

**Untersuchungen zu physiologischen,  
morphologischen und biochemischen  
Veränderungen an mit *Phytophthora quercina*  
infizierten jungen Eichen**

Maria Brummer

Technische Universität München  
Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume  
Department für Ökologie

**Untersuchungen zu physiologischen,  
morphologischen und biochemischen  
Veränderungen an mit *Phytophthora quercina*  
infizierten jungen Eichen**

Maria Brummer

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 genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rainer Matyssek

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Oßwald  
2. Univ.-Prof. Dr. Erich F. Elstner

Die Dissertation wurde am 27. 02. 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19. 04. 2002 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Phytophthora</i>-Infektionen im Zusammenhang mit dem Eichensterben .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Zielsetzung dieser Dissertation .....</b>	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 Chemikalienliste .....</b>	<b>19</b>
<b>2.2 Pflanzen- und Pilzmaterial und Infektionsmethoden .....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Pflanzenmaterial .....	21
2.2.1.1 Anzucht von Eichensämlingen in Substrat .....	21
2.2.1.2 Düngung der Eichensämlinge während des Infektionsversuchs 1998 .....	22
2.2.1.3 Anzucht von Eichensämlingen in Wasser .....	22
2.2.1.4 Kultur von zweijährigen Eichen in Substrat .....	22
2.2.1.5 Behandlung und Aufbewahrung von Eicheln .....	23
2.2.2 <i>Phytophthora quercina</i> -Kulturen .....	23
2.2.2.1 V8-Agarkultur .....	23
2.2.2.2 V8-Flüssigkultur .....	23
2.2.3 Infektionsmethoden .....	24
2.2.3.1 Infektion von Eichensämlingen in Wasser .....	24
2.2.3.1.1 Herstellung der Zoosporensuspension .....	24
2.2.3.1.2 Infektion von Eichensämlingen zur Untersuchung von Peroxidasen, für Phenolanalysen und mikroskopische Untersuchungen .....	24
2.2.3.1.3 Infektion von Eichensämlingen in Wasser für physiologische Untersuchungen 2000 .....	25
2.2.3.1.4 Infektion von Eichensämlingen für ELISA-Analysen und zur Messung von Chitinasen, Glucanasen und Osmotinen in der Wurzel .....	25
2.2.3.2 Infektion von Eichensämlingen in Substrat .....	26
2.2.3.2.1 Herstellung von Inokulum .....	26
2.2.3.2.2 Infektion von Eichensämlingen und Kontrollansatz beim Infektionsversuch 1998 .....	26
2.2.3.2.3 Infektion von zweijährigen Eichen und Kontrollansatz für physiologische Messungen 2000 .....	27

<b>2.3</b>	<b>Biochemische Untersuchungen .....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	27
2.3.2	Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes nach Ziegler und Egle (1965) .....	28
2.3.3	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	29
2.3.3.1	Double-Antibody-„Sandwich“-ELISA zum Nachweis von <i>Phytophthora</i> .....	29
2.3.3.2	Indirekter ELISA zum Nachweis von Quercinin bzw. <i>Phytophthora</i> .....	29
2.3.4	Phenolanalyse in Wurzelproben mittels HPLC (nach Brunner 2000) .....	30
2.3.4.1	Probenvorbereitung .....	30
2.3.4.2	HPLC-Analysen .....	30
2.3.4.3	Qualitative Auswertung .....	31
2.3.4.4	Quantitative Auswertung .....	32
2.3.5	Proteinextraktionsmethoden .....	32
2.3.5.1	Proteinextraktion für den Double-Antibody- „Sandwich“-ELISA .	32
2.3.5.2	Proteinextraktion für den indirekten ELISA .....	32
2.3.5.3	Proteinextraktion zur Untersuchung von Peroxidasen .....	32
2.3.5.4	Proteinextraktion zur Untersuchung von PR-Proteinen .....	33
2.3.6	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) .....	33
2.3.6.1	Methode der Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	33
2.3.6.2	Durchführung der Elektrophorese .....	34
2.3.6.3	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
2.3.6.4	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE) .....	37
2.3.7	Western-Blots von Polyacrylamidgelen (Semi-Dry-Blots) .....	37
2.3.7.1	Lösungen, Puffer, Antiseren .....	38
2.3.7.2	Herstellung des Western-Blots .....	40
<b>2.4</b>	<b>Mikroskopische Untersuchungen .....</b>	<b>41</b>
2.4.1	Licht- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen ohne spezifische Markierungen .....	42
2.4.1.1	Lichtmikroskopische Untersuchungen .....	42
2.4.1.1.1	Einbettung in Historesin (Glycomethacrylat), Färbung mit Safranin O/Azur II .....	42
2.4.1.1.2	DMAZA-Färbung an frischen Präparaten .....	43
2.4.1.1.3	Einbettung in SPURR-Epoxidharz und Färbung mit Toluidinblau .....	43
2.4.1.2	Elektronenmikroskopische Untersuchungen .....	44
2.4.2	Immunohistochemie .....	46
2.4.2.1	Prinzip immunohistochemischer Untersuchungen .....	46
2.4.2.2	Immunofluoreszenzmarkierung .....	47
2.4.2.2.1	Fluoreszenzmikroskop .....	48
2.4.2.2.2	Laser Scanning Mikroskop .....	48
2.4.2.3	Immunogoldmarkierung .....	49
2.4.2.3.1	Markierung nach Fixierung und Einbettung .....	49
2.4.2.3.2	Markierung vor endgültiger Fixierung und Einbettung .....	50
<b>2.5</b>	<b>Morphologische Untersuchungen an Wurzelsystemen .....</b>	<b>52</b>
2.5.1	Vorbereitung der Wurzeln .....	52
2.5.2	Einscannen der Wurzeln und morphologische Analyse .....	52

2.5.3	Ermittlung der Trockengewichte der Wurzeln .....	54
2.5.4	Für die morphologische Analyse berechnete Größen .....	54
<b>2.6</b>	<b>Physiologische Untersuchungen .....</b>	<b>55</b>
2.6.1	Chlorophyllfluoreszenzmessung .....	55
2.6.2	Gaswechselformung .....	57
2.6.2.1	Gerätebeschreibung und Wirkungsweise .....	57
2.6.2.2	Durchführung der Gaswechselformungen für den Infektions- versuch 1998 .....	58
2.6.2.3	Durchführung von Gaswechselformungen für die Infektions- versuche 2000 .....	60
<b>2.7</b>	<b>Versuchsaufbau und Überblick über anschließende Messungen .....</b>	<b>60</b>
2.7.1	Infektionsversuch von Eichensämlingen mit <i>Phytophthora quercina</i> 1998 .....	61
2.7.2	Infektionsansatz zur Untersuchung der biochemischen Abwehr in Eichenwurzeln .....	65
2.7.3	Infektionsansatz zum parallelen Nachweis von <i>Phytophthora quercina</i> und Quercinin in Wurzelgewebe .....	65
<b>2.8</b>	<b>Statistische Auswertungen .....</b>	<b>66</b>
2.8.1	Statistische Auswertung der Gaswechselformdaten .....	66
2.8.1.1	Statistische Auswertung des Wurzel-Inokulations- versuchs 1998 .....	66
2.8.1.2	Statistische Auswertung der Wurzel-Inokulations- versuche 2000 .....	67
2.8.2	Statistische Auswertung der Chlorophyllfluoreszenzdaten .....	67
2.8.3	Statistische Auswertung der wurzelmorphologischen Daten .....	67
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>68</b>
<b>3.1</b>	<b>Physiologische Veränderungen auf Blattebene nach Infektion der Wurzel mit <i>Phytophthora quercina</i> .....</b>	<b>68</b>
3.1.1	Physiologische Messungen an Wurzel-Inokulations- versuchen 1998 .....	68
3.1.2	Physiologische Messungen an Wurzel-Inokulations- versuchen 2000 .....	73
3.1.2.1	Infektion von Eichensämlingen in Wasser .....	73
3.1.2.1.1	Gaswechselformungen .....	73
3.1.2.1.2	Chlorophyllfluoreszenzmessungen .....	76
3.1.2.2	Infektion von zweijährigen Eichen in Substrat .....	78
3.1.2.2.1	Gaswechselformungen .....	78
3.1.2.2.2	Chlorophyllfluoreszenzmessungen .....	82
<b>3.2</b>	<b>Weitere Blattuntersuchungen zum Inokulations- versuch 1998 .....</b>	<b>84</b>
3.2.1	Zustand der Pflanzen zu den Meßzeitpunkten .....	84
3.2.2	Frischgewichte der Blätter und Blattflächen .....	85

3.2.3	Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoidgehalten in den Blättern .....	86
<b>3.3</b>	<b>Morphologische Untersuchung der infektionsbedingten Wurzelschäden aus dem Inokulationsversuch 1998 .....</b>	<b>88</b>
3.3.1	Betrachtung der Schäden am Gesamtwurzelsystem .....	88
3.3.2	Schäden am Feinwurzelsystem (0 - 1,5mm Durchmesser) .....	90
3.3.3	Schäden am Grobwurzelsystem (>1,5 - 4,5mm Durchmesser) .....	92
<b>3.4</b>	<b>Immunologische Untersuchungen .....</b>	<b>95</b>
3.4.1	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von <i>Phytophthora quercina</i> .....	95
3.4.2	Immunologischer Nachweis von Quercinin in infizierten Eichenwurzeln .....	96
<b>3.5</b>	<b>Biochemische Abwehrreaktionen auf Pathogenbefall in der Wurzel .....</b>	<b>97</b>
3.5.1	Proteinbestimmungen .....	97
3.5.1.1	Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und mit <i>P. quercina</i> infizierten Eichenwurzeln markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen, basische $\beta$ -1,3-Glucanasen, saure Chitinasen, Osmotin PR-S und Osmotin pep2 .....	97
3.5.1.2	Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzelbereichen an der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen .....	98
3.5.1.3	Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzeln oberhalb der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen .....	99
3.5.1.4	Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzelbereichen an der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische $\beta$ -1,3-Glucanasen .....	100
3.5.1.5	Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzeln oberhalb der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische $\beta$ -1,3-Glucanasen .....	101
3.5.2	Nachweis von PR-Proteinen in Eichenwurzeln anhand von Western-Blots: Reaktionen auf Pathogenbefall mit <i>P. quercina</i> .....	102
3.5.2.1	Nachweis von basischen Chitinasen .....	102
3.5.2.2	Nachweis von basischen $\beta$ -1,3-Glucanasen .....	104
3.5.2.3	Nachweis von sauren Chitinasen .....	106
3.5.2.4	Nachweis von Osmotinen .....	107
3.5.2.5	Nachweis von Peroxidasen .....	108
<b>3.6</b>	<b>Mikroskopische Untersuchung von infiziertem und gesundem Wurzelgewebe .....</b>	<b>109</b>
3.6.1	Lichtmikroskopie .....	109
3.6.1.1	Mikroskopische Aufnahmen gesunder Eichenwurzeln .....	109
3.6.1.2	Mikroskopische Aufnahmen mit <i>P. quercina</i> infizierter Eichenwurzeln .....	113

