**Funktionelle Charakterisierung von
apoplastischen Proteinen in
Brassica napus und *Arabidopsis thaliana*
nach Infektion mit *Verticillium longisporum***

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
„Doctor rerum naturalium“
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Christine Drübert
aus Volkmarsen

Göttingen 2011

Mitglieder des Betreuungsausschusses:

Prof. Dr. Andrea Polle,
Prof. Dr. Christiane Gatz

Referentin:

Prof. Dr. Andrea Polle

Korreferentin:

Prof. Dr. Christiane Gatz

Tag der mündlichen Prüfung:

18.04.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Das vaskuläre Pathogen <i>Verticillium longisporum</i>	1
1.2	Die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen.....	7
1.3	Die Rolle des pflanzlichen Apoplasts bei der Pathogenabwehr gegen vaskuläre Pathogene wie <i>Verticillium longisporum</i>	11
1.4	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Material.....	17
2.1.1	<i>Verticillium longisporum</i>	17
2.1.2	Pflanzen.....	17
2.1.3	Bakterien	19
2.1.4	Hefe (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	19
2.1.5	Standardchemikalien.....	19
2.1.6	Plasmide	19
2.1.7	Oligonukleotide.....	20
2.1.8	Antikörper	23
2.1.9	Nährmedien	23
2.1.9.1	Potato-Dextrose-Medium (PDB und PDA)	23
2.1.9.2	Wurzelmedium.....	23
2.1.9.3	Medien für Mikroorganismen	24
2.1.10	Geräte	26
2.1.11	Verbrauchsmittel.....	29
2.1.12	PC-Programme.....	30
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.2	Kultivierung von <i>Brassica napus</i>	31
2.2.3	Kultivierung von <i>Verticillium longisporum</i>	32
2.2.3.1	Herstellung von Stammkulturen <i>Verticillium longisporum</i>	32
2.2.3.2	Herstellung einer Sporenlösung von <i>Verticillium longisporum</i>	32
2.2.3.3	Wachstum von <i>Verticillium longisporum</i> im Xylemsaft von <i>Brassica napus</i>	32
2.2.3.4	Wachstum von <i>Verticillium longisporum</i> unter dem Einfluss von GLP3 produzierender Hefe	33
2.2.4	Infektion der Versuchspflanzen mit <i>Verticillium longisporum</i>	34

2.2.5	Gewinnung von Xylemsaft aus <i>Brassica napus</i> Pflanzen.....	34
2.2.6	Messung der Blattfläche von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.2.7	Ermittlung der Biomasse von <i>Arabidopsis thaliana</i>	35
2.2.8	Messung der Chlorophyllfluoreszenz	35
2.2.9	Bestimmung des Pigmentgehaltes	36
2.2.10	Elementanalyse durch Optische Emissionsspektrometrie mit einem induktiv gekoppelten Plasma.....	37
2.2.11	C/N-Analyse.....	38
2.2.12	Molekularbiologische Methoden	39
2.2.12.1	Extraktion pflanzlicher und pilzlicher genomischer DNA.....	39
2.2.12.2	Extraktion von Plasmid-DNA	39
2.2.12.3	Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren	40
2.2.12.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	40
2.2.12.5	Selektion homozygoter T-DNA-Insertionslinien mittels PCR	42
2.2.12.6	Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Molekülen	43
2.2.12.7	Aufreinigung von DNA durch Gel-Extraktion	44
2.2.12.8	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	44
2.2.12.9	Extraktion pflanzlicher RNA mit Trizol	46
2.2.12.10	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA-Molekülen	46
2.2.12.11	Verdau von genomischer DNA im RNA-Extrakt	47
2.2.12.12	cDNA-Synthese.....	47
2.2.12.13	Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)	48
2.2.12.14	Restriktionsspaltung.....	50
2.2.12.15	Herstellung transgener <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen.....	52
2.2.12.16	Selektion transgener Pflanzen	53
2.2.12.17	Herstellung eines Vektorkonstrukts für die Überexpression von glp3.....	54
2.2.12.18	Herstellung eines Vektorkonstrukts für die Komplementierung der T-DNA-Insertionslinie FLAG_412D02.....	56
2.2.12.19	Herstellung der Vektorkonstrukte für amiRNA-Pflanzen.....	56
2.2.12.20	Herstellung des Vektorkonstrukts für die GUS-Reporterpflanzen	59
2.2.12.21	Kultivierung und Transformation von <i>Escherichia coli</i>	61
2.2.12.22	Kultivierung und Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
2.2.12.23	Heterologe Expression eines pflanzlichen Proteins in Hefe	63
2.2.13	Biochemische Methoden.....	66
2.2.13.1	GUS-Färbung für die Expressionsanalysen in GUS-Reporterpflanzen.....	66
2.2.13.2	Proteinextraktion aus Pflanzen und Gelfiltration.....	66
2.2.13.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninic acid (BCA).....	67
2.2.13.4	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	68
2.2.13.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	68
2.2.13.6	Western Blot	70

2.2.13.7	Bestimmung der Aktivität der Guajakolperoxidase	71
2.2.13.8	Enzymatische Zuckerbestimmung	73
2.2.13.9	Aminosäurebestimmung	74
2.2.14	Anatomische und histologische Methoden	75
2.2.14.1	Einbettung in Styrol-Methacrylat	75
2.2.14.2	Herstellung von Semidünnschnitten mit Hilfe eines Mikrotoms	76
2.2.14.3	Herstellung von Schnitten mit dem Gefriermikrotom	77
2.2.14.4	Herstellung von gelatinierten Objektträgern	77
2.2.14.5	Färbung mit Toluidinblau	77
2.2.14.6	Licht- und Fluoreszenzmikroskopie	78
2.2.15	Statistik	78
3	Ergebnisse	79
3.1	<i>Analysen des Xylemsaftes von Brassica napus im Bezug auf potentielle antifungale Eigenschaften</i>	<i>79</i>
3.2	<i>Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten von Arabidopsis thaliana hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber Verticillium longisporum</i>	<i>86</i>
3.3	<i>Charakterisierung von Arabidopsis-Pflanzen mit konstitutiv erhöhter glp3-Expression hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber Verticillium longisporum</i>	<i>93</i>
3.4	<i>Komplementierung der glp3-Mutante</i>	<i>100</i>
3.5	<i>Charakterisierung von amiRNA-Pflanzen bezüglich der Sensitivität gegenüber Verticillium longisporum</i>	<i>102</i>
3.6	<i>Anatomische Untersuchungen von Arabidopsis-Wildtyp-Pflanzen sowie der glp3-Mutante hinsichtlich Verticillium-induzierter Veränderungen</i>	<i>105</i>
3.7	<i>Analyse von Promoter_{glp3}-GUS-Reporterpflanzen zur Lokalisierung der glp3-Expression in Arabidopsis thaliana</i>	<i>111</i>
3.8	<i>Untersuchung des Einflusses von heterolog produziertem GLP3 auf das Wachstum von Verticillium longisporum</i>	<i>117</i>
4	Diskussion	121
4.1	<i>Proteine aus dem Xylemsaft von Brassica napus weisen antifungale Eigenschaften auf</i>	<i>121</i>
4.2	<i>Eine Infektion mit Verticillium longisporum führt in Arabidopsis thaliana zur Produktion von hyperplastischem Xylem und zu einer Transdifferenzierung von Mesophyllzellen zu Gefäß-ähnlichen Elementen</i>	<i>126</i>
4.3	<i>GLP3 vermittelt in Arabidopsis thaliana Resistenz gegenüber Verticillium longisporum durch Einschränkung des Pilzwachstums</i>	<i>129</i>

5	Zusammenfassung.....	135
6	Literaturverzeichnis.....	139
	Anhang	164
	<i>Anhang A: Einfluss einer Infektion mit <i>Verticillium longisporum</i> auf die Aktivität des Photosystems II in <i>Arabidopsis thaliana</i></i>	<i>164</i>
	<i>Anhang B: Zusätzliche Bilder der GUS-Reporterpflanzen, Linie 3.....</i>	<i>167</i>
	<i>Anhang C: Querschnitte der VND7-Repressorlinien.....</i>	<i>169</i>
	<i>Anhang D: Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit.....</i>	<i>170</i>

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Col-0	Ökotyp Columbia von <i>Arabidopsis thaliana</i>
ddNTPs	Didesoxyribonukleotide
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
dpi	Days post infection = Tage nach Infektion
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	und andere (et alii)
ETI	Effector triggered immunity
ETS	Effector triggered susceptibility
FM	Frischmasse
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
GUS	β-Glucuronidase
kDA	Kilodalton
l	Liter
M	Molar = mol/l
MAMP	Microbe associated molecular pattern
max	maximal
min	minimal
MPa	Megapascal

MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Wiederholungen
NAD ⁺ / NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, oxidierte/reduzierte Form
NADP ⁺ / NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, oxidierte/reduzierte Form
RNA	RNA (Ribonukleinsäure)
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	Pathogen associated molecular pattern
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PR-Protein	Pathogenesis-related Protein
PS	Photosystem
PTI	PAMP-triggered immunity
qRT-PCR	Quantitative Real Time PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Laurylsulfat (engl. Sodium dodecyl sulfat)
T	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transferierte DNA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
VL43	<i>Verticillium longisporum</i> , Stamm 43
v/v	Volumenprozent (volume per volume)
Ws-2	Ökotyp Wassilewskija von <i>Arabidopsis thaliana</i>
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsprozent (weight per volume)
z. B.	zum Beispiel

Liste der in dieser Arbeit untersuchten Proteine und deren Abkürzungen

Abkürzung	Vollständiger Name des Proteins	AGI-Nummer
GAL	α -Galactosidase	At5g08370
GLP3	Germin-ähnliches Protein 3	At5g20630
LLP	Lektin-ähnliches Protein	At3g16530
POD34	Peroxidase 34	At3g49120
POD37	Peroxidase 37	At4g37530
POD52	Peroxidase 52	At5g05340
SCP	Serin-Carboxypeptidase	At4g12910

1 Einleitung

1.1 Das vaskuläre Pathogen *Verticillium longisporum*

Die Gattung *Verticillium*

Die verschiedenen Vertreter der Gattung *Verticillium*, zu denen auch das Pathogen *Verticillium longisporum* gehört, sind weit verbreitete bodenbürtige Pilze, die besonders in gemäßigten Zonen und in den Subtropen vorkommen (Pegg & Brady 2002, Fradin & Thomma 2006). Über 200 Pflanzenarten sind von den durch diese Pilze verursachten Krankheiten betroffen (Fradin & Thomma 2006). Zu der Gattung *Verticillium* gehören sechs phytopathogene Arten (Barbara & Clewes 2003). Hiervon sind *V. dahliae* Klebahn und *V. albo-atrum* Reinke & Berthold am weitesten verbreitet und bislang am besten untersucht. *V. albo-atrum* kommt beispielsweise an Hopfen, Tomate, Kartoffel und Luzerne vor (Heale 2000). Infektionen durch *V. dahliae* wurden an Tomate, Paprika, Kopfsalat, Melone, Kartoffel, Baumwolle, Sonnenblume, Artischocke, Weintrauben, Erdbeere, Flachs, aber auch an holzigen Pflanzen wie Olivenbäumen beobachtet (Pegg & Brady 2002, Gordon *et al.* 2006). Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Pilz *V. longisporum* wurde zunächst als Varietät von *V. dahliae* angesehen (s. unten). Die weiteren Arten, *V. tricorpus* Isaac, *V. nigrescens* Pethybridge, *V. nubilum* Pethybridge und *V. theobroma* Mason & Hughes sind für die Landwirtschaft nicht so bedeutend, da sie sehr schwach phytopathogen sind oder saprophytisch leben (Barbara & Clewes 2003).

Aufgrund der vegetativen Strukturen und neuerer genetischer Analysen wird die Gattung *Verticillium* phylogenetisch den filamentösen Ascomyceten und der Ordnung der Phyllachorales zugeordnet (Barbara & Clewes 2003, Hibbet *et al.* 2007). Da jedoch bisher keine Ascosporen, d. h. keine sexuelle Vermehrung, dokumentiert werden konnte, wird *Verticillium* auch zur Sammelgruppe der Deuteromyceten gezählt (Barbara & Clewes 2003).

Die Konidiophoren der *Verticillium*-Arten sind wirtelig angeordnet. Sie bilden längliche Phialiden, an deren Apex die Konidien entstehen (Fradin & Thomma 2006). Ein weiteres Merkmal von *V. dahliae* und *V. albo-atrum* ist die Produktion von Mikrosklerotien.

Hierbei handelt es sich um eine Überdauerungsform aus Aggregaten von stark melanisierten, dickwandigen Hyphen (Gordee & Porter 1985, Klimes & Dobinson 2006).

Verticillium longisporum

Seit den 1950er Jahren werden *Verticillium*-Isolate an Kruziferen beschrieben, die sich mikroskopisch hinsichtlich ihrer Sporenlänge von den anderen unterscheiden (Isaac 1957, Stark 1961). Zunächst wurden diese Isolate als Varietät von *V. dahliae* eingeordnet (Stark 1961). Aufgrund von morphologischen, physiologischen und molekulargenetischen Unterschieden wurde *V. longisporum* als neue Art vorgeschlagen (Karapapa *et al.* 1997, Karapapa & Typas 2001). Während die Konidiosporen von *V. longisporum* eine Länge von 7-9 µm aufweisen, sind die von *V. dahliae* mit einer Länge von 3,5 – 6 µm deutlich kürzer (Karapapa *et al.* 1997). Auch die Mikrosklerotien sind bei *V. longisporum* verlängert (Karapapa *et al.* 1997). Im Gegensatz zu *V. dahliae* und *V. albo-atrum* wurde bei *V. longisporum* zudem eine annähernde Verdopplung der DNA festgestellt (amphiaploid), was auf eine Herkunft der Art durch parasexuelle Hybridisierung von zwei *Verticillium*-Arten schließen lässt (Collins *et al.* 2003, Barbara *et al.* 2005, Karapapa *et al.* 2007). Um welche Arten es sich hierbei handeln könnte, ist noch unklar. Zunächst wurden *V. dahliae* und *V. albo-atrum* als Elternteile postuliert (Karapapa *et al.* 1997, Collins *et al.* 2003), aber durch Mikrosatellitenanalysen konnte *V. albo-atrum* als Elternteil ausgeschlossen werden (Barbara & Clewes 2003, Barbara *et al.* 2005).

Auch hinsichtlich der Pilz-Pflanze-Interaktion gibt es Unterschiede zwischen *V. longisporum* und *V. dahliae* bzw. *V. albo-atrum*. Während für die beiden letztgenannten ein vielfältiges Wirtsspektrum dokumentiert ist, wurde für *V. longisporum* eine Spezifität gegenüber der Pflanzenfamilie der *Brassicaceae* beschrieben (Karapapa *et al.* 1997, Zeise & von Tiedemann 2001, 2002a, 2002b). Auch die zu den *Brassicaceae* gehörende Modellpflanze *A. thaliana* kann unter Laborbedingungen von *V. longisporum* infiziert werden (Steventon *et al.* 2001, Veronese *et al.* 2003, siehe auch Abb. 1). Bislang ist nur in einer Studie beschrieben worden, dass auch Pflanzen anderer Familien in einem Gewächshausexperiment mit *V. longisporum* infiziert werden konnten (Johansson *et al.* 2006a).

Abb. 1: Symptome durch *V. longisporum*. Gestauchtes Wachstum von *B. napus* (A) und *A. thaliana* (B). Bei *A. thaliana* ist nach Infektion neben Chlorosen und asymmetrischem Wachstum (B) auch das Ausbleichen der Blattnervatur (C) zu beobachten. Auch hinsichtlich der photosynthetischen Quantenausbeute gibt es geringe Unterschiede zwischen infizierten und mock inokulierten Pflanzen, wie Falschfarbenbilder der Messungen der Quantenausbeute (D) zeigen (weitere Erläuterungen siehe Anhang A).

Die Symptome, die durch die verschiedenen Arten hervorgerufen werden, sind verschieden. Charakteristisch für Infektionen durch *V. dahliae* und *V. albo-atrum* ist das Auftreten von Welkeerscheinungen, weshalb die durch die genannten Arten verursachte Krankheit auch als Welkekrankheit oder *Verticillium*-Welke bezeichnet wird. Weiterhin können Chlorosen, Nekrosen, ein Ausbleichen der Blattnervatur sowie braune Verfärbungen im vaskulären Gewebe der Sprossachse auftreten, jedoch ist die Symptomatik und Ausprägung bei den verschiedenen Wirtspflanzen sehr unterschiedlich (Fradin & Thomma 2006). Bei einer Infektion durch *V. longisporum* konnten wir dagegen weder offensichtliche Anzeichen für ein Welken beobachten, noch wurden Hinweise auf eine eingeschränkte Wasser- und Nährstoffversorgung gefunden (Floerl *et al.* 2008, 2010, siehe Anhang D). Symptome bei einer Infektion mit *V. longisporum* sind Chlorosen der Blätter sowie eine verfrühte Seneszenz und ein damit einhergehendes vorzeitiges Abreifen der Pflanze (Karapapa *et al.* 1997, Eynck *et al.* 2007, siehe auch Abb. 1). Unter Gewächshausbedingungen ist außerdem ein gestauchtes Wachstum zu beobachten (Floerl *et al.* 2008, 2010, Häffner *et al.* 2010). Zudem verändert sich die Chlorophyllfluoreszenz geringfügig (Floerl *et al.* 2008, 2010, Abb. 1).

Der Lebenszyklus von *Verticillium*

Der Lebenszyklus der verschiedenen *Verticillium*-Arten ist sehr ähnlich (Zhou *et al.* 2006). Er ist eng gekoppelt an den Lebenszyklus der Wirtspflanze und wird eingeteilt in eine ruhende, eine parasitische und eine saprophytische Phase (Fradin & Thomma 2006).

Mikrosklerotien im Boden keimen in der Nähe von Pflanzenwurzeln durch Wurzelexsudate aus (Schreiber & Green 1963, Huisman 1982, Mol *et al.* 1995, siehe auch Abb. 2). Für *V. dahliae* wurde gezeigt, dass die Keimungsrate mit weiterem Abstand zur Pflanzenwurzel abnimmt (Mol & van Riessen 1995). Nach der Keimung wachsen die Hyphen des Pilzes gerichtet zur Pflanzenwurzel hin (Eynck *et al.* 2007). Der Eintritt in die Wurzel, bei dem der Pilz in die parasitische Phase seines Lebenszyklus übergeht, erfolgt durch direktes Penetrieren der Epidermis in der Wurzelhaarzone (Zhou *et al.* 2006, Eynck *et al.* 2007). In der Wurzel wächst der Pilz intra- und interzellulär durch die Cortextzellen weiter, bis er die Gefäße im Zentralzylinder erreicht. Hier kann *V. longisporum* zwar durch die Plasmodesmata in benachbarte Gefäße vordringen, jedoch beschränkt sich das Vorkommen des Pilzes meist auf einzelne Gefäße, während benachbarte Xylem-Elemente

vollständig frei von Hyphen sind (Eynck *et al.* 2007). Dies ist vermutlich einer der Gründe für das Fehlen der Welkesymptome bei einer Infektion durch *V. longisporum* (Floerl *et al.* 2008, 2010).

Abb. 2: Lebenszyklus der *Verticillium*-Arten (verändert nach Berlangier & Powelson 2000).

Im Xylem bildet der Pilz Konidiosporen, die sich mit dem Transpirationsstrom akropetal verbreiten (Beckman 1987, Gold *et al.* 1996). Wenn diese Sporen in Aushöhlungen und an den Enden von Gefäßen, den sogenannten „trapping sites“ (Heinz *et al.* 1998), hängen bleiben, keimen sie aus. Die Hyphen dringen in die nächsten Zellen vor, wo wiederum neue Sporen gebildet werden (Beckman 1987, Gold & Robb 1995, Gold *et al.* 1996, Heinz *et al.* 1998, Eynck *et al.* 2007). Der Pilz tritt in seine saprophytische Phase ein, wenn die Pflanze in die Seneszenz übergeht (Fradin & Thomma 2006). In diesem Stadium ist er nicht mehr nur auf das Leitgewebe beschränkt, sondern breitet sich in allen Zellen des absterbenden Gewebes aus. Hier bildet das Pathogen Mikrosklerotien, die mit den absterbenden Pflanzenteilen in den Boden gelangen (Schnathorst 1981, Mol & Scholte 1995, Neumann & Dobinson 2003). Während Konidien und Myzel des Pilzes nicht lange

überlebensfähig sind (Menzies & Griebel 1967, Galanopoulos & Tribe 1974), kann der Pilz in seiner ruhenden Phase in Form von Mikrosklerotien viele Jahre im Boden überdauern (Wilhelm 1955, Schnathorst 1981, Heale & Karapapa 1999).

Die Bedeutung von *Verticillium longisporum* für die Agrarwirtschaft

Zu der Familie der Brassicaceae, auf die *V. longisporum* spezialisiert ist, gehören viele ökonomisch bedeutende Pflanzen, unter anderem Raps (*Brassica napus* L. *oleifera*) (Karapapa *et al.* 1997, Zeise & von Tiedemann 2001, 2002a, 2002b). Infektionen durch *V. longisporum* an Raps werden in Nordeuropa seit den 1960er Jahren beschrieben (Svenson & Lerenius 1987, Zielinski & Sadowski 1995, Dixelius *et al.* 2005). *V. longisporum* konnte bisher in Schweden, Deutschland, Frankreich und Polen nachgewiesen werden (Karapapa *et al.* 1997, Zeise & von Tiedemann 2002a, 2002b). In Schweden stellt *V. longisporum* mittlerweile die bedeutendste Gefahr für den Rapsanbau dar (Dixelius *et al.* 2005). Aber auch in Deutschland nimmt die Bedrohung durch das Pathogen seit den 80er Jahren mit dem Rapsanbau zu (Daebeler *et al.* 1988, Krüger 1989, Günzelmann & Paul 1990, Zeise & Seidel 1990). Die verfrühte Abreife der Pflanzen durch die Infektion mit *V. longisporum* kann zu Ertragsverlusten zwischen 10 und 50 %, bei Einzelpflanzen sogar bis 80 % führen (Daebeler *et al.* 1988, Günzelmann & Paul 1990, Dunker *et al.* 2008). Der Ertragsverlust ist hauptsächlich durch das Aufplatzen der Schoten aufgrund der Notreife bedingt (Dunker & von Tiedemann 2005).

Aufgrund der Lebensweise im Leitgewebe der Wirtspflanze und der Überdauerung im Boden sind alle *Verticillium*-Arten schwer zu bekämpfen, da sie Fungiziden keine Angriffsfläche bieten (Fradin & Thomma 2006). Neben einer Vorbeugung der Krankheit durch eine breite Fruchtfolge (Pegg & Brady 2002) ist daher die einzige Möglichkeit, der Krankheit entgegen zu wirken, die Züchtung von resistenten Sorten. Für *B. napus* sind bisher keine resistenten Sorten bekannt, aber bei den nah verwandten Arten *B. oleracea* und *B. rapa* konnten resistente Genotypen identifiziert werden (Happstadius *et al.* 2003, Dixelius *et al.* 2005, Rygulla *et al.* 2007). In dieser Arbeit steht die Charakterisierung der pflanzlichen Abwehrreaktionen nach einer Infektion mit *V. longisporum* im Mittelpunkt. Die Erforschung einer solchen Pflanze-Pathogen-Beziehung kann Beiträge zur gezielten Züchtung von resistenten Pflanzen liefern („smart breeding“, Collard & Mackill 2008).

1.2 Die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen

Pathogene werden in biotrophe und nekrotrophe Pathogene eingeteilt. Während nekrotrophe Pathogene wie z. B. *Botrytis cinerea*, die pflanzlichen Zellen abtöten, leben biotrophe Pathogene in der Pflanze, ohne die Zellen gezielt zu töten (Pieterse *et al.* 2009). Einige Pathogene wechseln im Infektionsverlauf von einer biotrophen zu einer nekrotrophen Lebensweise. Zu diesen als hemibiotroph bezeichneten Pathogenen zählen auch die *Verticillium*-Arten (Fradin & Thomma 2006).

Des Weiteren wird bei der Pflanze-Pathogen-Beziehung zwischen einer kompatiblen und einer inkompatiblen Interaktion unterschieden. Bei einer inkompatiblen Interaktion kann das nichtadaptierte Pathogen eine Pflanze nicht befallen. Die Pflanze ist resistent gegenüber dem Pathogen und zeigt keine Symptome (Tao *et al.* 2003). Wenn eine ganze Pflanzenart oder -familie resistent gegenüber allen Isolaten eines Pathogens ist, so wird dies auch als Nicht-Wirts-Resistenz bezeichnet (Lipka *et al.* 2005). Wenn eine Pflanze suszeptibel gegenüber einem Pathogen ist und Symptome auftreten, handelt es sich um eine kompatible Interaktion (Tao *et al.* 2003). Daher ist die Interaktion zwischen *V. longisporum* und *B. napus* bzw. *A. thaliana* kompatibel.

Um eine Pflanze zu besiedeln und auszubeuten, müssen Pathogene eine Reihe basaler Schutzmechanismen überwinden. Dazu zählen zunächst mechanische Barrieren wie die Cuticula auf der Epidermis der Blätter sowie die Exo- und Endodermis in den Wurzeln. Beide Strukturen erschweren nichtadaptierten Pathogen das Eindringen in das pflanzliche Gewebe. Bei einer kompatiblen Interaktion haben die entsprechenden Pathogene diese ersten Abwehrmechanismen überwunden. Einige Pathogene nutzen zum Eintritt in die Pflanze offene Stellen wie Stomata oder Wunden. Das Auftreten von Nematoden im Boden kann beispielweise eine Infektion durch *Verticillium* verstärken, was sowohl auf die vermehrte Keimung von Mikrosklerotien durch austretende Wurzelexsudate als auch auf den erleichterten Eintritt des Pathogens in die Wurzel aufgrund der Verletzungen zurückgeführt wird (Fradin & Thomma 2006). Da solche natürlichen Eintrittsstellen selten sind, haben die Pathogene vielfältige Strategien entwickelt, um die Pflanzen zu penetrieren. Einige Pathogene sekretieren beispielsweise Enzyme, welche die Zellwand lysieren und so den Eintritt in die Zellen ermöglichen (Beliën *et al.* 2006), während andere sogenannte Appressorien ausbilden, in denen Druck aufgebaut wird, so dass die Epidermis durchbrochen werden kann. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Gattung *Magnaporthe*

(Ebbole 2007). *V. longisporum* bildet an der Eintrittsstelle an der Wurzel keine Appressorien. Jedoch sind die Hyphen in diesem Bereich leicht geschwollen (Eynck *et al.* 2007). Die biologische Relevanz dieser Schwellungen ist noch ungeklärt.

Wenn ein Pathogen eine Pflanze penetriert, reagiert diese mit einer Vielzahl von Abwehrreaktionen. Die Pflanze nimmt das Pathogen aufgrund des Auftretens eines sogenannten Pathogen- oder Microben-assoziierten molekularen Musters (Pathogen/Microbe Associated Molecular Pattern, PAMP oder MAMP) wahr (Jones & Dangl 2006). Die Pflanze bringt also bestimmte Moleküle mit einem Befall durch ein Pathogen in Verbindung. Hierbei handelt es vor allem um Pathogen-eigene Substanzen wie das Chitin und Ergosterol von Pilzen oder das Flagellin von Bakterien, die unter dem Begriff Elicitoren zusammengefasst werden (Schwessinger & Zipfel 2008). Aber auch pflanzliche Moleküle, die durch den Angriff des Pathogens entstehen, wie z. B. Bestandteile der durch das Eindringen des Pathogens zerstörten Zellwand, zählen zu den PAMPs (Ferrari *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass auch manche *Verticillium*-Arten Elicitoren und Phytotoxine produzieren (Dubery & Slater 1997, Wang *et al.* 2004, Mansoori & Smith 2005). In *V. dahliae* wurde ein Nep1-ähnliches Protein identifiziert, das vermutlich als Elicitor fungiert (Wang *et al.* 2004). *V. dahliae* produziert außerdem ein Zelltod-auslösendes Phytotoxin, das den Krankheitsverlauf in Baumwollpflanzen maßgeblich beeinflusst (Tian *et al.* 2010).

Da die PAMPs relativ unspezifisch sind und ganze Gruppen von Pathogenen umfassen, haben sich Pflanzen erfolgreich gegen viele Pathogene durchgesetzt. Man spricht von PAMP-vermittelter Immunität (PAMP-triggered immunity, PTI, Jones & Dangl 2006). Diese PTI ist darauf zurückzuführen, dass infolge der Wahrnehmung des Pathogens eine Reihe von Abwehrreaktionen in der Pflanze ausgelöst werden, die sich zum Teil überschneiden und sich gegenseitig beeinflussen können. An erster Stelle steht hierbei die Signaltransduktion, die über Kaskaden von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAP-Kinasen, Tena *et al.* 2001, Sanabria *et al.* 2008), durch Calcium (Blume *et al.* 2000, Boudsocq *et al.* 2010) sowie durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) wie H₂O₂ (Lamb & Dixon 1997, Apel & Hirt 2004) oder Stickstoffmonoxid (Beligni & Lamattina 2001) erfolgen kann. Anschließend kommt es zur Induktion von PR-Proteinen (pathogenesis-related proteins, van Loon *et al.* 2006), zum Schließen der Stomata (Melotto *et al.* 2006) und zur Synthese von Phytoalexinen (Van Etten *et al.* 1994,

Williams & Cooper 2003, Bednarek & Osbourn 2009). Bei den Phytoalexinen handelt es sich um sekundäre Metabolite des pflanzlichen Stoffwechsels, die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen (Van Etten *et al.* 1994). Auch für Kruzifereen wurde eine Vielzahl an Phytoalexinen beschrieben (Pedras *et al.* 2000), die bei der Interaktion mit *V. longisporum* eine Rolle spielen könnten. Tatsächlich konnte in Raps nach einer Infektion mit *V. longisporum* die Produktion von phenolischen Komponenten nachgewiesen werden (Eynck *et al.* 2009). Die Konzentration dieser Phenole war in resistenten Kultivaren höher als in suszeptiblen Pflanzen (Eynck *et al.* 2009). *A. thaliana* reagierte auf eine Infektion mit *V. longisporum* mit der Produktion von Camalexin (Iven 2009). Camalexin ist ein *A. thaliana*-spezifisches Phytoalexin und wurde als Resistenzfaktor gegenüber pilzlichen Pathogenen beschrieben (Thomma *et al.* 1999, Bednarek & Osbourn 2009). Da Mutanten, die kein Camalexin mehr bilden können, keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* aufweisen, müssen bei *A. thaliana* aber noch andere Faktoren bei der Erlangung einer Resistenz gegen das Pathogen eine Rolle spielen (Johansson *et al.* 2006b, Iven 2009).

Im Laufe der Evolution haben einzelne Pathogene Strategien entwickelt, um die PTI zu umgehen. Bei einzelnen Stämmen bestimmter Pathogene haben sich die PAMPs evolutiv verändert, so dass diese von den Rezeptoren der Pflanze nicht mehr erkannt werden. In anderen Fällen sekretieren die Pathogene zusätzliche Moleküle, welche den Signalweg und die Abwehrreaktionen stören oder bereits produzierte antimikrobielle Sekundärmetabolite oder ROS degradieren und sie so unschädlich machen. Solche Moleküle werden als Effektoren oder als Virulenz-Faktoren bezeichnet (Sanabria *et al.* 2008, Boller & He 2009). Auch in *V. dahliae* und *V. albo-atrum* wurden putative Effektoren identifiziert. So vermuteten Lee *et al.* (1992), dass *V. albo-atrum* in Tomate die Produktion der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) unterdrücken kann. PAL ist das Schlüsselenzym im Phenylpropanoid-Syntheseweg, von dem ausgehend verschiedene für die Abwehr wichtige Substanzen wie Lignin und Suberin gebildet werden (Do *et al.* 2007). Bei Untersuchungen des Proteoms von *V. dahliae* wurden in aggressiveren Isolaten mehrere Proteine identifiziert, von denen angenommen wird, dass diese die Abwehr der Wirtspflanze unterdrücken, z.B. Thioredoxin, welches ROS degradieren kann, sowie eine Isochorismatase, welche die Bildung von Salicylsäure inhibieren kann (El-Bebany *et al.* 2010). Des Weiteren kann *V. dahliae* Zellwand-abbauende Enzyme produzieren (Neumann

& Dobinson 2003, Tzima *et al.* 2010). Ob *V. longisporum* ebenfalls Effektoren sekretiert, ist bisher nicht bekannt.

Gegen eine durch Effektoren ausgelöste Suszeptibilität (effector triggered susceptibility, ETS) haben sich bei der Pflanze wiederum Resistenz-Gene (R-Gene) entwickelt, die zu einer Effektor-vermittelten Immunität (effector-triggered immunity, ETI) führen können (Jones & Dangl 2006). Solche Resistenz-Gene wurden auch nach Infektionen mit *V. dahliae* in verschiedenen Pflanzen induziert. In Tomate wurden beispielsweise die Resistenz-Gene Ve1 und Ve2 entdeckt, die u. a. mit Veränderungen im Phenylpropanoid-Metabolismus in Verbindung gebracht werden (Gayoso *et al.* 2010). In Baumwolle wurde GhHb1 als Resistenz-Gen identifiziert, welches durch *V. dahliae* induziert wird und bei Überexpression Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen vermittelt (Qu *et al.* 2006). Ebenfalls in Baumwolle konnte kürzlich gezeigt werden, dass NDR1 und MKK2 zu einer Resistenz gegenüber *V. dahliae* beitragen (Gao *et al.* 2011).

Neben den bisher beschriebenen Abwehrreaktionen spielen bei der Immunantwort auch die Pflanzenhormone eine wichtige Rolle. Die Signaltransduktion von Salizylsäure, Jasmonsäure und Ethylen führt zu einer Vielzahl von Abwehrreaktionen, wobei Salizylsäure vor allem mit biotrophen Pathogenen assoziiert wird, während nekrotrophe Pathogene und Herbivore sensitiv gegen Abwehrmechanismen sind, die durch Jasmonsäure und Ethylen hervorgerufen werden (Spoel & Dong 2008, Bari & Jones 2009, Pieterse *et al.* 2009).

Auch die Auxinkonzentration und Auxin-vermittelte Antworten in Pflanzen können durch Pathogene beeinflusst werden. Auxin ist das wichtigste Wachstumshormon in Pflanzen (Vanneste & Friml 2009). Es wurde nachgewiesen, dass es eine negative Rückkopplung zwischen Salizylsäure und Auxin gibt (Wang *et al.* 2007). Daher führt die Aktivierung von Abwehrreaktionen durch Salizylsäure häufig zu Wachstumseinschränkungen. Dies wird dadurch erklärt, dass Pflanzen ihre Ressourcen nicht gleichzeitig in Wachstum und in Abwehrprozesse investieren können. Manche Pathogene produzieren selbst Auxin. Dies wirkt sich negativ auf die Salizylsäure-regulierte Immunantwort aus, wodurch die Pflanze anfälliger wird (Wang *et al.* 2007).

Andere Phytohormone wie Abscisinsäure, Gibberellinsäure oder Cytokinin können sowohl als negative als auch als positive Regulatoren im Hinblick auf die Abwehrreaktionen

fungieren. Ihre Reaktion ist spezifisch für bestimmte Pflanze-Pathogen-Interaktionen (Bari & Jones 2009).

Auch durch die verschiedenen Vertreter der Gattung *Verticillium* wird der Hormonhaushalt beeinflusst. So wurden erhöhte Mengen von Salicylsäure im Xylemsaft von mit *V. longisporum* infizierten Raps-Pflanzen nachgewiesen (Ratzinger *et al.* 2009). Eine Infektion mit *V. dahliae* führte in Tomate zu einer Veränderung in der Auxin-Antwort (van Esse *et al.* 2009). Suszeptible Kultivare der Kartoffel produzierten nach Behandlung mit einem aus *V. albo-atrum* isolierten Toxin mehr Ethylen als resistente Kultivare. Daher wurde angenommen, dass *V. albo-atrum* den Ethylen-Signalweg induziert (Mansoori & Smith 2005). Auch bei der Interaktion zwischen *A. thaliana* und *V. longisporum* scheint die Symptomausprägung mit Ethylen in Verbindung zu stehen. Die Zusammenhänge des Wirkungsmechanismus konnten bisher jedoch noch nicht im Detail geklärt werden (Veronese *et al.* 2003, Tjamos *et al.* 2005, Johansson *et al.* 2006b, Tappe 2008, Pantelides *et al.* 2010).

1.3 Die Rolle des pflanzlichen Apoplasts bei der Pathogenabwehr gegen vaskuläre Pathogene wie *Verticillium longisporum*

Der Apoplast ist der extrazelluläre Raum in Pflanzen, in dem die wässrige Phase frei diffundieren kann. Dazu zählen das Zellwandkontinuum ebenso wie das Xylem und der Xylemsaft, nicht aber die Interzellularen. Die offensichtliche Funktion des Apoplastes, vor allem die des Xylems, ist der Transport von Wasser, Nährstoffen und organischen Metaboliten. Zusätzlich spielt der Apoplast eine wichtige Rolle im Bezug auf biotischen und abiotischen Stress (Polle *et al.* 1995, Bolwell *et al.* 2002). *V. longisporum* ist als vaskuläres Pathogen die meiste Zeit seines Lebenszyklus auf das Xylem seiner Wirtspflanzen beschränkt. Daher spielt der Apoplast bei dieser Interaktion eine besonders große Rolle. Auch Abwehrreaktionen seitens der Pflanze werden vor allem im apoplastischen Raum erwartet.

Bei den meisten Interaktionen findet im Apoplast der erste Kontakt zwischen Pflanze und Pathogen statt. An der Grenzfläche zum Apoplast, nämlich in der Plasmamembran, befinden sich die zur Wahrnehmung der PAMPs essentiellen Rezeptoren. Zudem ist der Apoplast auch an der Signaltransduktion mittels ROS oder in Form von Pflanzenhormonen beteiligt (Apel & Hirt 2004, Ratzinger *et al.* 2009). Auch die Alkalinisierung im Apoplast,

die als Folge von biotischem Stress gemessen wurde, wird als wichtiges Signal bei der Immunantwort postuliert (Felle *et al.* 2005).

Zu den Pathogen-induzierten Abwehrreaktionen gehören Verstärkungen der Zellwand (Lamb & Dixon 1997, Apel & Hirt 2004). In Reis wurde beispielsweise Resistenz gegen das vaskuläre, pathogene Bakterium *Xanthomonas oryzae* durch Verdickung der sekundären Zellwand der Xylem-Gefäße erreicht (Hilaire *et al.* 2001). Auch der Durchmesser der Xylem-Gefäße scheint in manchen Fällen wichtig für die Resistenz gegen Xylem-besiedelnde Pathogene zu sein. So korrelierte bei Ulmen, die von dem Pilz *Ophiostoma novo-ulmi* befallen waren, der Durchmesser der Gefäße positiv mit der Suszeptibilität (Solla & Gil 2002). Auch bei vielen der frühen Studien an *Verticillium*-infizierten Pflanzen standen anatomische und histologische Untersuchungen im Mittelpunkt. So wurde beispielsweise in Hopfen nach Infektion mit *V. albo-atrum* das Auftreten von Thyllen und die Bildung neuer Gefäße beschrieben (Talboys 1958). Thyllen sind Membranausstülpungen benachbarter parenchymatischer Zellen, welche die Gefäße blockieren können (Talboys 1958). Auch in anderen Pflanzenarten wurden nach Befall durch verschiedene *Verticillium*-Arten Okklusionen einzelner Xylem-Gefäße gefunden. Das Auftreten dieses Phänomens korreliert positiv mit der Resistenz (Talboys 1958, Bishop & Cooper 1984, Eynck *et al.* 2009). Daher wurde vermutet, dass durch den Verschluss der Gefäße eine weitere Kolonisierung durch das Pathogen verhindert wird (Fradin & Thomma 2006). Die Okklusionen werden nicht nur auf die bereits beschriebene Bildung von Thyllen, sondern auch auf die Produktion von gelartigen Ablagerungen zurückgeführt, die Kallose, Suberin oder Material der primären Zellwand enthalten können (Beckman 1987, Benhamou 1995, Pegg & Brady 2002, Eynck *et al.* 2009). So wurden beispielsweise in Tomate Kallose und Suberin in den Xylem-Gefäßen nach Infektion mit *V. dahliae* und *V. albo-atrum* gefunden (Beckman 1987, Robb *et al.* 1989, Gold & Robb 1995). Kallose-reiche Strukturen wurden auch in Gefäßen von mit *V. albo-atrum* befallenen Auberginen sowie in Wurzeln von Baumwollpflanzen nach Infektion mit *V. dahliae* beobachtet (Benhamou 1995, Daayf *et al.* 1997). Smit & Dubery (1997) fanden mehr Lignin und lignin-ähnliche phenolische Polymere in Baumwollpflanzen, die mit einem aus *V. dahliae* isolierten Elicitor behandelt waren, und vermuteten, dass die Verstärkung der Zellwand der Abwehr diene. Lignin-, Suberin- und Kalloseablagerungen fungieren jedoch nicht nur als mechanische Barrieren, sondern auch als Phytoalexine.

Elementarer Schwefel zählt aufgrund seiner antifungalen Eigenschaften ebenfalls zu den Phytoalexinen und wurde nach Infektion mit *V. dahliae* im Xylem von Kakao, Tomate und Baumwolle detektiert (Cooper *et al.* 1996, Williams *et al.* 2002, Williams & Cooper 2003). Neben den Veränderungen der Zellwand und den antimikrobiell wirksamen Phytoalexinen spielen bei der apoplastischen Immunantwort auch Proteine eine wichtige Rolle. Besonders relevant sind in diesem Zusammenhang PR-Proteine, die in den Apoplast sekretiert werden und dort Abwehrfunktionen übernehmen (van Loon *et al.* 2006). Einige Vertreter dieser Gruppe wie Chitinasen und Peroxidasen sind bereits in unbehandelten Pflanzen im Apoplast vorhanden und scheinen für eine Basis-Resistenz zu sorgen (Buhtz *et al.* 2004, Alvarez *et al.* 2005, Boudart *et al.* 2005, Kehr *et al.* 2005, Floerl *et al.* 2008). Bei dem Kontakt mit Pathogenen steigen die Mengen der PR-Proteine meist an. Außerdem werden zusätzliche PR-Proteine induziert. So wurden beispielsweise im Apoplast von Tomate nach Inkubation mit dem interzellulär wachsenden Pilz *Cladosporium fulvum* Chitinasen und eine 1,3- β -Glucanase nachgewiesen (Joosten & De Wit 1989). Nach einer Infektion mit dem vaskulären Pathogen *Xanthomonas oryzae* wurde in Reis eine Peroxidase in größeren Mengen gefunden (Young *et al.* 1995). Im Xylemsaft von Tomate wurde eine Änderung der Proteinzusammensetzung nach einer Infektion mit *Fusarium oxysporum* beobachtet, wobei neben bekannten PR-Proteinen zusätzlich ein neues PR5-Protein entdeckt wurde (Rep *et al.* 2002). Auch nach dem Kontakt mit *Verticillium* produzieren die Wirtspflanzen verschiedene Proteine, die mit Abwehrfunktionen assoziiert werden. Blattscheiben von Baumwolle akkumulieren Chitinasen und 1,3- β -Glucanasen infolge der Behandlung mit Zellwandfragmenten von *V. dahliae* (Dubery & Slater 1997). Die gleichen Proteine wurden in zwei Baumwoll-Kultivaren mit unterschiedlicher Suszeptibilität nach Infektion mit *V. dahliae* induziert (McFadden *et al.* 2001).

Veränderungen des extrazellulären Proteoms nach einer Infektion mit *V. longisporum* wurden bisher nur wenig untersucht. Im Xylemsaft und in der apoplastischen Waschflüssigkeit von Raps traten eine Endochitinase, eine basische 1,3- β -Glucanase, eine Peroxidase sowie ein PR4-Protein nach der Kolonisierung durch das Pathogen in größeren Mengen auf (Floerl *et al.* 2008). Ähnliche Analysen wurden in *A. thaliana* durchgeführt. In der apoplastischen Waschflüssigkeit wurden 7 differenziell auftretende Proteine identifiziert. Davon waren drei verschiedene Peroxidasen (POD34, POD37 und POD52), ein Germin-ähnliches Protein (GLP3), eine Serin-Carboxypeptidase (SCP) und eine α -

Galactosidase nach Infektion mit *V. longisporum* in erhöhten Mengen zu finden, während die Menge eines Lectin-ähnlichen Proteins (LLP) nach Pathogenbefall abnahm (Flörl 2007). Einige dieser Proteine werden mit Abwehrfunktionen und Zellwandmodifikationen in Verbindung gebracht. So können beispielsweise Peroxidasen im Allgemeinen durch die Produktion von Lignin und Suberin, Zellwandverstärkungen, Synthese von Phytoalexinen sowie durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine Rolle bei der Pathogenabwehr spielen (Almagro *et al.* 2009). Die in der Literatur diskutierten putativen Funktionen der einzelnen Proteine sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Putative Funktionen der im Apoplast von *A. thaliana* differenziell auftretenden Proteine nach Infektion mit *V. longisporum*.

Protein	Beobachtungen und vermutete Funktionen	Referenz
Peroxidase 34 (POD34), At3g49120	In Zellwandextrakten von sich streckenden Hypokotylen gefunden, daher Rolle bei der Zellstreckung vermutet	Irshad <i>et al.</i> 2008
	Wichtig für die Generierung von ROS bei Abwehrreaktionen	Bindschedler <i>et al.</i> 2006
	Katalysiert die Polymerisierung von Coniferyl- und Sinapylalkoholen <i>in vitro</i>	Demont-Caulet <i>et al.</i> 2010
	Erhöhte Expression nach Befall durch <i>Pseudomonas syringae</i>	Mohr & Cahill 2007
Peroxidase 37 (POD37), At4g37530	In älteren Teilen des Blütenstängels verstärkt exprimiert, daher Rolle bei der Polymerisierung von Monolignolen vermutet	Ehltting <i>et al.</i> 2005
Peroxidase 52 (POD52), At5g05340	Erhöhte Expression nach Befall durch <i>Pseudomonas syringae</i>	Mohr & Cahill 2007
	Erhöhte Expression nach Insektenbefall	Little <i>et al.</i> 2007
α -Galactosidase (GAL), At5g08370	Lokalisiert in Zellwand, Rolle bei Zellwandmodifikationen vermutet	Chrost <i>et al.</i> 2007
	α -Galactosidasen in Reis und Gerste mit Seneszenz assoziiert	Chrost & Krupinska 2000, Lee <i>et al.</i> 2009
Serin-Carboxypeptidase (SCP), At4g12910	keine bekannte Funktion, ähnlich einer JA-induzierbaren SCP in Tomate, einige SCPs involviert in der Produktion von Sekundärmetaboliten	Fraser <i>et al.</i> 2005
Lectin-ähnliches Protein (LLP), At3g16520	Chitin-induzierbar, andere LLPs können Chitin hydrolysieren	Ramonell <i>et al.</i> 2005
	Chitin-induzierbar	Zhang <i>et al.</i> 2002
	Lectine allgemein: können das Wachstum von Pathogenen <i>in vitro</i> inhibieren	Sharon & Lis 2004, Wong <i>et al.</i> 2010
Germin-ähnliches Protein (GLP3), At5g20630	Induzierbar durch <i>Colletotrichum higginsianum</i>	Narusaka <i>et al.</i> 2004
	Keine Oxalat-Oxidase-Aktivität <i>in vitro</i>	Membré <i>et al.</i> 2000
	Ektopische Überexpression verschiedener GLPs aus anderen Pflanzen vermitteln Resistenz	Schlesier <i>et al.</i> 2004, Knecht <i>et al.</i> 2010

Bei der Übersicht fällt auf, dass neben den Peroxidasen auch die α -Galactosidase mit Zellwandumgestaltungen und Wachstum assoziiert wird. Über die Funktionen der identifizierten Serin-Carboxypeptidase, des Lectin-ähnlichen Proteins und des Germin-ähnlichen Proteins ist bisher wenig bekannt. Jedoch weisen die wenigen vorhandenen Informationen, vor allem aber die Kenntnisse über die Funktionen von homologen Proteinen, auf eine Rolle bei der Pathogenabwehr hin. Die spezifische Wirkungsweise der verschiedenen Proteine in der Immunantwort gegenüber *V. longisporum* ist bisher unbekannt.

1.4 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Interaktion zwischen *Verticillium longisporum* und seinen Wirtspflanzen *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* wird innerhalb der DFG Forschergruppe 546 auf physiologischer, zellbiologischer und genetischer Ebene untersucht. Zudem werden sowohl für *V. longisporum* als auch für die Wirtspflanzen Interaktion-induzierte Veränderungen des Transkriptoms, des Proteoms und des Metaboloms analysiert. Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen dieser Forschergruppe durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung von apoplastischen Proteinen in *B. napus* und *A. thaliana* nach einer Infektion mit *V. longisporum* in Relation zu anatomischen Veränderungen und Krankheitssymptomen.

Bei *A. thaliana* wurden dafür T-DNA-Insertionslinien mit einer verringerten Expression der Zielgene überprüft. Dabei wurde eine *glp3*-Linie mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* identifiziert. Um die Rolle dieses Proteins für die *Verticillium*-Infektion näher zu untersuchen, wurden Pflanzen mit einer konstitutiv erhöhten und mit einer verringerten Transkriptmenge hergestellt und im Hinblick auf Krankheitssymptome wie die Veränderung der Blattfläche, der Biomasse und des Chlorophyllgehaltes sowie des Gehaltes an *Verticillium*-DNA im Pflanzengewebe analysiert.

Um zu überprüfen, ob es infolge einer *Verticillium*-Infektion in *A. thaliana* zu anatomischen oder histologischen Veränderungen kommt, sollten Querschnitte infizierter und nicht infizierter Pflanzen miteinander verglichen und auf Unterschiede hin untersucht werden.

Hinsichtlich der Xylemsaft-Proteine von *B. napus* bestand die Hypothese, dass die durch *V. longisporum* induzierten Proteine das Wachstum von *V. longisporum* direkt beeinflussen. Um diese Hypothese zu testen, sollte die Proliferation von *V. longisporum* in Xylemsaft von infizierten und nicht infizierten Pflanzen analysiert werden. Des Weiteren sollten die Xylemsaft-Proteine in Bioassays auf ihre wachstumshemmende Aktivität gegen *V. longisporum* hin untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Verticillium longisporum*

Verticillium longisporum, Stamm 43, wurde aus *Brassica napus* isoliert und von der AG Tiedemann zur Verfügung gestellt (Zeise & Tiedemann 2002).

2.1.2 Pflanzen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Raps (*Brassica napus* var. *napus*) und mit *Arabidopsis thaliana* L. (Ackerschmalwand) gearbeitet.

Bei dem Raps handelte es sich um „rapid cycling“ Raps. Dieser zeichnet sich durch einem kurzen Lebenszyklus aus und wurde speziell für Forschungszwecke gezüchtet (Williams & Hill 1986). Während die meisten *Brassica*-Arten einen 0,5 bis 2 Jahre andauernden Lebenszyklus aufweisen und zudem zur Blüh-Induktion eine Vernalisierung notwendig ist, geht der „rapid cycling“ Raps ohne Vernalisierung 3 – 4 Wochen nach der Keimung in die Blühphase über (Musgrave 2000). Die Samen für diese Pflanzen wurden von der AG Tiedemann zur Verfügung gestellt und stammen ursprünglich von P.H. Williams (University of Wisconsin-Madison, Crucifer Genetics Cooperative).

Bezüglich *Arabidopsis thaliana* wurden die Ökotypen Columbia und Wassilewskija verwendet. Zusätzlich wurde mit transgenen Pflanzen gearbeitet, in denen jeweils ein bestimmtes Gen oder dessen Promoterbereich mutiert ist (SALK- und FLAG-Linien). Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene transgene Pflanzen selbst hergestellt. Alle *A. thaliana* - Linien sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten *A. thaliana* - Linien sowie deren Eigenschaften und Herkunft.

Name	Eigenschaften	Herkunft
Columbia Col-0	Wildtyp	Nottingham Arabidopsis Stock Centre, University of Nottingham, Loughborough, UK, Scholl <i>et al.</i> 2000
Wassilewskija Ws-2	Wildtyp	
SALK_022520	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At4g37530 (pod37); Kan ^R	
SALK_024708	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At4g37530 (pod37); Kan ^R	
SALK_051769	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At3g49120 (pod34); Kan ^R	
SALK_055557	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At5g20630 (glp3); Kan ^R	
SALK_081257	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At5g05340 (pod52); Kan ^R	
SALK_089515	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At4g37530 (pod37); Kan ^R	
SALK_095638	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At4g12910 (scp); Kan ^R	
SALK_134497	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At5g08370 (gal); Kan ^R	
SALK_147839	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At4g12910 (scp); Kan ^R	
FLAG_561D11	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At3g16530 (llp); Basta ^R	Institut Jean-Pierre Bourgin, INRA Centre de Versailles, Versailles, Frankreich; Samson <i>et al.</i> 2002
FLAG_146D08	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At5g20630 (glp3); Basta ^R	
FLAG_412D02	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At5g20630 (glp3); Basta ^R	
FLAG_552G09	T-DNA-Insertionsmutante, betroffenes Gen: At3g16530 (llp); Basta ^R	
p35s::glp3 (Ws)	Überexpression von glp3 (At5g20630) im Ws-2 Ökotyp; Basta ^R	diese Arbeit
p35s::glp3 (<i>glp3</i>), Kompl., Linie 1 + 5	Komplementierung der Insertionslinie FLAG_412D02; Hyg ^R	
p _{glp3} ::GUS	Promoter::GUS-Reporterlinie, 3363 bp vor dem ATG von glp3, in Col-0; Hyg ^R	
p35s::amiRNA _{glp3} , A und B	amiRNA-Linien mit einem Konstrukt gegen glp3 im Col-0 Ökotyp; Basta ^R	

2.1.3 Bakterien

Die bei den Klonierungen sowie die für die Transformation von *A. thaliana* verwendeten Bakterien sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Bakterien, deren Eigenschaften und Herkunft.

Bakterium + Stamm	Eigenschaften	Referenz
<i>Escherichia coli</i> Stamm TOP TEN	F– <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK</i> <i>rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> Stamm DB 3.1™	F– <i>gyrA462 endA1</i> Δ (<i>sr1-recA</i>) <i>mcrB</i> <i>mrr hsdS20</i> (rB–, mB–) <i>supE44 ara-14</i> <i>galK2 lacY1 proA2 rpsL20</i> (SmR) <i>xyl-5 λ– leu mtl1</i>	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> Stamm GV3101	Helferplasmid: pMP90RK genomisch codiert: Rif ^R auf Helferplasmid codiert: Gem ^R ; Kan ^R	Koncz & Schell, 1986

2.1.4 Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*)

Für die heterologe Expression eines pflanzlichen Proteins wurde *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm INVSc1 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland; Genotyp *his3 Δ 1/his3 Δ 1, leu2/leu2, trp1-289/trp1-289, ura3-52/ura3-52*) verwendet, der auxotroph für Histidin, Leucin, Tryptophan und Uracil ist.

2.1.5 Standardchemikalien

Standardchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth, Sigma oder Fluka bezogen und stets mit dem höchstmöglichen Reinheitsgrad bestellt. Abweichungen bei einzelnen Produkten oder Spezifizierungen sind im Text in Klammern angegeben. Das zum Ansetzen von Puffern und Lösungen verwendete demineralisierte Wasser (ddH₂O) wurde mit Hilfe des Gerätes Satorius arium® 611VF (Sartorius, Göttingen, Germany) produziert. RNase-freies Wasser wurde von Ambion (Ambion Inc., Austin, USA) bezogen.

2.1.6 Plasmide

Die bei den Klonierungen für die spätere Herstellung der transgenen Pflanzen sowie für die heterologe Expression eines pflanzlichen Proteins in Hefe verwendeten Plasmide sind in der Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide, deren Eigenschaften und deren Herkunft.

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft/Referenz
pDONR201	Gateway-kompatibler Eingangsvektor mit attL1- und attL2-site, pUC ori, ccdB, Cm ^R , Km ^R	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
pE	Gateway-kompatibler Zielvektor mit attR1- und attR2-site, 35s Promoter, ccdB, Cm ^R , Km ^R , Basta ^R	AG Dröge-Laser
pGWB2	Gateway-kompatibler Zielvektor mit attR1- und attR2-site, 35s Promoter, ccdB, Cm ^R , Km ^R , Hyg ^R	Nakagawa <i>et al.</i> 2007
pCAMBIA1391Z	Vektor zur Herstellung eines Promoter::GUS-Konstruktes; Km ^R , Hyg ^R	www.cambia.org
pRS300	Vektor zur Produktion von artifiziellen microRNAs durch zielgerichtete Mutagenese, Amp ^R	MPI Tübingen, Schwab <i>et al.</i> 2006, Ossowski <i>et al.</i> 2008
pYES2CT	Expressionsvektor für Hefe, Amp ^R , URA3 Marker, <i>GAL1</i> Promoter, V5 epitope, 6x His-Tag (beides C-terminal)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer für die verschiedenen PCR-Reaktionen sind der Tabelle 5 zu finden. Sie wurden alle von der Firma Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) synthetisiert.

