

Lehrstuhl für Phytopathologie
der Technischen Universität München

**Einfluss von CO₂ und Stickstoffdüngung auf
das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen
gegenüber *Phytophthora infestans* und
*Alternaria solani***

Kirstin Mittelstraß

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. G. Wenzel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. E.F. Elstner, em.
2. Priv.-Doz. Dr. Chr. Langebartels
3. Univ.-Prof. Dr. D. R. Treutter

Die Dissertation wurde am 05. August 2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 08. Dezember 2004 angenommen.

DANKSAGUNG

Im Folgenden möchte ich mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mir das Durchführen und Gelingen meiner Dissertation ermöglicht, mich darin unterstützt und beraten haben.

Herrn Prof. Dr. E. F. Elstner danke ich besonders für die Überlassung des Arbeitsplatzes, die Möglichkeit, dieses interessante Thema zu bearbeiten und die schöne Zeit am Institut.

Herrn PD. Dr. Ch. Langebartels verdient ein ausdrückliches Dankeschön für die Zusage, sich als Zweitprüfer mit meiner Arbeit zu beschäftigen.

Bei Herrn Prof. Dr. D. Treutter möchte ich mich ganz besonders für die spontane Zusage, sich als Gutachter für meine Arbeit einzusetzen, bedanken.

Bei Frau Dr. Ingrid Heiser bedanke ich mich ganz herzlich für die hervorragende Betreuung und die Unterstützung während der gesamten Zeit.

Vielen Dank auch an Simone Seiler, die mir stets mit bester Hilfe und vielen aufmunternden Worten immer zur Seite stand. Ohne Sie wäre der große Probenumfang nicht zu bewältigen gewesen.

Dr. Harry Schempp danke ich für die geduldige und erfolgreiche Einführung in die HPLC-Technik und die vielen wertvollen Ratschläge.

Judith Illig möchte ich für ihre stete Hilfsbereitschaft und die vielen langen, fruchtbaren Gespräche danken.

Herrn Prof. Dr. Höll und Frau Irmgard Karbach danke ich für die gute Zusammenarbeit während der gesamten Zeit und für das gemeinsame Erarbeiten schöner Ergebnisse. In diesem Rahmen möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Schnyder und Frau Brigitte Schilling (Lehrstuhl für Grünlandlehre) für die Kooperation bei der Analyse der C/N-Werte bedanken. Außerdem gilt mein Dank dem Team der Landesanstalt für Pflanzenbau und Bodenkultur für die nette Zusammenarbeit und die Einführung in die Stärkebestimmung mittels des Unterwassergewichts. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Treutter und Frau Marlene Kramler für die Analyse der Phenolgehalte.

Auch die Betreuung meiner Versuche in den Gewächshauskammern der GSF durch das EPOKA-Team unter Leitung von Herrn Payer und deren grenzenlose Hilfsbereitschaft verdient meinen besonderen Dank.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine Kollegen Angelika Muhr, Anja Breyer, Arne Schieder, Birgit Krauss, Dieter Hecht, Elke Mann, Gundi Theiß, Jens Milde,

Julia Koehl, Karin Brandl, Kerstin Janisch, Regina Dittebrandt, Reinhold und Eva Bäßler, Sandra Kern, Susanne Hippeli und Wiebke Sauter für die tatkräftige Unterstützung bei den Probenahmen und im Laboralltag sowie der schönen Atmosphäre am Institut.

Herrn Dr. Frank Fleischmann danke ich für seine Hilfsbereitschaft bei der Einführung in PR-Protein Nachweisanalytik.

Danken möchte ich auch den Gärtnern Herrn Joachim Schattauer, Herrn Tom Müller, Herrn Robert Höckmeier und Herrn Hans Sellmeier für die Pflege der Versuchspflanzen im Gewächshaus und des Freilandversuchs.

Auch den zahlreichen studentischen Hilfskräften, die stets die Routinearbeiten ohne zu klagen beherzt durchgeführt haben dürfen nicht unerwähnt bleiben und verdienen ein großes Dankeschön.

Unserem Sekretariat, Frau Mergans und Frau Schröttle danke ich für Ihre aufmunternde und entgegenkommende Art.

Insgesamt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Phytopathologie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die schönen Jahre nochmals recht herzlich bedanken.

Herrn Prof. Dr. Ivo Feussner und Frau Dr. Cornelia Göbel möchte ich für Ihre Gastfreundschaft, die hervorragende Einweisung in die Oxylipinanalytik und die angenehme Zeit in Göttingen danken.

Tommy Illig danke ich ganz besonders für die vielen interessanten Gespräche und die Durchsicht meiner Arbeit.

Großer Dank gebührt auch meiner Schwester Silke und all meinen Freunden. Sie haben mich während meiner Arbeit besonders bestärkt, und zur rechten Zeit auch immer wieder auf andere Gedanken gebracht.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ganz herzlich für Ihre immer währende, grenzenlose Unterstützung und Ihr Vertrauen bedanken.

Tom danke ich für alles, seine Geduld und Unterstützung, für seine auffangenden Worte während der letzten drei Jahre. Ohne ihn hätte ich diese Arbeit so nicht anfertigen können. Danke.

München, im Juli 2004

Kirstin Mittelstraß

INHALTSVERZEICHNIS

I	Einleitung.....	1
1	Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen und Stickstoffdüngung auf den Stoffwechsel der Pflanzen	1
1.1	Global Change–der Anstieg atmosphärischer CO ₂ -Konzentration.....	1
1.2	Einfluss erhöhter atmosphärischer CO ₂ -Konzentrationen auf den Stoffwechsel der Pflanzen	2
1.3	Einfluss erhöhter Stickstoffdüngung auf den Stoffwechsel der Pflanzen	5
2	Pathogenabwehrmechanismen der Pflanzen	8
2.1	Formen der pflanzlichen Resistenz.....	8
2.2	Konstitutive und induzierte Abwehrmechanismen.....	9
2.3	Weitere Signalmoleküle bei der Induktion pflanzlicher Abwehr.....	14
3	Pflanze–Pathogen-Interaktionen im <i>Solanum tuberosum</i> L., <i>Phytophthora infestans</i> und <i>Alternaria solani</i> System	21
3.1	Pflanzenpathogene und ihre Ernährungsstrategien	21
3.2	<i>Phytophthora infestans</i> –der Erreger der Kraut- und Knollenfäule.....	21
3.3	<i>Alternaria solani</i> – der Erreger der Dürrfleckenkrankheit	22
3.4	Interaktionen von <i>Solanum tuberosum</i> L. und <i>Phytophthora infestans</i> bzw. <i>Alternaria solani</i>	24
4	Themenstellung.....	26
II	Material und Methoden	27
1	Material	27
1.1	Geräte.....	27
1.2	Chemikalien	28
1.2.1	Feinchemikalien	28
1.2.2	Pufferlösungen.....	30
1.3	Pflanzenmaterial	31
1.3.1	Art und Herkunft des Pflanzenmaterials.....	31
1.3.2	Anzuchtbedingungen der Gewächshauskulturen.....	31
1.3.3	Anzuchtbedingungen im Freiland.....	32
1.4	Pilzliche Isolate und Inokulation der Blätter	33

2	Methoden	34
2.1	CO ₂ -Begasung und Stickstoffdüngung	34
2.1.1	CO ₂ -Begasung	34
2.1.2	Stickstoffdüngung der Gewächshausversuche	34
2.1.3	Stickstoffdüngung im Freiland	35
2.1.4	Versuchsaufbau und Variantenverteilung der einzelnen Großversuche	35
2.1.5	Ernte des Blattmaterials	36
2.2	Messung der Biomasseproduktion	37
2.3	Bestimmung biochemischer Parameter des Wachstums	37
2.3.1	Aufbereitung der Blattproben für die Analysen	37
2.3.2	Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Blätter	37
2.3.3	Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Knollen	38
2.3.4	Stärke- und Zuckanalytik	38
2.3.4.1	Bestimmung der Stärkegehalte im Blatt	38
2.3.4.2	Bestimmung des Stärkegehaltes der Kartoffelknollen	40
2.3.4.3	Bestimmung löslicher Zucker (Glukose, Fruktose Saccharose) im Blatt	40
2.4	Bestimmung biochemischer Parameter der pflanzlichen Abwehr	41
2.4.1	Bestimmung der Ethylenemission	41
2.4.2	Bestimmung der Gehalte an Salizylsäure	42
2.4.3	Histochemische Detektion der Wassertoffperoxid-Akkumulation	43
2.4.4	PR-Proteine	44
2.4.4.1	Bestimmung des Gesamtproteingehalts	44
2.4.4.2	Bestimmung der Chitinase-Aktivität	45
2.4.4.3	Bestimmung der Glukanase-Aktivität	45
2.4.4.4	Bestimmung des Gehalts an Osmotin (AP24)	47
2.4.5	Bestimmung der Gehalte an Phenylpropanoiden	50
2.4.6	Bestimmung der Gehalte an Divinylethern	51
2.5	Molekularbiologische Untersuchungen der Pflanze-Pathogen Interaktion ...	52
2.5.1	DNA-Extraktion	52
2.5.2	Quantitative PCR	52
2.6	Bonitur der Blattschäden	54
2.7	Statistik	54

III	Ergebnisse.....	56
1	Vergleichende Untersuchungen zum Resistenzverhalten verschiedener Kartoffelsorten (<i>Solanum tuberosum</i> L.) gegenüber <i>Phytophthora infestans</i>	56
1.1	Entstehung von Blattschäden nach Pathogenbehandlung.....	56
1.2	Untersuchung sekundärer Inhaltsstoffe der pflanzlichen Abwehr	58
1.2.1	Bestimmung der Salizylsäuregehalte nach Pathogenbehandlung	58
1.2.2	Untersuchungen zum Phenylpropanoidgehalt der Kartoffelsorten	61
1.2.3	Histochemische Detektion der Wasserstoffperoxid-Akkumulation	64
2	Untersuchungen zum Primärstoffwechsel von Kartoffelpflanzen unter variierter CO₂- und Stickstoffversorgung	66
2.1	Einfluss von CO ₂ und Stickstoff auf die Biomasseproduktion	66
2.2	Einfluss von CO ₂ und Stickstoff auf biochemische Parameter des Primärstoff- wechsels	67
2.2.1	Stärkegehalte der Kartoffelblätter und Knollen	67
2.2.2	Gehalte der Kartoffelblätter an löslichen Zuckern	69
2.3	Untersuchungen zum C/N-Verhältnis der Kartoffelblätter und -knollen.....	70
3	Untersuchungen zum Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber <i>Phytophthora infestans</i> und <i>Alternaria solani</i> unter variiertes CO₂- und Stickstoffversorgung.....	74
3.1	Entstehung von Blattschäden nach Pathogenbehandlung.....	74
3.1.1	Bonitur der Blattschäden einer <i>Phytophthora infestans</i> Infektion.....	74
3.1.2	Bonitur der Blattschäden einer <i>Alternaria solani</i> Infektion.....	76
3.2	Bildung von Ethylen nach Behandlung der Pflanzen mit <i>Phytophthora infestans</i>	78
3.3	Induktion von PR-Proteinen nach Pathogenbehandlung	79
3.3.1	Konstitutive Proteingehalte der Blätter	80
3.3.2	Induktion des PR-Proteins Osmotin nach Pathogenbehandlung	81
3.3.2.1	Induktion von Osmotin während einer <i>Phytophthora infestans</i> Infektion.....	81
3.3.2.2	Induktion von Osmotin während einer <i>Alternaria solani</i> Infektion	83
3.3.3	Induktion der Chitinase-Aktivität während einer <i>Alternaria solani</i> Infektion..	84
3.3.4	Induktion der Glukanase-Aktivität während einer <i>Alternaria solani</i> Infektion	85

3.4	Untersuchungen zum Phenylpropanoidmuster der Blätter nach Pathogen- behandlung	85
3.4.1	Das Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer <i>Phytophthora</i> <i>infestans</i> Infektion	86
3.4.2	Das Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer <i>Alternaria solani</i> Infektion	88
3.5	Akkumulation der Divinylether während der Ausprägung von Blattschäden	90
3.5.1	Akkumulation der Divinylether während einer <i>Phytophthora infestans</i> Infektion	91
3.5.2	Akkumulation der Divinylether während einer <i>Alternaria solani</i> Infektion.....	92
4	Untersuchungen zum Primärstoffwechsel von Kartoffelpflanzen unter variierter Stickstoffversorgung im Freiland.....	93
4.1	Einfluss von Stickstoff auf die Biomasse der Pflanzen im Freiland	94
4.1.1	Oberirdische Biomasse und Knollenmasse	94
4.2	Einfluss von Stickstoff auf biochemische Parameter der Pflanzen im Freiland	95
4.2.1	Stärkegehalte der Kartoffelblätter und Knollen	95
4.2.2	Zuckergehalte der Kartoffelblätter.....	97
4.2.3	Untersuchungen zum C/N-Verhältnis der Kartoffelblätter und -knollen.....	98
5	Untersuchungen zum Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber <i>Phytophthora infestans</i> im Freiland.....	101
5.1	Ausbreitung von <i>Phytophthora infestans</i> im Freiland.....	102
5.2	Entstehung von Blattschäden nach künstlicher Inokulation	103
5.3	Untersuchungen zum Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer <i>Phytophthora infestans</i> Infektion.....	104
IV	Diskussion	107
V	Zusammenfassung	133
VI	Literaturverzeichnis	135
Anhang		i

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4CL	4-Cumarat:CoA-Ligase
a	Jahr
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure
ANOVA	Analysis of Variance
AOS	Allenoxidsynthase
A.s.	<i>Alternaria solani</i>
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Kohlenstoff
C4H	Zimtsäure-4-Hydroxylase
C _a	externer CO ₂ -Gehalt
CA	Colnensäure
CHS	Chalkonsynthase
C _i	interne CO ₂ -Gehalt
CnA	Colnelensäure
CO ₂	Kohlendioxid
Da	Dalton
DES	Divinylethersynthase
dpi	days post inoculation (Tage nach Inokulation)
dt	Doppeltonnen
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
GÄ	Glucoseäquivalente
GACC	Glutamyl-ACC
GOGAT	Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase
g _s	stomatäre Leitfähigkeit
GSF	GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit
Gt	Gigatonnen
ha	Hektar
hpi	hours post inoculation (Stunden nach Inokulation)
HR	hypersensitive Reaktion
ICS	Isochorismatsynthase
ISR	induzierte systemische Resistenz

JA	Jasmonsäure
LOX	Lipoxygenasen
MACC	Malonyl-ACC
N	Stickstoff
NO	Stickstoffmonoxid
NR	Nitratreduktase
NV	Normalverteilung
OAA	Oxalacetat
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin-Ammoniumlyase
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvatcarboxylase
<i>P.i.</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
PL	Pyruvatlyase
ppm	parts per million (= $\mu\text{l l}^{-1}$)
PR-Proteine	pathogenesis related proteins
PUFA	vielfach ungesättigte Fettsäuren
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
r	Korrelationskoeffizient
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RUBISCO	Ribulose-1,5-bisphosphatcarboxylase/oxygenase
SA	Salizylsäure
SAM	S-Adenosylmethioin
SAR	systemisch erworbene Resistenz
SFB	Sonderforschungsbereich
t	Tonnen
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan
TS	Trockensubstanz
UV	Ultraviolett
WUE	Wassernutzungseffizienz
WZW	Wissenschaftszentrum Weihenstephan
ZW	Zellwand

I EINLEITUNG

1 Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen und Stickstoffdüngung auf den Stoffwechsel der Pflanzen

1.1 Global Change–der Anstieg atmosphärischer CO₂-Konzentration

Im Laufe der Erdgeschichte schwankte die CO₂-Konzentration der Atmosphäre beträchtlich. Sie wies Konzentrationsmaxima von bis zu 7000 ppm CO₂ auf. Als vor über 460 Millionen Jahren die phototrophen Organismen das Land eroberten, lag die CO₂-Konzentration um 6000 ppm. Mit der Entwicklung der samenlosen Gefäßpflanzen (*Pteridophyten*) fiel der CO₂-Gehalt der Atmosphäre drastisch ab. Seit ca. 25 Mio. Jahren hielt sich die Konzentration unter 350 ppm (PEARSON UND PALMER, 2000). Die Rekonstruktion der Zusammensetzung der Atmosphäre der letzten Jahrtausende aus polaren Eiskernen zeigte, dass die CO₂-Konzentration seit etwa 400 000 Jahren zwischen 190 ppm während der glazialen Eiszeiten und um ca. 280 ppm während der Warmzeiten pendelte (PETIT *et al.* 1999).

Seit Beginn der Industrialisierung um das Jahr 1800 ist ein annähernd exponentieller Anstieg der CO₂-Konzentration der Atmosphäre von 280 ppm auf heute 370 ppm zu verzeichnen (Abbildung 1, INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE 2001). Dieser Anstieg ist überwiegend auf anthropogene Eingriffe in den Kohlenstoffkreislauf zurückzuführen. Die Nutzung fossiler Brennstoffe wie Kohle, Erdöl und Erdgas sowie die gleichzeitige Rodung gewaltiger Waldareale und die Zunahme der landwirtschaftlich genutzten Flächen führte zu einer massiven Verschiebung des terrestrisch gebundenen Kohlenstoffs hin zur Atmosphäre. Etwa die Hälfte der momentanen anthropogenen CO₂-Emissionen (7 Gt/a) wird von den Ozeanen (2 Gt/a) und von den Landökosystemen (2 Gt/a) als CO₂-Senke absorbiert. Die Differenz von 3 Gt CO₂ verbleiben dabei jährlich in der Atmosphäre (KNORR, MPI für Meteorologie, Hamburg). Das „INTERGOVERNMENTAL PANEL OF CLIMATE CHANGE“ (IPCC) hat eine Serie von Szenarien zu Energieverbrauch und Landnutzung entwickelt, die zu dem Ergebnis kamen, dass diese in den nächsten Jahrzehnten weiterhin ansteigen werden. Die damit einhergehende Steigerung der CO₂-Emission wird zu einer weiteren Zunahme des atmosphärischen CO₂-Gehalts führen.

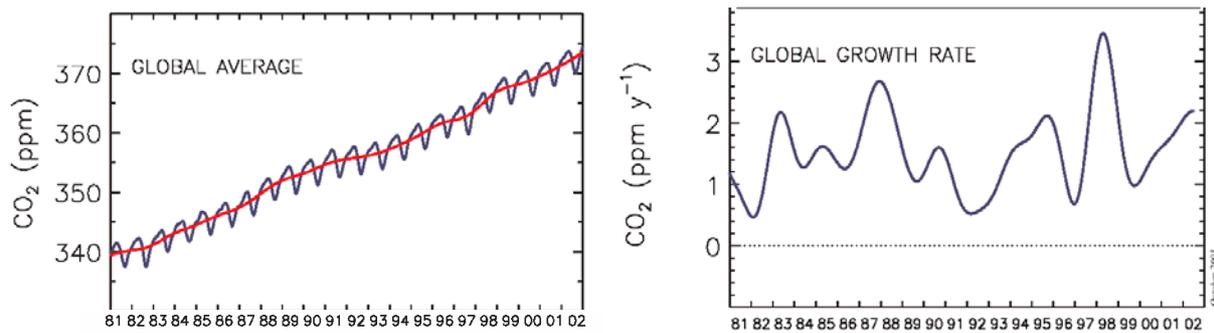


Abbildung 1: Jährlicher CO₂-Anstieg in ppm (links) und jährliche Zuwachsrate der CO₂-Zunahme in ppm/a (rechts) (Dr. Pieter Tans, NOAA, Colorado, <http://www.cmdl.noaa.gov/ccgg>)

Da CO₂ eines der Haupttreibhausgase unserer Atmosphäre ist, könnte eine Erhöhung der globalen CO₂-Konzentration um jährlich ca. 1,5 ppm (Abbildung 1) zu einer Erwärmung der mittleren Temperatur der Atmosphäre führen und so zu einer Veränderung des momentanen Klimas der Erde beitragen. Aber auch auf die terrestrische Biosphäre hat der Anstieg der CO₂-Konzentration der Atmosphäre große Auswirkungen.

1.2 Einfluss erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentrationen auf den Stoffwechsel der Pflanzen

Dass erhöhte CO₂-Konzentrationen das Wachstum von Pflanzen stimulieren, wurde bereits 1804 von DE SASSURE (zit. in KIMBALL *et al.* 1993) festgestellt, und Justus von Liebig bewies vor 120 Jahren, dass CO₂ die Quelle für den Kohlenstoffgewinn der Pflanzen in der Photosynthese ist. So zeigt ein Großteil von landwirtschaftlichen Kulturpflanzen bei Wachstum unter erhöhten CO₂-Konzentrationen von 700 ppm eine durchschnittliche Steigerung der Biomasse um ca. 30 % (FANGMEIER und JÄGER, 2001). Auch konnte eine beschleunigte Entwicklung von verschiedenen Pflanzenarten durch erhöhte CO₂-Konzentrationen beobachtet werden (GEIGER *et al.* 1999, MAROCO *et al.* 1999). POORTER (1993) postuliert, dass schnellwachsende Pflanzen (Konkurrenz um Licht) unter erhöhtem CO₂-Gehalt deutlich mehr Trockensubstanz gegenüber den Kontrollpflanzen akkumulieren. Pflanzen, die andere Überlebensstrategien (robuster gegen Umweltstress) verfolgen, zeigen eine deutlich geringere Zunahme an Trockensubstanz gegenüber den Kontrollpflanzen. Dennoch ist nicht geklärt, zu welchen Anpassungserscheinungen eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Atmosphäre in höheren Pflanzen führt. Häufig kommt es zunächst zu einer signifikanten Steigerung der Nettophotosynthese durch CO₂ (AMTHOR 1995). Bislang verfügbare Daten weisen darauf hin, dass eine Erhöhung

der atmosphärischen CO₂-Konzentration zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze führt (PENUÉLAS und ESTIARTE 1998, POORTER *et al.* 1997). Ertragssteigerungen wurden auf den Anstieg des C/N-Verhältnisses unter erhöhten CO₂-Konzentrationen zurückgeführt (LUDEWIG 1998).

Eine Verdopplung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm führt häufig auch zu einer Reduzierung der stomatären Leitfähigkeit (g_s) (REINIG 1994). In einer Studie aus dem Jahr 1987 (WOODWARD 1997) wurde die Dichte der Stomata pro Blattfläche einer Pflanzensammlung mäßig-krautiger Arten aus dem Jahre 1787 mit der Dichte heutiger Pflanzen verglichen. Dabei fand WOODWARD eine Verringerung der stomatären Dichte der Blätter um 67 %. Durch das Herabsetzen der stomatären Leitfähigkeit bleibt das C_i/C_a Verhältnis (interner CO₂-Gehalt/externer CO₂-Gehalt) der Pflanzen konstant. Auch bei Langzeituntersuchungen konnte meist keine signifikante Veränderung des C_i/C_a Verhältnisses beobachtet werden (SAGE 1994). BOWES (1996) konnte zeigen, dass durch eine Verdopplung des CO₂-Gehalts der interne CO₂-Gehalt (C_i) der Pflanzen von 245 auf 490 ppm stieg. Auch die Wassernutzungseffizienz (WUE, Water Use Efficiency) wird unter erhöhten CO₂-Bedingungen signifikant verbessert (MORISON 1993). Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich erhöhtes CO₂ in einer verbesserten Ressourcenausnutzung der Pflanzen niederschlägt. Dem liegt vor allem eine verbesserte Stickstoffnutzungseffizienz (= produzierte Biomasse pro Menge aufgenommenen Stickstoffs) und ein verbesserter Wasserhaushalt zu Grunde (COTRUFO *et al.* 1998).

Unter den zurzeit vorherrschenden CO₂-Konzentrationen ist das in den Chloroplasten der Pflanzen vorkommende Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (RUBISCO) nicht CO₂-gesättigt (SITTE *et al.* 1998). Hinzu kommt die Konkurrenz der RUBISCO durch O₂ bei der Oxygenase-Reaktion, so dass C3-Pflanzen bei den heutigen CO₂/O₂ Partialdruckverhältnissen nur 60-70 % ihrer potentiellen Photosynthesekapazität nutzen (BOWES 1993). Eine erhöhte CO₂-Konzentration der Atmosphäre führt deshalb zu einer Steigerung der Carboxylierungsreaktion der RUBISCO. Dieses wirkt sich in einem Netto-Kohlenstoffgewinn für die Pflanzen aus (DRAKE *et al.* 1997). Weiterhin hat eine erhöhte CO₂-Konzentration einen starken Effekt auf die Photorespiration. Nach FANGMAIER und JÄGER (1998) hat eine Verdopplung der atmosphärischen CO₂-Konzentration eine Halbierung der Photorespiration zur Folge.

Eine länger anhaltende CO₂-Exposition führt allerdings bei vielen Pflanzen nach einer anfänglichen Steigerung zum Rückgang der Photosyntheseleistung. Dieser Befund wird als „Akklimatisierung“ bezeichnet (STITT 1991, LAWSON *et al.* 2001). Die Abnahme des Gehalts an RUBISCO sowie deren verringerte Aktivität werden im Zusammenhang mit der „Akklimatisierung“ diskutiert. In Tomatenblättern sanken nach einer CO₂-Behandlung Transkripte der Proteine, die an der Photosynthese beteiligt sind, wie z.B. Transkripte für die kleine Untereinheit der RUBISCO und die Transkripte für die RUBISCO-Aktivase (VAN OOSTEN und BESFORD 1995). XIAO *et al.* (2000) beobachteten bei *Arabidopsis thaliana* eine Hemmung der Genexpression photosynthetisch aktiver Enzyme durch hohe Konzentrationen an nichtstrukturellen Kohlenhydraten. Einen direkten negativen Zusammenhang zwischen den Zuckergehalten und der Transkriptmenge von Genen der Photosynthese sowie des Calvin-Zyklus zeigten ebenfalls VAN OOSTEN und BESFORD (1995) sowie HERBERS *et al.* (1996). JANG und SHEEN (1997) sowie KOCH (1996) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass gleichzeitig Gene für die Speicherung und Umsetzung der Kohlenhydrate induziert werden. In diesem Zusammenhang wird der Hexokinase eine wichtige regulatorische Rolle zugeschrieben (GIBSON 2003, MOORE *et al.* 2003). AMTHOR (1995) vermutet auch eine direkte Inhibierung der Dunkelatmung durch erhöhtes CO₂, wobei der Mechanismus noch ungeklärt ist.

Auch die Regeneration des Substrats der RUBISCO, Ribulose-1,5-bisphosphat, ist bei erhöhter CO₂-Konzentration aufgrund eines veränderten Elektronentransports in der Thylakoidmembran und einer langsameren Regeneration des anorganischen Phosphats wegen einer verringerten Aktivität von Enzymen des Calvin-Zyklus limitiert (MCKEE *et al.* 2000, SAGE und COLEMAN 2001). Aufgrund der „Downregulierung“ der Photosynthese nach Akklimatisierung durch erhöhte CO₂-Konzentrationen ist der Bedarf an Stickstoff für photosynthetisch aktive Enzyme geringer. Dieser kann so für die Synthese von Sekundärmetaboliten der Pathogenabwehr und für das Pflanzenwachstum verwendet werden. Außerdem kommt es durch eine erhöhte CO₂-Konzentration nach STITT (1999) zu einer Hochregulierung der Nitratassimilation. GEIGER *et al.* (1998) sehen diese Steigerung der Nitratassimilation in einer direkten Aktivitätssteigerung der Nitratreduktase durch CO₂. Das Blattalter spielt neben der Nährstoffversorgung bei dem Prozess der „Akklimatisierung“ ebenfalls eine Rolle. In vielen Versuchen wurde die Abnahme der Photosyntheserate mit zunehmendem Pflanzenalter aber auch im vertikalen

Altersgradienten, d.h. von jungen zu alten Blättern einer Pflanze, beschrieben, wobei die Abnahme unter erhöhter CO₂-Konzentration schneller erfolgte als unter ambienten CO₂-Bedingungen (MILLER *et al.* 1997, LUDEWIG 1998).

Erhöhte CO₂-Konzentrationen haben unterschiedlichste Auswirkungen auf die Qualität des Pflanzengewebes. Es kommt zu einer vermehrten Akkumulation von Kohlenhydraten in den Blättern einerseits wodurch sich der relative Stickstoffgehalt der Blätter verringert.

Neben der Akkumulation von strukturellen und nichtstrukturellen Kohlenhydraten wurde in vielen Pflanzenarten auch eine Akkumulation löslicher phenolischer Inhaltsstoffe beschrieben (POORTER *et al.* 1997). Da sekundäre Inhaltsstoffe von Bedeutung für die Pathogenabwehr sind, lassen sich Konsequenzen für die Interaktion von Pflanze und Pathogenen erwarten.

1.3 Einfluss erhöhter Stickstoffdüngung auf den Stoffwechsel der Pflanzen

Stickstoff steht als molekularer Stickstoff (N₂) den Pflanzen in der Atmosphäre in unbegrenzter Menge zu Verfügung: 10¹⁵–10¹⁶ t gegenüber 6×10⁹ t in der Phytomasse. Jedoch ist die Aktivierungsenergie für die Spaltung des Stickstoffs so hoch, dass nur einige Gruppen von Mikroorganismen zu Nutzung von N₂ in der Lage sind. Pflanzen sind daher auf die Aufnahme des Stickstoffs in Form von NH₄⁺ oder NO₃⁻ angewiesen (ESSER 1999).

Zwei der wichtigsten Kontrollpunkte, die den C- und N-Primärstoffwechsel in Pflanzen koordinieren, sind die Nitratreduktase (NR) und die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC) (FOYER *et al.* 2003). Nach Aufnahme des Nitrats aus dem Boden wird Nitrat durch die Nitratreduktase (NR) über mehrere Schritte zu NH₄⁺ reduziert. Dieses wird anschließend im GOGAT (Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase)-Weg zu Glutamin assimiliert. Glutamin dient dann zur Synthese weiterer Aminosäuren. Durch die Photorespiration wird ebenfalls, zusätzlich zur Aufnahme aus dem Boden, NH₄⁺ zur Verfügung gestellt. Die Nitratassimilation läuft allerdings nur dann ab, wenn durch die CO₂-Assimilation genügend Kohlenstoffgerüste bereitgestellt werden. Nitrat und Licht, Glukose und andere Kohlenhydrate stimulieren, Glutamin und andere Aminosäuren hemmen hingegen die Nitratreduktase (STITT *et al.* 2002). Das „Füttern“ von Tabak mit einer Zuckerlösung führte zu einer Steigerung der NR-Aktivität und der

Aminosäuresynthese (MORCUENDE *et al.* 1998). GOJON *et al.* (1998) diskutierten eine starke „Feedback“-Regulation von Nitrat bei der Nitrataufnahme der Pflanzen. Dieses Ergebnis konnte jedoch von verschiedenen Autoren nicht belegt werden. Sie beobachteten, dass eine hohe interne Nitratkonzentration nicht zu einer „Downregulierung“ der Nitrataufnahme führte (SCHEIBLE *et al.* 1997). STITT und KRAPP (1999) diskutierten eine „Feedback“-Hemmung der Nitrataufnahme durch Produkte der Nitratassimilation, aber nicht durch Nitrat selbst. Eine hohe Nitratassimilation, stimuliert durch erhöhte N-Versorgung (FOYER *et al.* 2003), hat eine Abnahme der Kohlenhydratsynthese zur Folge. Über die Glykolyse wird mehr Kohlenstoff in Phosphoenolpyruvat (PEP) umgewandelt, welches dann in den Malatzyklus oder in den Aminosäurezyklus geht (STITT 2002). Dabei kommt Malat eine wichtige Rolle bei der Minderung der Alkalisierung der Zelle während der Nitratassimilation zu (RADEMACHER *et al.* 2002). Die Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) katalysiert dabei die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat (OA) im Cytosol. In C₄ und CAM Pflanzen unterstützt PEPC zusätzlich die CO₂-Fixierung.

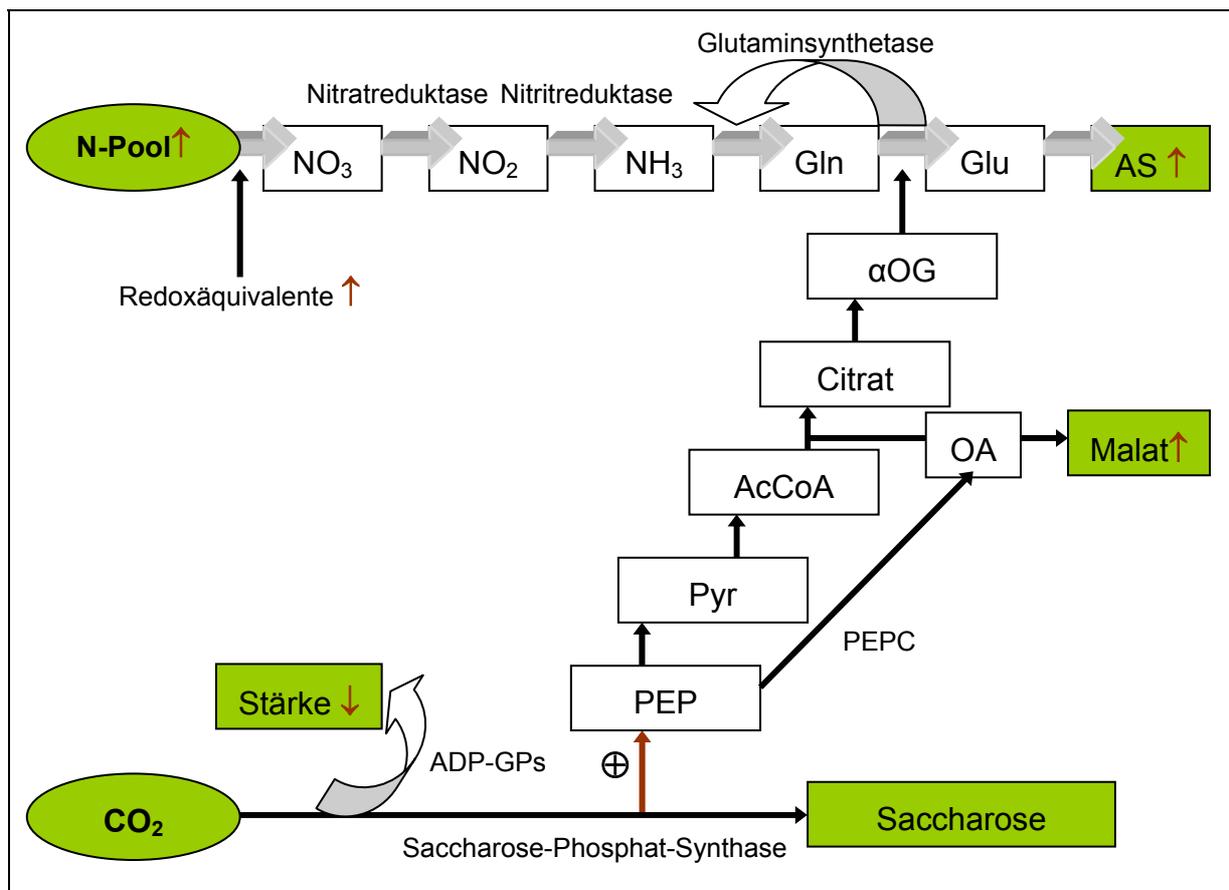


Abbildung 2: Einfluss einer erhöhten Stickstoffdüngung auf den Primärstoffwechsel (nach STITT (1999), verändert). PEPC = Phosphoenolpyruvat Carboxylase, PEP = Phosphoenolpyruvat, Pyr = Pyruvat, AcCoA = Acetyl-CoA, OA = Oxalacetat, αOG = α-Oxoglutarat, ADP-GPs = ADP-Glucose Pyrophosphorylase, Gln = Glutamat, Glu = Glutamin, AS = Aminosäuren

Den größten Teil des Stickstoffs nehmen Kartoffelpflanzen in der ersten Hälfte der Vegetationsperiode auf (MILLARD und MARSHALL 1986). Nach Messungen von VOS (1999) verläuft die Aufnahme von Stickstoff in die Knollen aber über die gesamte Vegetationsperiode linear, was bedeutet, dass in der zweiten Hälfte der Kulturperiode der Stickstoff vom Kraut in die Knollen umverlagert werden muss. Eine Umverteilung des Stickstoffs findet aber nicht nur vom Kraut in die Knollen statt, sondern auch innerhalb der Blätter. Durch die Beschattung der unteren Blattpositionen kommt es zu einem Abtransport von Stickstoff aus den niederen in die höheren Blattetagen. Mit zunehmender N-Aufnahme steigt auch die oberirdische Biomasse. Allerdings ist dieser Anstieg nicht linear, sondern erreicht mit steigender N-Gabe einen Sättigungsbereich (Vos 1995). Diese Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen der N-Verfügbarkeit große Auswirkungen auf den pflanzlichen Metabolismus haben. Dabei wird der Primärstoffwechsel ebenso wie der Sekundärstoffwechsel der Pflanzen beeinflusst. Daraus ergeben sich interessante Ansatzpunkte zum Verständnis der Pathogenabwehrmechanismen von Pflanzen (Abbildung 3).

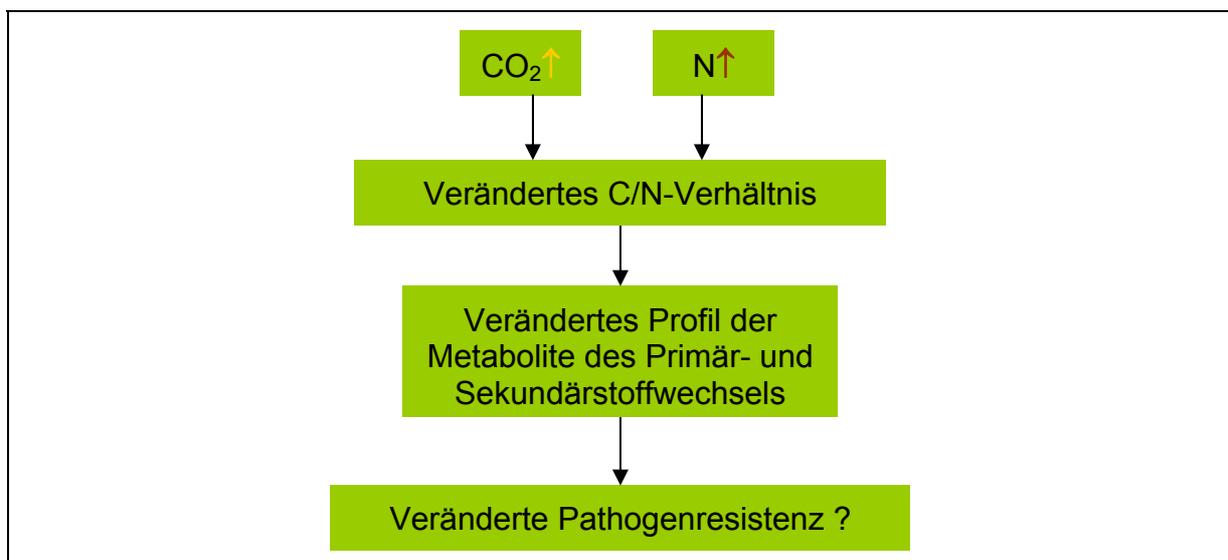


Abbildung 3: Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen und einer erhöhten Stickstoffdüngung auf Pflanzen und ihr Resistenzverhalten gegenüber Pathogenen.

2 Pathogenabwehrmechanismen der Pflanzen

2.1 Formen der pflanzlichen Resistenz

Pflanzen sind stetig diversen Umweltbedingungen ihres Standorts ausgesetzt. Sie haben daher ein breites Spektrum an biochemischen und morphologischen Mechanismen entwickelt, um entwicklungs-hemmende Situationen wie Trockenheit, mechanische Verletzung, Temperaturstress, UV-Strahlung und den Befall durch phytopathogene Organismen zu überstehen. Doch im Vergleich zu Vertebraten besitzen Pflanzen kein hochspezialisiertes Immunsystem, das bei Erkrankung schnell spezialisierte Zellen zum Infektionsort transportiert, um eindringende Organismen abzuwehren. In Pflanzen besitzt indes jede Zelle die Fähigkeit, auf Infektionen zu reagieren und Abwehrreaktionen zu aktivieren (EBEL UND MITHÖFER 1998). Dabei weisen die Signaltransduktionswege häufig Parallelen zu den Prozessen der angeborenen Immunität von tierischen Zellen auf (COHN *et al.* 2001, NÜRNBERGER UND SCHEEL 2001). Pflanzen sind fortlaufend dem Befall durch Insekten, Bakterien, Viren und Pilzen ausgesetzt. Trotz dieser Vielfalt von Schädlingen kommt es dabei nur selten zu einer Besiedlung der Pflanzen. Die Gründe hierfür liegen in den verschiedenen Resistenz- und Abwehrmechanismen der Pflanzen (DANGL 2001, JACKSON 1996). Die am weitesten verbreitete Form der Resistenz ist die „Nichtwirtsresistenz“ oder Basisresistenz. Hier stellt eine Pflanzenspezies keinen Wirt für ein spezifisches Pathogen dar, da dieses die konstitutiven Barrieren nicht überwinden kann (HEATH 2000). Wird die Pflanze dennoch von einem Pathogen parasitiert, kann der befallene Bereich sofort durch die Aktivierung induzierbarer Abwehrmechanismen lokal abgegrenzt werden. Diese Mechanismen der „Nichtwirtsresistenz“ werden auch unter dem Begriff der Basisinkompatibilität zusammengefasst, die Interaktion wird dann als inkompatibel bezeichnet. Sind die Abwehrmechanismen der Pflanzen unzureichend, kann die Basisresistenz durch das Pathogen überwunden werden und man spricht von einer kompatiblen Interaktion: die Pflanze erkrankt (HAMMOND-KOSACK UND JONES 2000, HEATH 2000).

Die zweite Form der Resistenz, die sich im Laufe der Evolution als Folge der Koexistenz von Pflanzen und Pathogenen gebildet hat, ist die sortenspezifische Wirtsresistenz eines an sich suszeptiblen Pflanzenkultivars (HEATH 2000, RAUSCHER 2001). Bei diesen Wirtsresistenzen unterscheidet man eine generelle oder auch horizontale Resistenz von einer spezifischen oder auch vertikalen Resistenz. Die

horizontale Resistenz einer Wirtspflanze wird häufig auch als Feldresistenz bezeichnet. Sie ist im Vergleich zur monogenetischen Determination der vertikalen Resistenz polygen bestimmt und gegenüber allen Rassen eines Pathogens wirksam. Die vertikale Resistenz ist rassenspezifisch und beruht auf dem Vorhandensein eines Avirulenzgens (Avr-Gen) des Pathogens sowie einem dominanten komplementären Resistenzgen (R-Gen) der Wirtspflanze. Die Genprodukte sind Voraussetzungen einer inkompatiblen Interaktion. Diese Inkompatibilität von Wirt und Pathogen wird durch die „gene-for-gene“-Hypothese beschrieben (FLOR 1971).

Die Erforschung der molekularen und biochemischen Grundlagen der Interaktionen von Pflanzen und Pathogenen ist Gegenstand der modernen Phytopathologie. Dabei ist die Aufklärung von pflanzlichen Abwehrmechanismen vor allem für landwirtschaftlich genutzte Pflanzen von großer Bedeutung, da resistent werdende Krankheitserreger einen immer höheren Einsatz von Fungiziden und Pestiziden mit erheblichen Belastungen für die Umwelt fordern. STAPLES (2004) ist es zwar kürzlich gelungen, gegenüber allen Rassen von *P. infestans* resistente Kartoffeln durch klonen eines Gens (*RB*) aus *Solanum bulbocastanum* zu erzeugen, doch besteht das Problem, dass gentechnisch veränderte Lebensmittel von einem Grossteil der Bevölkerung nicht akzeptiert werden und die ökologischen Folgen gentechnisch veränderter Pflanzen nicht absehbar sind (KAEPLER 2000, PUNJIA 2001). Konventionelle Züchtungsprogramme dagegen stehen vor dem Problem der sexuellen Inkompatibilität von *S. bulbocastanum* und *S. tuberosum* (VAN DER VOSSEN *et al.* 2003).

2.2 Konstitutive und induzierte Abwehrmechanismen

Der Pflanze stehen zur Abwehr eindringender Pathogene zwei unabhängige Wege zur Verfügung: die konstitutive präformierte Abwehr und die induzierte Abwehr.

Zur konstitutiven präformierten Abwehr zählen vor allem strukturelle und chemische Barrieren, die einen primären Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen darstellen. Verdickte Zellwände mit Lignineinlagerungen, die Kutikula mit ihren Kutin- und Suberineinlagerungen, aber auch niedermolekulare Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften stellen einen wirksamen Schutz dar. Extrazellulär (Interzellularraum) wie auch intrazellulär (Vakuole) werden diese Verbindungen in ihrer biologisch aktiven Form oder als inaktive Vorstufen gespeichert und nach Pathogenbefall freigesetzt oder aktiviert. Hierzu zählen unter anderem phenolische

Verbindungen, Saponine mit antifungaler Wirkung, Inhibitoren lytischer Enzyme und cyanogene Glykoside, die durch Freisetzung von Blausäure zahlreiche Organismen hemmen (OSBOURN 1996). Ein weiteres Beispiel hierfür ist auch das aus Kartoffelknollen isolierte, antimikrobielle Peptid Snakin-1, das eine Aggregation von Bakterien bewirkt (SEGURA 1999).

Ergänzend zu den konstitutiven Abwehrmechanismen existieren eine Reihe von induzierbaren Abwehrmechanismen, die ein weiteres Eindringen eines Pathogens verhindern. Diese können sowohl durch das Pathogen selbst als auch durch Verwundung oder spezifische Signalmoleküle (Elicitoren) hervorgerufen werden (MALECK 1999). So kann es nach Pathogenbefall zu einer Auflagerung von Kallose auf die Zellwand und einer Einlagerung von phenolischen Verbindungen wie Lignin und Suberin, zusätzlich zur konstitutiv vorhandenen Lignifizierung, direkt am Penetrationsort des Pathogens kommen (KAUSS *et al.* 1989). Unmittelbar nach der Reizaufnahme werden Ionenkanäle der Plasmamembran aktiviert, und es kommt zur Stimulierung von Ionenflüssen (H^+ - und Ca^{2+} -Einstrom, K^+ - und Cl^- -Ausstrom; NÜRNBERGER *et al.* 1994, ZIMMERMANN *et al.* 1997). Der Anstieg des cytosolischen Ca^{2+} -Gehaltes und die Depolarisierung der Plasmamembran induzieren die extrazelluläre Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), den so genannten „oxidative burst“ (BLUME *et al.* 2000). Hierzu gehören vor allem Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroperoxyl- und Hydroxylradikale (LAMB und DIXON 1997), deren reduktive Bildung aus atmosphärischen Sauerstoff auf der Aktivität membrangebundener NADPH-Oxidasen und/oder apoplastischer Peroxidasen beruhen (KOMBRINK und SOMSSICH 1995). Dabei entspricht der Begriff „oxidative burst“ dem „respiratory burst“ in tierischen und menschlichen Zellen. Er bezeichnet dort die Eigenschaften neutrophiler Granulozyten, große Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies zur antimikrobiellen Abwehr über eine NADPH-Oxidase zu bilden (BABIOR 1999). Somit könnte auch der „oxidative burst“ bei Pflanzen im direkten Zusammenhang mit der Pathogenabwehr stehen. Mittlerweile konnten mehrere Orthologe einer membranständige NADPH-Oxidase in Pflanzen analog zu der in neutrophilen Granulozyten detektiert werden (HIGGINS *et al.* 1998, AMICUCCI *et al.* 1999, YOSHIOKA *et al.* 2001). ROS haben sowohl eine direkte toxische Wirkung auf Pathogene als auch Funktionen bei der oxidativen Vernetzung von Glykoproteinen mit der Zellwand, bei der Auslösung von Signaltransduktionskaskaden und der hypersensitiven Reaktion (HR) (BOWELL 1999, LAMB und DIXON 1997, MITTLER *et al.*

2002). Insbesondere bei inkompatiblen Interaktionen von Pathogenen mit der Pflanze kommt es nach einer schnellen Bildung von $O_2^{\cdot -}$ und H_2O_2 zu einem weiteren, z.T. länger anhaltenden „oxidative burst“ (BAKER und ORLANDI 1995, LAMB und DIXON 1997, SCHEEL 2000). Diese Bildung von ROS wenige Stunden nach dem Pathogenbefall kann zum Absterben der pflanzlichen Zellen am Infektionsort durch die Aktivierung des programmierten Zelltods (PCD) führen (LAM *et al.* 2001). Hierbei kommt es zu lokalen Nekrosen, einzelne Zellen in der direkten Umgebung einer Infektion sterben ab und die Verbreitung des Pathogens in unbefallenes Nachbargewebe wird verhindert. Biotrophe Organismen werden so aufgrund eines Nahrungsentzugs in ihrem Wachstum eingeschränkt (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996).

Weitere Funktionen des „oxidative burst“ wurden in der Literatur zahlreich diskutiert. So kann es zu einer verstärkten Bildung von Phytoalexinen durch die Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanoidstoffwechsels wie z.B. der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (DESIKAN *et al.* 2001), der Zimtsäure-4-Hydroxylase (C4H) und der 4-Cumarat:CoA-Ligase (4CL) kommen. Aber auch antioxidative Enzyme wie die Glutathion-S-Transferase, die Glutathion-Peroxidase und die Superoxid-Dismutase (HAMMOND-KOSACK und JONES 1996, TENHAKEN *et al.* 1995, WEISSHAAR und JENKINS 1998) werden durch ROS aktiviert. CHAMNONGPOL *et al.* (1998) beschrieben im Zusammenhang mit dem „oxidative burst“ eine Induktion von PR-Proteinen (*pathogenesis related proteins*). Außerdem werden eine Reihe von Genen in ihrer Expression durch H_2O_2 verändert (DESIKAN *et al.* 2001). Es ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, wie ROS als „second messenger“ wirken. Eine Möglichkeit wäre die Änderung des zellulären Redoxzustandes (FOYER *et al.* 1997). Bei verstärkter ROS-Bildung kommt es zu erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen und einer Verschiebung des Redoxgleichgewichts für Glutathion [entspricht dem Verhältnis zwischen reduziertem (GSH) und oxidiertem Glutathion (GSSH)] der Zelle, was ein Absinken von GSH zu Folge hätte. Glutathion könnte außerdem als Signalmolekül beim „oxidative burst“ fungieren (LAMB *et al.* 1997, MAY *et al.* 1998). Schließlich gibt es eine Vielzahl von Hinweisen darauf, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht alleine Abwehrreaktionen auslösen, sondern eine Reihe weiterer Signalmoleküle nötig sind. Zusammen mit den ROS wird auch Stickstoffmonoxid (NO) als sekundärer Botenstoff bei der Aktivierung von Abwehrreaktionen beschrieben (BOLWELL 1999, DELLEDONE *et al.* 2001, DURNER *et al.* 1999). Darüber hinaus kann eine Induktion von

Abwehrmechanismen auch durch sekundäre Signalmoleküle (vgl. 2.3) erfolgen (DOREY *et al.* 1999). Des Weiteren akkumulieren wenige Minuten bis Stunden nach Pathogenbefall die Transkripte einer Vielzahl von PR-Proteinen (pathogenesis related proteins) und anderer „*defense related proteins*“. Der Begriff PR-Proteine umfasst intra- und extrazelluläre Proteine, die in gesunden Pflanzen kaum nachweisbar sind und erst nach Pathogeninfektionen bzw. unter bestimmten Stressbedingungen akkumulieren (BOWLES 1990). Es wurden bisher mindestens 14 PR-Protein-Familien klassifiziert, die β -1,3-Glukanasen, Chitinasen, Proteinase-Inhibitoren, Endoproteinasen und Peroxidasen sowie Proteine mit antifungalen Eigenschaften umfassen (HAMMOND-KOSACK und JONES 2000).

In der Literatur finden sich auch zahlreiche Angaben über die Beteiligung von phenolischen Verbindungen der Pflanzen an der Abwehr von Umweltstress (NICHOLSON und HAMMERSCHMIDT 1992). Eine Akkumulation von Catechinen und Proanthocyanidinen wurde vielfach als Antwort von Pflanzen auf die Einwirkung abiotischer Faktoren, wie Luftverschmutzung, Verwundung oder Trockenstress beobachtet (FEUCHT *et al.* 1985, HAMACHER und GIERSEPEN 1989). Auch biotische Stressfaktoren wie Infektion durch Pathogene oder Insektenfraß induzieren die Flavanolsynthese (FEUCHT *et al.* 1992). Auf der Stufe der Aminosäure Phenylalanin tritt die Proteinsynthese des Primärstoffwechsels in Konkurrenz zum Phenolstoffwechsel (FEUCHT und TREUTTER 1989): Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase bildet den Übergang von Primär- zu Sekundärstoffwechsel. Sie katalysiert die Umsetzung von Phenylalanin zu t-Zimtsäure unter Freisetzung von NH_3 . Zimtsäure stellt den Ausgangsstoff des Phenolmetabolismus dar. Ausgehend von aktivierter Zimtsäure leiten sich zum einen die Hydroxyzimtsäuren wie z.B. p-Cumarsäure, Kaffeesäure oder Ferulasäure ab. Zum anderen ist t-Zimtsäure Ausgangsprodukt für die Flavonoidbiosynthese. Die Chalkonsynthase (CHS) ist Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese und katalysiert die Bildung von Chalkon über Malonyl-CoA und Cumaroyl-CoA. Isomerisierung des entstandenen Chalkons führt zu Flavanon, welches über verschiedene Synthesewege zu den einzelnen Klassen der Flavonoide umgewandelt wird (Abbildung 4). Catechine und Proanthocyanidine wirken einerseits als Antioxidantien und Radikalfänger, die ROS abfangen können (FEUCHT *et al.* 1994), andererseits erweist sich ihre Eigenschaft zur Polymerisation und ihre Affinität zu Makromolekülen (Proteine, Zellulose, Pektine) für Resistenzreaktionen als besonders bedeutsam (TREUTTER 1991). Aufgrund dieser

Eigenschaften dienen sie in der Pathogenabwehr als Bestandteile von physikalischen Barrieren wie Suberin und Lignin und haben eine direkte Wirkung auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen durch Hemmung pilzlicher Pektinasen und Cellulasen (MACE *et al.* 1978, SCALBERT 1991). Weitere Autoren fanden in resistenten Apfelsorten präinfektionell höhere Gehalte an Flavanolen als in anfälligen Sorten (TREUTTER und FEUCHT 1990, SIEROTZKI und GESSLER 1993, PICINELLI *et al.* 1994). ROEPENACK-LAHAYE *et al.* (2003) konnten in resistenten Tomatenpflanzen nach Infektion erhöhte mRNA Level der PAL sowie weitere Enzyme des Phenolstoffwechsels finden.

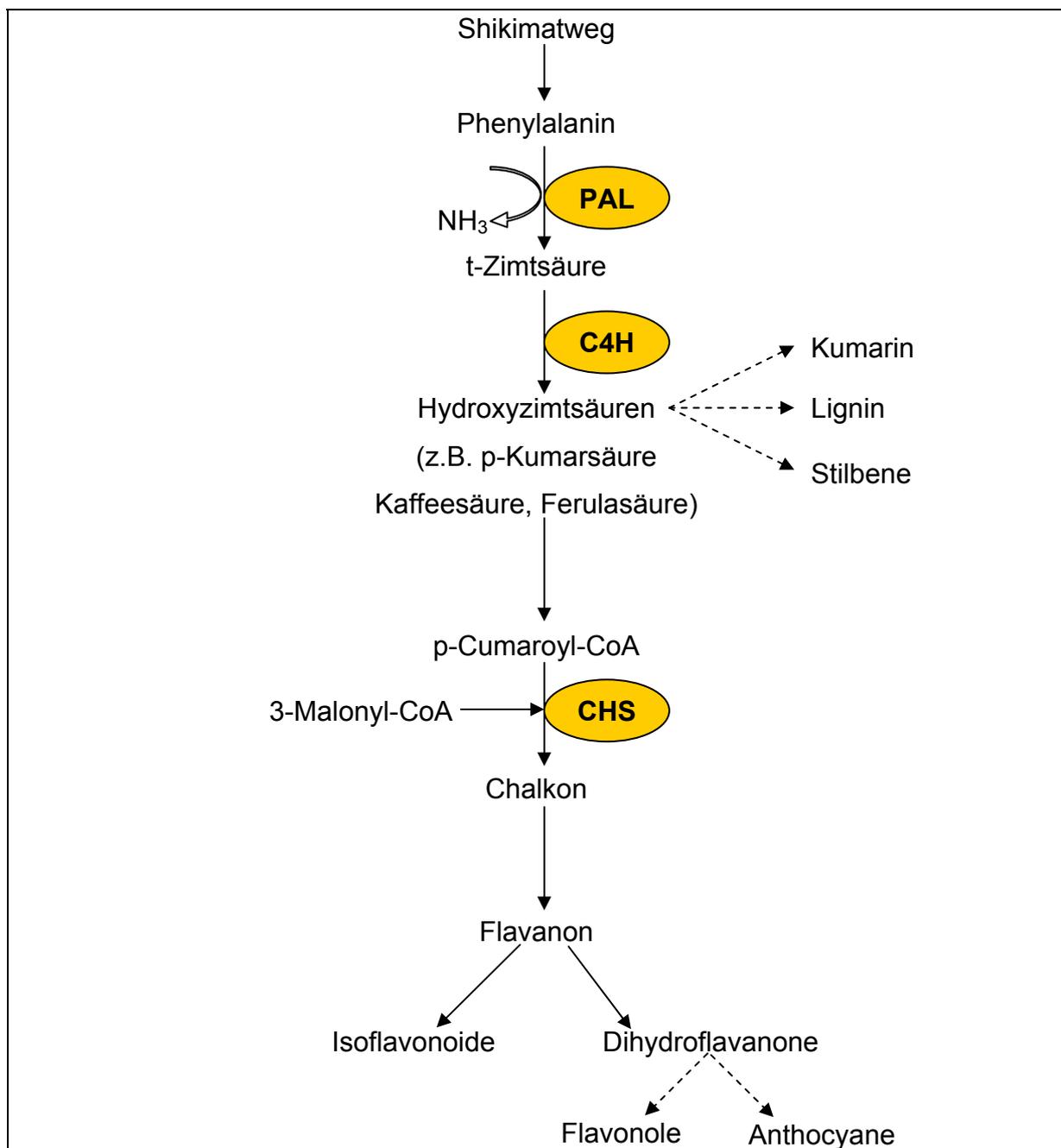


Abbildung 4: Biosyntheseweg der Phenole (verändert nach FEUCHT und TREUTTER 1989)

2.3 Weitere Signalmoleküle bei der Induktion pflanzlicher Abwehr

Eine Regulation der Abwehrgenexpression kann durch die Erzeugung sekundärer Signalmoleküle, wie Salizylsäure, Ethylen und Jasmonat erfolgen (YANG *et al.* 1997, FEYS und PARKER 2000).

Salizylsäure

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen in der Lage, selbst Salizylsäure (SA) zu synthetisieren und Salizylsäure-abhängige, physiologische Programme zu aktivieren (ALVAREZ 2000). SA kommt in Pflanzen eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Pathogenen zu (DURNER *et al.* 1997). Bevor die Verbindung als endogene Komponente der Signalwege pflanzlicher Abwehr identifiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass exogenes Auftragen von SA zur Induktion von Abwehrgenen und verstärkter Resistenz führte (DURNER *et al.* 1997).

Die Biosynthese von SA erfolgt über das im Shikimatweg gebildete Chorismat. Aus Chorismat wird über mehrere Zwischenstufen Phenylalanin gebildet. Die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure stellt einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar und wird von dem hochregulierten Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase katalysiert. Nach weiteren Zwischenschritten bildet die Benzoessäure-2-Hydroxylase aus Benzoessäure Salizylsäure (Abbildung 5). Außerdem scheint die Synthese von SA in Pflanzen über einen zweiten Weg möglich. In manchen Bakterien wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* wird SA aus Chorismat über die Isochorismatsynthase (ICS) und die Pyruvatlyase (PL) gebildet (Abbildung 5). WILDERMUTH *et al.* (2001) konnten in *Arabidopsis* Isoformen der ICS identifizieren und zeigen, dass eine Pathogenbehandlung zu einer deutlichen Induktion der Genexpression führte. In Pflanzen liegt ein Großteil der SA in gebundener konjugierter Form, meist glucosyliert, vor (ALVAREZ 2000). Die Bildung von Gentisinsäure aus SA als pflanzeneigene Abwehrreaktion ist bislang nur aus Tomate bekannt (BELLES *et al.* 1999). Eine Schlüsselrolle nimmt SA bei der Aktivierung von Resistenzantworten in einer Vielzahl von Pflanzen (Gurke, Tabak, Tomate, Ackerschmalwand) ein. Sie akkumuliert hier lokal sowie in den distalen pflanzlichen Geweben, ist für die Akkumulation von PR-Proteinen und zusammen mit ROS für den Zelltod verantwortlich. Außerdem ist sie bei der Ausprägung der systemisch erworbenen Resistenz (SAR; systemic acquired resistance) notwendig (DURNER *et al.* 1997). SAR tritt nach einer erfolgreichen Abwehr eines Pathogens in angrenzendem Gewebe,

aber auch in weiter entfernten Teilen der Pflanze auf und zeigt sich durch eine schnellere und stärkere pflanzliche Antwort gegenüber einer Sekundärinfektion (CONRATH *et al.* 2002).

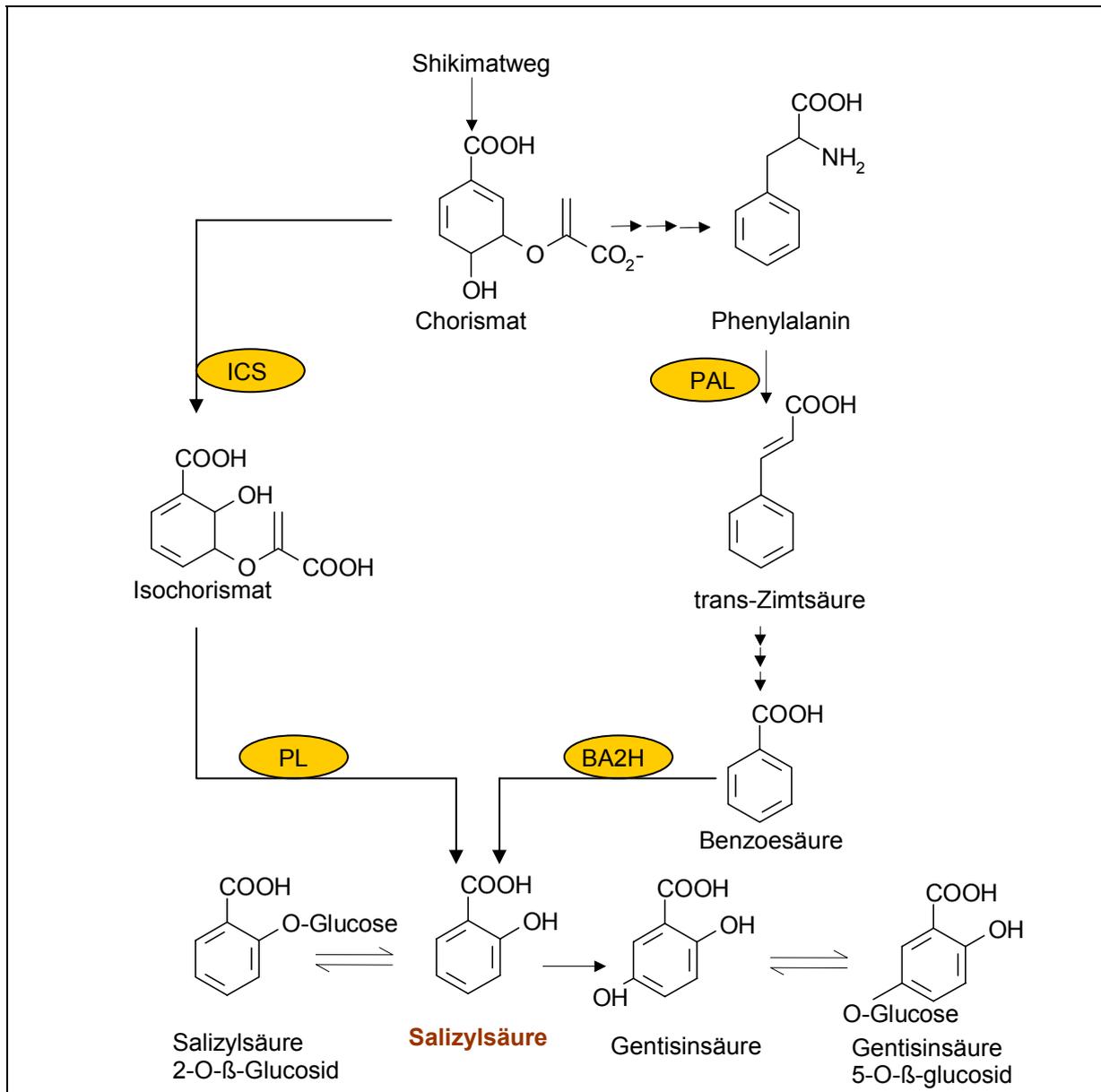


Abbildung 5: Biosynthesewege der Salizylsäure in Pflanzen PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase, BA2H = Benzoessäure-2-Hydroxylase, ICS = Isochorismat-Synthase, PL = Pyruvat-Lyase (aus WOHLGEMUTH 2002, verändert)

Die Bedeutung der Salizylsäure bei SAR konnte mit Hilfe von transgenen Pflanzen demonstriert werden, die ein bakterielles Gen (*nahG*) für eine Salizylsäure Hydroxylase besitzen. In diesen Pflanzen wird SA zu Katechol abgebaut und kann so nicht mehr akkumulieren (DURNER *et al.* 1997). Eine Konsequenz ist, dass *nahG*-Pflanzen eine reduzierte PR-Proteingenexpression zeigen, keine SAR ausprägen und ihre Fähigkeit verlieren, das Wachstum und die Ausbreitung von Pathogenen zu

begrenzen. Obwohl bekannt ist, dass Salizylsäure im Phloem über weite Strecken transportiert werden kann, scheint SA nicht das alleinige mobile Signal zu sein, welches SAR auch in distalen Blättern auslöst (DURNER *et al.* 1997).