3.6.2	Transmissionselektronenmikroskopie .....	120
3.6.3	Immunofluoreszenzmarkierung .....	125
3.6.4	Immunogoldmarkierung .....	130
<b>3.7</b>	<b>Erste Untersuchungen zur möglichen Induktion von Phenolen .....</b>	<b>140</b>
3.7.1	Mikroskopischer Nachweis von Phenolen mit DMAZA .....	140
3.7.2	Phenolanalyse in Wurzelproben mittels HPLC .....	141
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>143</b>
<b>4.1</b>	<b><i>Phytophthora quercina</i> beeinträchtigte die Physiologie junger Stieleichen negativ. ....</b>	<b>143</b>
4.1.1	Zur Erklärung der Reduktion der Netto-Photosyntheserate sind verschiedene Ursachen denkbar. ....	144
4.1.2	Chlorophyllfluoreszenzmessungen zeigten die infektionsbedingte Reduktion der photochemischen Effizienz. ....	146
4.1.3	Infektionsbedingte Störungen im Wasserhaushalt führten zu einer Reduktion der Transpirationsrate (E) und der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ). ....	148
<b>4.2</b>	<b>Infektionsbedingte Chlorosen entwickeln sich wahrscheinlich erst über einen längeren Zeitraum. ....</b>	<b>149</b>
<b>4.3</b>	<b>Infektionsversuch 1998: Einige Meßgrößen wichen im Juli vom erwarteten Kurvenverlauf ab; Am Ende der Vegetationsperiode erholte sich das System wieder. ....</b>	<b>149</b>
<b>4.4</b>	<b><i>Phytophthora quercina</i> wurde im Infektionsversuch 1998 über ELISA nachgewiesen. ....</b>	<b>151</b>
<b>4.5</b>	<b>Auswirkung der Flutung auf die Pflanzen .....</b>	<b>152</b>
<b>4.6</b>	<b>An den Wurzeln ließen sich durch <i>Phytophthora quercina</i> bedingte gravierende morphologische Schäden schon nach wenigen Wochen feststellen. ....</b>	<b>154</b>
<b>4.7</b>	<b>Auf mikroskopischer Ebene waren deutliche Schäden wenige Tage nach der Infektion erkennbar. ....</b>	<b>156</b>
4.7.1	Braun verfärbte Wurzelbereiche waren durchsetzt von Hyphen. ....	156
4.7.2	Im Lichtmikroskop ließ sich die inter- und intrazelluläre Besiedelung des Pflanzengewebes beobachten. ....	157
4.7.3	Die Infektion führte zu gravierenden zellulären Veränderungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene. ....	158
4.7.4	Die Infektion löste strukturelle Abwehrreaktionen der Pflanze aus. ....	160

## Inhaltsverzeichnis

<b>4.8</b>	<b>Biochemische Abwehrreaktionen auf den Pathogenbefall in der Eichenwurzel</b> .....	<b>161</b>
4.8.1	Bildung von PR-Proteinen .....	161
4.8.1.1	Die Bildung von basischen und sauren Chitinasen und basischen $\beta$ -1,3-Glucanasen wurde am Infektionsort durch das Pathogen induziert. ....	161
4.8.1.2	In infizierten Eichenwurzeln wurden extrazelluläre Osmotine synthetisiert. ....	162
4.8.1.3	In infiziertem Wurzelgewebe konnten weniger Peroxidasen nachgewiesen werden als in gesundem. ....	163
4.8.2	Erste Untersuchungen wiesen auf eine infektionsbedingte Induktion von Phenolen hin. ....	163
<b>4.9</b>	<b>Das Elicitin Quercinin wurde von <i>Phytophthora quercina</i> im Wurzelgewebe synthetisiert.</b> .....	<b>165</b>
4.9.1	Quercinin war in infiziertem Wurzelgewebe über ELISA nachzuweisen. ....	165
4.9.2	Quercinin wurde in den Zellwänden von Hyphen und in infiziertem Wirtsgewebe immunologisch nachgewiesen. ....	166
4.9.3	Quercinin kann vermutlich an pflanzliche Cytoplasmamembranen binden und wird möglicherweise im Xylem in der Pflanze transportiert. ....	167
4.9.4	Hintergrundreaktionen bei den Immunomarkierungen waren methodisch bedingt. ....	169
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>170</b>
	Literaturverzeichnis .....	173
	Danksagung .....	186
	Lebenslauf .....	188



**Abkürzungsverzeichnis**

A	Netto-Photosyntheserate
ABA	Abscisinsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin
const.	constant
DMAZA	4-(Dimethylamino)zimtaldehyd
E	Transpirationsrate
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Ext	Extinktion
$F_m$	Fluoreszenz eines dunkeladaptierten Blattes, induziert durch einen sättigenden Lichtimpuls
$F_m'$	Fluoreszenz eines lichtadaptierten Blattes, induziert durch einen sättigenden Lichtimpuls
$F_o$	Fluoreszenz eines dunkeladaptierten Blattes zu einem gegebenen Zeitpunkt
$F_t$	Fluoreszenz eines lichtadaptierten Blattes zu einem gegebenen Zeitpunkt
$g_{H_2O}$	Leitfähigkeit für Wasserdampf
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
konz.	konzentriert
Lsg.	Lösung
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NBT	4-Nitroblau-Tetrazolium
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffer Saline
PR	pathogenesis related
PSII	Photosystem II
PVPP	Polyvinylpyrrolidon
$q_{NP}$	nicht photochemisches Quenching
$q_P$	photochemisches Quenching
RLD	Root Length Density
RMD	Root Mass Density
rpm	rounds per minute
RTD	Root Tip Density
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz (Sodium Dodecyl Sulfate)
SL	Stammlösung
SRL	Specific Root Length
TBS	Tris Buffer Saline
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TG	Trockengewicht
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
WUE	Water Use Efficiency
z.A.	zur Analyse



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Phytophthora*-Infektionen im Zusammenhang mit dem Eichensterben

Die aktuelle Diskussion über das Eichensterben ist bei genauerer Betrachtung nicht neu. Es finden sich in der Literatur Berichte über das Eichensterben (*Quercus robur* L.) in Europa seit mehr als zwei Jahrhunderten (Donaubauer 1998). Konkret sind Schäden im ausgehenden 19. Jahrhundert und im vergangenen Jahrhundert aus Osteuropa belegt, wobei sich die Berichte seit den 1970er Jahren häufen (Brasier 1992, Donaubauer 1998). Ab diesem Zeitraum sind auch kranke Eichen im westlichen mediterranen Raum einschlägig, wobei die Arten *Q. suber*, *Q. ilex* und *Q. pubescens* betroffen sind.

Vor diesem Hintergrund könnte man zwischen „alten“ und „neuen“ *Phytophthora*-Erkrankungen an Eichen unterscheiden. Der Zusammenhang zwischen den „neu“ bei *Q. robur* beobachteten Schäden und einer Wurzelinfektion mit *P. quercina* konnte von Blaschke und Jung (Jung 1996, Jung und Blaschke 1996) erstmals deutlich belegt werden. Untersuchungen in 1990er Jahren zeigten, daß sich an den Wurzeln der Mehrzahl der untersuchten kranken Bäume Pathogene befanden. Dabei stellte sich heraus, daß es sich bei der an Eichenwurzeln gefundenen *Phytophthora*-Art um einen bislang unbekanntem Vertreter handelte. Dieser wurde von Jung isoliert und als *P. quercina* beschrieben (Jung et al. 1999). Jung et al. (1999) belegten für *P. quercina* eine sehr hohe Pathogenität gegenüber *Q. robur*. Es konnte eine Korrelation zwischen den Schadsymptomen an der Krone und dem Pilzbefall der Wurzeln nachgewiesen werden. Dabei fanden sich oberirdisch kranke Bäume mit starker Wurzelinfektion, aber auch oberirdisch gesund aussehende Bäume mit nur leichtem Befall der Wurzeln (Blaschke 1994). Oberirdisch zeigen sich die makroskopisch erkennbaren Symptome als Gelbwerden oder frühes Abwerfen der Blätter, Abszission von Zweigen, schwacher Wiederaustrieb, Einzug der Krone, Zunahme toter Zweige und Äste und als Auftreten von Rindenrissen an der Stammbasis oder auch höher (Donaubauer 1998, Jung und Blaschke 1996). Die Symptome können über Jahre andauern und zum Absterben des Baumes führen – in

## Einleitung

Deutschland sterben jährlich durchschnittlich 2-5 Eichen pro Hektar ab (Hartmann und Blank 1992). Wie die vorliegenden Arbeiten belegen, führen Wurzelinfektionen mit *P. quercina* bei *Q. robur* zu einer deutlichen Reduktion der physiologischen Leistungsfähigkeit (photochemische Effizienz, Netto-Photosyntheserate, Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf. An mit *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* infiziertem Tabak konnten Schramm und Wolf (1954) zeigen, daß die Wurzelinfektion die Transpiration deutlich gegenüber den Kontrollwerten nicht inokulierter Pflanzen vermindert. Untersuchungen an Bäumen zu diesem Sachverhalt wurden von Sterne et al. (1978) durchgeführt. Avocado-Bäume, die mit *Phytophthora cinnamomi* infiziert waren, hatten eine reduzierte Transpirationsrate und stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf. Obwohl im Rahmen dieser Arbeit mit Eichensämlingen gearbeitet wurde, ist anzunehmen, daß die Physiologie von Eichen im Freiland ebenfalls durch eine Infektion mit *P. quercina* deutlich beeinträchtigt wird. Vergleichende Arbeiten wurden von Heyne in den Jahren 1998-2000 am Alt-Auenstandort Erlau bei Landau an der Isar durchgeführt (Heyne 2002). Auch hier zeigte sich an Bäumen mit einer Wurzelinfektion durch *P. quercina* eine Reduktion der physiologischen Leistungsfähigkeit an chlorotischen Blättern. Es ist allerdings davon auszugehen, daß sich Krankheitssymptome an der Baumkrone oft erst 10 oder mehr Jahre nach dem Einwirken des schädigenden Faktors entwickeln (Donaubauer 1998).

Am Wurzelsystem, besonders an den Feinwurzeln, verursacht *P. quercina* gravierende Schäden. Dies wurde bereits von Blaschke (1994) an *Q. robur* beschrieben und konnte durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Die folgenden Abbildungen zeigen Beispiele von gesunden und mit *P. quercina* infizierten Wurzelsystemen von *Q. robur*.



A



B



C

**Abbildung 1.1 (A-C).** Gesunde und mit *Phytophthora quercina* infizierte Eichensämlinge. **A**, Links ein nicht infizierter, rechts ein infizierter Sämling 1 Woche nach der Inokulation. **B**, Dieselben Sämlingen wie A, liegend abgebildet. **C**, Aufnahme der Wurzeln: weiße, unverholzte Wurzeln des Kontrollsämlings (oben) und braune infizierte Wurzeln (unten). Die Wurzeln des infizierten Sämlings zeigen ein eingeschränkte Längenwachstum.



A



B

**Abbildung 1.2. (A-B).** Vergleich gesunder und mit *Phytophthora quercina* infizierter Wurzelsysteme junger Stieleichen. **A**, Wurzelsystem einer Kontrolleiche (Juni 1998). **B**, Wurzelsystem einer infizierten Eiche (Juni 1998).