Tabelle 5: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Primer und deren Sequenz.

Bezeichnung	Sequenz in 5' - 3' Richtung
LP SALK_022520	CTAGTTTTGGATTCACGCAGC
RP SALK_022520	TGGATCCCACGATTAACAAAG
LP SALK_024708	GCCAAATAGGCATCAGTATGC
RP SALK_024708	TGGATCCCACGATTAACAAAG
LP SALK_051769	CCAGTAACATCACTGTTCGATGAG
RP SALK_051769	TCCGTTAGCGTTCCACATTAG
LP SALK_055557	TCAACCTCGAGAGTGATGGTC
RP SALK_055557	CAGCTAAACTCTGGGAAAGGC
LP SALK_081257	TGTTAGACTATTTCCGGGTCTTG

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
RP SALK_081257	TACGACGGAGTCTCTAGCAGC
LP SALK_089515	CCCGCCTATTTTGAATTTAATG
RP SALK_089515	TTCGGAAAGATTCAAGGTGAC
LP SALK_095638	CTTTTCTTTGTAGCGGGGATC
RP SALK_095638	CCTATGTTGATGAAGCTATCAATCAC
LP SALK_134497	TTTGATAGGGGAGTTTGGTTG
RP SALK_134497	ATACTTTTGCCAATGCCCAG
LP SALK_147839	TGCAGTGGGAAACTCTCATTC
RP SALK_147839	ATGGACCACAAAGGCATTATG
LP FLAG_561D11	TGTAGATAGCGGGTCTCCAAAC
RP FLAG_561D11	AACTAGATTTGCTTGAACCACATG
LP FLAG_146D08	TGTTTTACGAAAATTTGCATC
RP FLAG_146D08	CAGCTAAACTCTGGGAAAGGC
LP FLAG_412D02	TGCTCTTGTGTTCTTGGAGAAG
RP FLAG_412D02	ACTTTGGGTGTACGTACGTGG
LP FLAG_552G09	CATGTTTCTTACCAAACAACCTTG
RP FLAG_552G09	TTCTCTTGTGCTGAGAAAGC
LBb1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT
FLAG_tDNA_RB4	TCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC
FLAG_tDNA_Tag3	CTGATACCAGACGTTGCCCCGCATAA
FLAG_tDNA_LB4	CGTGTGCCAGGTGCCACGGAATAGT
FLAG_tDNA_Tag5	CTACAAATTGCCTTTTCTTATCGAC
Act2_DNA_fw	AATTTGGATCTGTGAACCTCCAC
Act2_DNA_rev	CGACACTACAAATCCTAAAGTTTCG
UBQ5_fw	GACGCTTCATCTCGTCC
UBQ5_rev	GTAAACGTAGGTGAGTCC
G1_At5g20630_for	CCTCAAAGCCCATCAGGTTA
G1_At5g20630_rev	ACCTCAGAAGCACCAGGATG
At5g20630_FW	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC ATGAAGATGATAATCCAAATTTTCTTC
At5g20630_RV	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC ATTAGTTCCCCCAAGCACACCC
Seq-L1-pDON-FW	CTCGCGTTAACGCTAGCATGGATCT

Bezeichnung	Sequenz in 5'-3' Richtung
Seq-L1-pDON-RV	GTAACATCAGAGATTTTGAGACAC
PstI-PromoterGLP3_fw	AAAAACTGCAGTTAACTTTATTATTATTAT AATCATTATAGCTGTTTCC
NcoI-PromoterGLP3_rev	TTTTTCCATGGTTCTTTAGAATGTTTTATAGA TAAGAGCTTTTG
Seq_PromoterGLP3_1	CGAGTTATATATGGACCATAATCACGTG
Seq_PromoterGLP3_2	AAAGTTAGATAGGTAAAGCAATAAAATCG
Seq_PromoterGLP3_3	GAGAGACTGAGGTGTTGTCCATGTC
Seq_PromoterGLP3_4	CTTATCTTTTTAGACATTTAATCTGGGC
Seq_PromoterGLP3_5	GCCTATACTGTAGACTGGATTGAG
Seq_pCambia1391Z_fw	GTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
Seq_pCambia1391Z_rev	GGGTCCTAACCAAGAAAATGAAGG
amiRNA_GW_PrimerA	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTC TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC
amiRNA_GW_PrimerB	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTC GCGGATAACAATTCACACAGGAAACAG
amiRNA_At5g20630_A_PrimerI	GATATGGTAGAATTTGGAGCGCTTCTCTCTT TTGTATTCC
amiRNA_At5g20630_A_PrimerII	GAAGCGCTCCAAATTCTACCATATCAAAGAG AATCAATGA
amiRNA_At5g20630_A_PrimerIII	GAAGAGCTCCAAATTGTACCATTTCACAGGT CGTGATATG
amiRNA_At5g20630_A_PrimerIV	GAAATGGTACAATTTGGAGCTCTTCTACATA TATATTCCT
amiRNA_At5g20630_B_PrimerI	GATCAAATGGTAGAATTTGGGGCTCTCTCTT TTGTATTCC
amiRNA_At5g20630_B_PrimerII	GAGCCCCAAATTCTACCATTGATCAAAGAG AATCAATGA
amiRNA_At5g20630_B_PrimerIII	GAGCACCAATTCTAGCATTTGTTACAGGT CGTGATATG
amiRNA_At5g20630_B_PrimerIV	GAACAAATGCTAGAATTTGGTGCTCTACATA TATATTCCT
GLP_Hefe_FW	TATAAAGCTTATGAAGATGATAATCCAAATT TTCTTCA
GLP_Hefe_REV	TATACTCGAGATTAGTTCCCCCAAGCACACC
Seq_pYES2-CT_FW	TATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGA
Seq_pYES2-CT_REV	TTAAACTCAATGGTGATGGTGATG

2.1.8 Antikörper

Für die Western Blot Analyse wurde der Antikörper Anti His (C-term) - AP Antibody von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) verwendet, welcher an Polyhistidin-Tags bindet und an eine alkalische Phosphatase gekoppelt ist.

2.1.9 Nährmedien

2.1.9.1 Potato-Dextrose-Medium (PDB und PDA)

Zur Kultivierung von *Verticillium longisporum* wurde Potato-Dextrose-Medium verwendet (Fahleson *et al.* 2003). Für flüssiges Medium wurden 6 g PDB (Potato Dextrose Brooth, Sigma, Steinheim, Deutschland) in 250 ml destilliertem Wasser angesetzt. Zur Herstellung von festem Medium wurde 39 g/l PDA (Potato Dextrose Agar, Difco Laboratories, Detroit, USA) verwendet. Sowohl flüssiges als auch festes Medium wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen mit 0,2 µg/ml steril filtriertem Streptomycin (Duchefa, Haarlem, Niederlande) versetzt.

2.1.9.2 Wurzelmedium

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* und *Brassica napus* erfolgte auf Wurzelmedium. Die Zusammensetzung des Mediums (siehe Tabelle 6) basiert auf den Angaben von Schenk und Hildebrandt (1972) für die Makronährelemente; die Konzentrationen der Mikronährelemente richten sich jedoch nach Gresshoff und Doy (1974), während die der Vitamine und der weiteren Zusätzen nach Murashige und Skoog (1962) verändert sind. Für 1 Liter des Mediums wurden folgende Volumina der bei 4°C gelagerten Stammlösungen verwendet: 100 ml der Makroelemente, je 1 ml der Mikroelemente, Vitamine und Glycin sowie je 5 ml Inosit und Eisen. Nach Zugabe der Saccharose wurde der pH-Wert mit NaOH auf 5,8 eingestellt. Anschließend wurde das Gelrite hinzugefügt, bevor das vollständige Medium autoklaviert wurde.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Wurzelmediums. Die Abkürzungen SH (Schenk und Hildebrandt), GD (Gresshoff und Doy) und MS (Murashige und Skoog) geben an, auf wessen Angaben die Konzentration der jeweiligen Stammlösung basiert (nähere Erläuterungen siehe Text).

Stammlösung	Bestandteil	Konzentration Stammlösung	Endkonzentration
Makroelemente SH	KNO ₃	247,28 mM	24,73 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	13,60 mM	1,36 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	16,23 mM	1,62 mM
	NH ₄ H ₂ PO ₄	26,08 mM	2,61 mM
Mikroelemente GD	H ₃ BO ₃	48,52 mM	48,52 µM
	Na ₂ MoO ₄	1,21 mM	1,21 µM
	KI	4,52 mM	4,52 µM
	MnSO ₄ x H ₂ O	59,16 mM	59,16 µM
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	10,43 mM	10,43 µM
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	1,05 mM	1,05 µM
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	1,00 mM	1,00 µM
Vitamine MS	C ₆ H ₅ NO ₂	4,06 mM	4,06 µM
	C ₈ H ₁₁ NO ₃ x HCl	2,43 mM	2,43 µM
	C ₁₂ H ₁₈ C ₁₂ N ₄ OS x H ₂ O	0,30 mM	0,30 µM
Glycin MS	C ₂ H ₅ NO ₂	26,64 mM	26,64 µM
Inosit MS	C ₆ H ₁₂ O ₆	110,99 mM	554,94 µM
Eisen MS	C ₁₀ H ₁₂ FeN ₂ NaO ₈	29,99 mM	99,97 µM
	Saccharose		25 g/l
	Gelrite (Duchefa, Haarlem, Niederlande)		2,8 g/l

2.1.9.3 Medien für Mikroorganismen

Für die Kultur der verschiedenen Mikroorganismen wurden folgende Medien hergestellt:

LB-Medium 10 g/l Bacto™Trypton
 5 g/l Bacto™Hefeextrakt
 10 g/l NaCl
 ggf. 15 g/l Bacto™Agar für festes Medium
 pH auf 7,4 einstellen und bei 121°C sterilisieren

SOB-Medium	20 g/l Bacto™Trypton 5 g/l Bacto™Hefeextrakt 0,6 g/l NaCl 0,2 g/l KCl ggf. 15 g/l Bacto™Agar für festes Medium pH auf 7,0 einstellen und bei 121°C sterilisieren; getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen hinzufügen: 10 ml/l 1 M MgCl ₂ 10 ml/l 1 M MgSO ₄
SOC-Medium	SOB-Medium + 40 ml/l 0,5 M Glucose Glucose-Lösung getrennt autoklavieren und nach dem Abkühlen zum Medium geben
YEB-Medium	5 g/l Fleischextrakt 1 g/l Bacto™Hefeextrakt 5 g/l Bacto™Pepton 5 g/l Saccharose ggf. 15 g/l Bacto™Agar für festes Medium
YPD-Medium	1 % Bact™Hefeextrakt 2 % Bacto™Pepton 2 % Dextrose (D-Glucose) ggf. 2 % Bacto™Agar für festes Medium
SD-Medium	0,67 % Yeast nitrogen base (YNB) ohne Aminosäuren, mit Ammoniumsulfat 2 % Zucker (Glucose, Galactose oder Raffinose) 0,077 % CSM (Complete Supplement Mixture) ohne Uracil; entspricht einer Endkonzentration von je 0,01 % Adenin, Arginin, Cystein, Leucin, Lysin, Theonin und Tryptophan sowie je 0,005 % Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin und Valin ggf. 2 % Bacto-Agar für festes Medium

BactoTMTrypton, BactoTMHefeextrakt, BactoTMAgar und BactoTMPepton wurden von der Firma Becton, Dickinson and Company (Sparks, USA), Fleischextrakt von Difco Laboratories (Detroit, USA), YNB von Sigma (Steinheim, Deutschland) und CSM von der Firma Mobitec (Göttingen, Deutschland) bezogen.

Zu Selektionszwecken wurden den Medien unterschiedliche Antibiotika zugesetzt (Tabelle 7). Dafür wurden Stammlösungen hergestellt und steril filtriert. Für Rifampicin wurde DMF als Lösungsmittel verwendet, während alle anderen Antibiotika in Wasser angesetzt wurden. Dem autoklavierten Medium wurde die entsprechende Menge des Antibiotikums nach dem Abkühlen zugesetzt. Alle Antibiotika wurden von der Firma Duchefa (Haarlem, Niederlande) erworben.

Tabelle 7: Liste mit den in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika.

Zusatz	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin Natriumsalz	100 mg/ml	100 µg/ml
Gentamycin-Sulfat	10 mg/ml	15 µg/ml
Hygromycin B	40 mg/ml	40 µg/ml
Kanamycin Monosulfat	50 mg/ml	50 µg/ml
Streptomycin-Sulfat	100 mg/ml	0,2 µg/ml
Rifampicin	100 mg/ml (in DMF)	50 µg/ml
Tetracyclin HCl	15 mg/ml	15 µg/ml

2.1.10 Geräte

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit benutzten Geräte aufgeführt:

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	HST 6x6x6	Zirbus, Osterode, Deutschland
Binokular	M205FA; Kamera: DFC420C	Leica, Solms, Deutschland
Chlorophyllfluoreszenz-Messgerät	Imaging Pam	Walz, Effeltrich, Deutschland
Digitalkamera	Coolpix S4	Nikon, Düsseldorf, Deutschland
Eismaschine	AF 100	Scotsman, Mailand, Italien

Gerät	Modell	Hersteller
Elektroporationsgerät		Bio-Rad, Hercules, USA
Gefriermikrotom	2800 Frigocut N	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Geldokumentationsanlage für Agarose-Gele	Fluor-S Multi Imager	Bio-Rad, Hercules, USA
Geldokumentationsanlage für SDS-Gele	FLA-5100	Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland
Gelelektrophoresekammer horizontal, für Agarose-Gele		Bio-Rad, Hercules, USA
Gelelektrophoresekammer vertikal, für SDS-Gele		Bio-Rad, Hercules, USA
Glassmesserbrecher	Knifemaker 7800	LKB, Stockholm, Schweden
Heizblock+Schüttler	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Heizplatte		Schütt, Göttingen, Deutschland
Klimakammer	HN 1 1660 73	Karl Weiss, Giessen, Deutschland
Klimaschrank	AR-75L	Percival Scientific, Perry, USA
Laborschüttler	3015 und 3017	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Lampen Klimakammer	Osram HQL-R 400 W	Osram, München, Deutschland
Lampen Klimaschrank	Leuchtstoffröhren F32T8/TL741, 700 series, 32 Watt	Philips, Hamburg, Deutschland
	Glühlampen 230 V 25 Watt	Osram, München, Deutschland
Magnetrührer	MR 2002	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Mikroskop	Axioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrotom für Semidünnschnitte	Autocut	Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland
Mikrowelle		Siemens, Berlin, Deutschland
PCR-Gerät	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Gerät für quantitative Real Time PCR	Light Cycler 480	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
pH-Meter	pH 526	WTW, Weilheim, Deutschland
Photometer	DU 640	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Photometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Photometer	Specord 205	Analytic Jena, Jena, Deutschland
Retschmühle		Retsch, Haan, Deutschland
Scanner	CanoScan4400F	Canon, Krefeld, Deutschland
Sequenziergerät	ABI Prism 3100 Genetic Analyser, 36 cm Kapillare Matrix, Pop6	Applied Biosystems, Foster City, USA
Spannungsgeber für Elektrophorese	Power Pac 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilbank	Microflow Biological Safety Cabinet	Nunc, Wiesbaden-Biebrich, Deutschland
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus, Schütt, Göttingen
Tischzentrifuge mit Kühlung	5417 R, Rotor F 45-30-11	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510 H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Ultrazentrifuge	J2-HS; Rotoren: JA-20.1, JA-20, JLA-16.250	Beckman Coulter, Fullerton, USA
UV-Handlampe		Krannich, Göttingen, Deutschland
UV-Tisch	MW 312 nm	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Waage, fein	BP 210 D	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage, grob	LA 6205	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Waage für Einwaage der C/N-Proben	Supermicro	Sartorius, Göttingen, Deutschland

Gerät	Modell	Hersteller
Wärmeschrank		Memmert, Büchenbach, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	arium ® 611	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad		Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Western Blot Anlage	Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
Zentrifuge für Mikrotiterplatten	5430 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zinnkapseln		HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland

2.1.11 Verbrauchsmittel

Im Folgenden sind alle in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel aufgelistet:

Produkt	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckgläschen, 24 x 40 mm, Stärke 1	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Erde T25	Fruhstorfer, Vechta, Deutschland
Fließpapier	Whatman, Kent, UK
Filter Vivaspin 6, 3000 MWCO	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gelatine-Kapseln (Größe 0)	Plano, Wetzlar, Deutschland
Glasmaterialien (Bechergläser, Flaschen, Erlmeyerkolben etc.)	Brand, Wertheim; Schott, Mainz
Glasmesser, 25 mm	Leica, Solms, Deutschland
Glasperlen, 0,5 mm (Soda Lime)	BioSpec Products, Bartlesville, USA
Handschuhe	VWR, Darmstadt, Deutschland
Kleber (Pattex Sekundenkleber Blitzkleber Gel)	Henkel, Düsseldorf, Deutschland
Kunststoff-Einwegmaterial (Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Spritzen, Petrischalen, Rührspatel etc.)	Brand, Wertheim; Eppendorf, Hamburg; Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Küvetten für Photometer	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland

Produkt	Hersteller
Küvetten für Elektroporation	Bio-Rad, Hercules, USA
Multiwell Plates + Folie	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Nitrocellulose-Membran (Protran, Porengröße von 0,2 µm, BA 83)	Whatman, Kent, UK
Objektträger, geschnitten, 76 x 26 mm	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Sand/Quarzkies weiß, Körnung fein 1-2 mm, Farbcode 220	Vitakraft, Bremen, Deutschland
Sephadex G-25 Säulen NAP 5	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Töpfe (7 x 7 x 8 cm und 11 x 11 x 12 cm)	Meyer, Rellingen, Deutschland
Zentrifugenbecher	Nalgene, New York, USA

2.1.12 PC-Programme

Mit den folgenden PC-Programme wurde gearbeitet:

Software	Hersteller
Adobe Reader 9.2.0	Adobe, Burlington, USA
Axioplan	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Bildanalyseprogramm 1.0.2.4	Datinf GmbH, Tübingen, Deutschland
Chromas Lite, Version 2.01	Technelysium, USA
Image J, Version 1.43	Rasband, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA, 1997 – 2009; http://rsb.info.nih.gov/ij/
Imaging Win Version 2.32	Walz, Effeltrich, Deutschland
Light Cycler 480 Real Time Software 1.5.0	Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland
Multi Analyst	Bio-Rad, Hercules, USA
Office 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Origin 7G	OriginLab Corp., Northampton, USA
Photoshop Elements 2.0	Adobe, Burligton, USA
Statgraphics Plus 2.1	Manugistics, Rockville, USA
Vector NTI	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana*

Die Anzucht von *Arabidopsis thaliana* für die spätere Infektion mit *V. longisporum* erfolgte unter sterilen Bedingungen auf Wurzelmedium. Hierfür wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert, indem sie in einem 2 ml Reaktionsgefäß in einer Calciumhypochlorid-Lösung (5 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$, 0,02 % Triton X-100) für 15 Minuten inkubiert wurden. Nach drei Waschschritten mit sterilem Wasser wurden die einzelnen Samen mit Hilfe einer zuvor durch Autoklavieren sterilisierte Pipettenspitze auf das Medium gelegt. Zur Stratifizierung wurden die Samen 3 Tage im Dunkeln bei 4°C inkubiert, bevor bei 20°C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ unter Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit) in einem Klimaschrank (AR-75L, Percival Scientific, Perry, USA) die Keimung induziert wurde. Samen des Ökotyps Columbia und die hiervon abstammenden transgenen Linien wurden 4 Wochen vor Infektion, Samen des Ökotyps Wassilewskija sowie die hiervon abstammenden transgenen Linien 3 Wochen vor Infektion ausgelegt und kultiviert.

Zur Samenvermehrung und Basta®-Selektion wurden die Samen unsteril direkt auf Erde (Typ T25, Fruhstorfer, Vechta, Deutschland) ausgelegt und nach 3tägiger Stratifizierung bei 4°C unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit) bei 20°C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ kultiviert.

2.2.2 Kultivierung von *Brassica napus*

Brassica napus wurde wie *A. thaliana* auf Wurzelmedium vorkultiviert. Die Samen wurden sterilisiert und ausgelegt wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Die Platten wurden direkt in den Klimaschrank überführt, wo die Keimlinge für 2 Wochen bei Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit) bei 20°C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ wuchsen, bevor sie mit *V. longisporum* infiziert, in ein Sand/Erde-Gemisch umgesetzt und unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht/ 8 Stunden Dunkelheit) weiterkultiviert wurden.

2.2.3 Kultivierung von *Verticillium longisporum*

2.2.3.1 Herstellung von Stammkulturen *Verticillium longisporum*

Zur Herstellung von Stammkulturen von *Verticillium longisporum* wurden 2 ml Aliquots einer Sporen enthaltenden Flüssigkultur des Pilzes (Konzentration: 2×10^6 Sporen pro ml) mit steriler Glycerin-Lösung (Endkonzentration: 20 % Glycerin) in einem Reaktionsgefäß vermischt, eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung einer Sporenlösung von *Verticillium longisporum*

Zum Animpfen von *Verticillium* Flüssigkulturen wurden 250 µl der Glycerin-Stammkulturen (siehe Punkt 2.2.3.1) in 250 ml flüssiges PDB-Medium gegeben. Die Sporenlösung wurde unter leichtem horizontalen Schütteln (80 rpm, G10 Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific, New Brunswick, USA) bei 22°C im Dunkeln kultiviert (Fahleson *et al.* 2003). Die Sporen keimten und Pilzmyzel wuchs heran, bevor sich nach ca. 14 Tagen neue Sporen in der Kultur entwickelten. Zur Isolierung der Sporen wurden die Flüssigkulturen zunächst durch ein Haushaltssieb mit einer Maschenweite von 0,5 mm (VWR, Darmstadt, Deutschland) gegeben, wodurch das Myzel von der Sporenlösung getrennt wurde. Das Medium, welches die Sporen enthielt, wurde 10 min bei $900 \times g$ (Rotanta 96 R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Sporen in Leitungswasser resuspendiert und bis zu der gewünschten Konzentration verdünnt. Die Sporenkonzentration wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer (VWR, Darmstadt, Deutschland) bestimmt, indem zunächst die Sporen in den Kleinquadraten der Zählkammer am Mikroskop gezählt wurden. Anschließend wurde die Anzahl der Sporen durch das Volumen der gezählten Quadrate dividiert. Das Ergebnis wurde mit 1000 multipliziert, um die Sporenanzahl bezogen auf 1 ml zu erhalten.

2.2.3.3 Wachstum von *Verticillium longisporum* im Xylemsaft von *Brassica napus*

Xylemsaft von *Brassica napus* wurde während eines Zeitraums von 25 bis 28 dpi gewonnen wie unter Punkt 2.2.4 beschrieben. 900 µl Xylemsaft wurde in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben, mit 100 µl einer *Verticillium*-Sporenlösung ($1,8 \times 10^5$ Sporen/ml) angeimpft und 3 Tage bei 20°C im Dunkeln unter leichtem horizontalem Schütteln bei 80 rpm (G10 Gyrotory Shaker, New Brunswick Scientific, New Brunswick,

USA) inkubiert. Das Experiment wurde mit dem Xylemsaft von infizierten und mit dem von mock inokulierten Pflanzen sowie mit Xylemsaft und PDB-Medium, dem 3 μM Salicylsäure (Sigma, Steinheim, Deutschland) zugegeben wurde, durchgeführt. Des Weiteren wurde Xylemsaft, aus dem alle Makromoleküle größer als 3 kDa gefiltert (Filter Vivaspin 6, 3000 MWCO, Sartorius, Göttingen, Deutschland) wurden, für den Versuch verwendet. In einem weiteren Ansatz wurde die Sporenlösung in PDB-Medium gegeben, welches 15 $\mu\text{g/ml}$ der herausgefilterten Xylemsaft-Proteine enthielt.

Nach der 3tägigen Inkubationszeit wurde das gewachsene Pilzmyzel durch 20 minütige Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C von dem Xylemsaft bzw. dem PDB-Medium Pilzmaterial getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und für weitere Analysen (Zucker, Aminosäuren) bei -80°C aufbewahrt. Aus dem Pellet wurde nach dem Aufmörsern des Materials die Pilz-DNA extrahiert (siehe Punkt 2.2.12.1). Die Quantifizierung der DNA erfolgt durch quantitative Real Time PCR (siehe Punkt 2.2.12.13).

2.2.3.4 Wachstum von *Verticillium longisporum* unter dem Einfluss von GLP3 produzierender Hefe

Um den Einfluss von GLP3 produzierender Hefe auf das Wachstum von *V. longisporum* zu untersuchen, wurden die Hefezellen aus einer Vorkultur (flüssiges SD-Medium ohne Uracil mit Glucose) in selektives Expressionsmedium (flüssiges SD-Medium ohne Uracil mit Galaktose) überführt. Das Volumen des Expressionsmediums wurde so gewählt, dass die Kultur nach dem Überimpfen eine OD_{600} von 0,8 aufwies. Die Hefe wurde bei 25°C unter leichtem Schütteln im Dunkeln einige Stunden inkubiert, bis sie eine OD_{600} von 1,5 erreicht hatte. Die Hefezellen aus dieser Kultur wurden auf festes SD-Medium (ohne Uracil mit Galaktose) aufgebracht, indem ein sterilisierter Glastrichter mit einem Durchmesser von 6 cm in die Kultur eingetaucht und leicht auf das Medium gedrückt wurde. In die Mitte der Agarplatten wurde eine runde Myzelscheibe von *V. longisporum* mit einem Durchmesser von 2 cm, welche einer vier Wochen alten Kultur des Pilzes auf Potato-Dextrose-Agar entnommen wurde, übertragen. Neben der GLP3 exprimierenden Hefe wurde auf zusätzlichen Platten der Einfluss von Hefe, die mit dem leeren Vektor (ohne *glp3*) transformiert worden war, getestet. Außerdem wurde das Wachstum von *V. longisporum* ohne Hefe-Ring untersucht. Die Platten wurden dazu bei 25°C im Dunkeln inkubiert und regelmäßig mit Hilfe eines Scanners (CanoScan4400F, Canon, Krefeld,

Deutschland) dokumentiert. Zur Quantifizierung des Wachstums wurde die Fläche des Pilzmyzels auf den digitalen Bildern mit Hilfe der Software Image J gemessen.

2.2.4 Infektion der Versuchspflanzen mit *Verticillium longisporum*

Die Infektion wurde während des Pikierens der Pflanzen durchgeführt. Die zuvor unter sterilen Bedingungen heran gewachsenen Keimlinge wurden vorsichtig mit einer Pinzette aus dem Agar gezogen. Um das Eindringen des Pilzes in die Pflanze gezielt zu verbessern und somit eine gleichmäßigere Infektion zu gewährleisten, wurden die Wurzeln mit einer Schere um 1/3 gekürzt. Dann wurden die Pflanzen mit ihren Wurzeln 5 Minuten in eine Sporenlösung mit einer Konzentration von 2×10^6 Sporen/ml (siehe Punkt 2.2.3.2) getaucht, so dass die Wurzeln mit der Sporenlösung benetzt waren. Anschließend wurden die Pflanzen in Töpfe (7 x 7 x 8 cm für *A. thaliana*, 11 x 11 x 12 cm für Raps) mit Erde (*A. thaliana*) bzw. in ein Gemisch aus 50 % Erde und 50 % Sand (v/v) (Raps) überführt, indem die Wurzeln mit 10 ml der Sporenlösung vorbereitete Pflanzlöcher gespült wurden. Die Sporenanzahl pro Topf betrug somit 2×10^7 . Für die Kontrollpflanzen wurde statt der Sporenlösung Leitungswasser verwendet.

Die Pflanzen wurden nach Inokulation bei 20°C, 60 % relativer Luftfeuchte und einer Lichtintensität von $120 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ weiter kultiviert. Bei *A. thaliana* handelte es sich hierbei um Kurztag-Bedingungen (8 Stunden Licht/16 Stunden Dunkelheit), während Raps unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) wuchs.

2.2.5 Gewinnung von Xylemsaft aus *Brassica napus* Pflanzen

Der Xylemsaft wurde mit Hilfe einer Scholander-Bombe gewonnen (Scholander 1965; Kruse *et al.* 2003). Dafür wurden die Wurzeln der Pflanzen zunächst 1 – 2 Minuten unter Leitungswasser ausgewaschen, um sie von Sand und Erde zu befreien. Anschließend wurden Wurzel und Spross jeder Pflanze oberhalb des Hypokotyls mit einer Rasierklinge voneinander getrennt. Die Schnittfläche wurde mit destilliertem H₂O abgespült. Die Pflanzenwurzel wurde locker in Aluminiumfolie eingehüllt und in den Zylinder der Druckbombe gehängt. Wenn die Kammer gut verschlossen und abgedichtet war, wurde der Druck in der Kammer langsam bis auf 2 bar erhöht. Der austretende Xylemsaft wurde abgenommen und über einen Zeitraum von 15 Minuten in einem sterilen Reaktionsgefäß auf Eis gesammelt, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.6 Messung der Blattfläche von *Arabidopsis thaliana*

Um die Fläche der Blattrosetten von *A. thaliana* zu quantifizieren, wurde wöchentlich die Blattfläche der Pflanzen gemessen. Hierfür wurden die Pflanzen mit einer Digitalkamera von oben fotografiert (Coolpix S4, Nikon, Düsseldorf, Deutschland). Die digitalen Bilder wurden mit einer speziell für diesen Zweck entwickelten Software (DatInf GmbH, Tübingen, Deutschland) analysiert. Die Software nimmt alle Pixel des Fotos eines zuvor gewählten Farbtons sowie bestimmter Helligkeit und Sättigung auf. So lässt sich die grüne Blattfläche von dem Hintergrund unterscheiden und anhand eines Maßstabs (Topfgröße) messen.

2.2.7 Ermittlung der Biomasse von *Arabidopsis thaliana*

Für die Bestimmung der frischen Biomasse wurde die Blattrosette direkt über der Erde mit einer Rasierklinge abgeschnitten und gewogen.

2.2.8 Messung der Chlorophyllfluoreszenz

Lichtenergie, die auf die Chlorophyllmoleküle in Photosystem I (PS I) und Photosystem II (PS II) trifft, kann im Bereich der Wellenlänge von 380 bis 700 nm (PAR = Photosynthetic Active Radiation) für die Photosynthese genutzt werden. Ein Teil der absorbierten Energie geht jedoch in Form von Wärme verloren oder wird als Fluoreszenz wieder emittiert. Dabei korreliert die Chlorophyll-Fluoreszenz negativ mit der Photosyntheserate (Maxwell & Johnson 2000). Anhand der Chlorophyll-Fluoreszenz können daher Rückschlüsse über die Photosyntheseleistung gezogen werden. Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz kann auch zur Detektion von biotischem oder abiotischem Stress verwendet werden (Maxwell & Johnson 2000).

Bei der Messung der maximalen Fluoreszenz mit einem IMAGING PAM (Walz, Effeltrich, Deutschland) wird ein 3 μ s andauernder, starker Lichtimpuls auf die Blattrosette appliziert. Dadurch sind die Photosysteme für einen kurzen Moment lichtgesättigt. Die weiter auftreffende Energie kann nicht mehr photosynthetisch genutzt werden, so dass die gesamte Energie in Form von Fluoreszenz emittiert wird. Aus der Differenz der maximalen Fluoreszenz F_m , die kurz nach dem Lichtblitz gemessen wird, und der Grundfluoreszenz im Dunkeln F_0 lässt sich die variable Fluoreszenz ($F_v =$

$F_m - F_0$) sowie die maximale photosynthetische Aktivität, die auch als maximale Quantenausbeute vom Photosystem II oder kurz als „Yield“ bezeichnet wird, berechnen:

Gleichung 1 $\Phi(\max) = (F_m - F_0)/F_m = F_v/F_m$

(Kitajima & Butler 1975, Roháček 2002)

Im Licht ist die Grundfluoreszenz größer, die maximale Fluoreszenz aufgrund der aktiven Photosynthese kleiner, die Differenz zwischen den Werten daher auch geringer. Die Quantenausbeute nimmt also in der Regel mit zunehmender Lichtintensität ab. Die Fluoreszenzwerte werden dann als F'_0 (Grundfluoreszenz) und F'_m (maximale Fluoreszenz) bezeichnet, mit denen sich analog zur Gleichung 1 die aktuelle Quantenausbeute ermitteln lässt:

Gleichung 2 $\Phi(\text{aktuell}) = (F'_m - F'_0)/F'_m$

(Maxwell & Johnson 2000)

In dieser Arbeit wurde die aktuelle und die maximale Quantenausbeute von infizierten und nicht infizierten Pflanzen anhand von Lichtkurven miteinander verglichen. Für die Erstellung von Lichtkurven wurde die Chlorophyllfluoreszenz bei Lichtintensitäten von 0, 20, 50, 100, 500 und 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ gemessen. Die Messungen wurden im Abstand von 5 Minuten durchgeführt, um eine Adaption der Pflanzen an die veränderten Lichtverhältnisse zu gewährleisten. Neben der Illustration anhand von Falschfarbenbildern, bei denen die Chlorophyllfluoreszenz der gesamten Rosette abgebildet wurde, wurde die mittlere Quantenausbeute (Yield) gegen die Lichtintensität aufgetragen und so als Kurve dargestellt.

2.2.9 Bestimmung des Pigmentgehaltes

Zur Bestimmung des Chlorophyll- und des Carotinoidgehaltes wurde das gefrorene Material gemahlen (Kugelmühle Typ MM 2, Retsch, Haan, Deutschland). 50 bis 60 mg Blattpulver wurden in Reagenzgläser eingewogen, mit je 4 ml 80 % (v/v) Acetonlösung versetzt, 30 Sekunden gemischt (Heidolph Reax 2000, Schwabach, Deutschland) und nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunkeln auf Eis 10 Minuten bei 4500 x g und

4°C zentrifugiert (Hettich Rotanta 96 R, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde in 1,6 ml Halbmikroküvetten aus Polystyrol (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) überführt. Die Absorption wurde bei den Wellenlängen $\lambda = 663$ nm für Chlorophyll a, $\lambda = 646$ nm für Chlorophyll b und $\lambda = 470$ nm für die Carotinoide photometrisch (Beckman DU 640, Fullerton, USA) bestimmt. Als Leerwert diente 80 % (v/v) Aceton. Um methodische Fehler auszuschließen, wurden drei technische Wiederholungen pro Probe durchgeführt.

Die Konzentrationen der Pigmente wurden mittels der Gleichungen 3 bis 6 mit den Extinktionskoeffizienten von Lichtenthaler & Wellburn (1983) berechnet:

Gleichung 3 Chlorophyll a [$\mu\text{g/ml}$] = $12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646}$

Gleichung 4 Chlorophyll b [$\mu\text{g/ml}$] = $20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663}$

Gleichung 5 Carotinoide [$\mu\text{g/ml}$] = $(1000 \cdot A_{470} - 3,27 \cdot \text{Chl a} - 104 \cdot \text{Chl b})/229$

Um die Pigmentmenge pro g Frischmasse zu bestimmen, müssen Extraktvolumen und die genaue Einwaage des Blattpulvers berücksichtigt werden:

Gleichung 6 Pigmentgehalt [$\mu\text{g/g}$ Frischmasse] =

$$\text{Pigment} [\mu\text{g/ml Extrakt}] \cdot V_e [\text{ml}] / \text{FM} [\text{g}]$$

A_x = Absorption bei der Wellenlänge x

Chl a = Konzentration an Chlorophyll a [$\mu\text{g/ml}$ Extrakt]

Chl b = Konzentration an Chlorophyll b [$\mu\text{g/ml}$ Extrakt]

Carotinoide = Konzentration der Carotinoide [$\mu\text{g/ml}$ Extrakt]

V_e = Extraktvolumen [ml]

FM = eingewogene Frischmasse [g]

2.2.10 Elementanalyse durch Optische Emissionsspektrometrie mit einem induktiv gekoppelten Plasma

Die Bestimmung der Konzentration verschiedener Elemente im Myzel von *V. longisporum* sowie im Xylemsaft aus Raps-Pflanzen erfolgte durch Optische Emissionsspektrometrie mit einem induktiv gekoppelten Plasma (Inductively Coupled Plasma - Optical Emission

Spectrometry, ICP-OES; Spectroflame, Spectro Analytical Instruments, Kleve, Deutschland). Um die Elemente aus dem Pilz-Myzel zu messen, wurden die Proben mittels Druckaufschluss vorbereitet. Hierbei wurden 50 mg des getrockneten Materials mit 2 ml einer 65%igen HNO₃-Lösung versetzt und in einem Trockenschrank 12 Stunden bei 137°C inkubiert. Die abgekühlten Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt. Der Xylemsaft wurde ohne weitere Vorbereitung für die Messung benutzt.

Während der ICP-OES wird die Probe atomisiert, gleichzeitig in einen angeregten Zustand versetzt und ionisiert. Diese Vorgänge finden in mehrere Tausend Kelvin heißem Argon-Plasma statt, d.h. in einem ionisierten Gas, in dem sich positiv geladene Argon-Ionen und negativ geladene Elektronen durch ein angelegtes elektromagnetisches Feld gegenläufig bewegen. Die Bestandteile der zugegebenen Probe folgen der Bewegungsrichtung der anderen Ladungsträger durch die verschiedenen heißen Zonen des Plasmas. Ein angeschlossenes Spektrometer detektiert die dabei von der Probe emittierten Lichtquanten. Da die Wellenlänge dabei für jedes Element spezifisch ist, lassen sich Rückschlüsse über die stoffliche Zusammensetzung der Probe und Anteile der einzelnen Bestandteile ziehen.

Die Messungen wurden von der Abteilung Ökopedologie der gemäßigten Zonen im Büsgen-Institut der Universität Göttingen durchgeführt.

2.2.11 C/N-Analyse

Für die Bestimmung des Kohlenstoff- und des Stickstoff-Gehaltes im Myzel von *V. longisporum* wurden 650 bis 900 µg des getrockneten, gemahlenen Materials in eine Zinnkapsel (HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland) eingewogen (Supermicro, Sartorius, Göttingen, Deutschland) und in einem Elementanalysator (Elemental Analyser EA-1108, Carlo Erba Instruments, Rodano, Italien) gemessen. In diesem Gerät werden die Moleküle bei 1020 °C und in Anwesenheit eines Oxidationskatalysators (Chrom-III-Oxid) unter Zugabe von Sauerstoff aufgespalten und zu N₂, CO₂ und H₂O reduziert, während im Verbrennungsrohr befindliches reduziertes Kupfer oxidiert wird. Die entstandenen Verbindungen werden anschließend chromatographisch aufgetrennt. An die Säule angeschlossen ist ein Wärmeleitfähigkeitsdetektor, der elektrische Signale an einen Integrator weiterleitet. Die durchlaufenden Elemente verändern die Temperatur und somit die Leitfähigkeit dieses Detektors, was sich auch in den abgegebenen Signalen widerspiegelt. Durch Integration der Flächen unter den aufgezeichneten Kurven konnte die

Gesamtkonzentration der Elemente Stickstoff und Kohlenstoff in der Probe berechnet werden. Als Standard diente Acetanilid (C_8H_9NO , HEKAtech GmbH, Wegberg, Deutschland).

2.2.12 Molekularbiologische Methoden

2.2.12.1 Extraktion pflanzlicher und pilzlicher genomischer DNA

Für die Extraktion genomischer DNA wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Methoden verwendet.

Die DNA-Extraktion von gemahlenen Proben von *A. thaliana* Pflanzen für die spätere Messung der *Verticillium*-DNA erfolgte mittels quantitativer Real Time PCR (siehe Punkt 2.2.12.13) mit dem DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) nach den Anweisungen des Herstellers.

Für die DNA-Extraktion aller anderen Proben wurde die Methode von Schneidereit (2005, abgewandelt nach Aitchitt *et al.* 1993) verwendet. Hierbei wurden zwischen 100 und 200 mg des gefrorenen Pflanzenmaterial bzw. das Pilzmyzel nach dem Mahlen mit 400 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % (v/v) SDS) versetzt. Nach gründlichem Durchmischen wurden die Proben für 3 Minuten bei 20000 x g zentrifugiert (5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). 300 µl des Überstands wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 300 µl Isopropanol wurden die Proben einige Male invertiert und anschließend 2 Minuten bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 20000 x g für 5 Minuten wurde der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet unter Vakuum für 5 Minuten bei 37 °C (Eppendorf Concentrator 5301) getrocknet. Die DNA wurde in der Regel in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert. Nur die aus *V. longisporum* extrahierte DNA, die mittels qRT-PCR quantifiziert werden sollte (siehe Punkt 2.2.12.13), wurde in destilliertem Wasser gelöst. Alle Proben wurden bis zur weiteren Bearbeitung bei – 20°C gelagert.

2.2.12.2 Extraktion von Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Zellen werden bei dieser Methode basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse (Le Gouill *et al.* 1994) aufgeschlossen.

Anschließend wird die DNA in mehreren Schritten über eine DNA-affine Säule konzentriert und gesäubert, bevor sie eluiert wird. Die Ausbeute an DNA lag mit dieser Methode unter Verwendung einer 5 ml Übernachtskultur bei etwa 200 - 400 ng/μl DNA.

2.2.12.3 Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden mit Hilfe eines Photometers (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Nach der Eichung des Geräts auf die Absorption von Wasser wurde die 1:50 mit Wasser verdünnte Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm gemessen. Eine optische Dichte (optical density = OD) von 1,0 entspricht hierbei einer Nukleinsäurekonzentration von 50 μg/ml H₂O für doppelsträngige DNA, 33 μg/ml H₂O für einzelsträngige DNA sowie 40 μg/ml H₂O für RNA. Da die aromatischen Seitenketten einiger Aminosäuren bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm ihr Absorptionsmaximum haben, kann durch eine zusätzliche Messung der Absorption bei dieser Wellenlänge und anschließender Bildung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ zudem eine Aussage über die Reinheit der Probe getroffen werden. Bei sauberen DNA-Extrakten liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0. Bei Messungen der RNA-Konzentration sollte der Wert für OD₂₆₀/OD₂₈₀ größer als 2 sein.

Für die Messung der Nukleinsäuren wurden 2 μl der Probe in 98 μl steriles, destilliertes Wasser gegeben. Nur Proben, bei denen die Reinheit durch Bestimmung des Quotienten OD₂₆₀/OD₂₈₀ nachgewiesen werden konnte, wurden weiter verwendet.

2.2.12.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction = PCR) ist eine Methode, mit der DNA-Fragmente *in vitro* amplifiziert werden können (Mullis & Faloona 1987). Bei dieser Methode wird eine thermostabile DNA-Polymerase (*taq*-Polymerase) eingesetzt, die einzelsträngige DNA zu einem Doppelstrang verlängern kann, wenn ein kurzer doppelsträngiger Startbereich vorliegt. Die Startpunkte werden durch Zugabe bestimmter Oligonukleotide, sogenannter Primer, definiert, welche mit der einzelsträngigen DNA-Matrize hybridisieren. Die Zusammensetzung für eine PCR-Reaktion ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Allgemeiner Ansatz für eine PCR. Bei der Taq-Polymerase, dem zugehörigen PCR-Puffer, MgCl_2 sowie den dNTPs handelt es sich um Produkte der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland).

Substanz	Volumen [μl]	Konzentration der Stammlösungen
PCR-Puffer	2,5	10x
dNTP-Mix	0,5	100 mM
MgCl_2	2,0	25 mM
Primer 1	1,0	10 pmol/ μl
Primer 2	1,0	10 pmol/ μl
Taq-Polymerase rec.	0,5	5u/ μl
H_2O	16,5	
DNA/Probe	1,0	300 – 500 ng/ μl
Gesamt	25,0	

Für die Amplifizierung der DNA werden die beiden Stränge der DNA zunächst durch Erhitzen voneinander getrennt (Denaturierung). Während einer kurzen Abkühlungsphase lagern sich die Primer an den codierenden oder codogenen Strang des aufgeschmolzenen DNA-Fragmentes (Annealing). Anschließend werden durch die Taq-Polymerase komplementäre desoxy-Nukleotidtriphosphate (dNTPs) an die Primer gehängt, was zu einer Verlängerung des neuen DNA-Stücks in 3'-Richtung führt (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Schritte (Zyklus) wird die vorhandene DNA vervielfältigt.

In der Regel wurde die DNA durch folgendes PCR-Programm amplifiziert:

1. Initiale Denaturierung: 1 min bei 93°C
 2. Denaturierung: 30 s bei 93°C
 3. Primer-Annealing: 30 s bei $T_m - 3^\circ\text{C}$
 4. Elongation: 30 s bei 72°C
 5. Finale Elongation: 1 min bei 72°C
 6. Hold 4°C
- } 30 x

Der Ablauf des PCR-Programms muss bei jeder PCR überprüft werden, da die Annealing-Temperatur und die Elongationszeit angepasst werden müssen.

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von den benutzten Primern und ist deshalb variabel. Im Allgemeinen ist sie 3°C geringer als die Schmelztemperatur T_m . Diese ist definiert als die Temperatur, bei der 50% des Primer-DNA-Komplexes dissoziiert sind. Ist die Annealing-Temperatur zu hoch, kann der Primer nicht an die DNA binden, wodurch die Amplifizierung inhibiert wird. Bei einer zu geringen Annealing-Temperatur kommt es zu unspezifischen Hybridisierungen und somit zu unspezifischen Produkten. Bei der Berechnung der Schmelztemperatur spielt die Länge des Primers und das Verhältnis der Nukleobasen Guanin und Cytosin zu Adenin und Thymin eine Rolle: Guanin und Cytosin sind über 3 Wasserstoffbrücken verbunden, Adenin und Thymin nur durch 2. Daher nimmt die Schmelztemperatur mit einem steigenden Anteil an Guanin und Cytosin zu. Die Annealing-Temperatur kann mit folgender Formel berechnet werden:

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\%GC) - 650/n \quad (\text{Bolton \& McCarthy 1962})$$

Die Elongationszeit ist abhängig von der Länge des zu vervielfältigenden DNA-Stückes und der Effizienz der benutzten Polymerase. In der Regel werden 1000 desoxy-Nukleotidtriphosphate pro Minute durch die Polymerase angehängt. Daher reicht für die meisten PCRs eine Elongationszeit von 20-30 Sekunden aus. Für die Isolierung von cDNAs oder Promotern für die anschließende Klonierung wird die Zeit verlängert, da DNA-Fragmente von mehreren Kilobasen amplifiziert werden. Die Temperatur während der Denaturierung und der Elongation ist ebenfalls abhängig von der verwendeten Polymerase und ist den Angaben des Herstellers des Enzyms zu entnehmen.

Bei der PCR zur Selektion von homozygoten T-DNA-Insertionslinien (siehe Punkt 2.2.12.5) sowie bei der Kontroll-PCR nach dem Verdau von genomischer DNA in RNA-Extrakten (siehe Punkt 2.2.12.11) wurde mit einer Annealing-Temperatur von 57°C gearbeitet. Die PCR für die Isolierung von *glp3* für die Klonierung (siehe Punkt 2.2.12.17) lief mit einer Annealing-Temperatur von 49°C für die ersten fünf Zyklen, während der restlichen Zyklen wurde die Annealing-Temperatur auf 70°C erhöht. Abweichend vom oben angegebenen Programm wurde hierbei auch die Elongationszeit auf 1,5 Minuten verlängert.

2.2.12.5 Selektion homozygoter T-DNA-Insertionslinien mittels PCR

Die T-DNA-Insertionslinien (Herkunft siehe Tabelle 2) wurden auf Erde unter Langtagbedingungen angezogen. Zur Selektion von homozygoten Pflanzen der

verwendeten T-DNA-Insertionslinien wurden nach der Extraktion genomischer DNA (siehe Punkt 2.2.12.1) zwei PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Primer-Kombinationen durchgeführt. Für den ersten PCR-Ansatz wurden genspezifische Primer verwendet, die rechts (RP) und links (LP) von der T-DNA Insertionsstelle binden. War die untersuchte Pflanze heterozygot oder Wildtyp, so wurde bei der PCR ein Amplikon um 1000 bp produziert. War die Insertion homozygot, entstand bei der PCR dagegen kein Produkt. In der zweiten PCR-Reaktion wurde der RP Primer mit einem weiteren Primer kombiniert, der mit der inserierten T-DNA hybridisiert, so dass die entsprechende Sequenz nur amplifiziert wird, wenn die getestete Pflanze homozygot oder heterozygot ist.

Die für die verschiedenen T-DNA Insertionslinien spezifischen RP- und LP-Primer wurden mit Hilfe des Primerdesign-Tools der SIGnAL-Webpage (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>) konzipiert und sind in der Tabelle 5 aufgelistet. Welcher Primer für die T-DNA verwendet wurde, ist abhängig von der jeweiligen Linie. Für alle SALK-Linien wurde der Primer LBb1 verwendet. Da die FLAG-Linien mit einem anderen Plasmid transformiert worden sind, müssen für diese Linien andere Primer, nämlich RB4 oder Tag3 (Right Border) bzw. LB4 oder Tag5 (Left Border), verwendet werden (siehe Tabelle 5).

2.2.12.6 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Molekülen

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen nach ihrer Größe (McDonell *et al.* 1977, Southern 1979). Da das Zucker-Phosphat-Rückgrat von DNA negativ geladen ist, wandern diese im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto schneller bewegen sie sich im elektrischen Feld vorwärts. Als Gelmatrix dient Agarose (Agarose Seakem LE, Cambrex, Rockland, USA), ein gelierfähiges Polysaccharid. Die Agarosekonzentration beeinflusst die Porengröße: je höher die Agarosekonzentration, desto kleiner die Poren, desto besser werden kleine Moleküle aufgetrennt. Zur Auftrennung großer DNA-Fragmente (z. B. Plasmide) wurde in dieser Arbeit daher ein 1%iges Gel benutzt, während kleine DNA-Moleküle (z.B. PCR-Produkte) in höherprozentigen Gelen separiert wurden. Als Lösungsmittel für die Agarose sowie als Laufpuffer diente 1 x TBE-Puffer (89 mM Tris ultra, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA; pH 8,0-8,3).

Für ein Gel wurde die entsprechende Menge Agarose in TBE-Puffer in einer Mikrowelle bei 600 Watt so lange erwärmt, bis sie gelöst war. Die Lösung wurde mit 1 µl Ethidiumbromid (3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridiumbromid) versetzt und in die vorgesehenen Gelträger gegossen. Ethidiumbromid dient der späteren Visualisierung der DNA, da es an DNA-Moleküle bindet, wodurch diese nach Anregung mit ultraviolettem Licht fluoreszieren.

Das polymerisierte Gel wurde in einer Elektrophorese-Kammer plziert (Bio-Rad, Hercules USA) und mit den Proben beladen, welche zuvor mit Ladepuffer (57,5 % (w/v) Glycerin, 1% (w/v) SDS, 100 mM EDTA, 89 mM Tris ultra, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt wurden. Durch den Farbstoff Bromphenolblau im Puffer konnte die Fortbewegung der Proben im Gel nachvollzogen werden. Neben den Proben wurde auch ein Marker mitgeführt, der als Größenvergleich diente, so dass die Größe der DNA-Fragmente aus den Proben abgeschätzt werden konnte (Gene Ruler, Gene Ruler Plus oder 1kbLadder von Fermentas, je nach der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente). Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 20 bis 40 Minuten. Danach wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert (Fluor-S Multi Imager, Bio-Rad, Hercules, USA).

2.2.12.7 Aufreinigung von DNA durch Gel-Extraktion

Um verschiedene DNA-Fragmente voneinander zu trennen und von Primern oder Enzymen zu befreien, wurde die Probe über ein Agarose-Gel bei 100 V aufgetrennt (siehe Punkt 2.2.12.6). Die gewünschten Banden wurden mit Hilfe einer UV-Handlampe (Krannich, Göttingen, Deutschland) visualisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und aufgereinigt (Extraction Kit 50 QIAquick, Qiagen, Hilden, Deutschland).

2.2.12.8 Sequenzierung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierung der DNA wurde ein Verfahren verwendet, das auf dem kontrollierten Abbruch der DNA-Replikation während einer modifizierten PCR-Reaktion beruht (Sanger *et al.* 1977). Im Vergleich zu der üblichen PCR werden bei dieser Methode neben den desoxy-Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) auch didesoxy-Nukleotidtriphosphate (ddNTPs), welchen die freie 3'-OH-Gruppe fehlt und in die eine fluoreszierende Substanz eingebaut ist, in geringer Konzentration eingesetzt. Normalerweise werden die dNTPs von der DNA-Polymerase unter Abspaltung von zwei Phosphatgruppen jeweils an das freie 3'-

OH-Ende des wachsenden, synthetisierten DNA-Strangs geknüpft. Wird bei dieser Synthese allerdings ein ddNTP in die Kette eingebaut, können keine weiteren Nukleotide mehr angefügt werden und die Synthese stoppt. Die ddNTPs werden daher auch als Abbruchnukleotide bezeichnet. Da dieser Kettenabbruch aus statistischen Gründen an jeder beliebigen Position des DNA-Moleküls vorkommen kann, liegen nach der Reaktion im Ansatz viele Fragmente des Matrizenstrangs vor, die sich in ihrer Länge in nur einem Nukleotid unterscheiden. Über die unterschiedliche Länge der neu entstandenen DNA-Stränge lässt sich die Basenabfolge nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung ermitteln. Längenunterschiede von einem Basenpaar können aufgelöst werden.

Für eine Sequenzier-Reaktion wurden 1 µl Big Dye Terminator und 1,5 µl des zugehörigen Puffers (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit 1 µl des Primers (10 pmol/µl) und 100 bis 400 ng DNA gemischt und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer initialen Denaturierung für 1 Minute bei 95°C verlief die Reaktion über 30 Zyklen mit den folgenden Bedingungen: 10 Sekunden bei 95°C (Denaturierung), 10 Sekunden bei 50°C (Primer-Annealing) und 4 min bei 60 °C (Elongation). Um die Ergebnisse abzusichern, werden komplementäre Sequenzen separat amplifiziert.

Nach der Sequenzierreaktion wurden die PCR-Ansätze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 9,5 µl Wasser sowie 31 µl 100% EtOH gemischt. Anschließend wurden die Proben 1 Stunde bei RT oder mehrere Stunden bei -20°C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 18000 x g 30 min zentrifugiert (5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, und die Proben wurden mit 125 µl 70% EtOH gewaschen. Nach einem erneuten 15minütigen Zentrifugationsschritt bei 18000 x g wurde der Überstand vollständig abgenommen. Um zu gewährleisten, dass sich kein restliches EtOH in den Proben befindet, wurden diese für 2 min bei 50°C auf dem Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde in 15 µl Hi-DiTM Formamide (Applied Biosystems, Foster City, USA) wieder aufgenommen und über ein Kapillargel (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, 36 cm Kapillare Matrix, Pop 6, Applied Biosystems, Foster City, USA) aufgetrennt. Diese Auftrennung und die Auswertung des Kapillargels wurde in der Abteilung Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung des Bösigen-Instituts der Universität Göttingen durchgeführt. Die Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Chromas Lite und Vector-NTI ausgewertet.

2.2.12.9 Extraktion pflanzlicher RNA mit Trizol

Für die Extraktion von RNA aus Pflanzengewebe wurden ein Trizol-Extraktionspuffer sowie Chloroform verwendet. Durch die beiden Thiocyanat-Salze im Extraktionspuffer wird die Aktivität von RNAsen inhibiert, wodurch eine Degradation der RNA vermieden wird (Chomczynski & Sacchi 1987, Chomczynski 1993).

Zur Isolation der RNA wurden 200 mg unter Stickstoff gemörseretes Blattmaterial in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit 1,5 ml Trizol-Extraktionspuffer (380 ml/l mit 0,1 M Citratlösung gesättigte Phenollösung, 0,8 M Guanidiumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 33,4 ml/l 3 M Natrium-Acetat, pH 5, 5 % (v/v) Glycerin) versehen und 5 Minuten stark geschüttelt. Danach wurden 300 µl Chloroform in den Ansatz gegeben und dieser erneut 5 Minuten geschüttelt. Während der anschließenden 30minütigen Zentrifugation bei 18000 x g und 4°C (5417 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden die polare und die unpolare Phase voneinander getrennt. Kleine, polare Nukleinsäuren reichern sich in der wässrigen Phase an, während unpolare Substanzen wie Chlorophyll in der Chloroformphase zu finden sind. Die genomische DNA sowie Zelltrümmer sammeln sich an der Phasengrenze als braune Platte. Um die gelöste RNA zu isolieren, wurde der Überstand aus der oberen, wässrigen Phase in ein neues steriles 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit 420 µl Fällungspuffer (1,2 M NaCl, 0,8 M tri-Natrium-Citrat-Dihydrat) versetzt und invertiert. Anschließend wurde die Probe mit 420 µl Isopropanol versehen und nochmals invertiert. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei RT wurden die Proben erneut bei 4°C und 18000 x g 20 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet der ausgefällten RNA wurde anschließend mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 18000 x g für 20 Minuten wurde das Pellet von jeglichem Ethanol befreit und in 50 µl nukleasefreiem Wasser aufgenommen. Eine längere Lagerung der RNA erfolgte bei mindestens -20°C.