Der Mechanismus, durch den Salizylsäure eine erhöhte Resistenz vermittelt und ihr Zusammenspiel mit reaktiven Sauerstoffspezies, das zur HR und Zelltod führt, wird kontrovers diskutiert. VAN BREUSEGEM *et al.* (2001) schlagen vor, dass Salizylsäure und ROS bei der Pathogenabwehr als selbstamplifizierendes System wirken: H₂O₂ induziert Salizylsäure, Salizylsäure verstärkt die H₂O₂-Akkumulation. Beide Signalstoffe fördern den Zelltod.

Ethylen

Ethylen (C₂H₄) ist ein Phytohormon mit vielfältigen biologischen Wirkungen. Zu den wichtigsten ethylenvermittelten Prozessen gehören verschiedene Entwicklungs- und Wachstumsprozesse wie Samenkeimung, Zellelongation, Fruchtreifung, Seneszenz und Abszission in Pflanzen (ABELES *et al.* 1992). Darüber hinaus ist eine Induktion der Ethylenbiosynthese als frühe pflanzliche Antwort auf zahlreiche biotische (Konkurrenz, Herbivorie, Pathogenbefall) und abiotische Faktoren (Wassermangel, Schwermetalle, Strahlung, Luftschadstoffe) gezeigt worden (ABELES *et al.* 1992, MORGAN und DREW 1997). Die Biosynthese von Ethylen erfolgt aus dem im Yang-Zyklus (YANG und HOFMANN, 1989) gebildeten S-Adenosylmethionin (SAM) über 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure (ACC; katalysiert durch die ACC-Synthase), welches durch die ACC-Oxidase zu Ethylen umgewandelt wird. Sowohl ACC-Synthase als auch ACC-Oxidase sind durch verschiedene Stressarten auf Protein- und Transkriptionsebene induzierbar (TUOMAINEN *et al.* 1997, JOHNSON und ECKER 1998). ACC ist dabei nicht nur der Vorläufer für Ethylen, sondern scheint auch als „second messenger“ innerhalb der Ethylen-Signalkette zu fungieren (MOEDER *et al.* 1999). Alternativ kann ACC auch zu Malonyl-ACC (MACC) oder Glutamyl-ACC (GACC) (MARTIN *et al.* 1995) konjugiert werden (Abbildung 6). Die Rolle von Ethylen bei der Stressantwort von Pflanzen wurde mit Hilfe von extern appliziertem Ethylen sowie unter Verwendung von Mutanten untersucht. Zunächst werden durch Ethylen Abwehrgene für PR-Proteine und Peroxidasen (KIEBER 1997) aktiviert. An transgenen Tabakpflanzen konnte gezeigt werden, dass Ethylen Resistenz gegen nichtpathogene Bodenpilze vermittelt (KNOESTER *et al.* 1998). Dem Pflanzenhormon wird auch eine wichtige Rolle in der so genannten induzierten systemischen Resistenz (ISR) zugeschrieben. Diese Signalkette wird durch die Besiedlung der

Pflanzenwurzeln mit speziellen nichtpathogenen Rhizobakterien ausgelöst und ist im Gegensatz zur SAR Salizylsäure-unabhängig (TON *et al.* 2001). Außerdem kommt Ethylen eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Läsionen zu. Eine Inhibierung der Ethylenbiosynthese führte zu einer deutlichen Verringerung von Läsionen (OHTSUBO *et al.* 1999). Auch in Tabak-Zellkulturen konnte durch das Pflanzenhormon in bestimmten Zellzyklusphasen ein progammierter Zelltod hervorgerufen werden (HERBERT *et al.* 2001).

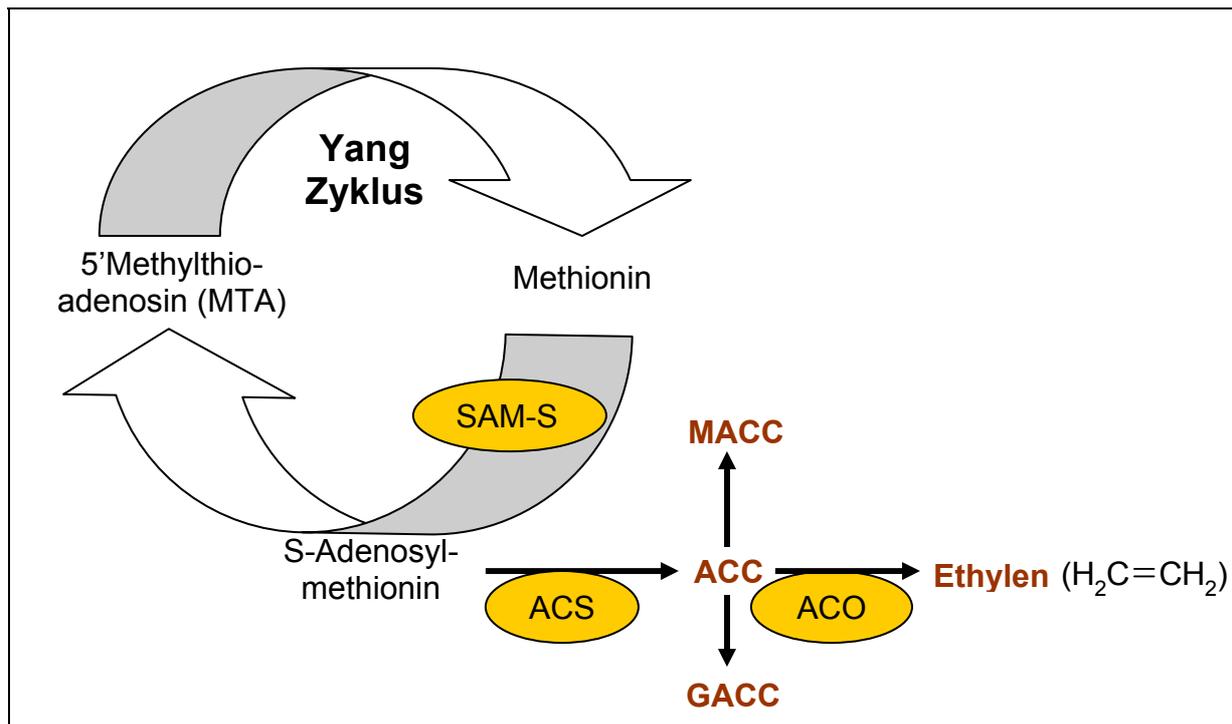


Abbildung 6: Reaktionsschema der Ethylenbiosynthese. SAM-S = SAM-Synthetase, ACS = ACC-Synthase, ACO = ACC-Oxidase, ACC = 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure, MACC = Malonyl-ACC, GACC = g-Glutamyl-ACC (aus LANGEBARTELS *et al.* 2000, verändert).

Oxylipine

Die Funktion oxygenierter Fettsäuren, den so genannten Oxylipinen (GERWICK *et al.* 1991) ist in tierischen Systemen bereits sehr gut untersucht worden. Leukotriene, Prostaglandine und Lipoxine sind hier an Entzündungs- und Immunprozessen beteiligt (SAMUELSON *et al.* 1987). Bei Pflanzen hingegen existieren relativ wenige Daten zu Funktionen der Oxylipine. In Kartoffel übernehmen sie Funktionen bei der Knollenbildung sowie bei Seneszenzvorgängen (FEUSSNER *et al.* 2001).

Der erste Schritt der Oxylipinsynthese, der entweder durch Autoxidation oder durch enzymatische Prozesse erfolgt, ist die Bildung von Hydroperoxid-Derivaten vielfach ungesättigter Fettsäuren (PUFAs) (FEUSSNER *et al.* 2001). Die vorwiegenden Substrate der pflanzlichen Lipoxygenasen (LOX) sind Linol- (LA) und α -Linolensäure

(LnA) aus denen die Glycerolipide pflanzlicher Membranen hauptsächlich aufgebaut sind (GUNSTONE 1992) (Abbildung 7). Die Produkte der LOX-Reaktion werden in Pflanzen sehr schnell durch eine Vielzahl von weiteren Enzymen umgesetzt. Der Allenoxidsynthese (AOS)-Reaktionsweg besteht aus einer Enzymkaskade, die zur Biosynthese von Jasmonsäure (JA) führt. Die nur in wenigen Pflanzen vorkommende Arachidonsäure ist in den Lipiden von zum Teil phytopathogenen Oomyceten enthalten und kann ebenfalls von pflanzlichen Lipoxygenasen umgesetzt werden (ROSAHL 1996). Die Primärprodukte der LOX-Reaktion wirken dabei auch inhibierend auf das Wachstum von *Magnaporthe grisea* und *Phytophthora infestans* (OHTA *et al.* 1990, RICKER und BOSTOCK 1994). Funktionelle Analysen in transgenen Pflanzen deuten auf die Bedeutung der Produkte und Zwischenprodukte sowie der Enzyme des LOX-Reaktionsweges bei der Antwort auf Pathogenbefall hin. Die Analyse von Mutanten von *Arabidopsis thaliana* (*fad3-2 fad7-2 fad-8*), deren LnA-Synthese ausgeschaltet war, ergab, dass die transgenen Pflanzen im Vergleich zu den Wildtyp-Pflanzen weniger Jasmonsäure enthalten und anfälliger gegenüber Befall saprophytischer Insekten sind (McCONN *et al.* 1997).

Jasmonsäure: Jasmonsäure (JA) stellt ein Stresssignal dar, das primär an Verwundungsantworten beteiligt ist (VAN BREUSEGEN *et al.* 2001). Den Jasmonaten wird neben SA eine entscheidende Rolle als Bestandteile der Signaltransduktionskette zugesprochen. FARMER und RYAN (1992) postulierten, dass nach Insekten- oder Pathogenbefall eine Lipase aktiviert und dadurch LnA aus Membranlipiden freigesetzt wird, die durch Lipoxygenasen und den anschließenden AOS-Reaktionsweg zu JA umgesetzt wird (Abbildung 7). Jasmonate induzieren nach mechanischer Verwundung sowie Fraßschäden durch Insekten die Expression von Proteinase-Inhibitoren im beschädigten Bereich sowie in weiter von der Verwundungsstelle entfernten Blättern (WASTERNAK und PARTHIER 1997). Dabei wird diese systemische Wirkung über das phloemaktive Peptid Systemin vermittelt (SCHALLER 1999). In *Oryza sativa* akkumulieren Phytoalexine nach exogener Gabe von Jasmonaten (TAMAGAMI *et al.* 1997). Außerdem besitzt JA neben seiner Funktion als Signalmolekül auch antifungale Eigenschaften und kann Entwicklungsprozesse in Pilzen inhibieren (SCHWEITZER *et al.* 1993). Zusätzlich wird Jasmonat im Gegensatz zu SA für die Entwicklung der ISR zusammen mit Ethylen benötigt (TON *et al.* 2001).

Divinylether: Die 9-Hydroperoxid-Derivate ungesättigter Fettsäuren können von der Divinylethersynthase (DES) weiter umgesetzt werden wobei 9-HPOT und 9-HPOD

zu Colnensäure (CA; 9-[1'E,3'Z-Nonadienyloxy-]-8E-nonensäure) bzw. Colnelensäure (CnA; 9-[1'E,3'Z,6'Z-Nonatrienyloxy-]-8E-nonsäure) umgesetzt werden (Abbildung 7). Die beiden Divinylether CA und CnA besitzen antimikrobielle Aktivität und akkumulieren nach Pathogenbefall in den Blättern von *S. tuberosum*. Möglicherweise sind sie an der Resistenzausprägung von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* beteiligt, da sie in unterschiedlich anfälligen Sorten unterschiedlich stark akkumulieren (WEBER *et al.* 1999).

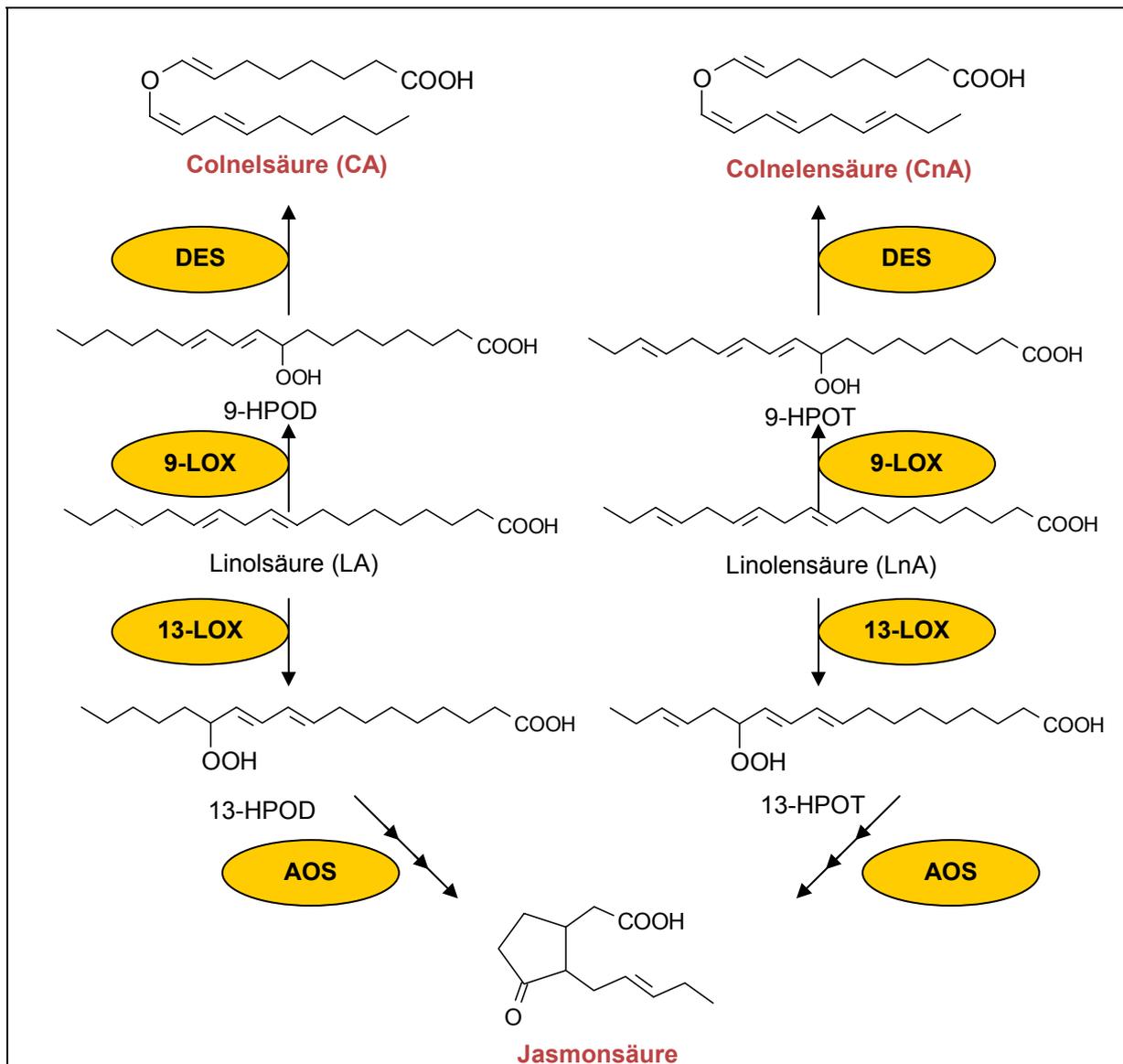


Abbildung 7: Biosyntheseweg zu Jasmonsäure und den Divinylethern CA und CnA. LOX = Lipoxygenasen, HPOD/HPOT = Hydroxyperoxide, AOS = Allenoxidsynthase, DES = Divinylethersynthase

Zusammenfassend sind in folgendem Modell (Abbildung 8) noch einmal die im Text beschriebenen Signaltransduktionswege in Pflanzen nach Pathogenbefall dargestellt.

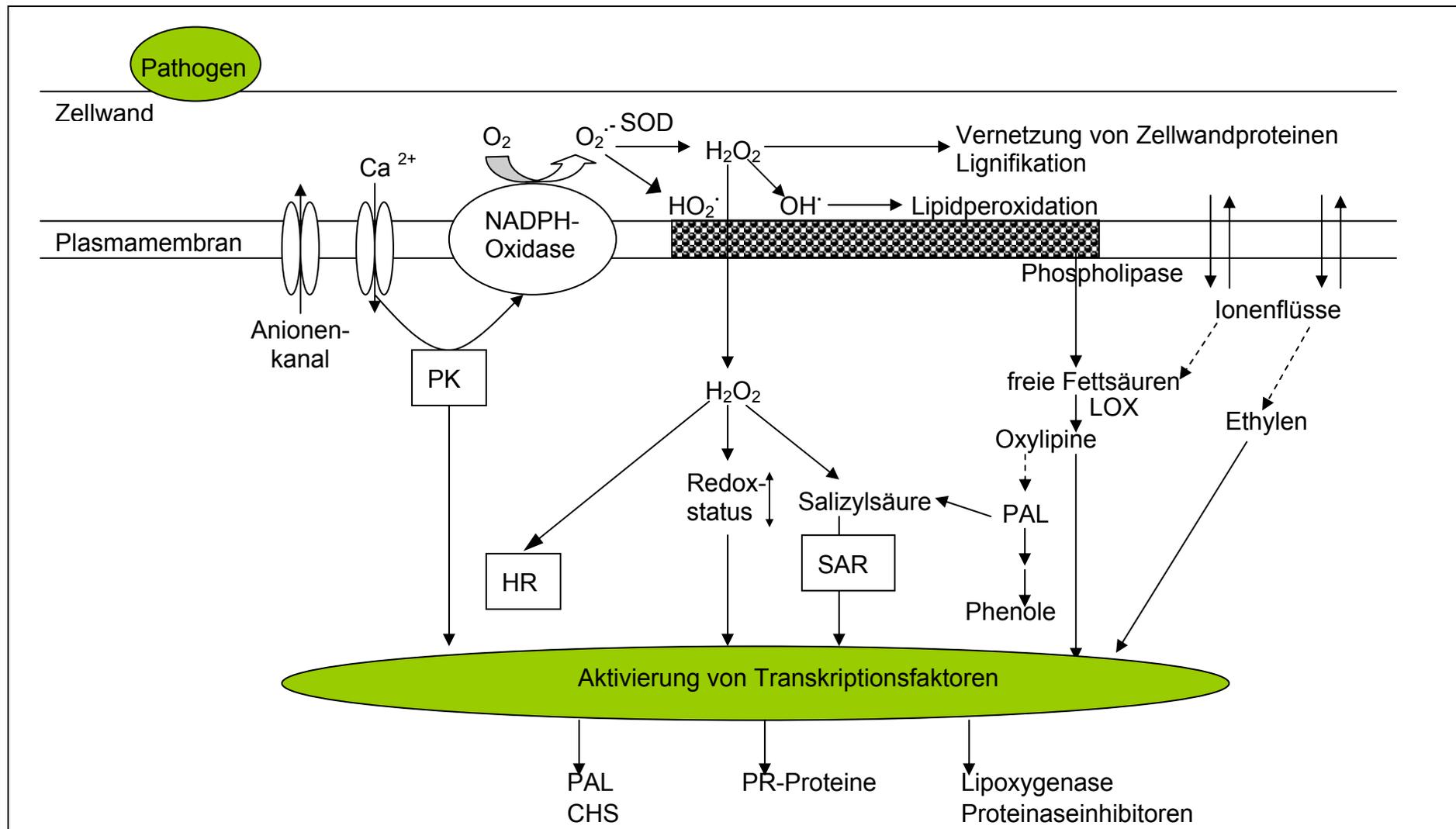


Abbildung 8: Modell der Signaltransduktionswege in Pflanzen nach Pathogenbefall. PK = Proteinkinasen, HR = Hypersensitive Reaktion, SAR = Systemic Acquired Reaction, PAL = Phenylalanin-Ammonium-Lyase, SOD = Superoxiddismutase, LOX = Lipoxygenase. Erläuterungen zu diesem Modell befinden sich im Text.

3 Pflanze–Pathogen-Interaktionen im *Solanum tuberosum* L., *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* System

3.1 Pflanzenpathogene und ihre Ernährungsstrategien

Phytopathogene haben im Verlauf der Evolution verschiedene Ernährungsstrategien entwickelt, um Wirtszellen als Nährstoffquellen zu nutzen. Sie werden demzufolge in drei Hauptgruppen unterteilt: biotrophe, hemibiotrophe und nekrotrophe Parasiten (HAMMOND-KOSACK und JONES 2000)

Bei der biotrophen Ernährungsform benötigt das Pathogen die Nährstoffe aus lebenden, noch stoffwechselaktiven Zellen. Zu dieser Gruppe der biotrophen phytopathogenen Parasiten zählen vor allem die Viren sowie die Erreger von Mehltau- und Rostkrankheiten, Nematoden und einige *Pseudomonas* Arten. Hemibiotrophe Pathogene durchleben zunächst eine kurze, biotrophe Phase, bei der die Wirtszellen lebensfähig bleiben. Anschließend folgt eine nekrotrophe Phase, die zum Absterben der Pflanzenzellen führt. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der Oomycet *Phytophthora infestans*, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.). Eine Großzahl von Pflanzenarten wird von nekrotrophen Organismen, wie Pilze der Gattung *Botrytis* und *Pythium* oder *Erwinia*-Bakterien befallen. Diese produzieren Toxine und zellwandabbauende Enzyme und können sich von den abgestorbenen Pflanzenzellen ernähren (HAMMOND-KOSACK und JONES, 2000).

3.2 *Phytophthora infestans*–der Erreger der Kraut- und Knollenfäule

Phytophthora infestans, der Erreger der Kraut- und Knollenfäule bei *Solanum tuberosum*, gehört zur Abteilung der *Oomyceten*. *Oomyceten* werden aufgrund ihrer phylogenetischen Unterschiede gegenüber den echten Pilzen dem Reich der *Chromista*, den Braun- und Kieselalgen zugeordnet (BEAKES *et al.* 1998). Besonderes Charakteristikum der *Oomyceten* ist ein diploides, unseptiertes und vielkerniges Myzel. Die Zusammensetzung ihrer Zellwand unterscheidet sich von den Vertretern der echten Pilze dadurch, dass sie anstatt Chitin als Hauptbestandteil Zellulose enthält. Im Gegensatz zu den meisten anderen *Phytophthora*-Arten ist der Wirtspflanzenkreis von *Phytophthora infestans* auf Kartoffeln, Tomaten, Eierfrüchte und andere *Solanaceae* begrenzt (JUDELSON 1997). Bei niedrigen Temperaturen (12 – 15 °C) und hoher Luftfeuchte breitet sich der Erreger rasch aus und kann

innerhalb einer Woche ganze Pflanzen zerstören. *P. infestans* bildet asexuelle, zitronenförmige, 20 – 40 µm große Sporangien. Bei geeigneten Bedingungen vollzieht das vielkernige Cytoplasma in den Sporangien eine Teilung und bildet zweigeißelige Zoosporen, die zur Infektion entlassen werden. Im Falle einer Infektion enzystieren sich die Zoosporen auf der Pflanzenoberfläche, bilden eine Zellwand und keimen aus, um die Pflanze zu penetrieren. Weiterhin wird beschrieben, dass die Sporangien bei Temperaturen um die 20 °C direkt auskeimen, was im Freiland allerdings eine untergeordnete Rolle spielt (AGRIOS 1997, DONALD und RIBEIRO 1996). Nach erfolgreicher Penetration wächst das Mycel im Interzellularraum des befallenen Organismus, während nur die Haustorien die pflanzliche Zellwand durchdringen. Diese scheiden Verdauungsenzyme aus und nehmen die gelösten Nährstoffe auf. Aus den Spaltöffnungen der Wirtspflanze ragen die zur vegetativen Vermehrung spezialisierten Hyphen, die so genannten Sporangioophoren, nach außen. Für die sexuelle Reproduktion bildet *P. infestans* Oosporen, die beim Aufeinandertreffen von Kreuzungstyp A1 und A2 gebildet werden. Oosporen können überwintern bevor sie wieder ein Sporangium ausbilden, doch wahrscheinlicher ist die Überwinterung von *P. infestans* in latent infizierten Knollen als Mycel (JUDELSON 1997).

3.3 *Alternaria solani* – der Erreger der Dürffleckenkrankheit

Alternaria solani Sorauer, der Erreger der Dürffleckenkrankheit, gehört zur Klasse der *Deuteromycetes*. Bisher ist nicht gesichert, ob es verschiedene Rassen von *Alternaria solani* gibt. Die morphologische, physiologische und pathogene Variabilität deutet allerdings darauf hin. Der Pilz kann schon innerhalb eines Stammes in Wachstum, Farbe, Sporulation und Größe der Sporen sehr stark variieren, so dass die Festlegung von einzelnen Rassen sehr schwierig und bisher noch unsicher ist (ROTEM 1994). Unter den *Fungi imperfecti* besitzt *A. solani* keine sexuellen Rekombinationsmöglichkeiten und die entsprechenden Fortpflanzungsmechanismen. *A. solani* zählt zu den nekrotrophen Organismen. Er kann widrige Umweltbedingungen als Mycel, Konidien oder aber als dickwandige Chlamydosporen auch auf totem Gewebe überdauern. Für die Keimung benötigt *A. solani* ausreichend Wasser und ein Temperaturoptimum von 25 °C. Die Ausbildung der Keimschläuche kann jedoch auch schon bei Temperaturen um die 5 °C erfolgen. Auch Temperaturen von 45 °C verhindern die Keimung nicht, solange genügend Feuchtigkeit vorhanden

ist (ROTEM 1994). Nach längeren Trockenphasen können vertrocknete Keimschläuche ihr Wachstum durch Wasser wieder aufnehmen (CHELKOWSKI und VISCONTI 1992). Eine Keimhemmung tritt vor allem durch erhöhte UV-Strahlung auf. Durch Pigmentierung der Sporen kann sich der Pilz teilweise vor der Strahlung schützen (STEVENSON und PENNYPACKER 1988). Neben der Kartoffel können Tomate, Paprika, Aubergine und alle Unkräuter aus der Familie der *Solanaceen* befallen werden. Kohl, Möhren, Salat und Zwiebeln können aber ebenfalls Wirtspflanzen für *A. solani* sein (HOFFMANN und SCHMUTTERER 1983). Nach Eindringen des Keimschlauchs durch Stomata oder Wunden kommt es nach fünf bis vierzehn Tagen zu den ersten Symptomen an der Pflanze und neue Sporengenerationen werden gebildet. Hierzu werden zunächst Konidiophore ausgebildet. Durch Licht und Trockenheit wird dann die Konidienbildung induziert, welche anschließend aber in der Dunkelheit stattfindet. Die für die Sporulation benötigten Temperaturen liegen zwischen 10 °C und 30 °C (ROTEM 1994). *A. solani* sporuliert bevorzugt auf totem Gewebe, da Photosynthese und die Anwesenheit von Zuckern hemmend auf die Bildung der Sporen wirken (ROTEM 1994). *A. solani* ist in der Lage, nicht-wirtsspezifische Toxine zu bilden. Eines dieser Toxine ist die so genannte „alternaric acid“ (Abbildung 9). „Alternaric acid“ bewirkt Elektrolytverluste in befallenem Gewebe und unterdrückt die Ausbildung einer HR (CHELKOWSKI und VISCONTI 1992).

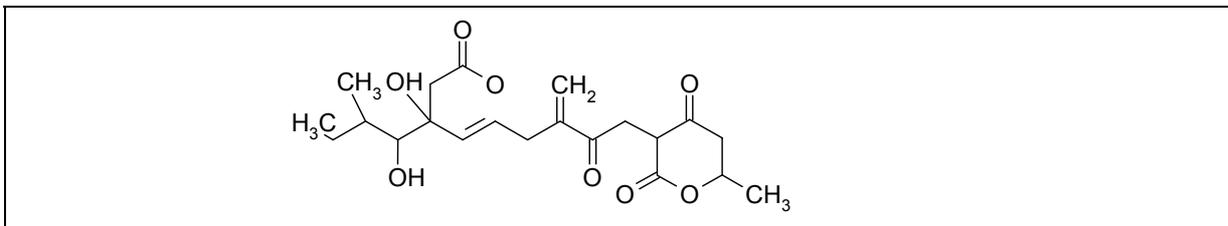


Abbildung 9: „Alternaric acid“ (CHELKOWSKI und VISCONTI 1992)

Weitere von *A. solani* produzierte toxische Substanzen sind Solanapyron A, B und C (Abbildung 10). Diese werden von CHELKOWSKI und VISCONTI (1992) im Zusammenhang mit der Nekrosenbildung nach Pathogenbefall diskutiert.

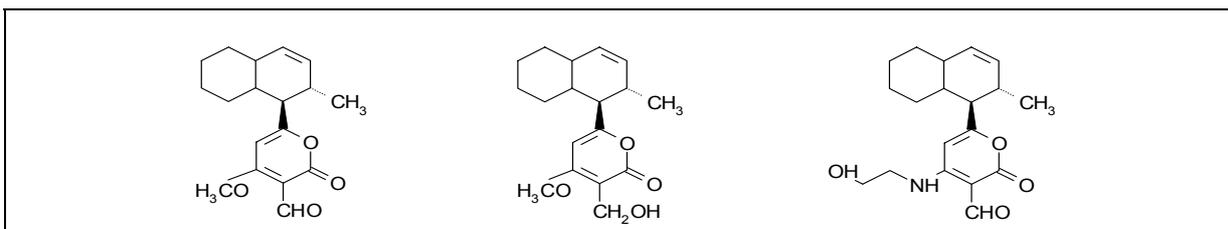


Abbildung 10: Solanapyrone (von links nach rechts A, B, C) (CHELKOWSKI und VISCONTI 1992)

3.4 Interaktionen von *Solanum tuberosum* L. und *Phytophthora infestans* bzw. *Alternaria solani*

Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) wurde im 16. Jahrhundert aus Südamerika eingeführt und gehört heute zu den wichtigsten Kulturpflanzen Europas. Sie gehört in die Klasse der dikotylen Pflanzen zur Familie der *Solanaceae*. Aufgrund der anspruchslosen Wachstumsbedingungen gestaltet sich der landwirtschaftliche Anbau relativ einfach. Probleme dabei bereiten jedoch immer wieder Erkrankungen wie die durch *P. infestans* verursachte Kraut- und Knollenfäule sowie die durch *A. solani* verursachte Dürffleckenkrankheit.

Zu Beginn der Kraut- und Knollenfäule an Kartoffel kommt es bei kühlem und feuchtem Sommerwetter, ausgehend von einem Primärherd, zu einer sehr schnellen, großflächigen Ausbreitung der Krankheit. Man erkennt die Krautfäule an gelblich-dunkelgrünen, später braunen Blattflecken und, bei hoher Luftfeuchte, an einem weißen Pilzrasen auf der Blattunterseite. Die Infektion der Knolle erfolgt hauptsächlich bei der Ernte und verursacht die so genannte Braunfäule. Die erkrankten Knollen sind anhand unregelmäßig braungrauer Flecken erkennbar, die bis ins Knolleninnere braun und trockenfaulig sind.

Die Ausbreitung von *A. solani* beginnt vor allem an älteren oder gestressten Pflanzen. Ältere Blätter einer Pflanze werden bevorzugt befallen. Im Anfangsstadium einer Infektion sind vereinzelte braun-schwarze Punkte, so genannte Sprühflecken auf der Blattoberfläche erkennbar. Diese Infektionsherde vergrößern sich, werden aber durch die Blattnerven scharf abgegrenzt. Eindeutig zu erkennen ist die Dürffleckenkrankheit an konzentrisch auftretenden Ringen innerhalb der befallenen, nekrotisierten Stellen und einem chlorotischen Hof (KUCHAREK 2001, ROWE *et al.* 2001). Die Infektion der Kartoffelknolle findet meist während der Lagerung statt. Es bildet sich eine typische Trockenfäule aus, die an bräunlich korkigen Flecken erkennbar ist. Der infizierte Bereich ist dabei scharf vom gesunden Gewebe getrennt (KUCHAREK 2001). Die Kraut- und Knollenfäule und die Dürffleckenkrankheit werden derzeit durch kostenintensiven Einsatz umweltbelastender Fungizide bekämpft. Daneben wird versucht, wirksame Resistenzgene aus den Wildtypformen *Solanum demissum* und *Solanum commersonii* in kultivierte Sorten von *Solanum tuberosum* einzukreuzen. Die erzielten Resistenzen waren aber aufgrund des schnellen Auftretens neuer virulenter Rassen nicht sehr dauerhaft. Deshalb besteht weiterhin

großes Interesse, alternative Methoden zur Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule sowie der Dürrfleckenkrankheit an *S. tuberosum* zu finden.

Nach VLEESHOUWERS *et al.* (2001) ist die hypersensitive Reaktion die Hauptantwort auf den Befall von Kartoffelblättern mit *P. infestans*. Das Ausmaß und die Schnelligkeit der HR entscheidet dabei, ob sich eine Infektion mit *P. infestans* ausbreiten kann oder nicht. Dabei akkumulierten nur bei einer inkompatiblen Interaktion reaktive Sauerstoffspezies, es kam zu einem „oxidative burst“, der anschließend zum Zelltod führte (DOKE *et al.* 1996). ANDREU *et al.* (2001) konnten nach Infektion zweier unterschiedlich anfälliger Kartoffelsorten gegenüber *P. infestans* eine stärkere Akkumulation von Phenolen nach Infektion bei der resistenteren Sorte nachweisen. YAO *et al.* (1995) zeigten an transgenen Kartoffeln, die verminderte Gehalte an Phenylalanin und somit auch an Chlorogensäure aufweisen, dass dies zu einer Zunahme der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* führte. COQUOZ *et al.* (1995) konnten zeigen, dass mit Arachidonsäure behandelte Kartoffelpflanzen erhöhte Salizylsäurekonzentrationen aufwiesen, doch dies nicht mit der Toleranz gegenüber *P. infestans* oder *A. solani* korrelierte.

Weiter scheint die Akkumulation verschiedener PR-Proteine eine wichtige Rolle bei der Abwehr von *P. infestans* oder *A. solani* zu spielen. PR-Proteine der Familie 1 zeigen *in vitro* antifungale Wirkung, unter anderem auch gegen *P. infestans* (SELITRENNIKOFF 2001). Glukanasen (PR-2) und Chitinasen (PR-3) können pilzliche Zellwände abbauen und so die Verbreitung der Pilze hemmen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass thaumatin-ähnliche Proteine (PR-5) den Apex der Sporangien von *P. infestans* abbauen und das Hyphenwachstum hemmen (HUANG 2001).

4 Themenstellung

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen des Sonderforschungsbereichs (SFB) 607 „Wachstum und Parasitenabwehr“. Ziel des SFB 607 ist es, die Regulation der Ressourcenverteilung zwischen und innerhalb von Nutzpflanzen aus Land- und Forstwirtschaft sowie die hierbei, unter dem Einfluss pflanzlicher Konkurrenten, Wirt/Parasit-Interaktionen und Mykorrhizen sich einstellenden stofflich/energetischen „Kosten-Nutzen-Bilanzen“ zu klären. Das „Dilemma“ der Pflanze, Primär- und Sekundärstoffwechsel im Spannungsfeld zwischen Wachstumsprozessen und der Parasitenabwehr aufeinander abstimmen zu müssen, bildet den wesentlichen Ansatzpunkt. Als zentrale Hypothese soll geprüft werden, ob eine Steigerung der Parasitenabwehr zu einer Einschränkung in Wachstum und Konkurrenzverhalten führt (MATYSSEK *et al.* 2002). Ein besseres Verständnis der Ressourcenverteilung könnte dazu beitragen, Störanfälligkeiten in forst- und landwirtschaftlichen Systemen zu minimieren und die Empfindlichkeit der Ökosysteme gegenüber Umwelteinflüssen besser zu beurteilen. In diesem Zusammenhang wurde das folgende Projekt „Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani*“ durchgeführt. Hierzu sollten verschiedene biochemische Abwehrwege von *Solanum tuberosum* gegenüber *P. infestans* als hemibiotropher Organismus und *A. solani* als nekrotropher Organismus untersucht werden. Die Verwendung unterschiedlich anfälliger Kartoffelsorten sollte eine Aussage über potenzielle Ursachen unterschiedlicher Toleranz gegenüber verschiedenen Pathogenen ermöglichen. PLEBL (2002) konnte dabei einen toleranzfördernden Effekt erhöhter CO₂-Konzentrationen bei Kartoffel gegenüber *P. infestans* aufzeigen. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte die Frage bearbeitet werden, ob durch Gaben erhöhter Stickstoffmengen der toleranzfördernden Effekt einer erhöhten CO₂-Konzentrationen wieder „weggedüngt“ werden kann. Kohlenstoff und Stickstoff stellen die Hauptelemente des Pflanzenmetabolismus dar. Die unterschiedlichen Resistenzreaktionen sollten anhand von Untersuchungen des Primär- und Sekundärstoffwechsels näher charakterisiert werden. Die Frage, inwieweit eine erhöhte CO₂-Konzentration unserer Atmosphäre im Rahmen eines sich veränderten Klimas und eine erhöhte N-Düngung auf die Anfälligkeit von *S. tuberosum* auswirken und ob eine gesteigerte Abwehrkapazität negativ mit dem Ertrag korreliert, ist für eine zukünftige, umweltfreundliche Landnutzung von großer Bedeutung.

II MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Geräte

Gerät	Typ	Firma
3D-Schüttler	Polymax 2040	Heidolph
Autoklav	Fabriknr. 69203	Webeke & Co
Blotter	Nova Blot	Pharmacia LKB
Elektrophoresapparatur	Mini Protean II Cell	BIO-RAD
Feinwaage	Typ 2474	Sartorius
Gaschromatograph	3300	Varian
Grobwaage	L310	Sartorius
Heizblock	Typ 2082	Gebr. Liebisch
HPLC		Beckmann
HPTLC Trennkammer	120150	DESAGA
Integrator	Model C-R1A	Altex
Integrator	4400	Varian
Küvetten (Plastik)	REF. 67.742	Sarstedt
Leuchtröhren	MT 450 DL/BH	Clean Ace
Lyophile	LYOVAC	Finn-Aqua
Mikroskop		Carl Zeiss
Mikrotiterplattenleser	Titertek Plus MT 212	ICN
pH-Meter	digital ANALYZER	Bachofer
pH-Meter	ORION RESEARCH	Bachofer
Photometer	No. 160	Beckman
Photometer	Uvicon 810	Kontron
Phytotron	York	York GmbH
Pumpen	No. 112	Beckman
Rotationsverdampfer	Rotavapor	Büchli, CH
Speed-Vac	SVC 100 M	SAVANT
Thoma Kammer	Tiefe 0,1 mm/0,0025 mm ²	Brandt
Vortex	VF2	Janke & Kunkel
Waage	Analytic AC 210S	Sartorius
Wärmeschrank	U50 / U40	Memmert
Wasserbad	Typ 1083	GFL
Zentrifuge	Avanti 30	Beckmann

1.2 Chemikalien

1.2.1 Feinchemikalien

Chemikalie	Firma	Kat. Nummer
β -Mercaptoethanol	Merck	1.15433
2-Butyl-6-Hydroxytoluen	Sigma	B-1378
4-Nitroblau Tetrazolium	Sigma	N-6876
5-Bromo-4-Chlor-3-Indoylphosphat	Sigma	B-6145
Aceton	Merck	UN-1090
Acrylamid	Sigma	A-8887
Agar	Sigma	A-8626
Ammoniumsulfat	Merck	A-172917
Amyloglucosidase (<i>Aspergillus niger</i>)	Sigma	A-3514
ATP	Sigma	A-2383
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad	500-0006
Bromphenolblau	Sigma	B-8026
Colnensäure (CA)	Larodan	14-1802-7
CaCl ₂	Merck	2382
CaCO ₃	Merck	2066
Carboxymethyl-Chitin-Remazol-Br.	LOEWE Biotech	04106
Chitinase	Sigma	C-6137
Chloroform	Baker	7386
Colnelensäure (CnA)	Larodan	14-1803-7
D(+)-Glukose-Monohydrat	Merck	1.08342
D-Glukose-6-Phosphat	Sigma	G-7250
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma	D-8001
Eisessig	Merck	UN 2789
Etherolensäure (EnA)	Larodan	14-1805-7
Essigsäure	Merck	63
Ethan-Eichgas	Messer-Griesheim	
Ethanol abs.	Merck	983
Ethylacetat	Merck	864
Ethylen-Eichgas	Messer-Griesheim	
Fruktose	Fluka	47739
Glukose	Merck	8337
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Boehringer Mannheim	197726
Glycerin, 87%	Merck	4094
Glycin	Sigma	G-7126
HCl (32%)	Merck	107
Hexokinase (aus Bäckerhefe)	Fluka	53115
Invertase	Sigma	L-4504

Chemikalie	Firma	Kat. Nummer
Isopropanol	Merck	UN 1219
Kaliumchlorid	Merck	4936
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	1.04871
Katalase	Boehringer Mannheim	106810
Kieselgelplatten	Merck	1.05644
Kupfer(II)sulfat	Merck	2791
Laminarin	Sigma	L-9634
Laurylsulfat (SDS)	Sigma	L-3771
Magnesiumchlorid	Merck	1.05833
MES	Sigma	M-2933
Methanol	Merck	6009
MgSO ₄	Merck	239086
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin	Merck	10732
NADP ⁺	Sigma	N-0505
NADPH	Sigma	N-6505
NaH ₂ PO ₄	Merck	6346
NaOH	Merck	6498
Natriumchlorid	Merck	1.06400
Natriumcitrat	Merck	6448
Natriumtetraborat (Borax)	Merck	6310
Natronlauge	Merck	5594
o-Anissäure (o-AA)	Sigma	A-2410
PhosphoGlukose Isomerase	Sigma	P-5381
p-Hydroxybenzoesäure (p-HBA)	Sigma	H-5376
p-Hydroxybenzoesäurehydrazin	Sigma	H-9882
PVPP	Sigma	PVP 10
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma	A-2153
Saccharose	Merck	7651
Salizylsäure	Sigma	S-0875
Sek. Antikörper (Anti-Rabbit IgG-AP)	Boehringer Mannheim	
Stärke	Merck	1252
Stickstoff 5,0	Messer-Griesheim	
Synthetische Luft	Messer-Griesheim	
Trichloressigsäure	Sigma	T-4885
Triethanolaminhydrochlorid	Sigma	T-1502
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan	Roth	4855.3
Tween 20	Merck	822184
Universal Master Mix	PE Applied Biosystems	E01086
Wasserstoff 5,0	Messer-Griesheim	

1.2.2 Pufferlösungen

Phosphatpuffer 50 mM, pH 2,0

Lösung A: 50 mM Phosphorsäure

Lösung B: 50 mM Natriumdihydrogenphosphat

Der pH wird mit Lösung B eingestellt.

Phosphatpuffer 0,2 M, pH 5-8

Lösung A: 0,2 M Natriumdihydrogenphosphat

Lösung B: 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat

Citrat/Acetat Puffer pH 5,0

Lösung A: 30 mM Natriumcitrat

Lösung B: 27 mM Natriumacetat

Der pH wird mit NaOH eingestellt.

Tris-Puffer 0,2 M, pH 8,0

0,2 M Trizma-Base

Der pH wird mit konz. HCL eingestellt.

Na-Acetatpuffer, pH 5,0

0,2 M oder 0,1 M Na-Acetat

1 % PVPP

1.3 Pflanzenmaterial

1.3.1 Art und Herkunft des Pflanzenmaterials

Zur Untersuchung des Einflusses von CO₂ und Stickstoff auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* dienten die vier Kartoffelsorten (*Solanum tuberosum* L.) Indira, Bettina, Kuras und Bintje (Tabelle 1).

Sorte	Vertreiber / Herkunft
Indira	Saatzucht Firlbeck, Rinkam
Bettina	Staatliches Versuchsgut Scheyern
Kuras	Böhm Kartoffelzucht, Langquaid
Bintje	Böhm Kartoffelzucht, Langquaid

Tabelle 1: Vertrieb und Herkunft der verwendeten Kartoffelsorten

1.3.2 Anzuchtbedingungen der Gewächshauskulturen

Die Anzucht der Kartoffelsorten erfolgte bis zur Keimung in klimatisierten Gewächshauskammern ohne Anschluss an Reinluft bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C (Tag u. Nacht) und einem zwölfstündigem Tag-Nacht-Zyklus (7:00 - 19:00 Uhr Licht). Die ungebeizten Knollen wurden für den Großversuch I „Allgemeine Resistenzmechanismen“ (vgl. 2.1.4, Tabelle 2) in einer 3:1 (v/v) Mischung aus Fruhsdorfer T-Erde und Ackerboden in Plastiktöpfen ($\varnothing = 21$ cm, 4,5 l, TEKU, Pöppelmann) herangezogen. Für den Großversuch II „Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf das Resistenzverhalten der Kartoffelsorten“ (vgl. 2.1.4, Tabelle 3) wurden die Knollen in einer 3:1:1 (v/v/v) Mischung aus Ackererde, Fruhsdorfer T-Erde und Sand zur Minimierung des Stickstoffanteils der Fruhsdorfer T-Erde herangezogen. Da die Versuche in den Wintermonaten stattfanden und die Knollen sich somit in der Keimruhe befanden, wurde diese durch Wechselwärme (3 Tage 4 °C, 3 Tage 25 °C) vor dem Topfen der Knollen beendet. Nach dem Auskeimen wurden die Pflanzen für den Großversuch II in die klimatisierten und an Reinluft angeschlossenen Gewächshäuser des GSF- Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg verlegt. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 14 Stunden Licht und 10 Stunden Dunkelheit bei einer Temperatur von 20 ± 2 °C und 16 ± 2 °C (Tag u. Nacht) sowie einer relativen Luftfeuchte von 60 ± 5 %. Die Bewässerung der Pflanzen erfolgte automatisch durch eine Tröpfchenbewässerungsanlage. Für

Großversuch I blieben die gekeimten Kartoffelpflanzen in den Gewächshäusern des Lehrstuhls bei einem 14-stündigen Tag-Nacht-Zyklus (6:00 - 20:00 Uhr Licht) und bei einer Temperatur von 18 ± 2 °C. Nachts wurde die Temperatur auf 16 ± 2 °C abgesenkt. Die Bewässerung erfolgte alle zwei Tage manuell. Zwei, vier und sechs Wochen nach Keimung begannen die einzelnen Versuche. Fünf Wochen nach Auflaufen wurden die Pflanzen mit einer Mischung aus NH_4NO_3 und HK_2PO_4 (0,2 g N und 0,2 g K_2PO_4^- /Pflanze) gedüngt.

1.3.3 Anzuchtbedingungen im Freiland

Die im Freiland kultivierten Sorten Indira und Bettina wurden am 10. April 2002 per Hand in ein, durch eine Kreiselegge aufgezoogenes Gitternetz ausgelegt. Der Reihenabstand betrug 66 cm. Die Versuchsfäche befand sich am Kieswasch in der Nähe von Freising in einer geschützten, ebenen Lage. Bei dem Aufbau des Feldes handelte es sich um eine randomisierte Blockanlage aus 20 Parzellen mit jeweils 126 Einzelpflanzen die in 9 Reihen zu jeweils 14 Pflanzen angelegt waren (Abbildung-A 1). Vor dem Ausbringen der Knollen wurde der Boden mit Patentkali (100 dt/ha) und Triplesuperphosphat (30 dt/ha) behandelt (Tabelle-A 10).

Nach dem Auslegen der Knollen wurden diese mit einem Häufelgerät mit Erde bedeckt. Die gesamte Blockanlage war an den Längsseiten mit je zwei Reihen Kartoffelpflanzen umgeben, um etwaige Randeffekte zu minimieren. Am 25.04.2002, zwei Wochen nach dem Auslegen der Knollen, waren über 50 % der Keimlinge 1 cm groß. Am 07.05.2002 waren die ersten Blattspitzen zu erkennen. Während der gesamten Vegetationsperiode wurde das Feld insgesamt viermal mit Pflanzenschutzmitteln gegen Unkraut (vor allem Distelbewuchs) und gegen Larven des Kartoffelkäfers behandelt (vgl. Anhang, Tabelle 1-3). Die klimatischen Bedingungen des Vegetationszeitraumes sind in Abbildung 50 des Ergebnisteils abgebildet. Kurz vor Bestandesschluss ca. 6 Wochen nach Auflaufen der Pflanzen, wurden Blätter der zweiten und dritten Blattetage (junge Blätter) sowie der fünften und sechsten Blattetage (alte Blätter) der Pflanzen für detached-leaf-Versuche mit *P. infestans* geerntet. Dabei wurden nur Pflanzen der inneren Reihen einer Parzelle beerntet, die Randpflanzen einer Parzelle wurden zur Minimierung des Randeffekts nicht berücksichtigt. Zu diesem Zeitpunkt war noch keine Verbreitung von *P. infestans* im Feld zu erkennen. Die übrigen nicht beernteten Pflanzen wurden zur

weiteren Beobachtung einer natürlichen *P. infestans* Epidemie bis zur Abreife auf dem Feld belassen.

1.4 Pilzliche Isolate und Inokulation der Blätter

Pilzliche Isolate: Die für die Versuche zur Verfügung stehenden Pilze (*Phytophthora infestans* und *Alternaria solani*) wurden von der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) in Braunschweig bezogen und in der Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising-Weihenstephan weiterkultiviert. Die Isolate von *Phytophthora infestans* wurden durch zweimaliges Überimpfen auf Kartoffelknollen fertil erhalten (FLEISCHMANN, 2000) und auf V8-Agar (20 g Agar, 2 g CaCO₃, 200 ml Gemüsesaft, 800 ml H₂O_{dest.}) in Petrischalen (Ø 9 cm) im Rhythmus von zwei bis drei Wochen vermehrt. Nach Vermehrung der Isolate wurden diese in einer Kühlkammer bei 16 °C ohne Licht kultiviert. Jedes der drei verwendeten Isolate (Isolatnummer 31, 38, 57) war multikomplex in Bezug auf die Virulenzgene. Alle drei Isolate besaßen die Virulenzgene 1 / 3 / 4 / 7 / 8 / 10 und 11. Bei Isolat 31 trat das Virulenzgen 5 zusätzlich auf, während es bei den beiden anderen Isolaten 38 und 57 nicht nachgewiesen werden konnte. Die Bestimmung der Virulenzgene erfolgte in der Biologischen Bundesanstalt (BBA) in Braunschweig.

Von *Alternaria solani* wurde der Stamm 2947 verwendet. Die Vermehrung von *A. solani* fand ebenfalls auf V8-Agar (20 g Agar, 2 g CaCO₃, 200 ml Gemüsesaft, 800 ml H₂O_{dest.}) in Petrischalen (Ø 9 cm) in einem 4-Wochen-Rhythmus statt. Nach Vermehrung wurden die Platten bei 20 bis 25°C in Wärmeschränken bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden kultiviert.

Inokulation der Blätter: Für die *in vitro* Inokulation der detached-leaf-Versuche erfolgte eine Überschichtung der Kulturen von *P. infestans* oder *A. solani* mit je 10 ml kaltem H₂O_{bidest.} Dabei wurde das Mycel mit einem Spatel vom Agar gelöst. Die entstandene Mycel-Suspension wurde durch einen Mullbindenfilter (4-lagig) filtriert und die Petrischalen nochmals mit 10 ml H₂O_{dest.} gespült. Die Sporangienkonzentration der Suspensionen konnte mit Hilfe einer Thoma-Kammer (Tiefe: 0,1 mm, Großquadratgröße: 1,0 mm²) bestimmt werden. Nach einer Inkubationszeit der Suspensionen von 1,5 Stunden bei 7 °C wurde die gewünschte Sporangienkonzentration von 10⁴ Sporangien/ml eingestellt. Anschließend wurden die Suspensionen der verschiedenen Isolate zu gleichen Teilen gemischt und bis zur Inokulation der Blätter im Kühlschrank aufbewahrt. Die Inokulation der Blätter erfolgte

durch Eintauchen des gesamten Blattes in die Sporensuspension, um eine gleichmäßige, flächige Ausbreitung von *P. infestans* sowie *A. solani* zu garantieren. Die mit *P. infestans* inokulierten Blätter wurden anschließend in Petrischalen mit Wasseragar in Klimakammern (YORK) bei einer konstanten Temperatur von 16 °C, einem zwölfstündigem Tag-Nacht-Rhythmus (7:00-19:00 Uhr Licht) und einer relativen Luftfeuchte von 65 % über fünf Tage beobachtet.

Die Beobachtung der mit *A. solani* inokulierten Blätter fand ebenfalls in Petrischalen mit Wasseragar für fünf Tage in Klimakammern statt. Die Temperatur betrug dabei 18 °C. Die relative Luftfeuchte und der Tag-Nacht-Rhythmus blieben konstant. Eine tägliche Benetzung der Blätter mit Wasser sollte ein Austrocknen der Blätter verhindern und ein gleichmäßiges Auskeimen der Pilze garantieren. Die Klimakammern waren mit speziellen UV-Lampen zur Imitation des Sonnenlichtes (HQI-Lampen, 200 µE Strahlungsstärke) ausgestattet.

2 Methoden

2.1 CO₂-Begasung und Stickstoffdüngung

2.1.1 CO₂-Begasung

Die CO₂-Begasung der Versuchspflanzen fand in den Gewächshauskammern der GSF in Neuherberg statt. Hierbei wurden die Pflanzen nach dem Auskeimen über vier Wochen bei einem kontinuierlichen CO₂-Partialdruck von 700 ppm ± 50 ppm gehalten. Die Kontrollpflanzen wuchsen unter einem atmosphärischen CO₂-Partialdruck von 400 ppm ± 50 ppm ebenfalls in den Gewächshäusern der GSF auf. Dabei wurden, um Kammerunterschiede zu minimieren, alle Pflanzen einer Variante auf zwei Gewächshauskammern mit identischem CO₂-Partialdruck aufgeteilt.

2.1.2 Stickstoffdüngung der Gewächshausversuche

Die Stickstoffdüngung erfolgte in zwei Gaben zu je 0,4 g reinen Stickstoff/Pflanze. Die erste Düngung erfolgte eine Woche nach dem Auflaufen der Pflanzen, die zweite Düngung zwei Wochen nach der ersten Düngung. Hierbei wurde der benötigte Stickstoff in Form von NH₄NO₃ gelöst in H₂O_{dest} aufgebracht. Die Kontrollpflanzen wurden nicht gedüngt. Alle Pflanzen wurden in stickstoffarmer Erde, einer Mischung aus Ackererde, Sand und Fruhstorfer T-Erde (3:1:1) angezogen.

2.1.3 Stickstoffdüngung im Freiland

Die Stickstoffdüngung im Freiland erfolgte einen Tag nach dem Auflaufen der Pflanzen. Die Keimlinge waren zum Zeitpunkt der Düngung ca. 1 cm hoch. Die im Boden vorhandenen Gehalte an verfügbarem sowie an gebundenem Stickstoff wurden vor der Düngung durch die Bayerische Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft in Freising-Weihenstephan bestimmt. Diese Daten dienten zur Ermittlung der tatsächlich aufzutragenden Stickstoffmengen. Hierbei wurde die Niedrig-N-Variante auf 60 kg N/ha und die Hoch-N-Variante auf 160 kg N/ha durch eine einmalige Gabe von Kalk-Ammoniumsulfat-Dünger (KAS) aufgedüngt (Tabelle A 10). Somit ergaben sich die im Folgenden dargestellten Varianten.

2.1.4 Versuchsaufbau und Variantenverteilung der einzelnen Großversuche

Großversuch I: Allgemeine Resistenzparameter

Kartoffelsorten	CO ₂ -Begasung	N-Düngung	Alter der Pflanzen
Indira	--	--	2, 4, 6 Wochen
Bettina	--	--	2, 4, 6 Wochen
Bintje	--	--	2, 4, 6 Wochen
Kuras	--	--	2, 4, 6 Wochen

Tabelle 2: Variantenverteilung des Großversuchs I

Großversuch II: Einfluss von CO₂ und N auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* und *A. solani*.

- *P. infestans*

Kartoffelsorten	CO ₂ -Begasung	N-Düngung	Alter der Pflanzen
Indira	400 ppm	- N	4 Wochen
Indira	400 ppm	+ N	4 Wochen
Indira	700 ppm	- N	4 Wochen
Indira	700 ppm	+ N	4 Wochen

Tabelle 3: Variantenverteilung des Großversuchs II (Fortsetzung siehe nächste Seite)

- *A. solani*

Kartoffelsorten	CO ₂ -Begasung	N-Düngung	Alter der Pflanzen
Indira	400 ppm	- N	4 Wochen
Indira	400 ppm	+ N	4 Wochen
Indira	700 ppm	- N	4 Wochen
Indira	700 ppm	+ N	4 Wochen
Bettina	400 ppm	- N	4 Wochen
Bettina	400 ppm	+ N	4 Wochen
Bettina	700 ppm	- N	4 Wochen
Bettina	700 ppm	+ N	4 Wochen

Tabelle 3: Variantenverteilung des Großversuchs II (Fortsetzung)

Großversuch III: Einfluss von N auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* im Freiland

Kartoffelsorten	CO ₂ -Begasung	N-Düngung	Alter der Blätter
Indira	--	60 kg N/ha	jung/alt
Indira	--	160 kg N/ha	jung/alt
Bettina	--	60 kg N/ha	jung/alt
Bettina	--	160 kg N/ha	jung/alt

Tabelle 4: Variantenverteilung des Großversuchs III

2.1.5 Ernte des Blattmaterials

Großversuch I (Tabelle 2): In diesem Versuchsteil wurden Blätter von zwei, vier und sechs Wochen alten Pflanzen geerntet, um eine eventuelle Altersabhängigkeit der Resistenz gegenüber *P. infestans* vom Pflanzenalter feststellen zu können. Dabei wurden Fiederblätter der zweiten und dritten voll ausgewachsenen Blatttage (erstes voll ausgewachsenes Fiederblatt > 8 cm) verwendet. Nach der Ernte wurde ein Teil des Blattmaterials für weitere Versuche sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Großversuch II (Tabelle 3): Die Ernte des Blattmaterials des Großversuchs II erfolgte vier Wochen nach dem Auskeimen der Pflanzen. Dabei wurden von allen Pflanzen der unterschiedlichen Varianten wiederum jeweils nur Fiederblätter des zweiten und dritten voll ausgewachsenen Blattstadiums verwendet. Eine Probe bestand hierbei aus den Blättern von sechs Einzelpflanzen. Für jeweils eine Variante gab es vier Wiederholungen. Dabei ergaben sich zwei Wiederholungen aus den zwei pro Variante vorhandenen Gewächshauskammern (Kammer 1 und Kammer 2 mit je

400 ppm CO₂; Kammer 3 und Kammer 4 je mit 700 ppm CO₂). Aus jeder Kammer wurden dabei zwei Wiederholungen entnommen (Kammer 1 Wiederholung A und B; Kammer 2 Wiederholung A und B usw.).

Großversuch III (Tabelle 4): In Großversuch III fand eine Verwendung der Fiederblätter des zweiten und dritten Blattstadiums der Kartoffelpflanzen sechs Wochen nach Auskeimen der Pflanzen statt. Um eine eventuelle Altersabhängigkeit der Resistenz von Kartoffelblättern gegenüber *P. infestans* feststellen zu können, wurden auch Blätter der unteren, älteren Blattstadien (fünf und sechs) geerntet. Wiederum bestand eine Mischprobe aus Blättern von sechs Einzelpflanzen.

2.2 Messung der Biomasseproduktion

An vier Wochen alten Pflanzen des Gewächshausversuches sowie des Freilandversuches wurde die Anzahl der Stängel pro Pflanze und die Pflanzenhöhe, von der Erdoberfläche bis zum Sprosspunkt des höchsten Stängels, ermittelt. Die Bestimmung der oberirdischen Biomasse erfolgte durch Wägung des abgeschnitten Pflanzenmaterials. Außerdem wurden die Anzahl der gebildeten Knollen pro Topf des Gewächshausversuches bestimmt und gewogen. Im Freiland wurde der Ertrag nach Abreife der Pflanzen nach 5 Monaten Wachstum pro Parzelle ermittelt. In Großversuch II fand außerdem die Bestimmung der Trockensubstanz der Blätter definierter Blattscheiben der einzelnen Varianten statt.

2.3 Bestimmung biochemischer Parameter des Wachstums

2.3.1 Aufbereitung der Blattproben für die Analysen

Das sofort nach der Ernte und an den einzelnen Boniturtagen in flüssigem Stickstoff tiefgefrorene Blattmaterial wurde mit einem Dismembrator (I.G. Braun) gemörsert, bis das Blattmaterial als feines Pulver vorlag und anschließend bis zur vollständigen Trockne lyophilisiert (LYOVAC, Finn-Aqua).

2.3.2 Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Blätter

Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Blätter fand am Lehrstuhl für Grünlandlehre (Prof. Dr. Schnyder) der TU München-Weihenstephan statt. Dazu wurden 2 mg TS (+/- 0,05 mg) in Zinn caps ($\varnothing = 4$ mm, Lüdi AG, CH-9230, Flawil) mit

Hilfe einer Feinwaage eingewogen. Durch Verbrennung in einem Elementaranalyser (Firma Carlo Erba) wurden die Gehalte an Kohlenstoff und Stickstoff der Blattproben ermittelt. Als Standard diente Wiesen-Knäuelgras (*Dactylis glomerata*) mit einem Kohlenstoffgehalt von 42,32 % und einem Stickstoffgehalt von 1,8 %. Vor der Messung der lyophilisierten Proben wurden diese für 3 h in einem Wärmeschrank bei 60 °C inkubiert, um eine eventuelle Restfeuchte zu entfernen. Die gewonnenen Daten dienen anschließend zur Ermittlung des C/N-Verhältnisses.

2.3.3 Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Knollen

Die Bestimmung der Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Knollen erfolgte an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) in Freising-Weihenstephan bei Herrn Dr. Pichlmeier. Hierzu wurden die Knollen zuerst mit einer herkömmlichen Küchenmaschine fein gehäckselt. Nach dem Lyophilisieren wurde das getrocknete Material zu feinem Mehl zermahlen und anschließend in einem Elementaranalyser die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte ermittelt. Diese dienen zur Berechnung des C/N-Verhältnisses der Knollen.

2.3.4 Stärke- und Zuckanalytik

Die Analyse der Stärke- und Zuckergehalte der Blätter konnte nach den Vorgaben von BEUTLER (1984) optimiert werden.

2.3.4.1 Bestimmung der Stärkegehalte im Blatt

20 mg TS wurde für 40 min in kochendem Wasser inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml heißem H₂O_{bidest} wurden die Proben für weitere 15 min gekocht, um anschließend geschüttelt und zentrifugiert (30000 g, 10 min) zu werden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nochmals mit 1 ml heißem H₂O_{bidest} extrahiert. Für die Stärkebestimmung wurden jeweils drei Ansätze aus einem Probenextrakt durchgeführt.

Folgende Formel diene zur Ermittlung der bereinigten Extinktion des Probenextraktes:

$$\Delta E = (E2 (\text{Probe}) - E1 (\text{Probe})) - (E2 (\text{freie Glukose}) - E1 (\text{freie Glukose}))$$

Weitere Formel diene zur Berechnung des Stärkegehaltes:

$$\text{Stärkegehalt [mg/g TS]} = \frac{V_{\text{Ansatz [ml]}} \times MG_{\text{Stärke [mg} \times \text{mmol}^{-1}]} \times \Delta E \times V_{\text{Extrakt [ml]}}}{\varepsilon [\text{l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}] \times d [\text{cm}] \times V_{\text{Probenvolumen [ml]}} \times m_{\text{Einwaage TS [g]}} \times 1000}$$

V: Volumen, E: Extinktion, d: Schichtdicke der Küvette, MG: Molekulargewicht, m: Masse,
 ε : Absorptionskoeffizient NADPH bei 334 nm ($6,18 \text{ l} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

2.3.4.2 Bestimmung des Stärkegehaltes der Kartoffelknollen

Die Bestimmung der Stärkegehalte der Kartoffelknollen fand an der Landesanstalt für Pflanzenbau und Bodenkultur (LBP) in Freising über das Unterwassergewicht statt. Dabei wurde jeweils der Stärkegehalt aller Knollen einer Pflanze bestimmt. Das Prinzip der Unterwassergewichtsbestimmung ist mittels der Dichte der Knollen den Stärkegehalt zu ermitteln. Dabei wird ein Regressionskoeffizient von etwa 0,93 angenommen. Weiteres zur Berechnung des Stärkegehalts mit Hilfe des Unterwassergewichts ist der Veröffentlichung von MUNZERT *et al.* (1987) zu entnehmen.

2.3.4.3 Bestimmung löslicher Zucker (Glukose, Fruktose Saccharose) im Blatt

20 mg TS wurde für 40 min in kochendem Wasser inkubiert. Nach Zugabe von 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ wurden die Proben geschüttelt und zentrifugiert (23000 g, 5 min). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nochmals mit 1 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ extrahiert. Für die Bestimmung von Glukose, Fruktose und Saccharose wurden jeweils drei Ansätze aus einem Probenextrakt durchgeführt. Die Reaktionsansätze (Tabelle 7, 8) wurden in Plastikkuvetten pipettiert. Die Bestimmung der Änderung der Extinktion erfolgte photometrisch. Die benötigten Lösungen für die Bestimmung der Glukose-, Fruktose- und Saccharosegehalte sind dem Abschnitt 2.3.4.1 zu entnehmen. Die Aufbereitung der Blattproben für die Zuckerbestimmung fand im Labor von Prof. Dr. Höll, Lehrstuhl für Botanik der TU München in Freising-Weihenstephan statt.