Deutliche Verluste an Feinwurzeln können die Wasserleitung in der Pflanze behindern (Ayres 1980, Sterne et al. 1978) und dadurch zu einem gestörten Wasserhaushalt führen. Untersuchungen zum Zusammenhang von Wurzelschäden mit physiologischen Meßgrößen sind an Holzpflanzen derzeit noch sehr selten. Der Großteil der Forschungsarbeiten hat seinen Schwerpunkt bei krautigen Pflanzen. Geht man davon aus, daß ein gravierender Verlust an Feinwurzeln und die dadurch erheblich erschwerte Aufnahme von Wasser und Nährsalzen für die Pflanze eine ähnliche Situation bedingt wie sie auch bei Trockenstreß vorliegt, so liegt die Vermutung nahe, daß die Netto-Photosyntheserate und die photochemische Effizienz, sowie die Transpirationsrate und die Leitfähigkeit für Wasserdampf unter derartigen Bedingungen deutlich absinken. Epron et al. (1992) und Epron und Dryer (1992) zeigten ebenfalls anhand von Untersuchungen der Chlorophyllfluoreszenz, daß die photochemische Effizienz von *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. bei Trockenstreß sinkt.

Die Diskussion um die möglichen Ursachen für die zunehmende Verbreitung pathogener, bodenbewohnender *Phytophthora*-Arten ist noch nicht abgeschlossen. Die Vermutung liegt nahe, daß aktuelle Veränderungen von Umweltbedingungen dafür der Grund sein könnten. Brasier (1996) vermutet in der Ausbreitung von *P. cinnamomi* an *Q. suber* und *Q. ilex* im Mittelmeerraum ein frühes Symptom von globaler Erwärmung. Anhand dieses Pathogens demonstriert Brasier (1996) exemplarisch, daß die Aktivität von *Phytophthora*-Arten innerhalb Europas durch eine globale Erwärmung zunehmen könnte. Dies würde zu einer weiteren Ausbreitung dieser Pathogene, auch in nördlicher gelegene Gebiete, führen. Wärmere Böden in Kombination mit höheren Niederschlägen und Feuchtigkeitsgehalten der Böden könnten die Produktion von Inokulum und den Infektionsprozeß begünstigen. Zudem würde durch wärmere Temperaturen die Ausbreitungsgeschwindigkeit des Pilzes im Wirtsgewebe erhöht, was wiederum eine gesteigerte Produktion von Inokulum bedeuten und Sekundärinfektionen bedingen könnte. Wärmere Bodentemperaturen während der Wintermonate könnten das Überleben des Pilzes im Boden oder in den Wurzeln fördern. Hinzu käme eine mögliche Prädisposition der Bäume durch klimatischen Streß (Brasier 1996). Wie Brasier (1996) darstellt, muß sich, im Falle von *P. cinnamomi*, nicht nur eine generelle klimatische Erwärmung begünstigend auf die Produktion und Verbreitung von Inokulum auswirken. Gelegentliche Perioden mit ungewöhnlich warmem Wetter in Kombination mit schweren Regenfällen, die zu

## Einleitung

warmen, feuchten Böden führen, könnten ausreichen, um Infektionen und schwerere Krankheitsverläufe auszulösen. In Kombination mit möglicherweise auftretenden Temperatur- und Feuchtigkeitsextremen könnte eine erhöhte Anfälligkeit des Wirtes gegenüber *Phytophthora* gegeben sein (Brasier 1992, Marçais et al. 1993). Nur bei genügend hohem und anhaltendem Bodenwasser kann eine Wurzelinfektion durch Zoosporen von *Phytophthora* erfolgen (Erwin und Ribeiro 1996, Kuan und Erwin 1982). Hinzu kommt, daß es durch Staunässe noch zu einer Schwächung der Pflanzen kommen kann, die sich im Schließen von Stomata (Kozłowski 1982, Tang und Kozłowski 1982) und in Wachstumsinhibition – v.a. an den Wurzeln äußert (Drew und Lynch 1980, Ploetz und Schaffer 1989, Tang und Kozłowski 1982). Andererseits können auch trockenere Perioden, die für die Pflanzen zu Wassermangel führen, prädisponierend für eine nachfolgende Infektion mit *Phytophthora* sein (Cahill et al. 1986). Wird Wassermangel von zu feuchten Bodenverhältnissen gefolgt, kann ein begünstigender Effekt auf eine Wurzelinfektion mit *Phytophthora* bemerkt werden (Bernhardt und Grogan 1982, Marçais et al. 1993). Des weiteren könnten Immissionen aus der Luft in den Boden die Interaktion zwischen *Phytophthora* und Wirt verändert haben (Blank und Hartmann 1993, Donaubaue 1998). Zum Beispiel könnte ein erhöhter Stickstoffeintrag in den Boden zu einer Schwächung der Mykorrhiza mit ihrer natürlichen Schutzfunktion gegen Bodenpathogene führen (Jung und Blaschke 1996). Es ist belegt, daß ein erhöhter Stickstoffgehalt im Boden die Pflanze für einen Befall mit *Phytophthora* prädisponiert (Hoffmann et al. 1994).

Im Rahmen der „neuen“ *Phytophthora*-Erkrankungen an Bäumen wurden mehrere wurzelpathogene *Phytophthora*-Arten an unterschiedlichen Wirten gefunden. Allein an Eiche wurden von Jung et al. (1999) im Rahmen der Untersuchung von 33 unterschiedlichen Standorten innerhalb Zentraleuropas 9 verschiedene *Phytophthora*-Arten von den Feinwurzeln und aus der Rhizosphäre krank erscheinender Stiel- und Traubeneichen (*Q. robur* L. und *Q. petraea* [Matt.] Liebl.) isoliert – darunter am häufigsten *P. cambivora*, *P. citricola* und *P. quercina*.

Seit 1993 wurde innerhalb Europas auch eine deutliche Erkrankung von Erlen (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn.) entlang von Flüssen festgestellt (Gibbs 1995, Gibbs et al. 1999). Die Symptome an der Baumkrone äußern sich, ähnlich wie bei Eichen, als Welke und Chlorosen. Die Krankheit wird durch einen neuen *Phytophthora*-Hybrid (genannt „Erlen-*Phytophthora*“) verursacht, welcher sich aus *P. cambivora* und einer

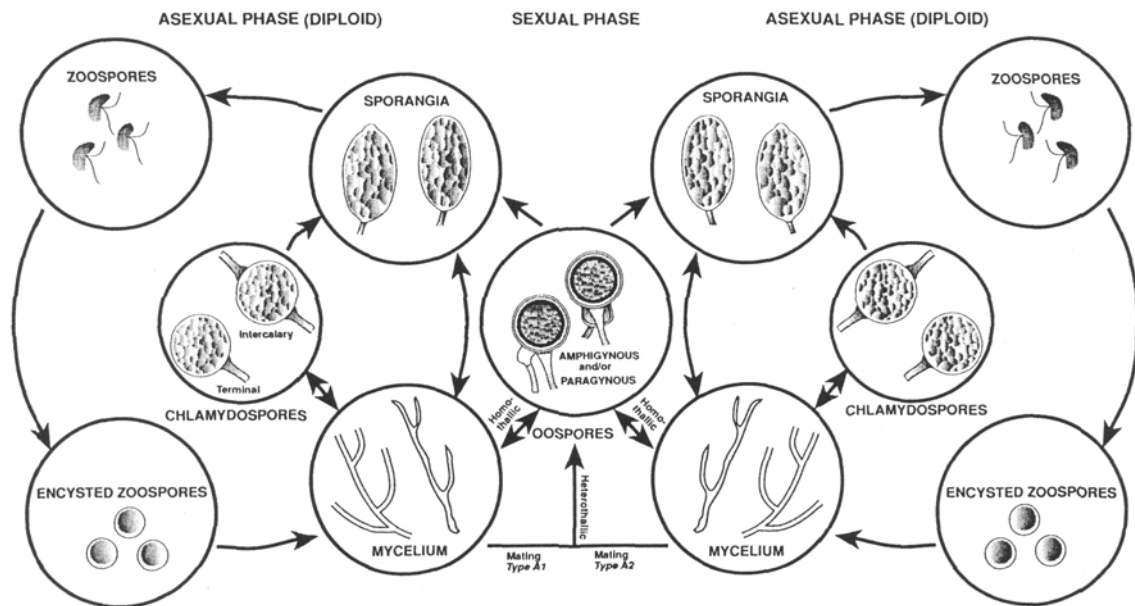


bislang unbekanntem weiteren *Phytophthora*-Art entwickelt hat (Brasier et al. 1995, 1999). Zu erwähnen sind auch die durch *Phytophthora cinnamomi* hervorgerufenen gravierenden Absterbeerscheinungen an Eukalyptus im südlichen Teil Australiens. In den 1970er Jahren wurde eine durchschnittliche Verbreitungsgeschwindigkeit von über 170m pro Jahr ermittelt (Weste et al. (1973).

*Phytophthora* hat mit ca. 40 Arten eine sehr weite geographische Verbreitung bei einer Vielzahl verschiedener Wirtspflanzen (Erwin und Ribeiro 1996). Nach Agrios (1997) gilt es als gesichert, daß die Gattung *Phytophthora* (Familie *Pythiaceae*, Ordnung *Peronosporales*, Klasse *Oomycetes*, Abteilung *Oomycota*), gemeinsam mit Kieselalgen, Braunalgen und Goldalgen, im Reich *Chromista*, eingeordnet werden kann. Begründet wird die neue Taxonomie durch einige nicht-pilzliche Merkmale der *Oomycota*: Die Zellwand enthält ein Mikrofibrillenskelett aus Zellulose, sowie amorphe  $\beta$ -1,3-Glucane statt Chitin; die Morphologie der mitochondrialen Christae unterscheidet sich von derjenigen bei echten Pilzen; der größte Teil des Lebenszyklus wird, im Gegensatz zu echten Pilzen, in der diploiden Phase verbracht; die Zoosporen sind heterokont begeißelt; Squalen, Zwischenprodukt in der Sterolbiosynthese, kann nicht zur Herstellung von Sterolen verwendet werden (Erwin und Ribeiro 1996). Obwohl *Phytophthora* demnach taxonomisch nicht mehr den echten Pilzen zuzuordnen ist, wird innerhalb dieser Arbeit die Bezeichnungen „Pilz“ bzw. „pilzlich“ in Bezug auf *P. quercina* beibehalten. Die molekulare Phylogenie von *Phytophthora* und verwandten Oomyceten belegt, daß es sich um eine monophyletische Art handelt (Cooke et al. 2000).