2.2.12.10 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese von RNA-Molekülen

Wie DNA-Fragmente können auch RNA-Moleküle gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Da RNA Sekundärstrukturen bildet, die das Laufverhalten im Gel beeinflussen können, findet die RNA im Unterschied zur DNA unter denaturierenden Bedingungen statt. Dazu wurde ein Gel aus 1,2 % (w/v) Agarose, MEA-Puffer (0,02 M MOPS, 1 mM EDTA, 5 mM Natrium-Acetat) und 7,4 % (v/v) Formaldehyd gegossen,

indem zunächst die Agarose in der Mikrowelle in MEA-Puffer gelöst und nach dem Abkühlen Formaldehyd zugegeben wurde. Für ein Gel mit 0,5 cm breiten Taschen wurde 1 µg der aufzutragenden RNA mit Wasser auf ein Volumen von 3 µl gebracht, mit 3 µl Ladepuffer (66 % (v/v) Formamid, 0,3 % (v/v) Formaldehyd, 10 % (v/v) 10x MEA-Puffer, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau, 0,05 % (w/v) Ethidiumbromid) versetzt und zur Denaturierung 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurden die Proben auf Eis gekühlt, bis sie auf das Gel aufgetragen wurden. Der Marker (High Range RNA Ladder RiboRuler, Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland) wurde genauso behandelt. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 V für 30 bis 40 Minuten. Anschließend wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert (Fluor-S Multi Imager, Bio-Rad, Hercules, USA).

2.2.12.11 Verdau von genomischer DNA im RNA-Extrakt

Da es möglich ist, dass mit der RNA auch geringe Mengen genomischer DNA extrahiert werden, muss die DNA beseitigt werden, bevor die mRNA in cDNA umgeschrieben wird. Im Ansatz vorhandene genomische DNA wird in der anschließenden qRT-PCR (siehe Punkt 2.2.12.13) ebenfalls amplifiziert wird und kann somit die Ergebnisse verfälschen.

Für die Degradation der genomischen DNA wurde 1 µg RNA mit 1 µl DNaseI und der gleichen Menge des zugehörigen Puffers (Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland) in einem 10 µl Ansatz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion nach Zugabe von 50 mM EDTA während einer 10 minütigen Inkubationszeit bei 65°C abgestoppt.

Im Anschluss wurde mit einer PCR verifiziert, ob die gesamte DNA in der Probe verdaut wurde. Für diese PCR wurden Primer eingesetzt, die genomische DNA von Actin amplifizieren (Act2_DNA_fw und Act2_DNA_rev, Sequenzen siehe Tabelle 5). Die PCR wurde wie unter Punkt 2.2.12.4 beschrieben durchgeführt.

2.2.12.12 cDNA-Synthese

Die Synthese komplementärer DNA (cDNA) aus isolierter mRNA wird durch eine Reverse Transkriptase vermittelt. Dieses Enzym bindet Desoxy-Nukleotide an einen Oligo-dT-Primer, der an das polyadenylierte Ende jeder mRNA hybridisiert. Die Menge der dabei entstehenden, komplementären cDNA ist direkt proportional zur Menge der Transkripte. Deshalb können anhand der Menge der cDNA, die mit quantitativer Real Time PCR

gemessen werden kann, auch Rückschlüsse über die Menge der mRNA in der Probe gezogen werden.

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St.-Leon-Rot, Deutschland) nach Anleitung durchgeführt. Hierbei wurde 1 µg RNA zunächst 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von dNTPs, RiboLockRNase Inhibitor und Reverser Transkriptase folgte eine 60minütige Inkubation bei 37°C. Abschließend wurde jede Probe zum Abstoppen der Reaktion für 10 Minuten bei 70°C inkubiert.

2.2.12.13 Quantitative Real Time PCR (qRT-PCR)

Bei der quantitativen Real Time PCR (qRT-PCR) handelt es sich um eine modifizierte PCR, die aufgrund der Verwendung eines fluoreszierenden Farbstoffs (SYBR Green) die Quantifizierung der DNA in einer Probe ermöglicht. SYBR Green ist ein Molekül, das sequenzunspezifisch in doppelsträngige DNA eingebaut wird und dann fluoresziert. Aufgrund der Amplifizierung der DNA-Moleküle während der PCR steigt auch die Fluoreszenzintensität, welche von einer speziellen Detektionseinheit des Geräts erfasst wird. Eine korrekte Quantifizierung ist allerdings nur in der exponentiellen Phase der PCR, in der optimale Reaktionsbedingungen herrschen, möglich, denn nur dann ist die Zunahme der DNA-Moleküle proportional zu der Fluoreszenzintensität. Hierfür wird der Ct-Wert (engl. *Cycle Threshold*) ermittelt. Der Ct-Wert bezeichnet den Zyklus, bei dem ein Schwellenwert zu Beginn der exponentiellen Phase überschritten wird und die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Je mehr DNA in einer Probe vorhanden ist, desto weniger PCR-Zyklen werden benötigt, um den Ct-Wert zu erreichen. Daher können aufgrund der Messung des Ct-Wertes die DNA-Menge verschiedener Proben miteinander verglichen werden.

Da die qRT-PCR eine sehr sensitive Methode ist, werden bei der Reaktion verschiedene Kontrollen mitgeführt. Zum Einen werden 3 technische Replikate gemessen, um Ungenauigkeiten beim Pipettieren erkennen zu können. Als Negativ-Kontrolle wird Wasser statt Probe in den Ansatz gegeben, um mögliche Verunreinigungen zu detektieren. Des Weiteren muss für jede Probe ein Abgleich mit einem sogenannten Haushaltsgen durchgeführt werden. Als Haushaltsgen (Housekeeping-Gen) wird ein Gen bezeichnet, dessen Produkt für grundlegende zelluläre Funktionen gebraucht wird. Viele dieser Haushaltsgene werden konstitutiv exprimiert, weshalb deren mRNA/cDNA in allen Proben

in der gleichen Menge vorhanden sein sollte. Die Expression mancher Haushaltsgene kann jedoch abhängig vom Zelltyp, Stadium und äußeren Einflüssen (Kultivierungsbedingungen, Infektion mit Pathogenen) schwanken. Deshalb muss für jedes Experiment erneut überprüft werden, ob die Expression des gewählten Haushaltsgens bei den gegebenen Bedingungen konstant ist (Czechowski *et al.* 2005, Udvardi *et al.* 2008). Bekannte und häufig benutzte Haushaltsgene sind beispielsweise Ubiquitin (UBQ), Actin (ACT), α -Tubulin (TUA) oder β -Tubulin (TUB) (Czechowski *et al.* 2005). In dieser Arbeit wurde Ubiquitin (UBQ) als Haushaltsgen verwendet. Über die Ct-Werte des Haushaltsgens kann die Qualität bzw. die Ausbeute der cDNA nach einer Reversen Transkriptase-PCR beurteilt werden. Eine vergleichbare Ausbeute an cDNA in allen Proben ist dann gegeben, wenn der Unterschied zwischen dem größten und dem kleinsten Ct-Wert des Haushaltsgens nicht größer als 1 ist (Udvardi *et al.* 2008). Außerdem dient das Haushaltsgen als Vergleichsgen bei der relativen Quantifizierung.

Für die PCR wurden Mikrotiterplatten für 96 Reaktionen (96 well Platten, Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) verwendet. Für eine einzelne Reaktion wurden 10 μ l 2x Mastermix (LightCycler® 480 SYBR Green I Mastermix, Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland), 2 μ l des Forward Primers, 2 μ l des Reverse Primers sowie 3 μ l nukleasefreies Wasser gemischt und in eine der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert, bevor 3 μ l der Proben, die nach der cDNA-Synthese 1:10 verdünnt wurden, hinzugegeben wurden. Nach dem Ansetzen aller durchzuführenden PCR-Reaktionen wurde die Platte mit einer Folie verschlossen (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) und für 1 Minute bei 400 x g zentrifugiert (5430 R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Die anschließende PCR-Reaktion fand im LightCycler® 480 (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) statt. Nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 95°C folgten 45 Zyklen mit folgenden Bedingungen: 10 Sekunden bei 95°C (Denaturierung), 10 Sekunden bei 57°C (Primer-Annealing), 20 Sekunden bei 72°C (Elongation).

Nach der Amplifizierung der DNA folgte zudem eine Schmelzkurvenanalyse. Hierbei wurde die Temperatur langsam ($0,11\text{ }^{\circ}\text{C s}^{-1}$) kontinuierlich von 65°C auf 97°C erhöht, so dass die DNA aufgeschmolzen (denaturiert) wurde. Hierbei trennt sich die doppelsträngige DNA zu zwei Einzelsträngen auf, wodurch SYBR Green nicht gebunden werden kann und die Fluoreszenz abnimmt. Die Schmelztemperatur von doppelsträngiger DNA spezifischer PCR-Produkte ist höher als die von unspezifischen Produkten oder Primerdimeren. Vor der

Auswertung wurde daher zunächst die Schmelzkurve begutachtet. Wenn nur ein Peak und dieser bei der richtigen Temperatur zu sehen war, wurde die Probe weiter berücksichtigt. Gab es einen zweiten Peak, handelte es sich um Nebenprodukte oder Primerdimere, die Probe wurde in dem Fall nicht weiter ausgewertet, weil bei der Berechnung der DNA-Menge die Nebenprodukte nicht ausgeschlossen werden können.

Für die Auswertung wurde anhand der Ct-Werte die relative Expression des Zielgens im Vergleich zu dem verwendeten Housekeeping-Gen mittels folgender Formeln (Guénin *et al.* 2008) berechnet:

Gleichung 7:

$$\text{Relative Expression} = 2^{(\text{Ct Zielgen} - \text{Ct Housekeeping-Gen})}$$

Gleichung 8:

$$\text{Relative Expression im Vergleich zur Referenz} = \frac{2^{(\text{Ct Zielgen VL} - \text{Ct Housekeeping-Gen VL})}}{2^{(\text{Ct Zielgen Kontrolle} - \text{Ct Housekeeping-Gen Kontrolle})}}$$

Die Quantifizierung der *Verticillium*-DNA im Pflanzenmaterial sowie im Xylemsaft erfolgte ebenfalls mittels quantitativer Real Time PCR und wurde von der AG Karlovsky durchgeführt. Nach der Extraktion der genomischen DNA (siehe Punkt 2.2.12.1) wurde die DNA-Konzentration in der Probe mit Hilfe eines Standards aus isolierter DNA von *Verticillium longisporum* bestimmt. Zur Amplifizierung wurden die Primer 5'-cagcgaaacgcgatatgtag-3' und 5'-ggcttgtaggggggttaga-3', die spezifisch für *Verticillium sp.* sind, verwendet (Eynck *et al.* 2007, Floerl *et al.* 2008, 2010).

2.2.12.14 Restriktionsspaltung

Restriktionsendonukleasen (Desoxyribonukleasen) des Typs II sind bakterielle Enzyme, die Phosphodiester-Bindungen doppelsträngiger DNA spalten können. Die verschiedenen Restriktionsendonukleasen erkennen und hydrolysieren spezifische Sequenzen in DNA-Molekülen. Je nach Enzym entstehen glatte DNA-Enden („blunt ends“) oder 5'- bzw. 3'-überhängende Enden („sticky ends“), die mit anderen Fragmenten mit komplementären Enden reassoziieren können (Smith & Wilcox 1970, Roberts 1985).

Mit Hilfe eines Restriktionsverdau können DNA-Fragmente sowie Vektoren so gespalten werden, dass sie im Anschluss daran mittels Ligation gezielt mit anderen Fragmenten zusammen gefügt werden können.

Für eine Restriktionsspaltung wurden allgemein 0,5 – 5 µg/µl DNA, 1µl der Restriktionsendonuklease sowie 2 µl des passenden Puffers (10fach konzentriert) gemischt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 20 µl aufgefüllt und inkubiert. Die optimale Inkubationszeit und –temperatur ist für jedes Enzym anders und wird vom Hersteller vorgegeben. Auch die Pufferbedingungen müssen an das jeweilige Enzym angepasst werden. Für jedes Enzym gibt es einen speziell abgestimmten Puffer, der jeweils die bestmögliche Effizienz und Spezifität der Endonuklease gewährleisten soll. Das Volumen der zugegebenen Enzymlösung sollte 10% des Endvolumens nicht überschreiten, da die Enzyme in einer Glycerinlösung vorliegen, welche in höheren Konzentrationen die Spezifität des Enzyms für die vorgesehene Schnittstelle herabsetzen kann. Kontaminationen der DNA durch hohe Salzkonzentrationen, EDTA oder organische Lösungsmittel können sich ebenfalls negativ auf die Enzymaktivität auswirken.

Nach der Inkubation werden die Restriktionsendonukleasen durch eine Inkubation bei hohen Temperaturen inaktiviert. Auch hier sind Dauer und die genaue Temperatur abhängig von dem verwendeten Enzym und wird vom Hersteller vorgegeben. Ist eine Hitzeinaktivierung nicht möglich, muss die DNA gelelektrophoretisch von den Enzymen getrennt und aufgereinigt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme, deren Inkubationszeit und Temperatur sowie die Art der Inaktivierung sind in der Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9: Liste aller verwendeten Restriktionsenzyme mit Angaben zu den Inkubationsbedingungen und der Inaktivierung. Alle aufgeführten Enzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) bezogen.

Enzym	Bedingungen für die Restriktionsspaltung	Inaktivierung des Enzyms
Bsp1407I	1 - 12 Std. bei 37°C	20 min bei 65°C
HindIII	1 - 12 Std. bei 37°C	20 min bei 80°C
NcoI	1 - 12 Std. bei 37°C	20 min bei 65°C
PstI	1 - 12 Std. bei 37°C	Gelelektrophorese
XhoI	1 - 12 Std. bei 37°C	20 min bei 80°C

2.2.12.15 Herstellung transgener *Arabidopsis*-Pflanzen

Ein klassischer Weg zur Transformation von dikotylen Pflanzen ist der Agrobakterien-vermittelte Gentransfer. Das gramnegative, zu den alpha-Proteobakterien zählende Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* tritt in der Natur als Pathogen auf und verursacht unkontrolliertes Wachstum der Pflanzenzellen und Tumorbildung. Ursache für die Infektiösität ist die Fähigkeit des Pathogens, die Pflanzenzellen umzuprogrammieren, indem sie einen durch zwei Border-Sequenzen flankierten DNA-Abschnitt in die Pflanzenzelle transportieren und dort ungerichtet in das Genom einfügen (Herrera-Estrella *et al.* 1992). Die für dieses Phänomen verantwortlichen Elemente sind die auf dem sogenannten Ti-Plasmid lokalisierten vir-Gene. Diese codieren für Ausschneide- und Integrationsproteine. Erstere schneiden an spezifischen Bordersequenzen der T-DNA, die dann durch letztere zufällig, d.h. an einer beliebigen Stelle in das Pflanzengenom integriert werden. Die integrierte T-DNA enthält wiederum Gene für die Synthese der Phytohormone Auxin und Cytokinin, die beim Ablesen zu einer übermäßigen Zellteilung und so zum sichtbaren Tumor führen. Des Weiteren codiert die T-DNA für Proteine der Opinsynthese und des -abbaus. Opine sind Verbindungen aus Aminosäuren mit Ketosäuren bzw. Zuckern, die von den Bakterien katabolisch genutzt werden können.

Die Eigenschaft des Bakteriums, die T-DNA in das pflanzliche Genom einzuschleusen, hat man sich für die für die gezielte Transformation von Pflanzen zunutze gemacht. Für diese gezielte Integration von Genen in das pflanzliche Genom wurde *Agrobacterium tumefaciens* so modifiziert, dass die für den T-DNA-Transfer notwendigen Funktionen auf zwei Plasmide aufgeteilt sind. Auf dem als Helferplasmid bezeichneten Vektor werden die zur Übertragung wichtigen vir-Gene codiert, das rekombinierte Ti-Plasmid enthält die T-DNA-Bordersequenzen, die nicht mehr die Gene für die Opin-, Cytokinin- und Auxinsynthese, sondern das zu übertragende Gen sowie Resistenzgene, die wichtig für die spätere Selektion sind, einschließen. Diese Aufteilung der wichtigen Gene auf 2 Plasmide wird als binäres System bezeichnet. Der Vorteil besteht vor allem darin, dass das Ti-Plasmid relativ klein bleibt und so besser transformierbar und stabiler ist.

Für eine Transformation von *A. thaliana* muss also zunächst ein Ti-Plasmid mit den gewünschten Informationen (gewünschtes Gen/Promoter, Resistenzgene, Promoter) konstruiert werden (siehe Punkte 2.2.12.17 bis 2.2.12.20). Die Selektion und Vermehrung des Konstruktes erfolgt zu Beginn in *E. coli* Zellen (siehe Punkt 2.2.12.21), bevor das

Plasmid isoliert, in *A. tumefaciens* Zellen transferiert (siehe Punkt 2.2.12.22) und diese für die Transformation von Pflanzen benutzt werden.

Für die Agrobakterien-vermittelte Transformation von *Arabidopsis thaliana* wurde in dieser Arbeit die Methode von Clough und Bent (1998) durchgeführt. Dazu wurden die Agrobakterien zunächst 3 Tage in 400 ml selektivem YEB-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3) auf dem Schüttler bei 200 rpm und 28°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 2500 x g und 4 °C vom Medium getrennt. Diese Zellen wurden in so viel Transformationsmedium (5 % (w/v) Saccharose und 0,02 % (v/v) Silwet L-77 (Lehle Seeds, Round Rock, USA) resuspendiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,8 erreicht war. Die Infloreszenzen der Pflanzen wurden für 10 bis 20 Sekunden in diese zucker- und benetzungsmittelhaltige Lösung getaucht, 16 bis 24 Stunden unter der Sterilbank inkubiert und anschließend unter Langtagbedingungen weiterkultiviert.

Durch das Abschneiden der ersten Blütenstände lässt sich die Bildung vieler sekundärer Blütenstände anregen. Dies erhöht die Ausbeute an transgenen Samen.

2.2.12.16 Selektion transgener Pflanzen

Da bei der Floral-Dip Transformation von *Arabidopsis thaliana* produktive Transformationsereignisse hauptsächlich in den sich entwickelnden Eizellen vorkommen (Bent 2000), entstehen zunächst nur heterozygot transgene Samen (T1), aus denen über mehrere Generationen homozygote Linien selektiert werden müssen. Eine Selektion ist aufgrund spezifischer Resistenzen des eingebrachten Vektors möglich. Die Pflanzen der T2-Generation können heterozygot oder homozygot bezüglich der integrierten T-DNA sein. Des Weiteren ist es möglich, dass diese Pflanzen die T-DNA bereits nicht mehr enthalten. Sie entsprechen somit den Wildtyp-Pflanzen. Um homozygote Pflanzen zu identifizieren, wurden mit den Samen der T2-Pflanzen Segregationsanalysen durchgeführt: wenn 100 % der Samen, die von einer Pflanze der T2-Generation gewonnen wurden, resistent gegenüber dem Selektionsmarker waren, war die entsprechende Mutterpflanze homozygot und wurde weiter verwendet.

Selektion transgener Pflanzen mittels Phosphinothricin

Vektoren, die das bar-Gen tragen, vermittelt eine Resistenz gegenüber Phosphinothricin. Phosphinothricin (auch Glufosinat = L-Homoanalin-4-yl-(methyl)-phosphinsäure) inhibiert die Glutaminsynthetase. Wildtyp-Pflanzen, die mit Phosphinothricin behandelt werden,

können Glutamat nicht mehr in Glutamin umwandeln, wodurch Ammonium in letalen Konzentration in der Pflanze akkumuliert wird. Zusammen mit dem Glutaminmangel führt dies zum Absterben der behandelten Keimlinge, während Pflanzen, die das *bar*-Gen als Resistenzmarker tragen, überleben (White *et al.* 1990).

Phosphinothricin ist in dem Herbizid Basta® enthalten. Zur Selektion wurden auf Erde gekeimte, 7-10 Tage alte Keimlinge, die 2-4 vegetative Blätter gebildet haben, mit einer 2mM Basta®-Lösung, die zur besseren Benetzung 0,02 % Silwet (Lehle Seeds, Round Rock, USA) enthält, besprüht und Licht ausgesetzt. Da es möglich ist, dass trotz Stratifizierung bei 4°C einige Samen verspätet keimen, wurden die Pflanzen insgesamt 3x im Abstand von 2-3 Tagen besprüht, um auszuschließen, dass nicht resistente Pflanzen überleben.

Selektion transgener Pflanzen mittels Hygromycin

Die Selektion von Pflanzen, die mit Hygromycin-Resistenz vermittelnden Vektoren transformiert worden waren, erfolgte unter sterilen Bedingungen auf ¼ MS-Medium, dem 40 µg/ml Hygromycin zugesetzt wurde. Das MS-Medium bestand aus 4,4 g/l Murashige und Skoog-Medium (Duchefa, Haarlem, Niederlande), 7,4 g/l SELECT Agar® (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) und 2,5 g/l Saccharose. Nach einer 3 tägigen Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln wurde die Keimung während einer 6 stündigen Lichtphase bei 120 µmol m⁻² s⁻¹ und 22°C induziert. Es folgte eine 2 tägige Inkubation im Dunkeln, während der sich das Hypokotyl resistenter Keimlinge streckte. Anschließend wurden die Pflanzen unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) weiter kultiviert.

Sowohl resistente als auch Wildtyp-Pflanzen keimten auf dem Selektionsmedium. Die nicht resistenten wuchsen jedoch schlechter als die resistenten. Nach der 2tägigen Dunkelheit waren die resistenten Keimlinge deutlich gestreckt, während die nicht resistenten kurz blieben.

2.2.12.17 Herstellung eines Vektorkonstrukts für die Überexpression von *glp3*

Zur Herstellung von *Arabidopsis*-Pflanzen, die *glp3* (At5g20630) konstitutiv überexprimieren, wurde der Gateway®-Vektor pE verwendet.

Das Gateway®-System (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) basiert auf dem DNA-Rekombinationsmechanismus des Bakteriophagen Lambda in das Genom von *E.coli*, bei

dem DNA-Segmente über ortsspezifische Rekombination zwischen verschiedenen Plasmiden transferiert werden können. Für diese Rekombination sind bestimmte Erkennungssequenzen (att-sites) nötig. Um ein gewünschtes DNA-Fragment in einen Gateway®-Vektor zu klonieren, wird dieses mittels PCR mit Primern amplifiziert, die an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen (att-sites) enthalten. Das Gateway®-kompatible DNA-Segment wird über zwei Reaktionen in den Expressionsvektor transferiert. Während der sogenannten BP-Reaktion wird das PCR-Produkt in einen Eingangs-Vektor (z.B. pDONR201) eingebracht. Mittels einer LR-Reaktion wird das DNA-Fragment in den jeweiligen Ziel-Vektor (z.B. pE) transferiert.

Für die Isolierung der glp3-cDNA wurde zunächst aus pflanzlichen RNA-Extrakten die komplementäre cDNA synthetisiert. Während einer PCR wurde aus diesem Gemisch unter Zugabe der Primer Atg5g20630_FW und At5g20630_RV (Primersequenzen siehe Tabelle 5) die Gateway®-kompatible cDNA von glp3 isoliert.

Um das Produkt mittels BP-Reaktion in den Entry-Vektor pDONR201 klonieren zu können, wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Dazu wurden 150 µl TE-Puffer (pH 8) und 100 µl 30% PEG 8000, 30mM MgCl₂ zu einem 50 µl PCR-Ansatz gegeben, gut gemischt und 15 Minuten bei 10000 g bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 50 µl TE-Puffer wieder aufgenommen und für eine BP-Reaktion weiter verwendet.

Bei der BP-Reaktion gelangt das mit attB-sites modifizierte DNA-Fragment durch das Zusammenwirken verschiedener Enzyme in den kompatiblen Donor-Vektor mit attP-sites. Durch den Integrationsvorgang werden die Sequenzen der Attachment-sites so verändert, dass die Reaktion nahezu irreversibel ist. Es entsteht ein Plasmid mit attL-sites (Entry-Vektor) (Hartley *et al.* 2000).

Für eine BP-Reaktion wurden 100 ng des PCR-Produktes (2-10 µl) mit 2 µl des Donor-Vektors pDONR201 (150 ng/µl) und 2 µl 5x BP-Clonase Reaktionspuffer auf 2 µl des aliquotierten BP-Clonase-Enzymmixes (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gegeben und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden über Nacht bei 25°C inkubiert.

Mit den Produkten der BP-Reaktion wurden *E. coli* Zellen transformiert (siehe Punkt 2.2.12.21). Positive Klone wurden nach einer Kontroll-Restriktionsspaltung mit Hilfe der Primer Seq-L1-pDON-FW und Seq-L1-pDON-RV (siehe Tabelle 5) sequenziert. War die

Sequenz des eingefügten DNA-Fragments exakt, wurde das Plasmid mit attL-sites mittels LR-Reaktion in den Gateway-kompatiblen Destination-Vektor pE mit attR-sites kloniert.

Für eine LR-Reaktion wurden 300 ng des Eingangs-Vektors, 100 – 300 ng des Ziel-Vektors pE, 2 µl 5x LR-Clonase Reaktionspuffers und 2 µl des LR-Clonase-Enzymmixes (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) gemischt und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 1 mM EDTA) auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden über Nacht bei 25°C inkubiert.

Mit dem entstandenen Expressions-Vektor wurde zunächst *E. coli* transformiert (2.2.12.21). Nach der Kanamycin-Selektion wurde *A. tumefaciens* mit dem Plasmid transformiert (Punkt 2.2.12.22), bevor das Plasmid mittels Floral-Dip (Punkt 2.2.12.15) in die Pflanze überführt wurde.

2.2.12.18 Herstellung eines Vektorkonstrukts für die Komplementierung der T-DNA-Insertionslinie FLAG_412D02

Um eine T-DNA-Insertionslinie zu komplementieren, wird jenes Gen wieder in die Pflanze eingebracht, dessen Expression durch die Insertion des T-DNA-Fragments beeinträchtigt oder vollständig inhibiert wird.

Für die Komplementierung der T-DNA-Insertionslinie FLAG_412D02 wurde der Vektor pGWB2 benutzt, der eine Hygromycin-Resistenz als Selektionsmarker codiert. Es handelt sich hierbei um einen Gateway-kompatiblen Destination-Vektor mit att-R Sites. Die für die Überexpressionspflanzen vorbereitete Gateway®-kompatible cDNA von glp3 wird mittels einer LR-Reaktion vom Eingangs-Vektor pDONR201-glp3 in den Vektor pGWB2 gebracht. Die Methode wurde wie unter Punkt 2.2.12.17 beschrieben durchgeführt. Das Plasmid wird nach der Vermehrung und Selektion in *E. coli* (2.2.12.21) und *A. tumefaciens* (Punkt 2.2.12.22) mittels Floral-Dip in die Pflanze transferiert.

2.2.12.19 Herstellung der Vektorkonstrukte für amiRNA-Pflanzen

Als microRNAs (miRNAs) werden einzelsträngige RNAs mit einer Länge von 19 – 24 Basenpaaren bezeichnet, die als negative Regulatoren fungieren können. Diese miRNAs entstehen aus längeren, nicht-kodierenden, doppelsträngigen RNAs, die von RNAsen der sogenannten Dicer Familie zerschnitten werden. Die entstehenden miRNAs binden an komplementäre mRNAs, die wiederum zerschnitten und abgebaut werden und so nicht mehr in ein Protein translatiert werden können (Bartel 2004, Filipowicz 2005, Chen 2005, Jones-Rhoades *et al.* 2006).

Dieses natürlich in der Pflanze vorkommende Phänomen kann genutzt werden, um gezielt die Menge eines bestimmten Transkriptes zu reduzieren. Zu diesem Zweck wird eine artifizielle miRNA (artificial microRNA = amiRNA) in der Pflanze überexprimiert, die an das Transkript eines Zielgens bindet. Die entstandene doppelsträngige RNA wird abgebaut. Dies führt zu einer Reduzierung der RNA-Menge des Zielgens.

Die Konstruktion geeigneter amiRNA-Sequenzen für die Reduzierung der Transkriptmenge von *glp3* sowie zu deren Synthese benötigte Primer erfolgte mit Hilfe des Web microRNA-Design-Tools (www.weigelworld.org, Tabelle 10). Da die Wahrscheinlichkeit, dass ein amiRNA-Konstrukt tatsächlich zu einer Verringerung des Expressionslevels führt, ca. 75% beträgt (www.weigelworld.org), wurden zwei verschiedene Konstrukte gegen *glp3* hergestellt.

Tabelle 10: amiRNA-Konstrukte und die für deren Herstellung verwendete Primer.

amiRNA-Konstrukt			Bezeichnung der für die PCR verwendeten Primer (Sequenzen siehe Tabelle 5)
Bezeichnung	Konstrukt	Sequenz	
amiRNA_GLP3_A	A	TATGGTA GAATTTG GAGCGCT	amiRNA_At5g20630_A_PrimerI
			amiRNA_At5g20630_A_PrimerII
			amiRNA_At5g20630_A_PrimerIII
			amiRNA_At5g20630_A_PrimerIV
amiRNA_GLP3_B	B	TCAAATG GTAGAAT TTGGGGC	amiRNA_At5g20630_B_PrimerI
			amiRNA_At5g20630_B_PrimerII
			amiRNA_At5g20630_B_PrimerIII
			amiRNA_At5g20630_B_PrimerIV

Zur Generierung der amiRNA-Sequenzen wurden in jeweils 3 parallelen PCR-Läufen mit verschiedenen Primern Teile des Plasmids pRS300 vervielfältigt und währenddessen mutiert. Für die Reaktion (a) wurden die Primer amiRNA_GW_PrimerA und IV verwendet, während für die Reaktion (b) die Primer III und II und für die Reaktion (c) die Primer I und amiRNA_GW_PrimerB eingesetzt wurden. Die Primer A und B (siehe Tabelle 5) waren für jedes Konstrukt gleich, während die Primer I bis IV spezifisch für die einzelnen Konstrukte waren. Die PCR startete mit einer Initialen Denaturierung für 2

Minuten bei 95°C und verlief anschließend über 25 Zyklen wie folgt: 30 Sekunden bei 95°C, 30 Sekunden bei 55°C und 40 Sekunden bei 72°C. Am Ende schloss ein finaler, 7 Minuten dauernder Elongationsschritt die Reaktion ab. Für die PCR wurde *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt, die keine Korrekturfunktion aufweist und so beabsichtigte Mutationen zulässt.

Die PCR-Reaktionen (a), (b) und (c) zur Generierung der amiRNA-Konstrukte wurden wie folgt angesetzt:

5 µl 10x PCR Puffer
5 µl dNTPs (2mM)
2 µl je Primer (10µM)
2 µl Plasmid DNA (200 ng)
0,5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase
33,5 µl Wasser
50 µl gesamt

Die Produkte der verschiedenen PCR-Reaktionen wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und die DNA aufgereinigt (siehe Punkt 2.2.12.7). Bei einer weiteren PCR wurden die zuvor erhaltenen PCR-Produkte zusammen gefügt. Nach einer initialen Denaturierung für 2 Minuten bei 95°C verlief die Reaktion über 25 Zyklen mit den folgenden Bedingungen: 30 Sekunden bei 95°C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 55°C (Primer-Annealing) und 1:30 Minuten bei 72 °C (Elongation). Beendet wurde die PCR durch eine finale Elongation von 7 Minuten.

Ansatz für die PCR-Reaktion:

5 µl 10x PCR Puffer
5 µl dNTPs (2mM)
2 µl je Primer (10µM)
0,5 µl PCR (a)
0,5 µl PCR (b)
0,5 µl PCR (c)
0,5 µl *Pfu*-DNA-Polymerase
34,5 µl Wasser
50 µl gesamt

Erneut wurden die PCR-Produkte über ein Agarose-Gel separiert, ausgeschnitten und aufgereinigt. Die DNA-Extrakte wurden mittels BP-Reaktion in den Donor-Vektor pDONR201, anschließend durch eine LR-Reaktion in den Destination-Vektor pE kloniert (siehe Punkt 2.2.12.17). Der entstandene Expressions-Vektor wurde zunächst nach *E. coli*, (Punkt 2.2.12.21), dann nach *A. tumefaciens* (Punkt 2.2.12.22) transferiert, bevor er mittels Floral-Dip in die Pflanze überführt wurde (Punkt 2.2.12.15).

2.2.12.20 Herstellung des Vektorkonstrukts für die GUS-Reporterpflanzen

Um das Expressionsmuster eines bestimmten Gens zu untersuchen, können Reporterpflanzen hergestellt werden. Ein bekanntes Gen, das häufig als Reportergen benutzt wird, ist das *uidA*-Gen aus *E. coli*, welches für die β -Glucuronidase (GUS) kodiert. Wird vor dieses Gen der Promoter des Zielgens kloniert, so kann mit Hilfe der Aktivitätsmessung des GUS-Enzyms die Induktion des vorgeschalteten Promoters nachgewiesen werden.

Für die Herstellung des Promoter(*glp3*)::GUS-Konstruktes wurde das gesamte, 3363 bp große DNA-Stück, das zwischen dem ATG des *glp3*-Gens und dem Stopcodon des in 5'-Richtung folgenden Gens liegt, aus einem Gemisch genomischer DNA aus Columbia-Wildtyp-Pflanzen isoliert. Da der Promoter mittels klassischer Ligation mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen NcoI und PstI in den Vektor pCAMBIA1391Z transferiert werden sollte, wurden während der PCR die Basenabfolge ctgcag an das 5'-Ende und ccatgg an das 3'-Ende der Sequenz gehängt (Primer PstI-PromoterGLP3_fw und NcoI-PromoterGLP3_rev, Sequenzen siehe Tabelle 5). Das PCR-Produkt wurde über ein Gel aufgetrennt, die Banden ausgeschnitten und aufgereinigt (siehe Punkt 2.2.12.7). Sowohl der über PCR amplifizierte Promoter als auch der Vektor pCAMBIA1391Z wurden mit PstI und NcoI während einer 2stündigen Inkubation bei 37°C gespalten. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme für 20 min bei 75°C inaktiviert. Der verdaute Promoter und die Vektor-Fragmente wurden für einen Ligationsansatz verwendet.

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente, die zuvor durch Restriktionsendonukleasen gespalten worden sind und komplementäre Enden besitzen, miteinander verknüpft. Für diese Reassoziierung wird das Enzym T4-DNA-Ligase verwendet, welches in Anwesenheit von ATP die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-

Gruppe am Ende eines DNA-Stranges und der 5'-Phosphatgruppe am Ende eines anderen katalysiert.

Ligationsansatz:

Einzufügende DNA (Insert)	20 – 100 ng
Linearisiertes Vektor-Fragment	50 – 500 ng
T4-DNA-Ligase 10x-Puffer (Fermentas)	2 µl
ATP	2 µl
T4-DNA-Ligase (Fermentas)	1 µl
mit H ₂ O auffüllen auf 20 µl	

Nach einer Inkubation von 4 Stunden bei 22°C wurden *E. coli* Zellen mit den Produkten transformiert (Punkt 2.2.12.21). Zusätzlich zu der Selektion mittels Antibiotika, mit der nach einer Transformation ausgeschlossen wurde, dass *E. coli* - Zellen wachsen, die kein Plasmid aufgenommen haben, wurde eine Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Dadurch kann festgestellt werden, ob das richtige Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment in das Bakterium transferiert worden ist.

Bei der Blau-Weiß-Selektion liegt die Klonierungsstelle innerhalb des *lacZ*-Gens. *lacZ* codiert für die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren der β -Galaktosidase. Der *lacZ* Promoter wird durch IPTG induziert. Die Bakterien selbst können nur eine funktionslose β -Galaktosidase, der die Aminosäuren 11 bis 41 fehlen, herstellen. Wenn ein Plasmid in die Bakterien eingebracht wird, der den C-Terminus produziert, bildet sich zusammen mit dem bakterieneigenen Enzym eine funktionierende β -Galaktosidase (α -Komplementation). Das aktive Enzym hydrolysiert das Substrat X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid) zu Galaktose und dem blauen Farbstoff 5-Brom-4-Chloro-3-Indol. Wird die Sequenz des *lacZ*-Gens jedoch durch den Einbau von fremder DNA in das Plasmid unterbrochen, so wird kein funktionsfähiges Enzym gebildet, wodurch das Substrat nicht mehr umgesetzt werden kann. Die Bakterienkolonie bleibt weiß.

Für die Blau-Weiß-Selektion wurde die Bakteriensuspension nach der Transformation auf Platten ausgestrichen, die kurz vor der Verwendung mit 60 µl einer X-Gal-Stammlösung (20 mg/ml, Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 60 µl 0,1 M IPTG-Lösung (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bestrichen wurden.

Nach 24 Stunden waren die positiven Klone gut von den blauen Kolonien unterscheidbar. Von weißen Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert. Deren Sequenz wurde durch Sequenzierung mit Hilfe der Primer Seq_pCambia1391Z_fw, Seq_pCambia1391Z_rev sowie Seq_PromoterGLP3_1 bis 5 (siehe Tabelle 5) verifiziert. Plasmide mit der exakten Sequenz wurden in Agrobakterien transferiert (Punkt 2.2.12.22) und für eine Pflanzentransformation verwendet (Punkt 2.2.12.15).

2.2.12.21 Kultivierung und Transformation von *Escherichia coli*

E. coli wurde auf LB-Medium kultiviert (siehe Punkt 2.1.9.3). Nach der Transformation wurden die Zellen auf festem Medium ausgestrichen, während Zellen, aus denen Plasmid-DNA gewonnen werden sollte, in Flüssigkultur angezogen wurden.

Für eine längere Lagerung der Bakterien wurden 750 µl einer Flüssigkultur 12 Stunden nach dem Animpfen mit der gleichen Menge einer 30%igen sterilen Glycerinlösung versetzt und nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

Für die Herstellung von elektrokompententen Zellen wurde festes selektives SOB-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3) mit *E. coli* - Zellen angeimpft und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde eine einzelne Kolonie in 50 ml flüssiges, selektives SOB-Medium überführt und 12 Stunden bei 37 °C inkubiert. Von dieser Vorkultur wurden 5 ml entnommen und in 500 ml flüssigem SOB-Medium (ohne Antibiotika) bei 37°C so lange geschüttelt, bis eine optische Dichte von 0,46 – 0,48 bei 578 nm erreicht war. Dann wurden die Kolben 10 Minuten auf Eis gestellt, um weitere Zellteilungen zu inhibieren. Anschließend wurden die Zellen durch mehrere Zentrifugations- und Waschschrte von dem Medium getrennt. Dazu wurden die Zellen jeweils für 15 Minuten bei 3600 x g und 4°C (Beckman J2-HS, Beckman Coulter, Fullerton, USA) pelletiert, der Überstand verworfen und nacheinander in 250 ml und 125 ml eiskaltem, sterilem, destillierten Wasser resuspendiert. Zuletzt wurden die Zellen in 12,5 ml 10%iger steriler Glycerinlösung wiederaufgenommen, nach einem abschließenden Zentrifugationsschritt in 1 ml 10%igem sterilem Glycerin gelöst und in 40 µl Aliquots in Stickstoff eingefroren, welche bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurden.

Die Transformation der *E. coli* Zellen erfolgte mittels Elektroporation. Hierbei wird durch Gabe kurzer Spannungspulse die Membran kompetenter Bakterienzellen vorübergehend permeabilisiert, wodurch die Aufnahme freier DNA aus dem Medium ermöglicht wird.

Für die Elektroporation wurden die aliquotierten elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. Ca. 100 ng Plasmid-DNA wurden zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 bis 60 Sekunden auf Eis wurde die Suspension in den Elektrodenzwischenraum einer sterilen Elektroporationsküvette (Bio-Rad, Hercules, USA) gefüllt. Diese wurde anschließend in den GenePulser (Bio-Rad, Hercules, USA) geschoben, wo kurzzeitig eine Spannung von 1,8 kV (bei 25 μ F und 400 Ω) angelegt wurde. Der Transformationsansatz wurde sofort mit 1 ml SOC-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3) versehen, in ein Reaktionsgefäß überführt, und im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Dies diente der Regeneration der Zellen und der Ausbildung der Resistenzen. Die Dauer war abhängig von dem verwendeten Antibiotikum. Zur Entwicklung der Resistenz gegen Ampicillin wurden die Zellen 30 Minuten, zur Resistenzausbildung gegen Kanamycin 1 Stunde inkubiert. Abschließend wurden 50 bis 100 μ l der Bakterienkultur auf festem, selektivem LB-Medium ausgestrichen. Wenn eine geringe Ausbeute von Transformanten zu erwarten war, wurde die Bakteriensuspension vor dem Ausplattieren zunächst konzentriert, indem nach einem Zentrifugationsschritt bei 18000 x g für 20 Sekunden 800 μ l des Überstandes verworfen wurden und das Pellet mit in dem zurückgelassenem Medium wieder aufgenommen wurde.

Nach 14 bis 16 Stunden bei 37°C wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher oder einer Pipettenspitze in 3 bis 5 ml flüssiges, selektives LB-Medium überführt. Nach einer Inkubationszeit von 12 bis 16 Stunden bei 37°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen in einem Reaktionsgefäß für 1 Minute bei 10000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde für die Extraktion der Plasmid-DNA (siehe Punkt 2.2.12.2) weiter verwendet.

2.2.12.22 Kultivierung und Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung von Agrobakterien erfolgte auf festem oder flüssigem LB- oder YEB-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3). Zur Selektion wurden in Abhängigkeit von dem verwendeten Stamm und Helferplasmid verschiedene Antibiotika hinzugefügt, da es andernfalls zum verstärkten Wachstum von Agrobakterien ohne Helferplasmid kommen kann, die ihre Infektiösität eingebüßt haben. Der in dieser Arbeit verwendete Agrobakterien-Stamm GV 3101 weist das Gen für die Resistenz gegenüber Rifampicin auf, zudem vermittelt das Helferplasmid pMP 90 die Resistenz gegenüber Gentamycin.

Daher wurden die Agrobakterien in Anwesenheit der genannten Antibiotika angezogen. Bei transformierten *A. tumefaciens* Zellen wurde ein zusätzliches Antibiotikum zum Medium gegeben, für dessen Resistenz das transferierte Plasmid codierte.

Die Transformation von Agrobakterien erfolgte wie bei *E. coli* durch Elektroporation. Für die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurden Agrobakterien auf Platten kultiviert. Von diesen Platten wurde eine einzelne Kolonie in 10 ml selektives, flüssiges YEB-Medium überführt und 12-16 Stunden auf dem Schüttler bei 28°C inkubiert. Die vollständige Kultur wurde zum Animpfen von 250 ml flüssigem YEB-Medium verwendet. Die Kultur wurde auf dem Schüttler bei 28°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 erreicht war. Anschließend wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis abgekühlt und dann durch Zentrifugation bei 3000 x g und 4°C für 10 Minuten in einer vorgekühlten Zentrifuge vom Medium getrennt. Die vom Überstand befreiten Zellpellets wurden in 200 ml eiskaltem, sterilem Wasser aufgenommen und wieder für 10 Minuten 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 100 ml kaltem, sterilem Wasser aufgenommen und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 50 ml sterilem 10 % (v/v) Glycerin gelöst. Nach einem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 1 ml kalter, steriler 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in 50 µl Aliquots in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Für die Transformation wurden 100 ng DNA zu 50 µl Aliquots auf Eis aufgetauter kompetenter Zellen gegeben. Dieses Gemisch wurde anschließend in den Elektrodenzwischenraum einer sterilen Elektroporationsküvette (Bio-Rad, Hercules, USA) gegeben und im GenePulser (Bio-Rad, Hercules, USA) einem Spannungsimpuls von 2,5 kV bei 25 µF und 400 Ω unterzogen. Diese Suspension wurde sofort mit 2 ml SOC- oder LB-Medium versehen, in ein Reaktionsgefäß überführt und 2 Stunden bei 28°C unter leichtem Schütteln inkubiert. 100 µl dieses Transformationsansatzes wurden auf selektivem YEB- oder LB-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3) ausgestrichen. Nach 3 (YEB-Medium) bzw. 4 (LB-Medium) Tagen wurden die Kolonien zum Animpfen von Flüssigkulturen benutzt.

2.2.12.23 Heterologe Expression eines pflanzlichen Proteins in Hefe

Um GLP3 näher zu charakterisieren, wurde das pflanzliche Protein in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*, Stamm INVSc1, siehe auch Punkt 2.1.4) exprimiert. Hierzu

wird die cDNA von *glp3* zunächst in den Vektor pYES2/CT kloniert, nach der Vermehrung und Selektion in *E. coli* isoliert und in die Hefe eingebracht.

Für die Konstruktion des Vektors wurde zunächst die Sequenz von *glp3* während einer PCR unter Zugabe der Primer GLP_Hefe_FW sowie GLP_Hefe_REV aus einem Gemisch aus cDNAs, die aus pflanzlichen RNA-Extrakten synthetisiert wurde, isoliert. Das PCR-Produkt sowie der Vektor pYES2/CT wurden während einer Inkubation über Nacht bei 37°C mit den Restriktionsendonukleasen HindIII und XhoI gespalten. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente über ein Gel und der anschließenden Aufreinigung erfolgte die Ligation (siehe Punkt 2.2.12.20). Mit dem Ligationsansatz wurden elektrokompente *E. coli*-Zellen transformiert, die nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei 37°C in SOC-Medium auf festem LB-Medium mit Ampicillin ausgestrichen wurden. Der verwendete Vektor pYES2/CT vermittelt eine Ampicillin-Resistenz. Nur die Zellen, die den Vektor aufgenommen haben, können auf dem Selektionsmedium wachsen. Die aus positiven Klonen isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsspaltung und Sequenzierung (Primer: Seq_pYES2-CT_FW und Seq_pYES2-CT_REV, siehe Tabelle 5) verifiziert und für die Transformation von Hefe verwendet.

Für die Transformation der Hefe wurden zunächst kompetente Zellen hergestellt. Dafür wurden Hefezellen einer einzelnen Kolonie von festem YPD-Medium in 20 ml flüssiges YPD-Medium (siehe Punkt 2.1.9.3) überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 30 °C unter leichtem Schütteln wurde eine neue 20 ml Flüssigkultur mit einem so großen Volumen dieser Vorkultur angeimpft, dass die OD₆₀₀ dieser neuen Kultur zwischen 0,3 und 0,4 lag. Es folgte eine erneute Inkubation bei 30°C unter leichtem Schütteln, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,8 – 1,2 erreicht hatte. 10 ml dieser Kultur wurden 3 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit H₂O und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 400 µl LITE-Puffer (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 mM EDTA) resuspendiert.

Für die Transformation wurden 200 µl kompetente Hefezellen mit 1 – 3 µg Plasmid-DNA sowie 800 µl PEG-Lösung (LITE-Puffer mit 40 % w/v PEG 4000) versetzt und gut gemischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 25 Minuten. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1700 x g für 1 Minute vom Transformationsmedium getrennt, in 100 µl Wasser resuspendiert, und auf Selektionsmedium (SD-Medium ohne Uracil, siehe Punkt 2.1.9.3) ausgestrichen. Nach 3

bis 5 Tagen bei 30°C wurden einzelne Kolonien auf neue Selektionsplatten überführt. Nur Zellen von diesen Sekundärplatten wurden weiter berücksichtigt.

Für die Expression von *glp3* wurde die Hefe in Expressionsmedium angezogen. Der verwendete Vektor pYES2/CT enthält den Galaktose-induzierbaren Promotor *GALI*. Das eingefügte Gen wird dadurch nach Zugabe von Galaktose exprimiert, während Glukose die Expression reprimiert (West *et al.* 1984, Giniger *et al.* 1985, Flick & Johnston 1990, Gancedo 1998). Damit die transformierten Hefezellen *glp3* herstellen, wurden diese nach einer Vorkultur in flüssigem, Glukose-haltigen Selektionsmedium in Expressionsmedium überführt. Hierfür wurden die Zellen durch einen Zentrifugationsschritt (2 min bei 1500 x g) von dem alten Medium getrennt und in neuem SD-Medium, welches statt Glukose Galaktose enthielt, wieder aufgenommen und bei 25°C unter leichtem Schütteln kultiviert. Wenn die Kultur eine OD₆₀₀ zwischen 0,8 und 1,5 erreicht hatte, wurden die Zellen geerntet, indem 15 ml der Kultur 5 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand verworfen, und die Zellen wurden mit 500 µl Wasser gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit wurden die Zellen lysiert. Dafür wurden 500 µl Lyse-Puffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7,4, 1 mM EDTA, 5 % v/v Glycerin), dem ein Protease-Inhibitor-Mix (Complete Mini, Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) zugesetzt wurde, auf das Pellet gegeben. Erneut wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1500 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde so viel Lyse-Puffer auf die Proben gegeben, dass eine optische Dichte von 50 – 100 erreicht war. Außerdem wurde das gleiche Volumen Glasperlen (0,5 mm Glass Beads Soda Lime, BioSpec Products, Bartlesville, USA) dazugegeben. Die Proben wurden dann 30 Sekunden gemischt (Vortexer), anschließend folgte eine Inkubation von 30 Sekunden auf Eis. Nach 4maliger Wiederholung der letztgenannten zwei Schritte wurden die Proben 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit bei 4°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert. Um nachzuweisen, dass das gewünschte Protein tatsächlich von der Hefe hergestellt wurde, wurde nach der Auftrennung der Gesamtproteine über ein SDS-Gel (siehe Punkt 2.2.13.5) ein Western Blot durchgeführt (siehe Punkt 2.2.13.6).

2.2.13 Biochemische Methoden

2.2.13.1 GUS-Färbung für die Expressionsanalysen in GUS-Reporterpflanzen

Das *uidA*-Gen aus *E.coli*, welches die β -Glucuronidase (GUS) kodiert, ist eines der häufig benutzten Reportergene (Jefferson *et al.* 1987). Das gebildete Enzym hydrolysiert β -glucosidische Bindungen von Glucuroniden. Für den sichtbaren Nachweis der GUS-Aktivität wird das synthetische Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronid (X-Gluc) verwendet. Wenn Pflanzen mit einer X-Gluc enthaltenden Lösung infiltriert werden, spaltet das GUS-Enzym den Glucuronsäure-Rest von X-Gluc ab. Die freien Indolyl-derivate dimerisieren und werden oxidiert, wodurch ein blauer Farbstoff entsteht.

Um Pflanzenteile zu färben, wurden diese nach der Ernte sofort in eiskaltes 90 % (v/v) Aceton gegeben und 20 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit GUS-Puffer (50 mM Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7,2), 0,5mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0,5mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) gewaschen, bevor die Färbelösung (GUS-Puffer mit 2 mM X-Gluc) auf die Proben gegeben wurde. Der Zusatz von $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ und $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ führt zu einem schnelleren Ausfällen des Indol-Farbstoffes und damit zu präziser abgegrenzten Färbungen. Zu hohe Konzentrationen hemmen allerdings die Enzymaktivität, so dass die Intensität der Färbung abnimmt.

Die Proben wurden mit der Färbelösung infiltriert, indem in einem Exsikator langsam ein Unterdruck von 200 mbar erzeugt und für 2 Minuten gehalten wurde. Nach dem langsamen Ablassen des Vakuums wurden die Proben 3 Stunden (junge Pflanzen) oder über Nacht (ältere Pflanzen) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt. Die Proben wurden nacheinander mit 65 % (v/v) Ethanol, 80 % (v/v) Ethanol und 96 % (v/v) Ethanol bei RT gewaschen. Dadurch wurden die Blätter entfärbt, das Gewebe wurde weiß. Durch das GUS-Enzym gefärbte Stellen blieben hingegen blau. Zur Lagerung wurden die Proben in FAE (37 % (v/v) Formaldehyd, 100 % (v/v) Eisessig, 70 % (v/v) Ethanol, 5:5:90, v/v/v) überführt.

2.2.13.2 Proteinextraktion aus Pflanzen und Gelfiltration

Für die Proteinextraktion aus Pflanzen wurden 200 mg Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) in Zentrifugenröhrchen mit 4 ml Extraktionspuffer (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer mit 0,5 % Triton X-100, pH 7,8) versetzt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 200 mg des gefrorenen, gemahlenen Pflanzenmaterials mit der Lösung vermischt. Nach

einer 15 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Proben 30 Minuten bei 4°C und 25000 x g zentrifugiert (Beckman J2-HS, Rotor JA 20.1, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Dabei wurden Zelltrümmer, durch PVPP gebundene Phenole sowie aufgrund der Verwendung von Triton X-100 nicht mehr lösliche Phospholipide von den im Überstand gelösten Proteinen getrennt. Der Proteinextrakt wurde über Gelfiltration weiter aufgereinigt, um niedermolekulare Substanzen aus der Lösung zu entfernen. Dazu wurden 500 µl des Überstandes aus dem Zentrifugationsschritt auf zuvor mit Elutionspuffer (0,1 M $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ -Puffer, pH 7,0) äquilibrierten Sephadex G-25 Säulen (NAP 5 Säulen, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) gegeben. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von 1 ml Elutionspuffer aus der Säule eluiert.

2.2.13.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Bicinchoninic acid (BCA)

Die Proteinbestimmung mit Bicinchoninic acid (BCA) basiert auf dem Prinzip, dass Cu^{2+} -Ionen aus Kupfersulfat in alkalischem Medium von Proteinen zu Cu^{1+} -Ionen reduziert werden. Diese wiederum reagieren mit BCA und bilden einen purpurfarbenen Komplex, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen werden kann (Smith *et al.* 1985).

Der BCA-Test wurde mit Hilfe eines Kits (BCA-Test, Uptima, Montelucon, Frankreich) durchgeführt. Wie vom Hersteller angegeben wurden die Reagenzien A und B im Verhältnis 50:1 gemischt. 600 µl des Gemischs wurden mit 30 µl der Probe versetzt und 30 Minuten bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Absorption der Probe bei $\lambda = 562$ nm gemessen (DU 640, Beckman Coulter, Fullerton, USA). Als Leerwert (Blank) wurde der Puffer, der in der Probe enthalten war, benutzt. Als Standard wurde Rinderserumalbumin (BSA, Uptima, Montelucon, Frankreich) verwendet, welcher in verschiedenen Verdünnungsstufen gemessen wurde. Die ermittelte Extinktion wurde gegen die bekannte Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe der Steigung aus der resultierenden Eichgeraden wurde die Proteinkonzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Gleichung 9} \quad \text{Proteinkonzentration der Probe (}\mu\text{g/ml)} = (\text{E}_{\text{Probe}} - \text{E}_{\text{Blank}}) / \text{Steigung}$$

E_{Probe} = Extinktion der Probe

E_{Blank} = Extinktion des Leerwertes (Blank)

Steigung = Steigung der Eichgerade aus den Messungen des Standards

Falls die Probe während der Proteinextraktion oder vor der Messung verdünnt wurde, wurde die entsprechenden Verdünnungsfaktoren in die Berechnung einbezogen. Um die Proteinkonzentration auf die Frischmasse zu beziehen, wurde das Ergebnis mit dem Volumen des bei der Proteinextraktion verwendeten Extraktionspuffers multipliziert und das Produkt durch die Frischmasse dividiert.

2.2.13.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford wurde mit Hilfe des Coomassie PLUS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) durchgeführt. In der sauren Lösung bindet Coomassie-Farbstoff an Proteine. Dies führt zu einer Farbänderung von rotbraun zu blau. Für die Messung wurden Probe und Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:30 gemischt. Nach einer 10 minütigen Inkubationszeit bei RT wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm (Bio Photometer, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen. Als Leerwert (Blank) wurde der in den Proben enthaltene Puffer zu der Reagenz gegeben und wie die Probe behandelt. Wie bei der Proteinbestimmung mit BCA (siehe Punkt 2.2.13.3) wurde auch hier Rinderserumalbumin (BSA, Uptima, Montelucon, Frankreich) für die Erstellung einer Eichreihe und verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der unter Punkt 2.2.13.3 angegebenen Formel berechnet.

2.2.13.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen anhand ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli 1970). Die Gelmatrix besteht aus Acrylamid und Methylenbisacrylamid, wobei die Porengröße von der Konzentration der genannten Bestandteile sowie deren Verhältnis zueinander bestimmt wird. Zur Polymerisation wird Ammoniumpersulfat (APS) und der Katalysator Tetramethylethylendiamin (TEMED) zugegeben. In dieser Arbeit wurden Gele aus einem 12,5 %igen Trenngel sowie einem 5 %igem Sammelgel verwendet (Tabelle 11).

Vor dem Beladen des Gels mit den Proteinextrakten wurden diese mit Ladepuffer (0,125 M Tris, 4 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol, 0,02 % Bromphenolblau, 0,2 M Dithiothreitol; pH 6,8) versetzt und für 10 min bei 70°C inkubiert. Das im Ladepuffer enthaltene Dithiothreitol zerstört Disulfidbrücken und sorgt so für eine Entfaltung der Proteine. Außerdem wurde dem Ladepuffer SDS zugesetzt, welches sich an die

denaturierten Proteinmoleküle lagert und deren Ladung überdeckt, so dass alle Proteine negativ geladen sind und daher im Gel in die gleiche Richtung wandern.