Lösungen (s. S. 39)	Volumen [μ l]
TEA-Puffer	810 (Glu), 805 (Fru)
ATP-NADP	100
Probenextrakt	50
Extinktion E1 bei 334 nm messen (Nullabgleich mit TEA-Puffer)	
Hexokinase	20
GPD	20
30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Extinktion E2 bei 334 nm messen	
Phospho-Glukoseisomerase	5
30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Extinktion E3 bei 334 nm messen	

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Bestimmung der Glukose- und Fruktosegehalte

Lösungen (s. S. 39)	Volumen [μ l]
Acetatpuffer	50
Invertase	50
Probenextrakt	50
45 min bei 40 °C im Wasserbad inkubieren	
TEA-Puffer	705
ATP-NADP	100
Extinktion E1 bei 334 nm messen (Nullabgleich mit TEA-Puffer)	
Hexokinase	20
GPD	20
30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Extinktion E2 bei 334 nm messen	
Phospho-Glukoseisomerase	5
30 min bei Raumtemperatur inkubieren, Extinktion E3 bei 334 nm messen	

Tabelle 8: Reaktionsansatz für die Bestimmung der Saccharosegehalte

2.4 Bestimmung biochemischer Parameter der pflanzlichen Abwehr

2.4.1 Bestimmung der Ethylenemission

Die Ernte des Blattmaterials für die Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese erfolgte an fünf Wochen alten Pflanzen der Sorte Indira. Die Messung der Ethylenemission erfolgte jeweils am Tag der Inokulation (Tag 0) der Kartoffelblätter mit *P. infestans*, sowie an Tag 1 und 3 nach Inokulation.

Fiederblätter, bestehend aus der Endfieder und den beiden darauf folgenden Fiederblättchen, wurden in mit 50 ml Wasser gefüllten Acrylglasküvetten ($\varnothing = 9,5$ cm, Höhe = 5 cm, Volumen = 260 ml) gestellt und mit einem Deckel mit einem Silikonseptum verschlossen. Nach einer Inkubationszeit von 5 h bei 16 °C wurde 1 ml Gas mit einer Insulin-Einwegspritze (Becton Dickinson, Dublin, Irland) aus den Acrylglasküvetten entnommen und in einen Gaschromatographen (GC, Varian 3300) mit einer Aluminiumoxidsäule (Durchmesser 1/8“, Länge 1 m) und einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) eingespritzt. Die Injektor- und Säulentemperatur betrug jeweils 80 °C, die Detektortemperatur 225 °C. Als Trägergas wurde Stickstoff (5.0, Messer-Griesheim) mit einer Flussrate von 30 ml/min verwendet. Die Flussraten der für den Detektor benötigten Gase betragen 450 ml/min für synthetische Luft und 45 ml/min für Wasserstoff. Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Ethylen 0,75 Minuten, für Ethan 1,1 Minuten. Zur Umrechnung der gemessenen Ethylen-Flächeneinheiten in pmol/g FG h⁻¹ wurde eine Eichung mit Ethylenstandardgas (Reinheit 3.0, Messer, Griesheim) durchgeführt. Die Umrechnung der Probenkonzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Ethylen [pmol/g FG]} = \frac{251,1 \text{ pmol ml}^{-1} \times \text{Fläche Probenpeak}}{\text{MW (Fläche des Eichgaspeaks)}} \times \frac{260 \text{ ml}}{\text{Einwaage}}$$

251,1 pmol Ethylen in 1 ml Standardgas

Die Fläche des Eichgaspeaks wurde ermittelt aus drei Wiederholungen der Einspritzung von 1 ml Ethylenstandardgas.

260 ml entspricht dem Gesamtvolumen der Acrylglasküvetten.

2.4.2 Bestimmung der Gehalte an Salizylsäure

Die Extraktion erfolgte nach einer modifizierten Methode von MEUWLY & MÉTRAUX (1993). 0,1 g lyophilisiertes Blattmaterial wurde mit 5 ml 100 %igem Methanol und 500 µM internem Standard (o-Anissäure) für 30 Sekunden unter Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 30000 g (10 min, 4 °C) wurde das Pellet nochmals in 4 ml Methanol resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die vereinigten Überstände und das Lösungsmittel bei 38 °C im Vakuum mittels eines Rotationsverdampfers (RE111, Büchli, Flawil, CH) abgezogen. Nach Aufnahme in 2 ml 40 %iger (v/v) Trichloressigsäure wurden die Proben zweimal gegen

Ethylacetat: Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt (5 und 3 ml) und die vereinigte organische Phase im Vakuum einrotiert. Die wässrige Phase wurde mit 1,3 ml 32 %iger Salzsäure auf 4 N HCl eingestellt und dann in verschlossenen Pyrexgläsern für eine Stunde bei 80 °C hydrolysiert. Die freigesetzten Verbindungen wurden, wie oben beschrieben, zweimal gegen Ethylacetat : Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt und anschließend einrotiert. Nach anschließender Aufnahme der Proben in 500 µl Laufmittel A, 20 % Methanol und Zentrifugation (20000 g, 5 min, 4 °C) erfolgte die Auftrennung der Proben mittels HPLC. Hierbei wurden Aliquots von 20 µl auf eine RP-C-18 Nucleosil-Säule aufgetragen. Der Fluss betrug dabei konstant 1,0 ml min⁻¹. Die Detektion von Salizylsäure erfolgte mit dem Fluoreszenzdetektor bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 305 und 407 nm. Die Retentionszeit für Salizylsäure betrug ca. 8 min, für den internen Standard o-AA ca. 10,5 min.

Laufmittel A:	27 mM Natriumacetat, 30 mM Natriumcitrat, pH 5,0
Laufmittel B:	100 % Methanol
Gradient:	0-15 min 100 % A
	16-18 min auf 100 % B
	19-25 min 100 % B
	26-28 min auf 100 % A
	29-40 min 100 % A

2.4.3 Histochemische Detektion der Wassertoffperoxid-Akkumulation

Die Akkumulation von H₂O₂ in Kartoffelblättern wurde mittels einer Farbreaktion mit 3,3'-Diaminobenzidin-hydrochlorid (DAB) nachgewiesen. DAB polymerisiert in Anwesenheit von H₂O₂ und Peroxidase-Aktivität zu einem braunen unlöslichen Farbstoff (THORDAL-CHRISTENSEN *et al.* 1997).

Zur histochemischen Detektion der Akkumulation von H₂O₂ wurden einzelne Seitenfiederblättchen der Fiederblätter der dritten Blattetage der Kartoffelpflanzen mit der Blattunterseite nach oben in einen Witt'schen Topf mit einer 0,1 %igen (w/v) DAB-Lösung. 10 mM MES Puffer (pH 6,5), gegeben. Mit einer Membranpumpe wurde ein Vakuum (100-200 mbar) angelegt, wobei die Luft aus den Blättern gezogen wurde. Durch ablassen des Vakuums wurde die Färbelösung in das Blatt infiltriert. Dieser Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt, um eine vollständige

Infiltration der Blätter zu garantieren. Die Färbelösung wurde stets unmittelbar vor den Versuchen angesetzt, um eine Autooxidation zu vermeiden. Die infiltrierten Blätter wurden danach für 30 min im Licht inkubiert. Anschließend wurden die Blätter mit erwärmten Ethanol (95 % v/v) entfärbt und in Ethanol (95 % v/v) aufbewahrt. Die durch DAB gefärbte Blattfläche [%] wurde bonitiert und das Ergebnis photographisch festgehalten.

2.4.4 PR-Proteine

2.4.4.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts

30 mg des lyophilisierten Blattmaterials wurde mit 1 ml Na-Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,0, 1% PVPP) homogenisiert, für 15 min auf Eis geschüttelt und anschließend für 10 min zentrifugiert (30000 g, 4 °C). Nach Abnahme des Überstands konnte dieser bei -20 °C aufbewahrt, oder gleich zur Bestimmung des Proteingehalts nach BRADFORD (1976) weiter verwendet werden. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte im Mikrotiterplattenmaßstab (96 Well Assay Plates, Costar). Der Reaktionsansatz der Bestimmung des Proteingehalts ergab sich aus Tabelle 9. Der Proteinextrakt wurde für die Proteinbestimmung 1:10 verdünnt.

	Proteinextrakt (1:10)	Referenz	Nullwert
Probe	25 µl	25 µl	25 µl
H ₂ O _{bidest}	175 µl	175 µl	175 µl
Farbreagenz	50 µl	50 µl	50 µl
Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur			

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die Bestimmung des Proteingehalts

- BSA-Lösung: 10 µg BSA/100 µl → Referenz
- Coomassie Brilliant Blue G250 (BIO-RAD) → Farbreagenz

Pro Mikrotiterplatte wurden die Ansätze dreimal wiederholt. Die Extinktionen wurden in einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Plus MT 212, ICN) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Nachfolgende Formel gibt die Berechnung des Proteingehalts einer Probe mit drei Wiederholungen wieder.

$$\text{Proteingehalt [mg/g TS]} = \frac{m_{\text{Referenz i.A. [mg]}} \times (E_{\text{Proteinextrakt}} - E_{\text{Nullwert}}) \times \text{Verd.} \times V_{\text{Puffer [ml]}}}{(E_{\text{Referenz}} - E_{\text{Nullwert}}) \times V_{\text{Proteinextrakt [ml]}} \times m_{\text{Einwaage TS [mg]}}$$

m: Masse, E: Extinktion, Verd.: Verdünnung, V: Volumen

2.4.4.2 Bestimmung der Chitinase-Aktivität

Die Aktivität des PR-Proteins Chitinase wurde durch hydrolytischen Abbau eines farbstoffmarkierten Substrats (Carboxymethyl-Chitin-Remazol-Brillant-Violett) photometrisch ermittelt (FLEISCHMANN 2000). Für den Reaktionsansatz (Tabelle 10), der im Mikrotiterplattenmaßstab erfolgte, war eine Verdünnung von 1:100 der verwendeten Proteinextrakte (vgl. 2.4.4.1) notwendig.

	Proteinextrakt (1:100)	Referenz	Nullwert
Probe	50 µl	50 µl	50 µl
Puffer	150 µl	150 µl	150 µl
Substrat	50 µl	50 µl	50 µl
Platte mit Klebefolie verschließen; Inkubationszeit: 20 min T = 37 °C			
Salzsäure (1M)	50 µl	50 µl	50 µl

Tabelle 10: Reaktionsansatz für die Bestimmung der Chitinase-Aktivität

- Carboxymethyl-Chitin-Remazol-Brillant-Violett (LOEWE Biotech) → Substrat
- Chitinase aus *Streptomyces griseus* → Referenz
- Na-Acetatpuffer (0,1 M, pH 5,0) → Puffer

Nach Abstoppen der Reaktion mit Salzsäure (1 M) wurde die Platte für weitere 10 min auf Eis gekühlt und anschließend für 10 min zentrifugiert (3000 U/min, 4 °C). Nach Überführung der Überstände in eine neue Mikrotiterplatte konnten die Extinktionen in einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Plus MT 212, ICN) bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen werden. Nachfolgende Formel gibt die Berechnung der Chitinase-Aktivität einer Probe mit drei Wiederholungen wieder.

$$\text{Chitinase-Aktivität [U/g TS]} = \frac{(E_{\text{Probe}} - E_{\text{Nullwert}}) \times \text{Verdünnung} \times V_{\text{Puffer}}[\text{ml}]}{\text{Inkubationszeit} [\text{min}] \times V_{\text{Probe}}[\text{ml}] \times m_{\text{Einwaage TS}}[\text{g}]}$$

E: Extinktion, V: Volumen, m: Masse

2.4.4.3 Bestimmung der Glukanase-Aktivität

Die Aktivität der β -1,3-Glukanase der Kartoffelblattextrakte wurde über die enzymatische Hydrolyse des Substrats Laminarin, einem Zellwandglukan der Braunalge, ermittelt. Nach hydrolytischer Freisetzung der Zuckeräquivalente und Derivatisierung nach LEVER (1972) mit p-Hydroxybenzoesäurehydrazin konnte der dadurch entstandene, gelbgefärbte Farbstoff Osazon mit Hilfe eines Photometers

quantifiziert werden (FLEISCHMANN 2000). Für den Reaktionsansatz (Tabelle 11), der im Mikrotiterplattenmaßstab erfolgte, war eine Verdünnung von 1:100 der verwendeten Proteinextrakte (vgl. 2.4.4.1) notwendig.

	Proteinextrakt	Proteinextrakt (Nullwert)	Laminarin (Nullwert)	Glukoselösung			
Probe	50 µl	50 µl	50 µl	0 µl	10 µl	20 µl	40 µl
H ₂ O _{bidest}	--	--	--	50 µl	40 µl	30 µl	10 µl
Puffer	--	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
Laminarin	50 µl	--	--	--	--	--	--
Platte mit Klebefolie verschließen; Inkubationszeit : 60 min, T = 37 °C							
Farbreagenz	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200 µl	200µl

Tabelle 11: Reaktionsansatz der Bestimmung der Glukanase-Aktivität

- Na-Acetatpuffer (0,2 M, pH 5,0) → Puffer
- p-Hydroxybenzoesäurehydrazin (0,1 g in 10 ml 0,1 M HCl) → Stammlösung
- Stammlösung: 0,5 M NaOH:H₂O_{bidest} 1:4:5 → Farbreagenz
- Glukose (5 mM) → Glukoselösung
- Laminarin (4 mg/ml) → Substrat

Herstellung einer glukosefreien Laminarinlösung:

1,0 g Laminarin wurden hierzu in 50 ml Ethanol (96 %) suspendiert und anschließend für 20 min zentrifugiert (25000 g, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Reinigungsschritt dreimal wiederholt. Das gereinigte Laminarin lag in 25 ml Na-Acetatpuffer gelöst (Stammlösung) vor und musste für den Reaktionsansatz (Tabelle 11) 1:10 verdünnt werden.

Für den Umsatz des Laminarins und der daraus resultierenden Farbentwicklung wurde die Mikrotiterplatte für fünf Minuten in kochendes Wasser gestellt. Nach Abkühlung des Ansatzes (ca. 5 min) konnte die Extinktion an einem Mikrotiterplattenphotometer (Titertek Plus MT 212, ICN) bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen werden. Nachfolgende Formeln geben die Berechnung der Glukanase-Aktivität einer Probe mit drei Wiederholungen wieder.

<p>Glukoseäquivalente [nmol] = $\frac{(E_{\text{Extrakt mit Laminarin bzw. } E_{\text{Extrakt ohne Laminarin bzw. } E_{\text{Laminarin}}) - b}{m}$</p> <p>E: Extinktion, b: Achsenabschnitt der Regressionsgeraden, m: Steigung der Regressionsgeraden</p>
--

Glukanase-Aktivität [nkat/g TS] =

$$\frac{(G\ddot{A}_{\text{Extrakt mit Laminarin}} - G\ddot{A}_{\text{Extrakt ohne Substrat}} - G\ddot{A}_{\text{Laminarin}})[\text{nmol}] \times \text{Verdünnung} \times V_{\text{Puffer}}[\text{ml}]}{\text{Inkubationszeit}[\text{sec}] \times V_{\text{Extrakt}}[\text{ml}] \times m_{\text{Einwaage TS}}[\text{g}]}$$

GÄ: Glukoseäquivalente, V: Volumen, m: Masse, V_{Puffer} : Volumen des Na-Acetateextraktionspuffer, kat: Katal (freigesetzte GÄ [mol]/sec), 1 Unit = 16.67 nkat

2.4.4.4 Bestimmung des Gehalts an Osmotin (AP24)

Das PR-Protein Osmotin aus der Gruppe der thaumatinähnlichen Proteine wurde durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließendem Western-Blot nachgewiesen. Nach Mischen gleicher Volumenanteile von vier Wiederholungen der Proteinrohextrakte einer Variante (vgl. 2.4.4.1) erfolgte eine Dialyse der Mischproben für fünf Stunden gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ bei 4 °C. Anschließend wurden die dialysierten Extrakte lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in Probenpuffer (Rotiphorese der Firma Roth) (5 µg Protein/1 µl, vgl. Proteinnachweis bei 2.4.4.1) aufgenommen und zur Denaturierung aller Proteine für 5 min in kochendes Wasser gegeben.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE):

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach LAEMMLI (1970) in einer MINI Protean II Apparatur (BIO-RAD) mit einem Gel von 0,75 mm Stärke. Ein 4 %-iges und ein 16,5 %-iges SDS-Polyacrylamidgel dienten als Sammel- und Trenngel.

Benötigte Lösungen:

- | | | |
|-----------------------------|-----------------------|--|
| • Acrylamid-Stammlösung | 30 g Acrylamid | |
| | 0,8 g Bisacrylamid | → ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ |
| • Sammelgelpuffer
pH 6,8 | 0,5 M Tris | → 6,05 g Tris |
| | pH mit HCl einstellen | → ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ |
| • Trenngelpuffer
pH 8,8 | 1,5 M Tris | → 18,17 g Tris |
| | pH mit HCl einstellen | → ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ |
| • SDS-Lösung | 10 g SDS | → ad 100 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ |

- Laufpuffer-Stammlösung 15 g Tris
 pH 8,3 72 g Glycin
 5 g SDS
 pH mit HCl einstellen → ad 1000 ml H₂O_{bidest}
 vor Gebrauch 1:5 verdünnen

- TEMED (gebrauchsfertig)

	Acrylamid [ml]	H ₂ O _{bidest.} [ml]	Puffer [ml]	SDS [µl]	TEMED [µl]	APS [µl]
Sammelgel 4 %	1,3	6,2	2,5 ¹	100	10	50
Trenngel 16,5 %	5,5	2,0	2,5 ²	100	5	50

Tabelle 12: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Jeweils 20 µg Protein (in 4 µl Protein-Probenpuffer) wurden auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard fanden 5 µl eines „prestained low range“ SDS-Standard (BIO-RAD) Anwendung. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Elektrophoresepuffer für 75 min bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA.

Western Blot-Hybridisierung:

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden nun in einem veränderten Verfahren nach TOBWIN *et al.* (1979) auf eine PVDF-Membran (Fluorotrans Transfer Membrane, Filtron) transferiert. Der Blot erfolgte in einer Pharmacia-Apparatur für 90 min bei 100 V. Das in Blotting-Puffer getränkte Blotting-Filterpapier, zusammen mit einer in Methanol angefeuchteten und in Blotting-Puffer gewaschenen PVDF-Membran wurde in der Blotting-Apparatur ausgelegt. Das mit Blotting-Puffer befeuchtete Gel wurde auf die Membran aufgebracht. Ein in Blotting-Puffer getränktes Filterpapier schloss den Sandwich-Aufbau ab.

Blotting-Puffer:	2,93 g Glycin	
	5,81 g Tris	
	0,375 g Natriumdodecylsulfat	
	200 ml Methanol	→ ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}

Immunodetektion mittels spezifischer Antikörper:

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese kurz in TBS gewaschen und dann für 1 h in TBS-BSA inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Danach erfolgte eine Beschichtung der Membran mit 1,5 ml einer Antikörperlösung (Ak1: PR-S gegen extrazelluläres Osmotin oder Ak2: Pep 2 gegen vakuoläres Osmotin) und eine anschließende Inkubation von 1 h. Nach dreimaligem Waschen für 5 min in TBST und einem einmaligem Waschgang in TBS für 5 min wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit IgG-Horseradish Phosphatase, BIO-RAD) in einer 1:5000 Verdünnung in TBS-BSA aufgetragen. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 1 h wurde die Membran wiederum für 5 min dreimal in TBST und einmal in TBS gewaschen. Die Nachweisreaktion der spezifischen Antikörperbindungen erfolgte durch eine Farbreaktion mit Hilfe des Farbstoffs NBT. NBT wird durch die Reaktion der alkalischen Phosphatase des sekundären Antikörpers mit BCIP zu dem unlöslichen blauvioletten Formazan reduziert. Hierfür wurde die Membran in 25 ml Entwicklerlösung mit 100 µl NBT und 75 µl BCIP bei Raumtemperatur für 30 bis 180 Sekunden geschwenkt. Vor dem Trocknen der Membran erfolgte ein Waschgang in TBS und anschließend in H_2O_{bidest} . Die Auswertung der Blots konnte mit Hilfe des Computerprogramms RFLP-Scan Version 1.0 für Windows durchgeführt werden.

Benötigte Lösungen:

- Tris-HCl, 1 M; pH 7,5 (SL) 12,11 g Tris
pH mit HCl einstellen → ad 100 ml H_2O_{bidest}
- NaCl, 5 M (SL) 29,2 g → ad 100 ml H_2O_{bidest}
- Tris Buffer Saline pH 7,5
(TBS) 20 mM Tris HCl → 20 ml Tris-HCl-SL
150 mM NaCl → 30 ml NaCl-SL
→ ad 1000 ml H_2O_{bidest}
- Blockingsolution pH 7,5
(BSA-TBS) 20 mM Tris HCl → 20 ml Tris-HCl-SL
150 mM NaCl → 30 ml NaCl-SL
10 g Rinderserumalbumin → ad 1000 ml H_2O_{bidest}

• TBS + Tween pH 7,5 (TBST)	20 mM Tris HCl 50 mM NaCl 0,05 % Tween 20	→ 20 ml Tris-HCl-SL → 30 ml NaCl-SL → ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}
• Entwicklerlösung pH 9,5	100 mM Tris HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ pH mit HCl einstellen	→ 12,11 g Tris → 20 ml NaCl-SL → 1,02 g MgCl ₂ 6 H ₂ O → ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}
• NBT	75 mg NBT 1 ml 70 %-iges N,N`-Dimethyl-Formamid	
• BCIP	50 mg BCIP 1 ml 70 %iges N,N`-Dimethyl-Formamid 1 ml H ₂ O _{bidest} .	
• primäre Antikörper	PR-S (Osmotin) aus Tabak (1:5000, TBS-BSA) Pep 2 (AP 24) synthetisch (1:5000, TBS-BSA)	
• sekundärer Antikörper	Anti-Rabbit mit Phosphatase (1:2000, TBS-BSA)	

2.4.5 Bestimmung der Gehalte an Phenylpropanoiden

Den Phenylpropanoidgehalt der Blattproben bestimmte die Arbeitsgruppe des Fachgebiets für Obstbau (Prof. Treutter) der TU München-Weihenstephan. 60 mg TS des lyophilisierten Blattmaterials wurden mit 1,8 ml MetOH für 30 min in einem Ultraschallbad bei 4 °C inkubiert, danach für 10 min zentrifugiert (20000 g, 4 °C). Der Überstand wurde bis zur Trockne eingeeengt und anschließend mit 90 µl MetOH aufgenommen. Die Analyse der löslichen Phenylpropanoide erfolgte über eine HPLC-Trennung mit anschließender UV-, Fluoreszenz- und Diodenarray-Detektion nach SCHNITZLER *et al.* (1996). Zur Quantifizierung der zellwandgebundenen Polyphenole wurden die Rückstände der methanolischen Extraktion gewaschen und nach STRACK *et al.* (1988) einer alkalischen Hydrolyse unterzogen. Danach konnten die Phenole mit Hilfe der HPLC-Analytik aufgetrennt werden. 6-Methoxy-Flavon, Rutin und Chlorogensäure dienten als interner Standard.

2.4.6 Bestimmung der Gehalte an Divinylethern

Die Bestimmung der Divinylether erfolgte nach WEICHERT *et al.* (1999) an der Universität Göttingen, Lehrstuhl für Biochemie der Pflanzen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Ivo Feussner. 200 mg lyophilisiertes Blattmaterial wurden in 20 ml HIP-Lösung (iso-Hexan/Isopropanol (3:2, v/v) mit 0,0025 % (w/v) 2-Butyl-6-Hydroxytoluen) mit (6Z,9S,10E,12Z)-9-Hydroxy-6,10,12-octadecatriensäure (EnA) als internem Standard für 45 sec auf Eis unter Argonstrom mit einem Ultraturrax homogenisiert, 10 min bei RT geschüttelt und anschließend zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4 °C). Nach Versetzen des Überstands mit 15 ml einer 6,7 % (w/v) Kaliumsulfat-Lösung wurde dieser für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt und wieder zentrifugiert (10 min, 5000 g, 4 °C). Die organische Phase wurde anschließend im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 1,2 ml Isopropanol aufgenommen und wieder im Stickstoffstrom bis zur Trockne eingengt. Nach Aufnahme des verbleibenden Rückstands in 80 µl HPLC-Laufmittel (Methanol/H₂O/Essigsäure (75:25:0,1, v/v/v)) und anschließender Zentrifugation (12000 g, 5 min, 4 °C) wurde der Überstand auf eine HPLC aufgetragen. Die Detektion der Divinylether erfolgte an der Umkehr-Phase bei 252 und 268 nm. Nach Auffangen der Peaks der Divinylether wurde das Laufmittel unter Stickstoff eingedampft und der Rückstand in 30 µl n-Hexan/Isopropanol/TFA (100:1:0,02, v/v/v) aufgenommen. Zur weiteren Aufreinigung folgte eine Normal-Phasen HPLC.

Umkehr-Phase I (RP-HPLC):

Säule:	NUCLEOSIL C-18 (250x2 mm, 5 µm Partikelgröße; MACHEREY-NAGEL, Düren)		
Laufmittel:	A Methanol/H ₂ O/Essigsäure (75:25:0,1, v/v/v) B Methanol/Essigsäure (100:0,1, v/v)		
Laufschema:	Zeit	% Laufmitte B	Fluß (ml/min)
	0	20	0,18
	5	20	0,18
	10	40	0,18
	12	100	0,18
	17	100	0,18
	22	100	0,18
	27	20	0,18
	30	20	0,18
Retentionszeiten:	CnA	10,2 min	
	EnA	10,7 min	
	CA	12,4 min	

Normal-Phase (SP-HPLC):

Säule:	ZORBAX RX-SIL (5 µm Partikelgröße, 2,1 × 150 mm, HEWLETTPACKARD, Waldbronn)
Laufmittel:	n-Hexan/Isopropanol/TFA (100:1:0,02, v/v/v)
Laufschema:	isokratisch
Fluß:	0,2 ml/min

Die erneut aufgefangenen Proben wurden ebenfalls unter Stickstoff eingedampft, in 80 µl Methanol/H₂O/Essigsäure (85:15:0,1, v/v/v) aufgenommen und in einer RP-HPLC bei 252 nm (Divinylether: Ca, CnA) und 268 nm (interner Standard: EnA) detektiert und quantifiziert.

Umkehr-Phase II (RP-HPLC):

Säule:	NUCLEOSIL C-18 (250 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße; MACHERY-NAGEL, Düren)	
Laufmittel:	Methanol/H ₂ O/Essigsäure (85:15:0,1, v/v/v)	
Laufschema:	isokratisch	
Fluß:	0,18 ml/min	
Retentionszeiten:	CnA:	8,9 min
	CA:	10,8 min
	EnA:	9,4 min

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen der Pflanze-Pathogen Interaktion

2.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der Kartoffelblattproben erfolgte mit einem DNA-Extraktions-Kit von Quiagen nach Angaben des Händlers. Die anschließende Reinigung der extrahierten DNA wurde mit einem Reinigungs-Kit „Wizard DNA Clean-up System“ von Promega gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt

2.5.2 Quantitative PCR

Das „AbiPrism 7700 Sequence Detector System“ von *PE* Applied Biosystems ermöglicht anhand einer Regressionsgeraden die Ausgangsmenge an Ziel-DNA in einer unbekannt Probe zu errechnen.

Zur Amplifikation der isolierten DNA des Blattmaterials wurde eine artspezifische GC-reiche Satelliten-DNA Sequenz von *P. infestans* mit unbekannter Funktion (MÖLLER 1989) herangezogen. Anhand dieser Sequenz konnte der Forward Primer P3 (5'-GCCATCAAGACGTGCGAGA-3'), der Reverse Primer P4 (5'-GGCAGGGATTCGGGCAT A-3') und die phosphorylierte Fluoreszenzsonde F2 (5'-AGAGTAAGTATATTTTGCCCGACCCCGCCT-3') entwickelt werden. Der modifizierte Primer P4 stammte von Pi2 (NIEPOLD und SCHÖBER-BUTIN 1995). Die Fluoreszenzsonde war am 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem Quencherfarbstoff (TAMRA, 6-Carboxy-Tetramethylrhodamin) markiert. Die Primer P3 und P4 sowie die Fluoreszenzsonde wurden von PE Applied Biosystems bezogen.

Der TaqMan-PCR Lauf wurde in MicroAmp Optical 96-well Plates mit einer 1:10 Verdünnung der DNA-Extrakte des Kartoffelblattmaterials durchgeführt. Für die Berechnung der Regressionsgeraden diente quantifizierte *P. infestans* DNA (Stammextrakt, PLEBL 2002), die in einer Verdünnungsreihe von 1:10¹ →...→ 1:10⁶ in jedem Ansatz ebenfalls amplifiziert wurde. Jede Standardkonzentration sowie die Proben wurden pro Lauf in dreifacher Wiederholung aufgetragen. Das Ansatzvolumen betrug 25 µl und setzte sich wie in Tabelle 13 dargestellt zusammen.

Ansatz	Volumen [µl]
Universal Master Mix	12,5
Primer P3	0,25
Primer P4	0,235
Fluoreszenzsonde P2	0,25
H ₂ O _{bidest}	6,765
Probe oder Standard	5,0

Tabelle 13: Reaktionsansatz für die Quantitative PCR

Die eingesetzte DNA-Polymerase besitzt neben der Eigenschaft, ein DNA-Fragment komplementär zu verlängern, auch die Eigenheit, die Fluoreszenzsonde bei einer komplementären Bindung abzubauen. Durch die räumliche Trennung des Reporter- und Quencherfarbstoffs kommt es zu einer Änderung in der Fluoreszenz. Diese wird aufgezeichnet und quantifiziert. Weiteres zur Quantifizierung der Ausgangs-DNA ist der Veröffentlichung von BÖHM *et al.* (1999) und PE Applied Biosystems (www.appliedbiosystems.com) zu entnehmen.

Das Temperaturprogramm des PCR-Laufs sah wie folgt aus:

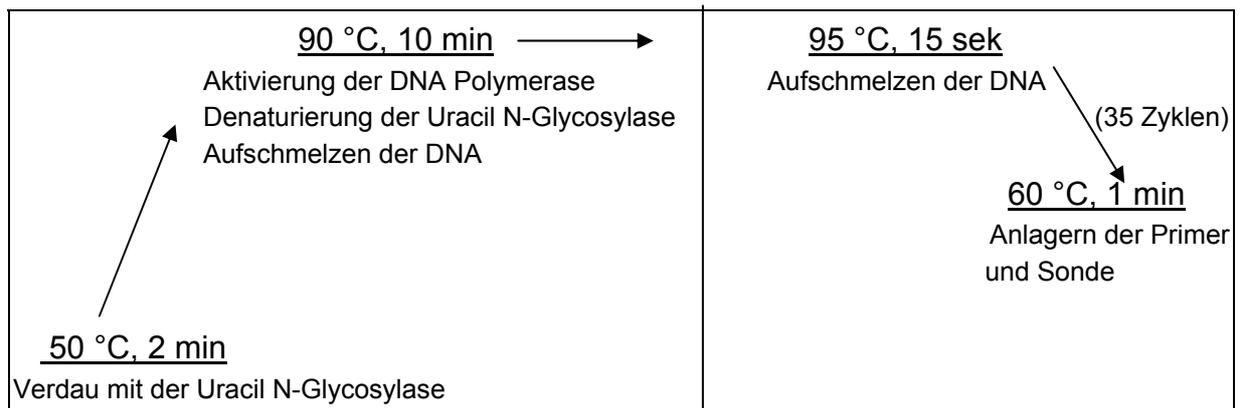


Abbildung 11: Temperaturprogramm des PCR-Laufs

2.6 Bonitur der Blattschäden

Die optische Bonitur der Blattschäden erfolgte an 5 Tagen nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* oder *A. solani*. Bonitiert wurden kontrollbehandelte sowie inokulierte Blätter an Tag 1 bis Tag 5 nach Inokulation. Dabei wurde die von *P. infestans* oder *A. solani* befallene Blattfläche [%] notiert. Gerade sichtbare Punktnekrosen wurden mit 1 % Läsionsgröße bewertet, weiter ausgedehnte Nekrosen wurden dabei mit 5 % erfasst. Die Bonitur sich flächig ausdehnender Läsionen erfolgte in 5 % Schritten. An jedem Tag der Bonitur wurde ein Teil der Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert.

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS, Version 11.5 für Windows. Zur Bildung homogener Gruppen wurde die einfaktorische ANOVA verwendet. Voraussetzungen zur Durchführung dieses Tests sind eine Normalverteilung der Daten und eine Varianzhomogenität zwischen den einzelnen Varianten eines Parameters.

Bei gegebener Normalverteilung und Varianzhomogenität wurde der Vergleich zwischen den Gruppen nach TUKEY durchgeführt. Lag keine Varianzhomogenität vor, wurde der DUNETT-T3 Test verwendet. Da die ANOVA gegenüber kleinen Abweichungen von der Normalverteilung robust ist, wurden geringfügige Abweichungen toleriert und die genannten Tests zur Bildung homogener Gruppen durchgeführt. Eindeutig nicht normalverteilte Datensätze (ausschließlich optische Bonituren) wurden unter Zuhilfenahme des MANN-WHITNEY-TESTS und

anschließender Bonferroni-Korrektur verrechnet. Für alle statistischen Tests wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0,05$ zugrunde gelegt. Signifikante Unterschiede zwischen den Varianten eines Parameters werden mit unterschiedlichen Buchstaben bei den Ergebnissen veranschaulicht.

III ERGEBNISSE

1 Vergleichende Untersuchungen zum Resistenzverhalten verschiedener Kartoffelsorten (*Solanum tuberosum* L.) gegenüber *Phytophthora infestans*

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten verschiedene Kartoffelsorten bezüglich ihrem Resistenzverhalten gegenüber *Phytophthora infestans* verglichen werden. Zur Charakterisierung der Pflanze-Pathogen-Interaktion wurde die Befallsstärke sowie die Akkumulation sekundärer Pflanzenstoffe untersucht. Weiterhin sollte geklärt werden, ob eine Altersabhängigkeit bei der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* vorliegt. Hierzu wurden vier Kartoffelsorten (Indira, Bettina, Kuras und Bintje) in Gewächshauskammern herangezogen.

1.1 Entstehung von Blattschäden nach Pathogenbehandlung

Die verwendeten Kartoffelsorten zeichnen sich durch eine unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* aus (FLEISCHMANN 2000). Blätter der vier Sorten wurden mit einer Sporensuspension von *P. infestans* inokuliert und zur Charakterisierung der Blattschäden für fünf Tage in Klimakammern kultiviert. Zum Zeitpunkt der Behandlung waren die Pflanzen zwei, vier und sechs Wochen alt. Die untersuchten Blätter entstammten jeweils der zweiten und dritten Blattetage einer Pflanze. Als erste Blattetage wurde dabei das erste voll ausgewachsene Blatt mit einer Länge von ca. 8 cm definiert.

In diesem Versuch zeigten sich deutliche Unterschiede in der Sensitivität der vier Kartoffelsorten gegenüber *P. infestans*. Auch das Alter der Pflanzen hatte Auswirkungen auf die Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans*. Die Ausprägung der auftretenden Blattschäden variierte bei den Pflanzen der verschiedenen Sorten stark. Blattschäden in Form von schwarzen Punktnekrosen bildeten sich bei allen Sorten drei Tage nach Inokulation. Bei den Sorten Indira und Bintje entwickelten sich diese zu wässrigen Läsionen, die an Tag 5 nach Inokulation das ganze Blatt bedeckten. Bei der Sorte Bettina hingegen entstanden braune nekrotische Stellen, die flächig über das Blatt verteilt waren und sich nur vereinzelt zu wässrigen Läsionen entwickelten, die an Tag 5 nach Inokulation 20 % der Blattfläche bedeckten.



Abbildung 12: Kartoffelblätter der Sorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras der 4 Wochen alten Pflanzen drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*.

Relativ tolerant gegenüber dem Pathogen verhielt sich die Sorte Kuras, bei der nur vereinzelt größere, braune Nekrosen auftraten. Ein Vergleich der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans* hinsichtlich des Pflanzenalters zeigte auf, dass bei der Sorte Bettina die älteren Pflanzen signifikant anfälliger sind als die jüngeren Pflanzen. Blätter der vier Wochen alten Pflanzen der Sorte Indira reagierten zunächst weniger anfällig gegenüber *P. infestans*, waren dann aber ab Tag 4 nach Inokulation ebenfalls weniger tolerant als die Blätter der älteren Pflanzen. Tendenziell ist zu sagen, dass ältere Pflanzen der Sorte Indira und Bettina anfälliger gegenüber *P. infestans* sind als jüngere Pflanzen. Auch bei der Sorte Bintje zeichnete sich dieser Trend an Tag 3 nach Inokulation ab. Die Blätter der sechs Wochen alten Pflanzen waren anfälliger als die Blätter der zwei und vier Wochen alten Pflanzen. An Tag 4 nach Inokulation allerdings waren die Blätter der vier Wochen alten Pflanzen toleranter gegenüber *P. infestans*. Hingegen war bei der toleranten Sorte Kuras keine Abhängigkeit der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* vom Pflanzenalter zu erkennen (Abbildung 13).

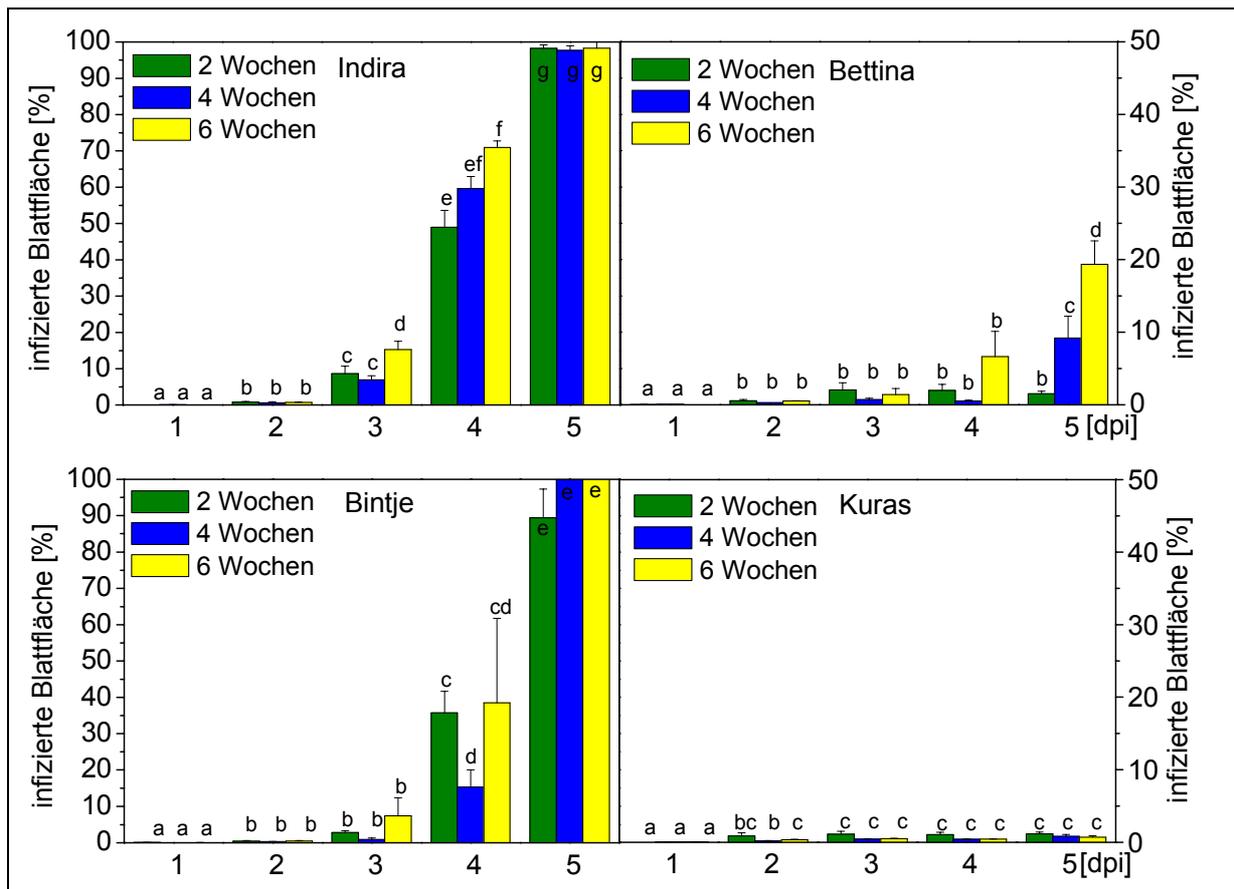


Abbildung 13: Vergleich der infizierten Blattfläche [%] *P. infestans* inokulierter Blätter der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras 1-5 Tage nach Inokulation. Zum Zeitpunkt der Ernte waren die Pflanzen zwei, vier und sechs Wochen alt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 10$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$). Kontrollen (K) sind nicht dargestellt ($K = 0$ % infizierte Blattfläche).

1.2 Untersuchung sekundärer Inhaltsstoffe der pflanzlichen Abwehr

Zur Charakterisierung der Unterschiede im Verhalten der Kartoffelsorten gegenüber *P. infestans* wurden der konstitutive Gehalt an Salizylsäure und das Phenolmuster sowie die Induktion dieser Inhaltsstoffe nach Pathogenbehandlung in den verschiedenen Sorten bestimmt. Eine Mischprobe der unterschiedlichen Varianten bestand dabei aus 10 Einzelblättern. Die Mischprobe jeder Variante wurde in fünffacher Wiederholung analysiert ($n = 5$). Mischproben wurden am Tag der Inokulation (Tag 0) sowie an Tag 1 und 3 nach Inokulation genommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

1.2.1 Bestimmung der Salizylsäuregehalte nach Pathogenbehandlung

Die Bedeutung von Salizylsäure (SA) bei der Pathogenabwehr konnte mit Hilfe von transgenen Pflanzen demonstriert werden, die ein bakterielles Gen (*nahG*) für eine

Salizylsäure-Hydroxylase besitzen. In diesen Pflanzen wird Salizylsäure zu Catechol abgebaut und kann so nicht akkumulieren (DURNER *et al.* 1997). Eine Konsequenz davon ist, dass *nahG*-Pflanzen ihre Fähigkeit verlieren, Wachstum und Ausbreitung von Pathogenen zu begrenzen (DURNER *et al.* 1997).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei den verschiedenen Kartoffelsorten der konstitutive Gehalt an freier und gebundener Salizylsäure sowie die Induktion nach einer Infektion mit *P. infestans* gemessen. Ein Großteil der Salizylsäure liegt in Pflanzen in gebundener konjugierter Form, meist glukosyliert, vor. Nach Aufreinigung der Salizylsäure aus den Blättern nach einer modifizierten Methode von MEUWLY & MÉTRAUX (1993) wurde der Extrakt mittels HPLC aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 305 und 407 nm detektiert.

Dabei war festzustellen, dass der konstitutive Gehalt an freier und gebundener Salizylsäure zwischen den Sorten nicht signifikant variierte. Allerdings lag der Gehalt an gebundener SA bei den vier Wochen alten Pflanzen aller Sorten über den Gehalten der zwei und sechs Wochen alten Pflanzen. Der konstitutive Gehalt der zwei Wochen alten Pflanzen lag dabei auf dem Niveau des konstitutiven Gehalts der sechs Wochen alten Pflanzen, außer bei der Sorte Kuras. Hier erreichte der Gehalt an gebundener Salizylsäure der sechs Wochen alten Pflanzen das Niveau der vier Wochen alten Pflanzen. Die Gehalte an freier Salizylsäure folgten dabei keinem einheitlichen Muster (Abbildung 14).

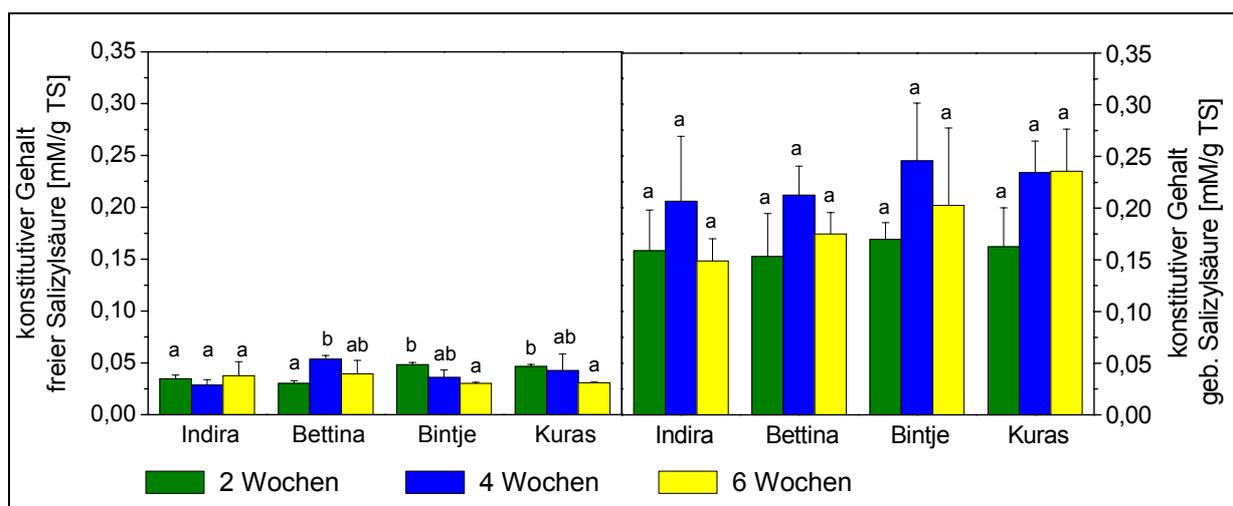


Abbildung 14: Konstitutiver Gehalt an freier und gebundener Salizylsäure der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras zwei, vier und sechs Wochen alter Pflanzen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben freier oder gebundener Salizylsäure sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Verschiedene, Nekrosen auslösende Pathogene können nach CAMERON *et al.* (1999) Salizylsäure induzieren. Die Untersuchungen zur Induktion von Salizylsäure nach Infektion mit *P. infestans* an Kartoffel ergaben, dass Salizylsäure zwar in relativ hohen konstitutiven Gehalten bei den Sorten vorkommt, jedoch keine signifikante Induktion durch Infektion bei den Sorten Indira und Kuras hervorgerufen wird. Bei den Sorten Bettina und Bintje konnte bei den sechs Wochen alten Pflanzen ebenfalls keine signifikante Induktion der gebundenen Salizylsäure gemessen werden. Bei der Sorte Bettina waren die Gehalte an gebundener Salizylsäure sowohl bei den zwei als auch vier Wochen alten Pflanzen ein und drei Tage nach Inokulation erhöht. Eine signifikante Induktion war bei den zwei Wochen alten Blättern der Sorte Bintje zu beobachten (Abbildung 15). Eine signifikante Zunahme an freier Salizylsäure bei den pathogenbehandelten Blättern der verschiedenen Sorten war nicht festzustellen (Ergebnisse nicht dargestellt).

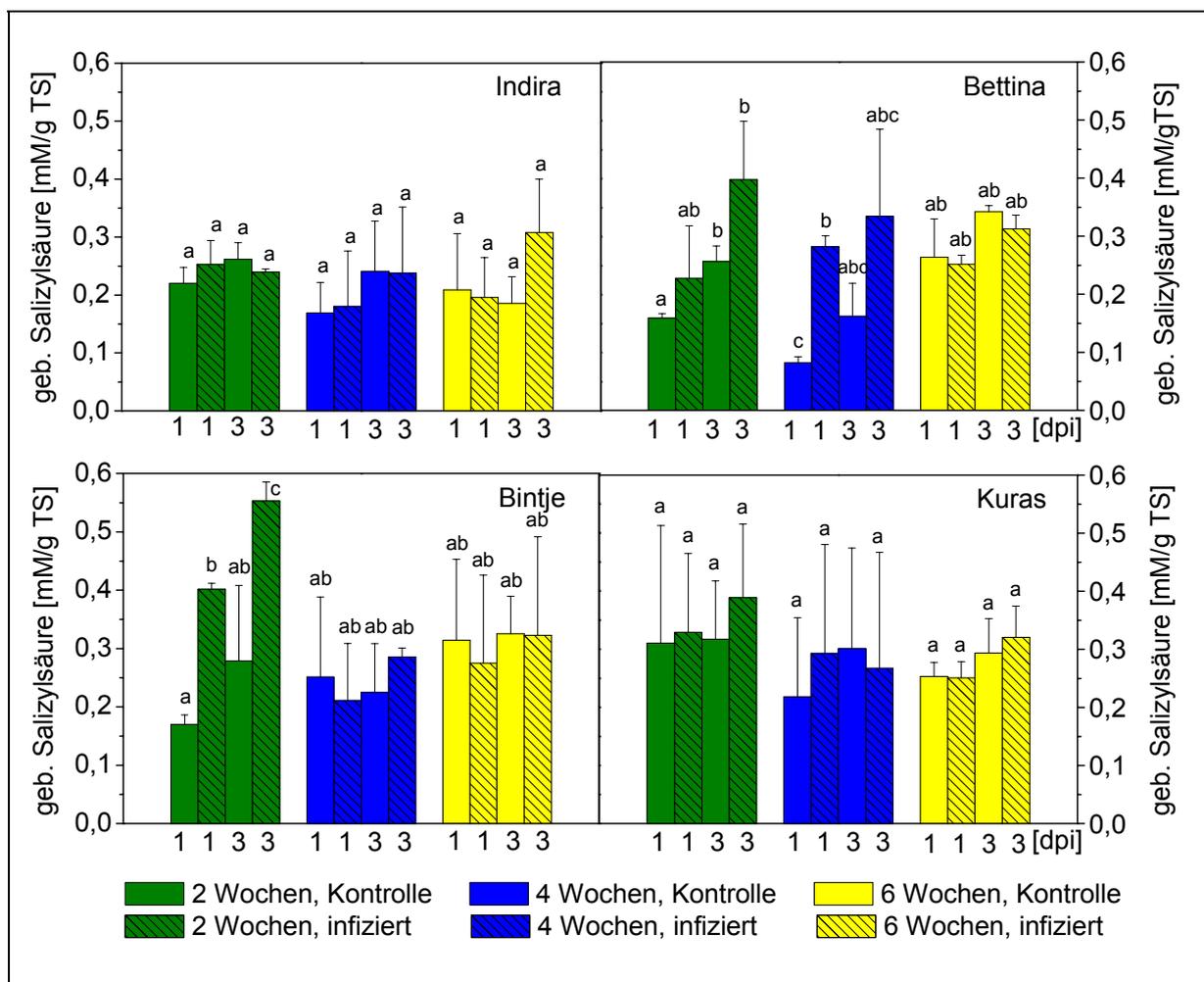


Abbildung 15: Zeitverlauf der Gehalte an gebundener Salizylsäure in zwei, vier und sechs Wochen alten Kartoffelblättern der Sorte Indira, Bettina, Bintje und Kuras während einer Infektion mit *P. infestans*. Erste Blattschäden wurden ab Tag 2 beobachtet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

1.2.2 Untersuchungen zum Phenylpropanoidgehalt der Kartoffelsorten

Der Phenylpropanoidgehalt wurde mittels HPLC im Labor des Fachgebiets Obstbau (Prof. Treutter) am Wissenschaftszentrum Weihenstephan (WZW) bestimmt. Dabei wurden die konstitutiven Gehalte sowie die Induktion der löslichen und membrangebundenen Phenole während einer Infektion mit *P. infestans* ermittelt. Aus einer Vielzahl detektierter Substanzen wurden Kryptochlorogensäure (KCA), Hydroxycimtsäuren (HCA), Chlorogensäure (CA), zwei Flavonolglycoside und Rutin sowie zwei nach Infektion induzierte Phenylpropanoide in den Gesamtgehalt der Phenylpropanoide einberechnet. Dabei handelt es sich bei den aufgetragenen Werten um Mischproben der fünf Wiederholungen, da vorangegangene Messungen geringe Standardabweichungen der einzelnen Wiederholungen aufzeigten (PLEßL 2000, Dissertation). Auffällig dabei ist vor allem, dass die anfällige Sorte Bintje konstitutiv signifikant weniger phenolische Inhaltsstoffe besaß als die drei anderen Sorten. Dies war bei den zwei und vier Wochen alten Pflanzen sowie bei den sechs Wochen alten Pflanzen zu verfolgen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die vier Wochen alten Pflanzen der Sorte Bettina deutlich höhere Gehalte an Phenylpropanoiden aufwiesen als die Blätter der zwei und sechs Wochen alten Pflanzen. Dieser Anstieg ist auf eine signifikante Akkumulation der Flavonole zurückzuführen. Die Sorte Indira hingegen zeigt einen Anstieg der Phenylpropanoidgehalte mit zunehmendem Alter der Pflanzen. Wiederum ist der Anstieg der Flavonole am stärksten ausgeprägt, wobei HCA und Rutin bei den vier Wochen alten Pflanzen ebenfalls ansteigen. Bei der toleranten Sorte Kuras nehmen dagegen die konstitutiven Phenolgesamtgehalte mit dem Alter der Pflanzen ab (Abbildung 16). Dieser Rückgang beruht auf einer Abnahme aller gemessenen Substanzen. Eine Auflistung der Gehalte der einzelnen Inhaltsstoffe gibt Tabelle 1 im Anhang wieder.

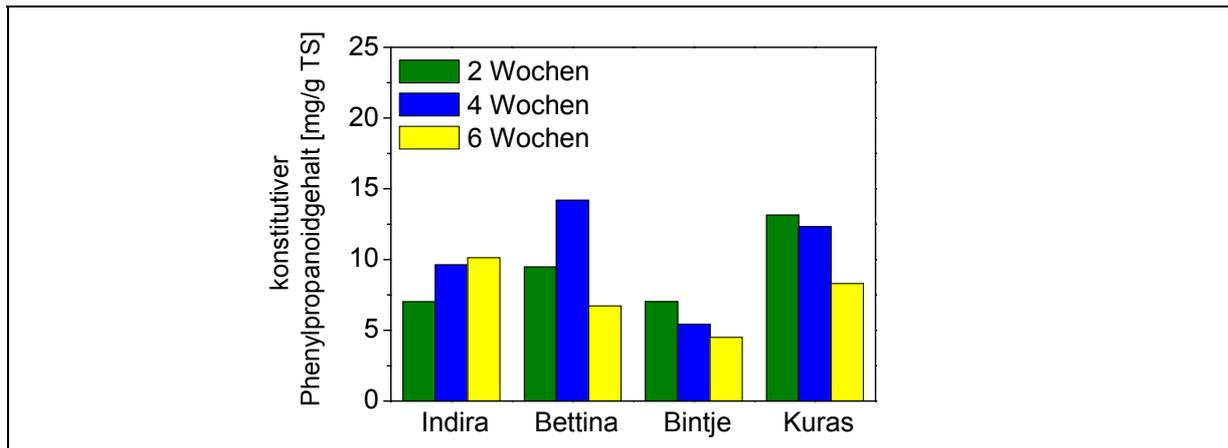


Abbildung 16: Konstitutiver Gehalt an Phenylpropanoiden der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras zwei, vier und sechs Wochen alter Pflanzen. Dargestellt sind Werte einer Mischprobe (n = 5).

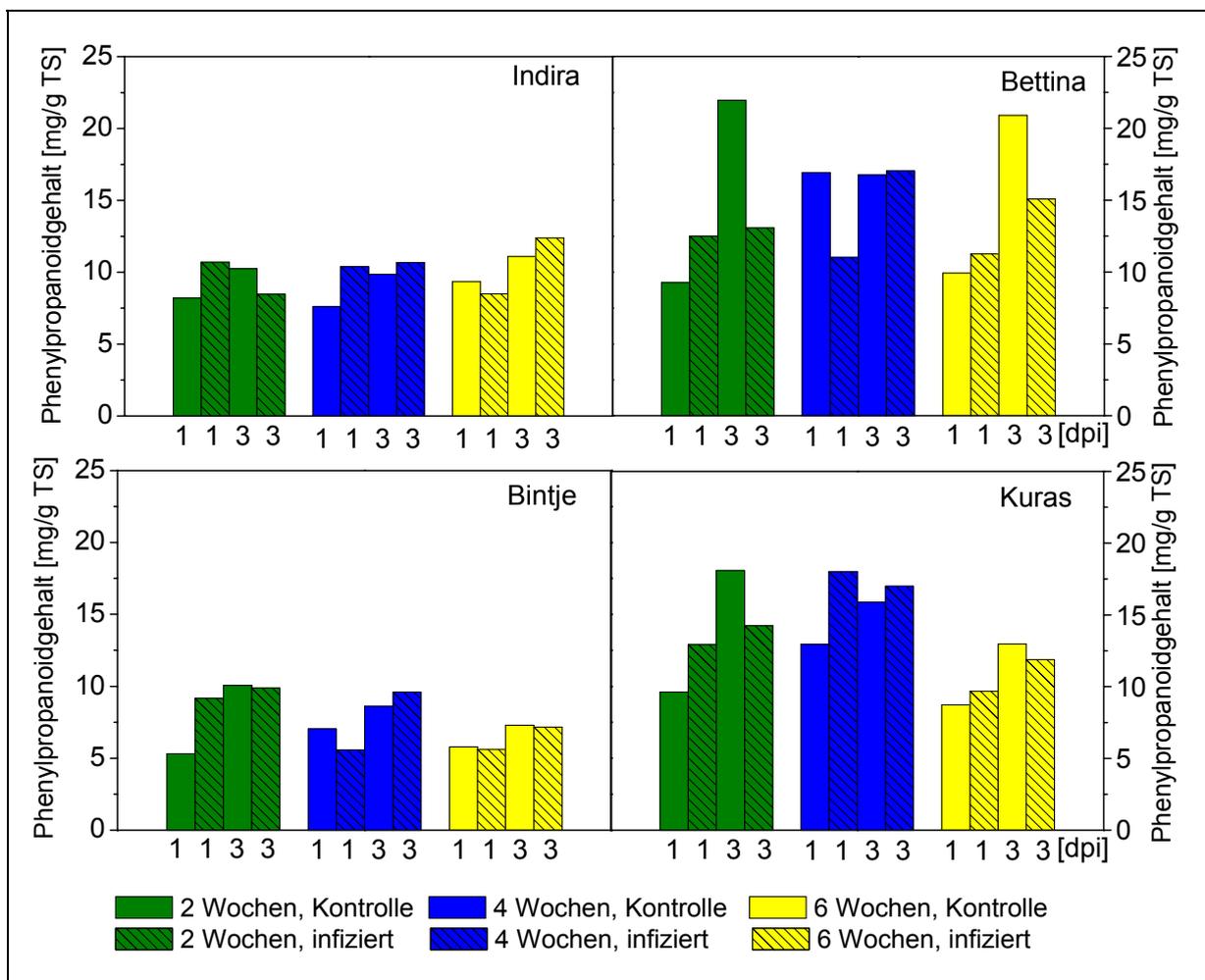


Abbildung 17: Zeitverlauf des Phenolgehalts der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras zwei, vier und sechs Wochen alter Pflanzen während einer *P. infestans* Infektion. Dargestellt sind Werte von Mischproben der einzelnen Wiederholungen mit n = 5.

Vergleicht man die Induktion der Phenylpropanoidgehalte nach Pathogenbehandlung so fällt auf, dass nur an Tag 1 nach Inokulation der zwei Wochen alten Pflanzen eine

Induktion von Phenylpropanoiden stattfindet. Diese Akkumulation beruht dabei bei allen Sorten auf der Anreicherung von KCA, HCA und CA (vgl. Anhang, Tabelle 1). Bei den Sorten Indira und Kuras ist ebenfalls bei den Blättern der vier Wochen alten Pflanzen eine Induktion an Tag 1 nach Inokulation zu erkennen. Dabei werden wiederum KCA, HCA und CA induziert. Im Gegensatz zur Sorte Indira wurden bei der Sorte Kuras zusätzlich die Flavonole induziert (siehe Anhang, Tabelle 1). Eine Infektion der Kartoffelblätter mit *P. infestans* hatte bei allen anderen Varianten keinen Einfluss auf den Gehalt an Phenylpropanoiden (Abbildung 17).

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Sorten konnte bei der Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin sowie *p*-Cumaroyloctopamin festgestellt werden.

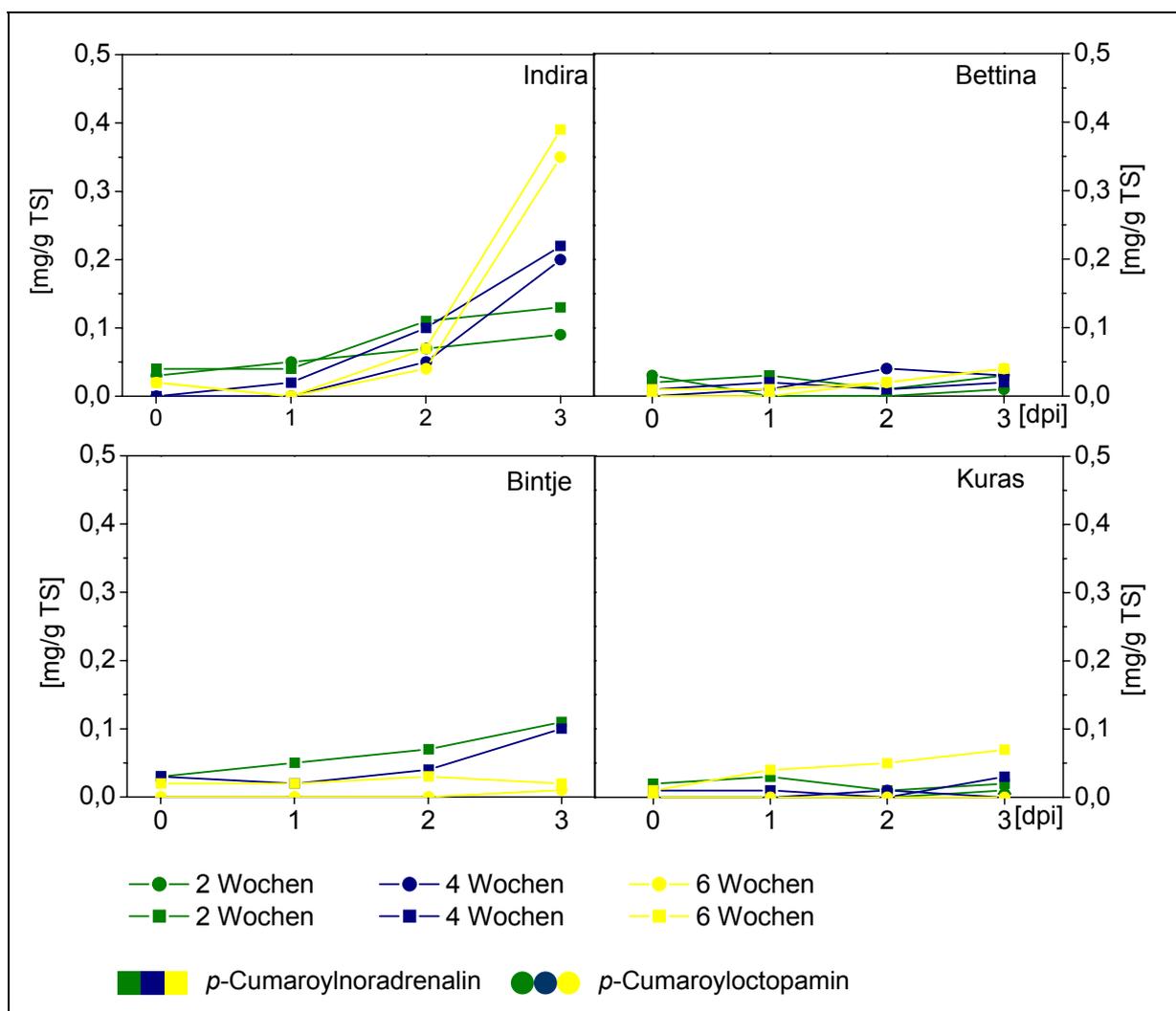


Abbildung 18: Zeitlicher Verlauf von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Bintje und Kuras zwei, vier und sechs Wochen alter Pflanzen während der Infektion mit *P. infestans*. Dargestellt sind Werte von Mischproben der einzelnen Wiederholungen mit $n = 5$. Die Werte der Kontrollblätter wurden nicht aufgetragen ($K < 0,05$ mg/g TS).

Auch spielt das Alter der Pflanzen bei der Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin eine wichtige Rolle. Diese Phenylpropanoide konnten in Zusammenarbeit mit Prof. Treutter (Fachgebiet Obstbau des WZW) sowie Dr. Heller (Institut für Biochemische Phytopathologie, GSF-Neuerberg) identifiziert werden. Während in den Blättern der Sorten Bettina und Kuras keine Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin sowie *p*-Cumaroyloctopamin nach Infektion mit *P. infestans* erfolgt, liegt bei der Sorte Indira eine deutliche Induktion dieser Verbindungen vor. Außerdem akkumulieren ältere Pflanzen signifikant mehr *p*-Cumaroylnoradrenalin sowie *p*-Cumaroyloctopamin als junge Pflanzen der Sorte Indira. Die Sorte Bintje zeigt eine leichte Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin in den Blättern der zwei und vier Wochen alten Pflanzen (Abbildung 18). Konstitutiv konnten *p*-Cumaroylnoradrenalin sowie *p*-Cumaroyloctopamin bei allen vier Sorten nur in sehr geringen Mengen (unter 0,05 mg/g TS) detektiert werden.