Das Myzel von *P. quercina* wird von tubulären Hyphen gebildet. Der Durchmesser der Hyphen bewegt sich zwischen 5 und 8 $\mu$ m. Auf Kulturmedium angezogenes oder unter feuchten Bedingungen aus infiziertem Gewebe herauswachsendes Myzel ist nicht pigmentiert und nahezu transparent. Die Hyphen sind coenocytisch, gelegentlich können aber auch Querwände beobachtet werden. *P. quercina* bildet sowohl glatte als auch stellenweise angeschwollene, undulierende Hyphen, mit deutlichen Verdickungen. Es treten zahlreiche Verzweigungen auf, wobei *P. quercina* ein sympodiales Verzweigungsmuster ausbildet. Das Hyphenwachstum erfolgt an der Spitze (Erwin und Ribeiro 1996). Bei *Phytophthora* kommen homothallische (selbst-fertile) oder heterothallische (selbst-sterile) Myzelien vor. Der Lebensweg von *Phytophthora* ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

## Einleitung



**Abbildung 1.3.** Lebenszyklen von *Phytophthora*. (Erwin und Ribeiro, 1996)

Unter geeigneten Bedingungen, bei optimalen Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen, produziert *Phytophthora* Zoosporangien mit asexuellen Zoosporen. Die Zoosporangien sitzen den Hyphen mit einem kurzen Stiel, dem Sporangiochor, auf. *P. quercina* bildet papillate, selten auch bipapillate Zoosporangien (Jung et al. 1999). Dabei können auch Abweichungen von der typischen Birnenform der Zoosporangien auftreten (Jung et al. 1999). Von Jung et al. (1999) wird die durchschnittliche Größe der Zoosporangien mit 36-49,2µm (Länge) x 23,3-33,7µm (Breite) angegeben.



**Abbildung 1.4.** Myzel von *Phytophthora quercina* mit Zoosporangium und schlüpfenden Zoosporen.

Der sexuelle Fortpflanzungsmodus ist Oogamie. Im coenocytischen Antheridium bzw. Oogonium findet die Reduktionsteilung vom diploiden zum haploiden Chromosomensatz statt. Oogonien werden sowohl in Kultur als auch in infiziertem Eichenwurzelgewebe unter geeigneten Bedingungen zahlreich gebildet. Der Querschnitt der Oogonien bewegt sich, je nach Isolat, zwischen 25,8 und 32µm (Jung et al. 1999). Pro Oogonium wird eine Oospore gebildet. Die Antheridien sind ebenfalls hyaline Gebilde und meist in der Nähe eines Oogoniums an der Hyphe inseriert (Jung et al. 1999). Die Zygoten können zu neuen Myzelien auskeimen oder an der Spitze ihres Keimschlauches Zoosporangien ausbilden. Gelegentlich kommen bei *P. quercina* auch terminale oder interkalare Chlamydosporen vor. Diese können entweder zu neuen Myzelien auskeimen oder sich zu Zoosporangien umbilden. Oogonien und Zoosporangien können bis zu einem Jahr im Boden überleben (Zentmyer und Erwin 1970).

Die aus den Zoosporangien entlassenen Zoosporen schwimmen über einige Stunden hinweg im Umgebungswasser und encystieren bei Kontakt mit der Oberfläche eines potentiellen Wirtes innerhalb von Minuten. Für den Infektionsverlauf entscheidende Parameter sind Temperatur, Feuchtigkeit, Boden (u.a. Nährstoffangebot, pH-Wert, Durchlüftung), Licht und Sauerstoffgehalt (Zentmyer und Erwin 1970). Die minimale Wachstumstemperatur für *P. quercina* liegt bei etwa 5°C, das Optimum bei ca. 25°C. Unter optimalen Bedingungen liegt das radiale Wachstum von auf V8-Agar kultiviertem Myzel bei 3,7mm·d<sup>-1</sup>. Temperaturen über 27,8°C führen zum Einstellen des Wachstums (Jung et al. 1999).

Bei der Versorgung mit Nährstoffen ist die Verfügbarkeit von Sterolen von besonderer Bedeutung, da *Phytophthora*-Arten diese nicht selbst synthetisieren können (Boissy et al. 1999, Hendrix 1970, Ponchet et al. 1999, Weete 1989). Sterole gelten bei *Pythiaceae* als essentiell für effizientes Wachstum und sexuelle und asexuelle Reproduktion (Hendrix 1970). Nach Ponchet et al. (1999) trifft dies allerdings nur bedingt zu. Demnach beeinträchtigt eine fehlende Sterolversorgung das Myzelwachstum von *Phytophthora cactorum* nicht. Gleichwohl ließ sich aber *in vitro* die Bildung reproduktiver Organe durch die Zugabe von Sterolen auslösen. Die strukturellen Funktionen, welche Sterole in Biomembranen ausüben, könnten bei *Pythiaceae* möglicherweise auch Triterpenoide übernehmen (Nes und Heftmann 1981).

## Einleitung

In molekularbiologischer Richtung sind an *Phytophthora*-Arten erst wenige Arbeiten durchgeführt worden. Bisher ist nur ein einziges funktionelles Gen bekannt, *inf1*, welches für Elicitin kodiert (Kamoun et al. 1999). Den phytotoxischen Elicitinen der Oomyceten wurde seit vielen Jahren besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Die Arbeiten von Wolf (1933) deuten bereits an, daß *Phytophthora* phytotoxische Verbindungen sekretiert. Wolf (1933) zeigte, daß Tabakpflanzen, die mit den Wurzeln im Filtrat einer Flüssigkultur von *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan inkubiert worden waren, spätestens nach 1½ h deutliche Welkesymptome zeigten. Aufgrund der Fällbarkeit mit Magnesiumsulfat wurde vermutet, daß es sich bei den toxischen Komponenten des Kulturfiltrates um Proteine handeln könnte. Auch wurde von Wolf (1933) bereits gezeigt, daß diese, später als Elicitine bezeichneten, Toxine, eine hohe Hitzestabilität aufwiesen. Seither wurde auf diesem Gebiet viel geforscht; zahlreiche Arbeiten belegen die Synthese toxischer Verbindungen durch *Phytophthora* in Flüssigkultur (Csinos und Hendrix 1977, Paxton 1972, Plich und Rudnicki 1979, Rönnebeck 1956 – um nur einige zu nennen). Viele Arbeiten befassen sich dabei mit Tabak. Csinos und Hendrix (1977) bestätigten, daß *Phytophthora cryptogea* Toxine produziert, die an in Kulturfiltrat inkubierten Tabakblättern innerhalb von 48h deutliche Welkesymptome hervorriefen. Auch für das von *P. quercina* synthetisierte Quercinin konnte die Toxizität gegenüber Tabak und auch die Hitzestabilität bestätigt werden (Heiser et al. 1999). Quercinin bewirkte in einer Konzentration von  $1\mu\text{g ml}^{-1}$  nach 48h Inkubation an Tabakblättern sehr starke Chlorosen und Welke (Giefing 1997).

Anhand eines Bioassays mit in Myzelextrakt inkubierten Tabakblättern wiesen Csinos und Hendrix (1977) nach, daß Elicitine auch im Myzel präsent waren. Später zeigten Tercé-Laforgue et al. (1992), daß in Flüssigkultur die weitaus größere Menge an Elicitinen in das Kulturmedium abgegeben wurde und nur ein geringer Teil im Myzel nachzuweisen war. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird auch für *P. quercina* gezeigt, daß Quercinin im Myzel von V8-Agarkulturen, sowie in Hyphen im infizierten Wurzelgewebe vorhanden ist.

Tercé-Laforgue et al. (1992) zeigten, daß Elicitine als Pre-Proteine im Myzel synthetisiert werden. Untersuchungen an Cryptogein ergaben, daß zunächst ein am N-Terminus um 20 Aminosäuren längeres Elicitin synthetisiert wird. Dieses angehängte Peptid ist in seiner Länge bereits bekannten Signalpeptiden ähnlich (Von Heijne und Abrahmsén 1989). Im Myzel wird das Signalpeptid entfernt, so daß die

Elicitine mit einer Größe von ca. 10kDa sekretiert werden (Tercé-Laforgue et al. 1992). Ende der 1970er Jahre war die Natur der toxischen Komponenten noch unbekannt. Erst später konnte belegt werden, daß es sich tatsächlich um Proteine handelte (Huet und Pernollet 1989, Huet et al. 1992, Nespoulous et al. 1992). Für *P. quercina* erbrachten Heiser et al. (1999) den Nachweis, daß es sich bei der phyto-toxischen Komponente im Kulturfiltat, wie erwartet, um Elicitine handelte. Anhand von Western-Blots wurde für Quercinin ein Molekulargewicht von etwa 8kDa ermittelt (Giefing 1997).

In zahlreichen Experimenten an mit Elicitinen behandeltem Tabak war die Bildung von Blattnekrosen und zugleich die Akkumulation von PR-Proteinen festzustellen (z.B. Bonnet et al. 1986). Es trat eine Resistenz gegen die nachfolgende Inokulation mit *Phytophthora nicotianae* auf (Ricci et al. 1989). Aufgrund dieser Induktion sowohl einer Hypersensitiven Reaktion (HR) als auch systemisch erworbener Resistenz (Systemic Acquired Resistance, SAR) (Ponchet et al. 1999) wurden diese Toxine auch als Elicitine bezeichnet. Kamoun et al. (1994) konnten zeigen, daß Elicitine möglicherweise als Avirulenzfaktoren fungieren. Untersuchungen an verschiedenen *Phytophthora*-Arten ergaben, daß Isolate, die Elicitine produzierten, an Tabak nicht pathogen waren. Anders ausgedrückt bedeutet diese These, daß bei einer inkompatiblen Reaktion, bei der es zur Abwehr des Pathogens kommt, Elicitine synthetisiert und möglicherweise an der Auslösung von Abwehrmechanismen der Pflanze beteiligt sind. Umgekehrt konnte an *P. parasitica* var. *nicotianae* - einer Ausnahme unter den *Phytophthora*-Arten, da hier bei einigen Isolaten keine Elicitin-Produktion vorkommt - eine starke Virulenz gegenüber Tabak beobachtet werden (Ponchet et al. 1999). Allerdings ist die Ansicht, daß es sich bei Elicitinen um Avirulenzfaktoren handelt, nicht unumstritten. Ein gegenteiliges Beispiel liefern bereits die frühen Arbeiten von Wolf (1933), der ebenfalls mit *P. nicotianae* arbeitete, aber im Kulturfiltrat seines Isolates im Biotest mit Tabak Elicitine nachweisen konnte. In diesem Falle lag eine kompatible Interaktion und Anwesenheit von Elicitinen vor. Ein weiteres Beispiel einer an Tabak virulenten *P. parasitica*-Art, die Parasiticein produzierte, wird von Ponchet et al. (1999) angeführt. Auch Kamoun et al. (1994) fanden einige *P. parasitica*-Isolate, die Elicitine produzierten und Tabak infizieren konnten. Im Falle von Stieleiche und *P. quercina* läßt sich vermuten, daß es sich, zumindest was den teilweise massiven Befall der Wurzeln betrifft, um eine Interaktion mit kompatiblen Merkmalen handelt. In diesem Falle könnte ein weiteres Beispiel

## Einleitung

geliefert werden, das die Synthese von Elicitinen auch bei kompatiblen Interaktionen belegt. Auch eine Herabregelung der Transkription von Elicitingenen während der kompatiblen Interaktion, d.h. während des Infektionsvorganges wäre denkbar (Colas et al. 2001). Colas et al. (2001) konnten zeigen, daß die Transkription von Elicitingenen einiger *in vitro* Elicitine produzierender Isolate von *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* während der Infektion von Tabak herabgeregelt werden.