Tabelle 11: Zusammensetzung eines Trenngels und eines Sammelgels zur SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Stammlösung	Volumen für ein 5 % Sammelgel [ml]	Stammlösung	Volumen für ein 12,5 % Trenngel [ml]
30 % Polyacrylamid	0,85	30 % Polyacrylamid	6,25
1 M Tris, pH 6,8	0,625	1,5 M Tris, pH 8,8	3,75
10 % Ammoniumpersulfat	0,05	10 % Ammoniumpersulfat	0,15
10 % SDS	0,05	10 % SDS	0,15
TEMED	0,005	TEMED	0,006
H ₂ O	3,4	H ₂ O	4,7
Gesamtvolumen	5	Gesamtvolumen	15

Nach dem Beladen des Gels wurde zunächst für 20 Minuten eine Spannung von 15 mA angelegt, bis die Proteine die Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel erreicht hatten. Anschließend erfolgte die weitere Auftrennung für 1,5 – 2 Stunden bei 25 mA. Als Laufpuffer während der Elektrophorese diente 1x SDS-Puffer (0,025 M Tris, 0,192 M Glycin, 0,1 % SDS; pH 8,3). Wenn das Gel für einen Western Blot weiter verwendet werden sollte, wurde der vorgefärbte Low-Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) benutzt. Sollte das Gel angefärbt werden, wurde als Größenabgleich dagegen ein ungefärbter Low Molecular Weight Marker (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) mit aufgetragen.

Für die Färbung des Gels wurde der Farbstoff RuBP [Ruthenium (II) tris (bathophenantrolin disulfat)] verwendet, der einen sensitiveren Nachweis von Proteinen im Vergleich zu Coomassie ermöglicht (Rabilloud *et al.* 2001). Der Farbstoff wurde vorbereitet wie in Lamanda *et al.* (2004) beschrieben. Die Gele wurden zunächst über Nacht in einer Fixierlösung (40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Eisessig) unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Fixierlösung ausgetauscht. Der frischen Lösung wurde 50 µl/l RuBP zugesetzt. Nach einer Inkubation von einer Stunde wurde die

Färbelösung durch frische Fixierlösung ersetzt. Nach einer weiteren Inkubation von 20 Minuten wurde das Gel zwei Mal für jeweils 10 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel wurde anschließend mit Hilfe einer Dokumentationsanlage (FLA-5100, Fuji Photo Film, Düsseldorf, Deutschland) visualisiert.

2.2.13.6 Western Blot

Bei einem Western Blot werden die über ein SDS-Gel aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen. In dieser Arbeit wurde für den Western Blot das Tank Blot System verwendet. Dafür wurden das Gel, eine Nitrocellulose-Membran (Protran BA 83, Whatman®), Filterpapier und Schwämme in Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol) äquilibriert und luftblasenfrei in folgender Reihenfolge aufeinander geschichtet: Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm. Die Übertragung auf die Membran erfolgte in gekühltem Transferpuffer über Nacht bei 30 V und 40 mA (Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Bio-Rad). Vor der weiteren Verwendung wurde die Membran in TBS-Puffer (20 mM Tris, 140 mM NaCl, pH 7,5) gewaschen, um Reste des Transferpuffers zu entfernen.

Zur Detektion bestimmter Proteine auf der Membran werden Antikörper verwendet. Der eingesetzte Antikörper erkennt spezifische Regionen (Epitope) des nachzuweisenden Proteins oder ein an dieses fusioniertes Proteinfragment und bindet daran. In dieser Arbeit wurde das nachzuweisende Protein mit einem Polyhistidine-(6x His)-Tag versehen. Zur Detektierung wurde daher ein gegen den Polyhistidine-Tag gerichteten Antikörper verwendet (Anti His (C-term) - AP Antibody). Der Antikörper war direkt an eine alkalische Phosphatase gekoppelt. Dies ermöglicht die spätere Sichtbarmachung des Proteins mittels einer Farbreaktion. Die alkalische Phosphatase katalysiert die Umsetzung von 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat (BCIP, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu einem schwach blauen Farbstoff. Außerdem wird Nitroblau-Tetrazoliumsalz (NBT, Roth, Karlsruhe, Deutschland) zu einem dunkelvioletten Farbstoff umgesetzt.

Da die Membran unspezifisch alle Proteine fixiert, würde sich bei direkter Zugabe des Antikörpers auch dieser an alle freien Bindungsstellen haften und einen spezifischen Nachweis verhindern. Daher müssen die freien Bindungsstellen auf der Membran zunächst mit einem für den Antikörper nicht erkennbaren Protein blockiert werden. Dafür wurde die Membran mit TBS-Puffer, der 5 % (w/v) Milchpulver (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

enthielt, für 2 Stunden bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran 2 Stunden mit dem 1:2000 in TBST-Puffer (TBS mit 0,1 % (v/v) Tween-20) verdünnten Antikörper inkubiert. Die Lösung enthielt zusätzlich 1 % (w/v) Milchpulver, um den Hintergrund so gering wie möglich zu halten. Zur Entfernung von überschüssigem Antikörper wurde die Membran danach 4mal für jeweils 5 Minuten mit TBST, anschließend einmal für 5 Minuten mit TBS gewaschen. Danach folgte die Umpufferung für die enzymatische Reaktion. Die Membran wurde dafür 2 mal für jeweils 10 Minuten mit AP-Puffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5) gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit der Substratlösung (AP-Puffer mit 66 µl/10ml NBT-Stammlösung sowie 33 µl/10 ml BCIP-Stammlösung; Stammlösungen: 50 mg/ml in 100 % DMF) inkubiert. Nach 10 bis 30 Minuten waren purpurfarbene Banden dort zu erkennen, wo der Antikörper an das Epitop gebunden hat.

2.2.13.7 Bestimmung der Aktivität der Guajakolperoxidase

Guajakolperoxidasen sind Enzyme, die H₂O₂ mit Hilfe von Guajakol (2-Methoxyphenol) als Kosubstrat umsetzen können. Durch photometrische Messung der Zunahme des rotbraunen tetrameren Substrates während einer solchen Reaktion kann die Aktivität von Guajakolperoxidasen ermittelt werden (Polle *et al.* 1990). Hierzu wurden gelfiltrierte Proteinextrakte (siehe Punkt 2.2.13.2) mit Guajakol und H₂O₂ versetzt (Zusammensetzung eines Testansatzes siehe Tabelle 12). Die Extinktionszunahme wurde bei $\lambda = 436$ nm und 25 °C über eine Dauer von 5 Minuten gemessen (Specord 205, Analytic Jena, Jena, Deutschland).

Tabelle 12: Zusammensetzung eines Ansatzes für die Messung der Aktivität der Guajakolperoxidase. Die Guajakol- sowie die H₂O₂-Lösung wurde vor jeder Messung frisch angesetzt und lichtgeschützt auf Eis aufbewahrt.

Substanz	Volumen [µl]	Endkonzentration [mM]
0,1 M KPP, pH 5,25	500	50
0,1 M KPP, pH7,0 (Elutionspuffer)	50 – X	
Probe	X	
0,1 M Guajakol	400	40
0,2 M H ₂ O ₂	50	10
Gesamt	1000	

Die Extinktionsänderung ΔE wurde über eine Regressionsgerade mit Hilfe der Messpunkte bestimmt. Die Berechnung der Aktivität der Guajakolperoxidase basiert auf dem Lambert-Beerschen-Gesetz nach folgender Formel:

Gleichung 10: Aktivität (nkat/l Extrakt) = $(\Delta E * V_T * \text{Verd}_G * \text{Verd}_P * c) / (\epsilon * V_E)$

ΔE = Extinktionsänderung (1/min)

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (für Guajakolperoxidase = $25,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

V_T = Gesamtvolumen des Tests (μl)

V_E = Volumen Extrakt im Test (μl)

Verd_G = Verdünnung Gelfiltration (siehe Punkt 2.2.7.2)

Verd_P = Verdünnung der Probe im Test

c = Umrechnungsfaktor zur Umrechnung in nkat (16666,67)

Um die Aktivität auf die Proteinkonzentration zu beziehen, wurde zunächst die Aktivität pro g Frischmasse (FM) berechnet:

Gleichung 11: Aktivität [nkat/g FM] = $\frac{\text{Aktivität [nkat]}}{(\text{FM [g]})}$

Mit Hilfe der bestimmten Proteinkonzentration (siehe Gleichung 9 unter Punkt 2.2.13.3) wurde die Aktivität pro mg Protein berechnet:

Gleichung 12: Aktivität [nkat/mg Protein] = $\frac{\text{Aktivität [nkat/g FM]}}{(\text{Proteinkonzentration [mg/gFM]})}$

2.2.13.8 Enzymatische Zuckerbestimmung

Die Quantifizierung von Glukose, Fruktose und Saccharose im Xylemsaft von Raps erfolgte enzymatisch (Beutler 1978, Schopfer 1989). Bei dieser Methode werden die Zuckermetabolite durch Zugabe von Enzymen zunächst zu Fruktose-6-Phosphat umgewandelt. Diese wird über eine aktivierte Zwischenstufe zu Gluconat-6-Phosphat umgesetzt. Dabei wird NADP^+ zu NADPH reduziert, dessen Absorption photometrisch bestimmt werden kann. Mit Hilfe des Lambert-Beerschen-Gesetzes kann daraus die in der Probe vorhandene Konzentration der einzelnen Zuckermetabolite berechnet werden.

Für die Messung wurden 200 μl des Xylemsaftes mit dem gleichen Volumen 50 μM Citratpuffer (Natriumcitrat-Dihydrat, pH 4,6) gemischt und auf Eis gestellt. 100 μl von diesem Ansatz wurden in 1,6 ml Halbmikroküvetten aus Polystyrol (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) mit 250 μl einer Reaktionslösung (4 mM NADP^+ , 10 mM ATP, 9 mM MgSO_4 , 0,75 M Triethanolamin, pH 7,6) sowie 400 μl H_2O versetzt. Nach 2minütiger Inkubationszeit wurde die Extinktion (E1) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 340 \text{ nm}$ mit einem Spectrophotometer (DU 640, Beckman Coulter, Fullerton, USA) gemessen. Anschließend wurden 10 μl Hexokinase/Glukose-6P-Dehydrogenase (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) hinzugefügt. Während der 5 minütigen Inkubationszeit wird Glukose durch ATP in Gegenwart der Hexokinase zu Glukose-6-phosphat phosphoryliert, welches wiederum durch die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase oxidiert wird, wobei die Elektronen auf NADP^+ übertragen werden. Dadurch entstehen Gluconat-6-phosphat und $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Die Extinktion von NADPH wurde nach einer Inkubationszeit photometrisch bei 340 nm gemessen, wobei die gebildete Menge des NADPH zur ursprünglichen Menge der Glukose äquivalent ist.

Fruktose wird gleichzeitig mit Glukose durch ATP in Gegenwart von Hexokinase zu Fruktose-6-phosphat phosphoryliert. Nach der Glukosebestimmung wurde dieses durch Zugabe von 5 μl Phosphoglukose-Isomerase (PGI, Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland) zunächst zu Glukose-6-phosphat, anschließend zu Gluconat-6-phosphat umgewandelt. 5 Minuten nach Zugabe des Enzyms wurde die Probe zur Bestimmung der Fruktose-Konzentration photometrisch gemessen (E3).

Im letzten Schritt wurde durch Zugabe von 10 μl β -Fruktosidase-Lösung (60 mg Fructosidase (Roche, Grenzach-Whylen, Deutschland)/1 ml 0,32 M Citratpuffer, pH 4,6) während einer 15 minütigen Inkubationszeit Saccharose zu Glukose und Fruktose

hydrolisiert. Beides wurde über die oben beschriebenen Zwischenschritte zu Gluconat-6-phosphat umgewandelt und die Zunahme des NADPH gemessen (E4), um Rückschlüsse über die Menge von Saccharose in der Probe zu ziehen.

Während sämtlicher Inkubationszeiten wurden die Proben abgedunkelt und bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe der jeweiligen Enzyme wurden die Proben mit Rührspatel (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) gut vermischt. Um methodische Fehler auszuschließen, wurden 3 Wiederholungen durchgeführt. Außerdem wurden parallel zu den Proben jeweils ein Leerwert (Wasser statt Probe) sowie eine Standard-Zuckerlösung (je 100 mg/l Glukose, Fruktose und Saccharose in H₂O) als Kontrolle gemessen. Die Berechnung der Konzentration der einzelnen Metabolite erfolgt unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren, des Testvolumens sowie der genauen Einwaage der Probe nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz:

Gleichung 13:

$$c \text{ [mg/ml]} = \frac{\text{Testvolumen} * \text{MG}}{(\epsilon \text{ NADPH} * \text{Schichtdicke in cm} * \text{Probenvolumen in ml}) * \Delta E}$$

MG = Molekulargewicht des jeweiligen Zuckermetaboliten

ϵ (NADPH) = Extinktionskoeffizient von NADPH = 6300 mM⁻¹cm⁻¹

ΔE = Extinktion – zuvor gemessene Extinktion, also für Glukose E2-E1, für Fruktose E3-E2 und für Saccharose E4-E3

2.2.13.9 Aminosäurebestimmung

Die Konzentration von Aminosäuren im Xylemsaft wurde mit Hilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High-performance liquid chromatography, HPLC, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland) ermittelt wie in Riens *et al.* (1991) und in Zhou (2000) beschrieben. Dabei wurden die Aminosäuren mit *ortho*-Phthaldialdehyd (OPA) und β -Mercaptoethanol derivatisiert, wodurch diese mittels Fluoreszenz nachweisbar waren. Hierzu wurden 0,5 ml OPA-Stocklösung (16 mM OPA, 88 % (v/v) Methanol, 0,1 M Kaliumborat (pH 10,4), 1,1 % (v/v) β -Mercaptoethanol) zu 1 ml einer 1 M Kaliumboratlösung (pH 10,4) gegeben. 20 μ l dieser Arbeitslösung wurden mit 20 μ l

Xylemsaft gemischt und 1 min derivatisiert. Anschließend wurden 20 µl des Gemischs mit einem automatisch gesteuerten Probengeber (Autosampler 2157, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland) bei 35°C auf eine C-18 Reversed Phase Säule (Superspher, 100 RP 18 endcapped, 4 µm, 4 x 125 mm; Merck, Darmstadt, Deutschland) aufgetragen. Um Verunreinigungen der Säule zu verhindern, wurde zusätzlich eine Vorsäule (LiChrospher 100 RP 18e, 5 µm, Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Als Standard wurde eine fertige Lösung (Amino Acid Standard Solution A-2161, Sigma, Steinheim, Deutschland) verwendet, der zusätzlich Glutamin, Asparagin, Tryptophan und γ -Aminobuttersäure sowie α -Aminobuttersäure (interner Standard) in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt waren.

Die Aminosäurederivate wurden durch einen Gradienten aus Acetonitril und Phosphatpuffer aus der Säule eluiert (detailliertes Protokoll siehe Zhou 2000). Zur Erzeugung des Gradienten wurde ein Gradientenmischer (Low Pressure Mixer, Ternary, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland) verwendet. Die Emission der Derivatisierungsprodukte wurde nach einer Anregung bei 330 nm bei 408 nm gemessen (Fluoreszenzdetektor 2144, Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland). Zur Auswertung der Daten wurde ein Integrationsprogramm (PeakNet Version 5.1, Chromatographie Datenstation, Dionex GmbH, Idstein, Deutschland) verwendet.

2.2.14 Anatomische und histologische Methoden

2.2.14.1 Einbettung in Styrol-Methacrylat

Pflanzenteile, die anatomisch untersucht werden sollten, wurden nach der Ernte in einer Mischung aus 37 % (v/v) Formaldehyd, 100 % (v/v) Eisessig und 70 % (v/v) Ethanol (FAE, 5:5:90) aufbewahrt. Für die Einbettung wurde das Material in 70 % (v/v) Ethanol überführt, wobei das Hypokotyl von *A. thaliana* als Ganzes belassen wurde, während von den Blättern 0,5 x 0,5 cm große Fragmente von der adaxialen Seite der Blätter im Bereich der Mittelrippe verwendet wurden. Die Proben wurden dann entwässert, bevor sie mit dem Plastik infiltriert wurden. Dazu wurden sie nacheinander in den folgenden Lösungen inkubiert: 70 % (v/v) Ethanol für 2 h, 80 % (v/v) Ethanol für 2 h, 90 % (v/v) Ethanol für 2 h, 96 % (v/v) Ethanol für 2 h, 96 % (v/v) Ethanol für 12 h, 100 % (v/v) Ethanol für 2 h, 100 % (v/v) Ethanol : 100 % (v/v) Aceton (1:1) für 2 h, 100 % (v/v) Aceton für 2 h (2 x), 100 % (v/v) Aceton : Plastik (1:1) für 4 h, 100 % (v/v) Aceton : Plastik (1:3) für 12 h,

reines Plastik für 12 h (2 x). Für die Plastik-Lösung wurden Styrol (Merck, Darmstadt, Deutschland) und Butyl-Methacrylat (Sigma, Steinheim, Deutschland) im Verhältnis 1:1 gemischt. Zusätzlich wurde 2 % (w/v) Dibenzoylperoxid hinzugegeben, welches 50 % Phthalat enthält (Peroxid Chemie GmbH, Pullach, Deutschland). Nach der Infiltration mit flüssigem Plastik wurden die Proben in Gelatine-Kapseln (Größe 0, Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) überführt, mit frischer Plastik-Lösung bedeckt und leicht gekippt in einem Trockenschrank für 1 Tag bei 60°C und weitere 10 Tage bei 37°C inkubiert, bis das Plastik polymerisiert war.

2.2.14.2 Herstellung von Semidünnschnitten mit Hilfe eines Mikrotoms

Vor dem Schneiden mit dem Mikrotom wurden die eingebetteten Proben zunächst getrimmt. Beim Trimmen wurde überflüssiges Plastik, das die Probe umgibt, entfernt. Die später mit dem Mikrotom zu schneidende Fläche sollte möglichst klein, die Probe aber noch von allen Seiten vom Einbettungsmedium umgeben sein. Hierfür wurden die Plastikblöckchen zunächst mit Hilfe einer kleinen Handsäge bearbeitet. Das feinere Trimmen erfolgte mit einer Rasierklinge und Zuhilfenahme eines Binokulars. Dabei wurde die Probe in eine pyramidenartige Form gebracht. Hierbei war darauf zu achten, dass die Seitenkanten möglichst parallel waren. Die Spitze der Pyramide wurde so weit abgetragen, bis die Probe frei lag. Das ca. 0,5 x 0,5 x 1 cm große Blöckchen wurde anschließend mit der Grundseite auf eine Probenhalterung aufgeklebt (Pattex Sekundenkleber Blitzkleber Gel, Henkel, Düsseldorf, Deutschland). Nach einer Trockenzeit von 1 – 2 Stunden bei 60°C wurden die Proben weiter bearbeitet.

Die Herstellung von Semidünnschnitten erfolgte mit Hilfe eines Mikrotoms (Autocut, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland). Zum Schneiden wurden frisch gebrochene Glasmesser (Knifemaker 7800, LKB, Stockholm, Schweden) verwendet. Die fertigen Schnitte wurden mit Hilfe eines Pinsels oder einer Federstahlpinzette auf gelatinierte Objektträger auf einen Tropfen frisch abgekochtes Wasser aufgesetzt. Anschließend wurden die Schnitte 30 Sekunden mit Chloroform bedampft, wodurch sich eingerollte und gefaltete Schnitte wieder streckten. Zum Schluss wurden die Objektträger auf eine Heizplatte (60°C) gelegt, bis der Wassertropfen getrocknet war.

2.2.14.3 Herstellung von Schnitten mit dem Gefriermikrotom

Die Herstellung der Querschnitte der GUS-Reporterpflanzen erfolgte mit einem Gefriermikrotom (2800 Frigocut N, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland). Damit die Zellen bei dieser Methode nicht platzen, wurden die Proben zuvor mit einem speziellen, zuckerhaltigen Einbettungsmedium (Pabisch, Bielefeld, Deutschland) infiltriert. Dazu wurden die in FAE fixierten Proben zunächst in 70% (v/v) Ethanol überführt. Danach wurden sie für 2 Stunden unter leichtem Schwenken in einem Gemisch aus 70 % (v/v) Ethanol und dem Einbettungsmedium (1:1) und anschließend für weitere 2 Stunden in 100 % Einbettungsmedium inkubiert. Die vorbereiteten Proben wurden bei -25°C geschnitten. Die fertigen, 10 µm dicken Schnitte wurden auf einen Objektträger mit 50 % (v/v) Glycerin gelegt, mit einem Deckgläschen bedeckt und sofort mikroskopisch untersucht.

2.2.14.4 Herstellung von gelatinierten Objektträgern

Damit die Schnitte gut auf den Objektträgern haften, wurden sie zuvor mit einer Gelatine-Lösung überzogen. Dafür wurden die Objektträger zunächst mit Aceton von Fettschlieren befreit, indem sie 30 Minuten in einer Glaspetrischale mit Aceton inkubiert wurden. Anschließend wurden die Objektträger in ein Edelstahlgestell positioniert, mit Leitungswasser abgespült und für 2 Stunden im Ultraschallbad in einer 2 % (v/v) Extranlösung gereinigt. Danach wurden sie 2 Stunden unter fließendem Leitungswasser und weitere 5 Minuten mit demineralisiertem H₂O gespült. Die gesäuberten Objektträger wurden noch im feuchten Zustand in eine 0,5 % (w/v) Gelatine-Lösung getaucht. Die Lösung wurde zuvor frisch angesetzt, bei 50°C gelöst und mit Hilfe eines Faltenfilters filtriert. Um eine bessere Haltbarkeit zu gewährleisten und Kontaminationen mit Mikroorganismen zu verhindern, wurde der Gelatine-Lösung 1,77 mM Kaliumchrom–III-sulfat zugesetzt. 2 Stunden nach dem Überziehen mit der Gelatine-Lösung waren die Objektträger getrocknet und konnten verwendet werden.

2.2.14.5 Färbung mit Toluidinblau

Toluidinblau ist ein Farbstoff, der an saure Gruppen bindet und eine Färbung von grün bis violett hervorruft, je nachdem, wie stark und an welches Molekül er gebunden ist. Lignifizierte Zellwände färben sich beispielsweise türkisblau, während Cytoplasma und unverholzte Zellwände sich violett färben.

Für die Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in einem Tropfen 0,05 % (w/v) Toluidinblau in destilliertem Wasser bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff unter fließendem Wasser entfernt, und der Schnitt wurde auf der Heizplatte bei 60°C getrocknet.

2.2.14.6 Licht- und Fluoreszenzmikroskopie

Gefärbte Schnitte wurden im Hellfeld eines Lichtmikroskops (Axioskop, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Autofluoreszenz wurde an ungefärbten Schnitten mit der Filterkombination G365/FT395/LP420 detektiert. Digitale Bilder der Autofluoreszenz wurden mit einer Belichtungszeit von 1,5 Sekunden aufgenommen.

2.2.15 Statistik

Für die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Statgraphics überprüft, ob die Ergebnisse normalverteilt waren und die Varianzhomogenität gegeben war. War dies der Fall, so wurden die Daten bei einem Vergleich von zwei Varianten mit dem Student's T-Test analysiert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ wurden die Ergebnisse mit einem Stern gekennzeichnet. Bei einer noch geringeren Irrtumswahrscheinlichkeit wurden die Unterschiede mit zwei ($p \leq 0,01$) bzw. drei ($p \leq 0,001$) Sternen markiert. Zur Ermittlung der Signifikanz von Unterschieden zwischen mehreren Varianten wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von einem Multiple Range Test (Fisher's LSD Test) durchgeführt. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) werden in dieser Arbeit durch unterschiedliche Buchstaben dargestellt. Wenn die Daten nicht normalverteilt oder die Varianzen nicht homogen waren, wurde der Mann-Whitney-Test verwendet. Die Ergebnisse werden in Form von mit dem PC-Programm Origin erstellten Box-und-Whisker-Plots präsentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Analysen des Xylemsaftes von *Brassica napus* im Bezug auf potentielle antifungale Eigenschaften

Um zu überprüfen, ob der Xylemsaft von Raps (*B. napus* var. *napus*) antifungale Eigenschaften aufweist und ob diese sich nach Infektion der Pflanzen mit *V. longisporum* verändern, wurde die Proliferation des Pathogens im Xylemsaft von infizierten Pflanzen und in Xylemsaft von Kontrollpflanzen *in vitro* untersucht. Dafür wurden Sporen von *V. longisporum* in Xylemsaft inkubiert (Gesamtvolumen = 1 ml). Nach 3 Tagen wurde die Pilzmenge anhand von DNA-Messungen ermittelt (Punkt 2.2.3.3).

Die Ergebnisse zeigten, dass der Pilz im Xylemsaft von infizierten Pflanzen schlechter wuchs als im Xylemsaft von Kontrollen (Abb. 3). Während die Konzentration der Pilz-DNA im Xylemsaft von infizierten Pflanzen um 15 pg pro μl betrug, war sie im Xylemsaft von Kontrollpflanzen um etwa 50 % reduziert.

Abb. 3: Wachstum von *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten (schwarze Säule) und im Xylemsaft von mock inokulierten Pflanzen (weiße Säule). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Abgebildet ist die mittlere Konzentration pilzlicher DNA nach 3tägiger Inkubation mit Standardabweichung ($n = 15$ für Xylemsaft aus infizierten Pflanzen, $n = 13$ für Xylemsaft aus nicht infizierten Pflanzen). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) sind durch zwei Sterne gekennzeichnet. Die DNA-Messung wurde von der AG Karlovsky durchgeführt. Die Daten wurden bereits veröffentlicht (Floerl, Druebert *et al.* 2008).

Um auszuschließen, dass der beobachtete inhibitorische Effekt von Xylemsaft aus infizierten Pflanzen auf *V. longisporum* auf Unterschiede in der Nährstoffzusammensetzung zurückzuführen war, wurde die Konzentration von Zuckern, Aminosäuren, Mineralelementen sowie der Proteine bestimmt.

Die Konzentration von Glukose, Fruktose und Saccharose im Xylemsaft von infizierten Pflanzen unterschied sich nicht von der im Xylemsaft von Kontrollpflanzen (Abb. 4).

Abb. 4: Glukose, Fruktose und Saccharose im Xylemsaft infizierter (schwarze Säulen) und nicht infizierter Pflanzen (weiße Säulen). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Dargestellt ist die mittlere Konzentrationen der einzelnen Zuckermetabolite mit Standardabweichung (n = 8).

Auch hinsichtlich der Proteinmenge gab es keine Unterschiede zwischen den Xylemsäften der unterschiedlich behandelten Pflanzen (Abb. 5). Die Summe aller löslichen Aminosäuren war in den verschiedenen Xylemsäften ebenfalls gleich (Abb. 6). Jedoch ergab die Messung signifikante Unterschiede bei einzelnen Aminosäuren. So war die Konzentration von Glycin und Isoleucin im Xylemsaft von infizierten Pflanzen erhöht, während die Menge an Tryptophan in infizierten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen verringert war (Tabelle 13).

Abb. 5: Gesamt-Proteinkonzentration im Xylemsaft infizierter (schwarze Säulen) und nicht infizierter Pflanzen (weiße Säulen). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Dargestellt ist die mittlere Proteinkonzentrationen mit Standardabweichung (n = 5).

Abb. 6: Summe aller freien Aminosäuren im Xylemsaft infizierter (graue Box) und nicht infizierter Pflanzen (weiße Box). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Die Daten sind dargestellt als Box-Plots (n = 5). Die Box beinhaltet 50 % der Werte. Die Linie innerhalb der Box stellt den Median dar. Zusätzlich ist der Mittelwert als Quadrat abgebildet.

Tabelle 13: Konzentration der verschiedenen Aminosäuren im Xylemsaft infizierter und nicht infizierter Pflanzen. Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Angegeben sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung ($n = 5$). Signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen im Xylemsaft infizierter und nicht infizierter Pflanzen sind durch unterschiedliche Buchstaben in Klammern gekennzeichnet.

Aminosäure	Konzentration im Xylemsaft aus nicht infizierten Pflanzen [μM]	Konzentration im Xylemsaft aus infizierten Pflanzen [μM]
Asparagin	125,6 $\pm$ 55,6 (a)	89,6 $\pm$ 80,4 (a)
Glutamin	241,4 $\pm$ 90 (a)	191,6 $\pm$ 124,1 (a)
Asparaginsäure	36,8 $\pm$ 8,2 (a)	49,6 $\pm$ 19,7 (a)
Serin	67,8 $\pm$ 17,6 (a)	89,6 $\pm$ 35,1 (a)
Histidin	17,6 $\pm$ 5,8 (a)	19,8 $\pm$ 3,6 (a)
Glutaminsäure	240,2 $\pm$ 84,7 (a)	286,4 $\pm$ 151 (a)
Glycin	36,8 $\pm$ 7,1 (a)	62,6 $\pm$ 10,5 (b)
Threonin	39,6 $\pm$ 18,4 (a)	61,6 $\pm$ 19,2 (a)
Arginin	34,8 $\pm$ 11,9 (a)	48,2 $\pm$ 16,5 (a)
Alanin	149,8 $\pm$ 72,9 (a)	205,2 $\pm$ 31,6 (a)
γ -Aminobuttersäure	176,2 $\pm$ 43 (a)	237,4 $\pm$ 56,2 (a)
Tyrosin	21,2 $\pm$ 3,1 (a)	17,2 $\pm$ 10,7 (a)
Valin	88,2 $\pm$ 12,2 (a)	105,6 $\pm$ 32,7 (a)
Methionin	5,4 $\pm$ 0,9 (a)	4,4 $\pm$ 3,7 (a)
Tryptophan	11,6 $\pm$ 2,3 (b)	6,6 $\pm$ 4,6 (a)
Isoleucin	32,2 $\pm$ 3,8 (a)	45 $\pm$ 12,6 (b)
Phenylalanin	14,2 $\pm$ 2 (a)	11,2 $\pm$ 5,7 (a)
Leucin	30,8 $\pm$ 6,5 (a)	38,2 $\pm$ 16,2 (a)
Lysin	27,6 $\pm$ 4,8 (a)	30 $\pm$ 16,7 (a)

Bezüglich der Mineralnährstoffe gab es geringe, jedoch signifikante Unterschiede bei einzelnen Elementen (Abb. 7). Die Konzentration von Kalium und Magnesium war im Xylemsaft von infizierten Pflanzen im Vergleich zu dem Saft aus Kontrollen erhöht, während die von Phosphor und Schwefel verringert war. Die Mengen von Calcium und Eisen waren im Xylemsaft von den unterschiedlich behandelten Pflanzen gleich.

Abb. 7: Mineral-Nährelemente im Xylemsaft infizierter (schwarze Säulen) und nicht infizierter Pflanzen (weiße Säulen). Dargestellt ist die mittlere Konzentration von Phosphor (P), Schwefel (S), Kalium (K), Calcium (Ca), Magnesium (Mg) und Eisen (Fe) mit Standardabweichung ($n = 5$). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den Xylemsäften der unterschiedlich behandelten Pflanzen sind mit einem Stern markiert. Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen.

Zusammenfassend ist also festzustellen, dass es nur geringfügige Unterschiede im Xylemsaft von infizierten und dem von Kontrollpflanzen hinsichtlich der Bestandteile gab, die *V. longisporum* als Nährstoffquelle benutzen kann. Der beobachtete Wachstumsunterschied des Pilzes im Xylemsaft von infizierten Pflanzen konnte also nicht durch eine geringere Nährstoffverfügbarkeit der hier untersuchten Bestandteile erklärt werden.

Als andere mögliche Substanz für den inhibierenden Effekt kam Salicylsäure in Frage. Im Xylemsaft von *B. napus* var. *napus* wurden signifikant höhere Mengen Salicylsäure (SA) sowie Salicylsäure-Glycosid (SAG) nach Infektion mit *V. longisporum* detektiert (Ratzinger *et al.* 2009). Daher wurde das oben beschriebene Wachstumsexperiment von *V. longisporum* in Xylemsaft unter Zugabe von 3 μ M Salicylsäure wiederholt. Die Konzentration von Salicylsäure richtete sich hierbei nach den Messergebnissen des Pflanzenhormons im Xylemsaft von *B. napus* Pflanzen nach Infektion mit *V. longisporum* (Ratzinger *et al.* 2009). Das Experiment wurde sowohl mit Xylemsaft von Kontrollpflanzen als auch mit PDB Medium durchgeführt. In keinem der beiden verschiedenen Versuchsansätze gab es Unterschiede hinsichtlich der DNA-Menge von *V.*

longisporum (Abb. 8). Salicylsäure hatte also keinen direkten Effekt auf das Pilzwachstum und konnte daher als Auslöser für das eingeschränkte Wachstum von *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten *B. napus* Pflanzen ausgeschlossen werden.

Abb. 8: Wachstum von *V. longisporum* unter dem Einfluss von Salicylsäure. Dargestellt ist die Konzentration von *Verticillium*-DNA im Xylemsaft von Kontrollpflanzen (A) und in PDB-Medium (B) mit (dunkelgraue Säulen) und ohne (hellgraue Säulen) Zusatz von 3 µM Salicylsäure. Präsentiert werden Mittelwerte mit Standardabweichung (n = 6 für Xylemsaft, n = 10 für PDB-Medium). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Die DNA-Messung wurde von der AG Karlovsky durchgeführt.

Neben dem putativen Nutzen der Proteine im Xylemsaft von Raps als Nährstoffquelle für *V. longisporum* könnten diese auch wachstumsinhibierende Eigenschaften gegen das Pathogen aufweisen. Da Floerl *et al.* (2008) Proteine mit putativ antifungalen Eigenschaften im Xylemsaft von Raps nachgewiesen hatten, sollte überprüft werden, ob diese Xylemsaft-Proteine das Wachstum von *V. longisporum* beeinflussen können und ob die nach Infektion durch *V. longisporum* neu oder vermehrt sekretierten Proteine für den beschriebenen inhibitorischen Effekt bezüglich des Wachstums des Pilzes im Xylemsaft von infizierten Pflanzen verantwortlich waren. Daher wurde der Einfluss der Proteine aus dem Xylemsaft von infizierten und nicht infizierten *B. napus* Pflanzen auf das Wachstum von *V. longisporum* *in vitro* untersucht. Dazu wurden die Wachstumsexperimente mit Xylemsaft wiederholt, aus dem Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 3 kDa durch Filtration entfernt wurden. In einem Bradford-Test konnten in filtriertem Xylemsaft keine Proteine mehr detektiert werden. Parallel dazu wurde das Wachstum des Pilzes in PDB-Medium untersucht, welches mit 15 µg/ml (Endkonzentration) der aus dem Xylemsaft heraus gefilterten Proteine versetzt wurde.

Die DNA-Menge von *V. longisporum* war nach 3-tägiger Inkubation im proteinfreien Xylemsaft deutlich höher als die in ungefiltertem Xylemsaft (Abb. 9 A). Dieser Effekt war in gleichem Maße im Xylemsaft von infizierten wie in dem von Kontrollpflanzen zu beobachten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte in Wachstumsexperimenten in PDB-Medium gezeigt werden, dass das Wachstum von *V. longisporum* durch Zugabe der Proteine aus dem Xylemsaft im Vergleich zu nicht supplementiertem PDB-Medium deutlich eingeschränkt wurde (Abb. 9 B). Die Proteine im Xylemsaft von *B. napus* hatten also eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation von *V. longisporum*. Da die Proteine aus dem Xylemsaft von nicht infizierten Pflanzen ähnliche antifungale Eigenschaften aufwiesen wie die aus dem Xylemsaft von infizierten Pflanzen, lässt sich schlussfolgern, dass *B. napus* konstitutiv Proteine in den Apoplast sekretiert, die unkontrolliertes Wachstum von *V. longisporum* unterdrücken.

Abb. 9: Einfluss von Xylemsaft-Proteinen auf das Wachstum von *V. longisporum*. Abgebildet ist die Konzentration von *Verticillium*-DNA im Xylemsaft (A) und in PDB-Medium (B) in Anwesenheit (schraffierte Säulen) oder Abwesenheit (graue, nicht schraffierte Säulen) von Xylemsaft-Proteinen. Präsentiert werden Mittelwerte mit Standardabweichung ($n = 5$). Signifikante Unterschiede zwischen den Proben mit und denen ohne Proteine sind durch zwei ($p \leq 0,01$) oder drei ($p \leq 0,001$) Sterne gekennzeichnet. Zwischen der Behandlung mit Proteinen aus dem Xylemsaft aus Kontrollpflanzen (Xylemsaft (K) bzw. PDB + P (K)) und denen aus infizierten Pflanzen (Xylemsaft (+VL43) bzw. PDB + P (+VL43)) gab es keine Unterschiede ($p = 0,4$ im Xylemsaft bzw. $p = 0,2$ im PDB-Medium). Der Xylemsaft wurde zwischen 25 und 28 dpi gewonnen. Die DNA-Messung wurde von der AG Karlovsky durchgeführt.

3.2 Charakterisierung von T-DNA-Insertionsmutanten von *Arabidopsis thaliana* hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber *Verticillium longisporum*

Für die funktionelle Charakterisierung der von *V. longisporum* beeinflussten Proteine wurden Pflanzen mit einer veränderten Expression des entsprechenden Gens untersucht. Hierfür wurden T-DNA-Insertionslinien verwendet. Bei diesen Linien handelt es sich um Pflanzen, bei denen eine T-DNA in ein bestimmtes Gen oder in dessen Promoterbereich integriert ist, was zu einer Beeinträchtigung oder zum vollständigen Verlust der Genfunktion führen kann. Für die zu analysierenden Kandidatengene waren 1 bis 3 verschiedene Linien pro Gen verfügbar. Mit Hilfe der öffentlich zugänglichen Angaben zur Sequenz der verschiedenen Gene (The Arabidopsis Information Resource; www.tair.org) wurde überprüft, in welchem Bereich des jeweiligen Gens die T-DNA inseriert ist (Abb. 10). Nur für 2 Gene (At5g05340 und At5g08370) gab es Linien, bei denen die kodierenden Bereiche des Gens von der Insertion direkt betroffen sind. Bei allen anderen Linien lag die Insertion im UTR-Bereich oder außerhalb des Gens. Die Samen wurden bestellt und vermehrt. Für alle Linien konnten mittels PCR in der folgenden Generation homozygote Pflanzen identifiziert werden. Dies ist beispielhaft für die Linie SALK_147839, die das Gen At4g12910 (Serin-Carboxypeptidase) betrifft, dargestellt (Abb. 11).

Um zu überprüfen, ob die Expression des jeweiligen Gens durch die Insertion der T-DNA beeinträchtigt war, wurden unter Kurztag-Bedingungen angezogene, homozygote Pflanzen aller Linien mittels qRT-PCR überprüft. Da für die Generierung der SALK-Linien der Ökotyp Columbia, für die FLAG-Linien dagegen der Ökotyp Wassilewskija verwendet wurde, wurden beide Ökotypen in den Versuchen mitgeführt. Die Expression der durch die Insertion betroffenen Gene der SALK-Linien wurde relativ zu der des gleichen Gens im Columbia Wildtyp (Col-0) ermittelt. Die Expression der Gene der FLAG-Linien wurde mit der im Wassilewskija Wildtyp (Ws-2) verglichen.

Bei der Linie SALK_051769, bei der die T-DNA-Insertion den Promoterbereich des Gens für die Peroxidase 34 (pod34) betrifft, war die relative Transkriptmenge von pod34 signifikant gegenüber der im Wildtyp erhöht (Abb. 12). Bezüglich der Peroxidase 37 (pod37) wurden drei SALK-Linien getestet. Eine (SALK_024708) wies eine erhöhte Expression von pod37 auf, während sich die Transkriptmenge von pod37 der weiteren Linien (SALK_022520 und SALK_089515) nicht von der des Wildtyps unterschied.

Abb. 10: Schematische Darstellung der untersuchten Zielgene. Diese codieren für folgende Proteine: Peroxidase 34 (POD34), Peroxidase 37 (POD37), Peroxidase 52 (POD52), Serin-Carboxypeptidase (SCP), α -Galactosidase (GAL), Lektin-ähnliches Protein (LLP) und Germin-ähnliches Protein 3 (GLP3). Abgebildet sind Exons (weiß), Introns (schwarz) und die UTR-Bereiche (grau) sowie die cDNA umgebende Region der DNA (dünnere Linie). Die Position der inserierten T-DNA der verschiedenen T-DNA-Insertionslinien ist mit einem Dreieck gekennzeichnet. Pfeile zeigen die Bindestellen der Primer für die qRT-PCR-Analysen (FW und REV) sowie die der Primer an, die für die PCR zur Selektion homozygoter Pflanzen verwendet wurden (RP und LP).

Abb. 11: 3-Primer-PCR zur genotypischen Charakterisierung einer T-DNA-Insertionsmutante. Wildtyp-Proben (WT, links) zeigen eine Bande zwischen 1000 und 1500 bp, während mit der Primerkombination LB und RP keine DNA amplifiziert werden kann. Bei homozygoten Pflanzen (HM, Mitte) führt die PCR mit dem LB-Primer zu einer Bande um 500 bp, während bei der PCR mit dem LP-Primer die Bande fehlt. Können mit beiden Primerpaaren Banden detektiert werden, handelt es sich um Proben von heterozygoten Pflanzen (HZ, rechts). Abgebildet ist als Beispiel ein Agarosegel mit den Produkten der zwei PCR-Reaktionen zur Selektion homozygoter Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie SALK_147839.

Abb. 12: Relative Expression der Zielgene in verschiedenen T-DNA-Insertionslinien. Dargestellt ist die mittlere relative Expression des durch die Insertion betroffenen Gens in den T-DNA-Insertionslinien (schraffierte Säulen) im Vergleich zum jeweiligen Wildtyp (weiße Säulen) mit Standardabweichung ($3 \leq n \leq 5$). Signifikante Unterschiede zwischen der T-DNA-Linie und dem Wildtyp sind mit einem ($p \leq 0,05$), zwei ($p \leq 0,01$) oder drei Sternen ($p \leq 0,001$) gekennzeichnet. Als Haushaltsgen diente Ubiquitin.

Für die Peroxidase 52 (pod52) wurde eine Linie (SALK_081257) mit einer signifikant reduzierten Transkriptmenge identifiziert. Die Expression des Gens, das für die Serin-Carboxypeptidase (scp) codiert, war in zwei Linien (SALK_095638 und SALK_147839) signifikant gegenüber der im Wildtyp verringert. Für die α -Galactosidase (gal) wurde eine Linie (SALK_134497) mit einer signifikant verringerten Expression von gal gefunden. Bezüglich des Lektin-ähnlichen Proteins (llp) waren zwei Linien verfügbar. Die relative Transkriptmenge für llp war in der Linie FLAG_561D11 im Vergleich zum Wildtyp unverändert, während die T-DNA-Insertion bei der Linie FLAG_552G09 eine Reduktion der Transkriptmenge verursachte. Für das Germin-ähnliche Protein (glp3) zeigte die Linie FLAG_412D02 eine signifikant verringerte Expression, während die der zwei weiteren getesteten Linien (SALK_055557 und FLAG_146D08) im Vergleich zum Wildtyp unverändert war.

Bei den T-DNA-Insertionslinien, bei denen Peroxidasen betroffen sind, wurde ergänzend zu den Messungen der Transkriptmenge die Aktivität der Guajakolperoxidase getestet, um zu untersuchen, ob die Funktion der entsprechenden Enzyme durch die Insertion der T-DNA beeinträchtigt war.

Die Ergebnisse zeigten, dass die Linien SALK_051769 (pod34) und SALK_024708 (pod37) eine signifikant erhöhte Guajakolperoxidase-Aktivität aufwiesen, während es bei den weiteren pod37 betreffenden Linien SALK_022520 und SALK_089515 keine Unterschiede zum Wildtyp gab (Abb. 13). Die erhöhte Guajakolperoxidase-Aktivität der beiden Erstgenannten stand in Übereinstimmung mit den Daten der qRT-PCR-Analysen, bei denen eine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde. Vermutlich führte die erhöhte Transkriptmenge zu der erhöhten Enzymaktivität. Die unveränderte Guajakolperoxidase-Aktivität der Linie SALK_022520 (pod37) im Vergleich zum Wildtyp war auf die unveränderte Expression des Gens zurückzuführen.

Die Linie SALK_081257 zeigte trotz signifikant verringerter Expression von pod52 keine Verminderung in der Guajakolperoxidase-Aktivität. Da eine spezifische Funktion von POD52 bislang nicht beschrieben wurde und somit auch das Substratspektrum nicht bekannt ist, ist ein möglicher Grund für die Diskrepanz der Ergebnisse der qRT-PCR und der Messungen der Guajakolperoxidase-Aktivität, dass POD52 Guajakol nicht so effizient oder gar nicht umsetzen kann.

Abb. 13: Aktivität der Guajakolperoxidase in den T-DNA-Insertionslinien, in denen eine der drei Peroxidasen (*pod34*, *pod37* oder *pod52*) betroffen ist, sowie im Wildtyp Col-0. Dargestellt ist mittlere Enzymaktivität mit Standardabweichungen ($3 \leq n \leq 5$) in nanokatal bezogen auf 1 mg der Proteine im Extrakt. Bei signifikanten Unterschieden zum Wildtyp sind die Ergebnisse mit einem ($p \leq 0,05$) oder zwei Sternen ($p \leq 0,01$) gekennzeichnet.

Um zu testen, ob die durch die 2-D-Gelelektrophorese entdeckten Proteine eine Funktion in der Pathogenabwehr von *A. thaliana* aufweisen, wurden die homozygoten T-DNA-Insertionslinien, bei denen eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Transkriptmenge detektiert werden konnte, hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* untersucht. Dazu wurden die Pflanzen in mehreren Experimenten mit dem Pathogen infiziert und unter Kurztag-Bedingungen kultiviert.

Erste Veränderungen der Pflanzen durch die Infektion mit *V. longisporum* waren in der Regel ca. 10 Tage nach Infektion zu sehen. Die Pflanzen wiesen zu diesem Zeitpunkt vergilbte Blattadern und ein verringertes Wachstum auf. Im weiteren Verlauf der Infektion traten Chlorosen auf. Zudem waren an einzelnen Pflanzen morphologische Veränderungen wie das Einrollen einzelner Blättern und ein asymmetrisches Wachstum der Blattrosette erkennbar (Abb. 1, Einleitung). Des Weiteren wurde durch Messungen der Chlorophyllfluoreszenz eine Reduktion der Quantenausbeute festgestellt (siehe Anhang A).

Um den Pathophänotypen der Mutanten mit dem des Wildtyps vergleichen zu können und eine potentielle Veränderung der Suszeptibilität beurteilen zu können, wurde zur Quantifizierung der Stauchung die Blattfläche der einzelnen Pflanzen anhand von digitalen Bildern gemessen. Außerdem wurden die Blattrosetten 21 oder 28 Tage nach Infektion geerntet und die Biomasse ermittelt. Da es bei diesen Parametern Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen der verschiedenen T-DNA-Insertionslinien und den Wildtypen gab, wurde für alle Messungen die relative Veränderung zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen berechnet. Zudem traten Schwankungen zwischen den verschiedenen Experimenten auf. Daher wurden die Daten aus den verschiedenen Experimenten anhand der immer mitgeführten Wildtyp-Kontrollen normalisiert.

Bei den meisten T-DNA-Insertionslinien waren keine Unterschiede zum Wildtyp hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* feststellbar. Die Blattfläche der SALK-Linien im Col-0 Hintergrund wies nach Infektion eine Reduktion zwischen 29 und 41 % auf (Abb. 14).

Abb. 14: Reduktion der Blattfläche der T-DNA-Insertionslinien (hellgraue Säulen) und der Wildtypen Col-0 und Ws-2 (dunkelgraue Säulen) 21 dpi. Dargestellt ist die Reduktion der Blattfläche infizierter Pflanzen relativ zu den mock inokulierten Pflanzen in Prozent. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardfehler aus unabhängigen Versuchen mit jeweils 20 Pflanzen je Behandlung und Linie (n = 1 für *pod37*; n = 2 für *pod52*, *scp* und *gal*; n = 3 für *pod34*, *llp* und *glp3*). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch einen Stern gekennzeichnet.

Die Reduktion der Blattfläche des Wassilewskija Wildtyps war generell stärker ausgeprägt als die des Ökotyps Col-0. Bei der mit dem Ökotypen Wassilewskija zu vergleichenden FLAG-Linie bezüglich *llp* gab es keinen Unterschied zum Wildtyp. Bei der *glp3* betreffenden FLAG-Linie war die Reduktion der Blattfläche durch *V. longisporum* dagegen signifikant größer als die des Wildtyps.

Die Ermittlung der frischen Biomasse ergab ähnliche Ergebnisse wie die Blattflächenmessungen. Während es bei allen SALK-Linien und bei der *llp*-Mutante keine signifikanten Unterschiede zum entsprechenden Wildtyp gab, war die infektionsbedingte Reduktion der Biomasse bei der *glp3*-Mutante deutlich stärker als die des Ws-2 Wildtyps (Abb. 15).

Abb. 15: Reduktion der Biomasse der T-DNA-Insertionslinien (hellgraue Säulen) und der Wildtypen Col-0 und Ws-2 (dunkelgraue Säulen) zwischen 21 und 28 dpi. Dargestellt ist die Reduktion der oberirdischen Frischmasse infizierter Pflanzen relativ zu den Kontrollen in Prozent. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardfehler aus unabhängigen Versuchen mit jeweils 20 Pflanzen je Behandlung und Linie ($n = 1$ für *pod37*, *scp*, Linie SALK_147839; $n = 2$ für *pod34*, *pod52*, *scp*, Linie SALK_095638 und *gal*; $n = 3$ für *llp* und *glp3*). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) sind mit zwei Sternen markiert.

Bei einem Rückblick auf die bisherigen Ergebnisse bezüglich der verschiedenen getesteten T-DNA-Insertionslinien ist also festzustellen, dass die meisten Linien, die eine veränderte Expression des durch die Insertion betroffenen Gens aufwiesen, keinen Unterschied zum Wildtyp hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* zeigten. Nur die T-

DNA-Insertionslinie FLAG_412D02, bei der das T-DNA-Fragment im Promoterbereich des *glp3*-Gens inseriert ist und für die eine verringerte Expression von *glp3* im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden konnte, zeigte eine größere infektionsbedingte Reduktion der Blattfläche und der Biomasse. Die *glp3*-Insertionslinie ist somit susceptibler gegenüber *V. longisporum* im Vergleich zum Wildtyp.

3.3 Charakterisierung von *Arabidopsis*-Pflanzen mit konstitutiv erhöhter *glp3*-Expression hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber *Verticillium longisporum*

Da beobachtet wurde, dass eine Verringerung des Transkriptlevels von *glp3* in *A. thaliana* zu einer erhöhten Suszeptibilität der Pflanzen gegenüber *V. longisporum* führte, sollte geprüft werden, ob eine Erhöhung der Menge von GLP3 eine erhöhte Toleranz der Pflanzen gegenüber dem Pathogen hervorrufen kann. Um diese Hypothese zu testen, wurden *Arabidopsis*-Pflanzen hergestellt, die *glp3* konstitutiv und ektopisch in deutlich größeren Mengen exprimierten als der Wildtyp. Zur Transformation wurde der Ökotyp Wassilewskija verwendet, da die *glp3*-Mutante von diesem Wildtyp abstammt und die Überexpressionspflanzen mit dieser verglichen werden sollten. Die Pflanzen wurden mit einem Vektor transformiert, in den die codierende Sequenz für *glp3* unter der Kontrolle eines konstitutiv aktiven 35s-Promoters eingefügt worden war. Die Pflanzen der T1-Generation wurden hinsichtlich ihres *glp3*-Transkriptlevels überprüft. Vier von zehn getesteten heterozygoten Pflanzen zeigten eine deutlich erhöhte Menge der *glp3*-mRNA im Vergleich zum Wildtyp Ws-2. Diese Linien wurden weiter selektiert, bis von zwei der Linien (Linie 7 und Linie 9) homozygote Pflanzen vorhanden waren. In diesen Pflanzen der T3-Generation wurde erneut die Menge der *glp3*-mRNA gemessen. Bei diesen homozygoten Pflanzen war die Expression im Durchschnitt rund 800 mal höher als im Wildtyp Ws-2 (Abb. 16).

Um zu testen, ob die Überexpression von *glp3* zu einer veränderten Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* führt, wurden die homozygoten Linien mit dem Pilz infiziert, unter Kurztag-Bedingungen kultiviert und die Entwicklung des Pathophänotypen verfolgt. Als Vergleich wurden sowohl der Wassilewskija-Wildtyp als auch die susceptiblere *glp3*-Insertionslinie (FLAG_412D02) im selben Experiment mitgeführt.

Abb. 16: qRT-PCR-Analysen der Überexpressionspflanzen zur Quantifizierung der *glp3*-mRNA. Dargestellt ist die relative Expression von homozygoten Pflanzen der Linien 7 und 9 (p35s::*glp3*) im Vergleich zum Wildtyp. Zusätzlich ist die Expression der *glp3*-Mutante (FLAG_412D02) abgebildet. Präsentiert werden Mittelwerte mit Standardfehler aus 3 unabhängigen Versuchen mit je 5 Replikaten. Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp Ws-2 sind mit zwei ($p \leq 0,01$) oder drei Sternen ($p \leq 0,001$) markiert.

21 dpi wiesen alle infizierten Versuchspflanzen die typischen Symptome auf (Abb. 17). Für die bereits unter Punkt 3.2 beschriebene *glp3*-Insertionslinie konnte der stärker ausgeprägte Pathophänotyp bestätigt werden. Bei den Überexpressionspflanzen waren dagegen die charakteristischen Symptome insgesamt deutlich schwächer ausgebildet als beim Wildtyp oder den *glp3* Pflanzen.

Die Quantifizierung der Blattfläche zeigte eine stärkere Reduktion der Blattfläche der *glp3*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp nach Infektion mit *V. longisporum* (Abb. 18). Während die Wildtyp-Pflanzen durch die Infektion eine im Mittel um 40 % verringerte Blattfläche zeigten, waren die Blattflächen der *glp3*-Mutante infektionsbedingt 58 % kleiner als die der Kontrollen. Die durch das Pathogen hervorgerufene Reduktion der Blattflächen der Überexpressionspflanzen war dagegen signifikant geringer als die des Wildtyps und betrug 29 % bei der Linie 7 und 28 % bei der Linie 9.

Abb. 17: Fotos von mit *V. longisporum* infizierten (+VL43) und nicht infizierten Pflanzen (Kontrolle) des Wassilewskija-Wildtyps (WT Ws-2), der *glp3*-Insertionslinie FLAG_412D02 sowie der Überexpressionslinien 7 und 9 (p35s::*glp3*) 21 dpi.

Neben der Ermittlung der Blattflächen wurde auch die Frischmasse bestimmt. Die Ergebnisse zeigten ein ähnliches Bild wie die der Blattflächen-Analysen. Bei den Wildtyp-Pflanzen resultierte die Infektion durch *V. longisporum* in einer Verringerung der Masse um 32 % (Abb. 19). Bei der *glp3*-Insertionslinie war die Reduktion um 24 % stärker. Die relative Verringerung der Frischmasse der Überexpressionslinien war tendenziell geringer als die des Wildtyps und betrug im Mittel 25 % bei der Linie 7 und 18 % bei der Linie 9.

Abb. 18: Reduktion der Blattfläche des Wildtyps Ws-2, der *glp3* Insertionslinie FLAG_412D02 sowie der beiden Überexpressionslinien 7 und 9 (p35s::*glp3*, Linie 7 und p35s::*glp3*, Linie 9) 21 dpi. Dargestellt ist die Reduktion der Blattfläche infizierter Pflanzen relativ zu den Kontrollen in Prozent. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus vier unabhängigen Versuchen, bei denen die Anzahl der biologischen Replikate jeweils 20 betrug. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Abb. 19: Reduktion der Frischmasse des Wildtyps Ws-2, der *glp3*-Insertionslinie FLAG_412D02 sowie der beiden Überexpressionslinien 7 und 9 (p35s::*glp3*, Linie 7 und p35s::*glp3*, Linie 9) 21 dpi. Abgebildet ist die Reduktion der Frischmasse infizierter Pflanzen im Verhältnis zu den uninfizierten Pflanzen in Prozent. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen mit je 20 biologischen Replikaten. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Als weiterer Parameter zur Quantifizierung der Symptome diente der Pigmentgehalt. Dazu wurden Chlorophyll a und b sowie Carotinoide in infizierten und Kontroll-Pflanzen photometrisch gemessen. Die mittlere Konzentration der gesamten Pigmente der Kontrollen betrug 21 dpi 1015 µg pro g Blattmasse (Tabelle 14). 28 dpi war der Pigmentgehalt etwas geringer und lag im Mittel bei 925 µg pro g. Zu beiden Zeitpunkten war eine Reduktion durch die Infektion mit *V. longisporum* zu verzeichnen (Abb. 20).

Tabelle 14: Pigmentgehalt des Wildtyps Ws-2, der *glp3*-Insertionslinie FLAG_412D02 sowie zweier Überexpressionslinien (*p35s::glp3*, Linie 7 und *p35s::glp3*, Linie 9). Aufgeführt sind die Mittelwerte ± Standardabweichungen der Konzentration von Chlorophyll a, Chlorophyll b und den Carotinoiden sowie das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b von infizierten (VL) und nicht infizierten (K) Pflanzen der verschiedenen Linien 21 dpi (A) und 28 dpi (B) in µg des Pigments pro g Frischmasse. Die Daten der verschiedenen Zeitpunkte stammen aus unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 Pflanzen, die für die Analyse zu 5 Pools mit je 4 Pflanzen zusammengefasst wurden. Signifikante Unterschiede in einer Spalte ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben in Klammern gekennzeichnet.