1.2.3 Histochemische Detektion der Wasserstoffperoxid-Akkumulation

Um einen eventuellen Zusammenhang der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies mit der Ausbreitung des Pathogens feststellen zu können, wurde in den Blättern neben der Bonitur der Befallsstärke mit *P. infestans* parallel die H₂O₂-Akkumulation im Apoplasten untersucht. Fiederblättchen der vier Wochen alten Pflanzen der zwei Kartoffelsorten Indira und Bettina wurden dabei histochemisch durch Infiltration von einer 0,1 %igen (w/v) DAB-Lösung auf eine Akkumulation von H₂O₂ untersucht. Die Infiltration der DAB-Lösung erfolgte 5 und 24 Stunden nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans*. Dabei zeigten die mit *P. infestans* inokulierten Blätter der beiden Kartoffelsorten eine deutliche DAB-Färbung gegenüber den Kontrollblättern, die nicht mit *P. infestans* inokuliert wurden. Da die Kontrollblätter keine Färbung zeigten, werden im Folgenden nur Ergebnisse der inokulierten Blätter beschrieben und dargestellt. Fünf Stunden nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* zeigten die Blätter der Sorte Bettina bereits eine starke DAB-Färbung, wohingegen bei der Sorte Indira keine DAB-gefärbte Stellen nachzuweisen waren. 24 Stunden nach Inokulation war bei den Blättern beider Sorten eine deutliche Färbung durch DAB zu beobachten, wobei die Blätter der Sorte Bettina eine stärkere Braunfärbung zeigten (Abbildung 19, Abbildung 20).



Abbildung 19: Histochemische H_2O_2 -Detektion an Fiederblättchen der Kartoffelsorten Indira (links) und Bettina (rechts) fünf Stunden nach Inokulation mit *P. infestans*. Dargestellt sind Fiederblättchen der dritten Blatttage vier Wochen alter Pflanzen. Nach Entfärbung mit Ethanol wurden die Blätter fotografiert.

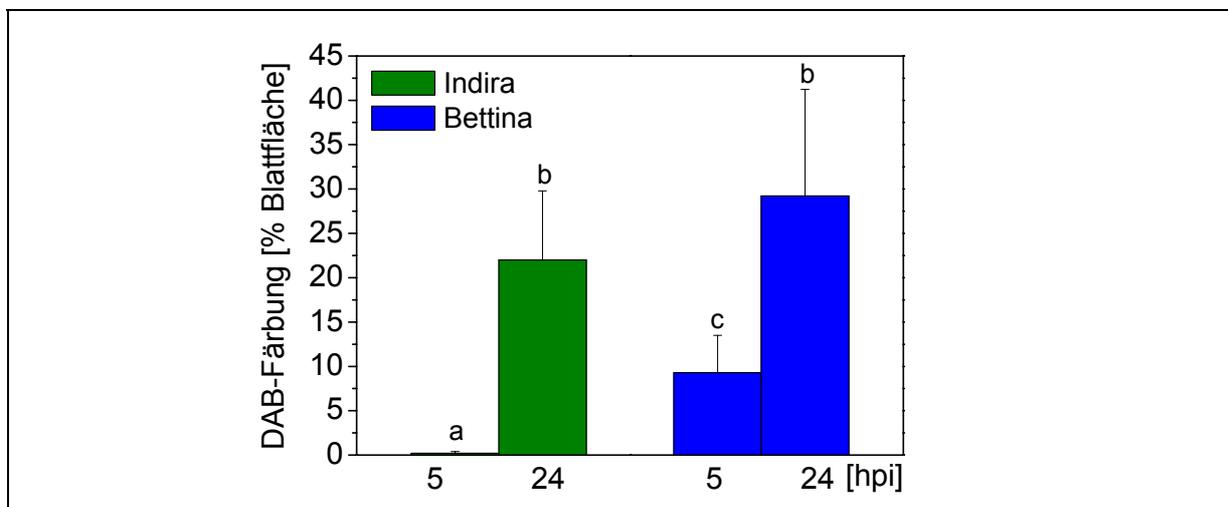


Abbildung 20: H_2O_2 -Nachweis durch Diaminobenzidin (DAB) 5 und 24 Stunden nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* der Kartoffelsorten Indira und Bettina nach vier Wochen Wachstum. Der H_2O_2 -Nachweis in den nicht-pathogenbehandelten Blättern wurde nicht dargestellt, da keine H_2O_2 -Akkumulation nachzuweisen war. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 10$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

2 Untersuchungen zum Primärstoffwechsel von Kartoffelpflanzen unter variierter CO₂- und Stickstoffversorgung

2.1 Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Biomasseproduktion

Zur Untersuchung des Einflusses von CO₂ und Stickstoff auf die Biomasseproduktion der Pflanzen, wurde die oberirdische Biomasse sowie die Knollenmasse bestimmt.



Die Anzucht der Kartoffelpflanzen erfolgte unter einer CO₂-Konzentration von 400 ppm sowie 700 ppm CO₂ in den Gewächshäusern der GSF in Neuherberg. Um den Einfluss unterschiedlicher N-Düngestufen auf die Pflanze zu untersuchen, wurde ein Teil der Pflanzen zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt, der andere Teil erhielt keine zusätzliche N-Düngung. Alle Pflanzen wurden in einer stickstoffarmen Mischung aus Ackererde, Sand und Fruhstorfer T-Erde herangezogen.

Abbildung 21: Kartoffelpflanzen der Sorte Indira vier Wochen nach dem Auskeimen unter ambienter CO₂-Konzentration. Ein Teil der Pflanzen wurde mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt (+N), der andere Teil erhielt keine Stickstoffdüngung (-N).

Nach einer 4-wöchigen Exposition der Kartoffelpflanzen wurden pro Variante 24 Pflanzen zur Bestimmung der oberirdischen Biomasse herangezogen. Die Bestimmung der Knollenmasse erfolgte nach einer 8-wöchigen Exposition der Pflanzen, da zum Erntezeitpunkt nach vier Wochen die Knollen noch nicht weit genug entwickelt waren. Eine zusätzliche N-Düngung von 0,8 g N führte bei Pflanzen der Kartoffelsorten Indira und Bettina zu einer signifikanten Steigerung der ober- und unterirdischen Biomasse. Eine bis zu 3,3-fache Steigerung der oberirdischen Biomasse durch eine zusätzliche N-Gabe war sowohl bei der Niedrig- als auch bei der Hoch-CO₂-Variante zu verzeichnen (Abbildung 21). Auch bei den Knollen konnte bei der Sorte Indira eine drastische Steigerung (2,4-fach) der Masse nach einer Stickstoffdüngung beobachtet werden. Die Knollen der Sorte Bettina waren zum Zeitpunkt der Ernte zu klein, um Aussagen zu einem etwaigen N-Effekt treffen zu können.

Eine Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 700 ppm hatte im Gegensatz zu einer erhöhten N-Versorgung keinen signifikanten Effekt auf ober- und

unterirdische Biomasse. Tendenziell konnte ein Zuwachs an oberirdischer Biomasse und Knollenmasse nach vier Wochen Wachstum der Pflanzen durch eine erhöhte CO₂-Konzentration beobachtet werden (Abbildung 22).

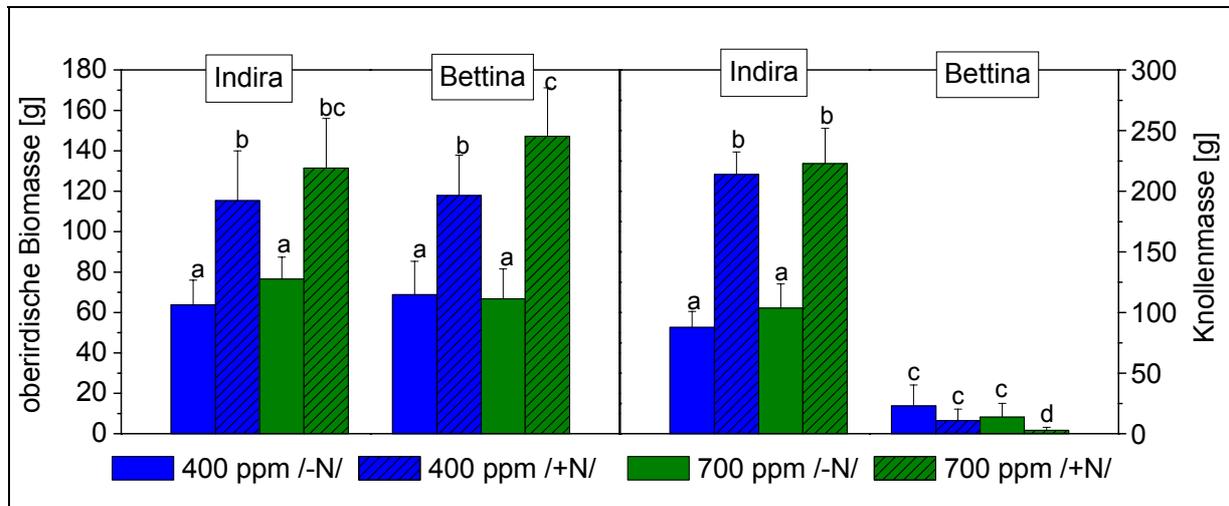


Abbildung 22: Oberirdische Biomasse und Knollenmasse nach vier Wochen (Blätter) und acht Wochen (Knollen) Wachstum der Pflanzen unter 400 ppm und 700 ppm CO₂. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 24 [Blätter], n = 12 [Knollen]). Mittelwerte der oberirdischen Biomasse oder der Knollenmasse mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

2.2 Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf biochemische Parameter des Primärstoffwechsels

Zur Untersuchung des Einflusses von CO₂ und N auf biochemische Parameter des Primärstoffwechsels wurden Blätter der zweiten und dritten Blatttage der mit CO₂ und N behandelten Pflanzen (vgl. 2.1) nach einer 4-wöchigen Exposition geerntet. Die folgenden Ergebnisse setzen sich aus vier Wiederholungen (n = 4) zusammen, wobei eine Wiederholung aus den Fiederblättchen der zweiten und dritten Blatttage von sechs Pflanzen bestand.

2.2.1 Stärkegehalte der Kartoffelblätter und Knollen

Die Stärkegehalte der Blätter der Sorte Indira wurden photometrisch bestimmt (siehe II.2.3.4.1.). Eine Behandlung der Pflanzen mit 700 ppm CO₂ über vier Wochen hatte dabei deutliche Auswirkungen auf die Stärkegehalte der Blätter. Der Gehalt an Stärke in den Blättern stieg durch eine erhöhte CO₂-Konzentration von 6,0 ± 3,3 % auf 11,8 ± 6,3 %. Die Düngung der Pflanzen mit Stickstoff hatte sowohl bei der Hoch-CO₂-Variante sowie bei der Niedrig-CO₂-Variante eine Abnahme der Stärkegehalte in den Blättern zur Folge. Zur Stärkeanalytik der Knollen, die an der LfA Freising-

Weihenstephan erfolgte, wurden pro Variante Knollen von 12 Pflanzen nach acht Wochen Wachstum unter 400 ppm oder 700 ppm CO₂ und einer zusätzlichen N-Gabe von 0,8 g N herangezogen. Durch eine N-Düngung von 0,8 g N/Pflanze konnte eine signifikante Stärkeanreicherung in den Knollen der Sorte Indira erzielt werden. Eine Behandlung der Pflanzen mit 700 ppm CO₂ führte ohne zusätzliche N-Düngung ebenfalls zu einer sichtbaren Zunahme des Stärkegehalts der Knollen von $24,4 \pm 0,5$ % auf $26,0 \pm 0,3$ %. Hingegen konnte eine Erhöhung der CO₂-Konzentration die Stärkeakkumulation in den Knollen weniger stark induzieren nachdem die Pflanzen mit Stickstoff behandelt wurden (Abbildung 23).

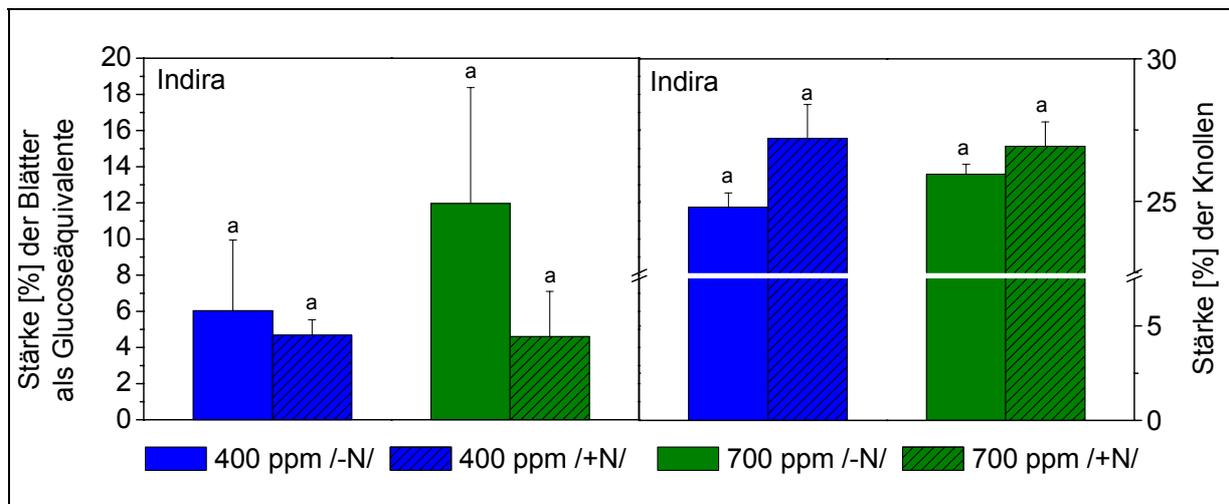


Abbildung 23: Stärkegehalte [%] der Blätter der Sorte Indira nach vier Wochen Wachstum und der Knollen nach acht Wochen Wachstum der Pflanzen unter 400 ppm und 700 ppm CO₂. Gleichzeitig wurden ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 4 [Blätter], n = 12 [Knollen]). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

Eine Behandlung der Blätter aller Varianten mit *P. infestans* hatte drei Tage nach Inokulation einen tendenziellen Rückgang des Stärkegehalts zur Folge. Bei der Variante 400 ppm /-N/ reduzierte sich der Gehalt an Stärke sogar signifikant von $11,8 \pm 4,2$ % auf $4,5 \pm 3,8$ % (Tabelle 14).

Indira	Tag 3 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
Stärke [%]	Kontrolle	11,8 \pm 4,2	10,8 \pm 2,3	11,8 \pm 5,6	8,4 \pm 6,2
	infiziert	4,5 \pm 3,8	7,3 \pm 5,9	10,8 \pm 5,7	7,6 \pm 2,7

Tabelle 14: Stärkegehalte [%] von Kontrollblättern und pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ über 4 Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 4). Signifikante Veränderungen der Stärkegehalte durch eine *P. infestans* Infektion sind blau markiert.

2.2.2 Gehalte der Kartoffelblätter an löslichen Zuckern

Die Gehalte an löslichen Zuckern der Blätter der Sorte Indira wurden photometrisch bestimmt. Der Gesamtgehalt an löslichen Zuckern besteht dabei aus Einzelmessungen der Gehalte an Glukose, Fruktose und Saccharose. Zur Darstellung der Gesamtgehalte wurden diese addiert. Standardabweichungen wurden für die Gesamtgehalte nicht berechnet, können aber den Gehalten der einzelnen Zuckern der folgenden Tabelle 15 entnommen werden. Eine Behandlung der Pflanzen mit 700 ppm CO₂ über vier Wochen führte zu einer Steigerung der konstitutiven Gehalte an löslichen Zuckern im Vergleich zu den Pflanzen, die mit 400 ppm CO₂ behandelt wurden. Der Gehalt in den Blättern stieg durch eine erhöhte CO₂-Konzentration von 700 ppm von 17,8 auf 23,4 mg/g TS der Niedrig-N-Varianten an. Dabei akkumulierte vor allem Saccharose in größeren Mengen. Durch eine zusätzliche N-Düngung war der CO₂-Effekt auf den Gehalt an löslichen Zuckern noch deutlicher. Hier stieg der Gehalt von 24,3 auf 33,2 mg/g TS an. Dabei akkumulierte vor allem Glukose in größeren Mengen. Eine N-Düngung der Pflanzen hatte dabei eine noch stärkere Anreicherung der löslichen Zucker in den Blättern zur Folge (Abbildung 24). In der Niedrig-CO₂-Variante war vor allem eine Akkumulation von Saccharose zu beobachten, wohingegen in der Hoch-CO₂-Variante vor allem die Glukoseanreicherung induziert wurde. Die Gehalte an Fruktose blieben bei allen Behandlungsvarianten unverändert (Tabelle 15).

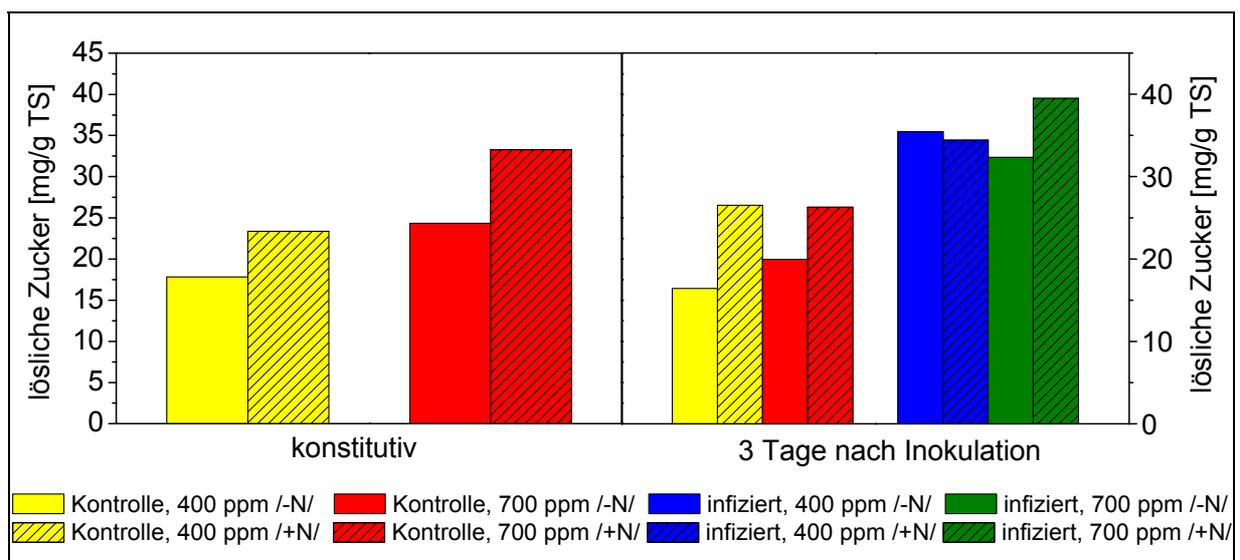


Abbildung 24: Konstitutive Gehalte löslicher Zucker [mmol/g TS] (links) sowie Gehalte an löslichen Zuckern von Kontrollblättern und pathogenbehandelten Blättern drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* (rechts) der Sorte Indira. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4).

[mmol/g TS]	Tag 0 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
Glukose	konstitutiv	9,5 ± 7,9	8,7 ± 1,9	6,4 ± 4,9	15,8 ± 9,5
Fruktose	konstitutiv	1,4 ± 0,9	0,8 ± 0,5	1,3 ± 0,8	0,9 ± 0,3
Saccharose	konstitutiv	7,0 ± 3,3	13,8 ± 4,4	16,6 ± 0,6	16,5 ± 0,9
[mmol/g TS]	Tag 3 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
Glukose	Kontrolle	7,7 ± 1,5	12,6 ± 2,0	8,0 ± 1,0	14,1 ± 1,4
	infiziert	18,8 ± 4,3	17,2 ± 1,6	16,9 ± 2,7	23,0 ± 6,3
Fruktose	Kontrolle	0,6 ± 0,4	2,6 ± 1,8	1,5 ± 1,1	1,9 ± 0,9
	infiziert	0,7 ± 0,4	0,4 ± 0,1	0,7 ± 0,2	0,9 ± 0,2
Saccharose	Kontrolle	8,2 ± 2,6	11,3 ± 3,5	10,5 ± 5,1	7,5 ± 5,1
	infiziert	15,9 ± 4,9	16,8 ± 5,8	17,5 ± 2,7	15,6 ± 2,1

Tabelle 15: Konstitutive Gehalte von Glukose, Fruktose und Saccharose [mmol/g FS] sowie Gehalte an löslichen Zuckern von Kontrollblättern und pathogenbehandelten (*P. infestans*) Blättern der Sorte Indira drei Tage nach Inokulation. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Signifikante Induktionen der Zuckergehalte durch eine *P. infestans* Infektion sind blau markiert.

Eine Infektion der Blätter mit *P. infestans* hatte eine deutliche Zunahme der Gehalte an löslichen Zuckern in den Blättern aller Varianten an Tag 3 nach Inokulation zur Folge. Dabei akkumulierten die Gehalte an Glukose und Saccharose in allen Varianten signifikant, mit Ausnahme der Saccharoseakkumulation der 400 ppm CO₂/+N/-Variante. Die Fruktosegehalte blieben auch durch eine Infektion mit *P. infestans* unverändert (Tabelle 15).

2.3 Untersuchungen zum C/N-Verhältnis der Kartoffelblätter und -knollen

Die Kultivierung von Kartoffelpflanzen der Sorte Indira und Bettina unter erhöhter atmosphärischer CO₂-Konzentration führte zu einer leichten Zunahme des C/N-Verhältnisses in den Blättern beider Sorten wie auch in den Knollen der Sorte Indira. C/N-Daten der Knollen der Sorte Bettina konnten nicht bestimmt werden, da diese zum Erntezeitpunkt noch zu klein waren. Die Zunahme des C/N-Verhältnisses durch CO₂ konnte sowohl in den Blättern und Knollen der Varianten ohne zusätzliche Stickstoffdüngung, wie auch in Pflanzen der Variante mit einer zusätzlichen N-Düngung gemessen werden. Diese gesteigerten C/N-Verhältnisse der Blätter durch eine erhöhte CO₂-Konzentration beruhen auf erniedrigten N-Gehalten und nicht auf einer Steigerung des C-Gehalts bei der erhöhten CO₂-Konzentration. Bei einem

höheren N-Angebot (0,8 g N/Pflanze) wurden gesteigerte Stickstoffgehalte in den Blättern und Knollen gegenüber den Pflanzen, die ohne zusätzliche N-Gabe aufwuchsen, gemessen. Dieser Befund war in den Pflanzen der Hoch-CO₂-Variante wie auch unter ambienten CO₂-Bedingungen zu beobachten (Tabelle 16, Tabelle 17).

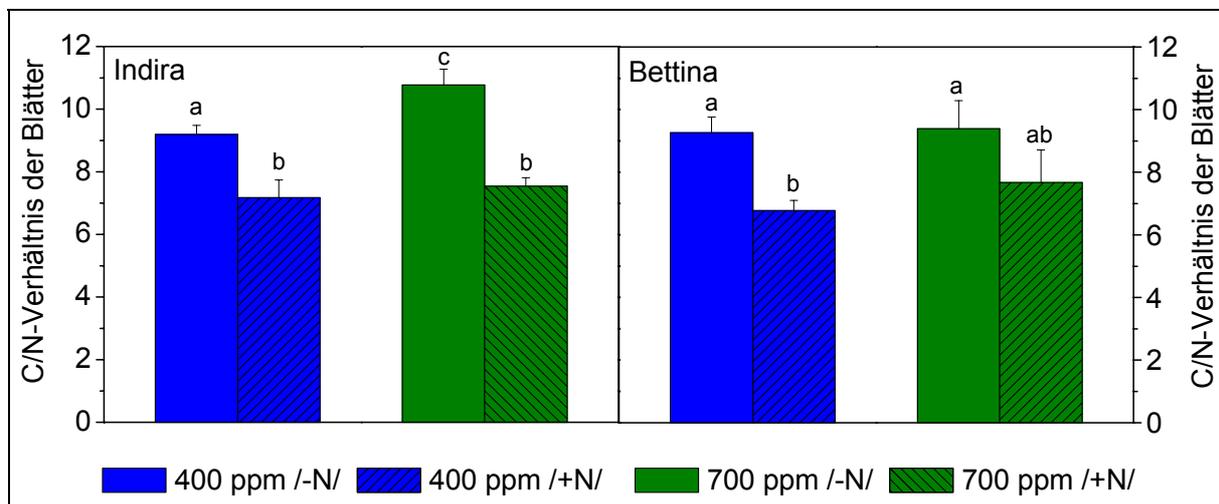


Abbildung 25: C/N-Verhältnis der Blätter der Kartoffelsorten Indira und Bettina. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm CO₂ oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

Das daraus resultierende C/N-Verhältnis der Blätter beider Sorten und Knollen der Sorte Indira war gegenüber dem C/N-Verhältnis der Blätter ohne zusätzliche N-Gabe verringert (Abbildung 25, Abbildung 26).

	Indira				Bettina			
	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
C/N	9,2 ± 0,4	7,2 ± 0,5	10,8 ± 0,5	7,5 ± 1,0	9,3 ± 0,5	6,8 ± 0,3	9,4 ± 0,9	7,7 ± 1,0
N (%)	4,8 ± 0,2	6,2 ± 0,4	4,2 ± 0,3	5,9 ± 0,5	4,7 ± 0,4	6,4 ± 0,6	4,7 ± 0,5	5,9 ± 0,8
C (%)	44,0 ± 0,7	45,0 ± 0,5	43,7 ± 1,0	44,9 ± 1,4	42,9 ± 4,0	45,1 ± 0,5	44,2 ± 0,4	44,4 ± 0,8

Tabelle 16: C/N-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Blätter der Kartoffelsorten Indira und Bettina. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm CO₂ oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4).

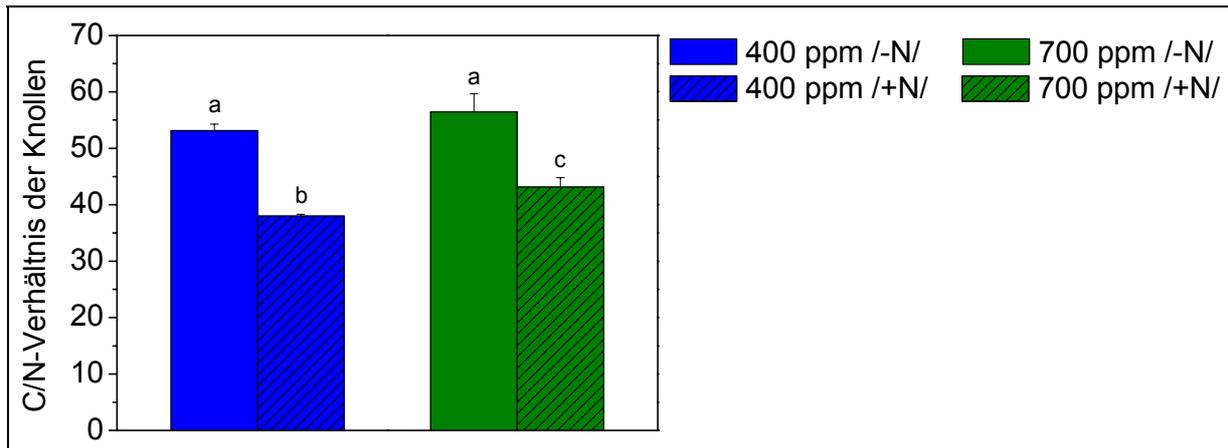


Abbildung 26: C/N-Verhältnis der Knollen der Sorte Indira. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm CO₂ oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

Indira	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
C/N	53,1 ± 1,2	38,0 ± 0,3	56,5 ± 3,2	43,2 ± 1,7
N (%)	0,82 ± 0,02	1,2 ± 0,01	0,77 ± 0,01	1,0 ± 0,04
C (%)	43,4 ± 0,2	43,9 ± 0,1	43,4 ± 0,1	43,9 ± 0,1

Tabelle 17: C/N-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Knollen der Sorte Indira. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm CO₂ oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4).

Die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte und das daraus resultierende C/N-Verhältnis wurden ebenfalls an Blättern der verschiedenen Varianten drei Tage nach einer künstlichen Infektion mit *P. infestans* und *A. solani* bestimmt. Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter wieder. Durch eine 3-tägige Inkubation trat bei den N-Gehalten sowie dem C/N-Verhältnis der Blätter beider Sorten keine signifikante Änderung auf. Die Behandlung der Blätter mit *P. infestans* führte bei allen Varianten, außer der Variante 700 ppm /+N/ zu einer signifikanten Abnahme der C-Gehalte in den Blättern (Tabelle 18).

Indira/<i>P. infestans</i>	Tag 3 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
C/N	Kontrolle	10,2 ± 0,8	8,1 ± 0,5	10,0 ± 1,4	8,4 ± 0,8
	infiziert	9,7 ± 0,9	8,3 ± 1,5	9,9 ± 0,4	8,1 ± 0,1
N (%)	Kontrolle	4,4 ± 0,3	5,8 ± 0,4	4,7 ± 0,7	5,4 ± 0,3
	infiziert	4,5 ± 0,4	5,4 ± 1,1	4,2 ± 0,2	5,5 ± 0,2
C (%)	Kontrolle	45,2 ± 0,7	46,6 ± 0,8	45,5 ± 0,9	45,2 ± 1,3
	infiziert	42,7 ± 0,4	43,3 ± 0,9	41,8 ± 0,5	44,6 ± 1,3
Indira/<i>A. solani</i>	Tag 3 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
C/N	Kontrolle	9,2 ± 0,4	7,3 ± 0,5	10,6 ± 0,7	7,7 ± 0,4
	infiziert	9,3 ± 0,3	7,5 ± 0,5	10,9 ± 0,7	7,7 ± 0,4
N (%)	Kontrolle	4,8 ± 0,2	6,2 ± 0,5	4,2 ± 0,3	5,9 ± 0,3
	infiziert	4,8 ± 0,1	6,1 ± 0,5	4,1 ± 0,3	5,9 ± 0,3
C (%)	Kontrolle	44,1 ± 0,3	45,1 ± 0,4	43,7 ± 0,6	44,9 ± 0,8
	infiziert	44,8 ± 0,3	45,4 ± 0,5	44,0 ± 0,8	45,4 ± 0,4
Bettina/<i>A. solani</i>	Tag 3 [dpi]	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
C/N	Kontrolle	9,2 ± 0,5	7,1 ± 0,8	9,5 ± 1,0	7,6 ± 0,7
	infiziert	8,9 ± 0,2	6,7 ± 0,4	9,1 ± 0,7	7,5 ± 0,9
N (%)	Kontrolle	4,7 ± 0,4	6,4 ± 0,6	4,7 ± 0,5	5,9 ± 0,6
	infiziert	5,0 ± 0,1	6,7 ± 0,4	4,9 ± 0,4	6,1 ± 0,7
C (%)	Kontrolle	42,9 ± 0,3	45,1 ± 0,6	44,2 ± 0,4	44,2 ± 0,9
	infiziert	43,6 ± 0,6	45,1 ± 0,6	44,7 ± 0,4	45,3 ± 0,4

Tabelle 18: C/N-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte der Blätter der Sorte Indira und Bettina drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* oder *A. solani*. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Signifikante Änderungen der Werte durch Infektion sind blau markiert.

Die Messungen belegen, dass die gewählten Variationen der C- und N-Versorgung ausreichen, um die C/N-Flüsse zu modulieren und damit die Allokation der Ressourcen in den Primär- oder Sekundärstoffwechsel zu verschieben. Es sollte im Folgenden geprüft werden, ob neben morphologischen und physiologischen Veränderungen auch Unterschiede im Resistenzverhalten sowie im Gehalt an sekundären Inhaltsstoffen auftreten.

3 Untersuchungen zum Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani* unter variierter CO₂- und Stickstoffversorgung

Nach POORTER *et al.* (1997) und PENUELAS *et al.* (1997) führen erhöhte atmosphärische CO₂-Konzentrationen zu einer Verschiebung des C/N-Verhältnisses in der Pflanze, wonach sich der Gehalt stickstofffreier Komponenten in der Pflanze erhöht. Konsistent dazu wurde die Zunahme an löslichen phenolischen Verbindungen auch unter Mangel an Stickstoff und anderen Nährstoffen beobachtet (PENUELAS und ESTIARTE 1998). Diese Veränderungen im metabolischen Profil lassen Konsequenzen für die Wechselwirkung der Pflanze mit ihrer Umwelt insbesondere in der Interaktion mit Pathogenen erwarten. In diesem Versuchsteil sollte daher geprüft werden, ob die Kultivierung von Kartoffelpflanzen unter erhöhter CO₂-Konzentration und bei variabler Stickstoffversorgung zu veränderten Gehalten an Sekundärmetaboliten führt. Außerdem sollten Inokulationsexperimente zeigen, ob veränderte Metabolitprofile gegebenenfalls mit einer veränderten Suszeptibilität gegenüber *P. infestans* oder *A. solani* korrelieren. Hierzu wurden Kartoffelpflanzen der Sorte Indira und Bettina unter ambienten (400 ppm) und erhöhten (700 ppm) CO₂-Konzentrationen in klimatisierten Gewächshauskammern angezogen und variabel mit Stickstoff versorgt (0,0 g N/Pflanze; 0,8 g N/Pflanze). Aufgrund des Versuchsumfangs wurde die Sortenanzahl auf zwei Sorten reduziert. Zum Zeitpunkt der Probenahme waren die Pflanzen vier Wochen alt. Blätter zur Untersuchung der folgenden Parameter wurden der zweiten und dritten Blatttage entnommen und mit einer Sporensuspension der Pathogene *P. infestans* oder *A. solani* [10⁴ Sporen/ml] inokuliert und anschließend in Petrischalen für fünf Tage in Klimakammern kultiviert .

3.1 Entstehung von Blattschäden nach Pathogenbehandlung

3.1.1 Bonitur der Blattschäden einer *Phytophthora infestans* Infektion

Mit Hilfe der quantitativen PCR und visueller Bonitur konnte deutlich gezeigt werden, dass eine Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 700 ppm zu einer verminderten Anfälligkeit der Kartoffelsorte Indira gegenüber *P. infestans* führt. Stichprobenartig (n = 12) wurden nicht pathogenbehandelte Blätter mit Hilfe der quantitativen PCR untersucht. Da in diesen Proben keine *P. infestans* DNA nachgewiesen werden konnte, sollen im Folgenden nur Ergebnisse der inokulierten

Blätter beschrieben und dargestellt werden. Die gilt ebenfalls für die optische Bonitur der Blätter. Bereits drei Tage nach Inokulation der Blätter waren signifikante Unterschiede zwischen den beiden CO₂-Behandlungsstufen mit Hilfe der PCR-Technik detektierbar. Aber auch visuell zeichneten sich erste Unterschiede im Befall ab. An Tag 4 und 5 nach Inokulation sind diese Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* deutlich zu erkennen. Eine zusätzliche Stickstoffversorgung von 0,8 g N/Pflanze erhöhte hingegen die Anfälligkeit der Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans*. Die durch eine erhöhte CO₂-Konzentration gesteigerte Toleranz konnte durch eine N-Düngung von 0,8 g N/Pflanze wieder aufgehoben werden. Drei Tage nach Inokulation der Blätter konnte mit Hilfe der quantitativen PCR ein signifikanter Anstieg der Anfälligkeit der mit Stickstoff vorbehandelten Blätter beider CO₂-Behandlungsvarianten gegenüber *P. infestans* aufgezeigt werden. Erkennbar zeichneten sich drei und vier Tage nach Inokulation die ersten Unterschiede in der Toleranz gegenüber *P. infestans* der verschiedene Stickstoffvarianten ab, aber erst an Tag 5 war zu erkennen, dass die Blätter der Düngervariante anfälliger gegenüber *P. infestans* reagierten, als die Blätter ohne zusätzliche Stickstoffversorgung (Abbildung 27).

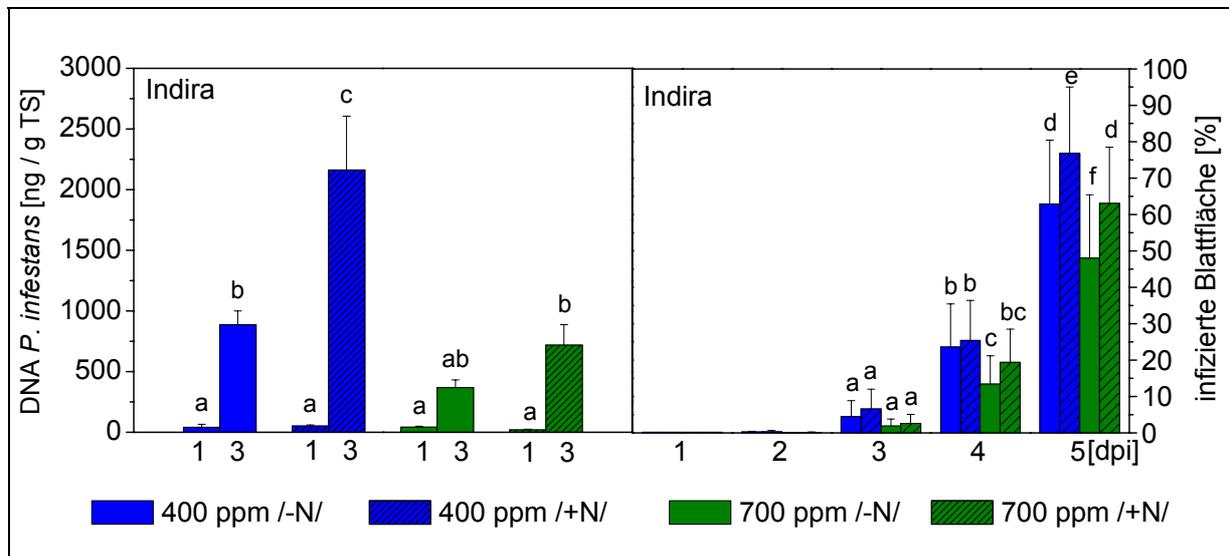


Abbildung 27: Quantitativer Nachweis der Befallsstärke der Blätter der Sorte Indira mit *P. infestans* ein und drei Tage nach Inokulation. Gemessen wurde der Gehalt an DNA [ng/g TS] mit Hilfe der quantitativen PCR (links). Rechts ist die visuelle Bonitur der infizierten Blattfläche [%] ein bis fünf Tage nach Inokulation mit *P. infestans* aufgetragen. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Eine Wiederholung setzt sich dabei aus den Boniturdaten von 45 Einzelblättern zusammen. Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

3.1.2 Bonitur der Blattschäden einer *Alternaria solani* Infektion

Eine Inokulation der Blätter mit *Alternaria solani* sollte zeigen, ob erhöhte CO₂-Konzentrationen und erhöhte N-Gehalte auch zu einer veränderten Pathogenresistenz der Kartoffelpflanzen gegenüber nekrotrophen Phytopathogenen führen. Das Ausmaß der *A. solani* Infektion wurde mittels visueller Bonitur der Blätter erfasst. Blätter der Sorte Indira und Bettina wurden mit einer Sporensuspension von *A. solani* inokuliert und zur Charakterisierung der Blattschäden für fünf Tage in Klimakammern kultiviert. Zum Zeitpunkt der Behandlung waren die Pflanzen vier Wochen alt. Die verwendeten Blätter wurden der zweiten und dritten Blatttage einer Pflanze entnommen. Als erste Blatttage wurde das erste voll ausgewachsene Blatt mit einer Länge von ca. 8 cm definiert.

Bei diesem Versuch zeigten sich ebenfalls deutliche Unterschiede in der Sensitivität der Sorten und der Behandlungsvarianten gegenüber *A. solani*. Kontrollblätter aller Varianten zeigten während der gesamten Inkubationszeit keine Symptome einer Infektion und sind somit nicht aufgeführt.

Schon am ersten Tag nach Inokulation waren deutliche Symptome einer *A. solani* Infektion bei der Sorte Bettina zu erkennen. Blätter der Sorte Indira zeigten am zweiten Tag sichtbare schwarze Punkte, die einer *A. solani* Infektion zugeschrieben werden konnten. Diese anfänglich kleinen schwarzen Punkte vergrößerten sich während des Beobachtungszeitraums und es entstanden chlorotische Höfe um die Infektionsstellen auf den Blättern. Daher stellte sich die optische Bonitur der infizierten Blattfläche als sehr schwierig dar. Einerseits musste auf die deutlichen schwarzen Infektionsherde geachtet, andererseits aber auch die Vergilbung in die Bonitur miteinberechnet werden. Daher weisen die Boniturdaten hohe Standardabweichungen auf.

Interessanterweise ist die generelle Anfälligkeit der Sorte Bettina gegenüber *A. solani* höher als die der Sorte Indira, was im Gegensatz zur Anfälligkeit der Sorten gegenüber *P. infestans* steht. Auch eine Behandlung der Pflanzen mit 0,8 g N hatte einen gegenteiligen Effekt zur Folge. Wo eine N-Düngung die Suszeptibilität der Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* erhöhte, erniedrigte eine zusätzliche N-Gabe die Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber *A. solani*. Am Tag 4 nach Inokulation ist deutlich zu erkennen, dass die Blätter mit zusätzlicher N-Düngung toleranter gegenüber *A. solani* sind. Exemplarisch dargestellt sind Blätter der Sorte Bettina und

Indira drei Tage nach Inokulation mit *A. solani* der Varianten 400 ppm CO₂ /-N/ und 400 ppm CO₂ /+N/ (Abbildung 28)

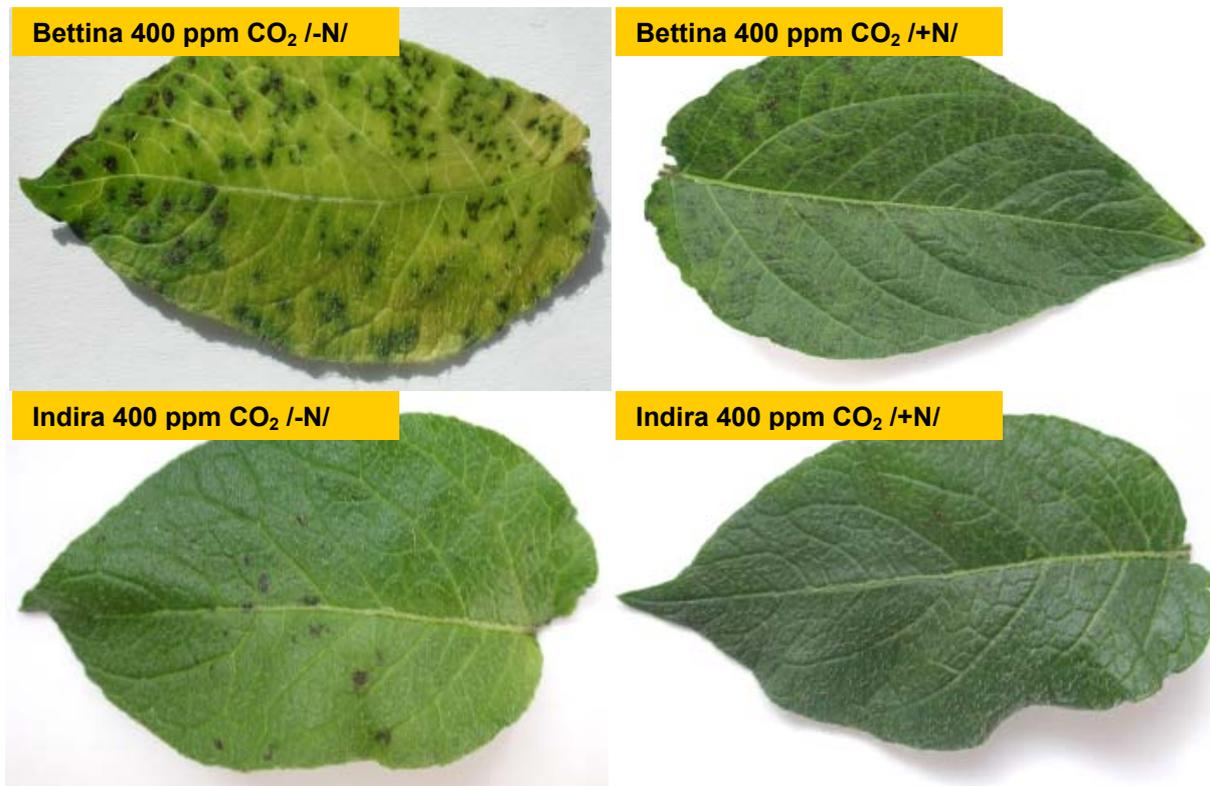


Abbildung 28: Kartoffelblätter der Sorte Bettina (oben) und der Sorte Indira (unten) drei Tage nach Inokulation mit *A. solani*. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt.

Bei der Sorte Indira waren ohne N-Düngung 66 % der Blattfläche und mit N-Düngung nur 36 % der Blattfläche der ambienten CO₂-Variante durch *A. solani* beschädigt. Vergleicht man die befallene Blattfläche der Hoch-CO₂-Variante, handelt es sich um ein Verhältnis von 55 % zu 32 %. Hierbei fällt auf, dass durch eine Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm die Toleranz der Blätter gegenüber *A. solani* ebenfalls steigt. Dieser Effekt ist auch bei der anfälligeren Sorte Bettina zu beobachten. Vergleicht man die Werte der infizierten Blattfläche der Sorte Bettina während des Versuchszeitraums, so ist deutlich zu erkennen, dass eine zusätzliche N-Gabe und eine Erhöhung der CO₂-Konzentration die Anfälligkeit gegenüber *A. solani* herabsetzen. Am vierten Tag nach Inokulation sind bei der Variante ohne N-Düngung 96 % der Blattfläche beschädigt, bei der Variante mit N-Düngung nur 81 %. Betrachtet man die beschädigte Blattfläche der Hoch-CO₂-Variante handelt es sich um ein Verhältnis von 91 % zu 56 % (Abbildung 29).

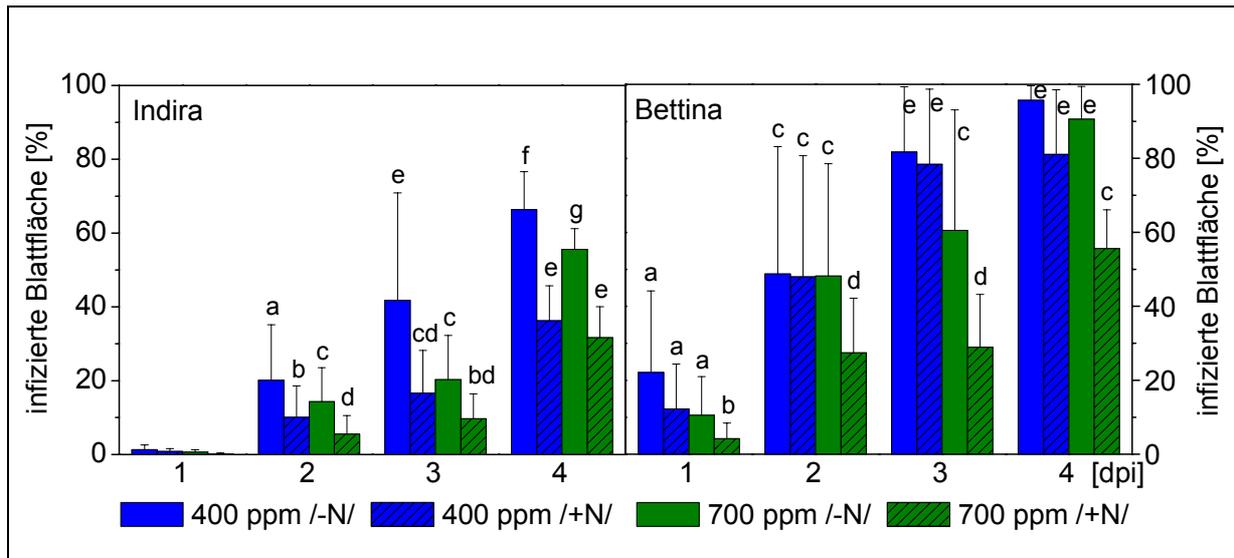


Abbildung 29: Zeitverlauf einer *A. solani* Infektion der Sorte Indira (links) und der Sorte Bettina (rechts). Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Eine Wiederholung setzt sich dabei aus den Boniturdaten von 50 Einzelblättern zusammen. Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

3.2 Bildung von Ethylen nach Behandlung der Pflanzen mit *Phytophthora infestans*

Eine Induktion der Ethylenbiosynthese als frühe pflanzliche Antwort auf biotische (Konkurrenz, Herbivorie, Pathogenbefall) sowie abiotische (Wassermangel, Schwermetalle, Strahlung, Luftschadstoffe) Faktoren wurde in der Literatur häufig beschrieben (ABELES *et al.* 1992, MORGAN und DREW 1997). Aufgrund dieser Befunde sollte der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Ethylenemission während einer *P. infestans* Infektion untersucht werden. Die Ethylenemission wurde an der Endfieder und den zwei ersten Seitenfiedern eines Fiederblatts der Sorte Indira bestimmt. Die Ernte des Blattmaterials erfolgte nach fünf Wochen Wachstum der Pflanzen unter zwei verschiedenen CO₂-Konzentrationen. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N versorgt. Nach der Ernte wurden die Blätter mit einer Sporensuspension von *P. infestans* [10⁴ Sporen/ml] inokuliert und in luftdichten Küvetten in Klimakammern kultiviert. Die Bonitur der Blätter erfolgte wie unter 3.1 beschrieben. Die Ergebnisse der Bonitur waren identisch mit den Ergebnissen des ersten Versuchs und werden somit nicht gesondert dargestellt (vgl. 3.1). Deutlich ist in Abbildung 30 die Abhängigkeit der Ethylenemission vom Pathogenbefall zu erkennen. Mit Zunahme des Befalls steigt die Ethylenemission deutlich an. Ebenso korreliert die Ethylenemission der Blätter innerhalb der unterschiedlichen Varianten

mit dem Befall durch *P. infestans*. Pflanzen, die mit einer erhöhten N-Gabe versorgt wurden, waren gegenüber *P. infestans* anfälliger und emittieren mehr Ethylen. Dies konnte sowohl bei den Pflanzen, die unter 400 ppm CO₂, als auch bei Pflanzen, die unter 700 ppm CO₂ aufwuchsen, festgestellt werden. Pflanzen, die unter Hoch-CO₂ aufgezogen wurden, waren wiederum weniger anfällig gegenüber *P. infestans* als solche, die unter ambienten Bedingungen aufwuchsen. Auch hier korrelierte die Ethylenemission mit der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans*. Signifikante Unterschiede an Tag 3 nach Inokulation konnten allerdings nur zwischen der Variante 400 ppm CO₂/+N/ und 700 ppm CO₂/-N/ gemessen werden. An Tag 4 nach Inokulation nahm die Ethylenemission der Blätter der Niedrig-CO₂-Variante wieder ab (Abbildung 30).

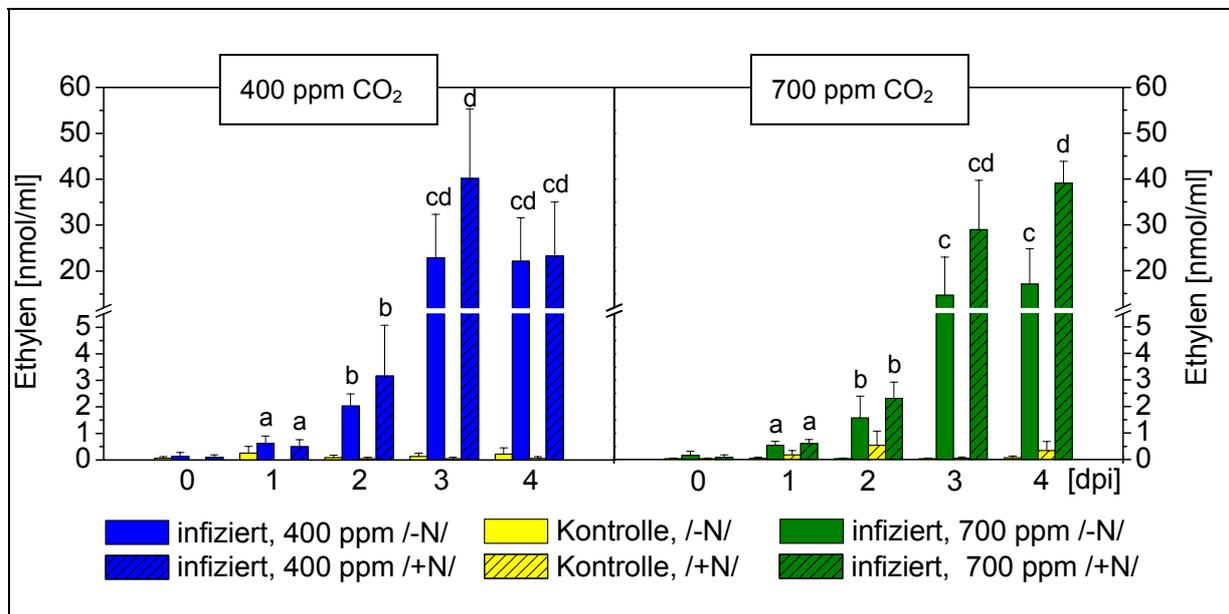


Abbildung 30: Zeitverlauf der Ethylenemission [nmol/ml] der Sorte Indira während einer Infektion mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden über fünf Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 6). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

3.3 Induktion von PR-Proteinen nach Pathogenbehandlung

PR-Proteine (pathogenesis related proteins) kommen in gesunden Pflanzen nicht oder nur in geringen Mengen vor und werden durch Pathogenbefall oder andere Stresssituationen induziert (VAN LOON und VAN STRIEN 1999). Daher sollte geprüft werden, ob ein Befall der Blätter mit *P. infestans* oder *A. solani* eine Induktion von PR-Proteinen auslöst und welchen Einfluss CO₂ und Stickstoff auf die Induktion der PR-Proteine ausüben. Die PR-Protein-Familien der Chitinasen und β -1,3-Glucanasen wurden mittels eines Enzymaktivitätstest bestimmt, das PR-Protein

Osmotin wurde anhand eines Western Blots detektiert. Dabei ging der Antikörper Pep2 eine spezifische Bindung mit vakuolärem Osmotin ein, der Antikörper PR-S markierte hingegen vakuoläres und extrazelluläres Osmotin. Neben den Enzymaktivitäten wurden auch die Proteingesamtgehalte in den Blattextrakten bestimmt. Die Proteingesamtgehalte dienen zur Berechnung der Enzymaktivität [U/mg Protein] und sind in Tabelle A-3 und A-4 des Anhangs dargestellt. Das Blattmaterial wurde wie beschrieben (vgl. 3), vorbehandelt und anschließend mit einer Sporensuspension von *P. infestans* oder *A. solani* [10^4 Sporen/ml] inokuliert. Die Kontrollblätter sowie die pathogenbehandelten Blätter wurden für fünf Tage in Klimakammern kultiviert.

3.3.1 Konstitutive Proteingesamtgehalte der Blätter

Die Proteingesamtgehalte wurden mittels des Bradford-Tests photometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 31 zu erkennen ist, erhöhen sich die konstitutiven Proteingesamtgehalte der Blätter der Sorte Indira durch eine zusätzliche N-Gabe während der Wachstumsphase der Pflanzen. Dies ist sowohl bei den Pflanzen, die unter ambienten CO₂-Verhältnissen als auch bei den Pflanzen, die unter einer erhöhten CO₂-Konzentration aufwachsen, zu beobachten. Allerdings ist die Zunahme an Proteinen in den Blättern der Pflanzen, die unter ambienten CO₂ aufwachsen größer. Dies liegt daran, dass sich durch eine erhöhte CO₂-Konzentration ebenfalls die konstitutiven Proteingesamtgehalte der Blätter der Sorte Indira erhöhten. Im Gegensatz dazu sind bei der Sorte Bettina keine signifikanten Unterschiede im Proteingehalt der Blätter der verschiedenen Behandlungsvarianten zu beobachten. (Abbildung 31). Die Gesamtproteingehalte der Sorten Indira und Bettina nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* oder *A. solani* können dem Anhang (Tabelle-A 6, Tabelle-A 7) entnommen werden.

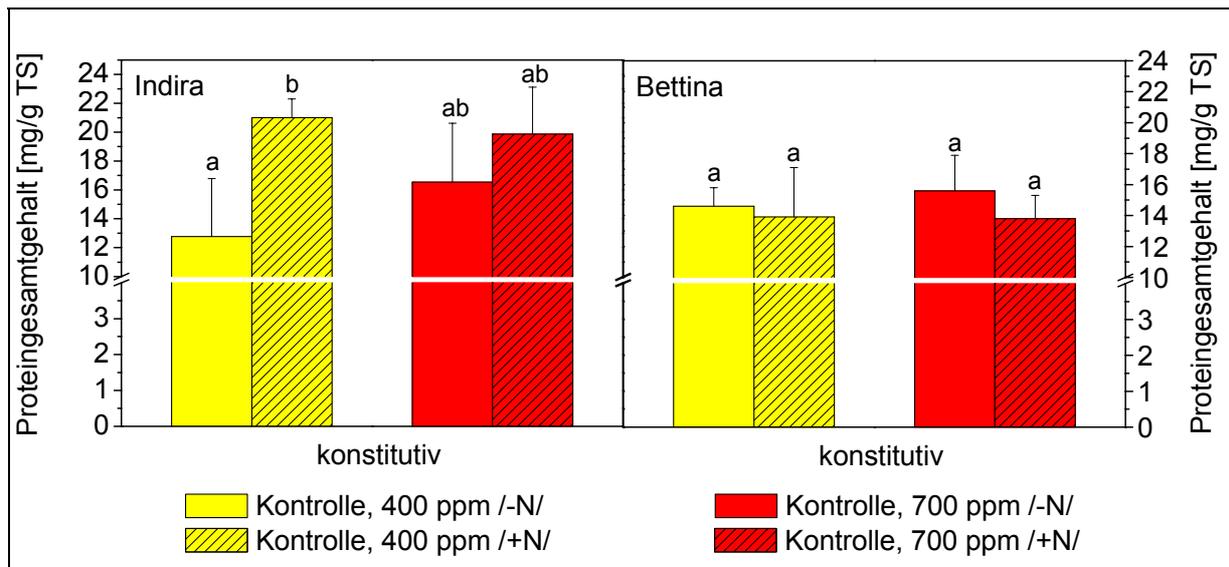


Abbildung 31: Konstitutive Proteingehalte der Blätter der Sorte Indira und Bettina. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm CO₂ oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

3.3.2 Induktion des PR-Proteins Osmotin nach Pathogenbehandlung

Die Untersuchung der Induktion des Gehalts von Osmotin wurde an den Kartoffelblättern der Sorte Indira mit Hilfe der bereits beschriebenen detached-leaf-Tests durchgeführt (vgl. 3.1). Für die Gewinnung der Blattextrakte wurden Blätter der zweiten und dritten Blattetage einer Pflanze herangezogen, die wie beschrieben (vgl. 3) behandelt wurden. Dabei bestand der Blattextrakt einer Probe aus Blattextrakten einer Mischprobe von je vier Wiederholungen, die wiederum aus den Blättern von sechs Einzelpflanzen bestanden. Da es sich bei den in Abbildung 32 aufgeführten Werten um Mischproben handelt, konnten keine Standardabweichungen berechnet werden. Der konstitutive Gehalt sowie die Induktion des Gehalts des PR-Proteins ein und drei Tage nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* und *A. solani* wurde mittels Western-Blot nachgewiesen. Der Antikörper PR-S markierte dabei das vakuoläre wie auch extrazelluläre Osmotin, der Antikörper Pep 2 hingegen reagierte spezifisch mit dem vakuolären Osmotin. Dargestellt ist die Bandenintensität mittels optischer Dichte.

3.3.2.1 Induktion von Osmotin während einer *Phytophthora infestans* Infektion

Eine Induktion des vakuolären Osmotins der Blätter, die mit CO₂ und N behandelt wurden, erfolgte erst drei Tage nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans*. Blätter der Variante 400 ppm -N/ zeigten keine Induktion des vakuolären Osmotins nach

Pathogenbehandlung. Deutlich nahm der Gehalt an Osmotin durch den Befall der Blätter mit *P. infestans* der Varianten 400 ppm /+N/, 700 ppm /-N/ und 700 ppm /+N/ zu. Die Messung des Gehalts an vakuolären und extrazellulären Osmotins drei Tage nach Inokulation ergab nur für die Variante 700 ppm /+N/ eine deutliche Induktion während einer *P. infestans* Infektion. Bei den anderen Varianten konnte an Tag 3 nach Inokulation nur eine geringfügige Zunahme des Osmotins beobachtet werden. Einen Tag nach Inokulation konnte nur bei der Variante 700 ppm /+N/ eine Induktion des Gehalts an vakuolären und extrazellulären Osmotin beobachtet werden. Konstitutiv besaßen die Blätter der Pflanzen der Variante 400 ppm /-N/ mehr an vakuolärem Osmotin als die Blätter der mit CO₂ und N behandelten Blätter.

Der konstitutive Gehalt an vakuolären und extrazellulären Osmotin in den Blättern der vier Behandlungsvarianten schwankte stark. Auffällig dabei war, dass die Blätter der unbehandelten Pflanzen (400 ppm /-N/) während des gesamten Beobachtungszeitraumes stetig die geringsten Mengen an vakuolären und extrazellulären Osmotin aufwiesen. Außerdem konnte beobachtet werden, dass an allen Untersuchungstagen der Osmotinsgehalt der 700ppm/-N/-Variante deutlich über dem Gehalt der 400ppm/-N/-Variante lag (Abbildung 32).

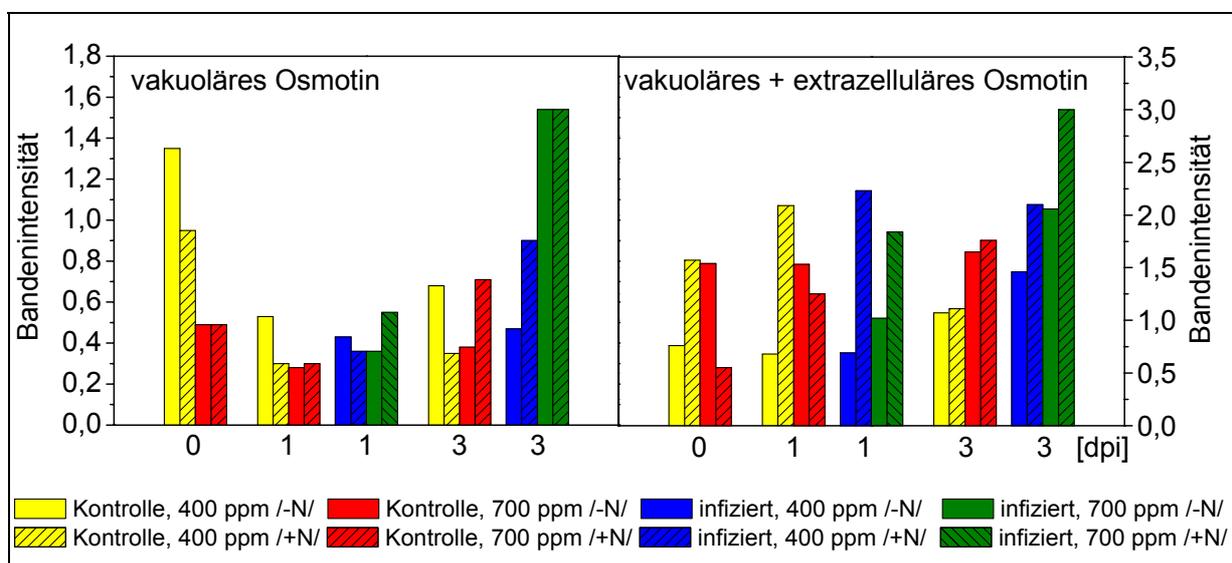


Abbildung 32: Osmotinsgehalte der Blätter der Sorte Indira während einer Infektion mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte von Mischproben aus je vier Wiederholungen. Die Bandenintensität wurde mittels der optischen Dichte bestimmt.

3.3.2.2 Induktion von Osmotin während einer *Alternaria solani* Infektion

Die Auswirkungen einer *A. solani* Infektion auf den Gehalt an Osmotin in Kartoffelblättern der unterschiedlichen Behandlungsvarianten (vgl. 3) wurden wie unter 3.3.2.1 beschrieben bestimmt. Die Bestimmung des konstitutiven Gehalts an vakuolärem Osmotin ergab weder Unterschiede zwischen den beiden Sorten noch zwischen den vier Behandlungsvarianten.

An Tag 1 nach Inokulation der Blätter mit *A. solani* konnte keine Induktion von Osmotin beobachtet werden. Erst an Tag 3 nach Inokulation war eine deutliche Steigerung des vakuolären Osmotingehalts in den Blättern der Sorte Bettina messbar. Die stärkste Bandenintensität konnte dabei bei der Variante 400 ppm /-N/ detektiert werden. Eine Behandlung der Pflanzen mit CO₂ und Stickstoff führte zu einer Abnahme des detektierbaren Osmotins in den Blättern der Sorte Bettina im Vergleich zur 400 ppm/-N/-Varinate. Diese beobachtete Induktion von Osmotin in den Blättern korreliert mit der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *A. solani*. Betrachtet man hingegen die Osmotingehalte der Sorte Indira drei Tage nach Inokulation kann nur eine geringe Induktion des Osmotingehalts beobachtet werden. Auch die Auswirkungen der unterschiedlichen Behandlungsvarianten der Pflanzen der Sorte Indira auf die Induktion von Osmotin während einer Infektion mit *A. solani* sind gering (Abbildung 33).