Die Expression von Elicitingenen ist bislang noch ein Gebiet, bei dem viele Fragen offen sind. Grundsätzlich ist auch noch nicht geklärt, ob Elicitingene konstitutiv oder reguliert exprimiert werden (Ponchet et al. 1999). Pernollet et al. (1993) gelang es, Elicitine mehrerer *Phytophthora*-Arten zu reinigen und zu sequenzieren. Bezüglich ihrer Nettoladung werden basische und saure Elicitine unterschieden (Birch et al. 1997). Basische  $\beta$ -Elicitine sind 50- bis 100mal toxischer als saure  $\alpha$ -Elicitine (Birch et al. 1997, Keller et al. 1996). *P. quercina* bildet sowohl saure (pI=3,6 und 3,9) als auch basische (pI=8,3) Elicitine (Giefing 1997). Die höhere Toxizität der basischen Elicitine wird vermutlich durch ihre bevorzugte Attraktion zu den negativ geladenen Kopfgruppen der Phospholipide der pflanzlichen Zellmembran bedingt (Boissy et al. 1999). In ihrer Aminosäuresequenz weisen Elicitine eine Homologie von ca. 80% auf (Birch et al. 1997, Keller et al. 1996). Unter Berücksichtigung dieser Tatsache wurden in dieser Arbeit Antikörper gegen das von *P. cryptogea* produzierte Cryptogein benutzt, um das von *P. quercina* in Eichenwurzeln synthetisierte Quercinin zu detektieren. Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Elicitinen ergaben, daß im Falle von  $\alpha$ -Cinnamomin der Aminosäure an Position 25 eine Nekrosen auslösende Funktion zukommt (Perez et al. 1997). Fefeu et al. (1997) und Boissy et al. (1999) weisen der Aminosäure an Position 13 eine besondere Funktion zu. Diese ist an der Moleküloberfläche lokalisiert und soll bei der Ausbildung von Nekrosen eine Rolle spielen. Möglicherweise ist sie an der Bindung eines Liganden oder Rezeptors beteiligt. Die Polarität dieser Position beeinflusst wahrscheinlich die Erkennung und die Bindungseigenschaften für einen Sterol-Liganden und damit die nekrotische Aktivität des Elicitins. In ihrer Fähigkeit, Sterole zu binden, sieht man heute eine wichtige funktionelle Eigenschaft der Elicitine. Als Bindungsstelle kommt eine hydrophobe Vertiefung, welche hoch konserviert ist, in Frage (Fefeu et al. 1997). Fefeu et al. (1997) zeigten anhand von Cryptogein, daß Elicitine fünf Helices aufweisen, sowie ein doppelsträngiges  $\beta$ -Faltblatt gegenüber einer  $\Omega$ -Schleife. Die mögliche Bindungsstelle für einen Liganden befindet sich am Rande des  $\beta$ -Faltblattes und der

benachbarten  $\Omega$ -Schleife. Es existieren drei Disulfidbrücken (Capasso et al. 1999). Die Tatsache, daß Elicitine auch nach einer Hitzebehandlung in Verbindung mit Mercaptoethanol mit demselben Molekulargewicht vorliegen, deutet darauf hin, daß es sich um Monomere handelt (Capasso et al. 1999).

Zur Wirkungsweise von Elicitinen auf zellulärer und molekularer Ebene können anhand der dazu verfügbaren Literatur Vermutungen angestellt werden. Wendehenne et al. (1995) konnten zeigen, daß es Bindungsstellen für Cryptogein in pflanzlichen Plasmamembranen gibt, die aus Tabakzellsuspensionskulturen gereinigt wurden. Dabei könnte die Bildung eines Elicitin-Sterol-Komplexes eine notwendige Voraussetzung für die Bindung an den Rezeptor sein (Ponchet et al. 1999). Es wird angenommen, daß Elicitine an pflanzliche Biomembranen binden und dort Sterole herauslösen können. Die Sterole des Wirtes könnten über Elicitin-Shuttle zu den Biomembranen des Pathogens transportiert und in diese eingebaut werden (Ponchet et al. 1999). Wie von Ponchet et al. (1999) aber betont wird, sind Sterole für die physiologischen Aktivitäten bei *Pythiaceae* nicht unbedingt essentiell. Vor diesem Hintergrund wäre es auch denkbar, daß Elicitine durch Sekretion in der Umgebung des Oomyceten verteilt werden und fremde Lipidverbindungen aufnehmen, um zufallsabhängig zum Myzel zurückzukommen. Für das Pathogen läge darin zugleich ein Informationsgehalt über die Präsenz (oder auch Abwesenheit) eines geeigneten Wirtes (Ponchet et al. 1999).

Pugin und Guern (1996) stellten ein Modell für die Reaktionsfolge auf, welche durch die Bindung der Elicitine an die Rezeptoren der pflanzlichen Cytoplasmamembran in Gang gesetzt wird. Demnach wird im Cytosol zunächst eine Phosphorylierungs- bzw. Dephosphorylierungskaskade ausgelöst. Dies führt zur Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle. Zugleich wird der Ausstrom von  $\text{K}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in das extrazelluläre Medium induziert. Es tritt eine Depolarisierung der pflanzlichen Cytoplasmamembran ein. Die Ursachen dafür sind (i) der Elektronentransfer durch die pflanzliche Cytoplasmamembran, der durch eine membrangebundene NADPH-Oxidase vermittelt wird und im extrazellulären Medium zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, (ii) der Ausstrom von  $\text{Cl}^-$ , (iii) die Hemmung der in der Cytoplasmamembran lokalisierten  $\text{H}^+$ -ATPase, welche Protonen aus dem Cytosol nach außen abtransportieren könnte (Ponchet et al. 1999). Reaktive Sauerstoffspezies können an Biomembranen Lipidperoxidation induzieren, was zur Membranzerstörung führt (Hock und Elstner 1995). Die geschilderten Vorgänge könnten für die im

## Einleitung

Zusammenhang mit *Phytophthora*-Infektionen beobachteten Symptome mitverantwortlich sein. Im Bioversuch mit Tabakblättern zeigte sich sehr deutlich, daß Quercinin die Auflösung von Biomembranen, besonders der Chloroplasten auslöst (Giefing 1997). Erste mikroskopische Untersuchungen von Blättern mit *P. quercina* infizierter Eichen im Freiland wurde von Heyne (2002) durchgeführt. Auch hier zeigte sich eine Schädigung der Membranstrukturen der Chloroplasten (Heyne 2002).

Ob Elicidine an der Ausbildung der an Eichen zu beobachtenden Krankheits-symptome direkt beteiligt sind, ist noch unklar. Nach wie vor ist für Eiche noch nicht geklärt, ob sekundäre Folgen einer beeinträchtigten Wasserleitung symptomauslösend sind, oder ob Elicidine im Transpirationsstrom direkt in die Blätter transportiert werden. Die Toxizität von Elicitinen innerhalb von Blattgeweben ist bereits mehrfach nachgewiesen worden – wie z.B. die oben erwähnten Arbeiten von Wolff (1933) und Giefing (1997) belegen. Bei Versuchen an Tabak traten äußerlich starke Welkesymptome infolge der Behandlung mit Elicitinen auf (Giefing 1997). Auf zellulärer Ebene zeigte sich anhand von transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen, daß Quercinin eine sehr starke Dekompartimentierung vor allem der Chloroplasten bewirkte. Die Grana- und Stromathylakoide der Chloroplasten waren nahezu vollständig aufgelöst (Giefing 1997). Im Zusammenhang mit der Diskussion um einen möglichen Transport von Elicitinen im Transpirationsstrom infizierter Pflanzen ist die Arbeit von Wolf und Wolf (1954) sehr beachtenswert. Damals wurde bereits gezeigt, daß Xylemsaft von mit *P. nicotianae* Breda de Haan infizierten Tabakpflanzen bei darin inkubierten gesunden Tabakpflanzen Welkesymptome hervorruft. Bei Tabak ist dies ein Beleg dafür, daß Elicidine im Xylem der Pflanze transportiert werden. Offenbar konnten Elicidine in das Leitgewebe gelangen, ohne daß diese einen massiven Befall mit Myzel aufwiesen. An mit *P. quercina* infizierten Stieleichenwurzeln ließ sich ebenfalls beobachten, daß nur wenige Hyphen in das Leitgewebe eindringen. Es wäre aber dennoch ein Transport von Elicitinen im Xylemstrom auch bei Eichen als symptomauslösender Faktor denkbar.

Neuland stellen in mancher Hinsicht auch die Untersuchungen zu den biochemischen Abwehrmechanismen gegen Pathogenbefall bei Bäumen dar. Auch hier wurde den krautigen Pflanzen bisher wesentlich mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Es ist jedoch anzunehmen, daß holzige Pflanzen ähnliche Verbindungen zur Pathogenabwehr induzieren wie krautige Pflanzen (Oßwald 2000). Generell



können die Abwehrstrategien von Pflanzen in die Aktivierung vorgeformter Verbindungen und in die post-infektionelle Induktion pflanzlicher Metabolite und Enzyme unterteilt werden. Hierunter fällt auch die Induktion von PR-Proteinen (Pathogenesis Related Proteins). PR-Proteine sind bei Pflanzen weit verbreitet und oft in geringer Menge bereits vorhanden, werden aber beim Angriff eines Pathogens oder auch bei Streß vermehrt gebildet (Agrios 1997). Innerhalb dieser strukturell diversen Gruppe von Abwehrproteinen werden derzeit aufgrund von Funktion, Aminosäuresequenz, Molekulargewicht und weiterer spezifischer Eigenschaften 14 Familien unterschieden (Van Loon und Van Strien 1999). PR-Proteine weisen entweder extrem basische oder extrem saure isoelektrische Punkte auf und sind daher gut wasserlöslich (Agrios 1997). Gut bekannte und in der vorliegenden Arbeit untersuchte PR-Proteine sind  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Chitinasen, Osmotine und Peroxidasen. Die Funktion der im Zuge der Pathogenabwehr in der Pflanze induzierten Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen sieht man im hydrolytischen Abbau ( $\beta$ -1,3-Glucanasen und Chitinasen sind Endohydrolasen) der Zellwände von Pathogenen (Hammerschmidt 1999). Unklar ist allerdings, ob und in welchem Ausmaß sie dabei direkt zur Resistenz beitragen (Hammerschmidt 1999, Recorbet et al. 1998). Zur erfolgreichen Abwehr von Oomyceten, die kein Chitin in ihrer Zellwand enthalten, ist die Induktion von Chitinasen, obwohl zu beobachten, sicherlich nicht von Bedeutung.  $\beta$ -1,3-Glucanasen könnten allerdings die in den Zellwänden von Oomyceten enthaltenen  $\beta$ -1,3-Glucane (Erwin und Ribeiro 1996) angreifen. Ebenso konnte nachgewiesen werden, daß Proteine der Familie PR-5, die Osmotine innerhalb der Gruppe der thaumatinähnlichen Proteine, für Oomyceten toxisch sind. Osmotine hemmen das Wachstum von Oomyceten irreversibel (Elstner et al. 1996). Auch Proteine der Gruppe PR-1 (unbekannt) werden im Zusammenhang mit der Abwehr von Oomyceten diskutiert (Oßwald 2000). Untersuchungen von Sharma et al. (1993) haben gezeigt, daß in Fichtenwurzeln viele verschiedene saure und basische PR-Proteine nach der Infektion mit dem Oomyceten *Pythium* sp. induziert werden. Unter anderem wurde die infektionsbedingte Induktion von Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen nachgewiesen. Vleeshouwers et al. (2000) beschreiben für *Solanum tuberosum* – als Beispiel einer sehr gut untersuchten krautigen Pflanze - eine positive Korrelation der Expression von PR-1 (PR-1-Typ, unbekannt)-, PR-2 ( $\beta$ -1,3-Glucanasen)-, PR-5 (thaumatinähnlichen Proteinen)-Genen und der Resistenz verschiedener Sorten gegen *Phytophthora infestans*. Die Induktion von Peroxidasen