A

Linie	Behandlung	Chlorophyll a [µg/g]	Chlorophyll b [µg/g]	Carotinoide [µg/g]	Chlorophyll a/ Chlorophyll b
Wildtyp Ws-2	K	601,6 ± 14,2 (b)	153,5 ± 6,8 (c)	198,5 ± 5,1 (b)	3,93 ± 0,09 (d)
	VL	520,5 ± 15,4 (a)	137,7 ± 4,7 (a)	172,1 ± 4,4 (a)	3,78 ± 0,04 (b)
FLAG 412D02	K	656,5 ± 26,1 (d)	171,5 ± 5,7 (ef)	217,1 ± 8,2 (c)	3,83 ± 0,05 (bc)
	VL	535,2 ± 11,7 (a)	145,9 ± 2,6 (b)	178,6 ± 3,8 (a)	3,67 ± 0,09 (a)
<i>p35s::glp3</i> , Linie 7	K	630,9 ± 21,5 (c)	164,5 ± 4,9 (de)	204,3 ± 7,5 (b)	3,83 ± 0,03 (bc)
	VL	619,7 ± 20,7 (bc)	164,5 ± 5,9 (de)	200,9 ± 5,0 (b)	3,77 ± 0,05 (b)
<i>p35s::glp3</i> , Linie 9	K	668,9 ± 13,6 (d)	173,0 ± 6,3 (f)	218,8 ± 5,6 (c)	3,87 ± 0,07 (cd)
	VL	615,7 ± 19,1 (bc)	164,0 ± 2,9 (d)	198,6 ± 6,1 (b)	3,75 ± 0,07 (b)

B

Linie	Behandlung	Chlorophyll a [µg/g]	Chlorophyll b [µg/g]	Carotinoide [µg/g]	Chlorophyll a/ Chlorophyll b
Wildtyp Ws-2	K	577,6 ± 36,3 (d)	160,5 ± 10,4 (e)	202,6 ± 12,2 (d)	3,60 ± 0,12 (a)
	VL	450,8 ± 49,1 (a)	122,9 ± 10,9 (ab)	159,1 ± 14,9 (a)	3,66 ± 0,08 (ab)
FLAG 412D02	K	569,6 ± 44,8 (d)	153,7 ± 8,2 (e)	198,9 ± 11,5 (cd)	3,70 ± 0,13 (ab)
	VL	420,6 ± 43,0 (a)	114,9 ± 10,1 (a)	153,3 ± 13,1 (a)	3,66 ± 0,06 (ab)
<i>p35s::glp3</i> , Linie 7	K	582,3 ± 27,0 (d)	155,7 ± 7,9 (e)	194,0 ± 12,6 (bcd)	3,73 ± 0,13 (b)
	VL	504,8 ± 43,4 (b)	135,4 ± 11,6 (bc)	176,8 ± 17,8 (b)	3,73 ± 0,04 (b)
<i>p35s::glp3</i> , Linie 9	K	560,6 ± 41,0 (cd)	149,7 ± 13,4 (de)	198,3 ± 15,5 (cd)	3,75 ± 0,09 (b)
	VL	514,8 ± 35,9 (bc)	139,2 ± 7,1 (cd)	182,9 ± 10,4 (bc)	3,70 ± 0,08 (ab)

Abb. 20: Reduktion des Chlorophyllgehalts des Wildtyps Ws-2, der *glp3*-Insertionslinie FLAG_412D02 sowie der beiden Überexpressionslinien 7 und 9 (p35s::glp3, Linie 7 und p35s::glp3, Linie 9) 21 dpi (A) und 28 dpi (B). Dargestellt ist die mittlere Reduktion der Summe von Chlorophyll a und Chlorophyll b infizierter Pflanzen relativ zu den Kontrollen in Prozent mit Standardabweichung. Die Daten der verschiedenen Zeitpunkte stammen aus unabhängigen Experimenten mit jeweils 20 Pflanzen, die für die Analyse zu 5 Pools mit je 4 Pflanzen zusammengefasst wurden. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

21 dpi war der Pigmentgehalt des Wildtyps infektionsbedingt 13 % geringer. 28 dpi war diese Reduktion noch weiter erhöht, so dass die infizierten Pflanzen 22 % weniger Chlorophyll besaßen als die Kontrollen. Die *glp3*-Mutante zeigte zu beiden Zeitpunkten eine stärkere Reduktion der Pigmentkonzentration als der Wildtyp, die aber nur 21 dpi signifikant war. Der Pigmentgehalt der infizierten Überexpressionspflanzen dagegen war 21 dpi im Vergleich zu den Kontrollen um rund 1,5 % (Linie 7) bzw. 8 % (Linie 9) reduziert. 28 dpi waren die Unterschiede zum Wildtyp nicht mehr so stark ausgeprägt wie 21 dpi, so dass dieser zu diesem Zeitpunkt nur bei der Linie 9 signifikant war.

Um zu untersuchen, ob die GLP3-Menge in *A. thaliana* neben der Symptomausprägung auch die Proliferation des Pilzes in der Pflanze beeinflusst, wurde die DNA des Pilzes in den Blattrosetten mittels qRT-PCR gemessen. In Wildtyp-Pflanzen ließen sich im Mittel Mengen von ca. 10500 pg *Verticillium*-DNA je g Frischmasse nachweisen (Abb. 21). In der *glp3*-Insertionslinie konnten doppelt so hohe Konzentrationen detektiert werden, während in den Pflanzen, die *glp3* konstitutiv überexprimieren, die VL-DNA-Konzentrationen mehr als 60 % geringer waren und signifikant vom Wildtyp zu unterscheiden waren.

Abb. 21: VL-DNA in infizierten Pflanzen des Wildtyps Ws-2 (WT), der *glp3*-Insertionslinie FLAG_412D02 sowie der beiden Überexpressionslinien 7 und 9 (p35s::*glp3*, Linie 7 und p35s::*glp3*, Linie 9) 21 bis 28 dpi. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen mit je 20 Pflanzen pro Linie und Behandlung. Für die Messung wurden jeweils 5 Pools aus je 4 Pflanzen gebildet. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Die Daten wurden für die statistischen Analysen Log-transformiert. Die DNA-Messung wurde von der AG Karlovsky durchgeführt.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die infektionsbedingte Wachstumsdepression und die Reduktion des Pigmentgehalts in den Überexpressionspflanzen im Vergleich zum Wildtyp verringert war, während die erhöhte Suszeptibilität der *glp3*-Mutante bestätigt werden konnte. Zusätzlich zu der veränderten Symptomatik war die Pilzmenge innerhalb der Pflanze bei der *glp3*-Mutante signifikant erhöht, während sie bei den Überexpressionspflanzen signifikant niedriger war als die des Wildtyps. Die Pilzproliferation scheint also mit der Menge GLP3 in der Pflanze in Zusammenhang zu stehen. Die Überexpressionspflanzen können somit bei einem Vergleich mit dem Wildtyp Ws-2 als toleranter gegenüber *V. longisporum* bezeichnet werden.

3.4 Komplementierung der *glp3*-Mutante

Bei einer Transformation von Pflanzen mittels Insertion einer T-DNA kann es vorkommen, dass die T-DNA mehrere Male in das Genom integriert wird. So ist es möglich, dass neben dem Zielgen auch andere Gene betroffen sind, die ebenfalls eine verminderte Expression aufweisen. Um zu verifizieren, dass der gegenüber dem Wildtyp veränderte Pathophänotyp der T-DNA-Insertionslinie FLAG_412D02 auf die verminderte Expression von *glp3* und nicht die anderer Gene zurückzuführen ist, wurde die entsprechende Linie komplementiert. Dazu wurde ein Vektorkonstrukt mit *glp3* unter der Kontrolle eines 35s-Promoters in die *glp3*-Mutante transferiert. Die mittels qRT-PCR analysierte Expression von *glp3* in den transgenen Pflanzen war 21-fach (Linie 1) bzw. 27-fach (Linie 5) gegenüber der des Wildtyps erhöht (Abb. 22).

Abb. 22: Relative Expression von *glp3* in der komplementierten T-DNA-Insertionsmutante FLAG_412D02. Dargestellt ist die relative Expression von zwei Linien (1 und 5) der komplementierten Pflanzen sowie der Mutante im Vergleich zum Wildtyp Ws-2. Präsentiert werden Mittelwerte mit Standardabweichungen ($n = 5$ für Ws-2 und FLAG_412D02, $n = 15$ für Kompl. Linie 1 und $n = 20$ für Kompl. Linie 5). Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp Ws-2 ($p \leq 0,001$) sind mit drei Sternen markiert.

Die zwei Linien (1 und 5) der komplementierten Insertionsmutante wurden in zwei unabhängigen Experimenten hinsichtlich der Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* getestet wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Die infizierten Pflanzen aller Linien

wiesen die typischen Symptome wie Stauchung und Chlorosen auf. 21 dpi waren bei allen Linien signifikante Unterschiede zwischen infizierten Pflanzen und Kontrollen hinsichtlich Blattfläche und Frischgewicht (Abb. 23) zu beobachten. Bei einem Vergleich der uninfizierten Kontrollen der verschiedenen Linien fiel zudem auf, dass die Pflanzen der komplementierten Mutante signifikant kleiner waren als die Mutante selbst (Abb. 23).

Die durch *V. longisporum* hervorgerufene Reduktion der Wachstumsparameter betrug in diesen Versuchen für den Wildtyp Ws-2 im Mittel 37 % für die Blattfläche bzw. 26 % für die Frischmasse, während die Reduktion der Insertionsmutante wie in vorausgegangenen Versuchen signifikant größer war (Abb. 24). Bei den Linien der komplementierten *glp3*-Mutante war die Reduktion der Blattfläche und der Frischmasse nicht so ausgeprägt wie die der Insertionsmutante, jedoch war die Reduktion nicht geringer als die des Wildtyps. Tendenziell wurde also durch das Einbringen des *glp3*-Konstruktes die erhöhte Suszeptibilität der Mutante aufgehoben, jedoch war dieser Effekt nur bei einer der beiden getesteten Linien signifikant.

Abb. 23: Blattfläche (A) und Frischmasse (B) des Wildtyps Ws-2, der *glp3*-Mutante (FLAG_412D02) sowie der Linien 1 und 5 der komplementierten Mutante (Kompl., Linie 1 und Kompl., Linie 5) 21 dpi. Dargestellt sind die Daten infizierter (+ VL 43, graue Boxen) und nicht infizierter Pflanzen (Kontrollen, weiße Boxen) aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 17 bis 24 Pflanzen als Box-und-Whisker-Plot. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Die Linie innerhalb der Box stellt den Median dar. Zusätzlich ist der Mittelwert als Quadrat abgebildet. Die Kreuze zeigen Ausreißer an.

Abb. 24: Reduktion der Blattfläche (A) sowie der Frischmasse (B) des Wildtyps Ws-2, der *glp3*-Mutante (FLAG_412D02) sowie der Linien 1 und 5 der komplementierten Mutante (Kompl., Linie 1 und Kompl., Linie 5) 21 dpi. Abgebildet ist die Reduktion der Blattfläche bzw. der Biomasse infizierter Pflanzen relativ zu den Kontrollen in Prozent. Gezeigt werden die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils 17 bis 24 Pflanzen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.5 Charakterisierung von amiRNA-Pflanzen bezüglich der Sensitivität gegenüber *Verticillium longisporum*

Nur eine der verfügbaren T-DNA-Insertionsmutanten wies eine signifikant reduzierte Transkriptmenge auf. Hierbei handelte es sich außerdem um eine FLAG-Linie, die mit Hilfe des Ökotyps Wassilewskija generiert worden war, während die meisten vorherigen Ergebnisse sich auf den Ökotyp Columbia beziehen. Aus diesen Gründen wurden als weiterer „Loss of function“-Ansatz ausgehend vom Columbia-Wildtyp transgene Pflanzen generiert, in die ein artifizielles microRNA (amiRNA) Konstrukt eingebracht wurde. Hergestellt wurden 2 verschiedene Konstrukte (A und B) mit unterschiedlichen Sequenzen, die aber beide komplementär zur *glp3*-mRNA waren. Die transgenen Pflanzen der T1-Generation wurden mittels qRT-PCR hinsichtlich ihres *glp3*-Transkriptlevels analysiert. Die Linien beider Konstrukte, welche die geringsten Transkriptmengen im Vergleich zum Wildtyp aufwiesen, wurden bis zur T3-Generation weiter vermehrt und selektiert, bis homozygote Linien detektiert werden konnten. Diese wurden erneut mittels qRT-PCR getestet. Die Ergebnisse bestätigten, dass die Mengen des *glp3*-Transkriptes in den amiRNA-Linien im Vergleich zum Wildtyp Columbia 20-fach reduziert waren (Abb. 25).

Abb. 25: Relative Genexpression von *glp3* in den amiRNA-Linien. Präsentiert werden Mittelwerte der n-fachen Expression der Linien A und B (*p35s::amiRNA-glp3-A* und *p35s::amiRNA-glp3-B*) im Vergleich zum Wildtyp Col-0 mit Standardabweichungen ($n = 5$). Signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp ($p \leq 0,001$) sind mit Sternen markiert.

Die Pflanzen reagierten ebenso wie der Wildtyp mit gedrunenem Wuchs und chlorotischen Blättern auf *V. longisporum*. 28 dpi waren bei allen Linien signifikante Unterschiede zwischen infizierten Pflanzen und Kontrollen hinsichtlich Blattfläche und Frischgewicht zu beobachten (Abb. 26 und 27). Diese Reduktion der Wachstumsparameter war bei den amiRNA-Linien ausgeprägter als beim Wildtyp. Während die *Verticillium*-induzierte Reduktion der Blattfläche beim Wildtyp 47 % betrug, verursachte der Pilz bei den amiRNA-Linien eine Reduktion der Blattfläche um 65 % (Linie amiRNA-glp3-A) bzw. 58 % (Linie amiRNA-glp3-B). Die Ergebnisse der Frischmassen-Bestimmung der 28 dpi geernteten Pflanzen waren ähnlich. Bei der Linie amiRNA-glp3-B war die Frischmasse infektionsbedingt um 57 % verringert. Die Frischmasse der Linie amiRNA-glp3-A war sogar um 61 % reduziert, während für den Wildtyp eine Reduktion um 44 % zu verzeichnen war. Diese erhöhte Suszeptibilität war jedoch nur bei der Linie amiRNA-glp3-A signifikant ($p \leq 0,05$).

Abb. 26: Blattfläche des Wildtyps Col-0 (WT) sowie der beiden amiRNA-Linien (p35s::amiRNA-glp3-A und p35s::amiRNA-glp3-B) 28 dpi. Dargestellt ist die Blattfläche infizierter (schwarzer Balken) und nicht infizierter (weißer Balken) Pflanzen (A) sowie die prozentuale Reduktion der Blattfläche infizierter Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen (B). Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Anzahl der Pflanzen im Experiment betrug $10 \leq n \leq 20$ für die Kontrollen und $12 \leq n \leq 22$ für die infizierten Pflanzen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

Abb. 27: Frischmasse des Wildtyps Col-0 (WT) sowie der beiden amiRNA-Linien (p35s::amiRNA-glp3-A und p35s::amiRNA-glp3-B) 28 dpi. Dargestellt ist die Frischmasse infizierter (schwarzer Balken) und nicht infizierter (weißer Balken) Pflanzen (A) sowie die prozentuale Reduktion der Frischmasse infizierter Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen (B). Gezeigt werden Mittelwerte mit Standardabweichungen. Die Anzahl der Pflanzen im Experiment betrug $10 \leq n \leq 20$ für die Kontrollen und $12 \leq n \leq 22$ für die infizierten Pflanzen. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet.

3.6 Anatomische Untersuchungen von *Arabidopsis*-Wildtyp-Pflanzen sowie der *glp3*-Mutante hinsichtlich *Verticillium*-induzierter Veränderungen

Einigen der von einer *Verticillium*-Infektion beeinflussten Gene wird eine putative Funktion in der Modifikation der Zellwand zugeschrieben (siehe Einleitung). Zudem wurde eine Erhöhung des Lignin- und Zellwandanteils in infizierten Pflanzen im Vergleich zu mock inokulierten Pflanzen nachgewiesen (Flörl 2007).

Um zu untersuchen, ob diese Effekte auf einen Anstieg des Ligninanteils pro Zelle durch Verstärkung der Zellwand oder auf vermehrte Bildung von Zellen mit lignifizierten Wänden (z. B. Gefäße oder Fasern) zurückzuführen sind, wurden Hypokotyl- und Blattproben von infizierten Pflanzen anatomisch untersucht und mit mock inokulierten Pflanzen verglichen. Da für die *glp3*-Mutante eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* nachgewiesen werden konnte, wurden neben dem Wildtyp Col-0 auch die *glp3*-Mutante sowie der zugehörige Wildtyp Ws-2 hinsichtlich anatomischer Veränderungen untersucht. Von eingebetteten Proben wurden Querschnitte hergestellt. Diese wurden mit Toluidinblau angefärbt. Dadurch färben sich lignifizierte Zellwände türkisblau, Cytoplasma und unverholzte Primärwände dagegen violett. Zudem wurde die Autofluoreszenz detektiert, durch die phenolische Substanzen wie Lignin sichtbar werden.

Die Hypokotylproben des Wildtyps Col-0 ließen bereits in der Übersicht einen deutlichen Unterschied zwischen infizierten Pflanzen und den uninfizierten Kontrollen erkennen (Abb. 28, A und B). Während das Xylem bei den Kontrollen ungefähr ein Drittel der Fläche des Gesamt-Querschnitts einnahm, war es bei den infizierten Pflanzen deutlich größer. Detaillierte Aufnahmen des Xylems zeigen, dass die durch die türkisblauen Zellwände gut erkennbaren Gefäße in Kontrollpflanzen relativ groß und von einer Vielzahl lebenden Zellen (Parenchym und Collenchym) umgeben waren (Abb. 28, C). Infizierte Pflanzen dagegen verfügten über eine größere Anzahl Gefäße, die jedoch einen geringeren Durchmesser als die der Kontrollen aufwiesen (Abb. 28, D). Hinsichtlich der Zellwanddicke der Gefäße gab es jedoch keinen Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen. Neben den Gefäßen waren auch in infizierten Pflanzen parenchymatische Zellen zu finden. Diese bildeten jedoch nicht wie bei den mock inokulierten Pflanzen Reihen in radialer Richtung, sondern kamen nur vereinzelt und in geringerer Anzahl vor.

Abb. 28: Querschnitte des Hypokotyls uninfizierter (A und C) und infizierter (B und D) Pflanzen des Wildtyps Col-0 21 dpi. C: Cortex, Ph: Phloem, K: Kambiumzone, Xy: Xylem, P: parenchymatische Zellen, G: Gefäße. Die 1 µm dicken Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt. Lignifizierte Zellwände sind daher türkisblau, Cytoplasma und Primärwände dagegen violett. Die Längenstandards entsprechen 100 µm (A, B) bzw. 50 µm (C, D).

Die durch *V. longisporum* bedingte vermehrte Produktion von Gefäßen war auch in den Blättern des Wildtyps Col-0 wieder zu finden (Abb. 29). Während bei den Kontrollpflanzen in der Regel nicht mehr als 5 Gefäße in adaxiale Richtung vom Kambium abgegeben wurden, war diese Zahl bei den infizierten Pflanzen deutlich erhöht. Wie beim Hypokotyl waren die ausdifferenzierten Zellen jedoch kleiner als die der Kontrollen. Die Blattquerschnitte der *glp3*-T-DNA-Insertionsmutante und des Ws-2 Wildtyps zeigten ebenfalls eine vermehrte Produktion von Gefäßen nach einer *Verticillium*-Infektion (Abb. 30).

Abb. 29: Leitgewebe von Blättern uninfizierter (A und C) und infizierter (B und D) Pflanzen des Wildtyps Col-0 21 dpi im Querschnitt. A und B: Mit Toluidinblau angefärbte, 1 µm dicke Schnitte. Lignifizierte Zellwände sind türkisblau, Cytoplasma und Primärwände violett. C und D: Autofluoreszenz von 5 µm dicken Schnitten. Xy: Xylem, Ph: Phloem, K: Kambium. Die infizierten Pflanzen weisen im adaxialen Bereich des Xylems sehr große Zellen mit lignifizierten Wänden auf (Pfeile). Die Längenstandards entsprechen 50 µm.

Des Weiteren offenbarten die Querschnitte der Blätter beider Ökotypen sowie der *glp3*-Mutante im Bereich des Leitgewebes noch weitere Unterschiede zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen, die im Hypokotyl nicht zu finden waren. So traten bei den infizierten Pflanzen im adaxialen Randbereich des Leitgewebes Zellen auf, die in ihrer Größe den das Leitgewebe umgebenden parenchymatischen Zellen entsprachen (Abb. 29, B und D sowie Abb. 30, B und D; Beispiele der beschriebenen Zellen sind mit Pfeilen markiert). Auch die Position ließe auf diesen Zelltyp schließen. Allerdings waren die Wände der betroffenen Zellen lignifiziert, was sowohl aufgrund der türkisblauen, durch Toluidinblau hervorgerufenen Farbe (Abb. 29 B sowie Abb. 30 B und D) als auch bei der

Abbildung der Autofluoreszenz (Abb. 29 D) sichtbar wurde. Bei einigen dieser Zellen war die lignifizierte Verstärkung wie bei Xylem-Gefäßen im Querschnitt als vollständiger Ring zu sehen, in anderen Zellen war sie in regelmäßigen Abständen unterbrochen (Abb. 29 und 30). Außerdem wurde in einigen dieser Zellen eine netzartige, sich durch den gesamten Zellquerschnitt ausbreitende lignifizierte Struktur beobachtet (Abb. 31).

Abb. 30: Leitgewebe von Blättern nicht infizierter (A und C) und infizierter (B und D) Pflanzen des Wildtyps Ws-2 (A und B) sowie der *glp3*-T-DNA-Insertionsmutante (C und D) 21 dpi im Querschnitt. Xy: Xylem, Ph: Phloem, K: Kambium. Die 1 µm dicken Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt. Lignifizierte Zellwände sind daher türkisblau, Cytoplasma und Primärwände dagegen violett. Bei den Bildern der infizierten Pflanzen sind im Übergangsbereich vom Xylem zum umgebenden Mesophyll sehr große Zellen ohne Cytoplasma mit lignifizierten Wänden zu sehen (Pfeile). Außerdem sind Zellen zu sehen, die Cytoplasma enthalten und partiell lignifizierte Wände aufweisen (Pfeilspitzen). Die Längenstandards entsprechen 50 µm.

Abb. 31: Netzartige Zellwandverstärkungen in infizierten Pflanzen. Diese konnten im Blattquerschnitt sowohl in den Wildtypen Col-0 (A) und Ws-2 (B) als auch in der *glp3*-Mutante (C) 21 dpi in einzelnen Zellen im Randbereich des Xylems im Übergang zum adaxialen Parenchym anhand der Autofluoreszenz nachgewiesen werden. Der Längenstandard entspricht 20 μm .

Um dieses Phänomen besser beurteilen zu können, wurden Serienschritte angefertigt und mikroskopisch untersucht. Diese zeigten eine Veränderung der beobachteten Struktur von einem Schnitt zum nächsten und eine Verschiebung vom Rand zur Mitte der Zelle hin (Abb. 32). Die Beobachtung weist auf eine runde Form der Zelle und somit auf einen parenchymatischen Ursprung hin.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Infektion mit *V. longisporum* sowohl in den beiden untersuchten Ökotypen Col-0 und Ws-2 als auch in der GLP3 betreffenden T-DNA-Insertionslinie FLAG_412D02 zu einer vermehrten Produktion von Gefäßen durch das Kambium führte. In den Blättern waren am Rand des Xylems im Übergang zum adaxialen parenchymatischen Gewebe zusätzlich sehr große Zellen mit lignifizierten Zellwänden zu finden. Dies weist auf eine nachträgliche Differenzierung von parenchymatischen Zellen zu Gefäß-ähnlichen Elementen hin.

Abb. 32: Serienaufnahme derselben Blattprobe einer infizierten Pflanze des Wildtyps Col-0 21 dpi. Die lignifizierte, türkisfarbene Struktur innerhalb der markierten Zelle (Pfeil) ist zuerst nur am Rand zu sehen (A), im nächsten Schnitt reicht diese weiter in die Zelle hinein (B), im letzten Schnitt ist die Struktur in der Mitte der Zellen zu finden (C). Die Beobachtung weist auf eine runde Form der Zellen hin. Xy: Xylem, Ph: Phloem. Längenstandard = 50 μm .

3.7 Analyse von Promoter_{glp3}-GUS-Reporterpflanzen zur Lokalisierung der glp3-Expression in *Arabidopsis thaliana*

Um weitere Hinweise auf die Funktion von GLP3 in *A. thaliana* zu bekommen, sollte untersucht werden, in welchen Pflanzenorganen und -geweben und zu welchem Zeitpunkt während des Lebenszyklus *glp3* exprimiert wird. Zudem sollte getestet werden, ob sich nach Infektion mit *V. longisporum* das Transkriptlevel in bestimmten Geweben ändert oder *glp3* in anderen Pflanzenteilen exprimiert wird als in den Kontrollen. Dazu wurden GUS-Reporter-Pflanzen hergestellt, indem Pflanzen des Ökotyps Col-0 mit einem Konstrukt transformiert wurden, in welchem der Promoter von *glp3* vor das *uidA*-Gen aus *E. coli* kloniert wurde. Wenn der *glp3*-Promoter in der Pflanze aktiviert wird, wird die β -Glucuronidase produziert, deren Aktivität anhand einer Farbreaktion im Pflanzengewebe nachgewiesen werden kann. Um auszuschließen, dass die Expression des *uidA*-Gens durch 35s-Promotoren, die vor anderen Genen innerhalb des Vektors liegen, induziert wird, wurden zusätzlich Pflanzen mit dem unveränderten Vektor (ohne *glp3*-Promoter) transformiert, die als Kontrolle in den Experimenten mitgeführt wurden.

Aus der Transformation gingen fünf Pflanzen hervor, die in der T1-Generation hinsichtlich der Funktionalität des Konstruktes überprüft wurden, indem einzelne Pflanzenteile in GUS-Färbelösung inkubiert wurden. Bei zwei der fünf Pflanzen war die Farbreaktion erfolgreich. Diese Pflanzen wurden weiter vermehrt und selektiert, bis Homozygote vorhanden waren, die für Experimente verwendet wurden. Mit den mit dem leeren Vektor transformierten Pflanzen wurde ebenso verfahren. Bei diesen konnte sowohl in den Pflanzen der T1-Generation als auch in den homozygoten Pflanzen keine Blaufärbung detektiert werden. Daher war die in den GUS-Reporterlinien auftretende β -Glucuronidase-Aktivität ausschließlich auf die Induktion des *glp3*-Promoters und nicht auf durch den verwendeten Vektor bedingte Faktoren zurückzuführen (Abb. 33).

Die Reporterlinien 2 und 3 sowie eine Leervektor-Kontroll-Linie wurden unter Kurztag-Bedingungen angezogen, mit *V. longisporum* infiziert und regelmäßig auf die GUS-Expression hin untersucht. Um zu prüfen, ob die GUS-Linien genauso auf *V. longisporum* reagieren wie der Wildtyp, wurden als Kontrolle zusätzlich infizierte und nicht infizierte Wildtyp-Pflanzen des Ökotyps Col-0 im Experiment mitgeführt. Bei einem Vergleich der uninfizierten Pflanzen war ein Unterschied zwischen der GUS-Reporterlinie 3 und den anderen Linien erkennbar (Abb. 34).

Abb. 33: Leervektor-Kontrollpflanzen zeigen keine unspezifischen Färbungen. Fotos von mit dem leeren Vektor transformierten Kontrollen nach Inkubation mit der GUS-Färbelösung. Sowohl in vegetativen Pflanzenteilen (A) als auch in Blüten (B) konnte keine β -Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen werden. Auch bei Blattquerschnitten (C) konnte keine Blaufärbung detektiert werden. Der Längenstandard entspricht 0,5 cm für die makroskopischen Bilder und 50 μ m für die mikroskopische Aufnahme.

Abb. 34: Beispielbilder der für die GUS-Färbung verwendeten Pflanzen. Mock inokulierte (A, C, E, und G) und infizierte (B, D, F und H) Pflanzen des Wildtyps Col-0 (A und B), der Leervektor-Kontrolle (C und D) und der GUS-Reporterlinien 2 (E und F) und 3 (G und H) 21 dpi. Der Längenstandard entspricht 3 cm.

Während die Blattflächen der GUS-Reporterlinie 2 sowie die mit dem leeren Vektor transformierten Pflanzen ungefähr die gleiche Größe erreichten wie die des Wildtyp, waren die der GUS-Reporterlinie 3 um mehr als die Hälfte kleiner (Abb. 34 und 35 A). Die typische Reduktion der Blattfläche nach der Infektion mit *V. longisporum* trat jedoch bei allen Linien in ähnlicher Form auf (Abb. 35 B).

Abb. 35: Blattfläche der Pflanzen der GUS-Reporterlinien (Pglp3::GUS, Linie 2 bzw. Pglp3::GUS, Linie 3) und der Leervektor-Kontrolle im Vergleich zu der des Wildtyps Col-0 21 dpi. Dargestellt werden die Blattflächen mock inokulierter (weiße Säulen) und infizierter (schwarze Säulen) (A) sowie die Reduktion der Blattfläche infizierter Pflanzen relativ zu den Kontrollen in Prozent (B). Abgebildet sind Mittelwerte mit Standardabweichungen (n = 5). Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) sind durch verschiedene Buchstaben gekennzeichnet.

Die β -Glucuronidase-Aktivität konnte in Blättern der GUS-Reporterpflanzen sowie in Petiolen anhand der Blaufärbung des Gewebes nachgewiesen werden, wobei es einen Gradient von den neu gebildeten, intensiv gefärbten hin zu den älteren Blättern gab, bei denen die Färbung nur noch lokal beschränkt und von geringer Intensität war (Abb. 36 und Abb. 37). Die ältesten Blätter waren nicht gefärbt. Ebenso nahm die Färbung mit dem Alter der Pflanzen ab (vgl. Abb. 36 und Abb. 37). Auffällig war auch, dass die Mittelrippe in der Regel ungefärbt war. Innerhalb der Blätter war sowohl in den Mesophyllzellen als auch in der Epidermis die β -Glucuronidase-Aktivität detektierbar (Abb. 38).

Bei einem Vergleich der infizierten Pflanzen mit den Kontrollen gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Lokalisierung der GUS-Aktivität. Allerdings waren teilweise Abweichungen bezüglich der Intensität der Färbung zu sehen. Die Blaufärbung in den

Abb. 36: GUS-Expression in vegetativen Pflanzenteilen. Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität in vegetativen Pflanzenteilen zur Analyse der Expression von *glp3* in GUS-Reporterpflanzen in mock inokulierten Kontrollen der Linie 2 (A, C und E) und nach Infektion mit *V. longisporum* (B, D und F). Abgebildet sind digitale Aufnahmen repräsentativer junger Pflanzen 1 dpi (A und B) und detaillierte Aufnahmen von Blättern verschiedener Entwicklungsstadien 3 dpi (C und D; links: jeweils eines der ältesten Blätter, rechts: jüngstes Blatt) und 7 dpi (E und F) nach 3stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 0,5 cm. Die Linie 3 zeigte ein ähnliches Färbemuster. Entsprechende Bilder der Linie 3 sind in Anhang B zu finden.

Blättern infizierter Pflanzen war 7 dpi weniger stark ausgeprägt als in denen der Kontrollen (Abb. 36). Die Expression von *glp3* war also in den Blättern zu diesem Zeitpunkt nach der Infektion mit *V. longisporum* geringer als in den Kontrollen.

Abb. 37: Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität 21 dpi. Abgebildet sind Blätter repräsentativer Pflanzen der Linie 2 in mock inokulierten Kontrollen (links) und in infizierten Pflanzen (rechts) nach 3stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 2 cm. Bilder der Linie 3 sind im Anhang zu finden.

Abb. 38: Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität innerhalb der Blätter 21 dpi. Abgebildet sind 10 μm dicke Querschnitte von mock inokulierten (A) und infizierten Pflanzen der Linie 2 (B) nach 3stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 50 μm .

In den Wurzeln konnte weder in infizierten noch in uninfizierten Pflanzen eine β -Glucuronidase-Aktivität festgestellt werden (Abb. 36).

Bei blühenden Pflanzen war der Blütenstiel (Pedicellus) intensiv blau gefärbt. Außerdem konnte in den meisten Teilen der Blüte eine GUS-Expression detektiert werden (Abb. 39).

Abb. 39: GUS-Expression in Blüten. Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität in GUS-Reporterpflanzen in uninfizierten (A – C und G) und infizierten Pflanzen (D – F und H). Zu sehen sind Bilder der Blütenstände repräsentativer Pflanzen der Linie 2 (A und D) sowie detaillierte Aufnahmen junger (B und E) und älterer (C und F) Blüten und Schoten (G und H) 56 dpi nach 18stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 0,2 cm.

So zeigten die Kelchblätter, Teile des Fruchtblattes sowie der Staubfaden eine Blaufärbung. In einigen Blüten war zusätzlich der mittlere Teil des Staubbeutels, das Konnektiv, welches die beiden Pollensackgruppen miteinander verbindet, gefärbt. Auch in den Schoten konnte die β -Glucuronidase-Aktivität detektiert werden. Die Intensität und die Ausbreitung der Färbung war in den Blütenteilen jedoch abhängig von deren Entwicklungsstadium. Während die Blaufärbung in Knospen und jungen Blüten sehr intensiv war und meist überall auftrat, war sie in den Blüten, in denen sich bereits die Samenschote entwickelte, meist schwächer und lokal begrenzt (vgl. Abb. 39 B und E mit C und F). Zwischen infizierten und nicht infizierten Pflanzen gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Intensität der Färbung der Blütenteile.

Anhand der GUS-Reporterpflanzen ließ sich zeigen, dass *glp3* in Blättern und in allen Blütenteilen, nicht aber in der Wurzel exprimiert wird. Zudem wurde festgestellt, dass diejenigen Gewebe, die sich noch in der Entwicklung befinden und sich noch strecken, stärker gefärbt waren als bereits ausgewachsene Pflanzenteile. Zwischen infizierten und mock inokulierten Pflanzen gab es zu den meisten Zeitpunkten keine Unterschiede hinsichtlich der GUS-Aktivität. Lediglich 7 dpi war die Blaufärbung in Blättern infizierter Pflanzen weniger ausgeprägt als in den Kontrollen. Die Ergebnisse lassen insgesamt darauf schließen, dass die *glp3*-Expression mit dem Streckungswachstum korreliert.

3.8 Untersuchung des Einflusses von heterolog produziertem GLP3 auf das Wachstum von *Verticillium longisporum*

Um zu prüfen, ob GLP3 das Wachstum von *V. longisporum* direkt beeinflusst, wurden Experimente durchgeführt, bei denen das Pathogen mit GLP3 produzierender Hefe konfrontiert wurde. Zu diesem Zweck wurde GLP3 in *S. cerevisiae* transferiert und mit einem Polyhistidin-Tag exprimiert. Mittels Western Blot Analyse konnte die Produktion des GLP3-Fusionsproteins in den mit dem entsprechenden Konstrukt transformierten Hefezellen nachgewiesen werden, während in Zelllysaten von Hefezellen, die mit dem Leervektor transformiert worden waren, kein Protein detektiert werden konnte (siehe Abb. 40).

Abb. 40: Western Blot Analyse (A) und SDS-PAGE (B) von lysierten Hefezellen. GLP3-His-Fusionsproteine mit einem Molekulargewicht von 26,8 kDa konnten in Hefezellen, die mit dem GLP3-His-Konstrukt transformiert wurden, nachgewiesen werden (+). Purpurfarbene Banden zeigen Bindestellen des Antikörpers. Bei Proben von Hefezellen, die mit dem Leervektor transformiert wurden (-), konnte kein Protein detektiert werden. Für den Blot wurden Hefezellen aus einer Expressionskultur mit einer OD_{600} von 1,5 lysiert, 20 μ g Protein über SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Immunodetektion erfolgte über einen anti-His-Antikörper, der an eine alkalische Phosphatase gekoppelt war. Diese katalysiert die Umsetzung von BCIP und NBT zu einem violetten Farbstoff.

Für die Wachstumsversuche wurde *V. longisporum* mit der GLP3 produzierenden Hefe koinkubiert. Dazu wurde eine Myzelscheibe des Pathogens mit einem Durchmesser von 2 cm von PDB-Medium auf festes, selektives Medium überführt. Die Hefezellen wurden mit einem Abstand von 2 cm zu *V. longisporum* als 1,5 cm breiter Ring auf die Agarplatten aufgebracht (Abb. 41, A und B). Das Medium enthielt zur Induktion der *glp3*-Expression in der Hefe Galaktose. Um unterscheiden zu können, ob auftretende Unterschiede im Wachstum von *V. longisporum* auf die Hefe oder auf GLP3 zurückzuführen sind, wurde neben den GLP3 produzierenden Hefezellen in parallelen Ansätzen auch die mit dem Leervektor transformierte Hefe für die Experimente verwendet. Als weitere Kontrolle wurden Agarplatten mit *V. longisporum* ohne Hefe mitgeführt (Abb. 41, C). Zur Quantifizierung des Wachstums von *V. longisporum* wurden die Agarplatten regelmäßig dokumentiert und die Fläche des Myzels anhand digitaler Bilder ausgewertet.

V. longisporum bildete unter den Versuchsbedingungen neue, helle Hyphen aus, die sich bei allen Varianten von den dunklen Myzelscheiben in radialer Richtung ausbreiteten (Abb. 41). Bei allen Varianten war der Zuwachs in den ersten Tagen am stärksten, danach nahm die Gesamtfläche des Myzels nur noch marginal zu. Bei einzelnen Platten stagnierte das Wachstum gänzlich (Abb. 42).

Abb. 41: *In vitro* Assay zur Untersuchung der wachstumsinhibierenden Wirkung von GLP3 auf *V. longisporum*. Abgebildet sind repräsentative Agarplatten des Experiments, bei dem *V. longisporum* mit Hefe, die mit einer Leervektor-Kontrolle transformiert wurde (A), mit GLP3 produzierender Hefe (B) sowie ohne Hefe (C) inkubiert wurde.

Abb. 42: Wachstum von *V. longisporum* unter dem Einfluss von GLP3. Dargestellt ist die mittlere Fläche des Myzels des Pathogens in cm² mit Standardfehler (n = 15). Untersucht wurde die Proliferation von *V. longisporum* unter dem Einfluss von GLP3 produzierender Hefe (rote Symbole) sowie unter dem Einfluss von Hefezellen, die kein GLP3 herstellen (Leervektor-Kontrolle, schwarze Symbole). Als weitere Kontrolle wurde das Wachstum des Pilzes ohne Hefe dokumentiert (graue Symbole). Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Varianten sind durch unterschiedliche Buchstaben gekennzeichnet. Die Daten wurden für die statistische Analyse logarithmiert.

Bei einem Vergleich der unterschiedlichen Varianten fiel zunächst auf, dass es eine deutliche Unterdrückung der Proliferation von *V. longisporum* in Anwesenheit von Hefe gab. Die Ergebnisse offenbarten zusätzlich eine signifikante Reduktion des Wachstums von *V. longisporum* unter dem Einfluss von GLP3 produzierender Hefe im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle. GLP3 produzierende Hefe verminderte das Wachstum von *V. longisporum* um rund 20 %.

Das GLP3-Fusionsprotein beeinträchtigte also das Wachstum von *V. longisporum in vitro*. Die erhöhte Toleranz von *A. thaliana* gegenüber *V. longisporum* durch konstitutive Expression von *glp3* kann daher durch eine direkte antifungale Wirkung des Proteins erklärt werden.

4 Diskussion

4.1 Proteine aus dem Xylemsaft von *Brassica napus* weisen antifungale Eigenschaften auf

V. longisporum befindet sich als vaskuläres Pathogen die meiste Zeit seines Lebenszyklus innerhalb der Pflanze in deren Xylem. Daher werden Abwehrreaktionen seitens der Pflanze vor allem hier erwartet. Um zu überprüfen, ob in *B. napus* nach Infektion mit *V. longisporum* Abwehrsubstanzen produziert und in den Xylemsaft abgegeben werden, die der Kolonisierung des Pilzes in der Pflanze entgegen wirken, sollte das Pilzwachstum in purem Xylemsaft analysiert werden. Die *in vitro* Bioassays haben gezeigt, dass *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten Pflanzen schlechter wuchs als im Xylemsaft von Kontrollpflanzen.

Über die Veränderung der antimikrobiellen Wirkung von Xylemsaft infolge eines Pathogenbefalls ist nicht viel bekannt. Lediglich der Xylemsaft von Sojabohne wurde dahingehend überprüft. Der Pilz *Neurospora crassa* wächst schlechter im Xylemsaft der Sojabohne, wenn die Pflanzen zuvor mit einem Elicitor aus dem Pathogen *Phytophthora sojae* behandelt wurden (Subramanian *et al.* 2009). Da es sich in der genannten Studie bei dem Auslöser der Immunantwort und dem anschließend getesteten Pilz um unterschiedliche Organismen handelt, ist zu vermuten, dass diese Immunantwort nicht spezifisch gegen ein bestimmtes Pathogen gerichtet ist. Ob die Einschränkung des Wachstums im Xylemsaft von infizierten Rapspflanzen gegenüber dem von uninfizierten Rapspflanzen nur für *V. longisporum* gilt oder ob andere Organismen sich ähnlich verhalten, wird zur Zeit von einer anderen Arbeitsgruppe (AG Karlovsky) innerhalb der Forschergruppe 546 analysiert. Erste Ergebnisse wiesen darauf hin, dass auch Agrobakterien im Xylemsaft von infizierten Pflanzen in ihrem Wachstum gegenüber dem im Xylemsaft von uninfizierten Pflanzen beeinträchtigt sind (Persönliche Mitteilung, Prof. Karlovsky). Somit wäre auch hier der wachstumsinhibierende Effekt nicht spezifisch. Weitere Experimente werden diese Hypothese klären.

Obwohl die Nährstoffversorgung von *B. napus* insgesamt infolge einer Infektion durch *V. longisporum* nicht negativ beeinflusst wird (Floerl *et al.* 2008), könnte die Anwesenheit des Pilzes dennoch lokal im Xylem bzw. im Xylemsaft zu Unterschieden hinsichtlich der Nährstoffzusammensetzung führen. Um auszuschließen, dass ein Mangel an Nährstoffen das geringere Wachstum des Pilzes im Xylemsaft von infizierten Pflanzen verursachte, wurde der Xylemsaft hinsichtlich der Konzentration der löslichen Zucker, der Proteine, der Aminosäuren sowie der Mineralelemente überprüft.

Sowohl bezüglich der Zucker als auch der Proteine gab es keine Unterschiede zwischen dem Xylemsaft von infizierten und dem von nicht infizierten Pflanzen. Zudem sind die Messergebnisse mit denen aus anderen Studien vergleichbar, denn in anderen Studien wurden im Xylemsaft Protein-Konzentrationen von 13 µg/ml in Raps (Nakamura *et al.* 2008), 12 µg/ml in Mais (Alvarez *et al.* 2005), 7,8 µg/ml in Sojabohne (Subramanian *et al.* 2009), 20 bis 70 µg/ml in Tomate (Rep *et al.* 2002) sowie zwischen 50 und 100 µg/ml in verschiedenen anderen Arten, darunter auch Raps (Buhtz *et al.* 2004), ermittelt. Diese Werte liegen in einem ähnlichen Bereich wie die hier gefundene Proteinkonzentration (um 50 µg/ml). Zwischen der Proteinkonzentration im Xylemsaft von *Verticillium*-infizierten Pflanzen und mock-inokulierten Pflanzen gab es keinen Unterschied, während diese in der Sojabohne nach Behandlung der Pflanzen mit einem Elicitor von 7,8 auf 11 µg/ml anstieg (Subramanian *et al.* 2009).

Die in dieser Arbeit gemessene Glukose-Konzentration von 0,18 mM ist etwas geringer als die in der Literatur für Raps angegebenen Werte von 0,3 mM (Nakamura *et al.* 2008) und 1,3 mM (Ratzinger *et al.* 2009). Bei der letztgenannten Studie wurde außerdem die Saccharose-Konzentration ermittelt und lag zwischen 0,7 und 1,7 mM. Zhou (2000) fand im Xylemsaft von Rapspflanzen mit unterschiedlicher Stickstoffversorgung zwischen 0,06 mM und 0,25 mM Saccharose. Die im Rahmen dieser Arbeit gemessene Konzentration liegt mit 0,44 mM dazwischen. Die Menge an Fruktose war sowohl in unseren (0,04 mM) als auch in anderen Untersuchungen (0,09 mM bei Nakamura *et al.* 2008) geringer als die von Glukose und Saccharose. Zwischen *Verticillium*-infizierten und nicht infizierten Pflanzen traten keine Unterschiede hinsichtlich der Zuckerkonzentration auf. Dies wird durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt (Ratzinger *et al.* 2009).

Bei den Elementanalysen konnten Eisen und Magnesium nur in geringen Mengen (2 mg/l bzw. 9 mg/l) detektiert werden. Die Konzentrationen von Kalzium und Phosphor lagen im

Bereich zwischen 25 und 37 mg/l. Schwefel kam in etwas größeren Menge um 60 mg/l vor. Der Anteil an Kalium war mit Abstand am größten und betrug um 300 mg/l. Nakamura und Mitarbeiter fanden im Xylemsaft von Raps Konzentrationen von 10,4 μM (= 0,58 mg/l) für Eisen, 3,5 mM (= 84 mg/l) für Magnesium, 7,6 mM (= 304 mg/l) für Kalzium sowie 6,4 mM (= 250 mg/l) für Kalium (Nakamura *et al.* 2008). Die Unterschiede zu den in dieser Arbeit gemessenen Werten kann durch die verschiedenen Wachstumsbedingungen bedingt sein. Insgesamt liegen die Messergebnisse aber in einer ähnlichen Größenordnung.

Für Phosphor und Schwefel sind die Werte in infizierten Pflanzen etwas niedriger als in nicht infizierten Pflanzen. Diese Unterschiede sind jedoch so gering, dass sie nicht der Grund für das verringerte Wachstum von *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten Pflanzen sein können.

Hinsichtlich der Aminosäuren gab es in der Summe keine Unterschiede zwischen dem Xylemsaft von infizierten und dem von nicht infizierten Pflanzen. In anderen Studien wurden im Xylemsaft von Raps Aminosäure-Konzentrationen von 0,5 mM (Singh *et al.* 2010), 8,3 mM (Nakamura *et al.* 2008) sowie in Abhängigkeit vor der Stickstoffversorgung zwischen 2,5 und 4,8 mM (Zhou 2000) ermittelt. Auch in anderen Pflanzen ist die Summe aller Aminosäuren im Xylemsaft ähnlich. So wurde beispielsweise in Zuckerrübe eine Konzentration von 1,8 mM detektiert (López-Milán *et al.* 2000). Die Summe der in dieser Arbeit gemessenen Aminosäuren von 1,5 mM ist mit den Literaturangaben vergleichbar.

Während die Summe aller Aminosäuren im Xylemsaft von Tomatenpflanzen nach Infektion mit *V. albo-atrum* steigt (Dixon & Pegg 1972), änderte diese sich im Xylemsaft von Raps durch die Infektion mit *V. longisporum* nicht. Allerdings führte die Infektion zur einem veränderten Vorkommen einzelner Aminosäuren. So war die Konzentration von Glycin und Isoleucin in infizierten Pflanzen erhöht, während die von Tryptophan im Vergleich zu den Kontrollen geringer war. Da aus der Literatur keine Eigenschaften von Tryptophan, Isoleucin und Glycin bekannt sind, durch die eine Beeinflussung des Wachstums von *V. longisporum* erklärt werden könnte, ist es sehr unwahrscheinlich, dass die Änderung der Konzentrationen dieser drei Aminosäuren das verringerte Wachstum des Pilzes verursacht haben könnten. Im Xylemsaft von Pflanzen stellt Nitrat die Haupttransportform von Stickstoff dar (Siebrecht 2000, Zhou 2000). Erste Ergebnisse von

Messungen der Nitratkonzentration im Xylemsaft von Raps deuten an, dass diese im Xylemsaft von infizierten Pflanzen gegenüber nicht infizierten Pflanzen erhöht ist (Persönliche Mitteilung, Prof. Gatz).

Daher ist das eingeschränkte Wachstum von *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten Pflanzen höchstwahrscheinlich nicht durch eine schlechtere Nährstoffversorgung erklärbar. Bislang kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass die Nährstoffverteilung unbeeinträchtigt bleibt. Dies muss in weiteren Analysen noch geprüft werden.

Ein anderer Grund für die Inhibierung des Wachstums von *V. longisporum* im Xylemsaft können *de novo* synthetisierte oder vermehrt produzierte und sekretierte Abwehrsubstanzen sein. Da auch Proteine zu diesen Komponenten zählen und im extrazellulären Proteom von *B. napus* infolge einer Infektion durch *V. longisporum* Veränderungen auftreten (Floerl *et al.* 2008), wurde die Wirkung der Xylemsaft-Proteine auf das Pilzwachstum untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Proteine das Wachstum des Pilzes massiv inhibieren. Interessanterweise war der Effekt auch bei Verwendung der Proteine aus den uninfizierten Pflanzen zu beobachten.

Dass Xylemsaft-Proteine generell das Wachstum von Mikroorganismen beeinflussen können, wird durch andere Studien bestätigt. So konnte für Proteine aus dem Xylemsaft von Mais eine antifungale Eigenschaft gegen *Neurospora crassa* nachgewiesen werden (Alvarez *et al.* 2005). Auch die bereits erwähnten antifungalen Effekte des Xylemsaftes von Sojabohne konnten auf die darin enthaltenen Proteine zurückgeführt werden (Subramanian *et al.* 2009).

Im Xylemsaft von Raps treten nach Infektion mit *V. longisporum* eine basische 1,3- β -Glucanase, eine Endochitinase sowie ein PR4-Protein in größeren Mengen als in Kontrollpflanzen auf (Floerl *et al.* 2008). Aber auch in unbehandelten Rapspflanzen sind bereits Proteine mit putativen Abwehrfunktionen zu finden, wie z.B. Peroxidasen, Chitinasen, Germin-ähnliche Proteine, Thaumatin-ähnliche Proteine und andere PR-Proteine (Kehr *et al.* 2005, Floerl *et al.* 2008). Eine ähnliche Situation stellt sich auch in anderen Pflanzen wie Mais, Brokkoli, Kürbis und Gurke dar (Buhtz *et al.* 2004, Alvarez *et al.* 2005).

Die antimikrobielle Wirkung von Proteinen, die im Xylemsaft vorkommen, wurde für verschiedene Proteine nachgewiesen (van Loon *et al.* 2006). So wirkte sich beispielsweise ein PR10-Protein negativ auf das Wachstum von *Fusarium oxysporum* aus (Gómez-Gómez

et al. 2011). Aus der apoplastischen Waschflüssigkeit von Kichererbse wurde ein Thaumatin-ähnliches Protein mit antifungaler Aktivität isoliert (Hanselle *et al.* 2001). Ein anderes Thaumatin-ähnliches Protein aus *Cynanchum komarovii* konnte das Wachstum verschiedener pathogener Pilze wie *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Valsa mali* und auch *V. dahliae* einschränken (Wang *et al.* 2011). Peroxidasen können sich indirekt durch die Produktion von ROS auf das Wachstum auswirken (Almagro *et al.* 2009, Wong *et al.* 2010). Chitinasen katalysieren die Hydrolyse von Chitin, dem Hauptbestandteil der Zellwand von Pilzen, und können so das Pilzwachstum unterdrücken (Collinge *et al.* 1993, Wong *et al.* 2010). So konnte einer Chitinase aus *Urginea indica* beispielsweise eine antifungale Wirkung gegen *Fusarium oxysporum* und *Rhizoctonia solani* nachgewiesen werden (Shenoy *et al.* 2006). Chitinasen aus Tabak können das Wachstum von Pilzen inhibieren, indem sie die Spitzen der Hyphen lysieren (Sela-Buurlage *et al.* 1993, Mauch *et al.* 1998). Auch in transgenen Pflanzen mit konstitutiv erhöhter Chitinase-Expression ist das Pilzwachstum gehemmt (Broglie *et al.* 1991, Jach *et al.* 1995). Das Auftreten einer Chitinase und einer β -1,3,-Glucanase in der apoplastischen Waschflüssigkeit von Weizen werden mit einer Resistenz gegen *Septoria tritici* assoziiert (Shetty *et al.* 2009). Ebenfalls in der apoplastischen Waschflüssigkeit von Weizen wurden in einer anderen Studie eine Chitinase, ein Thaumatin-ähnliches Protein und eine 1,3,- β -Glucanase detektiert. Die apoplastische Waschflüssigkeit hatte eine inhibitorische Wirkung gegen *Fusarium graminearum* und *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Anand *et al.* 2004).

Die hier aufgezeigten Befunde zeigen, dass die Xylemsaft-Proteine in *B. napus* aufgrund ihrer wachstumsinhibierenden Eigenschaft einen wichtigen Beitrag zur Abwehr gegen *V. longisporum* liefern. Da auch die Proteine im Xylemsaft von unbehandelten Pflanzen das Wachstum des Pilzes beeinträchtigen, scheinen die Pflanzen stetig eine Vielzahl von Proteinen in das Xylem zu sekretieren, die für eine gewisse Basis-Resistenz sorgen. Das Xylem spielt also eine große Rolle bezüglich der Immunantwort von *B. napus* gegen *V. longisporum*.

Ob solche Proteine die Kolonisierung des Leitgewebes durch *V. longisporum* auch *in planta* minimieren, und ob sie generell das Wachstum vaskulärer Pathogene unterdrücken, müssen weitere Experimente klären.

4.2 Eine Infektion mit *Verticillium longisporum* führt in *Arabidopsis thaliana* zur Produktion von hyperplastischem Xylem und zu einer Transdifferenzierung von Mesophyllzellen zu Gefäß-ähnlichen Elementen

V. longisporum ist wie die anderen phytopathogenen Vertreter der Gattung *Verticillium* ein vaskuläres Pathogen, das den größten Teil seines Lebenszyklus in der Pflanze in deren Xylem lokalisiert ist (Karapapa *et al.* 1997, Eynck *et al.* 2007). Infektionen durch Pathogene gehen oft mit anatomischen Veränderungen innerhalb der Pflanze einher (siehe Einleitung). Da in *A. thaliana* nach Infektion mit *V. longisporum* der Ligningehalt erhöht ist und zudem Proteine im Apoplast zu finden sind, die mit Zellwandmodifikationen assoziiert werden (Flörl 2007), wurden infizierte Pflanzen auf anatomische Veränderungen hin analysiert.

Dabei wurde festgestellt, dass eine Infektion mit *V. longisporum* im Hypokotyl sowie im Xylem-Bereich des Blattes zu einer vermehrten Produktion von Gefäßen führte. Aufgrund der Anordnung dieser zusätzlichen Gefäße in Reihen kann geschlossen werden, dass sie durch vermehrte Zellteilung aufgrund einer erhöhten Aktivität des Kambiums entstanden sein müssen. Ähnliche Muster wurden auch in anderen Pflanzen durch abiotischen und biotischen Stress ausgelöst. Bei Pappeln wurde beispielsweise eine Zunahme der Gesamtzahl der Gefäße infolge von Salz- und Trockenstress nachgewiesen (Escalante-Pérez *et al.* 2009, Beniwal *et al.* 2010). Ein ähnliches Phänomen wurde auch nach Infektion durch *V. albo-atrum* im Stamm von Hopfen dokumentiert (Talboys 1958). Trotz unterschiedlicher Ursachen geht die Erhöhung der Gesamtzellzahl in allen genannten Studien mit einer Verringerung der Zelllumina einher. Dies wurde auch in *A. thaliana* infolge der Infektion durch *V. longisporum* beobachtet. Eine vermehrte Produktion neuer Zellen durch eine gesteigerte Kambiumaktivität wird als Hyperplasie bezeichnet (Talboys 1958, Baayen 1986). Talboys assoziierte das Auftreten dieser Hyperplasie nach Infektion durch Pathogene mit Resistenz, da sie in Hopfen-Kultivaren, die tolerant gegen *V. albo-atrum* sind, häufiger zu finden ist als in sensitiven Pflanzen (Talboys 1958).