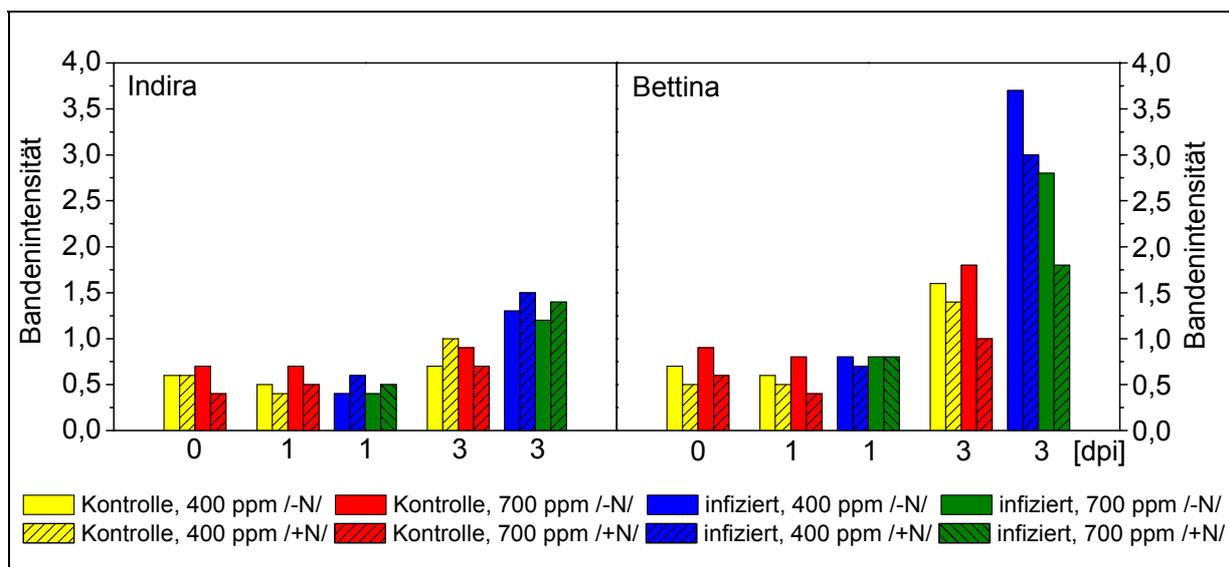


Abbildung 33: Zeitverlauf des Gehalts an vakuolärem Osmotin der Blätter der Sorten Indira (links) und Bettina (rechts) während einer *A. solani* Infektion. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. von Mischproben aus je vier Wiederholungen. Die Bandenintensität wurde mittels der optischen Dichte bestimmt.

3.3.3 Induktion der Chitinase-Aktivität während einer *Alternaria solani* Infektion

Eine Infektion der Blätter mit *A. solani* hatte deutliche Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms Chitinase. Während ein Tag nach Inokulation der Blätter noch keine Induktion zu erkennen ist, wurde die Chitinase-Aktivität an Tag 3 nach Inokulation der beiden Sorten signifikant erhöht, wobei die Induktion der Enzymaktivität der toleranteren Sorte Indira deutlich stärker ausfiel als die Induktion der anfälligeren Sorte Bettina. Ein signifikanter Einfluss einer erhöhten CO₂-Konzentration während der Vegetationszeit der Pflanzen auf die Induktion der Chitinase-Aktivität nach *A. solani* Infektion konnte hingegen bei beiden Sorten nicht beobachtet werden. Auffällig ist die enorme Aktivitätszunahme des Enzyms der Blätter der Sorte Indira nach Behandlung der Pflanzen mit einer erhöhten CO₂-Konzentration sowie einer erhöhten Stickstoffgabe. Diese beobachtete Aktivitätszunahme korreliert mit der Zunahme der Toleranz der Blätter gegenüber *A. solani*. Bei der anfälligeren Sorte Bettina ist diese Korrelation nicht zu beobachten. Die Chitinase-Aktivität nimmt hier mit der Anfälligkeit der Blätter zu, wobei der Einfluss der Stickstoffkonzentration auf die Hoch-CO₂-Variante nur tendenziell zu beobachten ist. In den konstitutiven Gehalten der beiden Sorten sowie der vier Behandlungsvarianten konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden (Abbildung 34).

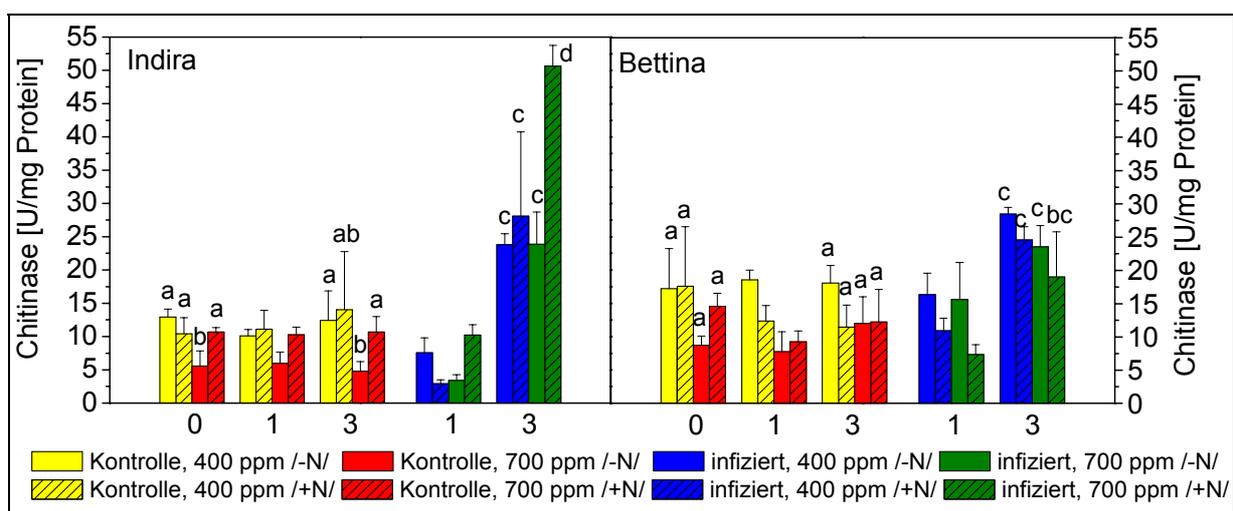


Abbildung 34: Zeitverlauf der Chitinase-Aktivität der Blätter der Sorten Indira und Bettina während einer *A. solani* Infektion. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05). Signifikanzen wurden nur für die konstitutiven Werte und die Werte an Tag 3 nach Inokulation berechnet.

3.3.4 Induktion der Glukanase-Aktivität während einer *Alternaria solani* Infektion

Wie bei der Chitinase-Aktivität der Blätter während einer *A. solani* Infektion, steigt auch die Aktivität des PR-Proteins β 1,3-Glukanase nach Inokulation der Blätter mit *A. solani*. Dieser Effekt ist allerdings nur bei der Sorte Bettina drei Tage nach Inokulation messbar. An Tag 1 nach Inokulation ist wie auch bei der Chitinase-Aktivität (vgl. 3.3.3) bei beiden Sorten kein signifikanter Anstieg der Glukanase-Aktivität zu messen. Eine Behandlung der Pflanzen mit CO₂ und Stickstoff hatte dabei an Tag 3 nach Inokulation eine Abnahme der Glukanase-Aktivität in den Blättern der Sorte Bettina zur Folge. Die Glukanase-Aktivität der Blätter korreliert mit der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *A. solani*. Ein Vergleich der konstitutiven Glukanase-Aktivität der beiden Sorten sowie der vier Behandlungsvarianten ergibt keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 35).

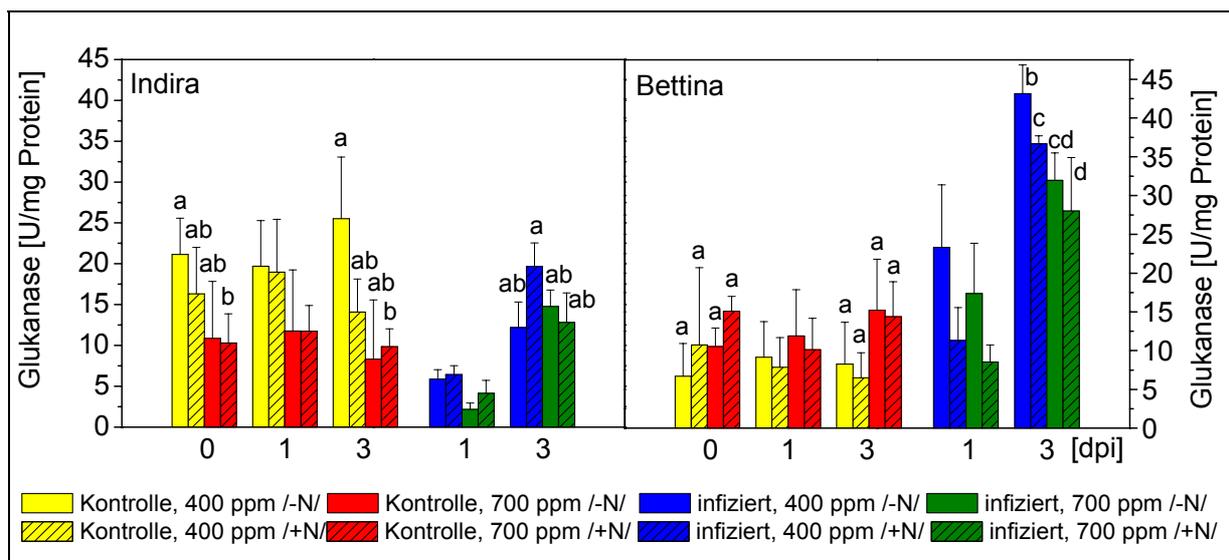


Abbildung 35: Zeitverlauf der Glukanase-Aktivität der Blätter der Sorten Indira und Bettina während einer *A. solani* Infektion. Die Pflanzen wurden jeweils mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ über vier Wochen behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N (+N) gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05). Signifikanzen wurden nur für die konstitutiven Werte und die Werte an Tag 3 nach Inokulation berechnet.

3.4 Untersuchungen zum Phenylpropanoidmuster der Blätter nach Pathogenbehandlung

Nach MARGNA (1977) kommt es bei einem hohem Angebot an mineralischem Stickstoff zu einer Bevorzugung des Primärstoffwechsels. JONASSAN *et al.* (1986) beobachteten in mehreren Pflanzen eine negative Korrelation zwischen der

Phenolsynthese und der Versorgung der Pflanzen mit Stickstoff. Weiterhin finden sich Angaben in der Literatur über eine gesteigerte Anfälligkeit von Pflanzen gegenüber Pathogenen durch eine Abnahme des Phenolgehalts (YAO *et al.* 1995). Daher sollte der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf das Phenylpropanoidmuster von Kartoffelpflanzen geprüft, und ein möglicher Zusammenhang mit dem Resistenzverhalten von Kartoffel gegenüber *P. infestans* und *A. solani* aufgezeigt werden.

3.4.1 Das Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer *Phytophthora infestans* Infektion

Die Untersuchung des Phenylpropanoidmusters der Blätter der unterschiedlichen Behandlungsvarianten während einer *P. infestans* Infektion wurde analog dem unter 1.2.2 beschriebenen Ansatz durchgeführt.

Nach Kultivierung der Pflanzen der Sorte Indira unter erhöhter CO₂-Konzentration war keine signifikante Veränderung im konstitutiven Gehalt an Phenylpropanoiden der Blätter zu beobachten. Signifikant veränderte Phenylpropanoidgehalte konnten nur durch eine zusätzliche N-Düngung der Pflanzen beobachtet werden. Eine N-Gabe von 0,8 g N/Pflanze senkte dabei den Gesamtgehalt an Phenylpropanoiden von $9,2 \pm 0,5$ mg/g TS auf $5,8 \pm 1,3$ mg/g TS der Niedrig-CO₂-Variante und von $8,7 \pm 0,5$ mg/g TS auf $6,9 \pm 0,2$ der Hoch-CO₂-Variante. Im Metabolitprofil der Phenylpropanoide konnten in den Blättern nach Kultivierung mit erhöhter N-Gabe sowohl Verbindungen mit geänderten als auch unveränderten Gehalten beobachtet werden. Dabei veränderte sich der Gehalt an Rutin nicht, die Gehalte an Hydroxycimtsäuren, Chlorogensäuren, Kryptochlorogensäuren und Flavonolen nahmen signifikant ab, wobei der Gehalt an Flavonolen am stärksten reduziert wurde (vgl. Anhang, Tabelle-A 2). Nach Infektion der Blätter mit *P. infestans* konnte keine Induktion des Gesamtphenylpropanoidgehalts in allen Behandlungsvarianten beobachtet werden. Die Gehalte an Phenylpropanoiden während einer *P. infestans* Infektion glichen denen des Probenahmetages (Abbildung 36). Eine Veränderung des Metabolitprofils der Phenylpropanoide aller Behandlungsvarianten konnte durch eine *P. infestans* Infektion ebenfalls nicht ausgelöst werden (vgl. Anhang, Tabelle-A 2).

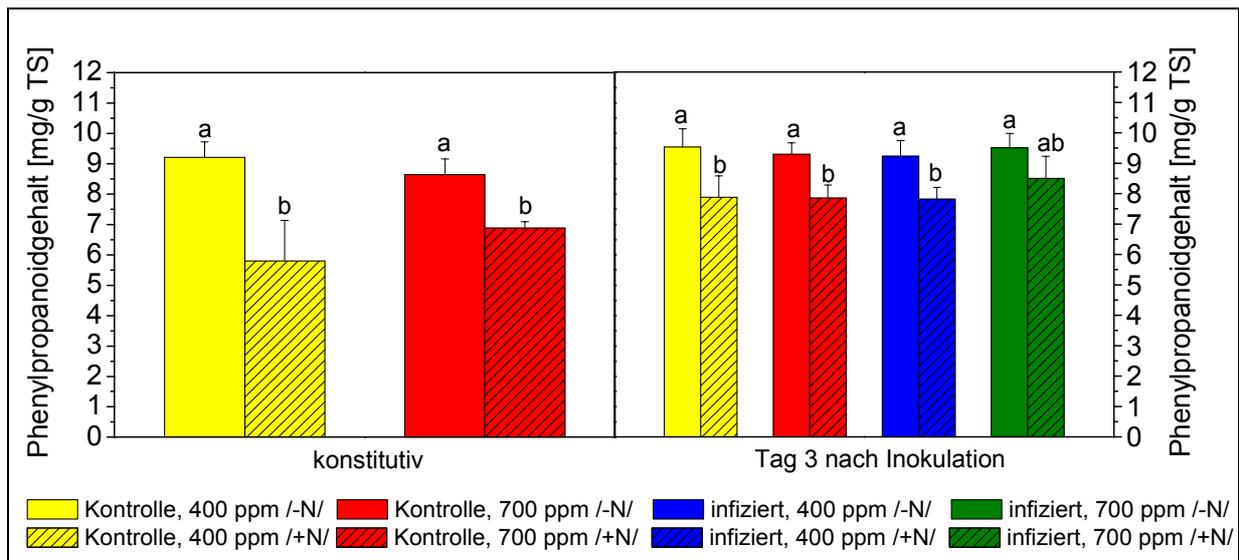


Abbildung 36: Phenylpropanoidgehalte [mg/g TS] von Kontrollblättern sowie pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira konstitutiv und drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Ein Einfluss der Stickstoffkonzentration und der CO₂-Konzentration auf den Gehalt an phenolischen Verbindungen konnte insbesondere für zwei bislang nicht identifizierte Verbindungen beobachtet werden. Wie schon unter 1.2.2 beschrieben, konnten diese durch eine Infektion mit *P. infestans* induzierbaren Verbindungen in Zusammenarbeit mit Prof. Treutter und Dr. Heller als *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin identifiziert werden. Diese im Blatt nach *P. infestans* Infektion detektierbaren phenolischen Verbindungen wurden durch eine CO₂-Behandlung der Pflanzen von 700 ppm in den Blättern weniger stark induziert als in den Blättern, die keiner erhöhten CO₂-Exposition ausgesetzt waren. *p*-Cumaroyloctopamin wurde dabei deutlich stärker induziert als *p*-Cumaroylnoradrenalin. Ein Einfluss der Stickstoffkonzentration auf die Induzierbarkeit von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin konnte nicht beobachtet werden. In den Blättern der Kontrollpflanzen konnten *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin nicht detektiert werden und wurden deshalb nicht aufgetragen (Abbildung 37).

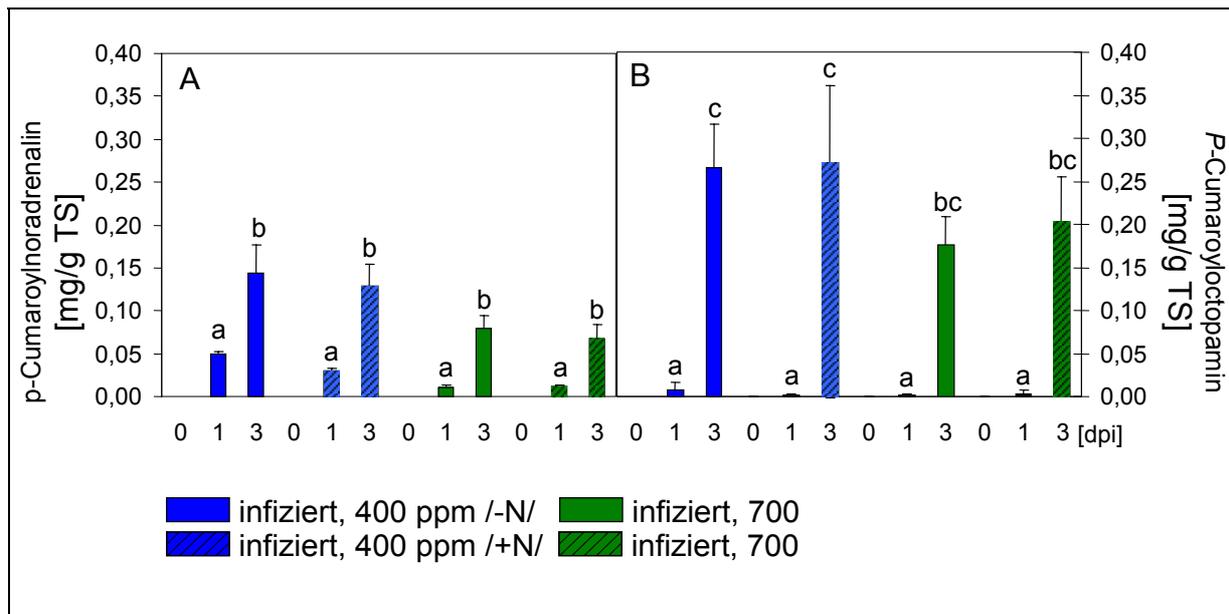


Abbildung 37: Zeitlicher Verlauf der Gehalte an *p*-Cumaroylnoradrenalin (A) und *p*-Cumaroyloctopamin (B) von Kartoffelblättern der Sorte Indira während einer Infektion mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

3.4.2 Das Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer *Alternaria solani* Infektion

Die Untersuchung des Phenylpropanoidmusters der Blätter der unterschiedlichen Behandlungsvarianten während einer *A. solani* Infektion wurde ebenfalls analog dem unter 1.2.2 beschriebenen Ansatz durchgeführt.

Nach Kultivierung der Pflanzen der Sorten Indira und Bettina unter erhöhtem CO₂ konnte keine signifikante Veränderung der konstitutiven Gehalte an Phenylpropanoiden der Sorte Indira sowie der Sorte Bettina beobachtet werden. Eine zusätzliche N-Düngung der Pflanzen verringerte die Phenylpropanoidgehalte in den Blättern der Sorte Indira wie auch der Sorte Bettina hingegen signifikant. Dieses Ergebnis entspricht somit dem unter 3.4.1 nur für die Sorte Indira beschriebenen Ergebniss. Im Metabolitprofil der Phenylpropanoide der Blätter konnten nach Kultivierung mit erhöhter N-Gabe sowohl Verbindungen mit veränderten als auch unveränderten Gehalten beobachtet werden. Dabei veränderte sich der Gehalt an Rutin in beiden Sorten nicht, die Gehalte an Hydroxycimtsäuren, Chlorogensäuren, Kryptochlorogensäuren und Flavonolen nahmen hingegen signifikant ab, wobei der Gehalt an Flavonolen am stärksten reduziert wurde (vgl. Anhang, Tabelle-A 3, Tabelle-A 4). Eine Behandlung der Blätter mit *A. solani* hatte drei Tage nach

Inokulation eine Veränderung der Phenylpropanoide der Blätter der Niedrig-N-Varianten zur Folge. Der Phenylpropanoidgesamtgehalt der Blätter der Niedrig-N-Varianten der Sorte Indira und der Sorte Bettina wurde durch eine *A. solani* Infektion an Tag 3 nach Inokulation induziert, doch unterscheiden sich die Werte nicht signifikant. Die Gehalte an Phenylpropanoiden der Blätter der Hoch-N-Varianten veränderten sich durch eine *A. solani* Infektion gegenüber den Kontrollblättern nicht signifikant (Abbildung 38).

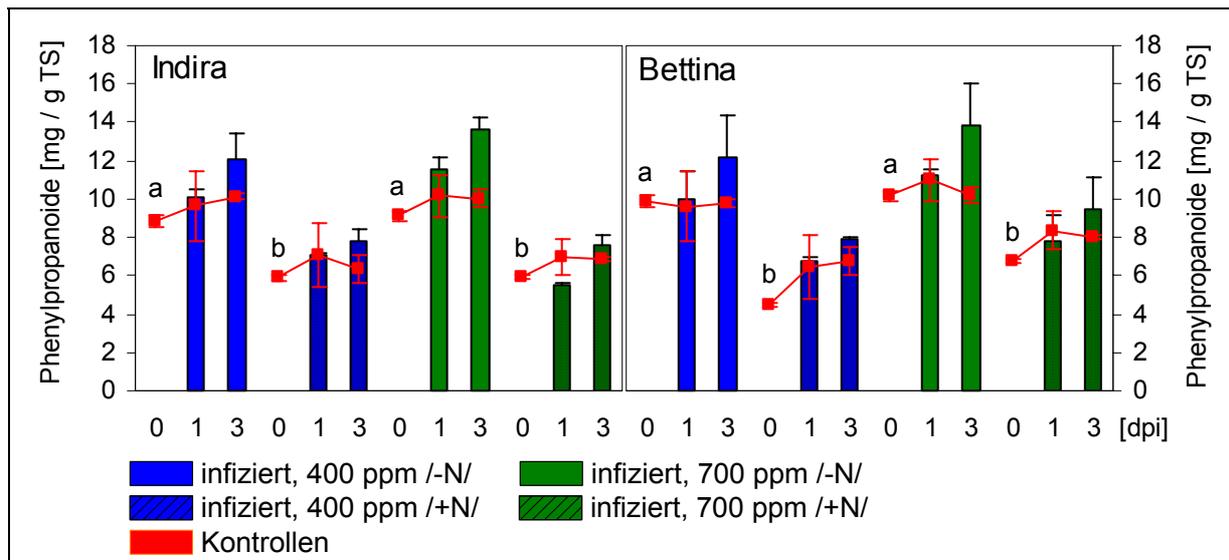


Abbildung 38: Phenylpropanoide [mg/g TS] von Kontrollblättern sowie pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira und Bettina konstitutiv sowie ein und drei Tage nach Inokulation mit *A. solani*. Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05). Signifikanzen wurden dabei zwischen den konstitutiven Werten an Tag 0 berechnet

Ein Einfluss der N-Konzentration und der CO₂-Konzentration auf den Gehalt an phenolischen Verbindungen konnte wiederum insbesondere für *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin beobachtet werden. Diese im Blatt auch nach *P. infestans* Infektion nachweisbaren phenolischen Verbindungen wurden ebenfalls nach einer *A. solani* Infektion detektiert. In den Blättern der Pflanzen, die über vier Wochen einer CO₂-Behandlung von 700 ppm ausgesetzt waren, wurden *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin weniger stark induziert als in den Blättern, die keiner CO₂-Exposition ausgesetzt waren.

p-Cumaroylnoradrenalin wurde dabei deutlich stärker induziert als *p*-Cumaroyloctopamin. Dies steht im Gegensatz zu der Induktion der beiden Substanzen durch eine *P. infestans* Infektion. Hier wurde *p*-Cumaroyloctopamin stärker induziert als *p*-Cumaroylnoradrenalin. Ein Einfluss der Stickstoffkonzentration

auf die Induzierbarkeit von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin während einer *A. solani* Infektion konnte ebenfalls, wie auch schon während einer *P. infestans* Infektion, nicht beobachtet werden. Werte der Kontrollblätter wurden nicht aufgetragen, da *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin konstitutiv nicht detektiert werden konnten (Abbildung 37).

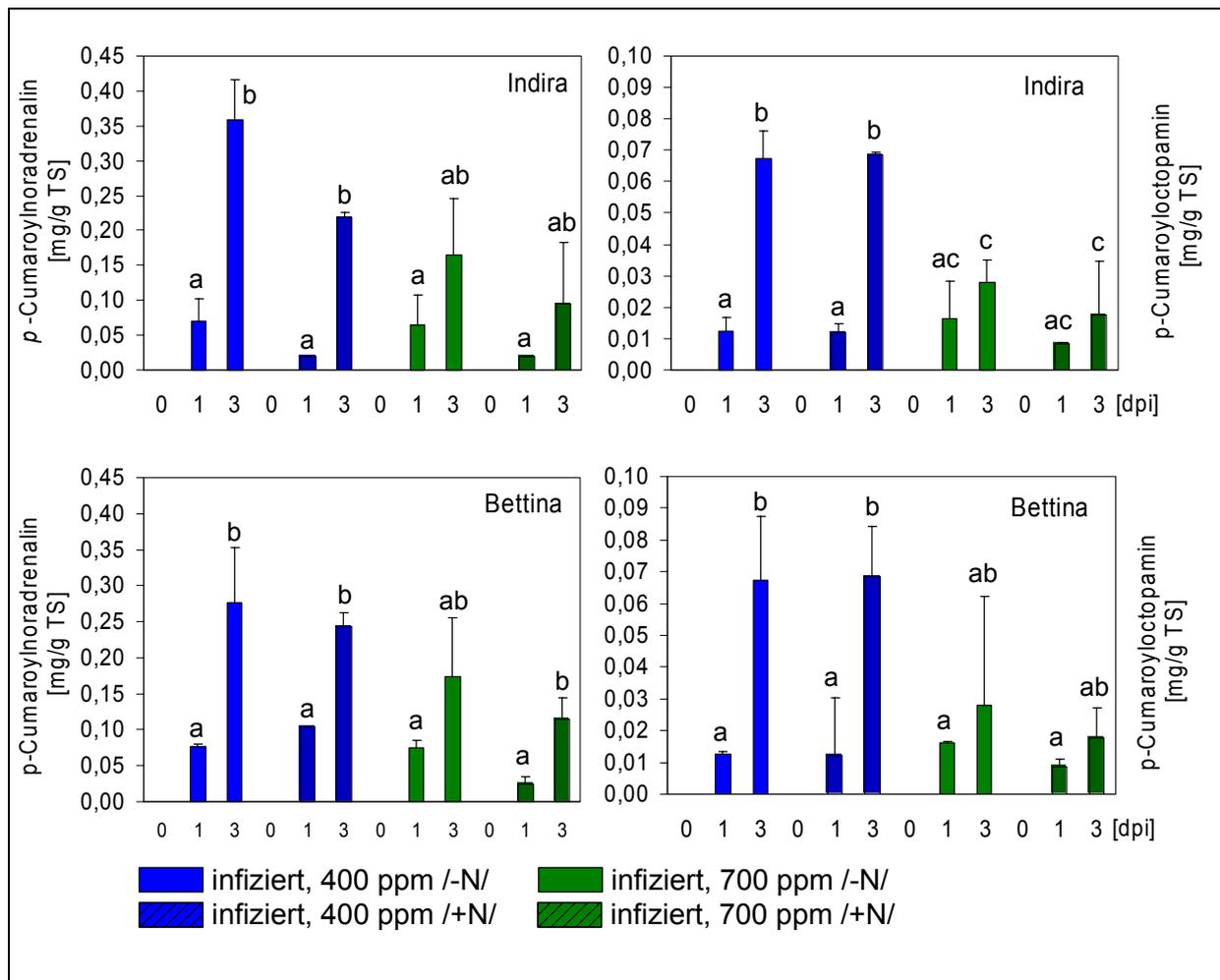


Abbildung 39: Zeitlicher Verlauf der Gehalte an *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin von Kartoffelblättern der Sorte Indira und Bettina während einer Infektion mit *A. solani*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

3.5 Akkumulation der Divinylether während der Ausprägung von Blattschäden

Nach GÖBEL *et al.* (2001) akkumulieren nach Pathogenbefall in Blättern von *S. tuberosum* die Transkripte der 9-Lipidperoxidase (LOX) und der 13-LOX, wobei die 9-LOX-Aktivität bevorzugt stimuliert wird. Zur Untersuchung der Bedeutung von

9-LOX-Metaboliten während der Ausprägung von Blattnekrosen in *S. tuberosum* sollte eine Analyse der Oxylipine Colnelensäure (CnA) und Colnelsäure (CA) nach Behandlung mit *P. infestans* und *A. solani* erfolgen und gleichzeitig der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Akkumulation dieser Verbindungen analysiert werden. Den Divinylethern CnA und CA wird eine fungitoxische Wirkung zugeschrieben (WEBER *et al.* 1999).

3.5.1 Akkumulation der Divinylether während einer *Phytophthora infestans* Infektion

Die Divinylether CnA und CA konnten in den Kartoffelblättern der mit CO₂ und Stickstoff behandelten Pflanzen der Sorte Indira nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied der konstitutiven Gehalte in den Blättern der verschiedenen Behandlungsvarianten der Pflanzen war nicht messbar. Nach Pathogenbefall konnte eine Akkumulation der Divinylether beobachtet werden. Der Gehalt an CnA und CA stieg in der 400 ppm/-N/-Variante drei Tage nach Inokulation von $0,6 \pm 0,1$ auf $3,8 \pm 0,4$ nmol/g TS (Abbildung 40). Wurden die Pflanzen während des Wachstums mit 0,8 g N gedüngt, stieg der Gehalt der Divinylether während einer *P. infestans* Infektion auf $5,7 \pm 1,2$ nmol/g TS. Nach einer vierwöchigen CO₂-Exposition der Pflanzen von 700 ppm konnte nur noch eine Zunahme auf $1,9 \pm 0,4$ nmol/g TS verzeichnet werden. Auch bei der Hoch-CO₂-Variante konnte eine zusätzliche N-Gabe die Akkumulation der Divinylether während einer Infektion stimulieren (Abbildung 40). Dabei liegen bei allen Varianten die Divinylether in einem Verhältnis von 2:1 (CnA : CA) vor. Die Kontrollblätter aller Varianten enthielten von beiden Verbindungen (CA + CnA) durchschnittlich 0,5 nmol/g TS.

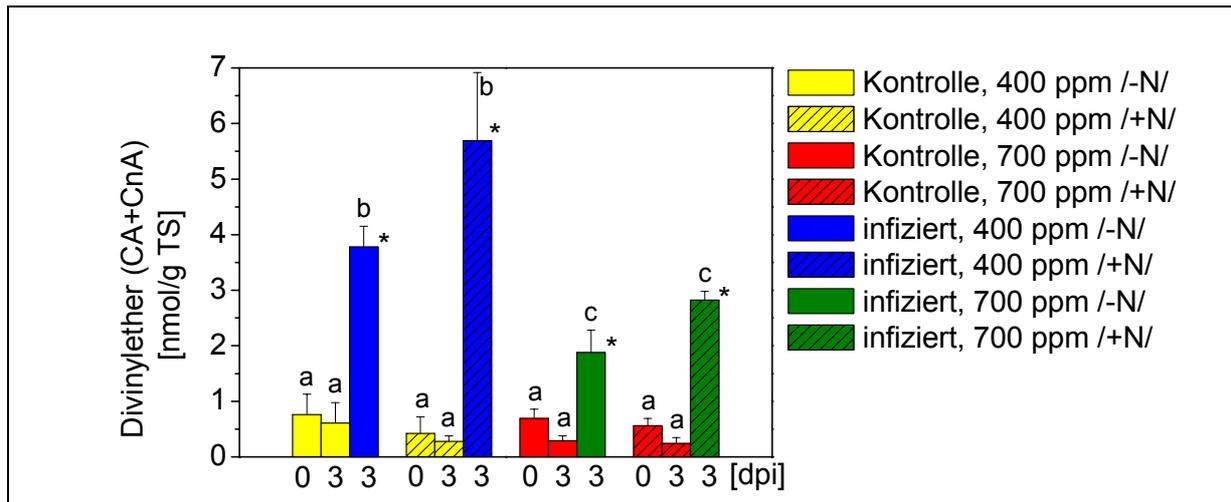


Abbildung 40: Divinylether (CA+CnA) [nmol/g TS] von Kontrollblättern sowie pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira konstitutiv und drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05). * weisen dabei auf eine signifikante Induktion an Tag 3 nach Inokulation hin.

3.5.2 Akkumulation der Divinylether während einer *Alternaria solani* Infektion

Zur Beurteilung der Relevanz von Divinylethern in der Pathogenabwehr wurden die Divinylether CnA und CA auch in Blättern während einer Infektion mit *A. solani* bestimmt. Um einen Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Akkumulation der Divinylether während einer *A. solani* Infektion feststellen zu können, wurden Pflanzen der Sorte Indira und Bettina ebenfalls über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Während die Behandlung der Pflanzen mit CO₂ und Stickstoff keine signifikanten Auswirkungen auf die konstitutiven Gehalte an Divinylethern hatte, konnten doch Unterschiede bei der Induktion der Divinylether während einer *A. solani* Infektion bei den unterschiedlich vorbehandelten Blättern beobachtet werden (Abbildung 41). CO₂-behandelte (700 ppm) Blätter der Sorte Indira akkumulierten signifikant weniger Divinylether in den Blättern während einer *A. solani* Infektion als die Blätter, die nicht unter einer erhöhten CO₂-Konzentration aufwuchsen. Ein Einfluss der Stickstoffdüngung auf die Anreicherung von CnA und CA in den Blättern der Sorte Indira nach Inokulation mit *A. solani* ist tendenziell erkennbar, konnte aber nicht signifikant nachgewiesen werden. In den Blättern der Sorte Bettina akkumulierten die Divinylether ebenfalls nach Pathogenbefall. Dabei ist allerdings kein signifikanter

Unterschied zwischen den Blättern der unterschiedlichen Behandlungsvarianten zu erkennen, mit Ausnahme der Variante 700 ppm /+N/, bei der die Infektion mit *A. solani* zu einer geringeren Induktion der Divinylether in den Blättern führte (Abbildung 41).

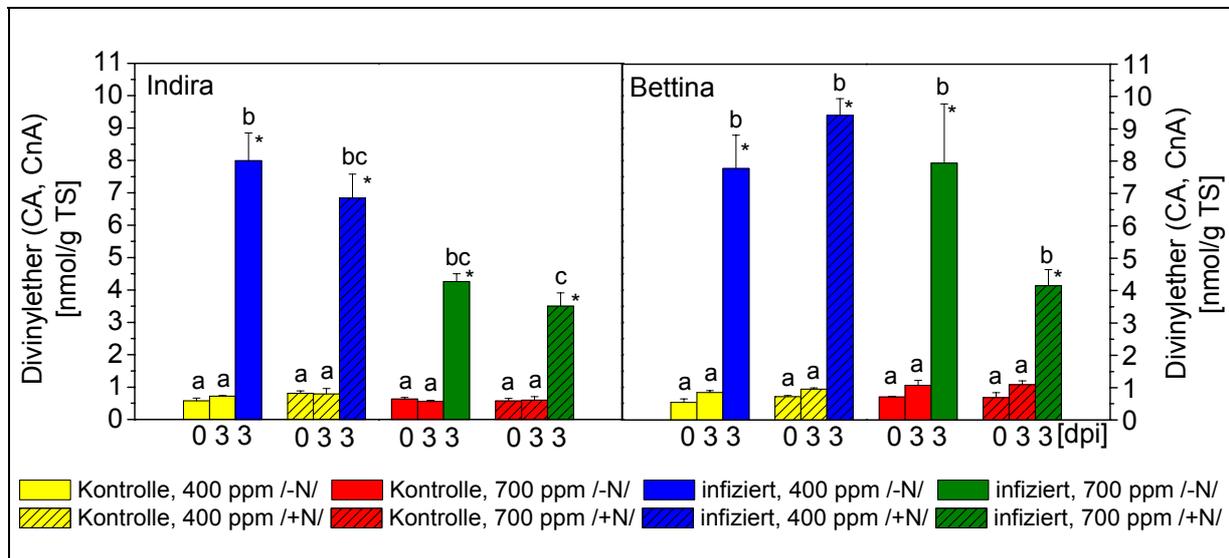


Abbildung 41: Divinylether (CA+CnA) [nmol/g TS] von Kontrollblättern sowie pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira und Bettina konstitutiv und drei Tage nach Inokulation mit *A. solani*. Die Pflanzen wurden über vier Wochen mit 400 ppm oder 700 ppm CO₂ behandelt. Gleichzeitig wurde ein Teil der Pflanzen mit 0,8 g N versorgt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 4). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05). * weisen dabei auf eine signifikante Induktion an Tag 3 hin.

4 Untersuchungen zum Primärstoffwechsel von Kartoffelpflanzen unter variiertes Stickstoffversorgung im Freiland



Ziel des Freilandversuches war, die Übertragbarkeit der unter Klimakammer- und Gewächshausbedingungen gefundenen Effekte eines geänderten C/N-Verhältnisses in den Kartoffelpflanzen auf die Reaktionslage gegenüber *P. infestans* unter Freilandbedingungen zu evaluieren.

Abbildung 42: Feldanlage des Freilandversuchs 2002 am Kieswasch bei Freising

Dazu wurden die beiden im Gewächshaus verwendeten Sorten Indira und Bettina im Freiland angepflanzt und mit zwei Stickstoffstufen (60 kg N/ha und 160 kg N/ha) gedüngt. Jede Variante war als Parzelle mit je 124 Einzelpflanzen je fünfmal auf dem

Feld vorhanden ($n = 5$) (siehe Anhang, Abb. A-1). Die Blätter wurden zum Zeitpunkt des Bestandesschlusses, ca. sechs Wochen nach dem Auflaufen, kurz vor einer natürlichen *P. infestans* Infektion, von zwei Blattetagen geerntet.

4.1 Einfluss von Stickstoff auf die Biomasse der Pflanzen im Freiland

Zur Untersuchung des Einflusses von Stickstoff auf die Biomasseproduktion der Pflanzen im Freiland, wurde die oberirdische Biomasse sowie der Ertrag nach fünf Monaten Wachstum der Sorten Indira und Bettina bestimmt.

4.1.1 Oberirdische Biomasse und Knollenmasse

Zur Charakterisierung des N-Effekts im Freiland auf die oberirdische Biomasse der Kartoffelsorten Indira und Bettina wurden die Bestandeshöhe und die Anzahl der Austriebe pro Pflanze bestimmt. Hierbei konnte kein signifikanter Zuwachs der Höhe der Pflanzen mit 160 kg N/ha gegenüber der Variante mit 60 kg N/ha gemessen werden. Tendenziell waren die Pflanzen mit erhöhter N-Versorgung höher als die Pflanzen, die mit weniger Stickstoff behandelt wurden. Auch im Ertrag war kein signifikanter Anstieg messbar. Wiederum war ein tendenziell höherer Ertrag durch erhöhte N-Zufuhr gegeben. Deutlich aber unterschieden sich die beiden Sorten in ihrem Ertrag (Abbildung 43). Die Sorte Bettina erbrachte um 40 % mehr Ertrag als die Sorte Indira.

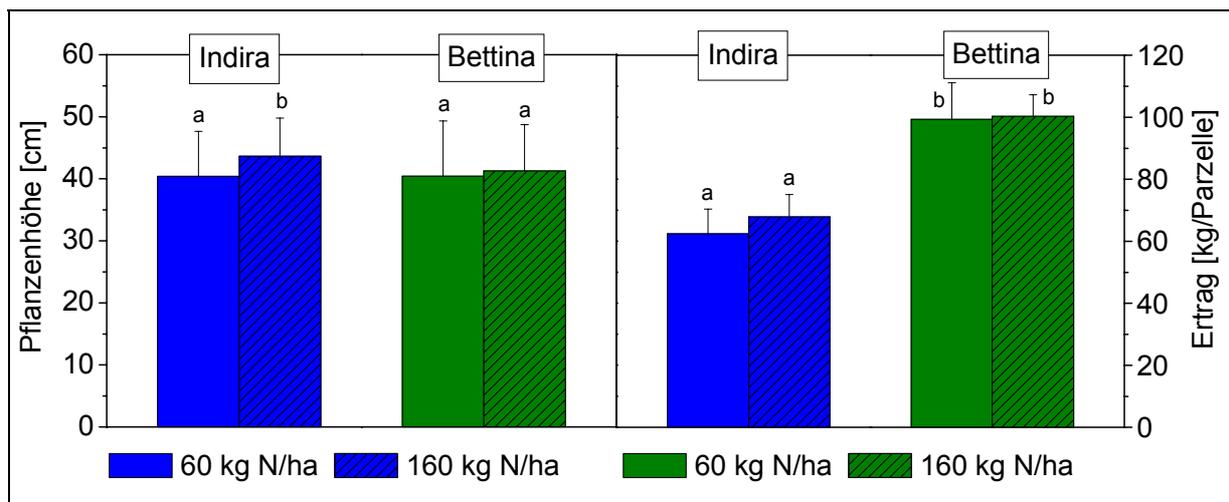


Abbildung 43: Pflanzenhöhe [cm] als Parameter der oberirdischen Biomasse (links) und Ertrag [kg/Parzelle] der Kartoffelsorten Indira und Bettina im Freiland des Versuchsjahres 2002. Die eine Hälfte der Pflanzen wurde mit 60 kg N/ha gedüngt, die andere mit 160 kg N/ha. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte der Pflanzenhöhe oder des Ertrags mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

4.2 Einfluss von Stickstoff auf biochemische Parameter der Pflanzen im Freiland

Zur Untersuchung des Einflusses von Stickstoff auf biochemische Parameter des Primärstoffwechsels der Pflanzen des Freilands wurden Blätter der mit Stickstoff behandelten Pflanzen (vgl. 4.1) nach sechs Wochen Wachstum geerntet. Dabei wurden Blätter der zweiten und dritten Blatttage (= junge Blätter) und Blätter der fünften und sechsten Blatttage (= alte Blätter) für die Untersuchungen herangezogen. Die folgenden Ergebnisse setzen sich aus fünf Wiederholungen (n = 5) zusammen, wobei eine Wiederholung aus Einzelblättern von 10-12 Pflanzen einer Parzelle bestand.

4.2.1 Stärkegehalte der Kartoffelblätter und Knollen

Die Stärkegehalte der Blätter der Sorte Indira und Bettina wurden photometrisch bestimmt (vgl. II.2.3.4.1.). Betrachtet man die konstitutiven Gehalte an Stärke der jungen und alten Blätter einer Pflanze fällt auf, dass die Sorte Indira in den alten Blättern deutlich mehr Stärke akkumuliert als in den jungen Blättern und dies bei der Sorte Bettina gegenläufig ist. Hier akkumuliert in den alten Blättern deutlich weniger Stärke als in den jungen Blättern. Außerdem ist festzustellen, dass durch eine erhöhte N-Gabe die Stärkeakkumulation in den Blättern zurückgeht. Dieses Ergebnis konnte auch bei der Sorte Indira während der Gewächshausversuche (vgl. 2.2) gezeigt werden. Dieser Effekt ist allerdings nicht bei den Varianten Indira/junge Blätter und Bettina/alte Blätter des Freilandversuchs zu erkennen. Die ermittelten Stärkegehalte liegen hier knapp über der Nachweisgrenze und lassen so keine Unterschiede erkennen.

Betrachtet man die Stärkeanreicherung nach Pathogenbefall, wird eine deutliche Zunahme des Stärkegehalts in den jungen Blättern der beiden Sorten sichtbar. Wiederum ist auch bei den infizierten Blattproben meist ein leichter Rückgang der Stärkeakkumulation durch eine Erhöhung der N-Gabe zu erkennen (Abbildung 44).

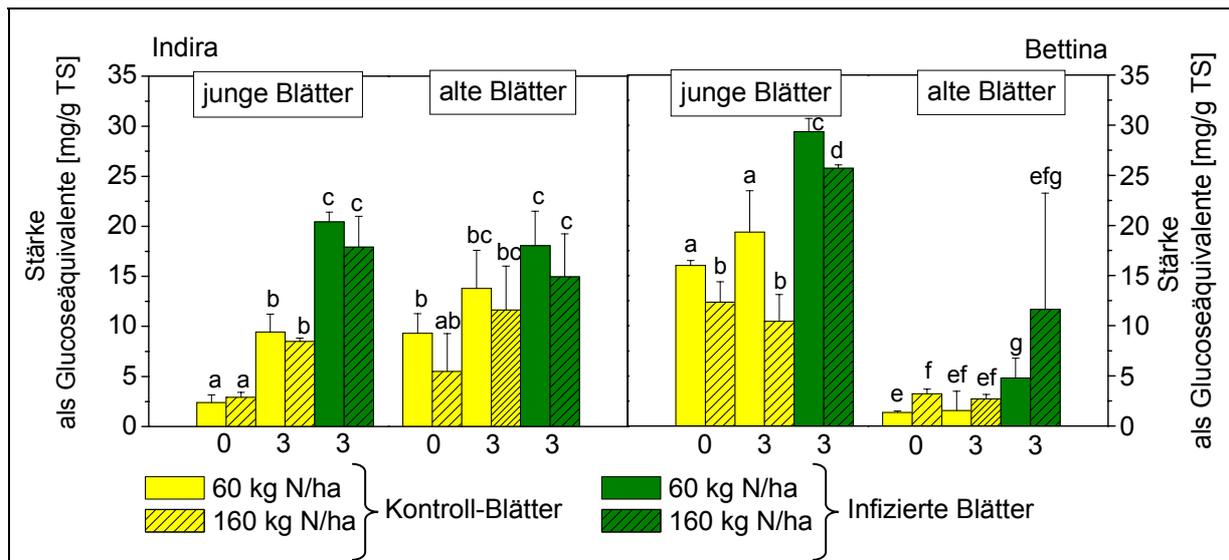


Abbildung 44: Stärkegehalte [%] junger und alter Kartoffelblätter einer Pflanze der Sorten Indira (links) und Bettina (rechts) des Freilands des Versuchsjahres 2002. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Die Messung der Stärkegehalte der Knollen anhand des Unterwassergewichts (vgl. II.2.3.4.2.) zeigte deutliche Unterschiede in den Stärkegehalten der beiden Kartoffelsorten. Die industriell genutzte Stärkekartoffel Indira hat einen um 1/3 höheren Gehalt an Stärke als die Speisekartoffelsorte Bettina. Verglichen mit den Stärkegehalten der Blätter, die durch eine erhöhte N-Düngung weniger Stärke akkumulieren, steigt der Gehalt an Stärke in den Knollen durch eine erhöhte N-Versorgung an (Abbildung 45). Dieser Effekt konnte auch an den Knollen des Gewächshausversuchs (vgl. 2.2) beobachtet werden.

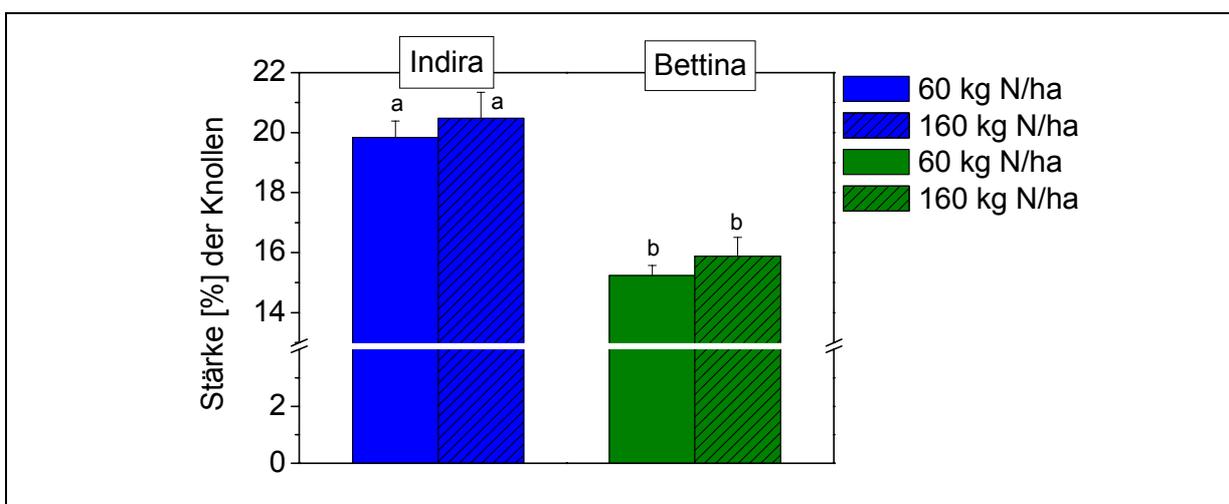


Abbildung 45: Stärkegehalte [%] der Knollen der Sorten Indira und Bettina im Freiland des Versuchsjahres 2002. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

4.2.2 Zuckergehalte der Kartoffelblätter

Die Gehalte an löslichen Zuckern der Blätter der Sorten Indira und Bettina des Freilandversuchs wurden photometrisch bestimmt (vgl. II.2.3.4.3.). Eine einmalige Gabe von 160 kg N/ha bewirkte bei der Sorte Indira eine signifikante Zunahme der Saccharosegehalte sowohl in den jungen als auch in den älteren Blättern einer Pflanze, wie auch schon in den Blättern der Sorte Indira der Gewächshausversuche beobachtet werden konnte (vgl. 2.2.2). Im Gegensatz dazu konnte weder in den jungen noch in den alten Blättern der Sorte Bettina ein Unterschied an Saccharose aufgrund einer N-Düngung beobachtet werden. Allerdings weisen die Blätter der Sorte Bettina der 60 kg N/ha-Variante deutlich mehr Saccharose auf als die Blätter der Niedrig-N-Variante der Sorte Indira (Abbildung 46). Der Saccharosegehalt in den Blättern stieg durch den Befall der Blätter mit *P. infestans* der Sorten beider N-Varianten signifikant an (Abbildung 46). Dies bestätigt das Ergebnis des Gewächshausversuchs, wo ebenfalls die Saccharosegehalte während einer *P. infestans* Infektion induziert werden (vgl. 2.2.2).

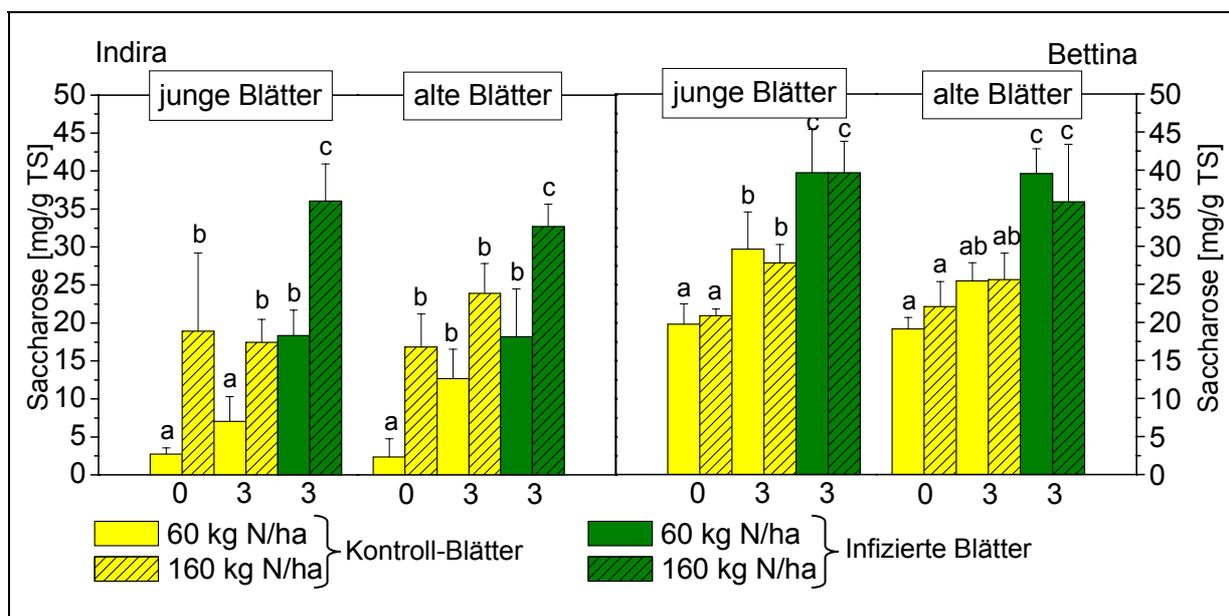


Abbildung 46: Konstitutive Saccharosegehalte [mg/g TS] sowie Saccharosegehalte [mg/g TS] drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* junger und alter Blätter der Sorten Indira und Bettina des Freilandversuchs des Versuchsjahres 2002. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 5). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden (p < 0,05).

Messungen der Glukose- und Fruktosegehalte der Blätter ergaben deutliche Unterschiede in den Gehalten der beiden Sorten (Abbildung 47). Im Vergleich zu der Sorte Indira reichert die Sorte Bettina signifikant weniger Glukose wie auch Fruktose

in den jungen und alten Blättern an. Übereinstimmend ist die Induktion der Glukose- und Fruktosegehalte während einer Infektion beider Sorten mit *P. infestans*. Die Akkumulation von Glukose durch *P. infestans* Befall konnte auch schon in Versuch 2.2.2 an Gewächshauspflanzen gezeigt werden.

Die Stickstoffdüngung von 160 kg N/ha im Vergleich zu 60 kg N/ha hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die konstitutiven Gehalte an Glukose und Fruktose der alten und jungen Blätter der Sorten Indira und Bettina im Freiland (Abbildung 47).

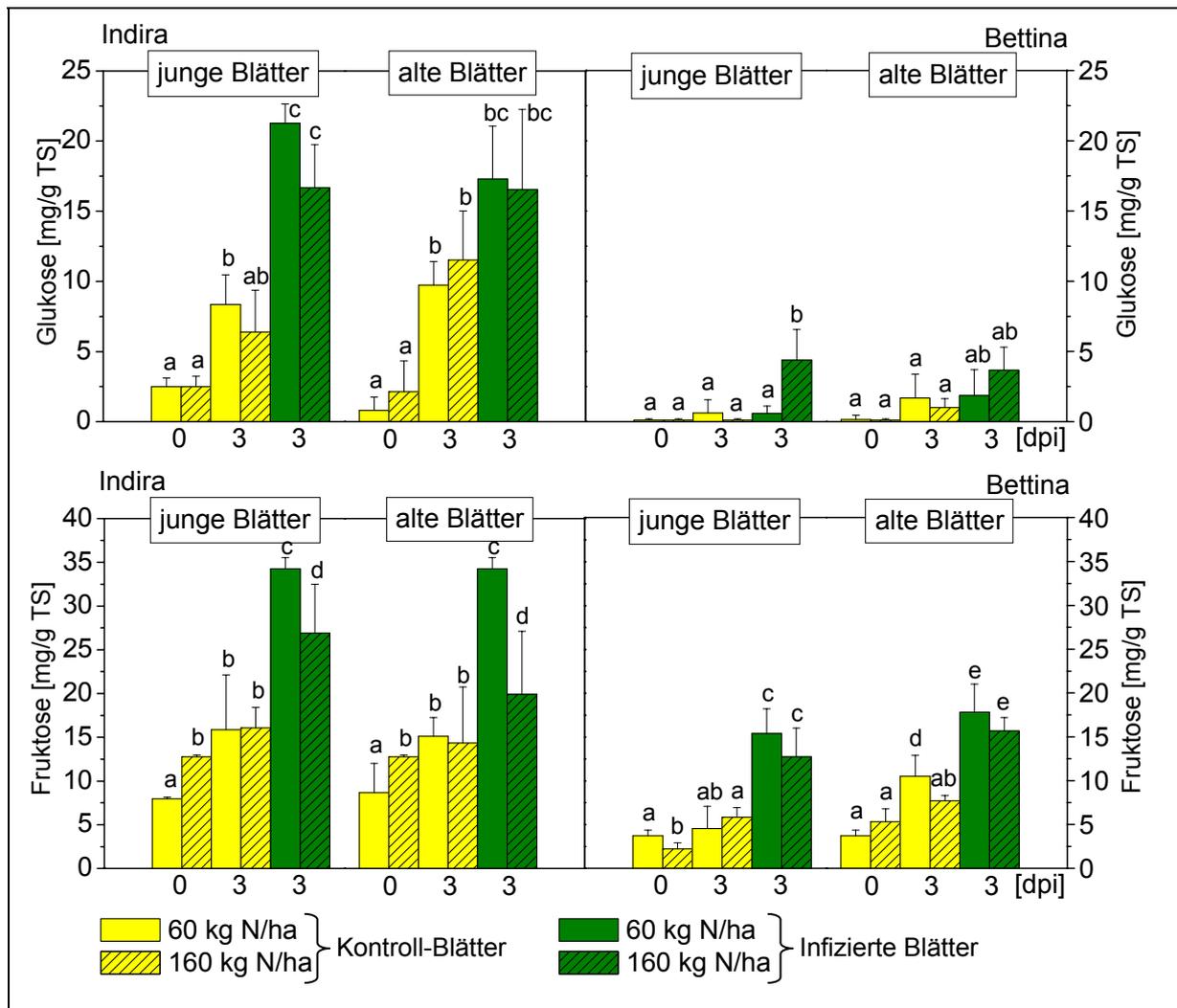


Abbildung 47: Konstitutive Glukose- und Fruktosegehalte [mg/g TS] sowie Glukose- und Fruktosegehalte [mg/g TS] drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* junger und alter Blätter der Sorten Indira und Bettina des Freilandversuchs des Versuchsjahres 2002. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

4.2.3 Untersuchungen zum C/N-Verhältnis der Kartoffelblätter und -knollen

Die Kultivierung von Kartoffelpflanzen der Sorte Indira und Bettina im Freiland unter erhöhter N-Düngung führte zu einer Abnahme des C/N-Verhältnisses in den Blättern

beider Sorten. Diese Abnahme des C/N-Verhältnisses konnte sowohl in jungen wie auch in alten Blättern einer Pflanze gemessen werden. Die verminderten C/N-Verhältnisse beruhen vorwiegend auf erhöhten N-Gehalten der Blätter. Das C/N-Verhältnis junger und alter Blätter der Sorte Indira lag dabei auf dem selben Niveau. Bei der Sorte Bettina hingegen war das C/N-Verhältnis der alten Blätter signifikant höher als das der jungen Blätter. Diese Steigerung des C/N-Verhältnisses beruht auf verminderten N-Gehalten der Sorte Bettina (Abbildung 48).

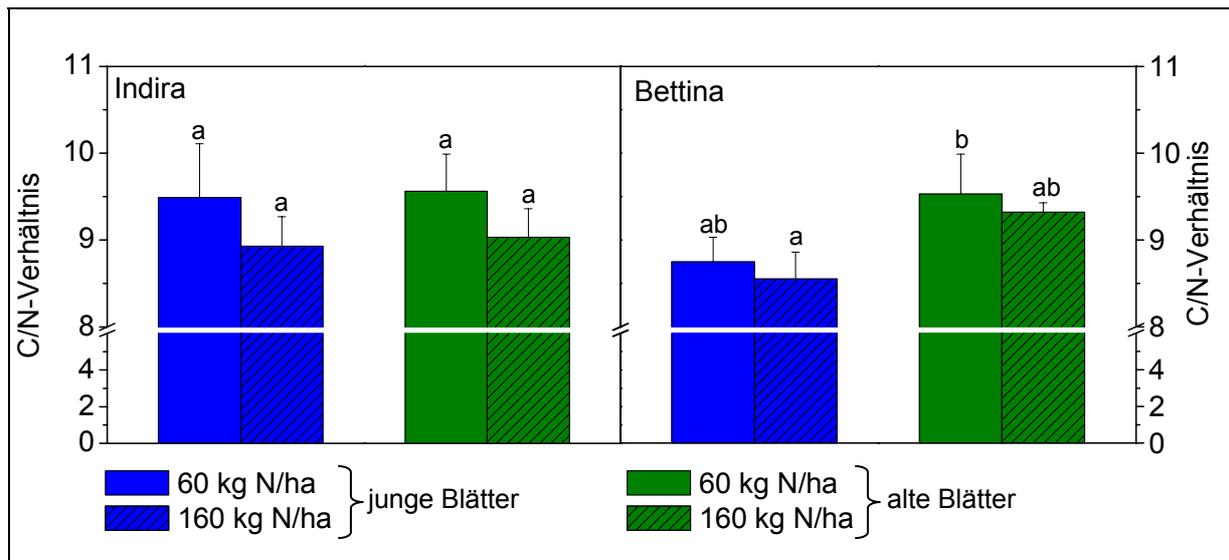


Abbildung 48: C/N-Verhältnis junger und alter Blätter einer Pflanze der Sorten Indira und Bettina der im Freiland aufgewachsenen Pflanzen. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 5). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

	Indira				Bettina			
	jung		alt		jung		alt	
	60 kg N/ha	160 kg N/ha						
C/N	9,5 \pm 0,6	8,9 \pm 0,3	9,6 \pm 0,4	9,0 \pm 0,3	8,8 \pm 0,3	8,6 \pm 0,3	9,5 \pm 0,5	9,3 \pm 0,1
N (%)	4,8 \pm 0,4	5,2 \pm 0,2	4,6 \pm 0,2	4,9 \pm 0,2	5,2 \pm 0,2	5,4 \pm 0,2	4,7 \pm 0,3	4,8 \pm 0,1
C (%)	45,3 \pm 1,0	46,0 \pm 0,3	43,9 \pm 0,7	44,3 \pm 0,5	45,8 \pm 0,6	46,5 \pm 0,3	45,1 \pm 0,4	45,0 \pm 0,7

Tabelle 19: C/N-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte junger und alter Blätter einer Pflanze der Sorten Indira und Bettina der im Freiland aufgewachsenen Pflanzen. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n = 5).

Die Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte und das daraus resultierende C/N-Verhältnis wurde ebenfalls an Blättern der verschiedenen Varianten drei Tage nach einer künstlichen Infektion mit *P. infestans* bestimmt. Die folgende Tabelle gibt die

Ergebnisse der Kontrollblätter sowie der infizierten Blätter wieder. (Tabelle 20). Dabei kann kein signifikanter Einfluss einer *P. infestans* Infektion auf das C/N-Verhältnis beobachtet werden, außer bei den jungen Blättern der Sorte Bettina Hoch-N-Variante. Bei der Sorte Indira nehmen die C-Gehalte der Blätter durch eine *P. infestans* Infektion außer bei den alten Blättern der Hoch-N-Variante signifikant ab.

Indira	Tag 3 [dpi]	jung		alt	
		60 kg N/ha	160 kg N/ha	60 kg N/ha	160 kg N/ha
C/N	Kontrolle	10,2 ± 0,8	8,1 ± 0,5	10,0 ± 1,4	8,4 ± 0,8
	infiziert	9,7 ± 0,9	8,3 ± 1,5	9,9 ± 0,4	8,1 ± 0,1
N (%)	Kontrolle	4,4 ± 0,3	5,8 ± 0,4	4,7 ± 0,7	5,4 ± 0,3
	infiziert	4,5 ± 0,4	5,4 ± 1,1	4,2 ± 0,2	5,5 ± 0,2
C (%)	Kontrolle	45,2 ± 0,7	46,6 ± 0,8	45,5 ± 0,9	45,2 ± 1,3
	infiziert	42,7 ± 0,4	43,3 ± 0,9	41,8 ± 0,5	44,6 ± 1,3
Bettina	Tag 3 [dpi]	jung		alt	
		60 kg N/ha	160 kg N/ha	60 kg N/ha	160 kg N/ha
C/N	Kontrolle	9,4 ± 0,3	8,7 ± 0,1	9,6 ± 0,3	9,2 ± 0,2
	infiziert	10,1 ± 0,5	9,6 ± 0,3	10,0 ± 0,5	9,2 ± 0,4
N (%)	Kontrolle	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,1	4,5 ± 0,2	4,8 ± 0,1
	infiziert	4,5 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,8 ± 0,2
C (%)	Kontrolle	46,0 ± 0,3	46,0 ± 0,3	43,2 ± 0,8	43,6 ± 0,2
	infiziert	45,8 ± 0,2	45,1 ± 1,1	43,4 ± 0,2	44,2 ± 0,5

Tabelle 20: C/N-Verhältnis, Kohlenstoff- und Stickstoffgehalte junger und alter Kontrollblätter und pathogenbehandelter Blattproben der Sorten Indira und Bettina der im Freiland aufgewachsenen Pflanzen 3 Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n = 5). Signifikante Änderungen der Werte durch Infektion sind blau markiert.

So wie das C/N-Verhältnis der Blätter durch eine erhöhte N-Düngung verändert werden konnte, war eine Veränderung des C/N-Verhältnisses durch eine N-Gabe auch in den Knollen zu erkennen. Durch die Erhöhung der N-Verfügbarkeit verringerte sich das C/N-Verhältnis der Knollen von $35,4 \pm 3,5$ auf $31,6 \pm 2,3$ bei der Sorte Indira und von $33,3 \pm 2,5$ auf $30,6 \pm 2,5$ bei der Sorte Bettina (Abbildung 49). Eine Zunahme des N-Gehalts der Knollen von $1,2 \pm 0,1$ % auf $1,4 \pm 0,1$ % bei der Sorte Indira und von $1,3 \pm 0,1$ % auf $1,4 \pm 0,1$ % bei der Sorte Bettina bewirkte diese

Abnahme des C/N-Verhältnisses. Der C-Gehalt der Knollen blieb bei allen Varianten unverändert bei $43 \pm 0,0 \%$.