## Einleitung

im Zuge der Pathogenabwehr wird v.a. aufgrund ihrer Funktion bei der Herstellung von polymerem Lignin verständlich. Zellwandgebundene Peroxidasen sind, in Verbindung mit Wasserstoffperoxid, an der Polymerisation von Cinnamylalkoholen über freie Phenoxylradikale zum dreidimensional vernetzten Lignin beteiligt (Elstner et al. 1996). Die Lignifizierung ist für die Resistenzausbildung von Bedeutung, da hierdurch eine höhere mechanische Widerstandsfähigkeit der Zellwände erreicht wird. Zudem wird der Abbau pflanzlicher Zellstrukturen durch Enzyme des Pathogens erschwert und die Translokation von Wasser und Nährstoffen der Pflanze zum Pathogen wird behindert. Umgekehrt wird auch die Translokation von Enzymen und Toxinen vom Erreger zum Wirt gestört (Elstner et al. 1996). Eine gesteigerte Lignifizierung läßt sich auch anhand der Induktion von Phenylalaninammoniumlyase (PAL), dem Schlüsselenzym für den Ligninbiosyntheseweg und die Bildung weiterer phenolischer Verbindungen, feststellen. Okey et al. (1997) konnten zeigen, daß *Phytophthora palmivora* an Tabak einen deutlichen Anstieg an PAL und auch an Peroxidasen in infizierten Wurzeln resistenter Klone im Vergleich zu anfälligen Klonen bewirkt. Eine ähnliche Zunahme konnte auch bei Polyphenoloxidasen festgestellt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erste Untersuchungen zur Induktion löslicher phenolischer Verbindungen als Folge der Infektion von Eichenwurzeln mit *P. quercina* angestellt. Vergleichbare Untersuchungen wurden von Cahill und McComb an Eukalyptuswurzeln nach Infektion mit *P. cinnamomi* durchgeführt, wobei nach der Infektion ein rascher Anstieg löslicher Phenole in Wurzeln der resistenten Baumart *E. calophylla* zu bemerken war. Generell läßt sich feststellen, daß resistente wie auch anfällige Pflanzen auf einen Pathogenbefall mit der Induktion von Resistenzfaktoren reagieren. Dabei ist die schnelle Akkumulation von Abwehrverbindungen in unmittelbarer Nachbarschaft zum befallenen Gewebe ein Merkmal resistenter Pflanzen (Oßwald 2000). Eine anfällige Interaktion ist dagegen nicht unbedingt mit der Abwesenheit pflanzlicher Abwehrmechanismen, sondern eher mit einer verspäteten Reaktion der Pflanze verbunden (Oßwald 2000).

Auch die Untersuchung einer möglichen Bekämpfung der Ausbreitung pathogener, bodenbewohnender *Phytophthora*-Arten steht gegenwärtig noch am Anfang. Neben allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen, die ein Verschleppen der Pathogene mit anhaftender Erde aus bekanntermaßen infizierten Gebieten verhindern sollen, wurden bisher einige Versuche einer Behandlung mit Fungiziden unternommen.

Zentmyer (1973) machte den Vorschlag, an der *Phytophthora*-Wurzelfäule erkrankte Avocadosämlinge mit Dexon (p-Dimethylaminobenzendiazonatriumsulfonat) zu behandeln. Dexon wirkt fungistatisch, verhindert die Sporulation und reduziert die Bildung von Zoosporangien und Chlamydosporen. Bei Freilandversuchen konnte man nach 4 Jahren von einer Kontrolle der Erkrankung sprechen. Neuere Bekämpfungsansätze unternahmten Darvas et al. (1984), wobei wieder die durch *Phytophthora cinnamomi* verursachte Avocado-Wurzelfäule untersucht wurde. Die besten Erfolge ergaben Stamminjektionen mit Phosethyl-Al (Phosphonat, Aluminiumsalz der phosphorigen Säure). Die Behandlung erfolgte zweimal pro Jahr, wobei die behandelten Bäume nach drei Jahren vollständig gesund waren. Auch Jackson et al. (2000) wiesen nach, daß die Wurzeln von *Eucalyptus marginata* nach einer Behandlung der Blätter mit Phosphonat einen geringeren Befall mit *P. cinnamomi* aufwiesen. Phosetyl-Al wirkt systemisch und kann in der Pflanze im Xylem und Phloem transportiert werden (Erwin und Ribeiro 1996). Phosphonate wirken in der Pflanze in komplexer Weise sowohl direkt auf das Pathogen ein als auch indirekt durch die Stimulierung von Abwehrreaktionen der Pflanze (Guest und Grant 1991). Stamminjektionen bei *Quercus ilex* und *Quercus suber* mit verschiedenen fungistatischen Verbindungen wurden auch von Fernandez-Escobar et al. (1999) beschrieben. Nach zweijähriger Behandlung wurde die Symptomentwicklung an mit Kaliumphosphonat (phosphorige Säure, neutralisiert mit Kaliumhydroxid) behandelten Bäumen gestoppt. Stamminjektionen bieten zwar eine Möglichkeit, relativ große Mengen an Substanzen in die Pflanze zu bringen, sind aber, im Gegensatz zum Aufsprühen von Fungiziden auf die Blätter, kostenaufwändig (Fernandez-Escobar et al. 1999). Ob Stamminjektionen bei Baumarten wie der Eiche, deren Holz genutzt werden soll, sinnvoll sind, ist fraglich.

## 1.2 Zielsetzung dieser Dissertation

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Infektion von *Quercus robur* L. mit dem Wurzelpathogen *Phytophthora quercina*. Vor dem Hintergrund, daß *P. quercina* wesentlich an den neuartigen Eichenschäden beteiligt ist, sollte ein Beitrag zum Verständnis der infektionsbedingten Veränderungen am Wirtsorganismus geleistet werden. Bei den morphologischen Untersuchungen stand das Wurzelsystem im

## Einleitung

Vordergrund. Anhand detaillierter Analysen sollte die Schädigung im Wurzelbereich und besonders die Veränderungen an den Feinwurzeln aufgezeigt werden. Mikroskopische Untersuchungen an infizierten Wurzeln ergänzten die makroskopischen Beobachtungen. Licht- und transmissionselektronenmikroskopische Analysen sollten die Kenntnisse über die Besiedlung von Wirtsgewebe durch *Phytophthora*-Arten auch für die neue Species *P. quercina* bestätigen.

Die gemeinsame Untersuchung wurzelmorphologischer und physiologischer Veränderungen an denselben Pflanzen sollte eine erweiterte Diskussion der an den Blättern der Stieleichen beobachteten physiologischen Schäden ermöglichen. An holzigen Pflanzen liegen wenige Arbeiten vor, welche diese beiden Gebiete in Kombination untersuchen. Diesbezüglich leistet diese Arbeit einen neuen Beitrag.

Dagegen ist die Untersuchung von PR-Proteinen bei Pathogenbefall in den Wurzeln ein allgemein sehr gut bekanntes Gebiet. Hierbei war beabsichtigt, bereits gesichertes Wissen auch für das Wirt-Pathogen-System Stieleiche-*P. quercina* zu bestätigen. In infizierten Wurzeln sollte eine mögliche Induktion von PR-Proteinen (basische Chitinasen, basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen, Osmotine, Peroxidasen) untersucht werden.

Allgemein gut untersucht ist auch die Synthese phytotoxischer Elicidine durch *Phytophthora*-Arten. Wo aber Elicidine während des Infektionsprozesses zu finden sind, war dagegen noch eine weitgehend offene Frage. Anhand immunohistochemischer Untersuchungen infizierter Wurzeln wurde dieser Fragestellung nachgegangen. Die Immunomarkierung mikroskopischer Schnitte sollte die Lokalisation von Elicitinen in der Eichenwurzel auf zellulärer Ebene ermöglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalienliste

Chemikalie	Bezugsquelle	Artikelnummer
Aceton, z.A.	MERCK	1.00014.
Acrylamid	SIGMA	A-8887
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	MERCK	1.01201.
Azur II	MERCK	9211
Bleinitrat $Pb(NO_3)_2$ z.A.	MERCK	1.07398.
Bovine Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	SIGMA	A-2153
Bradford-Reagenz	BIO RAD	500-0006
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat	SIGMA	B-6149
Bromphenolblau Natriumsalz	MERCK	11746.
Calciumcarbonat, gefällt, z.A:	MERCK	1.02060.
Calciumchlorid	ROTH	5239.1
4-Chloro-1-naphthol-Lösung	SIGMA	C-8302
Coomassie Brilliant Blue R-250	BIO RAD	161-0400
Diethanolamin	SIGMA	D-8885
Diethylether, z.A	MERCK	1.00921.
4-(Dimethylamino)zimtaldehyd	MERCK	8.22034.
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS)	MERCK	1.13761.
Dodecylsulfat-Natriumsalz (SDS), ultra pure	ROTH	2326.2
Essigsäure (Eisessig), 100%, z.A.	MERCK	1.00063.
Essigsäure (Eisessig), 100%, z.A.	ROTH	3738.2
Ethanol, absolut	MERCK	1.00983.
Ethidiumbromid, Solution 10mg/ml	BIO RAD	161-0433
Formvar	PLANO	R 1201
Glutaraldehyd	SERVA	23114
Glutaraldehyd-Stammlösung, 25%	AGAR SCIENTIFIC LTD.	R 1020

## 2 Material und Methoden

Glycerol, 87%	FLUKA	49782
Glycin	PHARMACIA BIOTECH	17-1323-01
Histo Resin Mounting Medium, Liquid	HERAEUS KULZER GmbH	
Historesin und Historesin Hardener	LEICA Instruments GmbH	7022 18500
Kaliumchlorid, z.A.	MERCK	4936
Kaliumdihydrogenphosphat, z.A.	MERCK	1.04873.
di-Kaliumhydrogenphosphat	MERCK	1.05100.
di-Natriumhydrogenphosphat z.A.	MERCK	6586
LR White Resin	London Resin Company Ltd.	
Magermilchpulver	MERCK	1.15363.
Magnesiumchlorid	MERCK	1.05833.
Magnesiumsulfat	SIGMA	M-1880
Methanol	BAKER	8045
2-Mercaptoethanol	MERCK	1.15423.
N,N,N',N'-Tetramethyldiamin, z.A.	MERCK	1.10732.
N,N'-Methylen-bis-Acrylamid	SIGMA	M-7256
N,N-Dimethylformamid	SIGMA	D-4254
Natriumcacodylat	AGAR SCIENTIFIC LTD.	R 1104
Natriumacetat	MERCK	6265
Natriumchlorid	FLUKA	71381
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	ROTH	K 300.1
Natriumhydroxid-Plätzchen	MERCK	1.6498.
Natriumhypochlorit-Lösung	FLUKA	71696
Natronlauge	MERCK	5587
4-Nitroblau-Tetrazolium	SIGMA	N-6876
Osmiumtetroxid	PLANO	OS 0003
Paraformaldehyd, zur Synthese	MERCK	8.18715.
p-Nitrophenylphosphat	SIGMA	104-0
Polyethylenglycol 2000, zur Synthese	MERCK	8.21037.
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	FLUKA	81385
Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP)	SIGMA	P-6755
Saccharose, reinst, z.A.	MERCK	1.07653.
Safranin T	FLUKA	84120

Salzsäure, 1M	MERCK	9057
Salzsäure, 25%, z.A:	MERCK	1.00316.
SPURR Harz-Kit	PLANO	R 1032
Toluidinblau O	SERVA	36692
Trichloressigsäure	SIGMA	T-4885
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, z.A.	MERCK	1.06448.
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	PHARMACIA BIOTECH	17-1321-01
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	MERCK	822184
UNICRYL™	British Bio Cell International	Ba 250
Wasserstoffperoxid, 30%, zur Synthese	MERCK	8.22287.