In den Blättern von *A. thaliana* traten nach einer Infektion durch *V. longisporum* zusätzlich Zellen am Rand des Xylems im Übergang zum adaxialen parenchymatischen Gewebe auf, die sowohl einige Merkmale der Mesophyllzellen, jedoch auch bestimmte Merkmale von Xylem-Elementen aufwiesen. Bezüglich der Größe und der Lage entsprachen die Zellen den Mesophyllzellen, die das Leitgewebe umgeben. Doch während normale

Mesophyllzellen durch sehr große zentrale Vakuolen, dem Vorhandensein von Cytoplasma mit Chloroplasten und primären, nicht lignifizierten Zellwänden charakterisiert sind, war bei den neuen Zellen kein Zellinhalt auszumachen. Außerdem besaßen sie lignifizierte Sekundärwände und ähnelten daher den Gefäßen. Von jenen unterschieden sie sich jedoch hinsichtlich ihrer Größe sowie ihrer Lage und Anordnung. Während durch kambiale Aktivitäten entstandenen Xylem-Elemente in Reihen angeordnet sind und in adaxiale Richtung vom Kambium abgegeben werden, traten die neuen, Gefäß-ähnlichen Zellen meist am Rand des Leitgewebes auf. Außerdem kamen sie nicht nur auf der adaxialen Seite, sondern rings um das Leitgewebe herum vor. Vereinzelt waren auch im Bereich des Phloems diese Gefäß-ähnlichen Zellen zu sehen.

Da die neuen, Gefäß-ähnlichen Zellen sowohl Ähnlichkeiten mit den Mesophyllzellen als auch mit Gefäßen besaßen, wurde vermutet, dass sich die neuen Gefäße ohne Zellteilung aus bereits bestehenden Mesophyllzellen entwickelt haben. Dazu müsste sich eine bereits ausdifferenzierte Zelle zunächst dedifferenzieren, d.h. die Charakteristika des bisherigen Zelltyps verlieren, und anschließend redifferenzieren. Ein solcher Prozess wird als Transdifferenzierung bezeichnet (Fukuda 2004, Turner *et al.* 2007).

Dass eine Transdifferenzierung von Zellen generell möglich ist, haben Studien mit Zellkulturen von *Zinnia elegans* und *A. thaliana* gezeigt. Zum Beispiel können Mesophyllzellen, die aus Blättern von *Z. elegans* isoliert werden, durch Zugabe von Cytokinin und Auxin zu Tracheen-ähnlichen Zellen transdifferenzieren (Fukuda & Komamine 1980). *A. thaliana* Zellen differenzieren sich in Anwesenheit von Brassinoliden und Borsäure zu Gefäßen (Kubo *et al.* 2005).

In planta treten Xylem-Elemente in Bereichen außerhalb des Xylems vor allem nach Verwundungen auf, bei denen das Leitgewebe unterbrochen wurde (Aloni 2001). Bei Nelken führt eine Infektion mit *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* im Bereich der Infektionsstelle zur Bildung neuer Gefäße, wobei der Entstehung neuer Xylem-Elemente in diesem Fall jedoch Zellteilungen vorgeschaltet waren (Harling *et al.* 1984, Baayen 1986).

Des Weiteren wurde das Auftreten von Xylem-Elementen in Bereichen außerhalb des Leitgewebes in transgenen Pflanzen beschrieben. So führt die Überexpression von ASL (Asymmetric leaves-like) 19 oder ASL20 in *A. thaliana* zu einer Differenzierung von Mesophyllzellen in Gefäß-ähnliche Zellen (Soyano *et al.* 2008). Auch die verschiedenen Mitglieder der Familie der VND (Vascular-related NAC-domain) Transkriptionsfaktoren

werden mit Differenzierungs- und Transdifferenzierungsprozessen assoziiert. Eine Überexpression von VND6 oder VND7 induziert die Differenzierung verschiedener Zelltypen in Xylem-Gefäße (Kubo *et al.* 2005).

Die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren für die *Verticillium*-induzierte Transdifferenzierung von Mesophyllzellen in Gefäß-ähnliche Elemente in *A. thaliana* wurde im Rahmen der Forschergruppe 546 von der AG Teichmann analysiert. Durch Expressionsanalysen und die Untersuchung von induzierbaren Mutanten, bei denen die Zielgene der VND-Transkriptionsfaktoren infolge einer *Verticillium*-Infektion in verringerten Mengen exprimiert werden (pPer21::VND7-SRDX), konnte gezeigt werden, dass VND6 und VND7 eine essentielle Rolle bei der *Verticillium*-induzierten Transdifferenzierung spielen (M. Reusche, unpublizierte Daten). Im Rahmen der anatomischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die genannten VND-Repressorlinien nach Infektion keine transdifferenzierten Zellen bilden (siehe Anhang C).

Neben den putativ transdifferenzierten Zellen, die keinen Zellinhalt mehr besitzen und außerdem eine lignifizierte Zellwand aufweisen, wurden in der vorliegenden Arbeit in *A. thaliana* nach *Verticillium*-Infektion auch Zellen gefunden, die eine partiell lignifizierte Wand aufwiesen, obwohl das Cytoplasma noch deutlich erkennbar war. Hierbei handelt es sich vermutlich um Zwischenstufen in der Entwicklung zu Xylem-Gefäßen. Während der Differenzierung einer Zelle zu einem vollständig funktionsfähigen Gefäß entsteht zunächst die lignifizierte, sekundäre Zellwand. Hierfür sind strukturelle Veränderungen des Cytoskeletts essentiell. Anschließend wird die Autolyse eingeleitet, indem Enzyme aktiviert werden, welche die subzellulären Bestandteile und teilweise auch die Primärwand degenerieren (Turner *et al.* 2007, Endo *et al.* 2009). Wahrscheinlich haben die oben beschriebenen Zellen zwar bereits eine Sekundärwand gebildet, die Autolyse steht jedoch noch bevor.

Ein weiterer Hinweis, der die Hypothese der Transdifferenzierung aus früheren Mesophyllzellen unterstützt, war die Beobachtung von netzartigen Strukturen, die teilweise in den putativ transdifferenzierten Zellen zu sehen waren. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um die Rückwand der Zellen, auf der sich das Material der Sekundärwand abgelagert hat. Dies bedeckt die Primärwand nie vollständig. Statt dessen werden bestimmte Bereiche bei der Ablagerung des Sekundärwandmaterials ausgespart, so dass

sich netzartige Strukturen ausbilden. Bei der normalen Differenzierung von Gefäßen aus kambialen Zellen geht der Bildung der Sekundärwand eine Elongation der Zellen voraus. Danach werden Teile der Wände während der Autolyse perforiert, so dass sich eine Röhre aus aneinander gereihten Xylem-Elementen bildet (Turner *et al.* 2007, Endo *et al.* 2009). Die Elongation und die Perforation der Zellwand scheint bei den in dieser Arbeit aufgezeigten putativ transdifferenzierten Zellen nicht stattgefunden zu haben. Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass zufällig in den Präparaten auch Rückwände der transdifferenzierten Zellen zu sehen sind.

Nach der Beobachtung der Hyperplasie und der putativen Transdifferenzierung von Mesophyllzellen in Gefäß-ähnliche Elemente stellte sich die Frage nach der biologischen Relevanz dieser vermehrten Gefäßbildung. Die Bildung von Wasserleit-Elementen kann der Pflanze oder dem Pathogen einen Vorteil verschaffen.

Es wäre beispielsweise möglich, dass putativ mit Pilzmyzel verstopfte Gefäße ersetzt werden und so die Wasserversorgung der Pflanze gewährleistet bleibt. Dass die neu gebildeten Gefäße funktionsfähig und mit dem restlichen Xylem-Elementen verbunden sind, haben Experimente gezeigt, bei denen der Transpirationsstrom mit Hilfe einer Safranin-O-Färbung sichtbar gemacht wurde (M. Reusche, unpublizierte Daten). Ob die Transdifferenzierung der Welke, die nach Infektion durch andere *Verticillium*-Arten auftritt, entgegen wirkt, ist noch unklar. Die Transdifferenzierung konnte auch in Pflanzen beobachtet werden, die Welkeerscheinungen zeigen (M. Reusche, unpublizierte Daten). Außerdem zeigten die VND-Repressorlinien keine Welkesymptome, obwohl in diesen nach Infektion keine Transdifferenzierung statt fand (M. Reusche, unpublizierte Daten).

Eine andere Möglichkeit ist, dass der Pilz durch Induktion der Gefäßbildung sein Habitat in der Pflanze erweitert oder die Nährstoffverteilung zu seinen Gunsten ändert.

Diese Hypothesen werden derzeit durch weitere Experimente innerhalb der Forschergruppe 546 von der AG Teichmann untersucht.

4.3 GLP3 vermittelt in *Arabidopsis thaliana* Resistenz gegenüber *Verticillium longisporum* durch Einschränkung des Pilzwachstums

Proteomanalysen der apoplastischen Waschflüssigkeit von *A. thaliana* haben gezeigt, dass drei verschiedene Peroxidasen, eine Serin-Carboxypeptidase, eine α -Galactosidase und ein Germin-ähnliches Protein (GLP3) infolge einer Infektion durch *V. longisporum* in

größeren Mengen auftreten, während ein Lektin-ähnliches Protein in geringeren Mengen vorkommt als in den mock-inokulierten Pflanzen. Auch auf Transkriptebene sind diese Unterschiede vorhanden (Flörl 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle dieser Proteine im Hinblick auf die Abwehrfunktion gegen *V. longisporum* untersucht. Apoplastische Proteine sind ein wichtiger Teil der Immunantwort gegen Pathogene und können deren Wachstum direkt beeinflussen (siehe Kapitel 4.1). Eine Verringerung der Mengen der für die Abwehr wichtigen Proteine im Apoplast kann die Suszeptibilität einer Pflanze gegenüber einem Pathogen erhöhen, während eine konstitutive Überexpression zu einer Resistenz führen kann (van Loon *et al.* 2006). Es ist aber auch möglich, dass ein Pathogen mit der Immunantwort interferiert und die beobachteten Veränderungen herbeiführt (Boller & He 2009). In einem solchen Fall wären Pflanzen mit einer verringerten Menge des entsprechenden Proteins resistenter.

Zur Überprüfung der Bedeutung der *V. longisporum*-responsiven Proteine wurden transgene Pflanzen hinsichtlich ihrer Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* untersucht. Für 5 der 7 Kandidaten, nämlich für die Peroxidase 52, Serin-Carboxypeptidase, α -Galactosidase, LLP und GLP3, konnten T-DNA-Insertionslinien mit einer verringerter Transkriptmenge identifiziert werden. Von diesen Linien reagierte nur die GLP3 betreffende Mutante mit einer erhöhten Suszeptibilität auf eine Infektion mit *V. longisporum*, während die anderen Linien in ihrem Pathophänotyp dem Wildtyp glichen. Trotz der unveränderten Suszeptibilität der transgenen Linien bezüglich der Serin-Carboxypeptidase, der α -Galactosidase, des Lektin-ähnlichen Proteins und der Peroxidasen kann ihre Rolle in Abwehrfunktionen nicht ausgeschlossen werden, da homologe Proteine die Funktion der reprimierten Gene teilweise oder vollständig übernehmen könnten. Eine solche Redundanz ist vor allem bei den Peroxidasen wahrscheinlich, da die einzelnen Familienmitglieder sich in diesem Fall besonders stark ähneln (Cosio & Dunand 2009). Die Rolle der Peroxidasen konnte nicht vollständig untersucht werden, weil keine T-DNA-Insertionslinie für POD34 und POD37 mit einer verringerten Expression, sondern lediglich solche mit einer leicht erhöhten Transkriptmenge identifiziert werden konnten. Auch amiRNA-Linien, in denen speziell POD34, POD37 und POD52 betroffen sind, konnten nicht hergestellt werden. Obwohl Peroxidasen im Allgemeinen mit Abwehrfunktionen wie Zellwandverstärkungen und der Bildung von ROS assoziiert werden, bleibt die spezifische

Funktion von POD34, POD37 und POD52 im Hinblick auf Abwehrfunktionen gegen *V. longisporum* noch unklar.

Für GLP3 konnte in dieser Arbeit eine Rolle für die Abwehr gegen *V. longisporum* nachgewiesen werden. Die *glp3*-Mutante zeigte eine verstärkte Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum*. Die Komplementierung der *glp3*-Mutante konnte deren verstärkte Suszeptibilität zwar nicht vollständig revertieren, die komplementierten Pflanzen waren aber dennoch tendenziell toleranter als die *glp3*-Mutante. Dass der Effekt relativ gering war, kann daran liegen, dass die komplementierten Pflanzen generell kleiner waren als die nicht komplementierte *glp3*-Mutante. AmiRNA-Pflanzen mit einer deutlich verringerten *glp3*-Transkriptmenge zeigten eine stärkere *Verticillium*-bedingte Wuchsdepression als der Wildtyp und konnten so die mit der *glp3*-Mutante gewonnenen Ergebnisse bestätigen. Des Weiteren waren Pflanzen mit einer konstitutiv erhöhten *glp3*-Expression toleranter gegenüber *V. longisporum*. Bei diesen Überexpressionspflanzen war die Reduktion der Wachstumsparameter nicht so stark ausgeprägt wie bei Wildtyp-Pflanzen oder der *glp3*-Mutante, zudem enthielten sie auch deutlich geringe Mengen pilzlicher DNA.

Insgesamt betrachtet scheint also die Toleranz von *A. thaliana* gegenüber *V. longisporum* mit der *glp3*-Expression zu korrelieren. Hinweise darauf, dass GLP3 aus *A. thaliana* (AtGLP3) eine Rolle bei der Immunantwort spielt, liefern auch Experimente, bei welchen die Induktion von *glp3* durch das fungale Pathogen *Colletotrichum higginsianum* dokumentiert wurde (Narusaka *et al.* 2004). Des Weiteren können auch andere Mitglieder der Superfamilie der Germin- und Germin-ähnlichen Proteine in diversen Pflanzen Resistenz gegenüber den verschiedensten Pathogenen vermitteln. So ist Weizen resistenter gegenüber Mehltau, wenn bestimmte GLPs in der Pflanze überexprimiert werden (Schweizer *et al.* 1999, Christensen *et al.* 2004). Auch in Gerste führt eine Überexpression von einigen GLPs zu einer erhöhten Resistenz gegen Mehltau, während Pflanzen mit einer verringerten Expression suszeptibler sind (Zimmermann *et al.* 2006). Eine Reduktion der Transkriptmengen verschiedener GLPs in Reis verursacht ebenfalls eine erhöhte Suszeptibilität gegen pilzliche Pathogene (Manosalva *et al.* 2009). An Tabakpflanzen sind die Schäden durch Herbivorie bei einer verringerten Menge eines Germin-ähnlichen Proteins größer (Lou & Baldwin 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das aus Zuckerrübe isolierte BvGLP-1-Gen bei Expression in *A. thaliana* eine Resistenz gegenüber *V. longisporum* und *Rhizoctonia solani* verursacht (Knecht *et al.* 2010). In weiteren

Pflanzen werden Germin-ähnliche Proteine infolge einer Infektion durch verschiedene Pathogene induziert, wie z. B. VvGLP3 in Wein durch Mehltau (Godfrey *et al.* 2007), verschiedene GLPs in Kiefer durch das pilzliche Pathogen *Ceratobasidium bicorne* (Jøhnk *et al.* 2005) und ein Germin-ähnliches Protein in Mais nach einer Virusinfektion (Uzarowska *et al.* 2009).

Durch diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch AtGLP3 eine große Bedeutung hinsichtlich der Immunantwort aufweist, da es in *A. thaliana* Resistenz gegenüber *V. longisporum* vermitteln konnte. In diesem Zusammenhang entstand die Frage, durch welche Mechanismen das Protein in der Pflanze gegen das Pathogen wirkt.

Einige der Mitglieder der GLP-Familie besitzen enzymatische Aktivitäten. Ein Germin-ähnliches-Protein aus Gerste (HvGER2) weist beispielsweise eine ADP-Glukose pyrophosphatase/phosphodiesterase (AGPPase) Aktivität auf (Bernier and Berna 2001, Rodríguez-López *et al.* 2001, Breen & Bellgard 2010). Häufiger sind bei GLPs Mangan-abhängige Enzymaktivitäten, bei denen H₂O₂ freigesetzt wird, zu beobachten (Woo *et al.* 2000, Dunwell *et al.* 2004). Dabei fungieren einige GLPs als Superoxid-Dismutasen und degradieren Sauerstoff-Radikale (Woo *et al.* 2000, Breen & Bellard 2010), andere dagegen als Oxalat-Oxidasen, welche die Degradation von Oxalsäure katalysieren (Woo *et al.* 2000). Oxalsäure wird von einigen Pathogenen produziert und stellt einen Virulenzfaktor dar (Godoy *et al.* 1990). Eine Oxalat-Oxidase verhindert also einerseits die Schädigung durch die Oxalsäure, des weiteren entsteht bei der Reaktion neben CO₂ auch H₂O₂, wodurch weitere Abwehrreaktionen aktiviert werden (Dunwell *et al.* 2004, Breen & Bellard 2010). AtGLP3 produziert *in vitro* jedoch kein H₂O₂, wenn Oxalat als Substrat angeboten wird (Membre *et al.* 2000).

Weitere Informationen über AtGLP3, die auf die Funktion im Hinblick auf Abwehrreaktionen schließen lassen, gibt es nur wenige. Bisher wurde vor allem die Expression sehr gut analysiert. Für diese konnte ein tageszeiten-abhängiger Rhythmus, verursacht durch den Wechsel zwischen Licht und Dunkelheit, nachgewiesen werden, wobei die Transkriptmenge zu Beginn der Nacht am stärksten ist (Staiger *et al.* 1999). Lokalisiert werden konnte die glp3-Expression im Rahmen dieser Arbeit anhand von GUS-Reporterpflanzen in Blättern, den verschiedenen Teilen der Blüte und in den Schoten, während sie in den Wurzeln zu keinem Zeitpunkt detektiert werden konnte. Dieses Expressionsmuster wurde auch in Untersuchungen von GUS-Reporterpflanzen mit einem

verkürzten Promoter beobachtet (Staiger *et al.* 1999). Ebenso konnte mittels Northern Blot Analysen kein *glp3*-Transkript in Wurzeln detektiert werden (Membre *et al.* 1997). Auf Proteinebene konnte GLP3 dagegen in den Wurzeln detektiert werden, wenn auch in sehr geringen Mengen (Schlesier *et al.* 2004).

Innerhalb der Blätter konnte in dieser Arbeit in den GUS-Reporterpflanzen eine deutliche β -Glucuronidase-Aktivität vor allem in den Mesophyllzellen und der Epidermis nachgewiesen werden, während diese im Leitgewebe nur sehr gering war. Zudem konnte für die Blätter eine Korrelation zwischen der *glp3*-Expression und dem physiologischen Alter festgestellt werden. Eine altersabhängige Expression von Atglp3 wurde auch im Infloreszenzstängel von *A. thaliana* beobachtet. Mittels Transkriptomanalysen wurde gezeigt, dass die Expression in älteren, basipetalen Abschnitten geringer ist als in weiter oben liegenden, jüngeren Bereichen (Ehlting *et al.* 2005, Minic *et al.* 2009). Auch das zu AtGLP3 homologe GhGLP1 aus Baumwoll-Fasern tritt vermehrt in Zellen auf, welche sich im Streckungswachstum befinden. Für dieses Protein wurde daher eine Funktion beim Streckungswachstum postuliert (Kim *et al.* 2004, Kim & Triplett 2004).

GLPs könnten eine Rolle bei Umgestaltungen und Modifizierungen der Zellwand spielen (Schweizer *et al.* 1999, Bernier & Berna 2001). Diese Funktion wurde allerdings hauptsächlich im Zusammenhang mit der H_2O_2 -Produktion durch Oxalat-Oxidase- oder Superoxid-Dismutase-Aktivitäten postuliert (Bernier & Berna 2001). Die in dieser Arbeit untersuchte *glp3*-Mutante mit einer verringerten *glp3*-Transkriptmenge zeigte in Querschnitten keinen Unterschied zum Wildtyp. Auch die *Verticillium*-induzierte Entstehung von hyperplastischem Xylem und die putative Transdifferenzierung konnte in der Mutante in ähnlicher Form beobachtet werden wie im Wildtyp.

Neben den putativen entwicklungsphysiologischen Funktionen von AtGLP3 zeigten die vorliegenden Untersuchungen, dass AtGLP3 relevant für die Toleranz von *A. thaliana* gegenüber *V. longisporum* war und die Menge des Pilzes in der Pflanze bei erhöhter *glp3*-Expression *in planta* abnahm. AtGLP3 kommt extrazellulär vor (Boudart *et al.* 2005, Charmont *et al.* 2005, Flörl 2007, Millar *et al.* 2009) und könnte deshalb das Pilzwachstum direkt beeinflussen. Um diese Hypothese zu prüfen, wurde GLP3 heterolog in Hefe exprimiert. Durch anschließende Wachstumsversuche konnte gezeigt werden, dass *V. longisporum* schlechter wuchs, wenn der Pilz mit GLP3 produzierender Hefe koinkubiert wurde.

Daher ist es wahrscheinlich, dass AtGLP3 in *A. thaliana* das Pilzwachstum direkt minimiert und Resistenz gegen *V. longisporum* vermittelt, indem es einer massiven Kolonisierung des Pathogens innerhalb der Pflanze entgegenwirkt.

In Kapitel 4.1 wurde bereits diskutiert, dass eine Vielzahl an Proteinen, besonders PR-Proteine, antimikrobielle Eigenschaften aufweisen (van Loon *et al.* 2006). Interessanterweise sind auch im Xylemsaft von Raps Germin-ähnliche Proteine enthalten (Kehr *et al.* 2005). In der apoplastischen Waschflüssigkeit von Raps wurde ebenfalls ein GLP identifiziert, welches die größte Übereinstimmung mit dem GLP3 aus *A. thaliana* aufweist (Floerl *et al.* 2008). Daher ist es möglich, dass ein oder mehrere Mitglieder der GLPs in Raps auch bei den Xylemsaft-Versuchen (Kapitel 4.1) an dem inhibitorischen Effekt beteiligt waren. Obwohl diverse Germin-ähnliche Proteine Resistenz gegen verschiedene Pathogene vermitteln können, wurde bisher für kein Mitglied dieser Multigenfamilie eine direkte wachstumshemmende Wirkung gegen Pathogene nachgewiesen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt. Wichtig wäre nun in folgenden Untersuchungen den Mechanismus aufzuklären, durch welchen das Wachstum von *V. longisporum* inhibiert wird.

5 Zusammenfassung

Verticillium longisporum ist ein bodenbürtiger, pathogener Pilz, der auf die Pflanzenfamilie der *Brassicaceae* spezialisiert ist. Da *V. longisporum* ein vaskuläres Pathogen ist, welches die meiste Zeit seines Lebenszyklus in der Pflanze im Xylem lokalisiert ist, werden Abwehrreaktionen der Pflanze im extrazellulären Raum erwartet.

In einer vorangegangenen Arbeit wurde das extrazelluläre Proteom von *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* im Hinblick auf Veränderungen infolge der Infektion der Pflanzen durch *V. longisporum* untersucht. Es zeigte sich, dass in *B. napus* eine Glucanase, eine Peroxidase, eine Chitinase sowie ein PR-4-Protein und in *A. thaliana* drei verschiedene Peroxidasen, eine Serin-Carboxypeptidase, eine α -Galactosidase und ein Germin-ähnliches Protein (GLP3) nach Infektion mit dem Pathogen vermehrt produziert wurden, während ein Lectin-ähnliches Protein in *A. thaliana* in geringeren Mengen auftrat. Ziel der vorliegenden Arbeit war die funktionelle Charakterisierung dieser differenziell auftretenden extrazellulären Proteine in *B. napus* und *A. thaliana* nach einer Infektion durch *V. longisporum* in Relation zu physiologischen und anatomischen Veränderungen.

Der Xylemsaft von *B. napus* wurde auf putative Abwehrsubstanzen hin überprüft, die sich auf das Wachstum von *V. longisporum* auswirken könnten. Zu diesem Zweck wurde das Wachstum des Pilzes in Xylemsaft aus infizierten und uninfizierten Pflanzen verglichen. Es zeigte sich eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums von *V. longisporum* im Xylemsaft von infizierten Pflanzen. Diese Inhibierung konnte nicht auf eine mangelnde Nährstoffverfügbarkeit im Xylemsaft zurückgeführt werden. Auch Salizylsäure, welche im Xylemsaft von *B. napus* infolge einer Infektion in erhöhten Mengen vorkommt, hatte keinen direkten Einfluss auf das Pilzwachstum. Mit Hilfe weiterer Wachstumsversuche im Xylemsaft und einem Vollnährmedium konnte nachgewiesen werden, dass die im Xylemsaft enthaltenen Proteine die Proliferation von *V. longisporum* massiv inhibieren. Diese antifungale Eigenschaft konnte sowohl für die Proteine aus dem Xylemsaft von infizierten Pflanzen als auch für die aus dem Xylemsaft aus nicht infizierten Pflanzen gezeigt werden. Die Pflanze sekretiert also konstitutiv

Proteine mit einer antifungalen Wirkungsweise in den Apoplast, wodurch sie einer unkontrollierten Ausbreitung von Mikroorganismen entgegenwirken kann.

Da einige der in *A. thaliana* nach einer *Verticillium*-Infektion differentiell auftretenden Proteine mit Funktionen bei der Modifizierung und Umgestaltung der Zellwand assoziiert werden, wurden infizierte und nicht infizierte Pflanzen anatomisch untersucht und auf Unterschiede überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass eine Infektion mit *V. longisporum* in *A. thaliana* im Hypokotyl sowie in den Blättern zur Bildung von hyperplastischem Xylem und in den Blättern zusätzlich zu einer Transdifferenzierung von Mesophyllzellen zu Gefäßen führt. Die biologische Rolle dieser vermehrten Bildung neuer wasserleitender Elemente muss noch weiter untersucht werden.

Um zu überprüfen, welche Proteine in *A. thaliana* an der Immunantwort gegen *V. longisporum* beteiligt sind, wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Dazu wurden homozygote Pflanze von T-DNA-Insertionslinien isoliert und hinsichtlich einer veränderten Suszeptibilität gegenüber *V. longisporum* untersucht. Die meisten Linien besaßen einen ähnlichen Pathophänotyp wie der Wildtyp. Eine Linie mit einer reduzierten *glp3*-Expression reagierte jedoch mit einer erhöhten Suszeptibilität. Weitere Analysen mit amiRNA-Linien bestätigten diese Beobachtung. Pflanzen mit einer konstitutiv erhöhten *glp3*-Expression waren dagegen resistenter gegenüber *V. longisporum*. Zudem war die Pilzmenge in infizierten Überexpressionspflanzen deutlich geringer als in infizierten Wildtyp-Pflanzen. Um die spezifische Funktion von GLP3 innerhalb der Pflanze-Pathogen-Interaktion weiter zu charakterisieren, wurde überprüft, ob GLP3 *V. longisporum* direkt beeinflusst. Heterolog in Hefe produziertes GLP3 konnte das Wachstum von *V. longisporum* einschränken. GLP3 vermittelt in *A. thaliana* Resistenz gegenüber *V. longisporum*, indem es offenbar die Kolonisierung durch das Pathogen direkt minimiert. Der genaue molekulare Mechanismus ist bislang unklar und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

Summary

Verticillium longisporum is a soil-borne pathogenic fungus which is restricted to the family of *Brassicaceae*. *V. longisporum* is a vascular pathogen which colonizes the xylem of its host plants. Therefore, main defence reactions are expected in the extracellular matrix.

Previously, the extracellular proteome of infected and mock inoculated *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* plants was analysed and compared. In *B. napus* a glucanase, a peroxidase, a chitinase and a PR-4 protein were induced following infection. In *A. thaliana* three different peroxidases, a serine-carboxypeptidase, an α -galactosidase and a germin-like protein (GLP3) were more abundant after infection. In contrast, a lectin-like protein was downregulated. The aim of this study was to functionally characterize those differentially expressed extracellular proteins in *B. napus* and *A. thaliana* in relation to physiological and anatomical alterations.

To test the hypothesis that defence related proteins in the xylem sap of *B. napus* could influence *V. longisporum* fungal proliferation was investigated in xylem sap of infected and mock inoculated plants. The growth of the fungus was restricted in xylem sap of infected plants compared to controls. This growth behaviour cannot be attributed to nutrient deficiencies in xylem sap of infected plants. Furthermore, the effect of salicylic acid on the growth of the fungus was studied. Salicylic acid was reported to increase after *V. longisporum* infection in the xylem sap of *B. napus*. But there was no effect on the proliferation of *V. longisporum*. In additional experiments the influence of xylem sap proteins on fungal growth was tested. Proliferation of *V. longisporum* was strongly enhanced in protein-free xylem sap regardless whether the sap was from infected or non-infected oil seed rape plants. These results show that the constitutive presence of defence proteins in xylem sap suppresses uncontrolled proliferation of *V. longisporum*.

Since some of the differentially expressed candidate proteins in *A. thaliana* are suggested to play a role in cell wall remodelling and modifications infected and mock inoculated plants were investigated anatomically. Infection with *V. longisporum* led to the production of hyperplastic xylem in the hypocotyl as well as in leaves. Moreover, transdifferentiation of mesophyll cells

into xylem vessels was observed in the leaves. The biological role of this observations remains unclear and needs to be investigated in future studies.

To investigate which proteins are responsible for the immune response against *V. longisporum* in *A. thaliana*, functional analysis were performed. For this purpose, homozygous plants of T-DNA insertion lines were isolated and challenged with *V. longisporum*. Most of them displayed a similar pathophenotype like the wildtype. However, one line with a reduced expression of the germin-like protein 3 (GLP3) showed enhanced susceptibility to the fungus. Further experiments with amiRNA lines supported these results. Moreover, glp3-overexpressing plants with a constitutively higher glp3 transcript level were more resistant to *V. longisporum*. Also the amount of fungal DNA within the plants was significantly reduced in infected overexpressing plants compared to wildtype plants. The next step then was to characterize the function of GLP3 for the plant-pathogen interaction. Growth experiments with heterologous expressed GLP3 showed that the protein was able to attenuate proliferation of *V. longisporum in vitro*. The results indicate that GLP3 mediates resistance in *A. thaliana* by restricting the growth of the fungus directly. The molecular mechanisms of glp3 action is unclear and should be investigated in further experiments.

6 Literaturverzeichnis

Aitchitt M., Ainsworth C.C., Thangavelu M. (1993): A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from mature leaves of the date palm (*Phoenix dactylifera* L.). Plant Molecular Biology Reporter 11: 317-319.

Aloni R. (2001): Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. Journal of Plant Growth Regulation 30: 22-34.

Almagro L., Gómez Ros L.V., Belchi-Navarro S., Bru R., Ros Barcelo A., Pedreño M.A. (2009): Class III peroxidases in plant defense reactions. Journal of Experimental Botany 60: 377-390.

Alvarez S., Goodger J.Q.D., Marsh E.L., Chen S., Asirvatham V.S., Schachtman D.P. (2005): Characterization of the maize xylem sap proteome. Journal of Proteome Research 5: 963-972.

Anand A., Lei Z., Sumner L.W., Mysore K.S., Arakane Y., Bockus W.W., Muthukrishnan S. (2004): Apoplastic extracts from a transgenic wheat line exhibiting lesion-mimic phenotype have multiple pathogenesis-related proteins that are antifungal. Molecular Plant-Microbe Interactions 17: 1306-1317.

Apel K. & Hirt H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. Annual Review of Plant Biology 55: 373-399.

Baayen (1986): Regeneration of vascular tissues in relation to *Fusarium* wilt resistance of carnation. Netherland Journal of Plant Pathology 92: 273-285.

Barbara D.J. & Clewes E. (2003): Plant pathogenic *Verticillium* species: how many of them are there? Molecular Plant Pathology 4: 287-305.

Barbara D.J., Morton A., Miller N.J. (2005): Isolation of microsatellite markers from an interspecific hybrid isolate of the fungal plant pathogen *Verticillium dahliae*. Molecular Ecology Notes 5: 854-856.

Bari R. & Jones J.D.G. (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. Plant Molecular Biology 69: 473-488.

Bartel D.P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.

Beckman C.H. (1987): The nature of wilt diseases of plants. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.

Bednarek P. & Osbourn A. (2009): Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324: 746-748.

Beliën T., Van Campenhout S., Robben J., Volckaert G. (2006): Microbial endoxylanases: effective weapons to breach the plant cell-wall barrier or, rather, triggers of plant defense systems? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 1072-1081.

Beligni M.V. & Lamattina L. (2001): Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment* 24: 267-278.

Benhamou N. (1995): Immunocytochemistry of plant defense mechanisms induced upon microbial attack. *Microscopy Research and Technique* 31: 63-78.

Beniwal R.S., Langenfeld-Heyser R., Polle A. (2010): Ectomycorrhiza and hydrogen protect hybrid poplar from water deficit and unravel plastic responses of xylem anatomy. *Environmental and Experimental Botany* 69: 189-197.

Bent A.F. (2000): *Arabidopsis in planta* transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiology* 124: 1540-1547.

Berger S., Papadopoulos M., Schreiber U., Kaiser W., Roitsch T. (2004): Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419-428.

Berger S., Benediktyová Z., Matouš K., Bonfig K., Mueller M.J., Nedbal L., Roitsch T. (2007): Visualization of dynamics of plant-pathogen interaction by novel combination of chlorophyll fluorescence imaging and statistical analysis: differential effects of virulent and avirulent strains of *P. syringae* and of oxylipins on *A. thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 58: 797-806.

Berlanger I. & Powelson M. L. (2000): *Verticillium* wilt. The Plant Health Instructor. American Phytopathological Society. Plant Disease Lesson.

<http://www.apsnet.org/education/lessonsplantpath/Verticillium/default.htm>

- Bernier F. & Berna A. (2001): Germins and germin-like proteins: Plant do-all proteins. But what do they do exactly? *Plant Physiology and Biochemistry* 39: 545-554.
- Beutler H.O. (1978): Enzymatic determination of starch in food by hexokinase method. *Starch* 30: 309-312.
- Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A., Stone J.M., Asai T., Plotnikov J., Denoux C., Hayes T., Gerrish C., Davies D.R., Ausubel F.M., Bolwell G.P. (2006): Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *The Plant Journal* 47: 851-863.
- Bishop C.D. & Cooper R.M. (1984): Ultrastructure of vascular colonization by fungal wilt pathogens. II. Invasion of resistant cultivars. *Physiological Plant Pathology* 24: 277-289.
- Blume B., Nürnberger T., Nass N., Scheel D. (2000): Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defence in barley. *The Plant Cell* 12: 1425-1440.
- Boller T. & He S.Y. (2009): Innate Immunity in Plants: An arms race between Pattern Recognition Receptors in plants and Effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744.
- Bolton E.T. & McCarthy B.J. (1962): A general method for isolation of RNA complementary to DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 48: 1390-1397.
- Bolwell G.P., Bindschedler L.V., Blee K.A., Butt V.S., Davies D.R., Gardner S.L., Gerrish C., Minibayeva F. (2002): The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three component system. *Journal of Experimental Botany* 53: 1367-1376.
- Boudart G., Jamet E., Rossignol M., Lafitte C., Borderies G., Jauneau A., Esquerre-Tugaye M.T., Pont-Lezica R. (2005): Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics. *Proteomics* 5: 212-221.
- Boudsocq M., Willmann M.R., McCormack M., Lee H., Shan L., He P., Bush J, Cheng S.-H., Sheen J. (2010): Differential innate immune signalling via Ca^{2+} sensor protein kinases. *Nature* 464: 418-422.

Bowling S.A., Clarke J.D., Liu Y., Klessig D.F., Dong X. (1997): The *cpr5* mutant of *Arabidopsis* expresses both Npr1-dependent and npR1-independent resistance. *The Plant Cell* 9: 1573-1584.

Breen J. & Bellgard M. (2010): Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. *Functional & Integrative Genomics* 4: 463-476.

Brininstool G., Kasili R., Simmons L.A., Kirik V., Hülkamp M., Larkin J.C. (2008): Constitutive expressor of pathogenesis-related genes5 affects cell wall biogenesis and trichome development. *BMC Plant Biology* 8: 58.

Brogliè K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P., Knowlton S., Mauvais C. J., Brogliè R. (1991): Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.

Buhtz A., Kolasa A., Arlt K., Walz C., Kehr, J. (2004): Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* 219: 610-618.

Charmont S., Jamet E., Pont-Lezica R., Canut H. (2005): Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds. *Phytochemistry* 66: 453-461.

Chen X. (2005): MicroRNA biogenesis and function in plants. *FEBS Letters* 579: 5923-5931.

Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. (2006): The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* 18: 465-476.

Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D.G., Felix G., Boller T. (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497-501.

Chomczynski P. & Sacchi N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162: 156-159.

Chomczynski P. (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15: 532-537.

Christensen A.B., Thordal-Christensen H., Zimmermann G., Gjetting T., Lyngkjaer M.J., Dudler R., Schweizer P. (2004): The germin-like protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 109-117.

Chrost B. & Krupinska K. (2000): Genes with homologies to known α -galactosidases are expressed during senescence of barley leaves. *Physiologia Plantarum* 110: 111-119.

Chrost B., Kolukisaoglu U., Schulz B., Krupinska K. (2007): An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta* 225: 311-320.

Clough S.J. & Bent A.F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16: 735-743.

Collard B.C.Y. & Mackill D.J. (2008): Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 363: 557-572.

Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U., Vad K. (1993): Plant chitinases. *The Plant Journal* 3: 31-40.

Collins A., Okoli C.A.N., Morton A., Parry D., Edwards S.G., Barbara D.J. (2003): Isolates of *Verticillium dahliae* pathogenic to Crucifers are of at least three distinct molecular types. *Phytopathology* 93: 364-76.

Cooper R.M., Resende M.L.V., Flood J., Rowan M.G., Beale M.H., Potter U. (1996): Detection and cellular localization of elemental sulphur in disease resistant genotypes of *Theobroma cacao*. *Nature* 246: 309-311.

Cosio C. & Dumand C. (2009): Specific functions of individual class III peroxidase genes. *Journal of Experimental Botany* 60: 391-408.

Czechowski T., Stitt M., Altmann T., Udvardi M.K., Scheible W.R. (2005): Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139: 5-17.

Daayf F., Nicole M., Boher B., Pando A., Geiger J.A. (1997): Early vascular defense reactions of cotton roots infected with a defoliating mutant strain of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 103: 125-136.

Daebeler F., Amelung D., Zeise K. (1988): *Verticillium*-Welke an Winterraps – Auftreten und Bedeutung. Nachrichtenblatt Pflanzenschutzdienst DDR 42: 71-73.

Demond-Caulet N., Lapierre C., Jouanin L., Baumberger S., Méchin V. (2010) : *Arabidopsis* peroxidase-catalyzed copolymerization of coniferyl and sinapyl alcohols: Kinetics of an endwise process. *Phytochemistry* 71: 1673-1683.

Ding X., Cao Y., Huang L., Zhao J., Xu C., Li X., Wang S. (2008): Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase Gh3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *The Plant Cell* 20: 228-240.

Dixelius C., Happstadius I., Berg G. (2005): *Verticillium* wilt on *Brassica* oil crops – a swedish perspective. *Journal of the Swedish Seed Association* 115: 36-48.

Dixon G.R. & Pegg G.F. (1972): Changes in amino acid content of tomato xylem sap following infection with strains of *Verticillium albo-atrum*. *Annals of Botany* 36:147-154.

Do C.-T., Pollet B., Thévenin J., Sibout R., Denoue D., Barrière Y., Lapierre C., Jouanin L. (2007): Both caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase 1 and caffeic acid O-methyltransferase 1 are involved in redundant functions for lignin, flavonoids and sinapoyl malate biosynthesis in *Arabidopsis*. *Planta* 226: 1117-1129.

Dubery I.A. & Slater V. (1997): Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry* 44: 1429-1434.

Dunker S. & von Tiedemann A. (2005): Zur Ertragswirkung von Pilzkrankheiten im Raps. *Raps* 23: 6-19.

Dunker S., Keunecke H., Steinbach P., von Tiedemann A. (2008): Impact of *Verticillium longisporum* on yield and morphology of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in relation to systemic spread in the plant. *Journal of Phytopathology* 156: 698-707.

Dunwell J.M., Purvis A., Khuri S. (2004): Cupins: the most functionally diverse protein superfamily? *Phytochemistry* 65: 7-17.

Ebbole D.J. (2007): *Magnaporthe* as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 45: 437-456.

Ehlting J., Mattheus N., Aeschliman D.S., Li E., Hamberger B., Cullis I.F., Zhuang J., Kaneda M., Mansfield S.D., Samuels L., Ritland K., Ellis B.E., Bohlmann J., Douglas C.J. (2005): Global transcript profiling of primary stems from *Arabidopsis thaliana* identifies candidate genes for missing links in lignin biosynthesis and transcriptional regulators of fiber differentiation. *The Plant Journal* 42: 618-640.

El-Bebany A.F., Rampitsch C., Daayf F. (2010): Proteomic analysis of the phytopathogenic soilborne fungus *Verticillium dahliae* reveals differential protein expression in isolates that differ in aggressiveness. *Proteomics* 10: 289-303.

Endo S., Pesquet E., Yamaguchi M., Tashiro G., Sato M., Toyooka K., Nishikubo N., Udagawa-Motose M., Kubo M., Fukuda H., Demura T. (2009): Identifying new components participating in the secondary cell wall formation of vessel elements in *Zinnia* and *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 1155-1165.

Escalante-Pérez M., Lautner S., Nehls U., Selle A., Teubner M., Schnitzler J.-P., Teichmann T., Fayyaz P., Hartung W., Polle A., Fromm J., Hedrich R., Ache P. (2009): Salt stress affects xylem differentiation of grey poplar (*Populus x canescens*). *Planta* 229: 299-309.

Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P., von Tiedemann A. (2007): Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* 118: 259-274.

Eynck C., Koopmann B., Karlovsky P., von Tiedemann A. (2009): Internal resistance in winter oilseed rape inhibits systemic spread of the vascular pathogen *Verticillium longisporum*. *Phytopathology* 99: 802-811.

Fahleson J., Lagercrantz U., Hu Q., Steventon L.A., Dixelius C. (2003): Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* 109: 361-371.

Felle H.H., Herrmann A., Hückelhoven R., Kogel K.-H. (2005): Root-to-shoot signalling: apoplastic alkalinization, a general stress response and defence factor in barley (*Hordeum vulgare*). *Protoplasma* 227: 17-24.

- Ferrari S., Vairo D., Ausubel F.M., Cervone F., de Lorenzo G. (2003): Tandemly duplicated *Arabidopsis* genes that encode polygalacturonase-inhibiting proteins are regulated coordinately by different signal transduction pathways in response to fungal infection. *The Plant Cell* 15: 93-106.
- Filipowicz W. (2005): RNAi: the nuts and bolts of the RISC machine. *Cell* 122: 17-20.
- Flick J.S. & Johnston M. (1990): Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* 10: 4757-4769.
- Flörl (2007): Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum* in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Floerl S., Druebert C., Majcherczyk A., Karlosky P., Kües U., Polle A. (2008): Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology* 8: 129.
- Floerl S., Druebert C., Aroud H.I., Karlovsky P., Polle A. (2010): Disease symptoms and mineral nutrition in *Arabidopsis thaliana* in response to *Verticillium longisporum* VL43 infection. *Journal of Plant Pathology* 92: 695-702.
- Fradin E.F. & Thomma B.P.H.J. (2006): Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7: 71-86.
- Fraser C.M., Rider L.W., Chapple C. (2005): An expression and bioinformatics analysis of the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiology* 138: 1136-1148.
- Fukuda H. & Komamine A. (1980): Establishment of an experimental system for the tracheary element differentiation from single cells isolated from the mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Physiology* 65: 57-60.
- Fukuda H. (2004): Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5: 379-391.
- Galanopoulos W. & Triebe M.T. (1974): Conidial survival of *V. dahliae*. *Transactions of the British Mycological Society* 63: 85-91.

Gancedo J.M. (1998): Yeast carbon catabolite expression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62: 334-361.

Gao X., Wheeler T., Li Z., Kenerley C.M., He P., Shan L. (2011): Silencing GhNDR1 and GhMKK2 compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt. *The Plant Journal*, Online-Erstaussage, doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04491.x.

Gayoso C., Pomar F., Novo-Uzal E., Merino F., Martínez de Iláduya Ó. (2010): The *Ve*-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H₂O₂, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biology* 10: 232.

Giniger E., Varnum S.M., Ptashne M. (1985): Specific DNA-binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* 40: 767-774.

Godfrey D., Able A.J., Dry I.B. (2007): Induction of a grapevine germin-like protein (*VvGLP3*) gene is closely linked to the site of *Erysiphe necator* infection: A possible role in defense? *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1112-1125.

Godoy G., Steadman J.R., Dickman M.B., Dam R. (1990): Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 37: 179-191.

Gold J. & Robb J. (1995): The role of the coating response in Craigella tomatoes infected with *Verticillium dahliae*, races 1 and 2. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 141-157.

Gold J., Lee B., Robb J. (1996): Colonization of tomatoes by *Verticillium dahliae*: determinative phase II. *Canadian Journal of Botany* 74: 1279-1288.

Gomez-Gomez L. & Boller T. (2002): Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* 7: 251-256.

Gómez-Gómez L., Rubio-Moraga A., Ahrazem O. (2011): Molecular cloning and characterisation of a pathogenesis-related protein CsPR10 from *Crocus sativus*. *Plant Biology* 13: 297-303.

Gordee R.S. & Porter C.L. (1985): Structure, germination, and physiology of microsclerotia of *Verticillium albo-atrum*. *Physiological Plant Pathology* 27: 109-118.

Gordon T.R., Kirkpatrick S.C., Hansen J., Shaw D.V. (2006): Response of strawberry genotypes to inoculation with isolates of *Verticillium dahliae* differing in host origin. *Plant Pathology* 55: 766-769.

Gresshoff P.M. & Doy C.H. (1974): Derivation of haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 37: 132-141.

Guénin S., Mauriad M., Pelloux J., Van Wuytswinkel O., Bellini C., Gutierrez L. (2008): Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systemic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of Experimental Botany* 60: 487-493.

Günzelmann H. & Paul V.H. (1990): Zum Auftreten und zur Bedeutung der *Verticillium*-Welke an Raps in der Bundesrepublik Deutschland in 1989. *Raps* 8: 23-25.

Häffner E., Karlovsky P., Diederichsen E. (2010): Genetic and environmental control of the *Verticillium* syndrome in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology* 10: 235.

Hanselle T., Ichinoseb Y., Barz W. (2001): Biochemical and molecular biological studies on infection (*Ascochyta rabiei*)-induced thaumatin-like proteins from chickpea plants (*Cicer arietinum* L.). *Zeitschrift für Naturforschung C* 56: 1095–1107.

Happstadius I., Ljungberg A., Kristiansson B., Dixelius C. (2003): Identification of *Brassica oleracea* germplasm with improved resistance to *Verticillium* wilt. *Plant Breeding* 122: 30-34.

Harling R., Taylor G.S, Charlton W.A. (1984): Xylem vessel regeneration in carnation in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Netherland Journal of Plant pathology* 90: 173-176.

Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A. (2000): DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination. *Genome Research* 10: 1788-1795.

Heale J.B. (2000): Diversification and speciation in *Verticillium* – An overview. In: *Advances in Verticillium research and disease management*. Tjamos E.C., Rowe R.C., Heale J.B., Fravel D.R. (eds.), St. Paul, Minnesota, APS Press: 175-177.

Heale J. & Karapapa V.K. (1999): The *Verticillium* threat to Canada's major oilseed crop: *Canola*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 1-7.

Heinz R., Lee S.W., Saparno A., Nazar R.N., Robb J. (1998): Cyclical systemic colonization in *Verticillium*-infected tomato. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 385-396.

Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1992): Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Biotechnology* 24: 377-381.

Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., Blackwell M., Cannon P.F., Eriksson O.E., Huhndorf S., James T., Kirk P.M., Lücking R., Lumbsch H., Lutzoni F., Matheny P.B., McLaughlin D.J., Powell M.J., Redhead S., Schoch C.L., Spatafora J.W., Stalpers J.A., Vilgalys R., Aime M.C., Aptroot A., Bauer R., Begerow D., Benny G.L., Castlebury L.A., Crous P.W., Dai Y.C., Gams W., Geiser D.M., Griffith G.W., Gueidan C., Hawksworth D.L., Hestmark G., Hosaka K., Humber R.A., Hyde K.D., Ironside J.E., Kõljalg U., Kurtzman C.P., Larsson K.H., Lichtwardt R., Longcore J., Miadlikowska J., Miller A., Moncalvo J.M., Mozley-Standridge S., Oberwinkler F., Parmasto E., Reeb V., Rogers J.D., Roux C., Ryvarden L., Sampaio J.P., Schüssler A., Sugiyama J., Thorn R.G., Tibell L., Untereiner W.A., Walker C., Wang Z., Weir A., Weiss M., White M.M., Winka K., Yao Y.J., Zhang N. (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research* 111: 509-547.

Hilaire E., Young S.A., Willard L.H., McGee J.D., Sweat T., Chittoor J.M., Guikema J.A., Leach J.E. (2001): Vascular defense responses in rice: Peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem cell wall thickening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1411-1419.

Huisman O.C. (1982): Interrelations of root growth dynamics to epidemiology of rootinvading fungi. *Annual Review of Phytopathology* 20: 303-327.

Irshad M., Canut H., Borderies G., Pont-Lezica R., Jamet E. (2008): A new picture of cell wall protein dynamics in elongating cells of *Arabidopsis thaliana*: Confirmed actors and newcomers. *BMC Plant Biology* 8: 94.

Isaac I. (1957): *Verticillium* wilt of Brussels sprout. *Annals of Applied Biology* 45: 276-283.

Iven (2009): Transkriptomanalyse der *Arabidopsis*-Wurzel nach Infektion mit dem pilzlichen Pathogen *Verticillium longisporum* und Identifizierung von transkriptionellen Regulatoren der Pathogenantwort. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Jach G., Gornhardt B., Mundy J., Logemann J., Pinsdorf P., Leah R., Schell J., Maas C. (1995): Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal* 8: 97-109.

- Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W. (1987): GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901-3907.
- Johansson A., Goud J.-K., Dixelius C. (2006a): Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *European Journal of Plant Pathology* 114: 139-149.
- Johansson A., Staal J., Dixelius C. (2006b): Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on NDR1, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 958-969.
- Jøhnk N., Hietala A.M., Fossdal C.G., Collinge D.B., Newman M.-A. (2005): Defense-related genes expressed in Norway spruce roots after infection with the root rot pathogen *Ceratobasidium bicorne* (anamorph: *Rhizoctonia* sp.). *Tree Physiology* 25: 1533-1543.
- Jones J.D.G. & Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Bartel B. (2006): MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53.
- Joosten M.H.A.J. & De Wit P.J.G.M. (1989): Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases. *Plant Physiology* 89: 945-951.
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., Heale J.B. (1997): Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* 101: 1281-1294.
- Karapapa V.K. & Typas M.A. (2001): Molecular characterization of the host-adapted pathogen *Verticillium longisporum* on the basis of a group-I intron found in the nuclear SSU-rRNA gene. *Current Microbiology* 42: 217-224.
- Kehr J., Buhtz A., Giavalisco P. (2005): Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*. *BMC Plant Biology* 5: 11.
- Kim H.J. & Triplett B.A. (2004): Cotton fiber germin-like protein. I. Molecular cloning and gene expression. *Planta* 218: 516-524.

- Kim H.J., Pesacreta T.C., Triplett B.A. (2004): Cotton-fiber germin-like protein. II: Immunolocalization, purification, and functional analysis. *Planta* 218: 525–535.
- Kitajima M. & Butler W.L. (1975): Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochemica et Biophysica Acta* 376: 201-204.
- Klimes A. & Dobinson K.F. (2006): A hydrophobin gene, VDH1, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 43: 283-94.
- Knecht K., Seyffarth M., Desel C., Thureau T., Sherameti I., Lou B., Oelmüller R., Cai D. (2010): Expression of BvGLP-1 encoding a germin-like protein from sugar beet in *Arabidopsis thaliana* leads to resistance against phytopathogenic fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23: 446-457.
- Koncz C. & Schell J. (1986): The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue specific expression chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular & General Genetics* 204: 383-396.
- Krüger W. (1989): Untersuchungen zur Verbreitung von *Verticillium dahliae* Kleb. und anderen Krankheits- und Schaderregern bei Raps in der Bundesrepublik Deutschland. *Nachrichtenblatt Deutscher Pflanzenschutzdienst* 41: 49-56.
- Kruse J., Hetzger I., Mai C., Polle A., Rennenberg H. (2003): Elevated pCO₂ affects N metabolism of young poplar plants (*Populus tremula* x *P. alba*) differently at deficient and sufficient N supply. *New Phytologist* 157: 65-81.
- Kubo M., Udagawa M., Nishikubo N., Horiguchi G., Yamaguchi M., Ito J., Mimura T., Fukuda H., Demura T. (2005): Transcription switches for protoxylem and metaxylem vessel formation. *Genes Development* 19: 1855-1860.
- Lamb C. & Dixon R.A. (1997): The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48: 251-275.
- Lamanda A., Zahn A., Röder D., Langen H. (2004): Improved ruthenium (II) tris (bathophenanthroline disulfonate) staining and destaining protocol for a better signal-to-background ratio and improved baseline resolution. *Proteomics* 4: 599-608.

- Laemmli U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Le Gouill C., Parent J.-L., Rola-Pleszczynski M., Stankova J. (1994): Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry* 219: 164.
- Lee R.-H., Hsu J.-H., Huang H.-J., Lo S.-F., Chen S.-C. G. (2009): Alkaline α -galactosidase degrades thylakoid membranes in the chloroplast during leaf senescence in rice. *New Phytologist* 184: 596-606.
- Lee S.W., Nazar R.N., Powell D.A., Robb J. (1992): Reduced PAL gene suppression in *Verticillium*-infected resistant tomatoes. *Plant Molecular Biology* 18: 345-352.
- Lichtenthaler H.K. & Wellburn A.R. (1983): Determination of total carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 603: 591-592.
- Lipka V., Dittgen J., Bednarek P., Bhat R., Wiermer M., Stein M., Landtag J., Brandt W., Rosahl S., Scheel D., Llorente F., Molina A., Parker J., Somerville S., Schulze-Lefert P. (2005): Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science* 310: 1180-1183.
- Little D., Gouhier-Darimont C., Bruessow F., Reymond P. (2007): Oviposition by Pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 784-800.
- López-Milán A.F., Morales F., Abadía A., Abadía J. (2000): Effects of iron deficiency on the composition of the leaf apoplastic fluid and xylem sap in sugar beet. Implications for iron and carbon transport. *Plant Physiology* 124: 873-884.
- Lou Y. & Baldwin I.T. (2006): Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. *Plant Physiology* 140: 1126-1136.
- Manosalva P.M., Davidson R.M., Liu B., Zhu X., Hulbert S.H., Leung H., Leach J.E. (2009): A germin-like protein gene family functions as a complex quantitative trait locus conferring broad-spectrum disease resistance in rice. *Plant Physiology* 149: 286-296.
- Mansoori B. & Smith C.J. (2005): Elicitation of ethylen by *Verticillium albo-atrum* in potato. *Journal of Phytopathology* 153: 143-149.

- Mauch F., Mauch-Mani B., Boller T. (1988): Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiology* 88: 936-942.
- Maxwell K. & Johnson G.N. (2000): Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- McDonell M.W., Simon M.N., Studier F.W. (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *Journal of Molecular Biology* 110: 119-146.
- McFadden H.G., Chapple R., de Feyter R., Dennis E. (2001): Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 58: 119-131.
- Melotto M., Underwood W., Jessica K., Kinya N., He S.Y. (2006): Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. *Cell* 126: 969-980.
- Membré N., Berna A., Neutelings G., David A., David H., Staiger D., Vásquez J.S., Raynal M., Delseny M., Bernier F. (1997): cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three *Arabidopsis* genes for germin/oxalate oxidase-like proteins. *Plant Molecular Biology* 35: 459-469.
- Membré N., Bernier F., Staiger D., Berna A. (2000): *Arabidopsis thaliana* germin-like proteins: common and specific features point to a variety of functions. *Planta* 211: 345-354.
- Menzies J.D. & Griebel G.E. (1967): Survival and saprophytic growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. *Phytopathology* 57: 703-709.
- Millar D.J., Whitelegge J.P., Bindschedler L.V., Rayon C., Boudet A.-M., Rossignol M., Borderies G., Bolwell G.P. (2009): The cell wall and secretory proteome of a tobacco cell line synthesising secondary wall. *Proteomics* 9: 2355-2372.
- Minic Z., Jamet E., San-Clemente H., Pelletier S., Renou J.-P., Rihouey C., Okinyo D.P.O., Proux C., Lerouge P., Jouanin L. (2009): Transcriptomic analysis of *Arabidopsis* developing stems: a close-up on cell wall genes. *BMC Plant Biology* 9: 6.

- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 19613-19618.
- Mohr P.G. & Cahill D.M. (2007): Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Functional & Integrative Genomics* 7: 181-191.
- Mol L., Scholte K., Vos J. (1995): Effects of crop rotation and removal of crop debris on the soil population of two isolates of *Verticillium dahliae*. *Plant Pathology* 44: 1070-1074.
- Mol L. & Scholte K. (1995): Formation of microsclerotia of *Verticillium dahliae* Kleb. on various plant parts of two potato cultivars. *Potato Research* 38: 143-150.
- Mol L. & van Riessen H. W. (1995): Effect of plant-roots on the germination of microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *European Journal of Plant Pathology* 101: 673-678.
- Mullis K.B. & Faloona F.A. (1987): Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335-350.
- Murashige T. & Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Musgrave M.E. (2000): Realizing the potential of rapid-cycling *Brassica* as a model system for use in plant biology research. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 314-325.
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007): Development of series of Gateway binary vectors, pGWBs, for realiting efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104: 34-41.
- Nakamura S.-I., Akiyama C., Sasaki T., Hattori H., Chino M. (2008): Effect of cadmium on the chemical composition of xylem exudate from oilseed rape plants (*Brassica napus* L.). *Soil and plant nutrition* 54: 118-127.