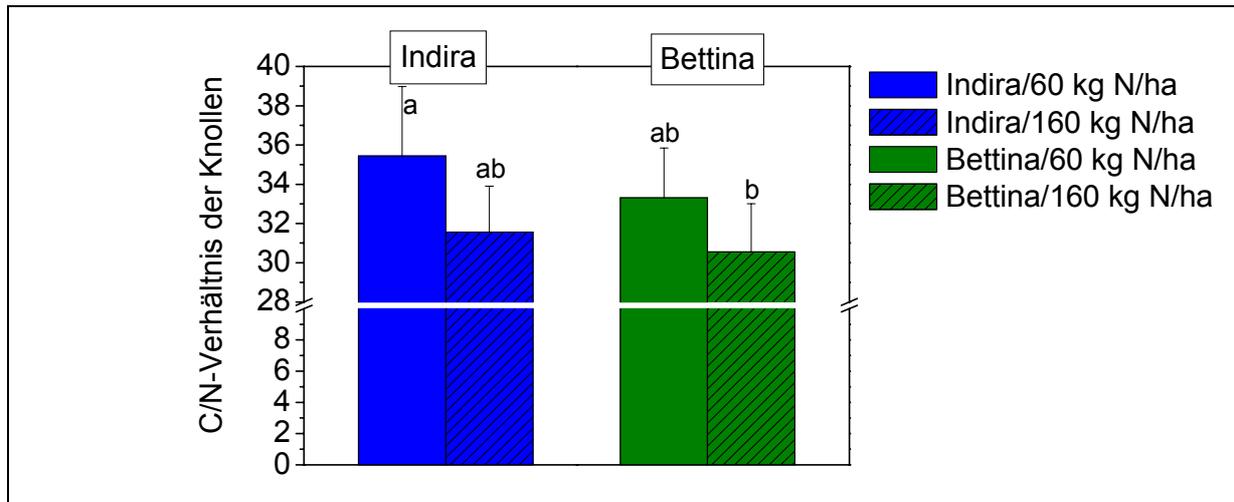


Abbildung 49: C/N-Verhältnis der Knollen der Sorten Indira und Bettina des Freilandversuchs des Jahres 2002. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 24$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

5 Untersuchungen zum Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans* im Freiland

In diesem Versuchsteil sollte geprüft werden, ob die Kultivierung von Kartoffelpflanzen bei variiertem Stickstoffversorgungsgrad im Freiland ebenfalls zu veränderten Gehalten an Sekundärmetaboliten führt. Außerdem sollten Inokulationsexperimente der Blätter der im Freiland aufgewachsenen Pflanzen zeigen, ob veränderte Metabolitprofile gegebenenfalls mit einer veränderten Suszeptibilität gegenüber *P. infestans* und mit den im Gewächshaus erhaltenen Ergebnissen korrelieren.

Hierzu wurden Kartoffelpflanzen der Sorte Indira und Bettina mit zwei unterschiedlichen Stickstoffstufen versorgt (60 kg N/ha, 160 kg N/ha). Die Blätter wurden vor der Blüte, ca. sechs Wochen nach dem Auflaufen, kurz vor dem Durchbrechen einer natürlichen *P. infestans* Epidemie von zwei Blättern geerntet, durch „detached-leaf“-Infektion mit einer Sporensuspension von *P. infestans* [10^4 Sporen/ml] inokuliert und anschließend in Petrischalen für fünf Tage in Klimakammern kultiviert. Da der Freilandversuch ohne Fungizid-Behandlung durchgeführt wurde, wurden nicht beerntete Pflanzen für eine weitere Beobachtung auf dem Feld belassen, um so eine natürliche *P. infestans* Infektion protokollieren zu

können. Die klimatischen Bedingungen des Versuchsjahres 2022 können dem folgenden Klimadiagramm (Abbildung 50) entnommen werden. Die Temperaturwerte lagen dabei im Mittel ab der zweiten Dekade des Monats Mai über 15 °C.

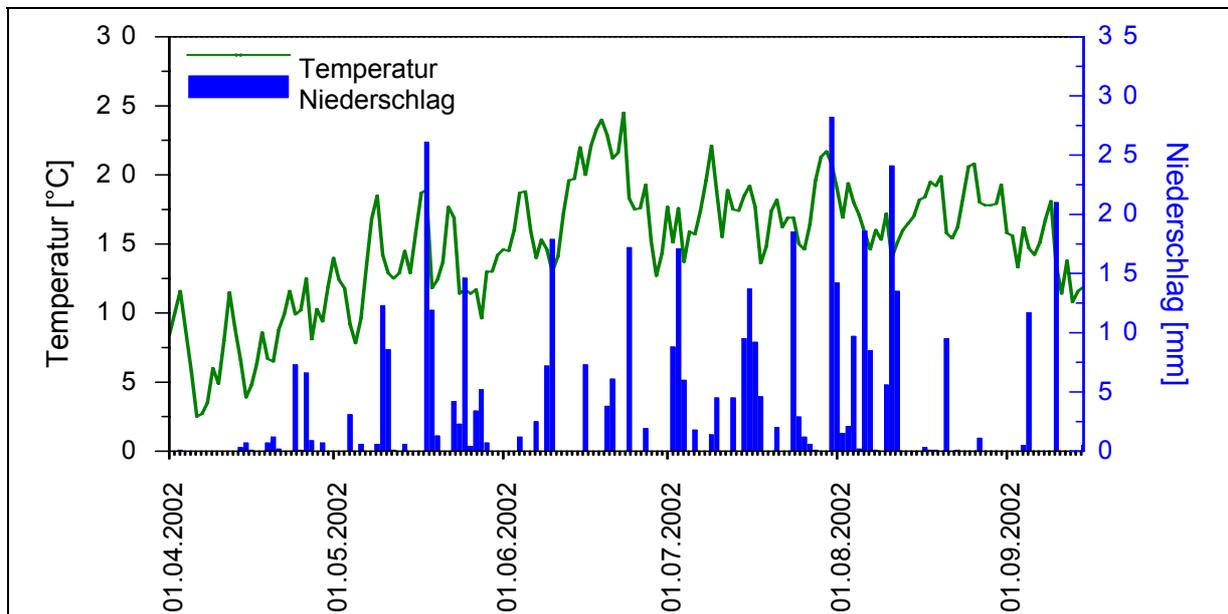


Abbildung 50: Klimadiagramm des Versuchsjahres 2022

5.1 Ausbreitung von *Phytophthora infestans* im Freiland

Im Versuchsjahr 2022 konnten erste Symptome einer *P. infestans* Infektion der Sorte Indira am 19. Juni beobachtet werden (Abbildung 51, Abbildung 52). Dabei war kein Unterschied zwischen den beiden N-Varianten zu erkennen. Die darauf folgende Infektion des Laubes der Sorte Indira erreichte am 17. Juli Befallsstärken der Pflanzen von 50 %. Ein starker Befall durch alle Parzellen war zu verzeichnen. Daraufhin stieg der Befall innerhalb kurzer Zeit (31. Juli) auf Werte über 95 % Befall einzelner Pflanzen. Über 50 % des Bestandes waren davon betroffen. Am 14. August war das Laub des gesamten Bestandes der Sorte Indira zerstört.

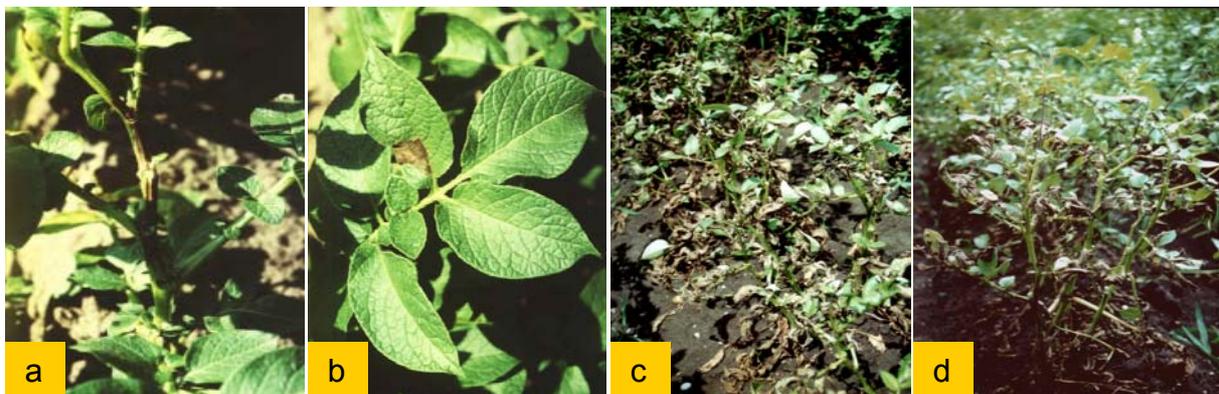


Abbildung 51: Erste Befallssymptome (a, b) einer *P. infestans* Infektion der Sorte Indira im Freiland. Weiterer Verlauf des Befalls (c, d) der Sorte Indira mit *P. infestans* im Freiland.

Erste Befallssymptome der Sorte Bettina konnten am 3. Juli bei der Variante mit 160 kg N/ha bonitiert werden. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine Befallssymptome an den Pflanzen der Niedrig-N-Variante beobachtet werden. Allerdings hoben sich diese Unterschiede in der Anfälligkeit der Sorte Bettina gegenüber *P. infestans* im Laufe der Vegetationsperiode rasch wieder auf. Im Gegensatz zu der Sorte Indira verlief der Befall der Sorte Bettina langsamer und erst Mitte September war der ganze Bestand durch *P. infestans* zerstört (Abbildung 52).

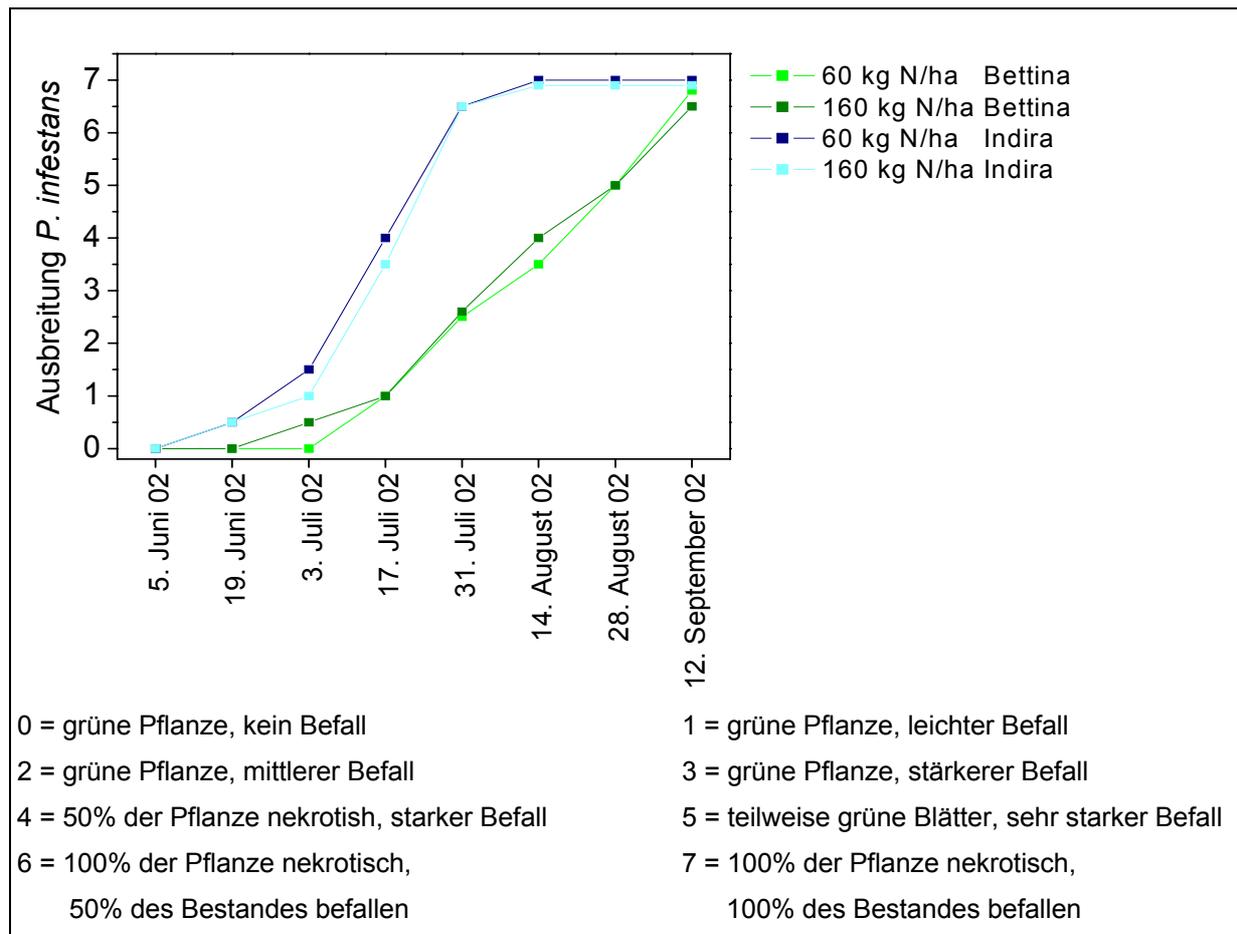


Abbildung 52: Ausbreitung von *P. infestans* im Freiland im Versuchsjahr 2002.

5.2 Entstehung von Blattschäden nach künstlicher Inokulation

Vergleicht man die erhaltenen Daten der Freilandbonitur mit den Boniturdaten des „detached-leaf“-Tests ist festzustellen, dass auch hier an Blättern der im Freiland herangezogenen Sorten Indira und Bettina kein signifikanter Unterschied in der Anfälligkeit der beiden N-Varianten aufzuzeigen. Ein Einfluss der unterschiedlichen N-Düngung auf das Resistenzverhalten konnte bei beiden Sorten nicht festgestellt werden. Nur bei der Sorte Bettina konnte sieben Tage nach künstlicher Inokulation beobachtet werden, dass die Blätter, der unter erhöhter N-Düngung aufgewachsenen

Pflanzen gegenüber *P. infestans* anfälliger waren (Abbildung 53). Wohl aber ist der Unterschied in der Anfälligkeit der beiden Sorten gegenüber *P. infestans* wieder zu beobachten. Die Sorte Indira ist im Vergleich deutlich anfälliger gegenüber *P. infestans* als die Sorte Bettina.

Weiterhin ist eine deutliche Abhängigkeit der Anfälligkeit der Blätter vom Blattalter zu erkennen (Abbildung 53). Junge, aber schon voll ausgewachsene Blätter der anfälligeren Sorte Indira sind weniger tolerant gegenüber *P. infestans* als ältere Blätter einer Pflanze. An Tag 4 nach Inokulation zeigen die unterschiedlich alten Blätter der Sorte Indira einen signifikanten Unterschied in der Toleranz gegenüber *P. infestans*. Im Gegensatz dazu ist bei der Sorte Bettina dieser Effekt nicht zu erkennen (Abbildung 53).

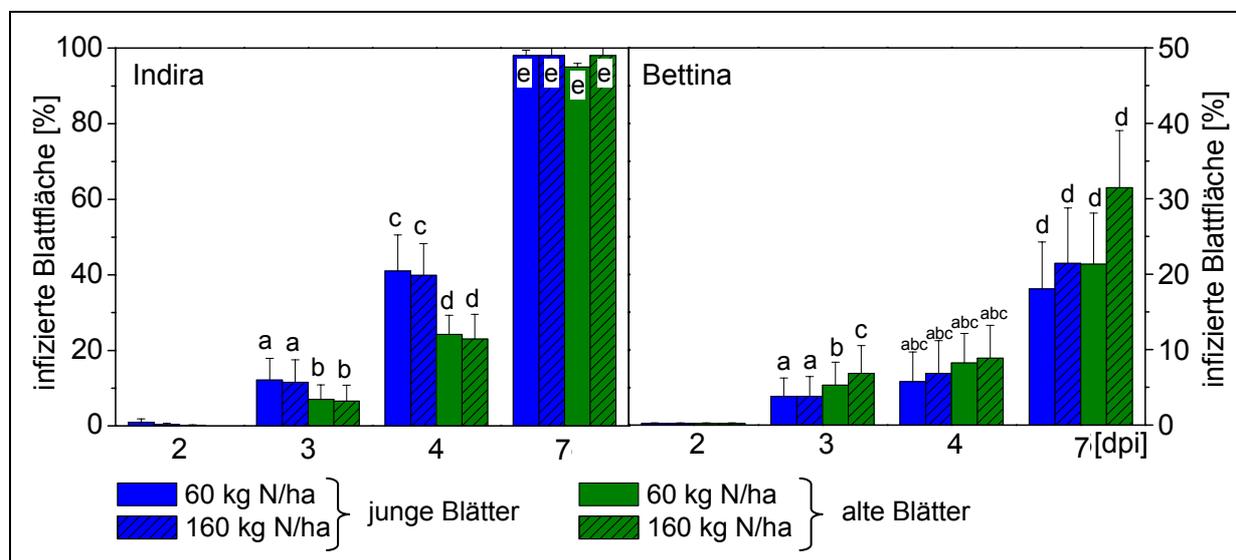


Abbildung 53: Infizierte Blattfläche [%] junger und alter Blätter einer Pflanze der im Freiland aufgewachsenen Pflanzen der Sorte Indira und Bettina. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 24$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

5.3 Untersuchungen zum Phenylpropanoidmuster der Blätter während einer *Phytophthora infestans* Infektion

Der Phenylpropanoidgehalt der Blätter der Pflanzen aus dem Freiland wurde mittels HPLC im Labor des Fachgebiets Obstbau (Prof. Treutter) am WZW bestimmt. Die Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen der Blätter der unterschiedlichen Varianten variierten zum Zeitpunkt der Ernte stark. Auffällig dabei war, dass die konstitutiven Gehalte an Phenylpropanoiden der älteren Blätter beider Sorten signifikant unter dem Niveau der jüngeren Blätter lagen. Ein Einfluss einer erhöhten N-Versorgung

konnte bei den jungen Blättern beider Sorten nicht beobachtet werden. Der konstitutive Gehalt an phenolischen Verbindungen lag bei den alten Blättern der Hoch-N-Variante unter dem Gehalt der Niedrig-N-Variante. Tendenziell waren die konstitutiven Gehalte an Phenylpropanoiden der Blätter der Sorte Bettina höher als die der Blätter der Sorte Indira.

Gleichzeitig wurden die Gehalte der phenolischen Inhaltsstoffe der pathogen-behandelten Blätter drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans* untersucht.

Vergleicht man die konstitutiven Gehalte mit den Gehalten drei Tage nach Inokulation, kann keine signifikante Induktion der Phenylpropanoidgehalte durch eine *P. infestans* Infektion festgestellt werden. Dieses Ergebnis konnte sowohl bei der Sorte Indira und Bettina wie auch bei den jungen und alten Blättern einer Pflanze beobachtet werden (Abbildung 54).

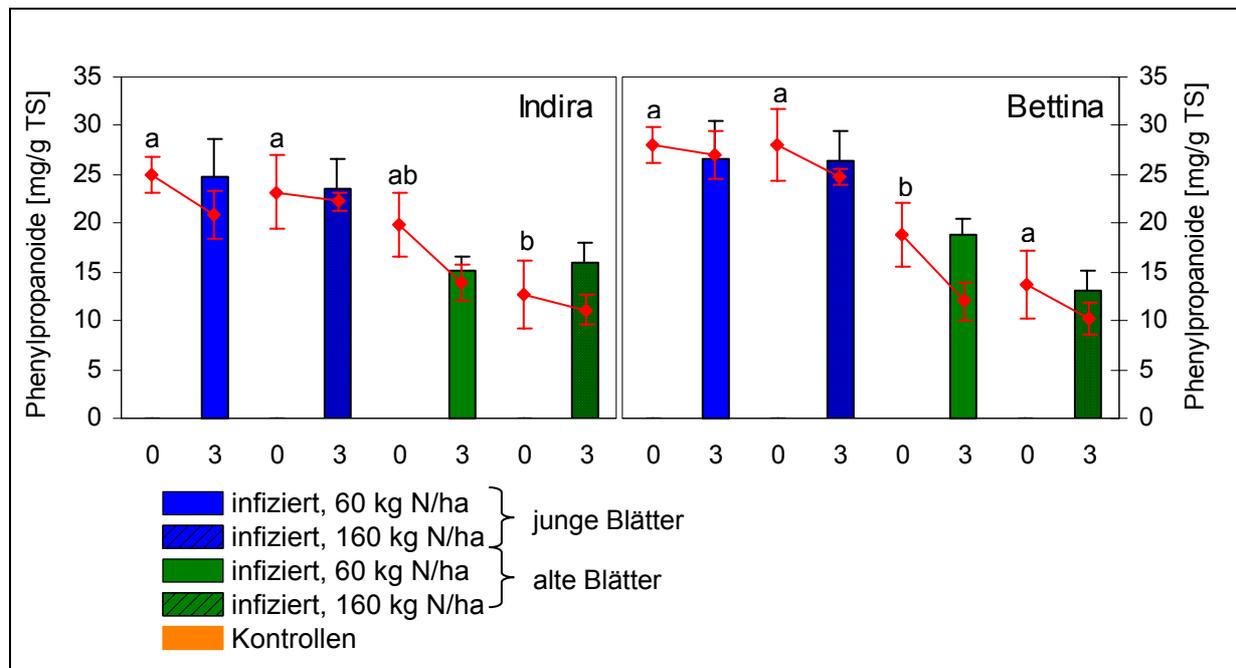


Abbildung 54: Phenylpropanoidgehalte der Blätter der Sorte Indira und Bettina konstitutiv und drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha im Freiland gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$). Signifikanzen wurden dabei nur für die konstitutiven Gehalte berechnet.

Betrachtet man die Einzelsubstanzen *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin ist zu beobachten, dass diese durch eine *P. infestans* Infektion signifikant ($p < 0,05$) in beiden Sorten induziert werden. Dies bestätigt die Ergebnisse vorheriger Versuche (vgl. 1.2.2 und 3.3). Ein signifikanter Einfluss von N auf *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin kann weder auf die konstitutiven

Gehalte noch auf die Gehalte nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* beobachtet werden. Auch variieren die Gehalte zwischen den unterschiedlichen Blattaltersstufen nicht signifikant. Werte der Kontrollblätter wurden nicht aufgetragen, da *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin in den Kontrollblättern konstitutiv nicht gemessen wurden (Abbildung 55).

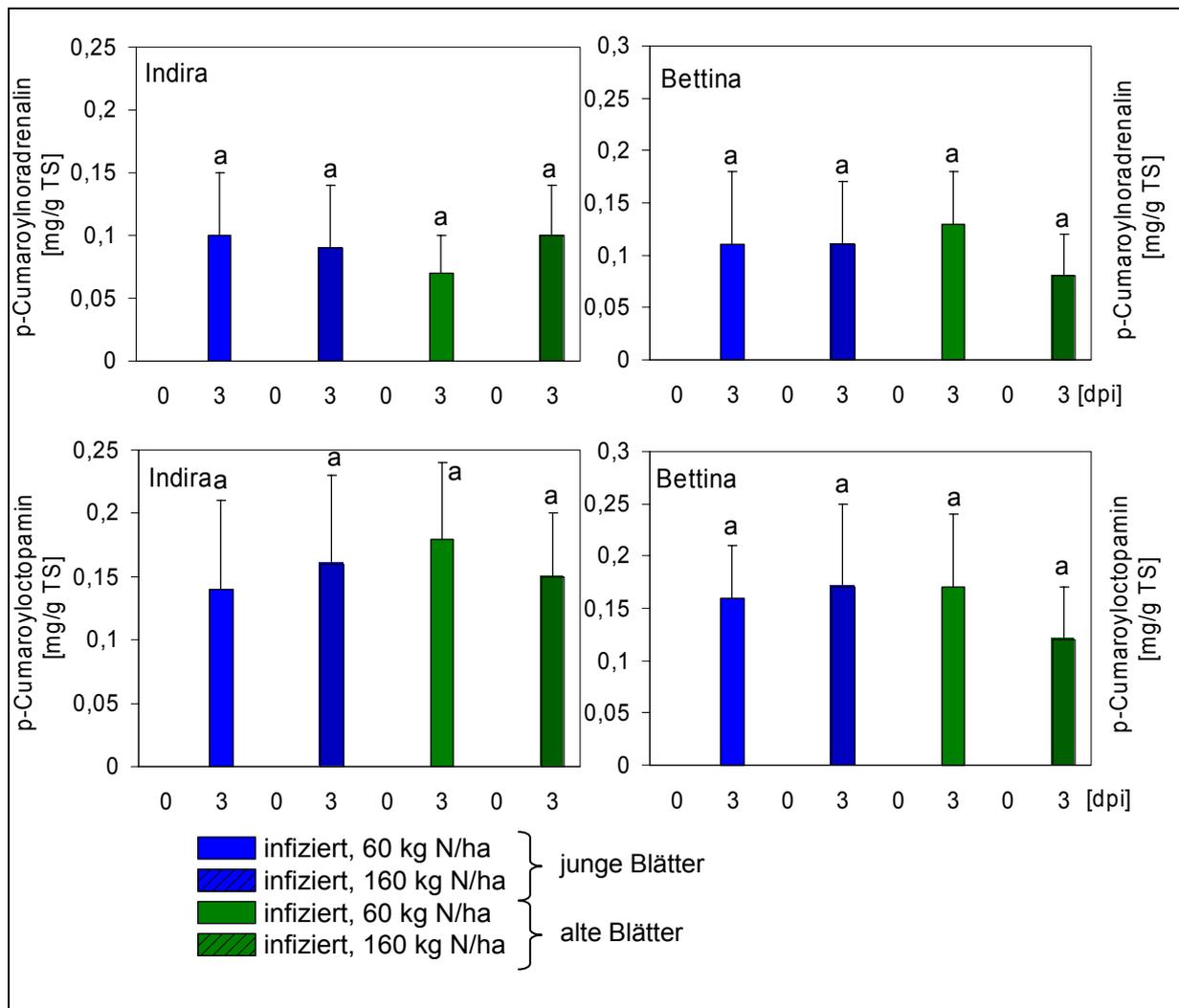


Abbildung 55: Gehalte an *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin [mg/g TS] pathogenbehandelten Blättern der Sorte Indira und Bettina am Tag der Inokulation (Tag 0) und drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha im Freiland gedüngt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. ($n = 5$). Mittelwerte der Sorten mit unterschiedlichen Buchstaben sind signifikant verschieden ($p < 0,05$).

IV DISKUSSION

Aufgrund des äußerst destruktiven Charakters der Kraut und Knollenfäule sowie der immer häufiger auftretenden Dürrfleckenkrankheit besteht in der Phytopathologie ein großes Interesse an der Aufklärung der Wirt-Pathogen Interaktion von Kartoffelpflanzen und dem Oomyceten *Phytophthora infestans* sowie dem Deuteromyceten *Alternaria solani* (GOVERS *et al.* 1997). Aufgrund der steigenden CO₂-Konzentrationen unserer Atmosphäre und der immer höher werdenden Stickstoffeinträge in unser Ökosystem wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber den beiden Phytopathogenen *P. infestans* und *A. solani* untersucht.

Da besonders Vergleiche zwischen unterschiedlich empfindlichen Sorten das Verständnis der Pathogenabwehrmechanismen von Pflanzen verbessern können, wurden dabei verschiedene Sorten von *S. tuberosum* verwendet, die sich deutlich in ihrem Resistenzverhalten gegenüber *P. infestans* und *A. solani* unterscheiden. Im Gegensatz zu den gegenüber *P. infestans* anfälligen Sorten Bintje und Indira, die in jedem Fall nach Infektion mit *P. infestans* absterben, besitzen die Sorten Bettina und Kuras eine erhöhte Resistenz gegenüber dem Pathogen (FLEISCHMANN 2000). Auch PLEßL (2002) zeigte das die Sorte Bettina eine erhöhte Resistenz gegenüber *P. infestans* im Vergleich zu der Sorte Indira aufweist. Ergebnisse dieser Arbeit konnten diesen Befund bestätigen. Die Sorte Kuras zeigte dabei nur vereinzelte Nekrosen, wohingegen sich bei der Sorte Bettina stellenweise wässrige Läsionen, die an Tag 5 nach Inokulation bis zu 20 % der Blattfläche einnahmen, zeigten. Die Blätter der beiden anfälligen Sorten Indira und Bintje waren an Tag 5 zu 100 % durch *P. infestans* infiziert. Vergleicht man hingegen das Resistenzverhalten der verschiedenen Sorten gegenüber *A. solani*, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die gegenüber *P. infestans* tolerantere Sorte Bettina gegenüber *A. solani* anfälliger, und die gegenüber *P. infestans* anfälligere Sorte Indira gegenüber *A. solani* resistenter ist.

Auswirkungen des Pflanzen- und Blattalters auf die Pathogenabwehr

Bei der Toleranz von Blättern gegenüber Ozon ist bekannt, dass mittelalte Blätter nach Ozonbehandlung stärkere Läsionen aufzeigen (HEGGESTAD 1991). Auch konnte von WOHLGEMUTH (2002) die maximale ROS-Akkumulation in mittelalten

Tomatenblättern nach Ozonstress detektiert werden. Die jüngsten Blätter zeigten keine Schäden sowie keine Akkumulation von H_2O_2 (WOHLGEMUTH 2002).

Die Resistenz einer Pflanze gegenüber Pathogenen variiert ebenfalls mit ihrem Alter. Dabei nimmt die Resistenz mit dem Alter zu, hat ihren Höhepunkt während der Blütezeit der Pflanze und fällt dann rasch wieder ab (ULLRICH und KRUG 1965, WARREN *et al.* 1971, CARNEGIE und COLHOUN 1982). Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen diesen Befund: Zwei Wochen alte Pflanzen der Sorten Indira und Bettina waren deutlich anfälliger gegenüber *P. infestans* als sechs Wochen alte, gerade vor der Blüte stehende Pflanzen. Nach POPULER (1978) ist der Einfluss des Pflanzenalters bei verschiedenen Kartoffelsorten allerdings unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch dies kann in vorliegender Arbeit bestätigt werden. Dabei zeigen die unterschiedlich alten Pflanzen der äußerst toleranten Sorte Kuras keine Unterschiede in der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans*.

Nach GUZMAN (1964) verhalten sich die einzelnen Blattpositionen einer Pflanze entsprechend. Dabei besitzen ausgewachsene Blätter, die weit von der Seneszenz entfernt sind, die geringste Anfälligkeit. Dies konnte an Blättern der gegenüber *P. infestans* toleranteren Sorte Bettina im Freilandversuch als nicht signifikanter Trend ebenfalls beobachtet werden. In diesem Versuch waren die voll ausgewachsenen Blätter des zweiten und dritten Blattstadiums weniger anfällig als die älteren Blätter der fünften und sechsten Blatttage einer Pflanze. Ältere Blätter der gegenüber *P. infestans* anfälligeren Sorte Indira waren, im Gegensatz zu den Blättern der Sorte Bettina, allerdings deutlich toleranter gegenüber *P. infestans* als die jüngeren, aber schon voll ausgewachsenen Blätter einer Pflanze. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von POPULER (1978), dass der Einfluss der Blattposition auf die Resistenz sortenabhängig ist. CARNEGIE und COLHOUN (1982) zeigen in ihren Untersuchungen, dass Sorten mit höherer Resistenz eine stärkere Minderung der Widerstandskraft mit dem Pflanzenalter aufweisen. GRAINGER (1962) findet einen im Zusammenhang zwischen hoher Anfälligkeit und dem entwicklungsbedingten Kohlenhydratstatus einer Pflanze. GUTSCHICK (1999) postuliert, dass junge Blätter die höchste Photosyntheserate aufweisen. HARPER *et al.* (1989) argumentiert, dass diese Blätter deshalb am kostbarsten für eine Pflanze sind, somit am besten gegenüber Pathogenen geschützt sein müssen.

Einfluss von Stickstoff und CO₂ auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans* und *Alternaria solani*

Zur Untersuchung des Einflusses von CO₂ und Stickstoff auf die Resistenz von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* und *A. solani* wurden die Sorten Indira und Bettina unter zwei CO₂-Konzentrationen (400 ppm, 700 ppm) sowie N-limitierten und N-gesättigten Bedingungen in Gewächshäusern herangezogen. Die Reduzierung der Sorten von vier auf zwei war aufgrund des Umfangs der Versuche notwendig. Weiterhin wurden in einem Freilandversuch die Sorten Indira und Bettina unter zwei verschiedenen N-Düngestufen (60 kg N/ha, 160 kg N/ha) beobachtet. Verschiedene Veröffentlichungen beschreiben widersprüchliche Effekte der N-Versorgung auf die Anfälligkeit von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans*. So fand HERLIHY (1970) in Feldversuchen eine Zunahme der durch *P. infestans* verursachten Läsionen bei Düngung mit erhöhten N-Mengen (120 kg N/ha). Auch CARNEGIE und COLHOUN (1983) fanden eine lineare Zunahme der Befallsstärke von Kartoffel mit *P. infestans* mit steigenden Stickstoffgaben. Im Gegensatz dazu zeigten PEHL und STURM (1962) und EL SHESHTAWI *et al.* (1988), dass eine Erhöhung der N-Applikation (im Bereich von 0 kg N/ha bis 120 kg N/ha) den Befall von Kartoffel mit *P. infestans* verringerte. COLON *et al.* (2002) konnten hingegen keinen Effekt einer erhöhten N-Düngung (im Bereich von 0 kg N/ha bis 200 kg N/ha) auf die Anfälligkeit von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* im Freiland beobachten. Auch in vorliegender Arbeit konnte kein Effekt einer erhöhten Stickstoffdüngung von 160 kg N/ha im Vergleich zu einer Düngung von 60 kg N/ha auf die Resistenz gegenüber *P. infestans* im Freiland beobachtet werden. Weder bei den Fungizid-unbehandelten Pflanzen des Freilands, die einer natürlichen *P. infestans* Infektion unterlagen, noch bei detached-leaf Versuchen in Klimakammern konnte eine veränderte Resistenz der beiden Kartoffelsorten durch erhöhte N-Gabe gegenüber *P. infestans* beobachtet werden. Betrachtet man jedoch die Pflanzen der Gewächshausversuche, so ist eine signifikante Zunahme der Anfälligkeit durch eine erhöhte N-Düngung gegenüber *P. infestans* zu beobachten. Ergebnisse der Taq-Man PCR zeigen eine 2,4fache Zunahme der *P. infestans* DNA-Menge an Tag 3 nach Inokulation der Blätter der mit Stickstoff behandelten Pflanzen. Auch durch eine optische Bonitur konnte die Zunahme der Anfälligkeit der Blätter der mit Stickstoff gedüngten Pflanzen um 15 % beobachtet werden. Diese widersprüchlichen Ergebnisse zeigen die Schwierigkeit von wissenschaftlichen Freilandversuchen auf. Sich während der Vegetationsperiode

freisetzender gebundener Stickstoff könnte die Stickstoffunterschiede der Niedrig- und Hoch-Düngevarianten des Freilandversuchs aufheben, so dass beide eher stickstoffgesättigten Varianten entsprachen. Außerdem könnten abiotische (Trockenheit, UV-Strahlung, Wind) und biotische Stimuli (Insekten, Pathogene) die Freilandpflanzen zur Induktion systemischer Abwehr induziert haben.

Untersuchungen zur Beeinflussung der Anfälligkeit von Kartoffelsorten gegenüber *A. solani* durch eine Stickstoffdüngung belegen stärkeres Erregeraufkommen bei einer geringeren N-Gabe (HOFFMANN und SCHMUTTERER 1983). Diese Aussage wird durch DAVIS *et al.* (2000) bestätigt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte in Gewächshausversuchen gezeigt werden, dass durch eine erhöhte Stickstoffdüngung von 0,8 g N gegenüber 0 g N pro Pflanze die Anfälligkeit der beiden Kartoffelsorten Indira und Bettina gegenüber *A. solani* abnimmt. MACKINZIE (1981) konnte ebenfalls eine verminderte Anfälligkeit von Kartoffelpflanzen gegenüber *A. solani* nach einer erhöhten Stickstoffdüngung (160 kg N/ha) im Freiland beobachten. Auch BLACHINSKY *et al.* (1996) bestätigen diese Ergebnisse. HOFMEESTER (1992) verweist darauf, dass eine gute N-Versorgung den Blattproteinabbau und die Alterung der Blätter hinauszögert und dadurch die Resistenz gegenüber nekrotrophen Pathogenen länger aufrecht erhalten werden kann. Durch eine erhöhte N-Düngung kann die meristematische Aktivität der Blätter verlängert werden (BARCLAY *et al.* 1973). Die N-Versorgung hat außerdem einen maßgeblichen Einfluss auf die Bildung apikaler Verzweigungen (VOS 1999). Lang anhaltendes Verzweigungswachstum bedeutet für eine Pflanze konstante Nachlieferung neuer Blätter (VOS und BIEMOND 1992). Da *A. solani* bevorzugt geschwächte, senescente Blätter befällt (DAVIS *et al.* 2001), könnten diese Befunde die erhöhte Resistenz bei zusätzlicher Stickstoffdüngung erklären. Auch bei Tomate konnte eine erhöhte Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber *Botrytis cinerea*, ebenfalls ein Schwächeparasit, durch eine geringere N-Düngung beobachtet werden (HOFFLAND *et al.* 1999).

Eine Zusammenfassung vieler Einzelstudien beschreibt den Einfluss von CO₂ auf die Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenen (MANNING und TIEDEMANN 1995). Insgesamt lässt sich festhalten, dass erhöhte CO₂-Konzentrationen abhängig vom jeweiligen Wirt-Parasit-System eine Infektion sowohl begünstigen als auch erschweren können. Zum Einfluss von CO₂ auf den Infektionsverlauf von *P. infestans* oder *A. solani* bei *S. tuberosum* liegen allerdings nur vereinzelt Publikationen vor. Erste Ergebnisse bescheinigen einen positiven Effekt erhöhter CO₂-Konzentrationen

auf die Toleranz von Kartoffel gegenüber *P. infestans* (PLEßL 2002). Kartoffelpflanzen in vorliegender Arbeit, die über vier Wochen mit 700 ppm CO₂ behandelt wurden, zeigten sowohl gegenüber *P. infestans* als auch gegenüber *A. solani* eine verringerte Anfälligkeit als Pflanzen, die unter 400 ppm CO₂ herangezogen wurden. Die Blätter der mit CO₂-behandelten Pflanzen zeigten eine 2,4fach geringere Menge an *P. infestans* DNA im Vergleich zu den Blättern der Pflanzen, die nicht mit einer erhöhten CO₂-Konzentration behandelt wurden. Somit konnte die erhöhte Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber *P. infestans* aufgrund erhöhter N-Düngung durch erhöhte CO₂-Konzentrationen wieder aufgehoben werden. Auch YWA *et al.* (1995) beschrieben eine erhöhte Toleranz von Tomatenpflanzen gegen *Phytophthora*-Fäule unter erhöhten CO₂-Bedingungen. Ein Grund für die CO₂-induzierte Resistenz könnte die Abnahme des Blatt-N-Gehaltes und somit eine verschlechterte Nährstoffsituation für das Pathogen sein. Ein niedrigerer N-Gehalt bedingte z.B. bei Tomatenpflanzen eine verminderte Infektion durch *Oidium lycopersicum* (HOFFLAND *et al.* 2000). Da eine Erhöhung des N-Gehalts in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anfälligkeit gegen *P. infestans* zur Folge hatte, könnte diese Erklärung für *P. infestans* zutreffen. Nach MARSCHNER (1995) besteht ein direkter Zusammenhang des Einflusses der Aminosäurekonzentration des Apoplasten sowie der Blattoberfläche auf die Keimung und das Wachstum von Konidien. Eine erhöhte Aufnahme von Stickstoff aufgrund eines größeren Stickstoffangebots führt nach STITT (1999) zu einer Induzierung der Synthese von Carbon- und Aminosäuren. HOFFLAND *et al.* (2000) diskutieren, dass das Vorhandensein gewisser Mengen an stickstoffhaltigen Komponenten für das Wachstum von Pathogenen wichtig ist. Die Blätter der Kartoffelsorte Indira zeigen eine Zunahme des Proteingehaltes nach N-Düngung und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans*. FANGMEIER *et al.* (2002) berichten, dass Kartoffelpflanzen, die in „open top chamber“ (OTC) - und „free air CO₂ enrichment“ (FACE)-Experimenten mit erhöhten CO₂-Konzentrationen behandelt wurden, einen erniedrigten Gehalt an Stickstoff sowohl in der oberirdischen Biomasse als auch in den Knollen aufwiesen. Auch in vorliegender Arbeit war der N-Gehalt bei einer erhöhten CO₂-Konzentration in den Blättern und in den Knollen erniedrigt, was ein erhöhtes C/N-Verhältnis zur Folge hatte. Dieser Effekt erhöhter CO₂-Konzentrationen auf den N-Gehalt von Blättern wurde auch für verschiedene andere Pflanzen beschrieben (MAKINO *et al.* 1997, FANGMEIER *et al.* 2000, THEOBALD *et al.* 1998).

Als weiterer Grund für die Verringerung des Stickstoffgesamtgehaltes bei erhöhten CO₂-Konzentrationen wird ein Zuwachs des Stärkeanteils im Blatt diskutiert, der zu einem prozentualen Rückgang anderer Blattkomponenten führt (STITT 1991). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich in den Kartoffelblättern aufgrund einer erhöhten CO₂-Konzentration eine Zunahme der Stärkegehalte. Dies kann jedoch nach POORTER *et al.* (1997) nicht der einzige Grund für die Verringerung des Stickstoffgesamtgehaltes sein. Dafür spricht, dass durch erhöhte N-Gaben eine Abnahme der Stärkekonzentration bei der Kartoffelsorte Indira beobachtet werden konnte. Auch STITT (1999) beschreibt die Abnahme der Stärkegehalte aufgrund einer erhöhten Stickstofffixierung. Interessanterweise wird die Synthese von Saccharose im Vergleich zur Stärkesynthese durch erhöhte Nitratkonzentrationen nicht reprimiert (SCHEIBLE *et al.* 1997) wie auch in dieser Arbeit bei der Sorte Indira bestätigt werden konnte. Nach STITT (1999) ist Saccharose für den Transport und die Aktivierung von Aminosäuren wichtig. Eine Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 700 ppm hatte ebenfalls eine Steigerung der Glukose und Saccharosegehalte zur Folge. Auch LONG *et al.* (1996) und LARIOS *et al.* (2001) konnten einen Anstieg von löslichen Zuckern durch erhöhte CO₂-Konzentrationen nachweisen. Dabei wird den löslichen Zuckern eine wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung und Induzierung von Abwehrantworten zugesprochen (STITT 1999, XIAO 2000). Dies würde auch mit der resistenzfördernden Wirkung erhöhter CO₂-Konzentrationen übereinstimmen. Dabei ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt, wie die Erkennung und Signalübermittlung der Zucker funktioniert. Von Xiao *et al.* (2000) sowie GIBSON (2003) und MOORE *et al.* (2003) wird ein Hexokinase-involvierter Mechanismus diskutiert. Aber auch andere Wege Saccharose-spezifischer Transmitter sind denkbar (SMEEKENS 2000, ROLLAND 2002, ROITSCH *et al.* 2002). ROITSCH (1999) schreibt einer extrazellulären Invertase eine wichtige regulatorische Rolle zu. Die dabei durch die Invertase erhöhten Zuckerkonzentrationen regulieren Enzyme der Pathogenabwehr. HERBERS *et al.* (1996) konnten durch „Füttern“ einer Zuckerlösung eine Induktion von PR-Proteinen in Tabakblättern nachweisen. Diese „High-sugar-resistance“ wurde schon von HORSFALL und DIMOND (1957) beschrieben und konnte von CONRATH *et al.* (2003) bestätigt werden. Sie konnten an transgenen Kartoffeln mit verminderter ATP/ADP Transporter Funktion, die erniedrigte Stärke und erhöhte Glukosegehalte aufzeigten, eine verminderte Anfälligkeit gegenüber *A. solani* beobachten. Auch in vorliegender Arbeit weisen die mit Stickstoff behandelten Pflanzen erniedrigte Stärkegehalte und

erhöhte Saccharosegehalte, sowie eine erhöhte Toleranz gegenüber *A. solani* auf. ROTEM (1994) postuliert, dass die Anwesenheit hoher Zuckerkonzentrationen auch hemmend auf die Bildung der Sporen von *A. solani* wirken.

Auswirkungen von Veränderungen des Sekundärstoffwechsels auf die Pathogenabwehr in Kartoffelpflanzen unter variiertem CO₂- und N-Versorgung

Phenole

Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Metabolite des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen bei Wachstum unter erhöhten atmosphärischen CO₂-Konzentrationen und variabler N-Versorgung sind für die Abwehr von Pflanzen besonders interessant: Die gesteigerte Akkumulation von Sekundärmetaboliten kann die Fitness der Pflanzen in Bezug auf den Befall mit pilzlichen und bakteriellen Pathogenen erhöhen (POORTER *et al.* 1997, PENUELAS und ESTIARTE 1998). Besondere Bedeutung haben dabei in der Pathogenabwehr und Stresstoleranz von Pflanzen die Phenylpropane (LEGRAND 1983, NICKOLSON und HAMMERSCHMIDT 1992, DIXON und PAIVA 1995), deren Konzentrationsänderungen Modifizierungen in der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen erwarten lassen (MAHER *et al.* 1994, PENUELAS und ESTIARTE 1998). Ergebnisse von LAVOLA *et al.* (2000) zeigen unter erhöhten CO₂-Konzentrationen einen signifikanten Anstieg der Allokation von Kohlenstoff in sekundäre Metabolite, ohne dabei Veränderungen im Wachstum von Birken Sämlingen zu messen. Sie konnten außerdem zeigen, dass die konstitutive Enzymaktivität der Phenylalaninammoniumlyase (PAL) deutlich gesteigert wird. Durch eine Akkumulation von Kohlenhydraten durch Hoch-CO₂ kommt es nicht nur zu einer Hemmung der Genexpression photosynthetisch aktiver Enzyme (DRAKE *et al.* 1997), sondern auch zu einer Induktion abwehrbezogener Enzyme wie z.B. der PAL und der Chalkonsynthase (HERBERS *et al.* 1996, XIAO *et al.* 2000). Eine induzierende Wirkung erhöhter CO₂-Konzentrationen auf die pflanzliche Abwehr ist in unterschiedlicher Ausprägung auch in der vorliegenden Arbeit zu sehen. Allerdings konnte in dieser Arbeit eine Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 700 ppm die Phenolsynthese in Kartoffelblättern nicht induzieren. Dieses Ergebnis unterstützt dabei nicht die von BRYANT *et al.* (1983) formulierte „*carbon/nutrient balance*“-Hypothese, nach der höhere C/N-Verhältnisse positiv mit dem Gehalt an C-haltigen Metaboliten verbunden sind. Die „*growth/differentiation balance*“-Hypothese erweitert diese Aussage um den Faktor Wachstum, d.h. nur wenn die Verfügbarkeit

der Ressourcen für das Wachstum der Pflanze limitiert ist oder den Bedarf übersteigt, investiert eine Pflanze in die Produktion sekundärer Metabolite (HERMS und MATTSON 1992). So kommt es zwar nicht zu einer Steigerung der Phenolgehalte bei gesteigerter CO₂-Versorgung, doch sind die konstitutiven Phenolgehalte der Niedrig-N-Variante deutlich höher als die der Hoch-N-Variante was bedeuten könnte, dass Stickstoff den limitierenden Faktor für das Wachstum darstellte und so die Pflanzen in die Produktion von Sekundärstoffen investierten.

Auch HARTLEY *et al.* (2000) fanden in drei aufeinanderfolgenden Generationen von Grünlandpflanzen widersprüchliche CO₂-Effekte auf die Synthese von Phenolen. Nach Meinung von HARTLEY *et al.* (2000) sind die Effekte einer erhöhten CO₂-Konzentration auf die Phenylpropanoidsynthese artabhängig und werden durch Umweltfaktoren, wie z.B. den Nährstoffgehalt im Boden stark beeinflusst. JONASSAN *et al.* (1986) beobachteten bei mehreren Pflanzen eine negative Korrelation zwischen der Phenolsynthese und der Versorgung der Pflanzen mit Stickstoff. In der Literatur finden sich weitere Angaben über eine gesteigerte Anfälligkeit verschiedener Pflanzen gegenüber Pathogenen aufgrund der Abnahme des Phenolgehaltes durch ein hohes Angebot an Stickstoff (FARKAS und KIRALY 1962, BAVARESCO und EIBACH 1987, SANDER 1992). Eine Abnahme der Phenylpropanoide in transgenen Kartoffelpflanzen resultierte ebenfalls in einer Steigerung der Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* (YAO *et al.* 1995). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigen die Pflanzen nach einer erhöhten Stickstoffdüngung erniedrigte Phenolgehalte in den Blättern und eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* allerdings nicht gegenüber *A. solani*.

Bei niedrigem N-Angebot ist die Rate der Proteinsynthese begrenzt und nur ein Teil der gebildeten Aminosäuren wird zur Biosynthese von Proteinen verwendet. Nach der „*amino acid diversion*“-Hypothese begünstigt der so entstandene Überschuss an Tyrosin und Phenylalanin die Phenylpropanoidbiosynthese (LAMBERS 1983). Auch SANCHEZ *et al.* (2000) konnten eine Induktion der Phenylpropanoidbiosynthese unter Mangel an Stickstoff nachweisen. Für die, unter 400 und 700 ppm CO₂ aufgewachsenen N-gesättigten Pflanzen, konnten in vorliegender Arbeit veränderte konstitutive Gehalte phenolischer Verbindungen im Vergleich zu der nicht mit Stickstoff gedüngten Variante beobachtet werden. Hierbei sank der Gesamtphenolgehalt nach N-Gabe signifikant. Dabei veränderte sich der Gehalt an Rutin nicht, die Gehalte an Chlorogen-, Kryptochlorogensäuren sowie Flavonolen und

weiteren Hydroxycimtsäuren nahmen signifikant ab, wobei der Gehalt an Flavonolen prozentual am stärksten reduziert wurde. Chlorogensäure stellt in den gegenüber *P. infestans* anfälligen Sorten Indira und Bintje mengenmäßig die Hauptkomponente der löslichen phenolischen Verbindungen dar. In den gegenüber *P. infestans* toleranten Sorten Bettina und Kuras hingegen sind die Flavonole mengenmäßig am stärksten vertreten. DEL RIO *et al.* (2004) postulieren, dass Flavanone bei der Abwehr von *Citrus sinensis* gegenüber *Phytophthora citrophthora* eine wichtige Rolle spielen. Nach Inokulationsversuchen konnten sie eine signifikante Induktion verschiedener Flavanone nachweisen.

Nach LI und STEFFENS (2002) hängt die Resistenz gegenüber Pathogenen mit der Enzymaktivität der Polyphenol Oxidase (PPO) zusammen. Sie zeigten an PPO überexprimierenden Tomatenpflanzen, dass diese weniger anfällig gegenüber *Pseudomonas syringae* waren. Sie begründen dies mit der Annahme, dass die aus der Oxidation der Phenole entstehenden Chinone hoch reaktiv sind, zur Vernetzung von Aminosäuren und Proteinen beitragen und so dem Pathogen nicht mehr als Nahrungsgrundlage zur Verfügung stehen.

Eine Abnahme phenolischer Inhaltsstoffe wie Lignin in transgenen Kartoffelpflanzen resultierte in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *P. infestans* (YAO *et al.* 1995). Eine Reduzierung des Phenylpropanoidmetabolismus durch Inhibierung der PAL in transgenem Tabak resultierte ebenfalls in einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Cercospora nicotianae* (MAHER *et al.* 1994). Transgene Kartoffelpflanzen, die aufgrund des H₂O₂ generierenden Enzyms Glukose/Glukose Oxidase H₂O₂ in hohem Maße akkumulieren, zeigten erhöhte Ligningehalte und verzögerte Läsionsentwicklung nach Inokulation mit *P. infestans* sowie eine verringerte Anfälligkeit gegenüber *A. solani* (WU *et al.* 1997).

Durch eine erhöhte N-Düngung konnte der Gehalt an löslichen Phenolen in Kartoffelblättern vermindert werden. Diese Reduzierung der konstitutiven Gehalte an Phenolpropanoiden spiegelt sich in einer höheren Anfälligkeit der N-gesättigten Pflanzen gegenüber *P. infestans* wieder. Nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* wurden die konstitutiven Phenolgesamtgehalte allerdings nicht induziert. Dies wurde von ANDREU *et al.* (2001) drei Tage nach Inokulation zweier unterschiedlich toleranter Kartoffelsorten mit *P. infestans* ebenfalls gezeigt.

Ein Einfluss der Pathogenbehandlung auf den Gehalt an löslichen phenolischen Metaboliten konnte aber für zwei in dieser Arbeit identifizierte Phenylpropanoide

beobachtet werden. In Zusammenarbeit mit Prof. Treutter (Fachgebiet Obstbau des Wissenschaftszentrums Freising-Weihenstephan) sowie Dr. Heller (Institut für Biochemische Phytopathologie, GSF-Neuerberg) konnten sie als *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin identifiziert werden.

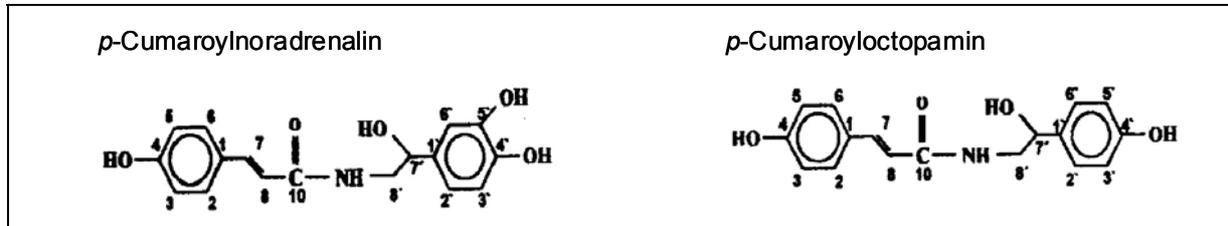


Abbildung 56: Strukturformeln der Phenylpropanoide *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin

Dabei akkumulieren diese beiden Phenylpropanoide nur in der gegenüber *P. infestans* anfälligen Sorte Indira, wohingegen bei den gegenüber *P. infestans* toleranten Sorten Bettina und Kuras in Gewächshausversuchen keine Induktion zu beobachten war. Außerdem korreliert die Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin positiv mit der Anfälligkeit der Pflanzen und dem Pflanzenalter. Vergleicht man dabei die Anzahl der befallenen Zellen der unterschiedlichen Varianten werden bei den anfälligen Interaktionen eine größere Anzahl an Zellen pro Blatt befallen. Mehr Zellen erhielten somit Signale zur Einleitung von Abwehrantworten und induzierten die Synthese von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin. Konstitutiv liegen *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin in Kartoffel nicht vor. Ein Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Synthese von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin konnte nicht gezeigt werden. Nach Inokulation der Pflanzen mit *P. infestans* korreliert die Induktion beider Substanzen wiederum mit der Anfälligkeit der Pflanzen der verschiedenen CO₂- und N-Behandlungsvarianten. ROEPENACK-LAHAYE *et al.* (2003) betrachten *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin im Zusammenhang mit der Abwehr von *Pseudomonas syringae* in Tomate. Sie konnten in resistenten Tomatenpflanzen nach Infektion erhöhte mRNA Level der PAL sowie weitere Enzyme des Phenolstoffwechsels finden. Versuche vorliegender Arbeit mit Pflanzen des Freilands zeigen ebenfalls die Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin nach einer Behandlung mit *P. infestans* in der resistenten Sorte Bettina auf. Auch nach Inokulation der beiden Kartoffelsorten Indira und Bettina mit *A. solani* wurde eine Induktion von *p*-Cumaroylnoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin beobachtet. Dabei ist die

Induktion in der gegenüber *A. solani* toleranteren Sorte Indira trotz niedrigerer Anzahl an befallenen Zellen gleich der Induktion in der gegenüber *A. solani* anfälligeren Sorte Bettina, was wiederum auf die Rolle von *p*-Cumarolynoradrenalin und *p*-Cumaroyloctopamin in der Pathogen-abwehr hinweisen könnte.

Eine Bedeutung von induzierten phenolischen Verbindungen in Kartoffelblättern nach einer Infektion wurde auch von KELLER *et al.* (1996) und LANDTAG *et al.* (2002) diskutiert. TAKAHAMA (1989) konnte durch Applikation von H₂O₂ die Phenolsynthese in Bohnen stimulieren. Andererseits können auch zellwandgebundene Peroxidasen durch H₂O₂ aktiviert werden. Der damit verbundene Einbau von Phenolen in die Zellwandmatrix könnte so zu einem wirksamen Schutz vor Pathogenen führen (NICHOLSON und HAMMERSCHMIDT 1992). Auch in vorliegender Arbeit kommt es bei der toleranten Interaktion von *P. infestans* mit der Kartoffelsorte Bettina zu einem schnellen Anstieg der H₂O₂-Konzentration in den inokulierten Blättern.

PR-Proteine

Mehrfach wird PR-Proteinen wie Chitinasen, Glukanasen und Osmotinen eine Rolle bei der Resistenz von Kartoffelpflanzen gegenüber pilzlichen Pathogenen zugesprochen (KOMBRINK und SOMSSICH 1995, VLEESHOWERS *et al.* 2000). Dabei können diese durch Pathogenbefall oder Elizitoren induziert werden, aber auch hohe Zuckerkonzentrationen induzieren in *A. thaliana* PR-Proteine der Familie 1 und 5 (XIAO *et al.* 2000) und in Tabak Chitinasen und Osmotin (HERBERS *et al.* 1996). Einhergehend mit der Zunahme der Zuckerkonzentrationen bei erhöhter CO₂-Konzentration in vorliegender Arbeit ist die Zunahme von Osmotin und eine Steigerung der Toleranz der Blätter gegenüber *P. infestans* und *A. solani*. HUANG *et al.* 2001 konnten zeigen, dass Thaumatin-ähnliche PR-Proteine wie Osmotin den Apex von Sporangien und das Hyphenwachstum des Oomyceten *P. infestans* hemmen können. Außerdem verursachen Osmotine das Auslaufen von Zellen durch spezifische Interaktionen mit der pilzlichen Membran, was zur Bildung von transmembranen Poren führt (KITAJIMA und SATO 1999). Drei Tage nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* ist eine deutliche Induktion der Gehalte an Osmotin zu beobachten, wobei die gegenüber *P. infestans* toleranteren Blätter der Hoch-CO₂-Varianten im Vergleich zu den Niedrig-CO₂-Varianten eine stärkere Induktion des Osmotingehalts aufzeigen. Auch PEREIRA *et al.* (1998) und LI *et al.* (1999) beschreiben einen resistenzfördernden Effekt von Osmotin PR-5 überexprimierenden Kartoffelmutanten. Diese Beobachtungen deuten auf eine Beteiligung von Osmotin

bei der Abwehr von *P. infestans* hin, wobei dies für die Abwehr von *A. solani* noch nicht eindeutig festgestellt werden kann. Auch hier werden die Gehalte an Osmotin deutlich nach Befall induziert, doch korreliert die Induktion mit der Anzahl an befallenen Zellen. Dies kann so auch für die Aktivitätszunahme der β -1,3-Glukanase der Blätter der Kartoffelsorten Indira und Bettina nach Befall mit *A. solani* aufgezeigt werden.

Anders verhalten sich die PR-Proteine der Familie 2, die Chitinasen. Diese werden in der gegenüber *A. solani* toleranteren Sorte Indira im Vergleich zu der anfälligeren Sorte Bettina stärker induziert. Außerdem kann der toleranzfördernde Effekt einer erhöhten CO₂-Konzentration sowie einer erhöhten N-Düngung gegenüber *A. solani* mit der Stärke der Aktivitätszunahme der Chitinasen erklärt werden. Transgene Kartoffelpflanzen, die eine Endochitinase von *Trichoderma harzianum* exprimieren sind weniger anfällig gegenüber einer *A. solani* Infektion (LORITO *et al.* 1998). VLEESHOUWERS *et al.* (2000) zeigen ebenfalls eine stärkere Akkumulation von PR-2 mRNA in resistenten, verglichen mit anfälligen Kartoffelsorten nach Pathogenbefall. Kartoffelzellkulturversuche zeigten, dass basische Chitinasen und Thaumatin-ähnliche PR-Proteine einen Aktin-bindenden Komplex bilden und so an einer cytoplasmatischen Umorganisation während der Abwehr von *P. infestans* beteiligt sein könnten (TAKEMOTO *et al.* 1997). Weiterhin können die durch Lyse der pilzlichen Membranen freigesetzten Oligomere Chitin und Glukan als effektive Elizitoren weitere Abwehrantworten in den Pflanzen induzieren (DEAN und KUC 1989). So wurde von VASIUKOVA *et al.* (2001) die Induktion der SAR durch Chitosan bei Kartoffel beschrieben. KLARZYNSKI *et al.* (2000) konnten mit Hilfe eines β -1,3 Glukans die Induktion von PAL, LOX und SA zeigen.

Eine zusätzliche N-Düngung führte zwar zu einer Zunahme des Gesamtproteingehalts, aber nicht zu einer konstitutiven Aktivitätszunahme der PR-Proteine Chitinase und β -1,3-Glukanase. Ein nicht signifikanter Trend zeigt, dass die Enzymaktivität der beiden PR-Proteine sowie der Gehalt an Osmotin abnimmt und könnte so die gesteigerte Anfälligkeit der Kartoffelpflanzen der Hoch-N-Varianten gegenüber *P. infestans* erklären. Die erhöhte Anfälligkeit der Blätter der Hoch-N-Varianten, trotz gesteigerter Osmotingehalte drei Tage nach Inokulation mit *P. infestans*, könnte auf der Erhöhung N-haltiger Inhaltsstoffe der Blätter und somit einer verbesserten Nährstoffversorgung von *P. infestans* basieren.

Pflanzliche Hormone in der Pathogenabwehr

Bei der Aktivierung einer Reihe von Abwehrreaktionen auf Pathogenbefall übernehmen insbesondere die Pflanzenhormone Salizylsäure, Ethylen und Jasmonat eine wichtige Funktion bei der Signalweiterleitung und der Aktivierung von Abwehr-assoziierten Proteinen und niedermolekularen Substanzen (ALVAREZ 2000, DURNER *et al.* 1997, KLESSIG *et al.* 2000, PIETERSE *et al.* 1999).

Salizylsäure

Salizylsäure wird als wesentlicher Auslöser von Resistenzen in Pflanzen diskutiert (DURNER *et al.* 1997). In verschiedensten Pflanzenarten konnte das gemeinsame Auftreten von Zelltod und erhöhten Werten von Salizylsäure nach Pathogenbefall nachgewiesen werden (O'DONELL *et al.* 2001, RAO und DAVIS 2000). Dabei scheint allerdings die Konzentration der Salizylsäure eine wichtige Rolle zu spielen. Während eine starke Induktion der Salizylsäuregehalte zum Zelltod führte, induzieren leicht erhöhte Konzentrationen Abwehrantworten (ALVAREZ 2000, RAO und DAVIS 1999). In vorliegender Arbeit wurden freie und konjugierte Salizylsäurekonzentrationen in pathogenbehandelten Kartoffelpflanzen untersucht. Dabei wurden die Salizylsäuregehalte verschiedener Kartoffelsorten, die ein unterschiedliches Resistenzverhalten gegenüber *P. infestans* aufweisen, gemessen. Weiterhin wurde untersucht, ob das Pflanzenalter eine wesentliche Rolle bei der Induktion von Salizylsäure bei der Pathogenabwehr spielt. Hierbei konnten in allen vier Sorten hohe konstitutive Gehalte an gebundener und freier Salizylsäure detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte von YU *et al.* (1997) ebenfalls gezeigt werden. Hier wurde eine bis zu 100 fach höhere Salizylsäurekonzentration in Kartoffelpflanzen verglichen mit *A. thaliana* oder Tomate festgestellt. Dabei konnten in vorliegender Arbeit aber keine Unterschiede zwischen den einzelnen Sorten beobachtet werden. Die äußerst anfällige Sorte Bintje, sowie die Sorten Indira und Bettina und die resistente Sorte Kuras zeigten gleiche konstitutive Salizylsäurekonzentrationen auf. Allerdings lag der Gehalt an gebundener Salizylsäure bei den vier Wochen alten Pflanzen aller Sorten über den Gehalten der zwei und sechs Wochen alten Pflanzen. Dabei korreliert dieses Ergebnis allerdings nicht mit der beobachteten Anfälligkeit der unterschiedlich alten Pflanzen gegenüber *P. infestans*.

Auch die Ergebnisse der Inokulationsexperimente der Kartoffelpflanzen der verschiedenen Sorten mit *P. infestans* zeigten, dass in Kartoffel die Pathogenabwehr

SA unabhängig abläuft. So konnte bei den zwei, vier und sechs Wochen alten Pflanzen weder bei der anfälligen Sorte Indira noch bei der resistenten Sorte Kuras eine Induktion der gebundenen sowie freien Salizylsäure beobachtet werden. Auch bei der toleranten Sorte Bettina war kein signifikanter Anstieg der SA-Gehalte zu erkennen. Yu *et al.* (1997) konnten durch Auftragen exogener SA keine Steigerung der Resistenz bei Kartoffelpflanzen hervorrufen. Auch bei Tomate konnten SMART *et al.* (2003) feststellen, dass die Resistenz gegenüber *P. infestans* SA-unabhängig ist. Kartoffelmutanten (*NahG*), die nicht in der Lage sind SA zu akkumulieren, sind trotz geringerer Mengen an SA nicht anfälliger gegen *P. infestans* (Yu *et al.* 1997). Die Ergebnisse zeigen, dass Salizylsäure keine Rolle für die Resistenz der Kartoffelblätter gegenüber *P. infestans* spielt und bestätigen somit auch die Ergebnisse von COQUOZ *et al.* (1995). Yu *et al.* (1997) postulieren, dass bei Kartoffel die SA-abhängige Signaltransduktion schlecht funktioniert. Unbestritten ist die Beteiligung von Salizylsäure bei der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) verschiedener anderer Pflanzenarten, die sich nach einer lokalen Infektion mit nekrotisierenden Pathogenen entwickeln kann und mit einer lang andauernden Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen einhergeht (ALVAREZ 2000, DURNER *et al.* 1997, KLESSIG *et al.* 2000). Doch nach YU *et al.* (1997) ist in Kartoffel auch die SAR unabhängig von SA. In distalen Blättern konnten nach Infektion ebenfalls keine erhöhten Pegel an SA gefunden werden.