## 2.2 Pflanzen- und Pilzmaterial und Infektionsmethoden

### 2.2.1 Pflanzenmaterial

Eicheln: Reifejahre 1997 und 1998: Universitätsgelände Freising-Weihenstephan  
Reifejahr 1999: Baumschule Geigle Samen GmbH, Kammlach bei Mindelheim  
Eichen: zweijährig, 30-50cm Höhe, Steingaesser, Miltenberg

#### 2.2.1.1 Anzucht von Eichensämlingen in Substrat

Die Eicheln wurden zum Quellen über Nacht in Leitungswasser eingelegt. Anschließend wurde das Saatgut in Substrat (Sand : Torf : Vermiculit = 1:1:1) ausgelegt. Die Töpfe wurden bis zur Keimung mit einer durchsichtigen Plastikfolie abgedeckt und bei ca. 20-25°C in einer Gewächshauskabine (Versuchsgut der TUM, Dürnast) gehalten. Bei einer Sproßlänge von ca. 15-20cm und Entwicklung der ersten Laubblätter wurde die Plastikfolie entfernt. Die Sämlinge wurden während der Anzucht mit Leitungswasser gegossen.

Eventueller Mehltaubefall wurde mit Netzschwefellösung bekämpft. Befallene Blätter wurden besprüht, um ein Stauben der Sporen zu vermeiden und anschließend entfernt.

## 2 Material und Methoden

### 2.2.1.2 Düngung der Eichensämlinge während des Infektionsversuchs 1998

Dünger-Konzentrat (250fach):

	Substanz:	Einwaage [g]:
Hauptsalze:	KNO <sub>3</sub>	100
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	50
	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	25
	MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	50
Spuren-Salze:	ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,02
	CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0,01
	FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,3
	MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0,2
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,3
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,015

Das Konzentrat wurde 1:250 mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> verdünnt. Pro Pflanze wurden an den im Zeitplan unter 2.7.1 angegebenen Tagen je 100ml verdünnte Düngerlösung zugegeben.

### 2.2.1.3 Anzucht von Eichensämlingen in Wasser

Die Eicheln wurden in Plastikschaalen mit Deckel zwischen Zellstoff ausgelegt und mit Leitungswasser feuchtgehalten. Bis zur Keimung erfolgte die Inkubation über Nacht bei 5°C und tagsüber bei 18°C. Gekeimte Eicheln (Keimwurzel ca. 5cm) wurden in Reagenzgläsern in Leitungswasser bei Raumtemperatur weiter angezogen. Da keine Unterschiede im Wachstum von abgedunkelten und nicht abgedunkelten Wurzeln festgestellt werden konnten, wurden die Wurzeln nicht abgedunkelt.

### 2.2.1.4 Kultur von zweijährigen Eichen in Substrat

Die wurzelnackt gelieferten Eichen wurden über Nacht in Leitungswasser gewässert und in Substrat (Sand : Torf : Vermiculit = 1:1:1) in 3l-Rosentöpfe eingesetzt (November 1999). Bis zum Blattaustrieb (ca. März 2000) wurden die Pflanzen bei 15°C in einer Gewächshauskabine (Versuchsgut der TUM, Dürnast) gehalten. Anschließend wurde die Kammertemperatur auf 20°C erhöht.



### 2.2.1.5 Behandlung und Aufbewahrung von Eicheln

Saatgut 1997: Das Saatgut wurde mit 2% NaOCl 4-5min oberflächensterilisiert und zweimal mit Leitungswasser gewaschen.

Saatgut 1998: Die Eicheln wurden zur Oberflächensterilisierung einer Wärmebehandlung von 41°C für 2h im Wasserbad (Leitungswasser) ausgesetzt.

Saatgut 1999: Aufgrund der 1999 völlig ausgebliebenen Samenbildung bei den 1997 und 1998 beernteten Bäumen mußten Eicheln bei der Baumschule Geigle gekauft werden. Dieses Saatgut wurde ohne weitere Vorbehandlung verwendet.

Die Aufbewahrung des Saatgutes erfolgte bei ca. 4°C in flachen Schalen, abgedeckt mit feuchtem Zellstoff.

### 2.2.2 *Phytophthora quercina*-Kulturen

*P. quercina*, Isolat Hag 4/2, wurde von Dr. Jung, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Department für Ökologie, Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume, TUM, bezogen. Zur Verwendung von V8 Medium als Pilzkulturmedium siehe Miller (1955).

#### 2.2.2.1 V8-Agarkultur

CaCO <sub>3</sub>	3 g	
Gemüsesaft (PÖLZ Bio)	200 ml	
Agar	18 g	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		ad 1l

Der Ansatz wurde bei 1,2atu und 121°C 30min autoklaviert. Der flüssige Agar wurde in Petrischalen gefüllt. Zum Beimpfen mit Pilzkultur wurde in die Mitte der Petrischale (mit erkaltetem V8-Agar) ein Myzelstück mit dem Myzel nach unten aufgelegt und die Kulturen standardmäßig bei 18°C inkubiert.

#### 2.2.2.2 V8-Flüssigkultur

CaCO <sub>3</sub>	3 g	
Gemüsesaft (PÖLZ Bio)	200 ml	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>		ad 1l

## 2 Material und Methoden

Der Ansatz wurde zu je 75ml in Erlenmeierkolben gefüllt und bei 1,2atm und 121°C 30min autoklaviert. Jeder Kolben wurde mit 5 Myzelstückchen vom Rand einer jungen V8-Agarkultur beimpft.

### 2.2.3 Infektionsmethoden

#### 2.2.3.1 Infektion von Eichensämlingen in Wasser

##### 2.2.3.1.1 Herstellung der Zoosporensuspension

- Herstellung von Wurzelexudat: Gekeimte Eichensämlinge wurden in Reagenz--gläser mit 20ml Leitungswasser gesetzt und 1-3d bei 20°C bei Raumtemperatur und normalem Tag / Nacht-Wechsel inkubiert. Das gewonnene Wurzelexudat wurde durch Papierfilter und anschließend an der Wasserstrahlpumpe durch 5,0µm-Filter filtriert. Vor der Verwendung erfolgte die Sterilfiltration mit 0,2µm-Sterilfiltern.
- Zoosporangieninduktion: Je Ansatz wurden 3 Myzelballen einer V8-Flüssigkultur  $H_2O_{\text{dest.,steril}}$  gewaschen, in eine autoklavierte Glaspetrischale überführt und mit 30ml sterilfiltriertem Wurzelexudat versehen. Die Petrischalen wurden 6-8d bei 18-20°C inkubiert, wobei das Wurzelexudat alle ein- bis zwei Tage erneuert wurde. Der Erfolg der Induktion wurde mit einer Zählkammer (Sedgewick Rafter S50) unter dem Mikroskop überprüft.
- Zoosporenfreisetzung: Die Ansätze wurden 1h bei 4°C im Dunkeln und anschließend ¼h bei 24°C im Licht inkubiert. Unter der Sterilbank wurden die Ansätze durch 4 Lagen Mull in autoklavierte Erlenmeierkolben filtriert. Unter dem Mikroskop wurde mit der Zählkammer die Zoosporendichte pro ml abgeschätzt.

##### 2.2.3.1.2 Infektion von Eichensämlingen zur Untersuchung von Peroxidasen, für Phenolanalysen und mikroskopische Untersuchungen

Pro Sämling wurde ein Reagenzglas mit Zoosporensuspension (ca. 10 Zoosporen·ml<sup>-1</sup>) 5cm hoch gefüllt. Die Wurzel wurde 5cm tief in die Zoosporensuspension eingetaucht. Um ein Austrocknen der übrigen Wurzel zu verhindern, wurde diese mit autoklaviertem Leitungswasser besprüht und das Reagenzglas mit

Parafilm abgedichtet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur und normalem Tag/Nacht-Wechsel. Die Inkubationsdauer betrug 5-7 Tage.

### 2.2.3.1.3 Infektion von Eichensämlingen in Wasser für physiologische Untersuchungen 2000

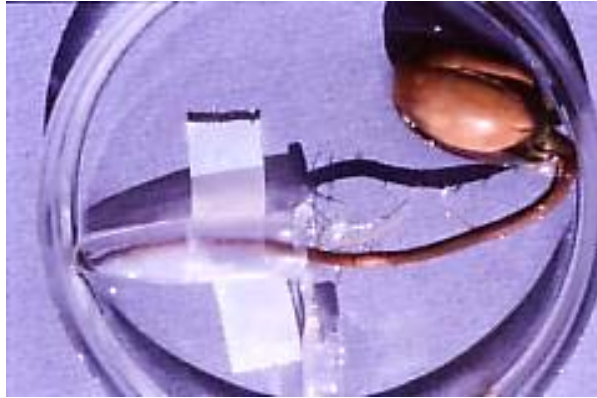
Die Infektion bzw. Kontrollbehandlung, sowie die Inkubation der Pflanzen erfolgte wie unter 2.2.3.1.2 beschrieben. Es wurden  $n=8$  Pflanzen gemessen. Die am Tag 0 gemessenen 8 Kontrollpflanzen wurden anschließend infiziert und am Tag 1 erneut gemessen. Von den weiteren 16 Kontroll- und 16 infizierten Pflanzen (ebenfalls angesetzt bzw. infiziert am Tag 0) wurden jeweils 8 am Tag 6 und 8 am Tag 14 gemessen. Somit ergab sich der folgende Ansatz:

- Tag 0: 8 Kontrollpflanzen (anschließend infiziert)
- Tag 1: 8 infizierte Pflanzen (dieselben Pflanzen wie an Tag 0, einen Tag nach der Infektion)
- Tag 6: 8 Kontroll- und 8 infizierte Pflanzen (angesetzt am Tag 0)
- Tag 14: 8 Kontroll- und 8 infizierte Pflanzen (angesetzt am Tag 0)

### 2.2.3.1.4 Infektion von Eichensämlingen für ELISA-Analysen und zur Messung von Chitinasen, Glucanasen und Osmotinen in der Wurzel

Je  $10\mu\text{l}$  Zoosporensuspension ( $1-5 \text{ Zoosporen}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ) wurden in die Spitze eines Eppendorfgefäße pipettiert. Für die Kontrollen wurde sterilfiltriertes Wurzelexudat verwendet. Das Cap wurde mit Tesafilm in der Petrischale befestigt, der Keimling liegend mit der Wurzel in die Zoosporensuspension gesteckt, die Wurzel mit autoklaviertem Leitungswasser besprüht und die Petrischalen dann mit Parafilm verschlossen (*Abbildung 2.1*). Die Inkubation erfolgte  $\frac{1}{2}\text{h}$  im Schwachlicht (ca.  $30-40\mu\text{mol m}^{-2} \text{sec}^{-1}$ ), dann im Dunkeln bei  $20^\circ\text{C}$ . Je nach Bedarf wurden die Keimlinge an den folgenden Tagen wieder mit autoklaviertem Leitungswasser beprüht. Sobald alle Flüssigkeit aus dem Eppendorfgefäß von der Wurzel aufgesaugt worden war, wurde dieses entfernt und die gesamte Wurzel nochmals befeuchtet.