- Narusaka Y., Narusaka M., Park P., Kubo Y., Hirayama T., Seki M., Shiraishi T., Ishida J., Nakashima M., Enju A., Sakurai T., Satou M., Kobayashi M., Shinozaki K. (2004): RCH1, a locus in *Arabidopsis* that confers resistance to the hemibiotrophic fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17: 749-762.
- Neumann M.J. & Dobinson K.F. (2003): Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 54-62.
- Ossowski S., Schwab R., Weigel D. (2008): Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* 53: 674-690.
- Pantelides I.S., Tjamos S.E., Paplomatas E.J. (2010): Ethylen perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant Pathology* 11: 191-202.
- Pedras M.S., Okanga F.I., Zaharia I.L., Khan A.Q. (2000): Phytoalexins from crucifers: synthesis, biosynthesis, and biotransformation. *Phytochemistry* 53: 161-176.
- Pedras M.S., Adio A.M., Suchy M., Okinyo D.P., Zheng Q.A., Jha M., Sarwar M.G. (2006): Detection, characterization and identification of crucifer phytoalexins using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A* 1133:172-183.
- Pegg G.F. & Brady B.L. (2002): *Verticillium* Wilts. Wallingford, UK: CAB Publishing.
- Pieterse C.M.J., Leon-Reyes A., Van der Ent S., Van Wees S.C.M. (2009): Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
- Polle A., Chakrabarti K., Schurmann W., Rennenberg H. (1990): Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiology* 94: 312-319.
- Polle A., Wieser G., Havranek W.M. (1995): Quantification of ozone influx and apoplastic ascorbate content in needles of Norway spruce trees (*Picea abies* L., Karst.) at high altitude. *Plant, Cell and Environment* 18: 681-688.
- Qu Z.-L., Zhong N.-Q., Wang H.-Y., Chen A.-P., Jian G.-L., Xia G.-X. (2006): Ectopic expression of the cotton non-symbiotic hemoglobin gene *GhHb1* triggers defense response and increases disease tolerance in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* 47: 1058-1068.

Rabilloud T., Strub J.M., Luche S., van Dorsselaer A., Lunardi J. (2001): A comparison between Sypro Ruby and ruthenium (II) tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1: 699-704.

Ramonell K., Berrocal-Lobo M., Koh S., Wan J.R., Edwards H., Stacey G., Somerville S. (2005): Loss-of-function mutations in chitin responsive genes show increased susceptibility to the powdery mildew pathogen *Erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology* 138: 1027-1036.

Ratzinger A., Riediger N., von Tiedemann A., Karlovsky P. (2009): Salicylic acid and salicylic acid glucoside in xylem sap of *Brassica napus* infected with *Verticillium longisporum*. *Journal of Plant Research* 122: 571-579.

Rep M., Dekker H.L., Vossen J.H., de Boer A.D., Houterman P.M., Speijer D., Back J.W., de Koster C.G., Cornelissen B.J.C. (2002): Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiology* 130: 904-917.

Riens B., Lohaus G., Heineke D., Heldt H.W. (1991): Amino acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiology* 97: 227-233.

Robb J., Powell D.A., Street P.F.S. (1989): Vascular coating: a barrier to colonization by the pathogen in *Verticillium* wilt of tomato. *Canadian Journal of Botany* 67: 600-607.

Roberts R.J. (1985): Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Research* 13: 165-200.

Rodríguez-López M., Baroja-Fernández E., Zanduetta-Criado A., Moreno-Bruna B., Muñoz F.J., Akazawa T., Pozueta-Romero J. (2001): Two isoforms of a nucleotide-sugar pyrophosphatase/phosphodiesterase from barley leaves (*Hordeum vulgare* L.) are distinct oligomers of hvglp1, a germin-like protein. *FEBS Letters* 490: 44-48.

Roháček K. (2002): Chlorophyll fluorescence parameters: the definitions, photosynthetic meaning, and mutual relationships. *Photosynthetica* 40: 13-29.

Rygulla W., Snowdon R.J., Eynck C., Koopmann B., von Tiedemann A., Lühs W., Friedt W. (2007): Broadening the genetic basis of *Verticillium longisporum* resistance in *Brassica napus* by interspecific hybridization. *Phytopathology* 11: 1391-1396.

- Samson F., Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Lepiniec L., Pelletier G., Caboche M., Lecharny A. (2002): FLAGdb/FST: a database of mapped flanking insertion sites (FSTs) of *Arabidopsis thaliana* T-DNA transformants. *Nucleic Acids Research* 30: 94-97.
- Sanabria N., Goring D., Nürnberger T., Dubery I. (2008): Self/nonself perception and recognition in plants: a comparison of self-incompatibility and innate immunity. *New Phytologist* 178: 503-514.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Schenk R.U. & Hildebrandt A.C. (1972): Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Canadian Journal of Botany* 50: 199-204.
- Schlesier B., Berna A., Bernier F., Mock H.-P. (2004): Proteome analysis differentiates between two highly homologous germin-like proteins in *Arabidopsis thaliana* ecotypes Col-0 and Ws-2. *Phytochemistry* 65: 1565-1574.
- Schnathorst W.C. (1981): Life cycle and epidemiology of *Verticillium*. In: Mace M.E., Bell A.A., Beckmann C.H. (Editoren): *Fungal Wilt Diseases of Plants*. Academic Press, New York, S. 81-111.
- Schneidereit A. (2005): Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des AtSUC2-Promotors beim Sink-Source-Übergang im Blatt und Analyse der Gene AtINT2 und AtINT4. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg.
- Scholander P.F., Bradstreet E.D., Hemmingsen E.A., Hammel H.A.T. (1965): Sap pressure in vascular plants, negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 148: 339-346.
- Scholl R.L., May S.T., Ware D.H. (2000): Seed and molecular resources for *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124: 1477-1480.
- Schopfer P. (1989): Experimentelle Pflanzenphysiologie. Band 2: Einführung in die Anwendungen. Springer, Berlin, S. 39-50.

Schreiber L.R. & Green R.J. (1963): Effects of root exudates on germination of conidia and microsclerotia of *Verticillium albo-atrum* inhibited by the soil fungistatic principle. *Phytopathology* 53: 260-264.

Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D. (2006): Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18: 1121-1133.

Schweizer P., Christoffel A., Dudler R. (1999): Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *The Plant Journal* 20: 541-552.

Schwessinger B. & Zipfel C. (2008): News from the frontline: recent insights to PAMP-triggered immunity in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 389-395.

Sela-Buurlage M.B., Ponstein A.S., Vloemans S.A., Melchers L.S., Van den Elzen P.J.M., Cornelissen B.J.C. (1993): Only specific tobacco (*Nicotinia tabacum*) chitinases and β -1,3-glucanases exhibit antifungal activity. *Plant Physiology* 101: 857-863.

Sharon N. & Lis H. (2004): History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53-62.

Shenoy S.R., Kameshwari M.N., Swaminathan S., Gupta M.N. (2006): Major antifungal activity from the bulbs of Indian squill *Urginea indica* is a chitinase. *Biotechnological Progress* 22: 631-637.

Shetty N.P., Jensen J.D., Knudsen A., Finnie C., Geshi N., Blennow A., Collinge D.B., Lyngs Jørgensen H.J. (2009): Effects of β -1,3-glucan from *Septoria tritici* on structural defence responses in wheat. *Journal of Experimental Botany* 60: 4287-4300.

Siebrecht S. (2000): Untersuchungen zur Dynamik des Nährstofftransports im Xylem von Pappeln unter besonderer Berücksichtigung der Stickstoffversorgung des Sprosses. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Singh S., Braus-Stromeier S.A., Timpner C., Tran V.T., Lohaus G., Reusche M., Knüfer J., Teichmann T., von Tiedemann A., Braus G. (2010): Silencing of Vlaro2 for chorismate synthase revealed that the phytopathogen *Verticillium longisporum* induces the cross-pathway control in the xylem. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1961-1976.

- Smit F. & Dubery I.A. (1997): Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochemistry* 44: 811-815.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C. (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Smith H.O. & Wilcox K.W. (1970): A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae* I. Purification and general properties. *Journal of Molecular Biology* 28: 379-391.
- Solla A. & Gil L. (2002): Xylem vessel diameter as a factor in resistance of *Ulmus minor* to *Ophiostoma novo-ulmi*. *Forest Pathology* 32: 123-134.
- Southern E.M. (1979): Measurement of DNA length by gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 100: 319-323.
- Soyano T., Thitamadee S., Machida Y., Chua N.-H. (2008): Asymmetric leaves 2 - like 19/Lateral organ boundaries domain 30 and ASL20/LBD18 regulate tracheary element differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20: 3359-3373.
- Spoel S.H. & Dong X. (2008): Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell, Host and Microbe* 3: 348-351.
- Staiger D., Apel K., Trepp G. (1999): The *Atger3* promoter confers circadian clock-regulated transcription with peak expression at the beginning of the night. *Plant Molecular Biology* 40: 873-882.
- Stark C. (1961): Das Auftreten der *Verticillium*-Tracheomykosen in Hamburger Gartenbau-Kulturen. *Gartenbauwissenschaft* 26: 493-528.
- Steventon L.A., Okori P., Dixelius C. (2001): An investigation of the susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to isolates of two species of *Verticillium*. *Journal of Phytopathology* 149: 395-401.
- Subramanian S., Cho U.-H., Keyes C., Yu O. (2009): Distinct changes in soybean xylem sap in response to pathogenic and symbiotic microbe interactions. *BMC Plant Biology* 9: 119.

- Svenson C.H. & Lerenius C. (1987): An investigation on the effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) on oilseed rape. Working group integrated control in oilseed rape. IOBC/WPRS (X/4): 30-34.
- Takken F.L.W. & Tameling W.I.L. (2009): To nibble at plant resistance proteins. *Science* 324: 744-746.
- Talboys P.W. (1958): Association of tylosis and hyperplasia of the xylem with vascular invasion of the hop by *Verticillium albo-atrum*. *Transactions of the British Mycological Society* 41: 249-260.
- Tao Y., Xie Z., Chen W., Glazebrook J., Chang H.-S., Han B., Zhu T., Zou G., Katagiri F. (2003): The quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *The Plant Cell* 15: 317-330.
- Tappe H. (2008): *Verticillium longisporum* induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.
- Tena G., Asai T., Chiu W.-L., Sheen J. (2001): Plant mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 392-400.
- Thomma B.P., Nelissen I., Eggermont K., Broekaert W.F. (1999): Deficiency in phytoalexin production causes enhanced susceptibility of *Arabidopsis thaliana* to the fungus *Alternaria brassicicola*. *The Plant Journal* 19: 163-171.
- Tian J., Zhang X., Liang B., Li S., Wu Z., Wang Q., Leng C., Dong J., Wang T. (2010): Expression of Baculovirus Anti-apoptotic genes p35 and op-iap in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) enhances tolerance to *Verticillium* Wilt. *PLoS ONE* 5: e14218.
- Tjamos S.E., Flemetakis E., Paplomatas E.J., Katinakis P. (2005): Induction of resistance to *Verticillium dahliae* in *Arabidopsis thaliana* by the biocontrol agent K-165 and pathogenesis-related proteins gene expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 555-561.
- Turner S., Gallois P., Brown D. (2007): Tracheary element differentiation. *Annual Review of Plant Biology* 58: 407-433.

- Tzima A.K., Paplomatas E.J., Rauyaree P., Ospina-Giraldo M.D., Kang S. (2010): *VdSNF1*, the sucrose non-fermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell wall degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 1: 129-142.
- Udvardi M.K., Czechowski T., Scheible W.-R. (2008): Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* 7: 1736-1737.
- Użarowska A., Dionisio G., Sarholz B., Piepho H.-P., Xu M., Ingvarsdén C.R., Wenzel G., Lübberstedt T. (2009): Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling. *BMC Plant Biology* 9: 15.
- Van Esse H. P., Fradin E.F., De Groot P. J., De Wit P.J.G.M., Thomma B.P.H.J. (2009) : Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 245-258.
- Van Etten H.D., Mansfield J.W., Bailey J.A., Farmer E.E. (1994): Two Classes of Plant Antibiotics: Phytoalexins versus "Phytoanticipins". *The Plant Cell* 6: 1191-1192.
- Van Loon L.C., Rep M., Pieterse C. M. J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44: 135-162.
- Vanneste S. & Friml J. (2009): Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* 136: 1005-1016.
- Veronese P., Narasimhan M.L., Stevenson R.A., Zhu J.-K., Weller S.C., Subbarao K.V., Bressan R.A. (2003): Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 35: 574-587.
- Wang D., Pajerowska-Mukhtar K., Hendrickson Culler A., Dong X. (2007): Salicylic acid inhibits pathogen growth in plants through repression of the auxin signaling pathway. *Current Biology* 17: 1784-1790.
- Wang J.-Y., Cai Y., Gou J.-Y., Mao Y.-B., Xu Y.-H., Jiang W.-H., Chen X.-Y. (2004): VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 4989-4995.

Wang Q., Li F., Zhang X., Zhang Y., Hou Y., Zhang S., Wu Z. (2011): Purification and characterization of a CkTLP protein from *Cynanchum komarovii* seeds that confers antifungal activity. PLoS ONE 6: e16930.

West R.W., Yocum R.R., Ptashne M. (1984): *Saccharomyces cerevisiae* GALI-GALIO divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UASG. Molecular and Cellular Biology 4: 2467-2478.

White J., Chang S.Y., Bibb M.J. (1990): A cassette containing the bar gene of *Streptomyces hygroscopicus*: a selectable marker for plant transformation. Nucleic Acids Research 18: 1062.

Wilhelm S. (1955): Longevity of the *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field. Phytopathology 45: 180-181.

Williams P.H. & Hill C.B. (1986): Rapid-cycling populations of *Brassica*. Science 232: 1385-1389.

Williams J.S. & Cooper R.M. (2003): Elemental sulphur is produced by diverse plant families as a component of defence against fungal and bacterial pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology 63: 3-16.

Williams J., Hall S.A., Hawkesford M.J., Beale M.H., Cooper R.M. (2002): Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen. Plant Physiology 128: 150-159.

Wong J.H., Ng T.B., Cheung R.C.F., Ye X.J., Wang H.X., Lam S.K., Lin P., Chan Y.S., Fang E.F., Ngai P.H.K., Xia L.X., Ye X.Y., Jiang Y., Liu F. (2010): Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. Applied Microbiology and Biotechnology 87: 1221-1235.

Woo E.-J., Dunwell J.M., Goodenough P.W., Marvier A.C., Pickersgill R.W. (2000): Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. Nature Structural Biology 7: 1036-1040.

Young S.A., Guo A., Guikema J.A., White F.F., Leach J.E. (1995): Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Plant Physiology 107: 1333-1341.

Zeise K. & Seidel D. (1990): Zur Entwicklung und Schadwirkung der *Verticillium*-Welkekrankheit am Winterraps. Raps 8: 20-22.

Zeise K. & von Tiedemann A. (2001): Morphological and physiological differentiation among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *V. longisporum*. Journal of Phytopathology 149: 469-475.

Zeise K. & von Tiedemann A. (2002a): Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. Journal of Phytopathology 150: 112-119.

Zeise K. & von Tiedemann A. (2002b): Application of RAPD-PCR for virulence type analysis within *Verticillium dahliae* and *Verticillium longisporum*. Journal of Phytopathology 150: 557-563.

Zielenski D. & Sadowski C. (1995): A preliminary study on *Verticillium dahliae* Kleb. in winter oilseed rape in Poland. In: Murphy D. (Editor): Proceedings of the 9th International Rapeseed Conference, Cambridge. 4-7 July 1995. GcIRC, Cambridge, UK, S. 649-651.

Zhang B., Ramonell K., Somerville S., Stacey G. (2002): Characterization of early, chitin-induced gene expression in *Arabidopsis*. Molecular Plant-Microbe Interactions 15: 963-970.

Zhou Z. (2000): Untersuchungen zum Blatt- und Wurzelmetabolismus sowie zum Phloem- und Xylemtransport in Zusammenhang mit der Stickstoff-Effizienz bei Raps (*Brassica napus* L.). Dissertation, Georg-August-Universität Göttingen.

Zhou L., Hu Q., Johansson A., Dixelius C. (2006): *Verticillium longisporum* and *Verticillium dahliae*: infection and disease in *Brassica napus*. Plant Pathology 55: 137-144.

Zimmermann G., Bäumlein H., Mock H.-P., Himmelbach A., Schweizer P. (2006): The multigene family encoding germin-like proteins of barley. Regulation and function in basal host resistance. Plant Physiology 142: 181-192.

Anhang

Anhang A: Einfluss einer Infektion mit *Verticillium longisporum* auf die Aktivität des Photosystems II in *Arabidopsis thaliana*

Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mit einem pulsmoduliertem Fluoreszenzmesser (MINI-PAM, Walz, Effeltrich, Deutschland) zur Charakterisierung des Einflusses von *V. longisporum* auf das Photosystem II offenbarten eine verringerte Quantenausbeute („Yield“) bei infizierten Pflanzen gegenüber Kontrollen (Floerl *et al.* 2010). Diese Unterschiede waren jedoch sehr gering. Anhand der Abbildung der Chlorophyllfluoreszenz mit einem IMAGING-PAM (Walz, Effeltrich, Deutschland) konnte gezeigt werden, dass bei heterogen im Pflanzengewebe auftretenden Pathogenen Beeinträchtigungen der Photosynthese lokal beschränkt sein können (Berger *et al.* 2004, Berger *et al.* 2007). Da auch *V. longisporum* als vaskuläres Pathogen in der biotrophen Phase seines Lebenszyklus nur auf einen bestimmten Teil innerhalb der Pflanze begrenzt vorkommt, wurden die Messungen der Chlorophyllfluoreszenz mit einem IMAGING-PAM wiederholt. Dazu wurden infizierte und nicht infizierte, im Kurztag angezogene *Arabidopsis*-Pflanzen wöchentlich gemessen. Hierbei wurde an 5 Pflanzen die Chlorophyllfluoreszenz zunächst nach Dunkeladaption detektiert. Anschließend wurde die Lichtintensität stufenweise über 20, 50, 100 und 500 bis 1000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ erhöht und die Messung wiederholt.

Die maximale Quantenausbeute im Dunkeln war ab 14 dpi bei infizierten Pflanze geringer als bei nicht infizierten Pflanzen (Abb. 42). Bei einer Lichtzufuhr von 20 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ konnte dagegen bei den Kontrollpflanzen bei allen Zeitpunkten eine signifikant geringere Quantenausbeute gegenüber infizierten Pflanzen detektiert werden. Bei Erhöhung der Lichtzufuhr war wiederum die Quantenausbeute der infizierten Pflanze ab 14 dpi tendenziell geringer als die der Kontrollen. Bei einer Lichtintensität von 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ war diese Verringerung signifikant.

Bei Betrachtung der Verteilung der Quantenausbeute anhand von Falschfarbenbildern (Abb. 43) werden keine weiteren Unterschiede aufgrund von dem putativ heterogenen Auftreten von *V. longisporum* innerhalb der Blattrosette erkennbar.

Abb. 42: Quantenausbeute von infizierten (rote Symbole) und nicht infizierten Pflanzen (schwarze Symbole) 7 dpi (A), 14 dpi (B), 21 dpi (C) und 28 dpi (D). Aufgetragen sind Mittelwerte mit Standardabweichung der Quantenausbeute ($n = 5$) in Abhängigkeit der Lichtintensität. Signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) zwischen den unterschiedlich behandelten Pflanzen sind durch Sterne gekennzeichnet.

Abb. 43: Messung der Quantenausbeute an infizierten (+ VL 43, rechts) und nicht infizierten Pflanzen (Kontrollen, links) 28 dpi. Abgebildet sind Falschfarbenbilder zur Darstellung der Quantenausbeute nach Dunkeladaption (A), bei Lichtintensitäten von $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (B), $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (C), $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (D), $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (E) und $1000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (F) sowie Fotos der verwendeten Pflanzen (G). Gezeigt werden 2 repräsentative Pflanzen jeder Behandlung.

Anhang B: Zusätzliche Bilder der GUS-Reporterpflanzen, Linie 3

Abb. 44: Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität in vegetativen Pflanzenteilen zur Analyse der Expression von *glp3* in mock inokulierten (A, C und E) und infizierten Pflanzen (B, D und F). Abgebildet sind Fotos repräsentativer junger Pflanzen der Linie 3 1 dpi (A und B) und detaillierte Aufnahmen von Blättern verschiedener Entwicklungsstadien 3 dpi (C und D; links: jeweils eines der ältesten Blätter, rechts: jüngstes Blatt) und 7 dpi (E und F) nach 3stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 0,5 cm.

Abb. 45: Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität 21 dpi. Abgebildet sind Blätter repräsentativer Pflanzen der Linie 3 nach Infektion mit *V. longisporum* (rechts) und in uninfizierten Kontrollen (links) nach 3stündiger Inkubation in der Färbelösung. Der Längenstandard entspricht 0,5 cm.

Anhang C: Querschnitte der VND7-Repressorlinien

Abb. 46: Leitgewebe von Blättern mock inokulierter (A und C) und infizierter (B und D) Pflanzen des Wildtyps Col-0 (A und B) sowie der Linie pPer21::VND7-SRDX (C und D) im Querschnitt. Die Proben wurden in Stryrol-Methacrylat eingebettet. Die 1 μm dicken Schnitte wurden mit Toluidinblau angefärbt. Lignifizierte Zellwände sind daher türkisblau, während Cytoplasma und unverholzte Primärwände durch eine violette Farbe gekennzeichnet sind. Bei den Bildern der infizierten Pflanzen des Wildtyp (B) sind die putativ transdifferenzierten Zellen zu sehen (Pfeile). In den infizierten Pflanzen der VND-Repressorlinie (D) fehlen diese Zellen. Xy: Xylem, Ph: Phloem, K: Kambiumzone. Die Längenstandards entsprechen 50 μm .

Anhang D: Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

Auf den sich anschließenden Seiten sind folgende Veröffentlichungen zu finden:

Floerl S., **Druebert C.**, Majcherczyk A., Karlovsky P., Kües U., Polle A. (2008): Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. BMC Plant Biology 8: 129.

Floerl S., **Druebert C.**, Aroud H.I, Karlovsky P., Polle A. (2010): Disease symptoms and mineral nutrition in *Arabidopsis thaliana* in response to *Verticillium longisporum* VL43 infection. Journal of Plant Pathology 92 (3): 695 – 702.

Research article

Open Access

Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptomsSaskia Floerl¹, Christine Druebert¹, Andrzej Majcherczyk², Petr Karlovsky³, Ursula Kües² and Andrea Polle^{*1}

Address: ¹Büsgen-Institut, Abteilung: Forstbotanik und Baumphysiologie, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Germany, ²Büsgen-Institut, Abteilung: Molekulare Holzbiotechnologie und technische Mykologie, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Germany and ³Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung: Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen, Germany

Email: Saskia Floerl - sfloerl@gwdg.de; Christine Druebert - cdruebe@gwdg.de; Andrzej Majcherczyk - amajche@gwdg.de; Petr Karlovsky - pkarlov@gwdg.de; Ursula Kües - ukues@gwdg.de; Andrea Polle* - apolle@gwdg.de

* Corresponding author

Published: 18 December 2008

Received: 26 July 2008

BMC Plant Biology 2008, 8:129 doi:10.1186/1471-2229-8-129

Accepted: 18 December 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/129>

© 2008 Floerl et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: *Verticillium longisporum* is one of the most important pathogens of *Brassicaceae* that remains strictly in the xylem during most stages of its development. It has been suggested that disease symptoms are associated with clogging of xylem vessels. The aim of our study was to investigate extracellular defence reactions induced by *V. longisporum* in the xylem sap and leaf apoplast of *Brassica napus* var. *napus* in relation to the development of disease symptoms, photosynthesis and nutrient status.

Results: *V. longisporum* (strain VL43) did not overcome the hypocotyl barrier until 3 weeks after infection although the plants showed massive stunting of the stem and mild leaf chlorosis. During this initial infection phase photosynthetic carbon assimilation, transpiration rate and nutrient elements in leaves were not affected in VL43-infected compared to non-infected plants. Proteome analysis of the leaf apoplast revealed 170 spots after 2-D-protein separation, of which 12 were significantly enhanced in response to VL43-infection. LS-MS/MS analysis and data base searches revealed matches of VL43-responsive proteins to an endochitinase, a peroxidase, a PR-4 protein and a β -1,3-glucanase. In xylem sap three up-regulated proteins were found of which two were identified as PR-4 and β -1,3-glucanase. Xylem sap of infected plants inhibited the growth of *V. longisporum*.

Conclusion: *V. longisporum* infection did not result in drought stress or nutrient limitations. Stunting and mild chlorosis were, therefore, not consequences of insufficient water and nutrient supply due to VL43-caused xylem obstruction. A distinct array of extracellular PR-proteins was activated that might have limited *Verticillium* spreading above the hypocotyl. In silico analysis suggested that ethylene was involved in up-regulating VL43-responsive proteins.

Background

Verticillium longisporum colonizes the xylem of *Brassicaceae* [1] using carbohydrates, amino acids, and minerals present in the xylem sap as nutrient source. Xylem sap of oilseed rape also contains a vast spectrum of proteins including many enzymes putatively involved in defence; e.g. a disease resistance response protein (PR-1), chitinases (class I, IV), germin-like proteins (subfamily 1) and different peroxidases [2]. A comparison of various species suggested that xylem sap composition was conserved across species [3].

Despite the presence of constitutive defence systems in the extracellular compartment, xylem-invading and inhabiting fungi provoke additional reactions. For example, analyses of tomato xylem sap after infection with the xylem-colonising fungus *Fusarium oxysporum* revealed novel proteins including PR-1, PR-2, and PR-5 [4]. In rice, infection with the vascular pathogen *Xanthomonas oryzae* induced the accumulation of a basic peroxidase in the apoplast of mesophyll cells as well as in xylem vessels [5]. Vascular pathogens such as *Cladosporium fulvum* and *Septoria tritici* affected the leaf apoplast by increasing chitinases and 1,3- β -glucanases or a germin-like protein with activity of a protease-inhibitor, respectively [6,7]. However, the example of *Cladosporium fulvum*, which inactivates chitinases by Avr4 and thereby, protects its cell walls from degradation shows that vascular fungi have developed specific means to disarm plant defences [8].

Recently, proteomic approaches have been introduced to obtain a comprehensive overview of proteins responsive in plants to pathogen attack. The apoplast, which includes the xylem sap, has received specific attention because it is the first compartment where recognition and defence may take place. When plants or cell cultures were challenged with pathogens or elicitors pronounced changes in the extracellular proteome were found such as accumulation of novel protease inhibitors, stimulation of defence proteins, modification in cell proteins, etc. [9-16]. *V. longisporum* is one of the most important diseases of oilseed rape (*Brassica napus* var. *oleifera*) locally causing yield losses in the range of 10 to 50% [17]. Activation of apoplastic defences has not been characterized in this species, although knowledge on these interactions may help to devise strategies for improving plant resistance.

Verticillium-infections have frequently been described as wilting disease [18]. For example, *V. dahliae* infection resulted in partial vessel occlusion by deposits secreted by neighbouring parenchyma cells [19]. These obstructions may delay movement of the fungus physically and also because they may contain antifungal components, e.g., elemental sulphur [19-21]. Since these obstructions can be expected to affect water and nutrient transport, typical

disease symptoms such as wilting, stunting, chlorosis and premature senescence, have been suggested to occur as consequences of water limitations and insufficient nutrient supply [22]. However, clear-cut evidence for this sequence of disease symptoms is still lacking for the *B. napus* – *V. longisporum* pathosystem. Since nutrient limitations and water stress can also affect the plant defence system, it is necessary to characterize the physiological stage of infected and non-infected to plants to distinguish between responses evoked by changes in the plant conditions and those related to fungal infection.

The major aim of our study was to identify proteins activated in response to *V. longisporum* in the leaf apoplast and xylem sap of *Brassica napus* and to investigate whether changes in the composition of extracellular fluid were efficient in attenuating fungal proliferation. We have characterized these responses in relation to the development of disease symptoms, photosynthetic electron transport, gas exchange and nutrient status.

Results

Verticillium-induced stunting is not caused by decline in photosynthetic gas exchange or plant nutrition

Stunting of the stem became apparent about 14 days after inoculation of oilseed rape plants with VL43 (Fig. 1). At 21 dpi (days post infection), the infected plants were about two times shorter than non-infected plants and showed initial chlorotic symptoms on leaves but no wilting (Fig. 1A, B). During these initial stages of infection stem biomass production was more inhibited than that of leaves or roots (Fig. 2).

Photosynthetic CO₂ assimilation or transpiration were not affected in VL43-infected plants until 21dpi, indicating that the plants did not suffer from diminished water transport or stomatal limitations (Fig. 3A, B). However, the maximum quantum yield of PSII of infected plants was lower than that of non-infected plants (~20%). This was probably the result of chlorophyll loss, which was about 17% compared with non-infected plants (Fig. 4A, B). Overall, these reductions in chlorophyll and electron transport capacity were apparently too small to affect gross carbon assimilation.

Nutrient elements were measured in leaves between 2 and 4 weeks after VL43 infection to investigate whether VL43 infection had negative effects on nutrition. Potassium, calcium, magnesium, manganese, and iron showed age-dependent changes in infected plants, which were not different from those found in non-infected plants (Table 1). The concentrations of the macro-nutrients N, P, and S were higher in VL43-infected plants than in controls at 28 dpi (Fig. 5). Overall, these analyses show that VL43 infec-

Figure 1
Stunting symptoms in oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* (VL43). (A) Time course. White circles = non-infected plants, black circles = VL43-infected plants. Data indicate means ($n = 20 \pm \text{SE}$). Occasionally, SE is smaller than the symbols. * indicate significant differences between treated and non-treated plants at $P \leq 0.05$. (B) Typical phenotype of controls and infected plants 21 dpi.

tion did not cause nutrient limitations in stages of plant development where severe stunting occurred.

Verticillium-induced defences in xylem sap and apoplast

Figure 6 shows SDS-PAGE gradient gels for an overview of changes occurring in the apoplastic washing fluid of leaves and in the xylem sap at 21 dpi. At earlier stages similar but less pronounced changes were found (not shown). Five apoplast and 3 xylem proteins were strongly increased compared with non-inoculated controls. These changes were not caused by unspecific effects because at this time point of infection, membranes were not destabilized by fungal action as indicated by low electrolyte leakage that was similar in infected plants to that of non-infected plants (Table 2). Furthermore, the estimated contamination of the apoplast with symplastic proteins was extremely low and not increased in infected plants (Table 2). In whole leaf extracts, separated by gradient PAGE, no changes in protein pattern were found, indicating that the influence of VL43 was only subtle (not shown). It is also notable that we have no evidence that at 21 dpi VL43 had overcome the hypocotyl barrier. In stems, *Verticillium* DNA did not exceed the detection limit of 0.5 ng g^{-1} fresh mass (Table 2).

To study the observed changes in greater detail, apoplastic washing fluids were subjected to 2-D electrophoresis to

obtain better resolution and to analyse changes in the protein patterns statistically. Silver stained gels showed 170 ± 9 protein spots (Fig. 7). We analysed 31 major spots common to both VL43-infected and non-infected plants to check if the apoplastic washing fluid was enriched in typical secretory proteins. Only 19 of these spots yielded peptides. The predicted sequences corresponded mainly to extracellular enzymes involved in defence and cell wall metabolism (Table 3). Several spots that were represented by just one peptide could not be identified unambiguously here (spot 10, 17, 18 = predicted aspartyl protease, spot 11 = predicted peroxidase, spot 12–15 = predicted glucanase) but pointed also the presence of typical extracellular enzymes, which have already previously been identified in oilseed rape [2]. With the exception of one protein with unknown function (spot 9) and two spots for a putative α -L-arabinofuranosidase (spots 5 and 7), all identified proteins contained a predicted target peptide for the secretory pathway. Whether the two putative α -L-arabinofuranosidase proteins were in fact mitochondrial proteins as suggested by TargetP analysis, is unlikely because the reliability of the prediction was low (RC4) and the *Raphanus sativus* enzyme, with which the highest homology existed, was shown to be localized in the cell wall fraction [23]. The protein with unknown functions in *B. rapa* var. *pekinensis* (spot 9) displayed high homologies with a pectin esterase from *A. thaliana*. Since pectin esterase

Figure 2
Time course of leaf, stem and root biomass production of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43. White circles = non-infected plants, black circles = VL43-infected plants. Data indicate means ($n = 5 \pm SE$). * indicate significant differences between treated and non-treated plants at $P \leq 0.05$.

rases are known cell wall and xylem sap components [2,3], the predicted chloroplastic localization is also unlikely. Overall, this supports that the washing fluid was enriched in soluble apoplastic proteins and contained only little unspecific contaminants

The total number of spots identified on silver stained gels was not significantly changed in VL43-infected compared with non-infected plants. However, the intensity of 12 spots was significantly increased in the apoplast of VL43 challenged plants compared with non-infected controls,

whereas no spots with decreased staining intensities were found. Of the 12 spots, 6 could be identified by LC-MS/MS (Table 4) and corresponded to three different proteins, i.e., a basic β -1,3-glucanase (3 spots), a basic endochitinase CHB4 (2 spots) and a peroxidase. The factor by which the intensities increased ranged from 2.4 to 8.3 (Table 4). All proteins contained a predicted signal peptide for the secretory pathway supporting their apoplastic localisation (Table 4). To corroborate these results, differentially appearing spots from PAGE gels shown in Figure 6 were also identified. AVL1 was the basic glucanase corresponding to spots no. 21–23, AVL2 the basic endochitinase CHB4 corresponding to spots no. 34 and 51 and AVL9 the putative peroxidase corresponding to spot no. 54 in the 2-D gels (Fig. 7). AVL 5 was not identified. AVL 7 was a new protein identified as a PR4-type protein (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*, gi|73671284, accession number AF528181, protein score 108), which also contained a predicted signal peptide for the secretory pathway. Since the MW of the PR4-type protein was below 20 kD, it was not resolved on the 2-D gels.

PAGE was also used to investigate the differentially appearing xylem sap proteins (Figure 6, Table 5). Among the three up-regulated protein bands, basic glucanase (XVL1) and PR4-type protein (XVL 3) were identified. XVL2 was not identified. However, its MW corresponded to that of AVL2, the endochitinase CHB4.

To find out whether the changes in the composition of the xylem were competent in attenuating VL43 growth, we

Figure 3
Net photosynthesis (A) and transpiration (B) of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) 15 and 21 dpi after infection with *Verticillium longisporum* VL43. White bars = non-infected plants, black bars = VL43-infected plants. Data indicate means ($n = 8 \pm SE$). Significant differences were not observed.

Figure 4
Quantum yield of photosynthesis (A) and chlorophyll concentration (B) of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43. White symbols = non-infected plants, black symbols = VL43-infected plants. Data indicate means ($n = 20$ for quantum yield of PSII and $n = 9$ for chlorophyll, $\pm$ SE). * indicate significant differences between treated and non-treated plants at $P \leq 0.05$.

isolated xylem sap from infected and non-infected oilseed rape and grew VL43 in pure xylem sap. Figure 8A shows that fungal growth was significantly inhibited in xylem sap of infected compared to that of non-infected plants, whereas the protein concentration was unaffected (Fig. 8B).

Discussion

Stunting and defence responses are not caused by suppression of carbon assimilation or injury to nutrient or water supply

Stunting occurred before *V. longisporum* colonized above-ground plant parts as reported previously [1]. Our study clearly shows that neither these growth reductions nor beginning symptoms of chlorosis were the result of nutrient limitations or suppression of carbon assimilation. We have also no evidence that *V. longisporum* caused drought stress since the transpiration rate was unaffected in infected plants. This is in contrast to *V. dahliae* infections, which resulted in reduced stomatal opening in species like tomato, potato and egg plants and caused wilting symptoms [24-26]. Eynck et al. [1] observed that clogging of vessels after VL43 infection of oilseed rape occurred infrequently and only at late stages of infection. They assumed, therefore, that these rare obstructions would not affect gross water transport. Our data corroborate this idea.

Although the effect on carbon assimilation was either marginal or not present, both *Verticillium* pathogens caused chlorosis [this study, [22,27,28]]. Since chlorosis preceded fungal proliferation in leaves, it might have been caused by *Verticillium* toxins as suggested earlier [18]. However, chlorophyll loss is also a common symptom of

nutrient deficiencies. Our study excludes the latter reason for *V. longisporum* infected oilseed rape. VL43 had also no effect on nutrient concentrations in *Arabidopsis thaliana* leaves at early stages of stunting [28]. Previous investigations with horticultural crops infected with *V. dahliae* neither revealed nutrient deficiencies [29-31]. Therefore, we conclude that chlorosis is not the consequence of insufficient nutrient supply to leaves. Notably, in our study the amounts of nutrient elements nitrogen, phosphorus and sulphur were higher in older leaves of VL43-infected oilseed rape than in those of non-infected controls. Increased phosphorus or nitrogen concentrations have also been reported in *V. dahliae* infected tomato, eggplant and in VL43-infected *Arabidopsis* [28,31] suggesting a yet unknown interference of *Verticillium* with P or N metabolism.

Vital functions related to nutrition, water supply and photosynthetic carbon assimilation were not compromised – at least not during infection stages when *Verticillium* was still retained in the root system. Therefore, we presume that the observed up-regulation of defence proteins must have been a pathogen-specific effect rather than an unspecific general stress response.

The extracellular proteome and its role in defence against *Verticillium longisporum*

A previous proteomic study of oilseed rape xylem proteins revealed about 300 spots; 69 of these yielded peptide sequences and were putatively identified by matches with database entries as enzymes related to defence and cell wall re-modelling including, e.g., peroxidases, proteases, chitinases, β -1,3-glucanases, germin-like proteins, PR1 protein, thaumatin-like protein, lectins, glycine-rich proteins, polygalacturonases, etc. [2]. We detected 170 protein spots in the apoplastic proteome of rape leaves. Since the focus of our work was on *V. longisporum*-responsive proteins, we analyzed only some of the unregulated proteins to document that apoplastic washing fluids were enriched in proteins with a signal peptide for the secretion pathway (Table 3). Among the identified proteins we confirmed the presence of chitinases, peroxidases, proteases, glucanases, germins, and some proteins involved in cell wall modifications in the leaf apoplast of healthy oilseed rape. A similar composition has also been reported for the apoplast and some cell wall-associated proteins of *Arabidopsis* [32-34]. But some of the proteins present in leaf apoplast of oilseed rape or belonging to secreted proteins of *Arabidopsis* [this study, [28,35]] were not found in xylem saps [2,3]. Among them were α -arabinofuranosidases that are members of a set of glycosidases required for degradation of polymeric substrates such as arabinan, arabinoxylan, and other polysaccharides, which are major components of plant cell wall hemicelluloses [36]. These enzymes provide many microorganisms with soluble car-

Figure 5

Nitrogen, phosphorus and sulphur concentrations in leaves of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43. White circles = non-infected plants, black circles = VL43-infected plants. Data indicate means ($n = 5 \pm \text{SE}$). Different letters indicate significant differences at $P \leq 0.05$.

bohydrates that can be used as carbon or energy sources [36]. Our study shows that these enzymes are part of the healthy apoplast and do not belong to the suite of primary responses to *V. longisporum* infection.

Table 1: Nutrient elements in leaves of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43.

Element	dpi	Control	VL43
K (mg g ⁻¹)	14	46.5 ± 3.7b	50.5 ± 1.3b
	21	29.1 ± 5.6a	31.0 ± 3.8a
	28	25.7 ± 2.6a	31.4 ± 6.1a
Ca (mg g ⁻¹)	14	30.0 ± 2.4a	27.5 ± 2.3a
	21	25.1 ± 2.9a	29.5 ± 2.9a
	28	30.5 ± 4.4a	29.3 ± 5.3a
Mg (mg g ⁻¹)	14	4.1 ± 0.2c	4.2 ± 0.2bc
	21	3.1 ± 0.4a	3.3 ± 0.3ab
	28	3.2 ± 0.5a	3.4 ± 0.5abc
Mn (μg g ⁻¹)	14	57 ± 7a	62 ± 8a
	21	49 ± 6a	63 ± 13a
	28	62 ± 7a	48 ± 6a
Fe (μg g ⁻¹)	14	92 ± 11ab	105 ± 15 b
	21	67 ± 11a	98 ± 17ab
	28	72 ± 9 ab	73 ± 13 ab

Data indicate means ($n = 5 \pm \text{SE}$). Different letters in blocks indicate significant differences at $P \leq 0.05$.

Our proteomic analysis revealed that only 7% apoplastic proteins were differentially regulated in response to VL43 suggesting that *Verticillium* evoked very distinct responses. All identified VL43-induced apoplastic proteins (β -1,3-glucanase, peroxidase, PR4-protein and endochitinase) are candidates already known to be involved in pathogen defence. For example, β -1,3-glucanases belong to the PR-2 protein family and hydrolyse β -1,3-glucans, major structural compounds of fungal cell walls [37]. Rep et al. [4] have also found a basic and an acidic glucanase in the xylem sap of tomato after infection with the vascular fungus *Fusarium oxysporum*. Infections with *V. dahliae* caused increased expression and activities of glucanases and chitinases [38,39]. The PR4 protein identified here was homolog to that of a *Pseudomonas syringae* inducible PR4 protein of *Brassica rapa* [40,41]. The expression of this gene was induced in *B. rapa* by ethylene but not by salicylic acid or methyl jasmonate [40,42]. In *A. thaliana*, expression of an ethylene-dependent PR4 protein was also increased after *V. longisporum* infection [22]. Since *Arabidopsis* mutants deficient in ethylene signalling (*ein2*, *ein4*, *ein6*) were more susceptible to *V. longisporum*, ethylene-associated signalling pathway appear to be involved in mediating *Verticillium* resistance [22]. Indeed, Genevestigator analysis showed that the *Arabidopsis* homologues of the endochitinase (At2g43590) and β -1,3-glucanase (Atg57240) identified in our study were significantly

Figure 6

Protein patterns in leaf apoplastic washing fluids and in the xylem sap of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) of non-infected plants and 21 dpi after infection with *Verticillium longisporum* VL43. Each lane was loaded with 100 µg protein. Proteins were separated by gradient SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue.

increased after ethylene exposure. In other plant species, chitinases and glucanases were also induced by ethylene [43-45]. In summary, this suggests that ethylene plays a yet unresolved role in *V. longisporum* responses of oilseed rape.

Overall, current studies suggest that the PR-response to *V. longisporum* is relatively conserved across different *Brassicaceae* [this study, [22,28]]. Some of these proteins (PR4, β-1,3-glucanase) appeared in xylem sap even before fungal infection had overcome the hypocotyl barrier. Moreo-

Table 2: Electrolyte leakage, fungal DNA, protein content and estimated contamination of apoplastic washing fluids of in leaves of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43.

	mock	VL43	P-Value
Electrolyte leakage (%)	7.4 ± 0.6	9.8 ± 1.4	0.1545
VL43-DNA (ng g ⁻¹ FM)	< LOD	< LOD*	
Leaf protein (mg g ⁻¹ FM)	13.7 ± 2.1	13.2 ± 1.6	0.8491
Apoplastic protein (µg g ⁻¹ FM)	13 ± 1	17 ± 2	0.1142
Leaf MDH activity (nkat g ⁻¹ FM)	417.1 ± 31.7	444.4 ± 17.9	0.4742
Apoplastic MDH (nkat g ⁻¹ FM)	0.015 ± 0.003	0.038 ± 0.022	0.3439
Contamination (%)	0.004 ± 0.001	0.008 ± 0.005	0.3940

Data indicate means (n = 5, ± SE). *Limit of detection (LOD) was 0.5 ng g⁻¹ FM

Figure 7
2-D-protein pattern in leaf apoplastic washing fluids of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) of non-infected plants and at 21 dpi after infection with *Verticillium longisporum* VL43. Each gel was loaded with 80 µg protein and stained with silver. Circles indicate differentially appearing protein spots. Numbers indicate proteins for which peptides were obtained.

ver, fungal growth in xylem sap of infected plants was massively inhibited (Fig. 8). Therefore, we suggest that xylem sap proteins may play a crucial role in the control of *V. longisporum*. Since xylem elements consist of dead tissue, the sap proteins must either have been produced in roots or in parenchyma cells in the xylem such as ray cells. Further studies must show whether the biosynthesis of these proteins is stimulated in roots, how they are loaded into the xylem and whether they serve to retain the fungus underground.

Since the VL43-responsive proteins of xylem sap were also increased in the leaf apoplast, it is possible that they were transported with the ascent of sap into the leaf mesophyll, where they might have accumulated. However, the leaf apoplast of infected plants contained additional novel proteins (a peroxidase, an endochitinase and unidentified proteins) compared with the xylem sap. We suspect that the endochitinase found in leaf apoplast also originated from xylem sap because a protein with identical molecular weight was present in the latter. The increases in additional novel defence proteins in the leaf apoplast occurred before significant fungal proliferation in above-ground plant parts was apparent. This suggests that systemic signalling took place. It is currently unknown whether *V. longisporum* produced such signalling compounds, which might have been transported with the xylem sap. We can not exclude that the new xylem sap proteins themselves might have exerted signalling functions or that glucanase activities released elicitors from fungal cell walls which

might have stimulated defence reactions in the leaf. This will require further analysis.

Conclusion

In conclusion our data show that *V. longisporum*-induced stunting of oilseed rape was not caused by nutrient limitations, reduced water supply or suppression of photosynthesis. Although *V. longisporum* had not yet overcome the hypocotyl barrier, proteomic analysis of the leaf apoplast revealed activation of pathogen defence enzymes (β -1,3-glucanase, peroxidase, PR4, and endochitinase). This suggests systemic signalling of *V. longisporum* infection. A subset of the defence enzymes identified in leaf apoplast was also increased in xylem sap. Since orthologs of these enzymes in other plant species were regulated by ethylene, this phytohormone appears also to be involved in mediating *V. longisporum* responses in oilseed rape. The xylem sap of infected plants suppressed fungal proliferation compared with that of non infected plants suggesting that the activation of apoplastic defences contributes to limit fungal spreading.

Methods

Plant growth conditions and infection with *Verticillium longisporum*

Brassica napus var. *napus* (rapid-cycling rape provided by PH Williams, University of Wisconsin-Madison, Crucifer Genetics Cooperative) seeds were surface-sterilized for 15 min in a solution of 5% Ca hypochloride and 0.02% Triton X-100, washed in sterilized water, sown on root-

Table 3: Major proteins in apoplastic washing fluids of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*).

Spot No	Similarity (Organism) Peptide	NCBI no. (ACC)	Protein score (Threshold)	MW	Target peptide
4	α-L-arabinofuranosidase (Ath) YVAIGNEDCGK AFVSEYAVTGK	gi 13937191 (At3g10740)	113 (56)	75437	S (RC 2)
5	α-L-arabinofuranosidase (Rs) GQETPGEDPLLSSK	gi 74355968 (BAE44362)	76	84750	M (RC 4)
7	α-L-arabinofuranosidase (Rs) GQETPGEDPLLSSK LPMTWYPQSYVEK	gi 74355968 (BAE44362)	195 (56)	84750	M (RC 4)
9	HP (pectin esterase) (Br) TVQDAVNAAAPDNNGVSK ISEGVYEETVR DITFQNTAGPDAHQAFAFR	gi 72384433 (homolog of At5g09770)	84 (56)	60345	C (RC 1)
27	Chitinase (Class IV) (Bn) DLNEGDLLATPEK AVNSMECTGGGVPSETAANR	gi 14486393 (AAK62048)	103 (56)	31219	S (RC 4)
28	Chitinase (Class IV) (Bn) GAIQLSWNYNYGPCGR DLNEGDLLATPEK	gi 14486393 (AAK62048)	90 (56)	31219	S (RC 4)
38	UP (basic secretory protein) (Ath) WDQGYDVTAR	gi 15226060 (At2g15130)	81 (56)	25459	S (RC 1)
39	Germin (GER 3, GLP3) (Ath) NPDQVTENDFAFTGLGK	gi 1755154 (At5g20630)	56 (56)	22020	S (RC 1)
40	Germin (GER 3, GLP3) (Ath) NPDQVTENDFAFTGLGK	gi 1755154 (At5g20630)	98 (56)	22020	S (RC 1)
45	Germin (GER 3, GLP3) (Ath) NPDQVTENDFAFTGLGK	gi 1755154 (At5g20630)	73 (45)	22020	S (RC 1)

Spot numbers refer to spots in Figure 7. NCBI and accession number (ACC) of the proteins identified by comparing the peptide sequence with NCBI databank are indicated. HP = hypothetical protein, UP = unknown protein. Protein score, predicted molecular weight (MW) and predicted target peptide with reliability class (RC) are indicated. C = Chloroplast, M = Mitochondrion, S = Secretory pathway. Ath = *Arabidopsis thaliana*, Bj = *Brassica juncea*, Bn = *Brassica napus*, Br = *Brassica rapa*, Rs = *Raphanus sativus*

medium [46], stored for 3 days at 4°C and then transferred to 20°C, 60% relative humidity, and a light intensity of 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation with an 16 h light/8 h dark cycle. Two weeks old plants were removed and planted into a soil-sand mixture (1:1) after cutting root tips. The plants were inoculated by applying 2×10^6 spores of *V. longisporum* in sterile water directly to the roots. Control plants were treated in the same way and mock-inoculated with sterile water. The plants were regularly watered with tap water and fertilized weekly with 10 ml fertilizer solution (10 g Flory Basisdünger, Eufloor, München, Germany and 2.2 g NH_4NO_3 in 1 l tap water).

Plant height growth was measured weekly. Harvested plants were separated into roots, stems and leaves for biomass determination. Aliquots of fresh plant tissue were stored frozen at -80°C and further aliquots were dried at 60°C.

Collection of apoplastic washing fluid and of xylem sap

Apoplastic washing fluids and xylem sap were extracted immediately after harvest. Leaves of five plants were pooled and used to prepare apoplastic washing fluid using the infiltration procedure of Polle et al. [47] with some modifications. Five biological replicates were pre-

pared per treatment. The leaves were detached and the midrib was removed. The leaves were briefly washed in distilled water, placed in infiltration solution (100 mM KCl, 0.01% Triton-X 100) and subjected to vacuum infiltration (-80 kPa, 5 min). Subsequently the atmospheric pressure was slowly restored. The leaves surface was quickly blotted between paper towels. The leaves were rolled and placed in centrifugation tubes with a perforated bottom. The tubes were inserted into larger centrifugation tubes over a reaction vial. The whole set-up was centrifuged at 900 g (8 min, 4°C, Rotana 96 R, Hettich, Tuttlingen, Germany) in a swing rotor. During centrifugation the infiltration solution was released from the leaves and collected in the reaction vial. The solution was weighed and stored at -20°C. The composition of the infiltration solution had been optimized by varying the KCl and Triton X-100 concentrations to obtain maximum protein with minimum contamination (see below). For proteome analysis five biological replicates per treatment were analysed.

Xylem sap was collected using a Scholander pressure chamber [48]. Plants were removed from the pots, the soil-sand mixture was carefully removed by washing in water and after covering the roots with aluminium foil, they were placed inside the pressure chamber. The stem

Table 4: Differentially expressed proteins in apoplastic washing fluids of leaves of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43.

Spot no	Similarity (Organism) Peptide	NCBI (ACC)	Protein score (threshold)	MW	Target peptide	Factor	P
21	basic glucanase (Bj) LYDPNQEVLSALR YISVGNEVQPSDPTSR GISGFPPSSGTFTPEFR β-1,3-glucanase (Ath) LASSQAEADTWVR GISGFPPSSGTFTPEF	gi 86371164 (ABC94638)	223 (56)	30722	S (RC 1)	3.9	0.037
22	basic glucanase (Bj) LASSQAEADTWVR LYDPNQEVLSALR YISVGNEVQPSDPTSR GISGFPPSSGTFTPEFR NLFFHALVDVYAALEK GSNIDLLDVPNPDLQR LDYALFTSPSTVVNDGSNAYR β-1,3-glucanase (Ath) LASSQAEADTWVR GISGFPPSSGTFTPEFR TYVNNLIQTVK	gi 86371164 (ABC94638)	405 (56)	30722	S (RC 1)	3.1	0.001
23	β-1,3-glucanase (Ath) LASSQAEADTWVR GISGFPPSSGTFTPEFR TYVNNLIQTVK GSNIELVDVPNPDLQR	gi 6735303 (At3g57240)	180 (56)	37632	S (RC 1)	4.8	0.049
30	not identified					5.8	0.007
32	not identified					8.3	0.000
34	basic endochitinase (CHB4) (Bn) DSFINAANTFPNFANSVTR AINGMECNGGNSGAVNAR	gi 584929 (Q06209)	95 (56)	29684	S (RC 1)	7.7	0.009
36	not identified					4.8	0.014
51	basic endochitinase (CHB4) (Bn) DSFINAANTFPNFANSVTR AINGMECNGGNSGAVNAR DYCGQLGVDPGNLS	gi 584929 (Q06209)	159 (44)	29684	S (RC 1)	4.2	0.020
52	not identified					3.5	0.045
53	not identified					4.4	0.005
54	Korean horseradish peroxidase (Rs) MGDISPLTGSSGEIR Peroxidase (Ath) MGDISPLTGSSGEIR	gi 1518388 (X91172) gi 15239075 (At5g05340)	94 (44) 94 (44)	33993 34650	S (RC 3) S (RC 1)	2.4	0.040
55	not identified					3.6	0.005

Data indicate means of 5 gels per treatment. Spot numbers refer to spots in Figure 7. NCBI and accession number (ACC) of the proteins were identified by comparing the peptide sequence with NCBI databank. Protein score, predicted molecular weight (MW) and predicted target peptide with reliability class (RC) are indicated. Factor indicates mean intensity of spots in apoplastic washing fluid of VL43-infected plants/mean intensity of spot in apoplastic washing fluid of control plants. P-values were calculated using ProteinWeaver software. Ath = *Arabidopsis thaliana*, Bj = *Brassica juncea*, Bn = *Brassica napus*, Rs = *Raphanus sativus*.

was cut above the hypocotyl and the cut surface was rinsed with ddH₂O. After closing the chamber, the roots were exposed to 0.2 MPa for 10 to 15 min. Xylem sap exuding through the cut surface was collected with a pipette tip. Sap of 15 plants per treatment was pooled as one biological replicate and stored at -20°C. For proteome analysis five biological replicates were analysed.

Fungal culture and growth test

Verticillium longisporum isolate VL43 (isolated from *Brassica napus*), was maintained on potato dextrose agar at 4°C. For sporulation, fungal hyphae were transferred to

250 ml liquid potato dextrose medium (PDB medium, Scharlau, Barcelona, Spain) with 0.2 mg/ml streptomycin sulphate (Sigma, Steinheim) as described by Fahleson et al. [49]. The culture was incubated at 22°C by horizontal shaking (80 rpm) for 14 d in darkness. For inoculation the fungal suspension was filtered and diluted to a suspension of 2×10^6 conidia per millilitre.

To test fungal growth, xylem sap was collected as described above from 30 control and 30 infected plants, respectively and used for 13 growth assays in uninfected and 15 growth assays in infected saps, respectively. Fungal

Table 5: Differentially regulated proteins in xylem sap of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) after infection with *Verticillium longisporum* VL43.

Spot No	Similarity (Organism) Peptide	NCBI (ACC)	Protein score (Threshold)	MW	Target peptide
XVL 1	basic glucanase (Bj) IASSQAEADTWVR LYDPNQEVLALR YISVGNEVQPSDPTSR GISGFPPSSGTFTPEFR NLFHALVDTVYAALEK GSNIDLLLDVNPDLQR LDYALFTSPSTVYNDGSNAYR	gi 118763538 (ABC94638)	510 (44)	30722	S (RC 1)
	β-1,3-glucanase (Ath) LASSQAEADTWVR GISGFPPSSGTFTPEFR TYVNNLIQTVK GSNIELVDVNPDLQR	gi 6735303(At3g57240)	222 (45)	37632	S (RC 1)
XVL 2	not identified				
XVL 3	PR4-Typ protein (Br) VTNTGTQAQATVR QIDTDGQGYAR ATYHFYNPAQNGWDLVR	gi 73671284 (AF528181)	162 (44)	15950	S (RC 2)

Spot numbers refer to Fig. 6. NCBI and accession number of the proteins identified by comparing the peptide sequence with NCBI databank are indicated. Protein score, predicted molecular weight (MW) and predicted target peptide with reliability class (RC) are indicated. Ath = *Arabidopsis thaliana*, Bj = *Brassica juncea*, Br = *Brassica rapa*

spore solution with 1.8×10^6 spores in PDB medium was centrifuged and resuspended in ddH₂O water. 10 µl of this spore solution were diluted 1:10 with sterile water, filled up with 900 µl xylem sap to a final volume of 1 ml and incubated in a sterile 2 ml reaction tube at 22°C by shaking (80 rpm) for 3 days in darkness. Subsequently, the suspension was centrifuged and the pellet was used for DNA extraction [50]. For this purpose, the pellet was milled (MM 2, Retsch, Haan, Germany), suspended in 400 µl extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% sodium dodecylsulfate), and centrifuged (20,000 g, 3 min, 5417 R Eppendorf centrifuge, Hamburg, Germany) after mixing. 300 µl of the supernatant was transferred to a new tube, mixed with 300 µl isopropanol and incubated for 2 min at room temperature. The sample was centrifuged (20000 g, 5 min). The supernatant was discarded and the pellet was dried for 5 – 10 min at 37°C in a Speed Vac (Eppendorf Concentrator 5301, Hamburg, Germany). The pellet was resuspended in 100 µl TE buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EDTA) used for fungal DNA determination was described below.