Aufgrund der Annahme, dass der Abwehrmechanismus von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* SA-unabhängig ist, wurden keine weiteren Untersuchungen der Salizylsäurekonzentrationen in Abhängigkeit von CO₂- und N-Konzentrationen durchgeführt.

Ethylen

Einen Zusammenhang zwischen der Emission des gasförmigen Pflanzenhormons Ethylen und der Antwort von Pflanzen auf Pathogenbefall ist schon seit den 1970er Jahren bekannt (HISLOP und STAHMANN 1971, MONTALBINI und ELSTNER 1977). Daher wurde im Rahmen vorliegender Arbeit der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf die Ethylenemission nach Pathogenbehandlung untersucht. Mit Zunahme der Befallsstärke der Blätter stieg die Ethylenemission stark an. Dabei korrelierte die Ethylenemission der Blätter innerhalb der unterschiedlichen CO₂- und N-Behandlungsvarianten mit dem Befall durch *P. infestans*. Pflanzen, die mit einer erhöhten N-Gabe versorgt wurden, waren gegenüber *P. infestans* anfälliger und

emittierten mehr Ethylen. Dies konnte sowohl bei den Pflanzen die unter 400 ppm CO₂, als auch bei Pflanzen die unter 700 ppm CO₂ aufwuchsen, festgestellt werden. Pflanzen, die unter einer erhöhten CO₂-Konzentration aufgezogen wurden, waren wiederum weniger anfällig gegenüber *P. infestans* als solche, die unter ambienten CO₂-Bedingungen aufwuchsen. Auch hier korrelierte die Ethylenemission ebenfalls mit der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans* (Abbildung 57). Dabei war bei allen Behandlungsvarianten ein drastischer Anstieg der Ethylenemission an Tag 3 nach Inokulation von 2-4 nmol Ethylen/ml auf über 20 nmol Ethylen/ml zu verzeichnen. Dieser Anstieg steht im Einklang mit dem Auftreten erster sichtbarer Befallssymptome (Nekrosen) durch *P. infestans*. Darauf folgte eine schnelle Ausbreitung wässriger Läsionen über die gesamte Blattspreite.

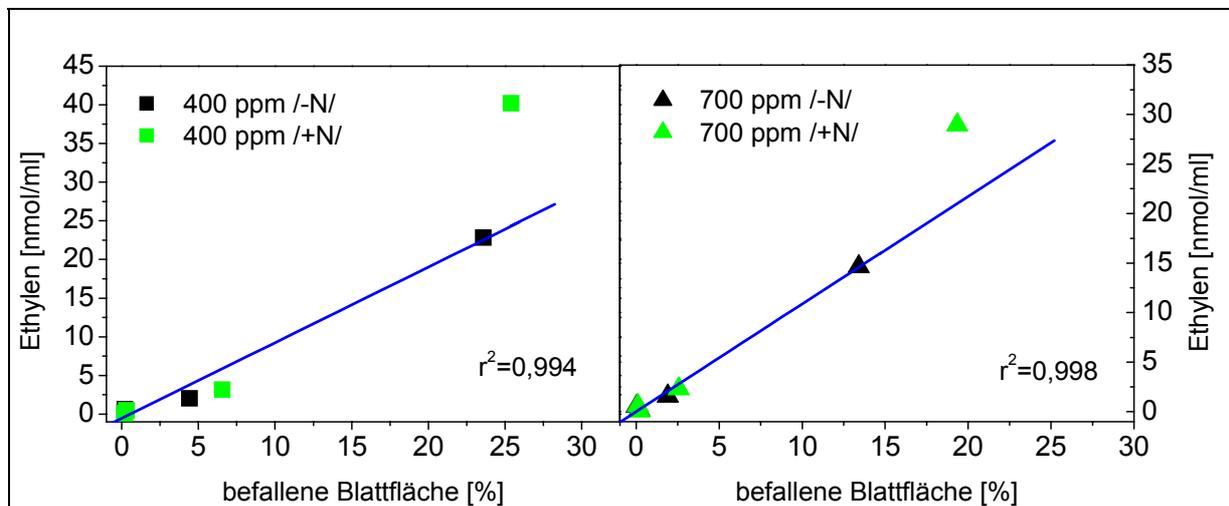


Abbildung 57: Korrelationen der Ethylenemission [nmol/ml] mit der befallenen Blattfläche [%] durch *P. infestans* bei Kartoffelpflanzen der Sorte Indira, die entweder mit 400 ppm (links) oder 700 ppm CO₂ (rechts) und zwei unterschiedlichen N-Konzentrationen behandelt wurden.

CHEN *et al.* (2003) konnten nach Inokulation von Tabak mit *Colletotrichum destructivum*, einem hemibiotrophen Pathogen, einen biphasischen Verlauf der Ethylenemission feststellen. Dabei scheint der erste schwächere Peak in der biotrophen Phase des Pathogens 24 h nach Inokulation aufzutreten, der zweite Peak mit der nekrotrophen Phase von *Colletotrichum destructivum* und dem Auftreten von wässrigen Läsionen zusammenzufallen.

Eine exogene Applikation von Ethylen bei Tomatenpflanzen führte zu einer verminderten Anfälligkeit gegenüber *B. cinerea*, während die Behandlung mit Inhibitoren der Ethylenperzeption in stärker ausgeprägten Symptomen resultierte (DÍAZ *et al.* 2002). Andererseits fördert Ethylen Seneszenz und Fruchtreife. Dies kann manchen nekrotrophen Pathogenen die Infektion leichter ermöglichen (ABELES *et al.*

1992, DÍAZ *et al.* 2002). Zusätzlich fördert Ethylen die Entwicklung von Nekrosen (LUND *et al.* 1998). In Ethylen-insensitiven Tomatenpflanzen führt eine Infektion mit den virulenten Bakterienstämmen *Xanthomonas campestris* oder *Pseudomonas syringae* zu einer abgeschwächten Symptomentwicklung. Eine defekte Ethylenperzeption etabliert in diesem Beispiel eine erhöhte Toleranz in den Pflanzen. (O'DONNELL *et al.* 2001). Versuche mit der *A. thaliana* Ethylen-Perzeptionsmutante *ein2-1* zeigten, dass diese anfälliger gegenüber der Zuckerrüben-Nematode, einem biotrophem Pathogen, aber gleichzeitig toleranter gegenüber *Botrytis cinerea*, einem nekrotrophen Pathogen waren (THOMMA *et al.* 1999). Diese Beispiele lassen erkennen, dass die Beteiligung von Ethylen-vermittelten Abwehrreaktionen, je nach Pathogen/Wirtkombination zu einer verstärkten oder erniedrigten Anfälligkeit führt. THOMMA *et al.* (1999) postulieren, dass Ethylen bei Interaktionen mit nekrotrophen Pathogenen als Signal zur Stimulierung von Abwehrreaktionen dient, wohingegen Ethylen bei biotrophen Pathogen-Interaktionen die Ausbreitung der Läsionen fördert. Nach Ergebnissen dieser Arbeit scheint die Ethylenbildung von Kartoffelpflanzen bei einer Infektion mit *P. infestans*, einem hemibiotrophen Pathogen, eher die Stärke der Infektion widerzuspiegeln, als Teil einer erfolgreichen Abwehr gegen *P. infestans* zu sein und bestätigt so die Annahme von THOMMA *et al.* (1999) und PARADIES *et al.* (1980), dass Ethylen die Ausbreitung der Läsionen fördert.

Oxylipine als Signalmoleküle in der Pathogenabwehr

Während der Ausprägung der HR ist die irreversible Schädigung von Membranen, verbunden mit der Peroxidation vielfach ungesättigter Fettsäuren, eine physiologische Veränderung innerhalb der Zelle (KEPPLER und NOVACKY 1987). Diese Lipidperoxidation kann durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder die Aktivierung von Lipoxygenasen (LOXen) hervorgerufen werden (KEPPLER und NOVACKY 1987).

Im Verlauf der Pathogenese wird in zahlreichen Interaktionen zwischen Pflanzen und ihren Pathogenen die Akkumulation von LOX-Transkripten beobachtet (Übersicht in: ROSAHL 1996). Die im LOX-Reaktionsweg entstehenden Hydroperoxid-Derivate der vielfach ungesättigten Fettsäuren (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) und die daraus resultierende Vielfalt an Oxylipinen, die in pathogenbefallenen Zellen gebildet werden, können toxisch auf eindringende Mikroorganismen wirken oder als Signalmoleküle für benachbarte Zellen dienen und die Synthese von PR-Proteinen sowie Phytoalexinen aktivieren (Übersicht in: ROSAHL 1996, BLEÉ 1998). Im

Gegensatz zu den bereits intensiv untersuchten Produkten des 13-LOX-Reaktionsweges, wie z.B. den Jasmonaten (BLEÉ 1998) sind die Funktionen der Produkte des 9-LOX Reaktionsweges bei Abwehrreaktionen bisher nur wenig untersucht worden. Es scheint jedoch den Divinylethern eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr zuzukommen. Das Vorkommen von Divinylethern konnte in höheren Pflanzen bisher nur in drei Arten (*Allium sativum*, *Lycopersicum esculentum* und *Solanum tuberosum*) aufgezeigt werden (GRECHKIN 1998). In vorliegender Arbeit konnten die Divinylether Colnensäure (CA) und Colnelensäure (CnA) in den verwendeten Kartoffelpflanzen detektiert werden. Dabei traten konstitutiv bei den zwei Sorten Indira und Bettina keine Unterschiede auf, die Gehalte lagen unter 5 nmol/g TS. Auch hatte eine Behandlung der Pflanzen mit 700 ppm CO₂ und einer erhöhten N-Düngung keinen Einfluss auf die konstitutiven Gehalte der Divinylether. Zur Beantwortung der Frage, ob die Divinylether bei der Abwehr von Pathogenen eine Rolle spielen, wurden die verwendeten Kartoffelpflanzen mit *P. infestans* sowie *A. solani* inokuliert. Nach sichtbar werden der ersten Befallssymptome drei Tage nach Inokulation konnte bei allen Behandlungsvarianten eine deutliche Induktion der Divinylether beobachtet werden. Eine Akkumulation dieser Verbindungen wurde auch von WEBER *et al.* (1999) in Kartoffel nach Inokulation mit *P. infestans* beschrieben.

Dabei korrelierte die Induktion der Divinylether innerhalb der unterschiedlichen CO₂- und N-Behandlungsvarianten mit dem Befall durch *P. infestans* (Abbildung 58). Pflanzen, die mit einer erhöhten N-Gabe versorgt wurden, waren gegenüber *P. infestans* anfälliger und akkumulierten mehr CnA und CA. Dies konnte sowohl bei den Pflanzen, die unter 400 ppm CO₂ als auch bei Pflanzen, die unter 700 ppm CO₂ aufwuchsen, festgestellt werden. Pflanzen, die unter Hoch-CO₂ aufgezogen wurden, waren wiederum weniger anfällig gegenüber *P. infestans* als solche, die unter ambienten CO₂-Bedingungen aufwuchsen. Auch hier korrelierte die Induktion der Divinylether mit der Anfälligkeit der Blätter gegenüber *P. infestans*.

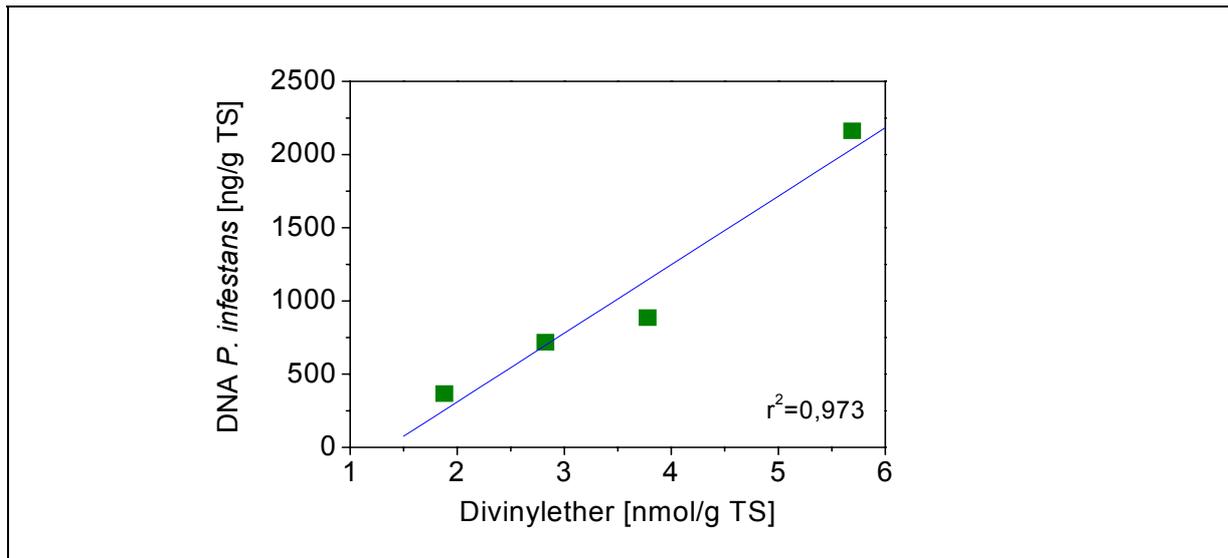


Abbildung 58: Korrelationen der Gehalte an Divinylethern [ng/g TS] mit der Befallsstärke der Blätter durch *P. infestans* als Menge DNA [ng/g TS] bei Kartoffelpflanzen der Sorte Indira an Tag 3 nach Inokulation. Hierbei wurden die Werte aller Varianten (400/700 ppm CO₂, +N/-N) berücksichtigt.

Auch bei der Interaktion von *A. solani* mit den Kartoffelsorten Indira und Bettina ist eine positive Korrelation zwischen der befallenen Blattfläche und der Höhe der Induktion der Divinylether zu beobachten (Abbildung 59). Wiederum werden die Divinylether in den Blättern, die anfälliger gegenüber *A. solani* sind, stärker induziert.

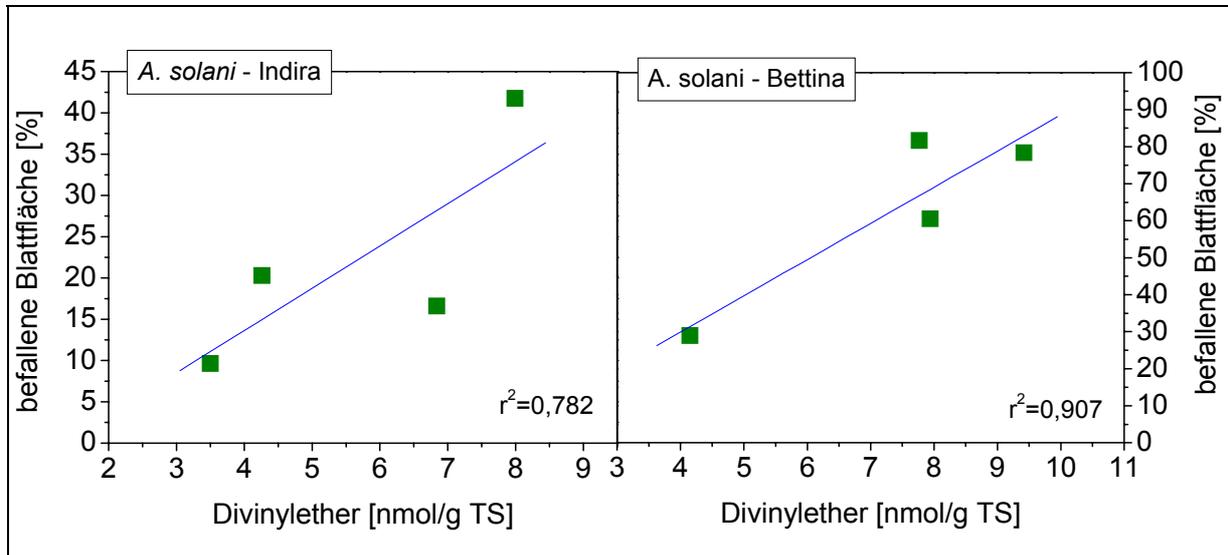


Abbildung 59: Korrelationen der Gehalte an Divinylethern [ng/g TS] mit der befallenen Blattfläche [%] durch *A. Solani* bei Kartoffelpflanzen der Sorte Indira (links) und Bettina (rechts) an Tag 3 nach Inokulation. Hierbei wurden die Werte aller Varianten (400/700 ppm CO₂, +N/-N) berücksichtigt.

Dieser Anstieg korreliert somit mit der Anzahl an befallenen Zellen. In der Summe scheint so die Induktion der anfälligeren Blätter höher als die Induktion der toleranteren Blätter, bei denen nur wenige Zelle infiziert sind.

SMART *et al.* (2003) konnten in Tomate eine verstärkte Genexpression der Enzyme der Divinylethersynthese nach Inokulation mit *P. infestans* bei der toleranten Interaktion aufzeigen. WEBER *et al.* (1999) postulierten, dass in einer inkompatiblen Interaktion von Kartoffel und *P. infestans* die Akkumulation bereits zwei Tage nach Inokulation induziert wurde, hingegen in der kompatiblen Interaktion erst drei Tage nach Inokulation eine Akkumulation von CA und CnA auftritt. Zur Induktion von CA und CnA an Tag 2 nach Inokulation kann jedoch im Rahmen dieser Arbeit keine Aussage getroffen werden.

Vernetzung der Pathogen-induzierten Abwehrwege

Von mehreren Gruppen wurde postuliert, dass ein Salizylsäure-abhängiger Signalweg Ethylen- und Jasmonsäure-unabhängig sei und vor allem von biotrophen Pathogenen induziert wird, während ein Ethylen/Jasmonsäure-abhängiger Weg vorwiegend von nekrotrophen Pathogenen aktiviert wird und in der Regel SA-unabhängig ist (MCDOWELL und DANGL 2000, DONG 1998). O'DONELL *et al.* (2001) zeigten jedoch, dass auch ein gleichberechtigtes Wirken von SA und Ethylen möglich ist. O'DONNELL *et al.* (2003) postulieren sogar, dass Ethylen regulierend auf die SA-Akkumulation wirkt.

Bei der inkompatiblen Interaktion von pflanzlichen Zellen mit einem Pathogen kommt es in der Regel zur Ausbildung eines zweiphasigen „oxidativen bursts“, wobei die erste Phase als unspezifische Antwort auf Stresssituationen zu betrachten ist, während die zweite Phase mit der Resistenzausbildung korreliert (GRANT *et al.* 2000). Im Verlauf der hypersensitiven Reaktion kommt es häufig zum Zelltod. Dieser hypersensitive Zelltod wird als Suizid-Abwehr der Pflanze gegen avirulente Pathogene betrachtet und korreliert mit dem Eindämmen des Pathogenwachstums (SASABE *et al.* 2000). Auch in vorliegender Arbeit konnte eine Akkumulation von H₂O₂ nach Inokulation der Blätter mit *P. infestans* beobachtet werden. Dabei wurde die Akkumulation von H₂O₂ bei der toleranteren Sorte Bettina fünf Stunden nach Inokulation induziert, wohingegen bei der anfälligen Sorte Indira erst 24 Stunden nach Inokulation erste H₂O₂ Anreicherungen beobachtet werden konnten. VLEESHOUWERS *et al.* (2001) postulierten, dass die hypersensitive Reaktion die Hauptantwort auf den Befall von Kartoffelblättern mit *P. infestans* ist. Dabei ist nach VLEESHOUWERS *et al.* (2001) das Ausmaß und vor allem die Schnelligkeit der HR entscheidend dafür, ob sich eine Infektion mit *P. infestans* ausbreiten kann oder nicht. Als Modell-System für endogen erzeugten oxidativen Stress wurden von

CHAMNONGPOL *et al.* (1998) Tabakpflanzen einer Katalase 1-Antisense-Linie eingesetzt, deren Katalaseaktivität in den Blättern um 90 % reduziert war. Eine Starklichtbehandlung führte zu vermehrter H₂O₂-Produktion, die durch die verringerte Katalaseaktivität nicht mehr abgefangen werden konnte, was schließlich zur Ausprägung von Läsionen führte. Außerdem kam es zu einem Anstieg der Salizylsäuregehalte (CHAMNONGPOL *et al.* 1998). Die Induktion von sauren PR-Proteinen wird dabei über Salizylsäure vermittelt (VAN LOON und VAN STRIEN 1999). Salizylsäure selbst kann wiederum durch H₂O₂ induziert werden (VAN BREUSEGEM *et al.* 2001). Durch Infiltration des H₂O₂-erzeugenden Systems Glukose/Glukose Oxidase und dem O₂⁻-erzeugenden Systems Xanthin/Xanthin Oxidase konnten erhöhte Salizylsäuremengen induziert werden (JABS *et al.* 1996). MÖDER (1999) konnten durch Infiltration des Glukose/Glukose Oxidase Systems im infiltrierten Bereich Läsionsbildung nachweisen, was wiederum für eine Beteiligung der ROS bei der Ausbildung von Zelltod spricht. RAO und DAVIS (1999) schließen, dass äußerst hohe Salizylsäurekonzentrationen zu einer Potenzierung der ROS-Akkumulation führen und damit der programmierte Zelltod induziert wird. Hingegen konnte von SMART *et al.* (2003) und YU *et al.* (1997) aufgezeigt werden, dass das Auftreten von Resistenzen nicht mit der Induktion von Salizylsäure korreliert, wie auch in dieser Arbeit bei der Interaktion von Kartoffel und *P. infestans* gezeigt werden konnte.

O'DONNELL *et al.* (2003) konnten an Tomatenmutanten, die einen Defekt in der Jasmonatsynthese aufweisen, beobachten, dass diese keine Ethylenemission und SA-Anreicherung nach Pathogenbefall aufzeigten. Auch die Befallssymptome waren deutlich verringert. O'DONNELL *et al.* (2003) postulieren, dass ein positives Zusammenspiel aller drei Signalmoleküle für die Symptomausprägung notwendig sei. Weiterhin gehen sie davon aus, dass nicht Jasmonsäure alleine für das Zusammenspiel verantwortlich ist, sondern die gesamte Anreicherung verschiedener Oxylipine die Stressantwort bedingt. Auch RUSTERUCCI *et al.* (1999) diskutieren einen von „primären“ ROS-unabhängigen (O₂⁻, H₂O₂, OH[•], usw.) Mechanismus der Zelltodaktivierung durch freie Lipidhydroperoxide im Wirt-Elicitor-System bei Tabak.

Durch Pathogenbefall kommt es weiterhin zu einer Induktion der Ethylenbiosynthese (CHEN *et al.* 2003). Basische PR-Proteine werden ethylenvermittelt induziert (WANG *et al.* 2002). Nach MÖDER (1999) wird durch eine auftretende ROS-Anreicherung die Ethylenbiosynthese induziert. Ethylen wirkt aber auch regulierend auf die H₂O₂-Bildung und den Zelltod (OVERMYER *et al.* 2003). In dieser Arbeit konnte gezeigt

werden, dass die Ethylenemission mit der Ausbreitung von Läsionen korreliert und scheint so eher die Stärke der Infektion widerzuspiegeln, als Teil einer erfolgreichen Abwehr gegen *P. infestans* zu sein. In der *Arabidopsis*-Mutante *rcd1* konnte nachgewiesen werden, dass das Pflanzenhormon Ethylen als „promoting factor“ während der Ausbreitungsphase der sich entwickelnden, ROS-abhängigen Läsionen wichtige Funktionen übernimmt (OVERMYER *et al.* 2000). Weiterhin diskutieren WANG *et al.* (2002) einen starken Einfluss von Ethylen auf SA-abhängige Genexpression, die zur Abwehr von Pathogenen dient. So konnten CLARKE *et al.* (2000) an Versuchen mit *A. thaliana* zeigen, dass das PR-Protein PR-1, welches SA-abhängig induziert wird, bei Mutanten, die einen Defekt in der SA-Synthese aufweisen, erst vollständig inaktiviert wird, wenn auch gleichzeitig ein Defekt in der Ethylensynthese vorhanden war.

Für die Ausbildung des Zelltods werden also mehrere Faktoren benötigt und es scheint ein komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Signalwege zu geben. Es kann je nach Pathogen/Wirtkombination zu einer verstärkten oder verminderten Anfälligkeit durch das antagonistische oder synergistische Zusammenwirken der verschiedenen Signalwege kommen. In Abbildung 60 im Modell des „Oxidativen-Zelltod-Zyklus“ werden die verschiedenen Signalwege zusammengefasst dargestellt.

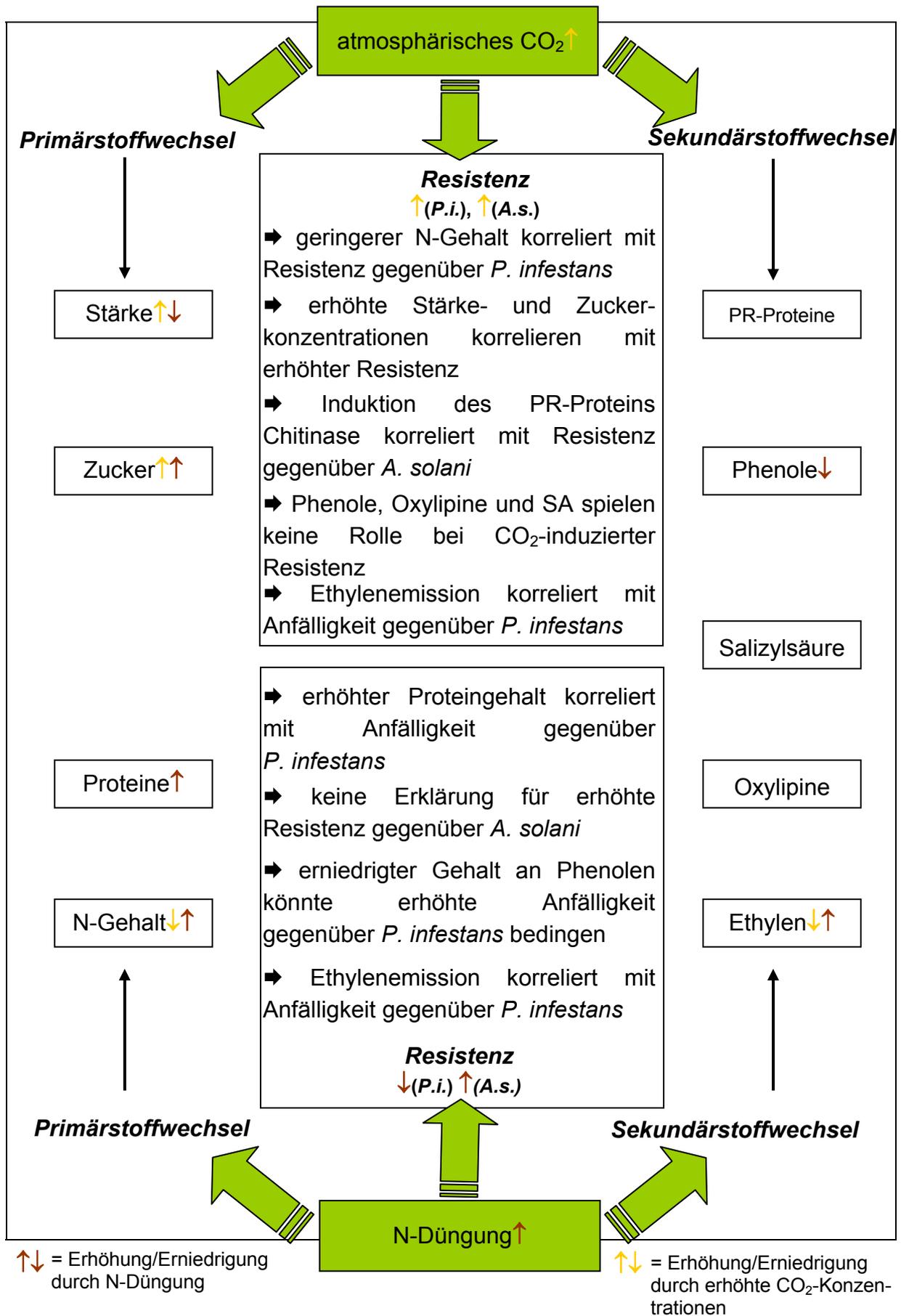


Abbildung 61: Einfluss erhöhter CO₂-Konzentrationen und erhöhter N-Düngung auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* (*P.i.*) und *A. solani* (*A.s.*).

Die zentrale Hypothese des SFB 607-Wachstum und Parasitenabwehr

„Unabhängig vom Typus einwirkender Faktorenszenarien
reguliert die Pflanze ihre Stoffallokation auf eine Weise,
dass Steigerung der Stresstoleranz (insbesondere der Pathogenabwehr)
zu Einschränkungen in Wachstum und Konkurrenzverhalten führt.“

ZENTRALE HYPOTHESE DES SFB 607

Gemäß der zentralen Hypothese des SFB 607 geht eine erfolgreiche Abwehr eines Pathogens auf Kosten des Wachstums und somit auch des Ertrags. Nach HEIL und BALDWIN (2002) gibt es verschiedene Arten von „Kosten“ zu beachten. Sie sprechen dabei einerseits von „Allokationskosten“, die bei der Verlagerung von Ressourcen hin zur Abwehr und weg von Wachstum auftreten und andererseits von „konstitutiven Kosten“, welche durch die Möglichkeit, induzierbare Abwehrmechanismen abrufen zu können, entstehen. Weiterhin entstehen der Pflanze „Kosten“ durch die Bereitstellung antioxidativer Systeme zur Entgiftung produzierter Abwehrstoffe.

Doch stellt sich auch die Frage, ob bei dem beschriebenen Szenario wirklich von Kosten als Konflikt gesprochen werden kann. Stellt sich nicht eher eine Balance zwischen der Ressourcenallokation ein?

Die Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 700 ppm hatte in vorliegender Arbeit keinen Effekt auf die Biomasseproduktion der Pflanzen. Dies wurde auch von LAWSON *et al.* (2001) durch eine Erhöhung der CO₂-Konzentration auf 680 ppm für Kartoffel beschrieben. Zwar wurde der Primärstoffwechsel durch eine erhöhte CO₂-Konzentration in dieser Arbeit gefördert, was sich in gesteigerten Stärke- und Zuckergehalten widerspiegelte, doch schlug sich dies nicht in einem gesteigerten Wachstum nieder. Dagegen aber waren die Pflanzen der Hoch-CO₂-Variante toleranter gegenüber *P. infestans* und *A. solani*. So kann festgestellt werden, dass auf zusätzliches Wachstum einerseits verzichtet wurde, aber dafür die Resistenz gesteigert wurde. Von XIAO *et al.* (2000) und ROITSCH *et al.* (1999) werden Glukose und Saccharose als Signalmoleküle in der pflanzlichen Abwehr diskutiert. Eine zusätzliche N-Düngung konnte das Wachstum der Kartoffelpflanzen induzieren, und gleichzeitig waren diese Pflanzen anfälliger gegenüber *P. infestans*. Betrachtet man aber das Verhalten der Kartoffelpflanzen gegenüber *A. solani*, so konnte gezeigt werden, dass diese durch eine zusätzliche N-Düngung toleranter gegenüber *A. solani* wurden. Somit ist die Aussage „Pflanzen regulieren ihre Stoffallokation auf

eine Weise, dass eine Steigerung der Stresstoleranz, insbesondere der Pathogenabwehr zu Einschränkungen in Wachstum und Konkurrenzverhalten führt“ nicht allgemeingültig. Verschiedene Wirt/Parasit-Interaktionen induzieren unterschiedliche Strategien in Pflanzen. Diese Aussage wird durch die Wirt/Parasit Systeme Buche/*P. citricola* oder Apfel/*Venturia inaequalis* und *Phytophthora cactorum* gestärkt. Bei der Interaktion von Buche und *P. citricola* führte eine erhöhte CO₂-Konzentration zu einer gesteigerten Anfälligkeit der Buchen gegenüber dem Wurzelpathogen. Eine doppelte Stickstoffdüngung reduzierte die Anfälligkeit der Buchen gegenüber *P. citricola* (FLEISCHMANN *et al.* 2004). Hingegen führte eine zunehmende Verfügbarkeit von N bei Apfel (*Malus domestica*) wieder zu einer deutlich verringerten Pathogenabwehr (*Venturia inaequalis* und *Phytophthora cactorum*). Ein erhöhter CO₂-Gehalt der Atmosphäre konnte die Anfälligkeit von Apfel gegenüber Pathogenen leicht erniedrigen (RÜHMANN *et al.* 2002). Somit muss die zentrale Hypothese für verschiedene Wirt/Parasit-Interaktionen getrennt betrachtet und gegebenenfalls verifiziert werden.

Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten Unterschiede im Resistenzverhalten der beiden Kartoffelsorten Indira und Bettina gegenüber *P. infestans* und *A. solani* aufgezeigt werden. Dabei wurde ein gegensätzliches Verhalten der Sorten gegenüber den beiden Pathogenen festgestellt. Es konnte gezeigt werden, dass die gegenüber *P. infestans* tolerantere Sorte Bettina gegenüber *A. solani* anfälliger, und die gegenüber *P. infestans* anfälligere Sorte Indira gegenüber *A. solani* resistenter ist. Weiterhin konnte ein Einfluss erhöhter CO₂-Konzentration sowie N-Düngung auf das Resistenzverhalten von Kartoffel aufgezeigt werden.

Es stellt sich die Frage, welche Signaltransduktionswege dazu führen, dass sich die beiden Sorten in der Anfälligkeit gegenüber *A. solani* im Gegensatz zu der beschriebenen Toleranz gegenüber *P. infestans* verhalten und welche Veränderungen durch eine erhöhte CO₂-Konzentration sowie erhöhte N-Düngung in der Zelle hervorgerufen werden. Ergebnisse dieser Arbeit zu Untersuchungen von Parametern des Primär- und Sekundärstoffwechsels ergaben dabei verschiedene Korrelationen zur Resistenzausprägung (vgl. Abbildung 61), wobei offen bleibt, welche Faktoren letztendlich für die beobachtete Resistenz bzw. Anfälligkeit der Sorten verantwortlich sind. Dabei wäre es sinnvoll, weitere Signalwege, die in diesen Wirt-Pathogen-Systemen beteiligt sein könnten, zu untersuchen. Um dies klären zu können gilt es besonders, Enzymaktivitäten und die Regulation von Enzymen der Abwehr zu untersuchen (PICHESKY und GANG 2000). Das Fehlen des Enzymaktivierenden Ca²⁺-Einstroms oder von Phosphorylierungsprozessen, die durch spezifische Kinasen, wie z.B. der Calcium-abhängigen Proteinkinase (CDPK, XING *et al.* 1996, ROMEIS *et al.* 2000) oder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK, SAMUAEL *et al.* 2000, KATOU *et al.* 2003) katalysiert werden, könnten mögliche Ansatzpunkte darstellen. In der Literatur wird auch NO als wichtiger Botenstoff bei der Abwehr von Pathogenen diskutiert (BELIGNI und LAMATTINA 2001, DURNER *et al.* 1998). YAMAMOTO *et al.* (2003) postulieren für Kartoffel einen NO-abhängigen Signaltransduktionsweg. NORITAKE *et al.* (1996) konnten bei der Behandlung von Kartoffelblättern mit einem NO-generierenden System (NOC18) die Induktion von Phytoalexinen nachweisen. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Signaltransduktionswege letztendlich zur Resistenzausprägung von Kartoffel gegenüber *P. infestans* oder *A. solani* führen.

V ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von CO₂ und Stickstoff auf das Resistenzverhalten von Kartoffelpflanzen gegenüber *Phytophthora infestans*, einem hemibiotrophen Pathogen und *Alternaria solani* als Vertreter nekrotropher Parasiten untersucht. Dabei waren verschiedene in der Literatur diskutierte Resistenzfaktoren von besonderem Interesse.

(1) Eine Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 700 ppm führte zu einer Reduzierung der Anfälligkeit der Kartoffelpflanzen gegenüber *P. infestans* und *A. solani*. Eine zusätzliche N-Gabe (0,8 g N/Pflanze) konnte diese induzierte Resistenz der Pflanzen gegenüber *P. infestans* teilweise aufheben. Pflanzen, die unter erhöhten Stickstoffkonzentrationen aufwuchsen, waren deutlich anfälliger gegenüber *P. infestans* als solche, die ohne zusätzliche N-Düngung auskamen. Im Gegensatz dazu hatte eine N-Düngung eine resistenzfördernde Wirkung auf die Interaktion zwischen Kartoffelpflanzen und *A. solani* (Abbildung 62).

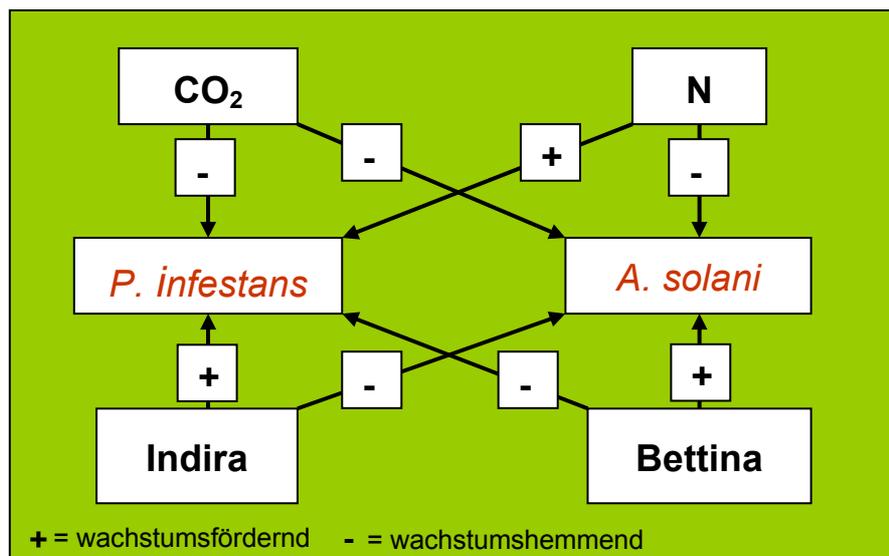


Abbildung 62: Zusammenspiel verschiedener Umweltfaktoren (CO₂, N) und zweier Kartoffelsorten (Indira, Bettina) sowie deren Resistenzverhalten gegenüber *P. infestans* und *A. solani*.

(2) Dabei verschoben die erhöhten CO₂-Konzentrationen den Stickstoffstatus der Pflanzen deutlich zugunsten des Kohlenstoffhaushalts. Pflanzen die unter erhöhten CO₂-Konzentrationen aufwuchsen, wiesen höhere Konzentrationen der Kohlenhydrate **Glukose**, **Saccharose** und **Stärke** und geringere Stickstoffkonzentrationen auf. Dies spiegelte sich in einem erhöhten **C/N-Verhältnis** der Blätter sowie der Knollen wieder. Eine Stickstoffapplikation konnte den Stickstoffstatus der Pflanzen verbessern, was sich in der Abnahme des C/N-Verhältnisses der Blätter und Knollen zeigte.

(3) Die konstitutiven Gehalte an **phenolischen Inhaltsstoffen** wurden durch eine erhöhte N-Düngung erniedrigt, was in einer gesteigerten Anfälligkeit der Pflanzen gegenüber *P. infestans* resultierte. Eine erhöhte CO₂-Konzentration hatte hingegen keine Auswirkungen auf den Gesamtphenylpropanoidgehalt. Die Phenylpropanoide **p-Cumaroylnoradrenalin** und **p-Cumaroyloctopamin** wurden durch Inokulation der Blätter mit *P. infestans* sowie *A. solani* deutlich induziert.

(4) Eine Induktion der **PR-Proteine** (pathogenesis related proteins) Chitinase, β -1,3-Glukanase oder Osmotin konnte durch Behandlung der Kartoffelblätter mit *A. solani* oder *P. infestans* nachgewiesen werden. Allerdings konnte nur bei den Chitinasen gegenüber *A. solani* eine eindeutige resistenzfördernde Wirkung beobachtet werden.

(5) Nach Infektion der Blätter mit *P. infestans* konnte eine deutliche Induktion der **Ethylenemission** beobachtet werden. Blätter der Hoch-N-Variante, die anfälliger gegenüber *P. infestans* waren, emittieren dabei mehr Ethylen als die Blätter der Niedrig-N-Variante. Blätter der Hoch-CO₂-Variante emittierten im Vergleich zur Niedrig-CO₂-Variante weniger Ethylen, was wiederum eine Korrelation zwischen der Ethylenemission und der Infektionsanfälligkeit der Blätter zeigte.

(6) Die **Divinylether** Colnensäure (CA) und Colnelensäure (CnA) wurden durch Pathogenbefall deutlich induziert, doch kann noch keine Aussage, über ihre Rolle bei der Resistenzausprägung getroffen werden.

Zusammenfassend sind in Abbildung 63 die Auswirkungen erhöhter CO₂-Konzentrationen sowie einer erhöhten Stickstoffdüngung auf die untersuchten Parameter des Primär- und Sekundärstoffwechsels dargestellt.

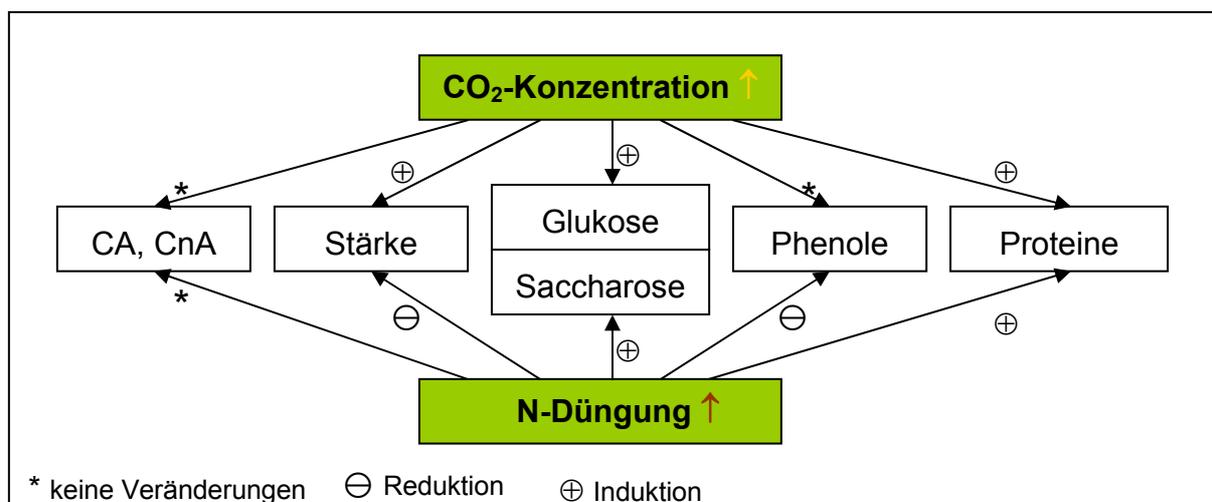


Abbildung 63: Veränderungen biochemischer Parameter in Kartoffelpflanzen aufgrund erhöhter CO₂-Konzentrationen und einer gesteigerten N-Düngung.

VI LITERATURVERZEICHNIS

- ABELES** FB, Morgan PW, Saltveit ME (1992): Ethylene in Plant Biology. New York: Academic Press.
- ALVAREZ** ME (2000): Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* **44**: 429-442.
- ALVAREZ** ME, Pennell RI, Meijer PJ, Ishikawa A, Dixon RA, Lamb C (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* **92**: 773-784.
- AMICUCCI** E, Gaschler K, Ward JM (1999): NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol* **1**: 524-528.
- AMTHOR** JS (1995): Terrestrial higher-plant response to increasing atmospheric CO₂ in relation to the global carbon cycle. *Global Change Biology* **1** (4): 243-274.
- ANDREU** A, Oliva C, Distel S, Daleo G (2001): Production of phytoalexins, glycoalkaloids and phenolics in leaves and tubers of potato cultivars with different degrees of field resistance after infection with *Phytophthora infestans*. *Potato Research* **44**: 1-9.
- BABIOR** BM (1999): Protein phosphorylation and the activation of the leukocyte NADPH oxidase. In *Different pathways through life*, eds. A. Denke, K. Dornisch, F. Fleischmann, Lincom. München, pp. 72-82.
- BAKER** C, Orlandi E (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 299-321.
- BAVARESCO** L, Eibach R (1987): Investigations on the influence of N fertilizer on resistance to powdery mildew (*Oidium tuckeri*) and downy mildew (*Plasmopara viticola*) and phytoalexin synthesis in different grapevine varieties. *Vitis* **26**: 192-200.
- BELIGNI** MV, Lamattina L (2001): Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends in Plant Science* **6**: 508-509.
- BELLÉS** JM, Garro R, Fayos J, Navarro P, Primo J, Conejero V (1999): Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 227-235.
- BEUTLER** HO (1984): Starch. In: Bergmeyer HU (Chef-Hrsg.), Bergmeyer J und Graßl M (Hrsg.): *Methods of enzymatic analysis—Volume VI: Metabolites 1: Carbohydrates*. Verlag Chemie; 3. Ausgabe; Weinheim: 2-10.
- BLACHINSKY** D, Shtienberg D, Dinoor A, Kafafi U, Sujkowski LS, Zitter TA, Fry WE (1996): Influence of foliar application of nitrogen and potassium on *Alternaria* diseases in potato, tomato and cotton. *Phytoparasitica* **24**: 281-292.

- BLÉE E** (1998): Phytooxylipins and plant defense reactions. *Prog Lipid Res* **37**: 33-72.
- BLUME B**, Nürnbergger N, Nass N, Scheel D (2000): Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* **12**: 1425-1440.
- BÖHM J**, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlmann R, Oßwald W (1999): Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology* **147**: 409-416.
- BOLWELL GP** (1999): Role of active oxygen species and NO in plant defence responses. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 287-294.
- BOWES G** (1993): Facing the inevitable: plants and increasing atmospheric CO₂. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 309 – 332.
- BOWES G** (1996): Photosynthetic Responses to Changing Atmospheric Carbon Dioxide Concentration. *Photosynthesis and the Environment* (Neil R. Baker ed.), 387 – 407, Kluwer Acad. Publishers.
- BOWLES DJ** (1990): Defense-related proteins in higher plants. *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907.
- BRADFORD MM** (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of a protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.
- BRYANT JP**, Chapin III FS, Reichardt P, Clausen T (1983): Carbon/nutrient balance of boreal plants in relation to vertebrate herbivory. *Oikos* **40**: 357-368.
- CARNEGIE S**, Colhoun S (1982): Susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans* in relation to plant age and leaf position. *Phytopathologische Zeitschrift* **104**: 157-167.
- CARNEGIE S**, Colhoun S (1983): Effects of plant nutrient on susceptibility of potato leaves to *Phytophthora infestans*. *Phytopathologische Zeitschrift* **108**: 242-250.
- CHAMNONGPOL S**, Willekens H, Moeder W, Langebartels C, Sandermann H, Van Montagu M, Inzé D, Van Camp W (1998): Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 5818-5823.
- CHELKOWSKI J**, VISCONTI A (1992): *Alternaria* – Biology plant diseases and metabolites. Elsevier Verlag Amsterdam.

- CHEN N**, Goodwin PH, Hsiang T (2003): The role of ethylen during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 2449-2456.
- CHENG SH**, Moore BD, Seemann JR (1998): Effects of short- CO₂ on the expression of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase / oxygenase genes and carbohydrate accumulation in leaves of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol.* **116**: 715-723 .
- CLARKE JD**, Volko SM, Ledford H, Ausubel FM, Dong X (2000) : Role of salicylic acid, jasmonic acid and ethylen in cpr-induced resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**: 2175-2190.
- COHN J**, Sessa G, Martin GB (2001): Innate immunity in plants. *Curr Opin Immunol* **13**: 55-62.
- COLON LT**, Budding DJ, Visker MH (2002): The effects of soil nitrogen on late blight resistance. In: Wenzel G, Wulfert I (Eds.) *Potatos today and tomorrow*, EAPR **15**: 100.
- CONRATH U**, Linke C, Jeblick W, Geiegnberger P, Quick P, Neuhaus HE (2003): Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tuber, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Plants* **19**: 75-83.
- CONRATH U**, Pieterse CM, Mauch-Mani B (2002): Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* **7**: 210-216.
- COQUOZ JL**, Buchala AJ, Meuwly Ph, Métraux JP (1995): Arachidonic acid induces local but not systemic synthesis of salicylic acid and confers systemic resistance in potato plants. *Phytopathology* **85**: 1219-1224.
- COTRUFO MF**, Ineson P, Scott A (1998): Elevated CO₂ reduces the nitrogen concentration of plant tissues. *Glob Cange Biol* **4**: 43-54.
- CRAIGON J**, Fangmeier A, Jones M, Donnelly A, Bindi M, De Temmermann L, Persson K, Ojanpera K (2002): Growth and marketable-yield responses of potato to increased CO₂ and ozone. *Europ J Agromomy* **17**: 273-289.
- CURE JD** und Acock B (1986): Crop responses to carbon dioxide doubling: A literature survey. *Agricultural and Forest Meteorology* **38**: 127-145.
- DANGL JD**, Jones JJ (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826-833.
- DAVIS RM**, Nunez J, Smart C (2000): Potato early blight. University of California Pest Management Guidelines (Stand 2001) <http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r607101311.html>

- DEAN RA, Kuc J (1989):** Immunisation against diseases: The plants fight back. In fungal infection of plants, Eds. Pegg GF, Ayers PG, Cambridge University Press: 383-410.
- DEL RIO JA, Gomez P, Biadez AG, Arcas MC, Botia JM, Ortuno A (2004):** Changes in the level of polymethoxyflavones and flavones as part of the defense mechanism of *Citrus sinensis* (Cv. Valencia Late) fruits against *Phytophthora citrophthora*. J Agric Food Chem **52**: 1913-1917.
- DELLEDONNE M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) :** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. Nature **394**: 585-588.
- DELLEDONNE M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001):** Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. Proc Natl Acad Sci USA **98**: 13454-13459.
- DESIKAN R, Mackerness AH, Hancock S, Neill SJ (2001):** Regulation of the *Arabidopsis* Transcriptome by Oxidative Stress. Plant Physiol **127**: 159-172.
- DÍAZ J, ten Have A, van Kan JA (2002):** The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. Plant Physiol **129**: 1341-1351.
- DIXON RA, Paiva NL (1995):** Stress-induced phenylpropanoid metabolism. Plant Cell **7**: 1085-1097.
- DONALD CE, RIBEIRO OK (1996):** *Phytophthora* Diseases Worldwide. The American Phytopathology Society, 3340 Pilot Knots Road, USA.
- DONG X (1998):** SA, JA, Ethylene and disease resistance in plants. Current Opinion in Plant Biology **1**: 316-323.
- DOREY S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S (1999):** Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. Plant Physiol **121**: 163-172.
- DRAKE BG, González-Meler MA, Long SP (1997):** MORE EFFICIENT PLANTS: A consequence of rising atmospheric CO₂? Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology **48**: 609-639.
- DURNER J, Shah J, Klessig DF (1997):** Salicylic acid and disease resistance in plants. Trends Plant Sci **2**: 266-274.
- DURNER J, Klessig DF (1999):** Nitric oxide as a signal in plants. Curr Opin Plant Biol **2**: 369-374.
- DURNER J, Wendehenne D, Klessig DF (1998):** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. Proc Natl Acad Sci USA **95**: 10328-10333.

- EBEL J, Mithöfer A (1998):** Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* **206**: 335-348.
- EL SHESHTAWI M, Dawood MK, Doss M (1988):** Host-pathogen relationship of potato to late blight (*Phytophthora infestans* (Mont.) De Barry) as promoted by nitrogen source in calcareous soil. *J Agr Sci* **13**: 735-742.
- ESSER G (1999):** Bedeutung der Mineralstoffe, insbesondere des Stickstoffs. In M. Heimann, C. Weber, J. C. Duinker, A. Körtzinger, L. Mintrop, N. Buchmann, E.-D. Schulze, M. Hein, A. Bondeau, W. Cramer, M. Lindner und G. Esser (Hg.), *Natürliche Senken und Quellen des atmosphärischen Kohlendioxids: Stand des Wissens und Optionen des Handelns.*, Report No, 287. Max-Planck-Institut für Meteorologie.
- FANGMEIER A, Jäger HJ (1998):** CO₂ enrichment, ozone, nitrogen fertilizer and wheat: physiological background of growth and yield responses. In: De Kok LJ, Stulen I (Eds.) *Responses of plant metabolism to air pollution and global change.* Backhuys Publ. Leiden, 299-304.
- FANGMEIER A, Jäger HJ (2001):** Wirkungen erhöhter CO₂-Konzentration. In Guderian R (Hrsg.) *Handbuch der Umweltveränderungen und Ökotoxikologie Band 2a: Terrestrische Ökosysteme,* Springer.
- FANGMEIER A, Chrost B, Högy P, Krupinska K (2000):** CO₂ enrichment enhances flag leaf senescence in barley due to greater grain nitrogen sink capacity. *Environmental and Experimental Botany* **44**: 151-164.
- FANGMEIER A, De Temmermann L, Black C, Persson K, Vorne V (2002):** Effects of elevated CO₂ and/or ozone on nutrient concentrations and nutrient uptake of potatoes. *Europ J Agromomy* **17**: 353-368.
- FARKAS GL, Kiraly Z (1962):** Role of phenolic compounds in the physiology of plant disease and disease resistance. *Phytopathologische Zeitschrift* **44**: 105-150.
- FARMER EE, Ryan CA (1992):** Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Plant Cell* **4**: 129-134.
- FEUCHT W, Schnid PS, Christ E (1985):** Flavonole und Wundheilung nach Hagelschäden beim Baumobst. *Obstbau Weinbau* **22**: 249-250.
- FEUCHT W, TREUTTER D (1989):** Phenolische Naturstoffe. Obst- und Gartenbauverlag, München.
- FEUCHT W, Treutter D, Christ E (1992):** The precise localisation of catechins and proanthocyanidins in protective layers around fungal infection. *Z Pflanzenkr Pflanzensch* **99**: 404-413.
- FEUCHT W, Treutter D, Christ E (2004):** Accumulation of flavonols in yellowing beech leaves from forest decline sites. *Tree Physiology* **14**: 403-412.

- FEUSSNER I, Kühn H, Wasternack C (2001):** Lipoxygenase-dependent degradation of storage lipids. *Trends Plant Sci* **6**: 268-273.
- FEYS BJ, Parker JE (2000):** Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics* **16 (10)**: 449 – 455.
- FIRMAN D, ALLEN E (1988):** Field measurements of the photosynthetic rate of potatoes grown with different amounts of nitrogen fertilizer. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **111**: 85-90.
- FLEISCHMANN F (2000):** Untersuchungen zur Resistenz von Kartoffeln gegen *Phytophthora infestans* mit Hilfe biochemischer Parameter. Dissertation am Lehrstuhl für Phytopathologie der TUM, Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München.
- FLEISCHMANN F, Göttlein A, Rodenkirchen H, Lütz C, Oßwald W (2004):** Investigations on biomass, nutrient content and pigments of beech (*Fagus sylvatica*) saplings infected with *Phytophthora citricola*, *P. cambivora*, *P. pseudosyringae* and *P. undulata*. *Forest Pathol* (in press).
- FLOR HH (1971):** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Reviews of Phytopathology* **9**: 275 – 296.
- FOYER C, Parry M, Noctor G (2003) :** Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of Experimental Botany* **54**: 585-593.
- FOYER CH, Lopez-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997):** Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiol Plant* **100**: 241-254.
- GEIGER M, Walch-Pui L, Harnecker J, Schulze ED, Ludewig F, Sonnewald U, Scheible WR, Stitt M (1998):** Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in higher plants. *Plant, Cell and Environment* **21**: 253-268.
- GEIGER M, Haake V, Ludewig F, Sonnewald U, Stitt M (1999):** The nitrate and ammonium nitrate supply have a major influence on the response of photosynthesis, carbon metabolism, nitrogen metabolism and growth to elevated carbon dioxide in tobacco. *Plant Cell Environ* **22**:1177.
- GERWICK WH, Moghaddam M, Hamberg M (1991):** Oxylin metabolism in the red alga *Gracilariopsis lemaneiformis*: mechanism of formation of vicinal dihydroxy fatty acids. *Arch Biochem Biophys* **290**: 436-444.
- GIBSON SI (2003):** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* **55**: 253-264.
- GÖBEL C (2003):** Untersuchungen zur Funktion von Oxylipinen bei der Pathogenantwort in *Solanum tuberosum* L. Dissertation, Universität Halle.

- GOJON A**, Dapoigny L, Lejay L, Tillard P, Rufty TW (1998): Effects of genetic modification of nitrate reductase expression on 15NO_3^- uptake and reduction in *Nicotiana* plants. *Plant, Cell and Environment* **21**: 43-53.
- GOVERS F**, Drenth A, Pieterse CMJ (1997): The potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* and other pathogenic *Oomycota*. In: *The Mycota V Part B Plant Relationships*. (Carroll G und Tudzinsky P) Springer, Berlin Heidelberg.
- GRAINGER J** (1962): The host plant as habitat for fungal and bacteria parasites. *Phytopathology* **52**: 140-150.
- GRANT J**, Yuon BW, Loake G (2000): Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of signal network that functions independently of ethylen, SA and MeJA but is dependent on MAPKK activity. *The plant Journal* **24**: 569-582.
- GRECHKIN A** (1998): Recent developments in biochemistry of the plant lipoxygenase pathway. *Prog Lipid Res* **37**: 317-352.
- GUNSTONE, F.D.** (1992) α -Linolenic Acid - Occurrence and physical and chemical properties. *Prog Lipid Res* **31**: 145-161.
- GUZMAN J** (1964): Nature of partial resistance of certain clones of three solanum species to *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* **54**: 1398-1404.
- HAMACHER J**, Giersiepen (1989): Histologisch-cytologische Veränderungen in Kirschblattrollvirus-infizierten und durch Luftschadstoffe gestressten *Betula*-Arten. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* **41**: 124-13.
- HAMMOND-KOSACK KE**, Jones JDG (2000): Responses to plant pathogens. In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. (Buchanan B, Gruissem W, Jones R) American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1102-1156.
- HARBORNE JB** (1980): Plant phenolics. In: Bell EA, Charlwood BV (Hrsg.): *Secondary plant products*, 329-402, Springer Verlag, Berlin.
- HARTLEY SE**, Jones CG, Couper GC, Jones TH (2000): Biosynthesis of plant phenolic compounds in elevated atmospheric CO_2 . *Global Change Biology* **6**: 497-506.
- HEATH MC** (2000): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 315-319.
- HEGGESTAD, HE** (1991): Origin of Bel-W3, Bel-C and Bel-B tobacco varieties and their use as indicators of ozone. *Environ Pollut* **74**: 264-291.
- HEIL M**, Baldwin IT (2002): Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science* **7**: 61-67.

- HERBERS** K, Meuwly P, Métraux JP, Sonnewald U (1996): Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *Federation of European Biochemical Societies Letters* **397**: 239-244.
- HERBERT** RJ, Vilhar B, Evett C, Orchard CB, Rogers HJ, Davies MS, Francis D (2001): Ethylene induces cell death at particular phases of the cell cycle in the tobacco TBY-2 cell line. *J Exp Bot* **52**: 1615-1623.
- HERLIHY** M (1970): Contrasting effects of nitrogen and phosphorus on potato tuber blight. *Plant Pathology* **19**: 65-68.
- HERMS** DA, Mattson WJ (1992): The dilemma of plants: to grow or to defend. *The Quarterly Review of Biology* **67**: 283-335.
- HIGGINS** VJ, Lu H, Xing T, Gelli A, Blumwald E (1998): The gene-for-gene concept and beyond: Interactions and signals. *Can J Plant Pathol* **20**: 150-157.
- HISLOP** EC, Stahmann MA (1971): Peroxidase and ethylene production by barley leaves infected with *Erysiphe graminis* f. sp. *horfei*. *Physiological Plant Pathol* **1**: 297-312.
- HOFFLAND** E, van Beusichem ML, Jeger MJ (1999): Nitrogen availability and susceptibility of tomato leaves to *Botrytis cinerea*. *Plant and Soil* **210**: 263-272.
- HOFFLAND** E, Jeger MJ, Van Beusichem ML (2000): Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and Soil* **218**: 239-247.
- HOFFMANN** GM, Schmutterer H (1983): Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- HORSFALL** JG, Dimond AE (1957): Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Z Pflanzenkr Pflanzenschutz* **27**: 415-421.
- HUANG** JS (2001): *Plant Pathogenesis and Resistance – Biochemistry and Physiology of Plant – Microbe Interactions*. KLUWER Academic Publishers, London.
- IPCC** (2001): The Carbon Cycle and atmospheric carbon dioxide. In J. T. Houghton, Y. Ding, D. J. Griggs, M. Noguer, P. J. van der Linden, X. Dai, K. Maskell und C. A. Johnson (Hg.), *Climate Change 2001: The Scientific Basis*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- JACKSON** AO, Taylor CB (1996). Plant-microbe interactions: life and death at the interface. *Plant Cell* **8**: 1651-1668.
- JANG** JC, Sheen J (1997): Sugar sensing in higher plants. *Trends in Plant Science* **6** (2): 208-214.

- JOHNSON PR, Ecker JR (1998):** The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu Rev Genet* **32**: 227-254.
- JONASSON S, Bryant JP, Chapin FS, Anderson M, (1986):** Plant phenols and nutrients in relation to variations in climate and rodent grazing. *Am Nat* **128**: 394-408.
- JUAREZ HS, Amaro JR, Rivera MD, Párraga, Hijmans RJ (1999):** The effect of nitrogen fertilization on potato late blight in the field. CIP Program Report : 69-75.
- JUDELSON HS (1997):** The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Genetics and Biology* **22**: 65–76.
- KAEPPLER HF (2000):** Food safety assessment of gegetically modified crops. *Agron Journal* **92**: 793-797.
- KARZYNSKI O, Plesse B, Joubert JM, Yvin JC, Kopp M, Kloareg B, Fritig B (2000):** Linear β -1,3 Glucans are elicitors of defense response in tobacco. *Plant Physiol* **124**: 1027-1037.
- KATOU S, Yamamoto A, Yoshioka H, Kawakita K, Doke N (2003):** Functional analysis of potato motigen-activated protein kinase kinase, StMEK1. *J Gen Plant Pathol* **69**: 161-168.
- KAUSS H, Jeblick W, Domard A (1989):** Degree of polymerization and acetylation of chitosan determine its ability to elicit callose formation in suspension cells and protoplasts of *Catharanthus roseus*. *Planta* **178**: 385-392.
- KEELING CD, Whorf TP (2000):** Atmospheric CO₂ records from sites in the SIO air sampling network. In *Trends: A compendium of data on global change*. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn, USA.
- KELLER H, Hohlfeld H, Wray V, Hahlbrock K, Scheel D, Strack D (1996):** Changes in the accumulation of soluble and cell wall-bound phenolics in elicitor-treated cell suspension cultures and fungus-infected leaves of *Solanum tuberosum*. *Phytochemistry* **42**: 389-396.
- KEPPLER LD, Novacky A (1987):** The initiation of membrane lipid peroxidation during bacteria-induced hypersensitive reaction. *Physiol Mol Plant Pathol* **30**: 233-245.
- KIEBER JJ (1997):** The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 277-296.
- KIMBALL BA (1983):** Carbon dioxide and agricultural yield: an assemblage and analysis of 430 prior observations. *Argron J* **75**: 779-788.
- KIMBALL BA, Mauney JR, Nakayama FS, Idso SB (1993):** Effects of increasing atmospheric CO₂ on vegetation. In: Rozema J, Lambers H, Van de Geijn SC, Cambridge ML (Eds.) *CO₂ and biosphere*. Kluwer Academic, Dordrecht, 65-75.

- KITAJIMA S, Sato F (1999):** Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. *J Biochem (Tokyo)* **125**: 1-8.
- KLESSIG DF, Durner J, Noad R, Navarre DA, Wendehenne D, Kumar D, Zhou JM, Shah J, Zhang S, Kachroo P, Trifa Y, Pontier D, Lam E, Silva H (2000):** Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 8849-8855.
- KNOESTER M, Van Loon LC, Van den Heuvel J, Hennig J, Bol JF, Linthorst HJM (1998):** Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 1933-1937.
- KOCH KE (1996):** Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 509-540.
- KOMBRINK E, Somssich IE (1995).** Defense responses of plants to pathogens. In: *Advances in Botanical Research*. (Andrews JH, Tommerup IC) Academic Press, New York, 1-34.
- KUCHAREK T (2001) :** Early blight on tomatoes and potatoes. University of Florida, cooperative extension service, <http://edis.ifas.ufl.edu>.
- LAEMMLI UK (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 681-685.
- LAM E, Kato N, Lawton M (2001):** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**: 848-853.
- LAMB C, Dixon RA (1997):** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **48**: 251-275.
- LAMBERS H (1993):** Rising CO₂, secondary plant metabolism, plant-herbivore interactions and litter decomposition. *Vegetatio* **104/105**: 263-271.
- LANDSBERG J, Stafford-Smith M (1992):** A functional scheme for predicting for predicting the outbreak potential of herbivorous insects under global atmospheric change. *Austral J Bot* **40**: 565-577.
- LANDTAG J, Baumert A, Degenkolb T, Schmidt J, Wray V, Scheel D, Strack D, Rosahl S (2002):** Accumulation of tyrosol glucoside in transgenic potato plants expressing a parsley tyrosine decarboxylase. *Phytochemistry* **60**: 683-689.
- LANGEBARTELS C, Ernst D, Kangasjärvi J, Sandermann H (2000):** Ozone effects on plant defense. *Meth Enzymol* **319**: 520-535.
- LARIOS B, Aguera E, de la Haba P, Perez-Vicente R, Maldonado JM (2001) :** A short-term exposure of cucumber plants to rising atmospheric CO₂ increases leaf carbohydrate content and enhances nitrate reductase expression and activity. *Planta* **212**: 305-312.

- LAVOLA A**, Julkunen-Tiitto R, de la Rosa TM, Lehto T, Aphalo PJ (2000): Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum* **109**: 260 – 267.
- LAWSON T**, Craigon J, Black C, Colls JJ, Tulloch AM, Landon G (2001): Effects of elevated carbon dioxide and ozone on the growth and yield of potatoes (*Solanum tuberosum*) grown in open-top chambers. *Environmental Pollution* **111**: 479 – 491.
- LEGRAND M** (1983): Phenylpropanoid metabolism and its regulation in disease. In: *Biochemical Plant Pathology*. Callow JA (ed.) Wiley, Chichester, U.K. 367-384.
- LEVER M** (1972): A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. *Analytical Biochemistry* **47**: 273-279.
- LI L**, Steffens JC (2002): Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta* **215**: 239-247.
- LI R**, Wu N, Fan Y, Song B (1999): Transgenic potato plants expressing osmotin gene inhibits fungal development in inoculated leaves. *Chin J Biotechnol* **15**: 71-75.
- LONG SP**, Osborne CP, Humphries S (1996): Photosynthesis, rising atmospheric carbon dioxide concentration and climate change. In Breymeyer AL, Hall DO, Melillo JM, Agren GL (Hrsg.): *Global Change: Effects on coniferous forest and grasslands*. John Wiley and Sons-Verlag, New York: 121-159.
- LORITO M**, Woo SL, Fernandez IG, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Ziona A, Tuzun S, Scala F (1998): Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci, USA* **95**: 7860-7865.
- LUDEWIG F**, Sonnewald U, Kauder F, Heinecke D, Geige M, Stitt M, Müller-Röber BT, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB. (1998): The role of transient starch in acclimation to elevated CO₂. *FEBS Lett* **429**: 147-151.
- MACE M**, Bell A, Stipanovic RD (1978): Histochemistry and identification of flavanols in *Verticillium* wilt resistance and –susceptible cottons. *Physiol Plant Pathol* **13**: 143-146.
- MACKINZIE DR** (1981): Association of potato early blight, nitrogen fertilizer rate and potato yield. *Plant Dis* **65**: 575-577.
- MAHER EA**, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb C (1994) : Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of performed phenylpropanoid products. *Proc Natl Acad Sci, USA* **91**: 7802-7809.
- MAKINO A**, MAE T (1999): Photosynthesis and plant growth at elevated levels of CO₂. *Plant Cell Physiology* **40** (10): 999-1006.
- MAKINO A**, Harada M, Sato T, Nakano H, Mae T (1997): Growth and N allocation in rice plants under CO₂ enrichment. *Plant Physiology* **115**: 199-203.

- MAKINO A**, Shimada T, Takumi S, Kaneko K, Matsuoka M, Shimamoto K, Nakano H, Miyao-Tokutomi M, Mae T, Yamamoto N (1997): Does decrease in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by antisense *RbcS* lead to a higher N-use efficiency of photosynthesis under conditions of saturating CO₂ and light in rice plants? *Plant Physiology* **114**: 483 – 491.
- MALECK K**, Dietrich RA (1999): Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci* **4**: 215-219.
- MANNING W**, Tiedemann A (1995): Climate change: potential effects of increased atmospheric carbon dioxide, ozone and ultraviolet-B radiation on plant disease. *Environmental Pollution* **88**: 219-245.
- MARGNA U** (1977): Control at the level of substrate supply – an alternative in the regulation of phenylpropanoid accumulation in plant cells. *Phytochemistry* **16**: 419-426.
- MAROCO JP**, Edwards GE, Ku MSB (1999): Photosynthetic acclimation of maize to growth under elevated levels of carbon dioxide. *Planta* **210**: 115-125.
- MARSHALL B**, Vos J (1991): The relation between nitrogen concentration and photosynthetic capacity of potato (*Solanum tuberosum*) leaves. *Annals of Botany* **68**: 33-39.
- MARTIN MN**, Saftner RA (1995): Purification and Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid N-malonyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiol* **108**: 1241-1249.
- MAY MJ**, Vernoux T, leaver C, Van Montagu M, Inez D (1998): Glutathione homeostasis in plants: Implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* **49**: 649-667.
- McCONN M**, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J (1997): Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5473-5477.
- McDOWELL J**, Dangl JL (2000): Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Science* **25**: 79-82.
- McKEE IF**, Farage PK, Long SP (1995): The interactive effect of elevated CO₂ and O₃ concentration on photosynthesis in spring wheat. *Photosynthesis Research* **45**: 111-119.
- MILLARD P**, MACKERRON D (1986 a): The effects of nitrogen application on growth and nitrogen distribution within the potato canopy. *Annals of Applied Biology* **109**: 427-437.
- MILLARD P**, Marshall B (1986 b): Growth, nitrogen uptake and partitioning within the potato (*Solanum tuberosum*) crop, in relation to nitrogen application. *Journal of agricultural science* **107**: 421-429.

- MILLER A**, Tsai CH, Hemphill D, Endres M, Rodermeil S, Spalding M (1997): Elevated CO₂ effects during leaf ontogeny. A new perspective on acclimation. *Plant Physiol* **115**: 1195-1200.
- MITTLER R** (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* **7**: 405-410.
- MOEDER W** (1999): Untersuchungen zum Auftreten von Signalsubstanzen im Blatt-Apoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba* bei oxidativem Streß. Dissertation, Technische Universität. München.
- MOHR H**, Schopfer P (1992): Pflanzenphysiologie, 4.Aufl. Springer Verlag, Berlin.
- MÖLLER EM** (1989): Repetitive DNA-Sequenzen von *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary: ihre Charakterisierung und Verwendung zur Konstruktion von DNA-Sonden für diagnostische und taxonomische Zwecke. Dissertation, Universität Göttingen.
- MONTALBINI P**, Elstner EF (1977): Ethylene evolution by rust-infected, detached bean (*Phaseolus vulgaris* L.) leaves susceptible and hypersensitive to *Uromyces phaseoli* (pers.) Wint. *Planta* **135**: 301-306.
- MOORE B**, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng WH, Liu YX, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003): Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signalling. *Science* **300**: 332-336.
- MOORE BD**, Palmquist DE, Seemann JR (1997): Influence of plant growth at high CO₂ concentrations on leaf content of Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and intracellular distribution of soluble carbohydrates in tobacco plants. *Plant Physiol* **115**: 241-248.
- MORCUENDE R**, Krapp A, Hurry V, Stitt M (1998): Sucrose feeding leads to increased rates of nitrate assimilation, increased synthesis of a wide spectrum of amino acids in tobacco leaves. *Planta* **211**: 587-595.
- MORGAN PW**, Drew MC (1997): Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* **100**: 620-630.
- MORISON JIL** (1993): Response of plants to CO₂ under water limited conditions. *Vegetatio* **104/105**: 193-209.
- MUNZERT M**, Schweitzer E, Voit K (1987): Eine Stärkewaage mit variabler Einwaage und Datenspeicherung. *Kartoffelbau* **38**: 377-380.
- MURCHIE EH**, Ferrario-Mery S, Valadier MH, Foyer CH (2000): Short-term nitrogen induced modulation of phosphoenolpyruvate carboxylase in tobacco and maize leaves. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1349-1356.
- NICHOLSON RL**, Hammerschmidt R (1992): Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Ann Rev Phytopathol* **30**: 369-389.

- NIEPOLD F**, Schöber-Butin B (1995): Application of the PCR technique to detect *Phytophthora infestans* in potato tubers and leaves. Microbiological Research **150**: 379-385.
- NORITAKE T**, Kawakita K, Doke N (1996): Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. Plant Cell Physiol **37**: 113-116.
- NÜRNBERGER T**, Scheel D (2001): Signal transmission in the plant immune response. Trends Plant Sci **6**: 372-379.
- NÜRNBERGER T**, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D (1994): High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. Cell **78**: 449-460.
- O'DONNELL PJ**, Schmelz E, Block A, Miersch O, Wasternack C, Jones JB, Klee HJ (2003): Multiple Hormones act sequentially to mediate a susceptible Tomato Pathogen Defense response. Plant Physiol **133**: 1181-1189.
- O'DONNELL PJ**, Jones JB, Antoine FR, Ciardi J, Klee HJ (2001): Ethylene dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. Plant J **25**: 315-323.
- OHTA H**, Shida K, Peng YL, Furusawa I, Shishiyama J, Aibara S, Morita Y (1990): The occurrence of lipid hydroperoxide-decomposing activities in rice and the relationship of such activities to the formation of antifungal substances. Plant Cell Physiol **31**: 1117-1122.
- OHTSUBO N**, Mitsuhashi I, Koga M, Seo S, Ohashi Y (1999): Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. Plant Cell Physiol **40**: 808-817.
- OSBOURN AE** (1996): Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. Plant Cell **8**: 1821-1831.
- OVERMYER K**, Brosche M, Kangsjärvi J (2003): Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. Trends in Plant Science **8**: 335-342.
- PARADIES I**, Konze JR, Elstner EF (1980): Ethylen: Indicator but not inducer of phytoalexin synthesis in soybean. Plant Physiol **66**: 1106-1109
- PEARSON PN**, Palmer MR (2000): Atmospheric carbon dioxide concentrations over the past 60 million years. Nature **406**: 695-699.
- PEHL L**, Sturm H (1962): Stickstoff-Versorgung und *Phytophthora*-Befall der Kartoffeln. Kartoffelbau **2**: 29-30.
- PENUELAS J**, Estiarte M, Llusia J (1997): Carbon based secondary compounds at elevated CO₂. Photosynthetica **33** (2): 313-316.
- PENUELAS J**, Estiarte M (1998): Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? Tree **13**: 20-24.

- PEREIRA** A, Sandbrink H, Wolters P, van Enckevort E, van der Vossen E, Vleeshouwers VGAA, Colon LT, Stiekema W (1998): Identification and engineering of disease resistance genes in potato. Abstract Book 5th International Symposium on the Molecular Biology of the potato. Bogensee: Germany.
- PETIT** JR, Jouzel J, Barkov NI, Barnola JM, Basile I, Bender M, Chappellaz J, Davis M, Delaygue G, Delmotte M, Kotlyakov VM, Legrand M, Lipenkov VJ, Lorius C, Pepin L, Ritz C, Saltzman E, Stievenard M (1999): Climate and atmospheric history of the past 420 000 years from the Vostok ice core in Antarctica. *Nature* **399**: 429-436.
- PICHERSKY** E, Gang DR (2000): Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science* **5**: 439-444.
- PICINELLI** A, Suarez B, Moreno J, Dapena E, Mangas J (1994): Polyphenol analysis in apple tree leaves by HPLC. In: Brouillard R, (Hrsg.) Abstract of the XVIIth international conference of the groupe polyphenols. INRA Editions, Paris.
- PIETERSE** CMJ, Van Wees SCM, Van Pelt JA, Knoester M, Laan R, Gerrits H, Weisbeek PJ, Van Loon LC (1998) : A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1571-1580.
- PLEBL** M (2002): Einfluss erhöhter Ozon- und CO₂-Konzentrationen auf das Resistenzverhalten gegenüber *Phytophthora infestans* und von Gerste gegenüber *Drechslera teres*. Dissertation, TU-München, Herbert Utz Verlag.
- POORTER** H, Van Berkel Y, Baxter R, Den Hertog J, Dijkstra P, Gifford RM, Griffin KL, Roumet C, Roy J, Wong SC (1997): The effect of elevated CO₂ on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C₃ species. *Plant, Cell and Environment* **20**: 472-482.
- POORTER** RJ, Wong SC (1997): The effect of elevated carbon dioxide on the molecule during defence. *Rufty* **7**: 552-555.
- POPULER** C (1978): Changes in host susceptibility with time. In: Horsfall J, Cowling E (Hrsg.) *Plant diseases. An Advanced Treatise Band 2*, Academic Press.
- PUNJA** ZK (2001): Genetic engineering of plants to enhance resistance to fungal pathogens – a review of progress and future prospects. *Can Journal of Plant Pathology* **23**: 216-235.
- RADEMACHER** T, Häusler RE, Hirsch HJ, Zhang L, Lipka V, Weier D, Kreuzaler F, Peterhänsel C (2002): An engineered phosphoenolpyruvate carboxylase redirects carbon and nitrogen flow in transgenic potato plants. *The Plant Journal* **32**: 25-39.

- RAO MV, Davis KR (1999):** Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. *The Plant Journal* **17 (6)**: 603–614.
- RAO MV, Koch JR, Davis KR (2000):** Ozone: a tool for probing programmed cell death in plants. *Plant Molecular Biology* **44**: 345 – 358.
- RAUSHER, MD (2001):** Co-evolution and plant resistance to natural enemies. *Nature* **411**: 857-864.
- RAY H, Douches DS, Hammerschmidt R (1998) :** Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Physiol Mol Plant Pathol* **53**: 93-103.
- RICKER KE, Bostock RM (1994):** Eicosanoids in the *Phytophthora infestans* potato interaction: lipoxygenase metabolism of arachidonic acid and biological activities of selected lipoxygenase products. *Physiol Mol Plant Pathol* **44**: 65-80.
- ROEPENACK-LAHAYE E, Newman MA, Schornack S, Hammond-Kosack KE, Lahaye T, Jones DG, Daniels MJ, Dow JM (2003):** p-cumaroylnoradrenalin, a novel plant metabolite implicated in tomato defense against pathogens. *The J Biol Chem* **278**: 43373-43383.
- ROITSCH T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK (2002):** Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J of Experimental Botany* **54**: 513-524.
- ROITSCH T (1999):** Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* **2**: 198-206.
- ROLLAND F, Moore B, Sheen J (2002):** Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell*: 185-205.
- ROMEIS T, Piedras P, Jones JDG (2000) :** Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *Plant Cell* **12**: 803-815.
- ROSAHL S (1996):** Lipoxygenases in plants - their role in development and stress response. *Z Naturforsch* **51**: 123-138.
- ROTEM J (1994):** The genus *Alternaria* – Biology, epidemiology and pathogenicity. APS Press, St. Paul, Minnesota.
- ROWE RC, Miller SA, Riedel RM (2001) :** Early blight of potato and tomato. The Ohio State University Extension Fact Sheet, Plant Pathology.
- RÜHMANN S, Leser C, Bannert M, Treutter D (2002):** Relationship between growth, secondary metabolism, and resistance of apple. *Plant Biol* **4**: 137-193
- RUFTY TW, Huber SC, Volk RJ (1988):** Alterations in leaf carbohydrate metabolism in response to nitrogen stress. *Plant Physiology* **88**: 725-730.

- RUSTERUCCI C**, Stallaert V, Milat M, Pugin A, Ricci P, Blein J (1999): Relationship between active oxygen species, lipid peroxidation, necrosis and phytoalexin production induced by elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* **111**: 885-891.
- SAGE EF** (1994): Acclimation of photosynthesis to increasing atmospheric CO₂: The gas exchange perspective. *Photosynth Res* **39**: 351-368.
- SAGE EF**, Coleman JR (2001): Effects of low atmospheric CO₂ on plants: more than a thing of the past. *Trends in Plant Science* **6** (1): 18-24.
- SAMUEL MA**, Miles GP, Ellis BE (2000): Ozone treatment rapidly activates MAP kinase signalling in plants. *Plant J* **22**: 367-376.
- SAMUELSON B**, Dahlän SE, Lindgren JÜ, Rouzer CA, Serhan CN (1987): Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science* **237**: 1171-1175.
- SANDER JF** (1992): Biochemisch-physiologische Ursachen der durch die Stickstoffernährung modifizierten Anfälligkeit des Weizens (*Triticum aestivum* L.) gegenüber dem echten Mehltau. Dissertation, Universität Göttingen.
- SASABE M**, Takeuchi K, Kamoun S, Ichinose Y, Govers, F, Toyoda K, Shiraihi T, Yamada T (2000): Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative bursts and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* **267**: 5005-5013.
- SCALBERT A** (1991): Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30**: 3875-3883.
- SCHALLER A** (1999): Oligopeptide signalling and the action of systemin. *Plant Mol Biol* **40**: 763-769.
- SCHEEL D**, Blume B, Brunner F, Fellbrich G, Dalboge H, Hirt H, Kauppinen S, Kroj T, Ligterink W, Nürnberger T, Tschöpe M, Zinecker H, Zur Nieden U (2000): Receptor-mediated signal transduction in plant defense. In: *Biology of plant-microbe-interactions*. (De Wit, PDGM, Bisseling T, Stiekema WJ) International Society of Plant-Microbe Interactions, St. Paul, MN.
- SCHEEL D** (2002): Oxidative Burst and the Role of Reactive Oxygen Species in Plant-Pathogen Interactions. In *Oxidative Stress in Plants*, eds. Inzé D, Van Montagu M, Taylor and Francis. London, pp. 137-153.
- SCHEIBLE WR**, Lauerer M, Schulze ED, Caboche M, Stitt M (1997): Accumulation of nitrate in the shoot acts as a signal to regulate shoot-root allocation in tobacco. *Plant Journal* **11**: 671-691.

- SCHNITZLER JP**, Jungblut TP, Heller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H (1996): Tissue localization of UV-B screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *New Phytologist* **132**: 247-258.
- SCHWEIZER P**, Gees R, Möisinger E (1993): Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with powdery mildew *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Plant Physiol* **102**: 503-511.
- SEGURA A**, Moreno M, Madueño F, Molina A, García-Olmedo F (1999): Snakin-1, a peptide from potato that is active against plant pathogens. *Mol Plant-Microbe Interact* **12**: 16-23.
- SELITRENNIKOFF CP** (2001): Antifungal proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **67** (7): 2883-2894.
- SIEROTZKI H**, GESSLER C (1993): Flavan-3-ol content and the resistance *Malus domestica* to *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. *Physiol Mol Plant Pathol* **42**: 291-297.
- SITTE P**, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A (1998): Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 34. Auflage; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- SMART CD**, Myers KL, Restrepo S, Martin GB, Fry WE (2003): Partial resistance of tomato to *Phytophthora infestans* is not dependent upon ethylene, jasmonic acid, or salicylic acid signaling pathways. *Mol Plant Microbe Interact* **2**: 141-148.
- SMEEKENS S** (2000): Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Physiol Plant Mol Biol* **51**: 49-81.
- STAPLES RC** (2004): Race nonspecific resistance for potato late blight. *Trends in Plant Science* **9**: 5-6.
- STEVENSON RE**, Pennypacker SP (1988): Effect of radiation, temperature and moisture on conidial germination of *Alternaria solani*. *Phytopathology* **78** (7): 926-930.
- STITT M**, Krapp A (1999): The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition: physiological and molecular background. *Plant Cell and Environment* **22**: 583-621.
- STITT M**, Müller K, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002): Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *Journal of Experimental Botany* **53**: 959-970.
- STITT M** (1991): Rising CO₂ levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell and Environment* **14**: 741-719.
- STRACK D**, Heilemann J, Mömken M, Wray V (1988): Cell wall-conjugated phenolics from coniferous leaves. *Phytochemistry* **27**: 351-352.

- TAKAHAMA U** (1989): A role of hydrogen peroxide in the metabolism of phenolics in mesophyll cells of *Vicia faba* L. *Plant Cell Physiol.* **30**: 295-302.
- TAKEMOTO D**, Furuse K, Doke N, Kawakita K (1997): Identification of chitinase and osmotin-like protein as actin-binding proteins in suspension-cultured potato cells. *Plant Cell Physiol.* **38**: 441-448.
- TAMOGAMI S**, Rakwal R, Kodama O (1997): Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Lett* **412**: 61-64.
- TENHAKEN R**, Levine A, Brisson L, Dixon R, Lamb C (1995): Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 4158-4163.
- THEOBALD JC**, Mitchell RAC, Parry MAJ, Lawlor DW (1998): Estimating the excess investment in ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in leaves of spring wheat grown under elevated CO₂. *Plant Physiology* **118**: 945-955.
- THOMMA BP**, Eggermont K, Tierens KFMJ, Broeckaert WF (1999): Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* **121**: 1093-1101.
- THORDAL-CHRISTENSEN H**, Zhang Z, Wei Y, Collinge DB (1997): Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* **11**: 1187-1194.
- TOBWIN H**, Staehlin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* **86**: 2673-2677.
- TON J**, Davison S, Van Wees SCM, Van Loon LC, Pieterse CMJ (2001): The *Arabidopsis* ISR1 locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol* **125**:652-661.
- TREUTTER** (1991): Bedeutung von Catechinen und Proantocyanidine für Obstanbauer und Verbraucher. Eine Studie über die Analytik, das Vorkommen und die Pflanzenphysiologische, phytopathologische und ernährungsphysiologische Bedeutung der kondensierten Tannine und ihre monomeren Vorstufen. Habilitationsschrift, TU München-Weihenstephan.
- TREUTTER D**, Feucht W (1990): The pattern of flavan-3-ols in relation to scab resistance of apple cultivars. *J Hort Sci* **65**: 511-517.

- TUOMAINEN J**, Betz C, Kangasjärvi J, Ernst D, Yin ZH, Langebartels C, Sandermann H (1997): Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J* **12**: 1151-1162.
- ULRICH J**, Krug H (1965): Der Einfluss von Tageslänge und Temperatur auf die relative Resistenz einiger Kartoffelsorten gegenüber *Phytophthora infestans* (Mont.) De Barry. *Phytopathologische Zeitschrift* **52**: 295-303.
- VAN BREUSEGEM F**, Vranová E, Dat JF, Inzé D (2001): The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* **16**: 405-414.
- VAN DER VOSSEN E**, Sikkema A, Hekkert BL, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S (2003): An ancient R gene from wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *The Plant J* **36**: 867-882.
- VAN LOON LC**, Van Strien EA (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 85-97.
- VAN OOSTEN JJ**, Besford RT (1995): Some relationships between the gas exchange, biochemistry and molecular biology of photosynthesis during leaf development of tomato plants after transfer to different carbon dioxide concentrations. *Plant, Cell and Environment* **18**: 1253-1266.
- VASIUKOVA NI**, Zinovëva SV, Il'inskaia LI, Perekhod EA, Chalenko GI, Gerasimova NG, Ilina AV, Varlamov VP, Ozeretkovskaia OL (2001): Modulation of plant resistance to disease by water-soluble chitosan. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **37**: 115-122.
- VLEESHOUWERS VGAA**, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT (2000): Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiol Mol Plant Pathol* **57**: 35-42.
- Vos J** (1995): Nitrogen and the growth of potato crops. In: Haverkort A, McKarren D (Hrsg.) *Potato ecology and modelling of crops under conditions limiting growths. Current issues in production ecology* **3**: 41-57. Kluwer.
- Vos J** (1999): Potato. In: Smith D, Hamel C, (Hrsg.) *Crop yield physiology and processes*. Springer.
- Vos J**, Biemond H (1992) : Effects of nitrogen on the development and growth of the potato plant. *Annals of Botany* **70**: 27-35.
- WANG K**, Li H, Ecker JR (2002): Ethylene Biosynthesis and signalling Networks. *The Plant Cell*: 131-151.

- WARREN R**, King J, Colhoun J (1971): Reaction of potato leaves to infection by *Phytophthora infestans* in relation to the position on the plant. Transactions of the British Mycological Society **57**: 501-514.
- WASTERNAK C**, Parthier B (1997): Jasmonate signalled plant gene expression. Trends Plant Sci **2**: 302-307.
- WEBER H**, Chetelat A, Caldelari D, Farmer EE (1999): Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight diseased potato leaves. The Plant Cell **11**: 485-493.
- WEICHERT H**, Stenzel I, Berndt E, Wasternack C, Feussner I (1999): Metabolic profiling of oxylipins upon salicylate treatment in barley leaves-preferential induction of the reductase pathway by salicylate. FEBS Lett **464**: 133-137.
- WEISSHAAR B**, Jenkins GI (1998): Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. Curr Opin Plant Biol **1**: 251-257.
- WILDERMUTH MC**, Dewdney J, Wu G, Ausubel FM (2001): Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. Nature **414**: 562-565.
- WOHLGEMUTH** (2002): Untersuchungen zur Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies bei Ozon-induziertem Zelltod in Pflanzen. Dissertation, Ludwig-Maximilians Universität München.
- WOODWARD FI** (1987): Stomatal numbers are sensitive to increases in CO₂ from pre-industrial levels. Nature **327**: 617-618.
- WU G**, Shortt BJ, Lawrence EB, Leon J, Fitzsimmons KC, Levine EB, Raskin I, Shah DM (1997) : Activation of host defence mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. Plant Physiol **115**: 427-435.
- XING T**, Higgins VJ, Blumwald E (1996): Regulation of plant defense response to fungal pathogens: two types of protein kinases in the reversible phosphorylation of the host plasma membrane H⁺-ATPase. The Plant Cell **8**: 555-564.
- XIAO W**, Sheen J, Jang JC (2000): The role of hexokinase in plant sugar signal transduction and growth and development. Plant Molecular Biology **44**: 451-461.
- YAMAMOTO A**, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K (2003): Nitrate reductase, a nitric oxide-producing enzyme: induction by pathogen signals. J Gen Plant Pathol **69**: 218-229.
- YANG Y**, Shah J, Klessig DF (1997): Signal perception and transduction in plant defense responses. Genes Dev **11**: 1621-1639.
- YAO K**, De Luca V, Brison N (1995): Creation of a Metabolic sink for tryptophan alters the phenylpropanoid pathway and the susceptibility of potato to *Phytophthora infestans*. Plant Cell **11**: 1787-1799.

YOSHIOKA H, Sugie K, Park HJ, Maeda H, Tsuda N, Kawakita K, Doke N (2001): Induction of plant gp91*phox* homolog by fungal cell wall, arachidonic acid, and salicylic acid in potato. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 725-736.

YU D, Liu Y, Fan B, Klessig DJ, Chen Z (1997): Is the high basal level of salicylic acid important for disease resistance in potato? *Plant Physiology* **115**: 343-349.

YWA NS, Walling L, McCool PM (1995): Influence of elevated CO₂ on disease development and induction of PR proteins in tomato roots by *Phytophthora parasitica*. *Plant Physiol* **85**: 1139.

ZIMMERMANN S, Nürnberger T, Frachisse JM, Wirtz W, Guern J, Hedrich R, Scheel D (1997): Receptor-mediated activation of a plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2751-2755.

ANHANG

Sorte	[dpi]	Behandlung	HCA	Flavonol	Rutin	Kryptochlorogensäure	Chlorogensäure
Indira 2 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,67	1,77	0,27	1,60	2,41
	Tag 1	Kontrolle	0,84	2,26	0,47	1,77	2,38
	Tag 1	infiziert	1,07	1,85	0,45	2,81	3,95
	Tag 3	Kontrolle	1,06	2,61	0,57	2,30	3,12
	Tag 3	infiziert	1,10	1,19	0,44	2,06	3,00
Indira 4 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,91	3,16	0,50	1,97	2,59
	Tag 1	Kontrolle	0,66	2,42	0,41	1,42	2,27
	Tag 1	infiziert	1,26	2,76	0,48	2,26	3,12
	Tag 3	Kontrolle	1,25	2,78	0,67	1,83	2,62
	Tag 3	infiziert	1,37	2,26	0,42	2,19	3,54
Indira 6 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,64	4,98	0,66	1,32	1,86
	Tag 1	Kontrolle	0,69	4,77	0,58	1,13	1,58
	Tag 1	infiziert	0,59	4,31	0,46	1,03	1,64
	Tag 3	Kontrolle	0,89	5,22	0,84	1,32	1,99
	Tag 3	infiziert	1,25	3,96	0,90	1,59	2,96
Bettina 2 Wochen	Tag 0	Kontrolle	1,14	2,41	0,30	2,35	2,96
	Tag 1	Kontrolle	0,79	2,83	0,49	2,00	2,66
	Tag 1	infiziert	1,47	2,58	0,82	3,01	3,77
	Tag 3	Kontrolle	1,85	8,30	1,66	3,64	4,82
	Tag 3	infiziert	1,20	2,70	1,52	2,45	3,62
Bettina 4 Wochen	Tag 0	Kontrolle	1,01	6,81	0,75	2,21	2,62
	Tag 1	Kontrolle	1,75	6,27	1,17	2,82	3,70
	Tag 1	infiziert	1,18	2,87	0,94	2,13	2,94
	Tag 3	Kontrolle	2,37	3,77	1,69	3,19	3,99
	Tag 3	infiziert	1,83	4,44	2,17	2,63	3,70
Bettina 6 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,74	2,54	0,64	0,97	1,17
	Tag 1	Kontrolle	1,06	3,83	1,12	1,07	1,71
	Tag 1	infiziert	1,03	4,22	1,53	1,13	1,81
	Tag 3	Kontrolle	1,76	6,26	2,82	3,11	4,04
	Tag 3	infiziert	1,43	5,13	2,03	1,79	2,60
Kuras 2 Wochen	Tag 0	Kontrolle	1,03	5,51	0,46	2,26	3,39
	Tag 1	Kontrolle	0,47	5,39	0,49	1,02	1,72
	Tag 1	infiziert	1,10	4,63	0,45	2,62	3,65
	Tag 3	Kontrolle	1,46	6,83	0,58	3,42	5,18
	Tag 3	infiziert	1,30	5,25	0,52	2,74	3,89
Kuras 4 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,68	6,02	0,39	2,05	2,77
	Tag 1	Kontrolle	0,77	6,77	0,43	1,86	2,67
	Tag 1	infiziert	1,08	8,28	0,64	2,99	4,36
	Tag 3	Kontrolle	1,05	8,57	0,55	2,08	3,05
	Tag 3	infiziert	1,03	8,87	0,58	2,32	3,55
Kuras 6 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,42	4,62	0,29	1,07	1,58
	Tag 1	Kontrolle	0,54	4,81	0,26	1,12	1,67
	Tag 1	infiziert	0,57	5,46	0,34	1,08	1,84
	Tag 3	Kontrolle	0,70	7,49	0,48	1,35	2,40
	Tag 3	infiziert	0,73	6,69	0,41	1,28	2,29

Sorte	[dpi]	Behandlung	HCA	Flavonol	Rutin	Kryptochloro- gensäure	Chloroge- n-säure
Bintje 2 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,62	0,13	2,95	1,44	1,83
	Tag 1	Kontrolle	0,39	0,23	3,12	0,61	0,89
	Tag 1	infiziert	0,77	0,05	3,50	2,09	2,71
	Tag 3	Kontrolle	0,94	0,12	4,13	2,09	2,70
	Tag 3	infiziert	1,16	0,64	2,83	2,12	2,93
Bintje 4 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,35	0,04	2,56	1,07	1,37
	Tag 1	Kontrolle	0,56	0,05	2,99	1,50	1,90
	Tag 1	infiziert	0,46	0,03	2,42	1,13	1,52
	Tag 3	Kontrolle	0,67	0,05	4,15	1,52	2,17
	Tag 3	infiziert	0,77	0,36	4,12	1,65	2,55
Bintje 6 Wochen	Tag 0	Kontrolle	0,37	0,05	2,10	0,85	1,11
	Tag 1	Kontrolle	0,52	0,04	2,43	1,02	1,73
	Tag 1	infiziert	0,47	0,09	2,40	0,92	1,70
	Tag 3	Kontrolle	0,55	0,17	3,77	1,02	1,74
	Tag 3	infiziert	0,57	0,03	3,34	1,23	1,95

Tabelle-A 1: Phenylpropanoidgehalte der Kartoffelsorten Indira, Bettina, Kuras und Bintje nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Blätter wurden mit *P. infestans* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Phenolgehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter gemessen. HCA = Hydroxycimtsäuren.

Behandlung Indira	[dpi]	Kontrolle / <i>P. infestans</i>	HCA	Favonol	Rutin	Kryptochloro- gensäure	Chlorogen- säure
400 ppm /-N/	Tag 0	Kontrolle	1,5 +/- 0,1	1,2 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,4 +/- 0,2	3,7 +/- 0,5
	Tag 1	Kontrolle	1,3 +/- 0,2	1,2 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,4 +/- 0,2	3,8 +/- 0,2
	Tag 1	infiziert	1,4 +/- 0,1	1,2 +/- 0,4	0,4 +/- 0,1	2,8 +/- 0,7	4,1 +/- 1,4
	Tag 3	Kontrolle	1,6 +/- 0,2	1,1 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,5 +/- 0,2	3,8 +/- 0,1
	Tag 3	infiziert	1,7 +/- 0,1	1,2 +/- 0,2	0,4 +/- 0,1	2,4 +/- 0,1	3,2 +/- 0,2
400 ppm /+N/	Tag 0	Kontrolle	1,0 +/- 0,1	0,5 +/- 0,2	0,4 +/- 0,1	1,7 +/- 0,4	2,2 +/- 0,6
	Tag 1	Kontrolle	1,2 +/- 0,2	0,5 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	1,8 +/- 0,3	2,6 +/- 0,5
	Tag 1	infiziert	1,2 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	1,8 +/- 0,0	2,3 +/- 0,1
	Tag 3	Kontrolle	1,6 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	2,2 +/- 0,2	2,9 +/- 0,4
	Tag 3	infiziert	1,9 +/- 0,2	0,7 +/- 0,2	0,4 +/- 0,1	2,0 +/- 0,1	2,4 +/- 0,2
700 ppm /-N/	Tag 0	Kontrolle	1,3 +/- 0,4	1,1 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	2,3 +/- 0,1	3,5 +/- 0,1
	Tag 1	Kontrolle	1,6 +/- 0,1	1,3 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	2,5 +/- 0,2	3,9 +/- 0,1
	Tag 1	infiziert	1,3 +/- 0,1	1,1 +/- 0,1	0,6 +/- 0,1	2,6 +/- 0,3	3,4 +/- 0,3
	Tag 3	Kontrolle	1,5 +/- 0,1	1,3 +/- 1,1	0,5 +/- 0,1	2,3 +/- 0,2	3,6 +/- 0,3
	Tag 3	infiziert	1,6 +/- 0,1	1,1 +/- 0,1	0,5 +/- 0,1	2,6 +/- 0,1	3,4 +/- 0,3
700 ppm /+N/	Tag 0	Kontrolle	1,1 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,1 +/- 0,2	2,6 +/- 0,1
	Tag 1	Kontrolle	1,4 +/- 0,2	0,8 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,2 +/- 0,4	3,0 +/- 0,7
	Tag 1	infiziert	1,4 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,3 +/- 0,2	3,0 +/- 0,3
	Tag 3	Kontrolle	1,7 +/- 0,1	0,7 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,2 +/- 0,1	2,8 +/- 0,1
	Tag 3	infiziert	1,7 +/- 0,2	0,9 +/- 0,1	0,4 +/- 0,1	2,3 +/- 0,2	2,9 +/- 0,3

Tabelle-A 2: Phenylpropanoidgehalte der Kartoffelsorte Indira nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Die Blätter wurden mit *P. infestans* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Phenolgehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). HCA = Hydroxyzimtsäuren.

Behandlung Indira	[dpi]	Kontrolle / <i>A. solani</i>	HCA	Favonol	Rutin	Kryptochlorogensäure	Chlorogensäure
400 ppm /-N/	Tag 0	Kontrolle	1,43 +/- 0,2	1,54 +/- 0,2	0,57 +/- 0,0	2,38 +/- 0,1	2,82 +/- 0,1
	Tag 1	Kontrolle	1,80 +/- 0,5	1,64 +/- 0,4	0,44 +/- 0,0	2,57 +/- 0,4	3,11 +/- 0,6
	Tag 1	infiziert	1,72 +/- 0,1	1,65 +/- 0,1	0,59 +/- 0,2	2,68 +/- 0,1	3,29 +/- 0,0
	Tag 3	Kontrolle	1,81 +/- 0,1	1,83 +/- 0,1	0,57 +/- 0,0	2,69 +/- 0,1	3,18 +/- 0,1
	Tag 3	infiziert	2,44 +/- 0,2	1,51 +/- 0,5	0,55 +/- 0,0	3,04 +/- 0,6	4,09 +/- 0,9
400 ppm /+N/	Tag 0	Kontrolle	1,13 +/- 0,0	1,01 +/- 0,12	0,42 +/- 0,0	1,56 +/- 0,1	1,72 +/- 0,2
	Tag 1	Kontrolle	1,33 +/- 0,2	1,06 +/- 0,1	0,36 +/- 0,1	1,89 +/- 0,5	2,35 +/- 0,8
	Tag 1	infiziert	1,48 +/- 0,0	1,09 +/- 0,1	0,21 +/- 0,0	1,82 +/- 0,0	2,35 +/- 0,1
	Tag 3	Kontrolle	1,53 +/- 0,1	0,98 +/- 0,0	0,34 +/- 0,1	1,63 +/- 0,3	1,81 +/- 0,3
	Tag 3	infiziert	2,08 +/- 0,1	0,88 +/- 0,1	0,13 +/- 0,0	1,85 +/- 0,3	2,53 +/- 0,1
700 ppm /-N/	Tag 0	Kontrolle	1,42 +/- 0,1	1,93 +/- 0,6	0,37 +/- 0,3	2,43 +/- 0,1	2,88 +/- 0,0
	Tag 1	Kontrolle	1,45 +/- 0,0	2,24 +/- 0,9	0,73 +/- 0,0	2,57 +/- 0,1	3,12 +/- 0,2
	Tag 1	infiziert	1,65 +/- 0,1	2,58 +/- 0,1	0,58 +/- 0,0	2,95 +/- 0,3	3,69 +/- 0,3
	Tag 3	Kontrolle	1,62 +/- 0,0	2,22 +/- 0,4	0,59 +/- 0,1	2,52 +/- 0,1	3,03 +/- 0,2
	Tag 3	infiziert	2,18 +/- 0,1	2,66 +/- 0,6	0,54 +/- 0,0	3,28 +/- 0,1	4,70 +/- 0,1
700 ppm /+N/	Tag 0	Kontrolle	1,21 +/- 0,1	0,93 +/- 0,1	0,30 +/- 0,1	1,58 +/- 0,1	1,85 +/- 0,0
	Tag 1	Kontrolle	1,26 +/- 0,0	1,13 +/- 0,3	0,34 +/- 0,1	1,95 +/- 0,3	2,24 +/- 0,3
	Tag 1	infiziert	1,21 +/- 0,0	0,84 +/- 0,0	0,29 +/- 0,1	1,44 +/- 0,1	1,65 +/- 0,1
	Tag 3	Kontrolle	1,56 +/- 0,0	1,10 +/- 0,0	0,32 +/- 0,1	1,80 +/- 0,1	1,99 +/- 0,1
	Tag 3	infiziert	1,47 +/- 0,1	1,02 +/- 0,1	0,35 +/- 0,0	1,98 +/- 0,1	2,60 +/- 0,2

Tabelle-A 3: Phenylpropanoidgehalte der Kartoffelsorte Indira nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Die Blätter wurden mit *A. solani* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Phenolgehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). HCA = Hydroxycimtsäuren.

Behandlung Bettina	[dpi] Kontrolle / <i>A. solani</i>	HCA	Favonol	Rutin	Kryptochloro- gensäure	Chlorogen- säure
400 ppm /-N/	Tag 0 Kontrolle	1,80 +/- 0,2	2,45 +/- 0,0	0,25 +/- 0,0	2,48 +/- 0,3	2,86 +/- 0,3
	Tag 1 Kontrolle	1,86 +/- 0,1	2,35 +/- 0,3	0,27 +/- 0,0	2,33 +/- 0,1	2,71 +/- 0,2
	Tag 1 infiziert	1,97 +/- 0,1	1,76 +/- 0,7	0,24 +/- 0,0	2,66 +/- 0,3	3,27 +/- 0,4
	Tag 3 Kontrolle	2,05 +/- 0,0	1,99 +/- 0,1	0,20 +/- 0,0	2,48 +/- 0,2	2,98 +/- 0,2
	Tag 3 infiziert	3,24 +/- 0,4	1,93 +/- 0,7	0,22 +/- 0,0	2,94 +/- 0,5	3,37 +/- 0,6
400 ppm /+N/	Tag 0 Kontrolle	1,12 +/- 0,1	0,67 +/- 0,0	0,15 +/- 0,0	1,20 +/- 0,1	1,28 +/- 0,1
	Tag 1 Kontrolle	1,39 +/- 0,0	0,91 +/- 0,2	0,20 +/- 0,0	1,87 +/- 0,3	2,01 +/- 0,4
	Tag 1 infiziert	1,76 +/- 0,1	0,87 +/- 0,1	0,20 +/- 0,0	1,78 +/- 0,1	1,93 +/- 0,2
	Tag 3 Kontrolle	1,67 +/- 0,0	0,83 +/- 0,2	0,17 +/- 0,0	1,90 +/- 0,3	2,12 +/- 0,5
	Tag 3 infiziert	2,85 +/- 0,0	0,62 +/- 0,0	0,19 +/- 0,0	1,82 +/- 0,0	1,98 +/- 0,0
700 ppm /-N/	Tag 0 Kontrolle	1,94 +/- 0,2	2,05 +/- 0,2	0,33 +/- 0,0	2,69 +/- 0,1	3,09 +/- 0,0
	Tag 1 Kontrolle	2,04 +/- 0,1	2,52 +/- 0,2	0,30 +/- 0,1	2,82 +/- 0,2	3,26 +/- 0,1
	Tag 1 infiziert	2,32 +/- 0,2	2,05 +/- 0,0	0,33 +/- 0,1	2,87 +/- 0,1	3,48 +/- 0,1
	Tag 3 Kontrolle	2,17 +/- 0,1	2,06 +/- 0,3	0,25 +/- 0,0	2,60 +/- 0,0	3,05 +/- 0,0
	Tag 3 infiziert	3,18 +/- 0,7	2,72 +/- 1,0	0,29 +/- 0,0	3,24 +/- 0,5	4,11 +/- 0,3
700 ppm /+N/	Tag 0 Kontrolle	1,21 +/- 0,0	1,20 +/- 0,3	0,18 +/- 0,0	1,86 +/- 0,0	2,27 +/- 0,1
	Tag 1 Kontrolle	1,43 +/- 0,0	1,54 +/- 0,2	0,20 +/- 0,0	2,36 +/- 0,1	2,77 +/- 0,1
	Tag 1 infiziert	1,43 +/- 0,2	1,32 +/- 0,5	0,19 +/- 0,0	2,21 +/- 0,2	2,57 +/- 0,3
	Tag 3 Kontrolle	1,88 +/- 0,1	1,20 +/- 0,2	0,16 +/- 0,0	2,23 +/- 0,1	2,42 +/- 0,3
	Tag 3 infiziert	2,48 +/- 0,2	1,39 +/- 0,6	0,15 +/- 0,0	2,42 +/- 0,2	2,81 +/- 0,5

Tabelle-A 4: Phenylpropanoidgehalte der Kartoffelsorte Bettina nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Die Blätter wurden mit *A. solani* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Phenolgehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). HCA = Hydroxyzimtsäuren.

Behandlung Indira	[dpi]	Kontrolle / <i>A. solani</i>	HCA	Favonol	Rutin	Kryptochlorogensäure	Chlorogensäure
junge Blätter 60 kg N/ha	Tag 0	Kontrolle	1,09 +/- 0,1	14,47 +/- 1,1	4,45 +/- 0,5	1,69 +/- 0,2	3,19 +/- 0,4
	Tag 3	Kontrolle	0,96 +/- 0,1	12,19 +/- 1,8	3,57 +/- 0,4	1,36 +/- 0,1	2,75 +/- 0,3
	Tag 3	infiziert	1,26 +/- 0,1	14,14 +/- 2,5	4,04 +/- 0,5	1,37 +/- 0,2	3,74 +/- 0,5
junge Blätter 160 kg N/ha	Tag 0	Kontrolle	0,99 +/- 0,2	13,34 +/- 2,5	4,03 +/- 0,6	1,52 +/- 0,2	3,21 +/- 0,5
	Tag 3	Kontrolle	1,26 +/- 0,0	12,13 +/- 0,2	3,86 +/- 0,2	1,91 +/- 0,2	2,99 +/- 0,3
	Tag 3	infiziert	1,55 +/- 0,3	13,02 +/- 1,2	3,67 +/- 0,5	1,71 +/- 0,5	3,26 +/- 0,7
alte Blätter 60 kg N/ha	Tag 1	Kontrolle	1,04 +/- 0,2	11,89 +/- 2,4	3,13 +/- 0,6	1,31 +/- 0,1	2,46 +/- 0,3
	Tag 1	Kontrolle	0,80 +/- 0,1	8,15 +/- 1,1	2,27 +/- 0,4	0,82 +/- 0,1	1,81 +/- 0,3
	Tag 3	infiziert	0,93 +/- 0,1	8,83 +/- 0,9	2,33 +/- 0,3	0,80 +/- 0,1	1,94 +/- 0,2
alte Blätter 160 kg N/ha	Tag 3	Kontrolle	0,75 +/- 0,2	7,78 +/- 2,2	2,14 +/- 0,6	0,73 +/- 0,2	1,22 +/- 0,3
	Tag 0	Kontrolle	0,77 +/- 0,1	6,73 +/- 1,0	1,80 +/- 0,2	0,58 +/- 0,1	1,21 +/- 0,2
	Tag 1	infiziert	1,12 +/- 0,1	9,16 +/- 1,0	2,46 +/- 0,4	0,87 +/- 0,2	2,09 +/- 0,5
Behandlung Bettina	[dpi]	Kontrolle / <i>A. solani</i>	HCA	Favonol	Rutin	Kryptochlorogensäure	Chlorogensäure
junge Blätter 60 kg N/ha	Tag 0	Kontrolle	1,19 +/- 0,1	14,44 +/- 1,6	7,31 +/- 1,0	2,08 +/- 0,2	2,93 +/- 0,3
	Tag 3	Kontrolle	1,47 +/- 0,2	12,88 +/- 2,4	7,06 +/- 1,3	2,13 +/- 0,4	3,38 +/- 0,8
	Tag 3	infiziert	1,53 +/- 0,1	12,80 +/- 0,9	6,64 +/- 0,3	1,99 +/- 0,3	3,30 +/- 0,4
junge Blätter 160 kg N/ha	Tag 0	Kontrolle	1,37 +/- 0,1	14,22 +/- 1,1	7,30 +/- 0,5	2,20 +/- 0,3	2,84 +/- 0,3
	Tag 3	Kontrolle	1,51 +/- 0,4	11,89 +/- 2,0	6,33 +/- 1,0	2,01 +/- 0,5	2,93 +/- 0,5
	Tag 3	infiziert	1,68 +/- 0,5	12,33 +/- 2,2	6,53 +/- 1,2	2,12 +/- 0,6	3,26 +/- 0,7
alte Blätter 60 kg N/ha	Tag 1	Kontrolle	1,14 +/- 0,3	9,03 +/- 1,3	5,59 +/- 0,7	1,26 +/- 0,3	1,73 +/- 0,4
	Tag 1	Kontrolle	0,71 +/- 0,4	5,65 +/- 2,1	3,79 +/- 1,3	0,62 +/- 0,4	1,10 +/- 0,7
	Tag 3	infiziert	1,37 +/- 0,4	8,50 +/- 2,1	5,43 +/- 1,3	1,11 +/- 0,4	2,10 +/- 0,7
alte Blätter 160 kg N/ha	Tag 3	Kontrolle	0,80 +/- 0,4	6,39 +/- 1,7	4,66 +/- 1,0	0,75 +/- 0,4	1,02 +/- 0,4
	Tag 0	Kontrolle	0,63 +/- 0,4	4,66 +/- 1,0	3,57 +/- 0,6	0,47 +/- 0,3	0,87 +/- 0,4
	Tag 1	infiziert	0,95 +/- 0,5	5,67 +/- 1,3	4,13 +/- 0,8	0,70 +/- 0,3	1,35 +/- 0,6

Tabelle-A 5: Phenylpropanoidgehalte der Kartoffelsorten Indira und Bettina nach Aufzucht der Pflanzen im Freiland. Die Pflanzen wurden mit 60 kg N/ha oder 160 kg N/ha gedüngt. Die Blätter wurden mit *P. infestans* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Phenolgehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm S.E. (n=4). HCA = Hydroxyzimtsäuren.

Indira	[dpi]	Kontrolle / <i>P. infestans</i>	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
	Tag 0	Kontrolle	12,8 +/- 4,0	21,0 +/- 1,3	16,5 +/- 4,1	19,9 +/- 3,3
	Tag 1	Kontrolle	15,9 +/- 2,8	24,1 +/- 4,4	15,1 +/- 2,2	19,8 +/- 2,0
	Tag 1	infiziert	16,8 +/- 2,9	22,5 +/- 2,2	13,1 +/- 1,0	13,0 +/- 1,3
	Tag 3	Kontrolle	16,0 +/- 1,1	28,0 +/- 2,2	16,9 +/- 2,1	20,9 +/- 2,4
	Tag 3	infiziert	20,6 +/- 6,1	30,6 +/- 3,7	13,6 +/- 1,9	18,3 +/- 1,8

Tabelle-A 6: Proteingehalt der Kartoffelsorte Indira nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Die Blätter wurden mit *P. infestans* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Proteingehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n=4).

Indira	[dpi]	Kontrolle / <i>A. solani</i>	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
	Tag 0	Kontrolle	11,1 +/- 1,5	16,0 +/- 3,1	11,7 +/- 2,0	14,0 +/- 1,1
	Tag 1	Kontrolle	12,2 +/- 2,5	16,6 +/- 3,9	12,6 +/- 0,8	13,9 +/- 1,5
	Tag 1	infiziert	18,2 +/- 3,4	26,5 +/- 2,0	22,8 +/- 3,4	21,8 +/- 1,5
	Tag 3	Kontrolle	12,3 +/- 2,5	17,5 +/- 3,9	15,5 +/- 1,4	16,5 +/- 1,0
	Tag 3	infiziert	19,6 +/- 3,6	19,4 +/- 2,5	18,0 +/- 2,3	17,2 +/- 1,9
Bettina	[dpi]	Kontrolle / <i>A. solani</i>	400 ppm /-N/	400 ppm /+N/	700 ppm /-N/	700 ppm /+N/
	Tag 0	Kontrolle	14,6 +/- 1,2	13,9 +/- 3,2	15,6 +/- 2,3	13,8 +/- 1,5
	Tag 1	Kontrolle	15,1 +/- 1,5	15,0 +/- 2,5	17,3 +/- 2,8	15,8 +/- 2,3
	Tag 1	infiziert	17,1 +/- 1,0	25,6 +/- 3,0	17,7 +/- 1,4	21,6 +/- 2,4
	Tag 3	Kontrolle	16,4 +/- 1,5	20,4 +/- 1,7	17,0 +/- 1,5	16,8 +/- 3,2
	Tag 3	infiziert	22,3 +/- 1,4	34,9 +/- 5,1	29,1 +/- 4,6	29,7 +/- 6,7

Tabelle-A 7: Proteingehalt der Kartoffelsorten Indira und Bettina nach vier Wochen Wachstum in Gewächshauskammern. Die Pflanzen wurden mit 400 ppm und 700 ppm CO₂ behandelt. Ein Teil der Pflanzen wurde zusätzlich mit 0,8 g N/Pflanze gedüngt. Die Blätter wurden mit *A. solani* inokuliert. Am Tag der Inokulation (Tag 0) und ein bzw. drei Tage nach Inokulation wurden die Proteingehalte der Kontrollblätter sowie der pathogenbehandelten Blätter bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte ± S.E. (n=4). Blau markierte Werte zeigen eine signifikante Induktion durch Inokulation der Blätter mit *A. solani*.

Techn. Universität München - Bayerische Hauptversuchsanstalt für Landwirtschaft, 85350 Freising-Weißenstephan

Telefon: 0816 1-713381 Telefax: 08161-714216 Postscheckkonto München 13809-801

Bodenuntersuchungsbefund für

Lehrstuhl für Phytopathologie
TU Weihenstephan
Versuchsstation Dürnast

Weihenstephan, den 20.03.02
Unser Zeichen: Sch
eingesandt am: 08.03.02

85350 Weihenstephan Kennung: 0

Analyse- Nummer	Schlagname/-Nr.	Nutz- ung	Nitrat-N NO3-N kg/ha	Ammonium-N NH4-N kg/ha
00313	Am Kieswasch 0-30 cm	Acker	20	1
00314	Am Kieswasch 30-60 c	Acker	17	1
00315	Am Kieswasch 60-90 c	Acker	12	1

Anmerkung:
Die Angabe des Ergebnisses in kg/ha
gilt für folgende Annahmen:
- Tiefe der beprobten Schicht: 30 cm
- Trockensubstanz: 80 %
- Lagerungsdichte: 1.4 kg/Liter Boden

i.A.
L. Nättscher
Dr. L. Nättscher

Tabelle-A 8: Bodenuntersuchungsbefund des Freilandversuchs 2002

BAY. SCHLAGKARTEI		BAY. SCHLAGKARTEI	
GETREIDE-RAPS-MAIS-FELDFUTTER Betriebs- und Bodenbeschreibung: Nur bei Neubeginn oder bei Änderungen ausfüllen Betriebsgröße (ha LF) Ackerfläche (ha) Grünland (ha) Getreide (ha) Weizen (ha) Mais (ha) Zuckerrüben (ha) Viehlos ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Viehbesatz (GV/ha LF)		Betriebsnummer Anschrift: LS f. Phytopathologie K. Mittelstraß Schlagnummer Schlagbezeichnung: 'Am Kieswasch'	
Tullage: ja <input type="checkbox"/> nein <input checked="" type="checkbox"/> Windlage: offen <input type="checkbox"/> geschützt <input checked="" type="checkbox"/> Lage: eben <input checked="" type="checkbox"/> hügelig <input type="checkbox"/> geneigt <input type="checkbox"/> geneigt nach: Süden <input type="checkbox"/> Westen <input type="checkbox"/> Norden <input type="checkbox"/> Osten <input type="checkbox"/> Bodeneigenschaften: einseitig <input type="checkbox"/> wechselseitig <input checked="" type="checkbox"/> stark wechselseitig <input type="checkbox"/> Bodenart: S/S/S/L/L/L/U/T/T/M/o Stauässe: ja <input type="checkbox"/> nein <input checked="" type="checkbox"/> Waldschatten max. erreichb. Pflughöhe (cm) 25 Ackerzahl (Reichtbodenschätzung) weitere Bewirtschaftungsauflagen: ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Art der Auflage: Bodenuntersuchung: pH-Wert: 7.8 Nährstoffe (mg/100g): N 10 7 19 EUF <input type="checkbox"/> EUF-Werte (mg/100g): N 20 17 12 19 DSN <input type="checkbox"/> Nitrat (kg/ha): 0-30 cm 20 30-60 cm 17 60-90 cm 12 Untersuchung auf Nematoden: <input type="checkbox"/> 19 Rüben: <input type="checkbox"/> Kartoffeln: <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> neugebildete Zysten je Gefäß		Erntejahr 02 Hauptfrucht Kartoffel Schlagnummer Schlaggröße (ha) Schlagbezeichnung	
Saat Sorte: Indira / Bellina Saatgut-Basis <input type="checkbox"/> zertifiziert <input type="checkbox"/> 1. Nachbar <input type="checkbox"/> weiterer Nachbar <input type="checkbox"/> Beizung/Inkrustierung: ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Mittel Aussaat am 04.02 Saatmenge (kg/ha) oder Einheiten Körner/m ² TKG des Saatgutes (g) Reihenabstand (cm) 66 bei Einzelkorn: Abgabe in der Reihe Fahrgeschwindigkeit bei Saat (km/Std) Saattiefe (cm) Fahrgassen: ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Normal Saat <input type="checkbox"/> Breitsaat <input type="checkbox"/> Einzelkorn Saat <input type="checkbox"/> Mulch-Direktsaat <input type="checkbox"/> Struktur des Bodens nach Aberrung der Vorfrucht: gut <input type="checkbox"/> mittel <input type="checkbox"/> schlecht <input type="checkbox"/> Verfrucht 19 Auflaufen am Keimpflanzen/m ² Stand nach Winter: gut <input type="checkbox"/> mittel <input type="checkbox"/> schlecht <input type="checkbox"/> Bestockung: stark <input type="checkbox"/> mittel <input type="checkbox"/> schwach <input type="checkbox"/> Ährenschieben am Ähren/m ² Lager: ja <input type="checkbox"/> nein <input type="checkbox"/> Ährenschieben [59] (%): Teilreife [85] (%): bei Raps: Blütenbeginn am bei Mais: Fahrenschieben am bei Mais/Raps: Pflanzen/m ² Ernte am Ertrag ungetrocknet (dt/ha) bei Wasser (%) Ertrag: geschätzt <input type="checkbox"/> gewogen <input type="checkbox"/> bei Feldfrütern: Zahl der Schnitte Verwertung Abputz (%) Sortierung: größer 2,5mm (%) kleiner 2,2mm (%) TKG (g) Eiweiß (%) Sedimentationswert Fallzahl Ölfett (%) bei Silomais TS (%)		Ertragsmindernde Einflüsse: Frostschaden kein / gering / mittel / groß / wann(Monat) Wirtschaden in % wann (Monat) Näserschaden kein / gering / mittel / groß / wann(Monat) Hagelschaden in % wann (Monat) Trockenheit kein / gering / mittel / groß / wann(Monat) Bemerkungen, weitere Ergebnisse: 25.04. Keimling ca. 1cm 07.05. Blattspitze	
RZ im SMELF ML DCF SCHLAGKARTENAFFE Sand: 19271 Bayerische Landesanstalt für Betriebswirtschaft und Agrarstruktur, München			

Tabelle-A 9: Geländeplan des Freilandversuchs 2002

Tragen Sie bitte alle Maßnahmen nach Aberntung der Vorfrucht ein!																			
BODENBEARBEITUNG (einschl. mechanischer Pflege und Handhacke)										MINERALISCHE DÜNGUNG ZUR HAUPT- UND ZWISCHENFRUCHT									
Datum	eingesetztes Gerät z.B. Kreiselegge Bei Handhacke auch Stundenangaben	Teilfläche %	Zahl der Arbeitsgänge	Bearbeitungstiefe (cm)	Bodenzustand			Arbeitsqualität	Datum	Entwicklungsstadium	Düngemitteltyp z.B. NPK 13/13/21 Unterfrühdüngung mit "U" Kennzeichnungen	Teilfläche %	Menge dt/ha	Reinheitsstoffe (kg/ha)					
					Z. trock.	Z. naß	Z. ideal							N	P ₂ O ₅	K ₂ O	MgO	Bor	CaO
10.04.	Kreiselegge		2	15	X	X	X	gut	09.04.			100							
10.04.	Höfelfegerät		1		X	X	X	mittel	03.04.			30							
30.04.	"		1		X	X	X	schl.	26.04.			50							
									//			11							
												121							
												21							
GESAMTMEANGE kg/ha																			
PFLANZENSCHUTZ										ORGANISCHE DÜNGUNG									
Besatz/Befall bei Spritzung,	Leitunkräuter, Krankheiten, Schädlinge	Datum der Behandlung	Entwicklungsstadium	Handelsname z.B. Avelon BA = Bandspritzung RA = Randspritzung UB = Unterblattspritzung	Teilfläche %	Menge kg/ha oder l/ha	Wirkung	Mist, Gülle, Jauche				Stroh: Rübtenblatt der Vorfrucht							
								Form	Tierart	Menge m ³ /ha oder dt/ha oder m ³ /ha	Bei Gülle TS		Stroh:	Rübtenblatt:	Zerkleinerung vor oder bei Einarbeitung:	Gerät zur Zerkleinerung			
X	Distel	02.05.		Sencor	100	300g	gut												
	"	16.05.		Ca#0	11	50g	mittel												
		//		FHS	11	0.31	schl.												
X	Kartoffelkäfer	23.05.		Decis	11	0.21													
Zwischenfrucht (nach Aberntung der Vorfrucht) <input type="checkbox"/> verfüllt im Herbst <input type="checkbox"/> eingearbeitet <input type="checkbox"/> Zerkleinerung vor oder bei Einarbeitung: <input type="checkbox"/> Pflanzensart:																			
Saatzeit: Wuchshöhe:																			

Tabelle-A 10: Dünge- und Pestizidplan des Freilandversuchs 2002

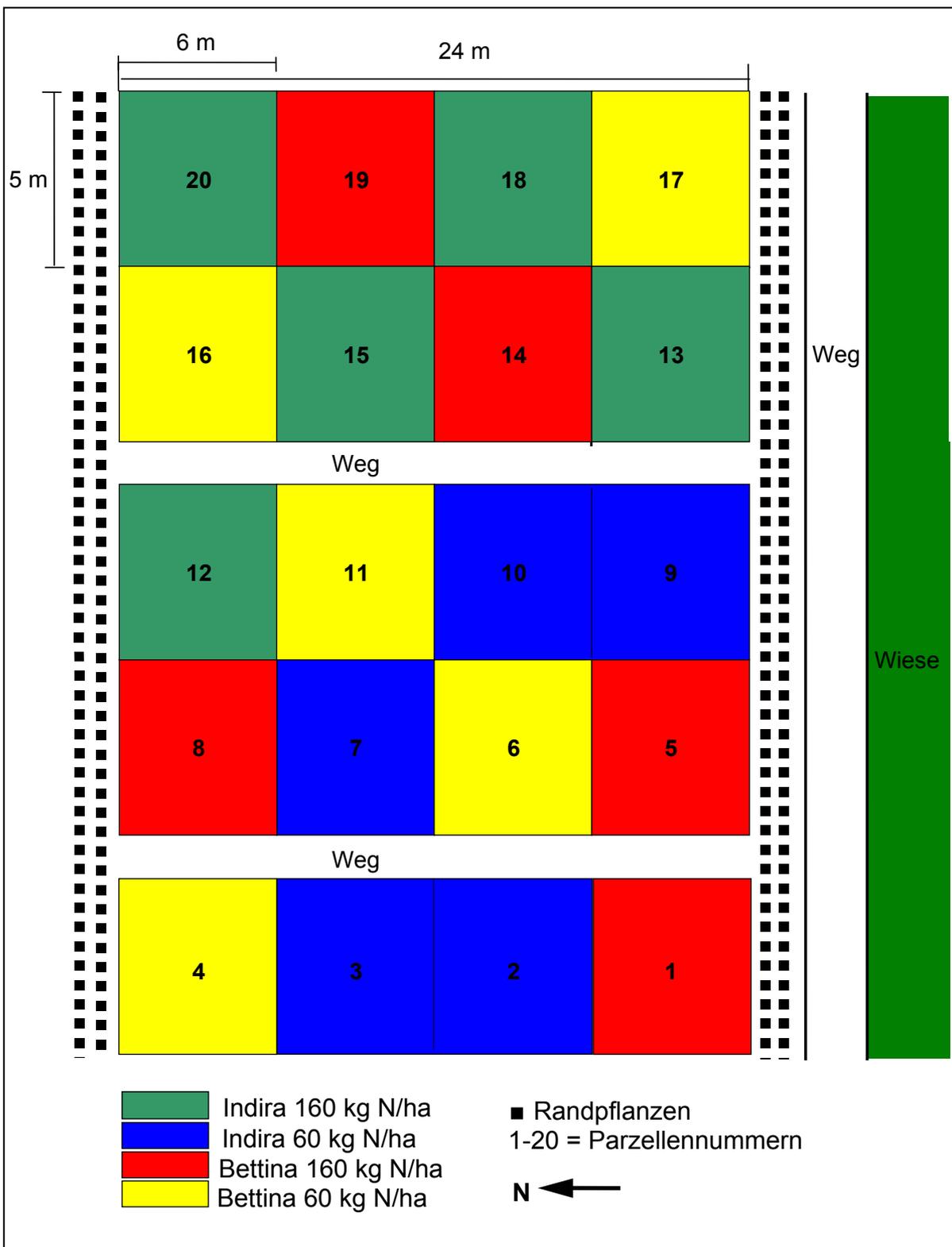


Abbildung-A 1: Randomisierte Blockanlage des Freilandversuchs 2002

LEBENS LAUF

Name Kirstin Mittelstraß

Geburtsdatum/-ort 23.03.1974 / München

Schulbildung

09/80 bis 07/85 Grund- und Hauptschule
in Gilching

09/85 bis 07/94 Carl-Spitzweg-Gymnasium
(neusprachlich und mathematisch-naturwissenschaftlich)
in Germering-Unterpfaffenhofen

Studium

11/94 bis 09/00 Biologische Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Diplomarbeit: Institut für Biochemische Pflanzenpathologie
der GSF Neuherberg,
„Reaktive Sauerstoffspezies und Ethylen als
Verstärkungsfaktoren bei der Ozonempfindlichkeit von
Wild- und Kulturpflanzen“

Abschluss: Diplom-Biologin Univ.

Studienbezogene Auslandsaufenthalte

11/98 - 02/99 Research Scientist an der San Diego State University
(USA), Department of Biology

07/99 - 08/99 Poster Presentation auf der Ecology Society of America
(ESA) conference, Spokane, WA
„Biomes and ecophysiological changes along a fire
induced chronosequence southern california chaparral“

11/00 - 06/01 Research Assistant an der Deakin University (Australia),
School of Biological and Chemical Sciences

Promotion

10/01 - 09/04 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für
Phytopathologie (Prof. E. F. Elstner) des Wissenschafts-
zentrums Weihenstephan der TU-München

Abschluss: Dr. rer. nat. Biol.