Quantification of *Verticillium longisporum* DNA by real-time PCR

Frozen hypocotyl was ground in liquid nitrogen to a fine powder. For DNA extraction from plant tissue the DNeasy Plant Mini Kit from Qiagen (Hilden, Germany) was used. The amount of fungal DNA was determined by real-time

PCR with primers 5'-cagcgaaacgcgatattag -3' and 5'-ggctt-gtaggggttttaga-3', which are specific for *Verticillium* spp [1]. BIOTaq DNA polymerase (Bioline, Luckenwalde, Germany) in standard polymerase buffer with 0.01% (v/v) Tween-20 and 3 mM MgCl₂ was used, 10 nM fluorescein (BioRad, Hercules, CA, USA) was added as internal fluorescence standard and the fluorescence of SYBR Green I (100,000-times diluted solution purchased from Invitrogen, Karlsruhe, Germany) was recorded using 490 ± 10 nm for excitation and 530 ± 15 nm for emission. PCR consisted of a 2 min denaturation step at 94°C followed by 36 cycles of 20 s at 94°C, 30 s at 59°C and 40 s at 72°C. The amount of *V. longisporum* DNA was estimated from a calibration curve constructed with purified fungal DNA dissolved in plant matrix.

Photosynthesis and Chlorophyll fluorescence

Chlorophyll fluorescence was measured on dark-adapted leaves using the Mini PAM system (Walz, Effeltrich, Germany). The quantum yield of photochemistry was calculated as described by Maxwell and Johnson [51]:

$$\Phi = (F_m - F_o) / F_m$$

with F_m and F_o referring to maximum and background fluorescence, respectively, in darkness.

Photosynthesis and transpiration were measured in gas exchange system (HCM 1000, Walz, Effeltrich, Germany) at saturating light of 800 µmol m⁻²s⁻¹ of photosynthetic active radiation (20°C, 60% air humidity).

Figure 8
Fungal growth (A) and protein content (B) in xylem sap of non-infected (X-C) and VL43-infected (X-VL43) oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*). Data indicate means (n = 13 for non-infected and 15 for infected xylem sap, $\pm$ SE). ** indicate significant differences between treated and non-treated plants at $P \leq 0.01$, ns = not significant.

Chlorophyll concentration

Frozen leaf material was milled in liquid nitrogen and extracted in 80% acetone. After centrifugation the pigment concentration of the supernatant was determined spectrophotometrically (Beckman DU 640, Beckman Coulter, Krefeld, Germany) at 646 nm and 663 nm. The chlorophyll concentration was determined as sum of chlorophyll a and b after Lichtenthaler and Wellburn [52].

Nutrient elements

Dry leaf material was milled to a fine powder (MM2 Retsch, Haan Germany). Aliquots of the powder were extracted with 65% HNO_3 [53] and subjected to inductively-coupled optical emission spectroscopy (Spectroflame, Spectro Analytical Instruments, Kleve Germany). For carbon and nitrogen determination, leaf powder was weighed into tin capsules and measured in a CNS-elemental analyser (Carlo Erba Instruments, Rodano, Italy).

Electrolyte leakage

Leaf disks (10 mm) were excised from leaf blades avoiding major veins. 25 disks were immersed in 20 ml of distilled water. The conductivity (C_0) was determined immediately (C_0) and after 24 h (C_{24}) with a conductivity meter (LF315/SET, WTW Wissenschaftliche Technik, Weilheim, Germany). The samples were autoclaved (5 min, 121°C) to destroy the tissues and measured after cooling to room temperature (C_{maximum}). Relative electrolyte leakage (REL) was calculated as

$$\text{REL (\%)} = [(C_t - C_0) / C_{\text{max}}] \times 100$$

Contamination measurements

To determine contamination of apoplastic fluids with cellular components, malate dehydrogenase activity was determined as symplastic marker enzyme [54]. The enzyme activity was measured spectrophotometrically at 340 nm as the consumption of NADH with oxalacetate as substrate. Malate dehydrogenase activity was also measured in leaf extracts prepared as described previously [47]. Crude extracts were filtered over Sephadex G-25 (NAP5, Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) before enzyme determination.

Preparation of protein extracts for gel electrophoresis

Xylem sap was filtered, (0.2 μm pore size, Sarstedt, Nümbrecht, Germany) freeze-dried, dissolved in 500 μl ddH_2O (double deionised water) and filtered over a Sephadex G-25 column.

Apoplastic washing fluids and whole leaf extracts were subjected to acetone/trichloroacetic acid (TCA) precipitation (5 volumes 10% w/v TCA, 0.14% v/v 2-mercaptoethanol in acetone with 1 volume of plant extract) overnight at -20°C. Subsequently, the samples were centrifuged (20000 g, 4°C, 20 min). The supernatant was discarded. The pellet was washed three times with 200 μl acetone containing 0.07% 2-mercaptoethanol and dried. The pellet was dissolved in 380 μl rehydration buffer (8 M urea containing 0.5% w/v CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 15 mM DTT (DL-dithiothreitol), 0.2% v/v IPG Buffer pH 3–10 (Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) and 0.2% v/v Bromphenol Blue [55] and shaken for 30 min at room temperature to dissolve proteins. The extract was centrifuged for 5 min (12000 g, 4°C) and the supernatant was used for protein separation on 2-D gels.

For 1-D gels protein pellets obtained by TCA/acetone precipitation were dissolved in ddH_2O water. For gel electrophoretic separation 5 μl loading buffer (4% w/v SDS, 20% v/v glycerol, 0.2 M DTT, 0.002% w/v Bromphenol Blue in 0.5 M Tris-HCl, pH 6.8) was added. Before application to gels samples were incubated for 3 min at 70°C.

The protein concentration of the extracts was quantified by the bicinchoninic acid (BCA) method using the BCA protein quantification kit (Uptima, Montluçon, France) and bovine serum albumin as the standard.

Separation of proteins by 1-D or 2-D gel electrophoresis

Proteins were separated by sodium dodecyl sulphate (SDS) – polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE, [56]) in a gradient from 7.5 to 20% (electrophoresis unit, Bio-rad, München, Germany). Each lane was loaded with 1.8 μg protein (for silver staining) or 50 to 100 μg protein (for

Coomassie staining). Molecular weight markers were used from Amersham (LMW 17-0446-01, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany).

For 2-D electrophoresis, 80 µg protein in 350 µl rehydration buffer was used for isoelectric focusing on immobilized pH gradient strips (Immobiline DryStrip, pH 3–10, length 18 cm, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany). Isoelectric focusing (IPGphor isoelectric focusing system, Amersham Bioscience, Freiburg, Germany) was performed under the following conditions: rehydration 12 h at 20 V, followed by 2 h at 150 V, 1 h at 200 V, 1 h at 500 V, 1.000 Vh at 1.000 V, and finally by 60.000 Vh at 80.00 V. The focused samples were stored at -20°C.

Prior to the second separation step, IEF focusing strips were incubated two times for 15 min in equilibration buffer (6 M urea, 30% w/v glycerol, 2% w/v SDS in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 8.8) after Görg and Weis [55] containing 1% DTT in the first equilibration step and 4% iodoacetamide in the second one. In the second dimension proteins were separated on 12% SDS-PAGE [56] using an EttanDalt-six electrophoresis unit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) operating at 600 V (400 mA, 13 W) for 30 min and followed by 3000 V (400 mA, 100 W) for 4.5 h.

Gels were stained with colloidal Coomassie Blue [57] or with silver [58] and scanned with a FluorS-Multimager (Biorad, München, Germany).

Protein identification

Protein spots of interest were cut and digested in-gel after Havlis et al. [59]. Gel pieces were washed twice with ddH₂O for 15 min and washed once with 50% methanol (15 min) at room temperature. The gel pieces were dehydrated in pure acetonitrile for 20 min and solvent was removed under vacuum. Gel pieces were soaked for 60 min in a solution of 2 µM modified trypsin (Promega, Mannheim, Germany) in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8 at 4°C. Trypsin solution not taken up by gel pieces was removed. The digestion was carried out for 30 min at 58°C and stopped by addition of 200 µl 5% (v/v) formic acid. Peptides were extracted for 300 min at room temperature on a shaker and extraction was repeated with 200 µl 50% (v/v) acetonitrile in 5% (v/v) formic acid. Combined supernatants were dried in a vacuum centrifuge (SPD SpeedVac, Thermo Savant, Holbrook, USA). Peptides were dissolved in 5 µl of 0.1% formic acid and 4 µl samples were used for separation on 180 µm capillary column packed with 218MS-C18 phase (Vydac, Columbia, USA) and analysed by ESI-LC-MS (HP 1100 Agilent, Palo Alto, USA; Esquire 3000, Bruker Daltonik, Bremen, Germany). Mass spectra were analysed by Data Analysis

software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) and proteins identified by online searching of MSDB, NCBItr and EST databases using Mascot software (Matrix Science, Boston, USA). Settings for peptide searches were: ion charge 2+ and 3+, monoisotopic ions, carbamidomethyl-C as fixed modification, oxidation-M as variable modification, missed cleavage 1, peptide tolerance 1.4 Da, MS/MS tolerance 0.4 Da, standard scoring using significance threshold $p < 0.05$. To obtain information whether the identified proteins contained a target sequence for the secretory pathway, the programme TargetP (version 1.1) was used, which predicts the subcellular localisation of eukaryotic proteins [60]. TargetP also indicates reliability classes (1 to 5) of the predicted localisation. Small values indicate high reliability.

Statistical analysis

To compare gels from *Verticillium*-treated and non-inoculated plants five gels, each loaded with one biological replicate per treatment were run and silver stained. The gels were scanned and stored as TIFF-files. Gels belonging to one treatment were analysed as a group by Proteomweaver software (Version 3.1.07, Definitions Cognitionware, München, Germany). Protein spots were identified automatically, adjusted manually where necessary and merged by Pair Matching or Multi Matching. The grouped gels were normalized using standard settings of the programme and compared. Protein intensities of matching spots were statistically analysed by Student's T-test to identify significant differences at $P \leq 0.05$.

Genevestigator analysis was conducted with the software developed by Zimmermann et al. [61].

Biometric and physiological data are shown as means ($\pm$ SE). The number of replicates is indicated in the figure legends. For statistical analysis ANOVA or Student's T-test were applied using Statgraphics (Centurion XV, St Louis, MO, USA).

Authors' contributions

SF conducted rape infection experiments, extracted and analysed the proteome. CD conducted *Verticillium* growth experiments in xylem sap. AM and UK made the LC-MS/MS available and helped with protein separation and identification. PK contributed data on *Verticillium* DNA. AP suggested experiments and wrote the manuscript. All authors have read and approved the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to A. von Tiedemann for the donation of the VL43-strain of *Verticillium longisporum* and to Monika Franke-Klein and Christine Kettner for excellent technical assistance. We thank the DFG for providing financial support (Po362/15-1/2) via FOR 546.

References

- Eynck C, Koopmann B, Grunewaldt-Stoecker G, Karlovsky P, von Tiedemann A: **Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques.** *Eur J Plant Pathol* 2007, **118**:259-274.
- Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P: **Analysis of xylem sap proteins from *Brassica napus*.** *BMC Plant Biol* 2005, **5**:11.
- Buhtz A, Kolasa A, Arit K, Walz C, Kehr J: **Xylem sap protein composition is conserved among different plant species.** *Planta* 2004, **219**:610-618.
- Rep M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, Speijer D, Back JW, de Koster CG, Cornelissen BJ: **Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato.** *Plant Physiol* 2002, **130**:904-917.
- Young SA, Guo A, Guikema JA, White FF, Leach JE: **Rice cationic peroxidase accumulates in xylem vessels during incompatible interactions with *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*.** *Plant Physiol* 1995, **107**:1333-1341.
- Joosten MHJ, De Wit PJGM: **Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3- β -glucanases and chitinases.** *Plant Physiol* 1989, **89**:945-951.
- Segarra CI, Casalongue CA, Pinedo ML, Ronchi VP, Conde RD: **A germin-like protein of wheat leaf apoplast inhibits serine proteases.** *J Exp Bot* 2003, **54**:1335-1341.
- Burg HA, Van den, Harrison SJ, Joosten MHJ, Vervoort J, de Wit PJGM: ***Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulation during infection.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**:1420-1430.
- Ndimba BK, Chivasa S, Hamilton JM, Simon WJ, Slabas AR: **Proteomic analysis of changes in the extracellular matrix of *Arabidopsis* cell suspension cultures induced by fungal elicitors.** *Proteomics* 2003, **3**:1047-1059.
- Smolka MB, Martins D, Winck FV, Santoro CE, Castellari RR, Ferrari F, Brum I Jr, Galembeck E, Della Coletta Filho H, Machado MA, Marangoni S, Novello JC: **Proteome analysis of the plant pathogen *Xylella fastidiosa* reveals major cellular and extracellular proteins and a peculiar codon bias distribution.** *Proteomics* 2003, **3**:224-237.
- Gau AE, Koutb M, Piotrowski M, Klopstsch K: **Accumulation of pathogenesis-related proteins in the apoplast of a susceptible cultivar of apple (*Malus domestica* cv. Elstar) after infection by *Venturia inaequalis* and constitutive expression of PR genes in the resistant cultivar Remo.** *Eur J Plant Pathol* 2004, **110**:703-711.
- Chivasa S, Simon WJ, Yu X-L, Yalpani N, Slabas AR: **Pathogen elicitor-induced changes in the maize extracellular matrix proteome.** *Proteomics* 2005, **5**:4894-4904.
- Houterman PM, Speijer D, Dekker HL, De Koster CG, Cornelissen BJ, Rep M: **The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants.** *Mol Plant Pathol* 2007, **8**:215-221.
- Kaffarnik FAR, Jones AME, Rathjen JP, Peck SC: **Effector proteins of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* alter the extracellular proteome of the host plant, *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Cell Proteomics* 2008.
- Bolton MD, van Esse HP, Vossen JH, de Jonge R, Stergiopoulos I, Stulemeijer IJE, Berg GCM van den, Borrás-Hidalgo O, Dekker HL, de Koster CG, de Wit PJGM: .
- Joosten MAHJ, Thomma BPHJ: **The novel *Cladosporium fulvum* lysin motif effector Ecp6 is a virulence factor with orthologues in other fungal species.** *Mol Microbiol* 2008, **69**:119-136.
- Daebeler F, Amelung D, Zeise K: ***Verticillium Welke* an Winter-raps – Auftreten und Bedeutung.** *Nachrichtenblatt Pflanzenschutzdienst DDR* 1988, **42**:71-73.
- Fradin EF, Thomma BPHJ: **Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*.** *Mol Plant Pathol* 2006, **7**:71-86.
- Benhamou N: **Immunocytochemistry of plant defense mechanisms induced upon microbial attack.** *Microsc Res Tech* 1995, **31**:63-78.
- Gold J, Robb J: **The role of the coating response in *Craigella tomatosae* infected with *Verticillium dahliae*, race-I and race-2.** *Physiol Mol Plant Pathol* 1995, **47**:141-157.
- Williams JS, Hall SA, Hawkesford MJ, Beale MH, Cooper RM: **Elemental sulfur and thiol accumulation in tomato and defense against a fungal vascular pathogen.** *Plant Physiol* 2002, **128**:150-159.
- Johansson A, Staal J, Dixelius C: **Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on *NDRI*, *JA*- and *ET*-associated signals via cytosolic *NPRI* and *RFO1*.** *Mol Plant Microbe Interact* 2006, **19**:958-969.
- Kotake T, Tsuchiya K, Aohara T, Konishi T, Kaneko S, Igarashi K, Samejima M, Tsumuraya Y: **An α -L-arabinofuranosidase(β -D-xylosidase from immature seeds of radish (*Raphanus sativus* L.).** *J Exp Bot* 2006, **57**:2353-2362.
- Bowden RL, Rouse DI, Sharkey TD: **Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato.** *Plant Physiol* 1990, **94**:1048-1055.
- Saeed IAM, MacGuidwin AE, Rouse DI, Sharkey TD: **Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans* – and *Verticillium dahliae*-infected potato.** *Crop Sci* 1999, **39**:1340-1346.
- Sadras VO, Quiroz F, Echarre L, Escande A, Pereyra VR: **Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower.** *Ann Bot* 2000, **86**:1007-1015.
- Flörl S: **Identifizierung und Charakterisierung extrazellulärer Proteine unter dem Einfluss von *Verticillium longisporum* in *Arabidopsis thaliana* und Raps (*Brassica napus*).** In Thesis University of Göttingen; 2007.
- Veronese P, Narasimhan ML, Stevenson RA, Zhu JK, Weller SC, Subbarao KV, Bressan RA: **Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*.** *Plant J* 2003, **35**:574-587.
- Walker JC, Gallegly ME, Bloom JR, Scheffer RP: **Relation of plant nutrition to disease development. *Verticillium* wilt of tomato.** *Am J Bot* 1954, **41**:760-762.
- Sivaprakasam K, Rajagopa CK: **Effect of nitrogen on incidence of *Verticillium* wilt disease of egg plant caused by *Verticillium dahliae* Kleb.** *Plant and Soil* 1974, **40**:217-220.
- Karagiannidis N, Bletsos F, Stavropoulos N: **Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings.** *Sci Hort* 2002, **94**:145-156.
- Bayer EM, Bottrill AR, Walshaw J, Vigouroux M, Naldrett MJ, Thomas CL, Maule AJ: ***Arabidopsis* cell wall proteome defined using multidimensional protein identification technology.** *Proteomics* 2006, **6**:301-311.
- Boudart G, Jamet E, Rossignol M, Lafitte C, Borderies G, Jauneau A, Esquerre-Tugaye MT, Pont-Lezica R: **Cell wall proteins in apoplastic fluids of *Arabidopsis thaliana* rosettes: Identification by mass spectrometry and bioinformatics.** *Proteomics* 2005, **5**:212-221.
- Slabas AR, Ndimba B, Simon WJ, Chivasa S: **Proteomic analysis of the *Arabidopsis* cell wall reveals unexpected proteins with new cellular locations.** *Biochem Soc Transac* 2004, **32**:524-528.
- Charmont S, Jamet E, Pont-Lezica R, Canut H: **Proteomic analysis of secreted proteins from *Arabidopsis thaliana* seedlings: improved recovery following removal of phenolic compounds.** *Phytochem* 2005, **66**:453-461.
- Saha BC: **α -L-arabinofuranosidases: biochemistry, molecular biology and application in biotechnology.** *Biotechnol Adv* 2000, **18**:403-423.
- Doxey AC, Yaish MWF, Moffatt BA, Griffith M, McConkey BJ: **Functional divergence in the *Arabidopsis* β -1,3-glucanase gene family inferred by phylogenetic reconstruction of expression states.** *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1045-1055.
- McFadden HG, Chapelle R, de Feyter R, Dennis E: **Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*.** *Physiol Mol Plant Pathol* 2001, **58**:119-131.
- Dubery IA, Slater V: **Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*.** *Phytochem* 1997, **44**:1429-1434.
- Park Y-S, Jeon MH, Lee S-H, Moon JS, Cha J-S, Kim HY, Cho T-J: **Activation of defense responses in chinese cabbage by a nonhost pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. tomato.** *J Biochem Mol Biol* 2005, **38**:748-754.
- Ryang S-H, Chung S-Y, Lee S-H, Cha J-S, Kim HY, Cho T-J: **Isolation of pathogen-induced chinese cabbage genes by subtractive**

- hybridization employing selective adaptor ligation. *Biochem Biophys Res Comm* 2002, **299**:352-359.
42. Park Y-S, Cho T-J: Isolation and characterization of methyl jasmonate-inducible genes in chinese cabbage. *Kor J Biol Sci* 2003, **7**:337-343.
 43. Broglie KE, Gaynor JJ, Broglie RM: Ethylene-regulated gene expression: molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:6820-6824.
 44. Mauch F, Staehelin LA: Functional implications of the subcellular localization of ethylene-induced chitinase and β -1,3-glucanase in bean leaves. *Plant Cell* 1989, **1**:447-457.
 45. Petruzzelli L, Kunz C, Waldvogel R, Meins F Jr, Leubner-Metzger G: Distinct ethylene- and tissue-specific regulation of β -1,3-glucanases and chitinases during pea seed germination. *Planta* 1999, **209**:195-201.
 46. Murashige T, Skoog F: A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962, **15**:473-497.
 47. Polle A, Chakrabarti K, Schurmann W, Rennenberg H: Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst). *Plant Physiol* 1990, **94**:312-319.
 48. Scholander PF, Hammel HT, Bradstre ED, Hemmings EA: Sap pressure in vascular plants - Negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* 1965, **148**:339-346.
 49. Fahleson J, Lagercrantz U, Hu Q, Steventon LA, Dixelius C: Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *Eur J Plant Pathol* 2003, **109**:361-371.
 50. Schneider A: Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des *AtSUC2*-Promotors beim Sink-Source-Übergang im Blatt und Analyse der Gene *AtINT2* und *AtINT4*. In Thesis University of Erlangen-Nürnberg; 2005.
 51. Maxwell K, Johnson GN: Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *J Exp Bot* 2000, **51**:659-668.
 52. Lichtenthaler HK, Wellburn AR: Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc Trans* 1983, **11**:591-592.
 53. Heinrichs H, Brumsack HJ, Löffel N, König N: Verbessertes Druckaufschlußsystem für biologische und anorganische Materialien. *Zeitschr Pflanzenemähr Bodenk* 1986, **149**:350-353.
 54. Bergmeyer HU, Rozalskis G: K_m of malate dehydrogenase from pig heart with oxaloacetate as substrate. *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie* 1975, **13**:509.
 55. Görg A, Weiss W: Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. In *Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods* Edited by: Rabilloud J. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 2000:57-106.
 56. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, **227**:680-685.
 57. Neuhoff V: Colloid Coomassie Blue staining of proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990, **371**:A10-A11.
 58. Blum H, Beier H, Gross HJ: Improved silver staining of plant-proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 1987, **8**:93-99.
 59. Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A: Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 2003, **75**:1300-1306.
 60. Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G: Predicting sub-cellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 2000, **300**:1005-1016.
 61. Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W: GEN-ESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 2004, **136**:2621-2632.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp

DISEASE SYMPTOMS AND MINERAL NUTRITION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* IN RESPONSE TO *VERTICILLIUM LONGISPORUM* VL43 INFECTION

S. Floerl¹, C. Druebert¹, H.I. Aroud², P. Karlovsky² and A. Polle¹

¹Institut für Forstbotanik, Abteilung: Forstbotanik und Baumphysiologie, Büsgenweg 2, 37077 Göttingen, Germany

²Department für Nutzpflanzenwissenschaften, Abteilung: Molekulare Phytopathologie und Mykotoxinforschung, Grisebachstr. 6, 37077 Göttingen, Germany

SUMMARY

Verticillium longisporum is one of the most important pathogens of Brassicaceae. The goal of the present study was to characterize the development of *V. longisporum* (strain VL43) stress symptoms caused to *Arabidopsis thaliana* in relation to plant nutrition. Significant growth inhibition became apparent between 2 and 3 weeks after VL43 inoculation but was not accompanied by reduced leaf water content or wilting. The leaves of VL43-infected plants showed reduced chlorophyll content (-20%) but only marginal effects on photosynthetic electron transport of PS II (-2%) compared with controls. VL43-infection did not have negative effects on nutrient element concentration in leaf tissues during a five-week observation period. Measurements of fungal nutrient content in simulated xylem medium suggested that nutrient intake by VL43 was negligible compared to that of plant tissues. Therefore, growth retardation induced by VL43 infection is not a consequence of nutrient depletion.

Key words: Brassicaceae, chlorosis, nutrients, photosynthesis, soil pathogen, stunting.

INTRODUCTION

Verticillium species are soil-borne fungi with worldwide distribution, causing vascular diseases in many plant species including a vast range of economically important crops and trees. *V. dahliae* is probably the most frequent and widespread pathogen. However, *V. longisporum*, which occurs predominately in crucifers (Zeise and Tiedemann, 2002), is one of the most important disease agents of oilseed rape in Europe, whereas *V. dahliae* is not, or little pathogenic to *Brassica napus* (Karapapa *et al.*, 1997; Eynck *et al.*, 2007). *V. longisporum* has probably evolved by parasexual hybridization between a strain of *V. albo-atrum* and a strain of *V.*

dahliae (Karapapa *et al.*, 1997). Typical disease symptoms of *Verticillium* infections are wilting, stunting, chlorosis and premature senescence (Fradin and Thomma, 2006).

All crucifer isolates of *Verticillium* produce thick-walled melanised microsclerotia which can survive for more than a decade in the soil. Their germination is stimulated by root exudates following which the fungus penetrates host roots and spreads systemically in the xylem (Fradin and Thomma, 2006). Until the very late stages of infection, *Verticillium* species remain strictly xylem-localized. Spreading in the xylem results in partial vessel occlusion by deposits secreted by neighbouring parenchyma cells (Benhamou, 1995). These obstructions may block transport through the vessels, thus delaying the fungus movement. Since obstructions can be expected to affect water and nutrient transport, disease symptoms such as wilting, stunting and chlorosis have been suggested to occur as the consequence of nutrient limitations or drought stress due to reduced water transport in the xylem (Johansson *et al.*, 2006). In fact, young, still symptomless leaves of potato plants infected by *Verticillium dahliae* displayed lower carbon assimilation than non-infected plants as the result of stomatal limitations (Bowden *et al.*, 1990). However, the effect was age-dependent and affected only some leaf areas (Saeed *et al.*, 1999). Data on plant nutritional status during *Verticillium* sp. infections are scarce (Karagiannidis *et al.*, 2002; Floerl *et al.*, 2008). To understand disease symptoms, which may lead to massive yield loss, it is important to know whether this pathogen compromises vital functions such as plant mineral nutrition and photosynthesis.

The goal of the present study was to provide a comprehensive characterization of the development of *Verticillium*-induced stress symptoms during the growth of *Arabidopsis* and to find out whether these symptoms were caused by effects on nutrition and photosynthesis. For this purpose, growth reduction, chlorosis, photosynthetic electron transport, and changes in macro- and micro-nutrients were measured in *Arabidopsis thaliana* (ecotype Col-0) infected with *V. longisporum* strain VL43 from *Brassica napus* (Zeise and Tiedemann, 2002). Since VL43 present in leaves also sequesters nutrients, we determined optimum fungal nutrition in a synthetic

Corresponding author: A. Polle
Fax: +49.551.3922705
E-mail: apolle@gwdg.de

medium and used these data to assess the upper limit of nutrients incorporated by the pathogen.

MATERIALS AND METHODS

***Arabidopsis* growth conditions.** Seeds of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia-0) were sown on MS-medium (Murashige and Skoog, 1962) and stored for 3 days at 4°C, then transferred to 20°C, 60% relative humidity, and a light intensity of 120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photosynthetically active radiation with an 8 h light/16 h dark cycle. After four weeks, seedlings were used for infection.

Fungal culture. Stock cultures of *V. longisporum* were stored in potato dextrose medium (PDB, Scharlau, Spain) with 20% glycerol at -80°C. For sporulation, the cultures were grown on potato dextrose agar at 22°C for 4 weeks, then transferred to 250 ml liquid potato dextrose medium (Scharlau, Spain) with 0.2 mg ml⁻¹ streptomycin sulphate (Sigma, Germany) as described by Fahleson *et al.* (2003). The culture was incubated at 22°C with horizontal shaking (80 rpm) for 14 days in darkness. The fungal suspension was filtered and centrifuged for 10 min at 900 g. The pellet was diluted to 2×10^6 conidia/ml and used for inoculation.

Infection of *Arabidopsis* with *V. longisporum* and assessment of disease symptoms. Four-week-old *Arabidopsis* plants were removed from the agar and their root tips were cut. During planting, the roots were placed into a small hole in the soil and were drenched with 10 ml of *V. longisporum* suspension containing 2×10^6 conidia/ml. Control plants were treated in the same way and mock-inoculated with sterile water. The plants (40 per treatment and experiment) were grown under the same conditions specified above, watered with tap water and fertilized twice a week with Wuxal (Aglucon, Germany).

Consequences of infection were monitored by measuring the leaf area development of the plants. For this purpose, the rosettes of all plants were photographed regularly (Digital-Camera: Casio QV R52) for 35 days post inoculation and the projected area of each rosette was recorded using *Image J* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). During the experimental period whole rosettes were harvested regularly (n=6 plants per sampling date) and stored at -80°C for further analysis.

Quantification of *Verticillium longisporum* DNA in plant tissue. Leaves were ground in liquid nitrogen to a fine powder and DNA was extracted using DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Germany). The amount of fungal DNA was determined by real-time PCR with the *Verticillium* sp.-specific primers 5'-CAGCGAAACGC-GATATGTAG-3' and 5'-GGCTTGTTAGGGGGTT-TAGA-3' (Eynck *et al.*, 2007). Calibration curves were

Fig. 1. Real-time PCR assay for *Verticillium longisporum*. Calibration curves were constructed by plotting threshold cycle values (Ct) against the amount of template DNA as described (Eynck *et al.*, 2007).

constructed with purified fungal DNA dissolved in a solution of plant DNA extracted from non-infected plants (matrix standards, Fig. 1).

Determination of specific DNA content of *V. longisporum* mycelium. *V. longisporum* was grown in simulated xylem sap (Neumann and Dobinson, 2003) for up to 28 days at 22°C without shaking. Mycelium was harvested by filtration, rinsed briefly with tap water and freeze-dried. DNA was extracted using the CTAB protocol (Brandfass and Karlovsky, 2006). The DNA preparation obtained was diluted 100- to 500-fold and the content of *V. longisporum* DNA was determined by real-time PCR (Eynck *et al.*, 2007) using preparations of pure fungal DNA as standards. To assess the completeness of fungal DNA extraction, the pellet obtained after centrifugation of mycelium lysate and the interlayer formed after chloroform/isopropanol extraction were re-extracted with buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and checked for DNA presence by agarose electrophoresis. No detectable DNA was found, showing that the extraction of DNA from fungal mycelium was complete.

Chlorophyll fluorescence. Chlorophyll fluorescence was measured in ambient light (120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of photosynthetic active radiation, 20°C, 60% relative air humidity) and on dark-adapted leaves using the Mini PAM system (Walz, Germany). The quantum yield of photochemistry was calculated as described by Maxwell and Johnson (2000):

$$\phi = (F_m - F_o) / F_m$$

with F_m and F_o referring to maximum and background fluorescence, respectively, in darkness and with

$$\phi_{(acute)} = (F_m' - F_t) / F_m'$$

with F_m' and F_t referring to maximum and background fluorescence in the light, respectively. Initially 40 plants

per treatment were measured. At each date six plants were removed for biochemical analysis, resulting in decreasing "n" during the time course of the experiment. At the final date n = 6 plants were measured per treatment.

Chlorophyll concentration. Frozen leaf material was milled in liquid nitrogen and extracted in 80% acetone. After centrifugation (10,000 g, 10 min) the pigment concentration of the supernatant was determined spectrophotometrically (Beckman DU 640) at 646 nm and 663 nm. The chlorophyll concentration was determined as the sum of chlorophyll a and b (Lichtenthaler and Wellburn, 1983).

Water content and nutrient elements. Leaves were harvested, weighed and dried at 60°C. The water content was determined as (fresh mass-dry mass)×100/fresh mass. In addition to plant tissues, freeze-dried fungal tissues obtained after growth in simulated xylem medium (see above) were used for nutrient analyses. The dry material was milled to a fine powder (MM2 Retsch, Germany). Aliquots of the powder were extracted with HNO₃ (Heinrichs *et al.*, 1986) and subjected to inductively coupled optical emission spectroscopy (Spectroflame, Spectro Analytical Instruments, Germany). For carbon and nitrogen, leaf powder was weighed into tin capsules and measured in a CNS-elemental analyser (Carlo Erba Instruments, Italy).

To assess nutrient partitioning between plant and *V. longisporum* in infected leaves, we calculated the amount of an element (E_f) per fungal DNA_f for pure fungal cultures:

$$E_f/\text{DNA}_f \text{ (mg } \mu\text{g}^{-1}) = (\text{mg of } E_f/\text{g of fungal dry mass}) / (\mu\text{g of DNA}_f/\text{g of fungal dry mass}).$$

This calculation was conducted at each harvest date, yielding three mean values for each element. These data were used to calculate the relative fraction of E associated with the fungus in infected leaves:

$$\text{Fraction of } E_f \text{ of total E in infected leaves (\%)} = [(E_f/\text{DNA}_f) \times \text{DNA}_f \text{ in plant} \times 100] / (\text{mg of total } E/\text{g of leaf dry mass}).$$

Element and fungal DNA amounts in *Arabidopsis* were used for the harvest dates 21, 28, 35 days post inoculation yielding, with three values for E_f/DNA_f , a total of nine estimates per element, which were presented as box plots to show the range covered by these assessments.

Osmotic pressure. Aliquots of dry leaf powder were extracted with distilled water. After centrifugation at 900g for 25 min the osmolality (osmol kg⁻¹) of the supernatant was determined in a Cryo-osmometer (Osmomat 030, Ganotec, Germany). The osmotic pressure (MPa) was calculated as:

$$\text{osmolality}_{(\text{supernatant})} \times \text{dilution factor} \times R \times T$$

with $R = 0.00831 \text{ (L} \times \text{MPa} \times \text{mol}^{-1} \times \text{K}^{-1})$ and $T = 295 \text{ K}$ (absolute temperature).

Statistical analyses. Data are shown as means. The number of biological replicates was n = 6, if not indicated differently in the figure legends. Statistical analysis (ANOVA, multiple range test) was performed using Statgraphics (Centurion XV, USA).

RESULTS

Verticillium infection causes growth reduction, chlorosis of leaf tissues, affects PSII activity but not plant water relations. Infection with *V. longisporum* VL43 caused a drastic reduction in projected rosette area compared with controls (Fig. 2 A,B). The difference in time course between expansion and fresh mass was mainly caused by the fact that the VL43 coloniza-

Fig. 2. Development of projected rosette area (A) and fresh mass of rosette (B) after infection with *Verticillium longisporum* and of mock-inoculated *Arabidopsis thaliana* plants. The projected leaf area and fresh mass was determined per plant. Data are means (n = 6, ± SE). Stars indicate significant differences between treatments at $P \leq 0.05$.

tion initially resulted mainly in stunting of *Arabidopsis* plants because petiole elongation was severely inhibited.

In both controls and VL43-infected plants, the amount of chlorophyll declined with plant age; however, this effect was more pronounced in infected plants (Fig. 3). Overall, on a fresh mass basis infected plants contained 20% less chlorophyll than non-infected plants. Quantum yield of photochemistry (ϕ) was determined to obtain information on photosystem II activity. Very small but significant reduction in ϕ was found in response to VL43 infection in ambient light (-2%) and in darkness (-1%, Fig. 4). The influence of VL43 infec-

Fig. 3. Chlorophyll content in leaves of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Verticillium longisporum* and in mock-inoculated controls. Data are means ($n = 6$, $\pm$ SE). Stars indicate significant differences between treatments at $P \leq 0.05$.

Fig. 4. Chlorophyll fluorescence of leaves of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Verticillium longisporum* and mock-inoculated controls. The maximum quantum yield of photosystem II was measured on dark-adapted leaves (circles) and the acute quantum yield was measured in ambient light ($120 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ of photosynthetic active radiation) (triangles). Stars indicate significant differences between treatments at $P \leq 0.05$.

Table 1. Water relations in *Arabidopsis thaliana* leaves. Data are means of $n = 8$ ($\pm$ SE) plants measured at 25 days post inoculation after infection with *Verticillium longisporum* strain 43.

	Mock-inoculated	VL43-infected
Relative water content (%)	91.7 $\pm$ 0.7	93.3 $\pm$ 0.8**
Osmotic pressure (MPa)	0.893 $\pm$ 0.014	0.843 $\pm$ 0.018*

Significant differences between treatments are marked as

* ($P \leq 0.05$) and ** ($P \leq 0.01$).

tion on PSII activity was, thus, much lower than that on chlorophyll content. Neither effect was detectable in old plants.

To find out whether the water relations were disturbed, we determined leaf water content and osmotic pressure at 25 days post inoculation. No evidence of drought stress was obtained since VL43-infected plants contained slightly more water and osmotic pressure was lower than in non-infected plants (Table 1).

Verticillium does not have any negative effects on Arabidopsis nutrient relations. Concentrations of macro- and micro-nutrients in the leaves were measured regularly after VL43 infection of *Arabidopsis*. Among the major nutrient elements P, N, K, and S, no pronounced age-dependent nor VL43-induced decreases were observed (Fig. 5A-D). The C/N ratio of the leaves was also unaffected and amounted 5.4 throughout the whole time course of the experiment (data not shown). In VL43-infected plants the concentration of phosphorus was higher than in non infected plants (Fig. 5B). Other nutrient elements showed small and inconsistent changes in response to VL43. Calcium was accumulated with increasing age to an about 10% higher concentration than that of controls (Fig. 5E). The magnesium concentration of infected plants was initially lower than that of non-infected plants, but this difference disappeared three weeks post infection (Fig. 5F), when stunting symptoms became pronounced (Fig. 2A). The manganese content fluctuated with age ranging from 90 to $150 \mu\text{g g}^{-1}$ dry mass (Fig. 5G). Although the time courses of these fluctuations in infected and non-infected plants were different, the amplitudes were similar (Fig. 5G). The iron concentration decreased until 4 weeks post infection. There were no differences between infected and non-infected plants (Fig. 5H).

When the element concentrations in VL43 mycelium grown in xylem sap-simulating medium were determined, the content of N, P, S, K, and Mn decreased during cultivation, whereas Mg increased (Fig. 5). Young fungal mycelium contained higher concentrations of P than *Arabidopsis* leaves (Fig. 5B). The concentrations of most other elements were lower in VL43 than in *Arabidopsis* (Fig. 5).

To assess the fraction of elements present in VL43 in

Fig. 5A-D. Nitrogen (A), phosphorus (B), sulphur (C) and potassium concentrations (D) in the leaves of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Verticillium longisporum* (full circles) and in mock-inoculated controls (open circles) and in fungal tissues grown in pure culture (open triangles). Data are means ($n = 6$, $\pm$ SE). Stars indicate significant differences between treatments at $P \leq 0.05$ for plants and letters indicate differences due to increasing culture time in *V. longisporum*.

infected leaves and thus not available for the plant, we determined the amount of fungal DNA in fungal tissues grown in simulated xylem medium as well as in plant leaves (Fig. 6). The amount of fungal biomass in infected plant leaves contributed approximately 0.001% to their dry mass. With this figure and the known nutrient content of fungal mycelium, the fraction of mineral nutrients sequestered by the fungus within plant tissue was estimated (Fig. 7). The mean fractions of nutritional elements present in the fungus in infected leaves were $0.0008 \pm 0.0003\%$ of the total leaf contents, except for iron whose fractions was slightly higher (0.006%). Even if we assume that fungal nutrient demand *in planta* exceeded the demand of mycelium grown *in vitro* by one or two orders of magnitudes, the effect of fungal consumption of mineral nutrients on the plant would be negligible. Therefore, we found no evidence that fungal infection caused nutrient deficiencies in *Arabidopsis*.

DISCUSSION

In the present study we documented that the growth reduction in *Arabidopsis*, which became very pronounced between two and three weeks post inoculation with *V. longisporum*, was not caused by foliar nutrient deficiencies but was mainly related to decreased elongation of the petioles. This finding does not support the hypothesis that insufficient supply with nitrogen or other major nutrients might have affected plant growth. This agrees with previous findings showing that VL43 infection did not cause nutrient deficiencies in oilseed rape (Floerl *et al.*, 2008). One might argue that in infected leaves the fungus may bind significant amounts of nutrients and that despite high total foliar nutrient concentrations the availability for the plant may be limited. To obtain an estimate for the amount of nutrients sequestered by the fungus in the leaf tissue, we deter-

Fig. 5E-H. Calcium (E), magnesium (F), manganese (G) and iron concentrations (H) in the leaves of *Arabidopsis thaliana* after infection with *Verticillium longisporum* (full circles) and in mock-inoculated controls (open circles) and in fungal tissues grown in pure culture (open triangles). Data are means ($n = 6$, $\pm$ SE). Stars indicate significant differences between treatments at $P \leq 0.05$ for plants and letters indicate differences due to increasing culture time in *V. longisporum*.

mined the content of mineral elements in fungal mycelium grown in a medium with a composition similar to xylem sap. Although culture conditions *in vitro* differ from the situation *in planta*, the data provide a reasonable estimate for the maximum amounts of mineral nutrients withheld off the plant by the fungus.

Nitrogen deficiencies have been shown to cause chlorosis in *Arabidopsis* (Hanaoka *et al.*, 2002). Since there was no evidence that fungal proliferation sequestered a significant fraction of nitrogen, N limitation was not the cause of chlorophyll loss observed during *Verticillium* infection.

Potassium acts in plants as a major osmolyte and is critically involved in cell expansion growth (O'Toole *et al.*, 1980). Our data do not support K deficiency as a cause of stunting of VL43-infected plants.

Surprisingly, VL43-infected plants displayed increased phosphorus concentrations. Since this effect was also observed in tomato and eggplants infected with

V. dahliae (Karagiannidis *et al.*, 2002), it seems that *Verticillium* infection influences the metabolism of phosphorus. Notably, microarray analysis revealed induction of the inorganic phosphate transporter gene *LePT2* in *V. dahliae*-infected tomato roots (Van Esse *et al.*, 2009). Whether this effect is relevant for fungal infection or plant physiology is unknown. However, it has been shown that plants well supplied with nutrients, especially nitrogen and phosphorus, are more susceptible to *V. dahliae* infection than starved plants (Sivaprakasam and Rajagopalan, 1972), whereas iron deficiency increases *Verticillium* infection of tomatoes (Macur *et al.*, 1991). These reports underline the importance of interactions between fungal infection and plant nutritional status, but our data do not support that *Verticillium* infection itself reduces plant nutrition.

It is possible that the observed chlorophyll loss was the result of phytotoxin action. Evidence for the role of phytotoxins in *Verticillium*-plant interactions has been

Fig. 6. Changes of fungal DNA during cultivation in artificial medium (A) and in *Arabidopsis thaliana* leaves (B). Data are means ($n = 4$ for the fungal cultures and $n = 6$ for plant tissues, $\pm$ SE). Significant differences at $P \leq 0.05$ are indicated by letters.

Fig. 7. Assessment of element partitioning in infected leaves of *Arabidopsis thaliana* between *Verticillium longisporum* and plant tissue. All possible combinations of element concentrations per fungal tissue and plant were calculated and are shown as box plots with maximum and minimum values (x) and mean (open square) and median (horizontal line in box).

provided by numerous studies (Fradin and Thomma, 2006). For example, Mansoori *et al.* (1995) isolated a heat stable toxin (MW < 1000) from the culture fluid of *V. dahliae*, which caused chlorosis and necrosis of leaf discs. Others reported that a protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium* sp. acted as phytotoxin (Fradin and Thomma, 2006). Since the toxins were isolated from culture fluids, it is unclear whether they are also formed in infected plants.

Phytotoxin production by *V. longisporum* has not been reported. Fungal phytotoxins often disrupt the integrity of photosynthetic electron transport (Kshirsagar *et al.*, 2001). Our data indicate that the loss in chlorophyll had only small impact on the quantum yield of

PSII. The slightly stronger decrease of quantum yield in light than in darkness in VL43-infected plants might have been the result of small effects on stomatal opening as reported by others (Bowden *et al.*, 1990; Saeed *et al.*, 1999; Sadras *et al.*, 2000) and was not indicative for direct injury of PSII or CO₂ assimilatory enzymes. In fact, microarray analysis of *V. dahliae* responsive genes in tomato revealed increased transcript abundance of several genes involved in photosynthesis (Robb *et al.*, 2007). These data contrast those of Veronese *et al.* (2003) who showed significant loss in Rubisco transcripts in *Arabidopsis* infected with *V. dahliae*. Although *V. dahliae* is non-pathogenic to several cultivars of oilseed rape (Karapapa *et al.*, 1997; Eynck *et al.*, 2007), it caused significant stunting and chlorosis in *Arabidopsis*. However, the response varied between different ecotypes, cv. Columbia being among the most sensitive ones (Veronese *et al.*, 2003).

In conclusion, our data show that *V. longisporum*, one of the most important pathogens of Brassicaceae, infects also *A. thaliana*. While VL43 caused strong stunting of the stem of oil seed rape (Floerl *et al.*, 2008), it suppresses leaf expansion in *Arabidopsis* which, according to our results, is not caused by nutrient depletion.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to A. von Tiedemann for providing *V. longisporum* strain VL43 and to M. Franke-Klein for excellent technical assistance. We thank the German Science Foundation for financial support to FOR 546 (PO362/15-1,15-2).

REFERENCES

- Benhamou N., 1995. Ultrastructural and cytochemical aspects of the response of eggplant parenchyma cells in direct contact with *Verticillium*-infected xylem vessels. *Physiology and Molecular Plant Pathology* **46**: 321-338.
- Bowden R.L., Rouse D.I., Sharkey T.D., 1990. Mechanism of photosynthesis decrease by *Verticillium dahliae* in potato. *Plant Physiology* **94**: 1048-1055.
- Brandfass C., Karlovsky P., 2006. Simultaneous detection of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in plant material by duplex PCR with melting curve analysis. *BMC Microbiology* **6**: 4.
- Eynck C., Koopmann B., Grunewaldt-Stoecker G., Karlovsky P., Tiedemann A., 2007. Differential interactions of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* with *Brassica napus* detected with molecular and histological techniques. *European Journal of Plant Pathology* **118**: 259-274.
- Fahleson J., Lagercrantz U., Hu Q., Steventon L.A., Dixelius C., 2003. Estimation of genetic variation among *Verticillium* isolates using AFLP analysis. *European Journal of Plant Pathology* **109**: 361-371.

- Floerl S., Drübert C., Majcherczyk A., Karlovsky P., Kües U., Polle A., 2008. Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. *BMC Plant Biology* 8: 129.
- Fradin E.F., Thomma B.P.H.J., 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology* 7: 71-86.
- Hanaoka H., Noda T., Shirano Y., Kato T., Hayashi H., Shibata D., Tabata S., Ohsumi Y., 2002. Leaf senescence and starvation-induced chlorosis are accelerated by the disruption of an *Arabidopsis* autophagy gene. *Plant Physiology* 129: 1181-1193.
- Heinrichs H., Brumsack H.J., Loftfield N., König N., 1986. Verbessertes Druckaufschlusssystem für biologische und anorganische Materialien. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde* 149: 350-353.
- Johansson A., Goud J.-K., Dixelius C., 2006. Plant host range of *Verticillium longisporum* and microsclerotia density in Swedish soils. *European Journal of Plant Pathology* 114: 139-149.
- Karagiannidis N., Bletsos F., Stavropoulos N., 2002. Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae* 94: 145-156.
- Karapapa V.K., Bainbridge B.W., Heale J.B., 1997. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape. *Mycological Research* 101: 1281-1294.
- Kshirsagar A., Reid A.J., McColl S.M., Saunders V.A., Whalley A.J.S., Evans H.E., 2001. The effect of fungal metabolites on leaves as detected by chlorophyll fluorescence. *New Phytologist* 151: 451-457.
- Lichtenthaler H.K., Wellburn A.R., 1983. Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochemical Society Transactions* 11: 591-592.
- Macur R.E., Mathre D.E., Olsen R.A., 1991. Interactions between iron nutrition and *Verticillium* wilt resistance in tomato. *Plant and Soil* 134: 281-286.
- Mansoori B., Milton J.M., Smith C.J., 1995. Isolation and partial purification of a phytotoxin related to pathogenic *Verticillium* species. *Journal of Phytopathology* 143: 33-36.
- Maxwell K., Johnson G.N., 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Neumann M.J., Dobinson K.E., 2003. Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology* 38: 54-62.
- O'Toole J.C., Treharne K., Turnipseed M., Crookston K., Ozburn J., 1980. Effect of potassium nutrition on leaf anatomy and net photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* L. *New Phytologist* 84: 623-630.
- Robb J., Lee B., Nazar R.N., 2007. Gene suppression in a tolerant tomato-vascular pathogen interaction. *Planta* 226: 299-309.
- Sadras V.O., Quiroz F., Echarte L., Escande A., Pereyra V.R., 2000. Effect of *Verticillium dahliae* on photosynthesis, leaf expansion and senescence of field-grown sunflower. *Annals of Botany* 86: 1007-1015.
- Saeed I.A.M., MacGuidwin A.E., Rouse D.I., Sharkey T.D., 1999. Limitation to photosynthesis in *Pratylenchus penetrans*- and *Verticillium dahliae*-infected potato. *Crop Science* 39: 1340-1346.
- Sivaprakasam K., Rajagopalan C.K.S., 1974. Effect of nitrogen on the incidence of *Verticillium* wilt disease of egg plant caused by *Verticillium dahliae* Kleb. *Plant and Soil* 40: 217-220.
- van Esse H.P., Fradin E.F., de Groot P.J., de Wit P.J.G.M., Thomma B.P.H.J., 2009. Tomato transcriptional responses to a foliar and a vascular fungal pathogen are distinct. *Molecular Plant Microbe Interactions* 22: 245-258.
- Veronese P., Narasimhan M.L., Stevenson R.A., Zhu J.K., Weller S.C., Subbarao K.V., Bressan R.A., 2003. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 35: 574-587.
- Zeise K., von Tiedemann A., 2002. Host specialization among vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in relation to *Verticillium longisporum*. *Journal of Phytopathology* 150: 112-119.

Received March 9, 2010

Accepted May 24, 2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Andrea Polle für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die damit verbundene Betreuung dieser Doktorarbeit und die vielen Anregungen zur experimentellen Durchführung sowie zur Gestaltung dieser Arbeit bedanken.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Christiane Gatz für Übernahme des Korreferates und die Teilnahme an meinem Thesis Committee bedanken.

Bei Dr. Thomas Teichmann, Prof. Dr. Petr Karlovsky, Prof. Dr. Jan Schirawski und Prof. Dr. Stefanie Pöggeler möchte ich mich dafür bedanken, dass sie sich als weitere Prüfer für die Disputation zur Verfügung gestellt haben.

Für die Finanzierung dieser Arbeit, die im Rahmen der Forschergruppe 546 durchgeführt wurde, bedanke ich mich bei der DFG. In dem Zusammenhang möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Verticillium-Forschergruppe 546 für die gute Zusammenarbeit und den Informationsaustausch während der monatlichen Treffen bedanken. Im Besonderen möchte ich der AG Karlovsky für die zahlreichen qRT-PCR-Messungen und die Zusammenarbeit im Hinblick auf die Xylemsaft-Wachstumsversuche bedanken. Der AG Teichmann danke ich für die gute Kooperation bei dem „Projekt Transdifferenzierung“. Von der AG Tiedemann haben wir VL43 und Raps bekommen. Dafür einen ganz herzlichen Dank. Weiterhin möchte ich der AG Gatz und der AG Dröge-Laser für diverse Vektoren, E.colis und Arabidopsis-Samen danken. Außerdem möchte ich mich bei Martin Fulda und der AG Feußner für die Ratschläge bei den Hefe-Experimenten danken. Bei Stefanie Götze und Mareike Possienke aus der AG Feußner bedanke ich mich für die nette Zusammenarbeit während der gemeinschaftlichen Arabidopsis-Versuche.

Aus der Abteilung Forstbotanik möchte ich vor allem Saskia Flörl herzlich danken. Durch ihre gute Vorarbeit ist dieses Projekt erst möglich geworden. Außerdem hat sie mich zu Beginn meiner Arbeit in die Geheimnisse und Tricks der Verticillium-Infektion eingewiesen. Danke hierfür! Bei Monika Franke-Klein möchte ich mich für die Hilfe beim Retschen, Xylemsaft-Pressen, Ernten und für diverse Extraktionen und Messungen bedanken. Marianne Smiatacz danke ich ebenfalls für die Hilfe bei einigen Ernten und für das Xylemsaft-Pressen, außerdem für die Erledigung der zahllosen „kleinen“ Dinge für die

Allgemeinheit. Merle Fastenrath danke ich für die große Hilfe bei der Anatomie und bei den GUS-Ernten. Im Zusammenhang mit der Anatomie möchte ich mich auch ganz herzlich bei Andrea Olbrich, Jasmin Seven, Karin Lange, Christa Lang und Frau Dr. Rosemarie Heyser für den Austausch vieler nützlicher Tips bedanken. Prof. Dr. Gertrud Lohaus danke ich für die Aminosäure-Messungen. Ein besonderer Dank geht an Mona Quambusch, die mir während ihrer Zeit als HiWi bei vielen Arbeiten geholfen hat. Christine Kettner, Gisbert Langer-Kettner, Sabine Elend, Viktoria Pfander, Thomas Klein und Gabi Lehmann haben mich ebenfalls unterstützt. Danke hierfür! Bernd Kopka danke ich für die Hilfe bei Computerproblemen und für das Drucken diverser Poster.

Für die nette Arbeitsatmosphäre, viele gemeinschaftliche Mensa-Gänge und Mittagspausen in der Sonne danke ich Andrea Olbrich, Christa Lang, Jasmin Seven, Kerttu Valtanen, Peter Hawighorst, Dennis Janz, Lara Danielsen, Franziska Biedermann, Katharina Platner, Annette Naumann und Caroline Carsjens. Meiner Bürokollegin Rodica Pena danke ich für die vielen aufmunternden Gespräche zwischendurch. Ihr, Christa Lang und Lara Danielsen danke ich auch für die vielen hilfreichen Statistik-Diskussionen. Allen anderen aus der Abteilung danke ich für die Hilfsbereitschaft und die nette, internationale Atmosphäre.

Ein großes Dankeschön möchte ich an meine Freunde und meine Familie, besonders an meine Eltern, richten, die mich während der ganzen Doktorarbeit immer wieder aufgemuntert und unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meinem Schatz Christoph Weiste, der mich während der gesamten Zeit der experimentellen Arbeit und vor allem während des anstrengenden Zusammenschreibens trotz eigener Doktorarbeit so liebevoll unterstützt hat. Danke.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Christine Drübert
Geburtsdatum: 22.09.1980
Geburtsort: Volkmarsen

Schulbildung

1987 - 1991 Kugelsburgschule, Volkmarsen (Grundschule)
1991 - 2000 Christian-Rauch-Schule, Bad Arolsen (Gymnasium)
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

2000 - 2001 Freiwilliges Ökologisches Jahr

Wissenschaftlicher Werdegang

Okt. 2001 - Jan. 2007 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität Göttingen; Abschluss: Diplom-Biologin

Febr. 2004 – Dez. 2004 Auslandspraktikum und Mitarbeit an einer Publikation im Rahmen eines Forschungsprojektes

März 2006 - Dez. 2007 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel „Einfluss des Kohlenstoffhaushaltes auf die Mykorrhizierung bei Buchen (*Fagus sylvatica* L.)“ in der Abteilung Forstbotanik und Baumphysiologie des Büsgen-Instituts der Universität Göttingen

April 2007 - Sept. 2007 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Abteilung Forstbotanik und Baumphysiologie des Büsgen-Instituts der Universität Göttingen

seit Okt. 2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Abteilung Forstbotanik und Baumphysiologie des Büsgen-Instituts der Universität Göttingen; Anfertigung der Dissertation „Funktionelle Charakterisierung von aoplastischen Proteinen in *Brassica napus* und *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit *Verticillium longisporum*“

Publikationen

Floerl S., **Druebert C.**, Aroud H.I, Karlovsky P., Polle A. (2010): Disease symptoms and mineral nutrition in *Arabidopsis thaliana* in response to *Verticillium longisporum* VL43 infection. Journal of Plant Pathology 92 (3): 695-702.

Druebert C., Lang C., Valtanen K., Polle A. (2009): Beech carbon productivity as driver of ectomycorrhizal abundance and diversity. Plant, Cell and Environment 32 (8): 992-1003.

Floerl S., **Druebert C.**, Majcherczyk A., Karlosky P., Kues U., Polle A. (2008) : Defence reactions in the apoplastic proteome of oilseed rape (*Brassica napus* var. *napus*) attenuate *Verticillium longisporum* growth but not disease symptoms. BMC Plant Biology 8: 129.

Gradstein S.R, Tan B.C., Zhu R.-L., Ho B.-C., King C., **Drübert C.**, Pitopang R. (2005): A catalogue of the bryophytes of Sulawesi, Indonesia. Journal of the Hattori Botanical Laboratory 98: 213-257.