## 2 Material und Methoden



**Abbildung 2.1.** Infektionsansatz für ELISA-Analysen und zur Messung von Chitinasen, Glucanasen und Osmotinen (hier: 3 Tage infizierte Wurzel).

### 2.2.3.2 Infektion von Eichensämlingen in Substrat

#### 2.2.3.2.1 Herstellung von Inokulum

Folgende Mischung wurde in Meßbechern bei 1,2atu und 121°C 1h autoklaviert:

Vermiculit	250 cm <sup>3</sup>	
Weizen	20 cm <sup>3</sup>	
V8-Medium	175 cm <sup>3</sup>	(Zur Herstellung von V8-Medium siehe 2.2.2.2)

Jeder Meßbecher wurde mit 20 Myzelstückchen vom Rand einer jungen V8-Agarkultur beimpft. Es wurde die gleiche Menge von unbeimpfter Kontrollmischung hergestellt. Pro Meßbecher wurde nach dem Autoklavieren von einem Volumen von 300ml ausgegangen.

#### 2.2.3.2.2 Infektion von Eichensämlingen und Kontrollansatz beim Infektionsversuch 1998

Die Substratmischung aus Sand, Torf, Vermiculit im Verhältnis 1:1:1 wurde bei 1,2atu und 121°C 1h autoklaviert. Es wurde eine Inokulum-Substrat-Mischung hergestellt, wobei 20cm<sup>3</sup> Inokulum mit 1l Substrat vermengt wurden. Für die Kontrollen wurde die gleiche Mischung mit unbeimpftem Ansatz verwendet. Die vorgezogenen Eichensämlinge wurden in 1l-Roottrainer eingesetzt und je 17 Roottrainer in eine Kunststoffbox gestellt. Als Drainage diente ein Holzgitter am Boden der Box. Jede Box wurde mit einem durch einen Gummistopfen

verschlossenen Loch an der Vorderseite unten versehen. Um die Bildung von Zoosporangien zu stimulieren, wurde jeweils für 2Tage mit Leitungswasser geflutet. Die Analysenwerte des verwendeten Wassers wurden zuvor bei den Stadtwerken Freising eingeholt und für unbedenklich erachtet.

### 2.2.3.2.3 Infektion von zweijährigen Eichen und Kontrollansatz für physiologische Messungen 2000

Die Pflanzen wurden wie unter 2.2.1.4 beschrieben angezogen. In jeden Topf wurden mit einem Stab vorsichtig 4 Löcher in das Substrat gebohrt und in jedes Loch  $50\text{cm}^3$  Inokulum- bzw. Kontrollmischung (siehe 2.2.3.2.1) gegeben, d.h. in jeden Topf kamen insgesamt  $200\text{cm}^3$  Inokulum- bzw. Kontrollmischung. Für jede Messung wurden  $n=9$  Pflanzen vorbereitet. Folgende Pflanzen standen damit zur Verfügung:

Tag 0:	9 Kontroll- und 9 infizierte Pflanzen
Tage 3-5:	9 Kontroll- und 9 infizierte Pflanzen
Tage 25-26:	9 Kontroll- und 9 infizierte Pflanzen

Die Angaben „Tage 3-5“ und „Tage 25-26“ bedeuten, daß diese beiden Meßreihen drei, bzw. zwei Tage gedauert haben, bis sie abgeschlossen waren.

## 2.3 Biochemische Untersuchungen

### 2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

- Prinzip des Proteinassays: Coomassie-Brilliant-Blue G-250, welches im Bradford-Reagenz (BIO RAD 500-0006) enthalten ist, bindet an basische und aromatische Aminosäuren. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Coomassie-Brilliant-Blue G-250-Lösung von  $465\text{nm}$  nach  $595\text{nm}$ . Die Proteinkonzentration verhält sich in diesem System proportional zur gemessenen Lichtabsorption bei  $595\text{nm}$ . Anhand eines Eichwertes bekannter Proteinkonzentration kann aus der Extinktion der Proteingehalt der Probe berechnet werden. Die Eichung erfolgt mit BSA [ $100\mu\text{g ml}^{-1}$ ].

## 2 Material und Methoden

- Durchführung des Proteinassays (n=3):

	Nullwert	BSA-Standard	Probe
H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> [μl]	800	700	800 - X
BSA-Standard [μl]	-	100	-
Probe	-	-	X

Die Inkubationszeit betrug 1h bei Raumtemperatur. Die Messung am Photometer erfolgte bei 595nm.

### 2.3.2 Bestimmung des Chlorophyll- und Carotinoidgehaltes nach Ziegler und Egle (1965)

- Prinzip der photometrischen Messung: Chlorophylle weisen ein Extinktionsmaximum im blauen und im roten Spektralbereich auf. Die Chlorophyllmessung erfolgte im roten Bereich, um die ebenfalls im blauen Bereich absorbierenden Carotinoide nicht zu erfassen. Für Chlorophyll a erfolgte die Messung bei 663nm ( $e_{\max.a}$ ), für Chlorophyll b bei 644nm ( $e_{\max.b}$ ), für Carotinoide bei 452nm ( $e_{\max.car}$ ).
- Probenextraktion und photometrische Messung: Die Blätter einer Pflanze wurden vereinigt, lyophilisiert und mit der Kugelmühle zerkleinert. 10mg Trockensubstanz wurden in 2ml-Eppendorfgefäße eingewogen (n=3), 2ml gekühltes (4°C) 85% Aceton zugegeben und am Vortex gemischt. Die Ansätze wurden 1h bei 4°C auf dem Rotationsrad inkubiert. Nach Zentrifugation für 6min bei 13000rpm und 4°C wurde der Überstand in Reagenzgläser überführt. Das Pellet wurde mit weiteren 2ml gekühltem 85% Aceton gewaschen und der nach erneuter Zentrifugation erhaltene Überstand mit dem entsprechenden ersten Extrakt vereinigt. Die erhaltenen Extrakte wurden ohne weitere Verdünnung am Photometer bei 663nm, 644nm und 452nm gemessen. Es wurden Küvetten aus optischem Spezialglas verwendet (HELLMA, Type Nr. 6030).
- Die Konzentrationen an Chlorophyll a ( $c_a$ ), b ( $c_b$ ) und Gesamtcarotinoiden ( $c_{car}$ ) wurde unter Berücksichtigung des Extraktionsvolumens (4ml) berechnet und auf das Trockengewicht bezogen.

$$\begin{array}{l}
 c_a = 0,3 \quad Ext_{663} - 0,918 \quad Ext_{644} \quad [mg \cdot l^{-1}] \\
 c_b = 19,7 \quad Ext_{644} - 3,87 \quad Ext_{663} \quad [mg \cdot l^{-1}] \\
 c_{car} = 4,76 \quad Ext_{452} - 0,226 \quad (c_a + c_b) \quad [mg \cdot l^{-1}]
 \end{array}$$

Pigmentkonzentration [ $\mu g \cdot mg^{-1} TG$ ] =  $c_x \cdot$  Extraktionsvolumen [ $\mu g \cdot l$ ] / Einwaage [ $l \cdot mg$ ]

Anmerkungen: (i) Bei unseren Untersuchungen war es sinnvoll die  $c_x$ -Werte in  $\mu\text{g l}^{-1}$  umzurechnen.  
(ii) Falls zu hohe Extinktionswerte vorliegen ( $\text{Ext} > 0,6$ ), müssen vor der Messung im Photometer Verdünnungen vorgenommen werden. Der Verdünnungsfaktor muß in diesem Falle bei der Berechnung der Pigmentkonzentration berücksichtigt werden:  
 $c_x \cdot \text{Extraktionsvolumen} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} / \text{Einwaage}$ )

### 2.3.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Prinzip des ELISA: Über die spezifische Bindung von Antikörpern können zu untersuchende Proteine gezielt in einem Proteingemisch nachgewiesen werden. Dazu wird ein Proteinextrakt hergestellt, der das Antigen enthält. An dessen spezifische Epitope binden passende Antikörper, welche beispielsweise in einem polyklonalen Antiserum vorliegen. Die Bindungen zwischen Antigenen und Antikörpern in der Probe können durch eine Farbreaktion meßbar gemacht werden. Dazu werden an Enzyme gekoppelte sekundäre Antikörper verwendet. Die Enzyme katalysieren bei Zugabe des geeigneten Substrates eine Farbreaktion, deren Intensität über einen ELISA-Reader quantifiziert werden kann.

#### 2.3.3.1 Double-Antibody-„Sandwich“-ELISA zum Nachweis von *Phytophthora*

Bei dieser Methode wurden Mikrotiterplatten eingesetzt, die bereits mit spezifischen Antikörpern beschichtet waren. Bei der Zugabe von Proteinextrakt banden die darin vorhandenen Antigene an die Antikörper-Beschichtung. Im nächsten Schritt wurden nochmals spezifische Antikörper zugegeben, die diesmal mit Enzymen gekoppelt waren. Die Enzyme katalysierten die detektierbare Farbreaktion. Im einzelnen wurde nach Anleitung zu AGRI-SCREEN *Phytophthora* detection Kit, NEOGEN Corporation verfahren.

#### 2.3.3.2 Indirekter ELISA zum Nachweis von Quercinin bzw. *Phytophthora*

Pro Ansatz (Vell) wurden 100 $\mu\text{l}$  des 1:100 verdünnten Extraktes in Mikrotiterplatten pipettiert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit PBS, pH=7,8 mit 0,5ml $\cdot\text{l}^{-1}$  Tween und 6g $\cdot\text{l}^{-1}$  Magermilchpulver wurden pro Vell 100ml primäre Antikörperlösung (Anti-Cryptogein) einpipettiert. Der Ansatz wurde bei 37°C

## 2 Material und Methoden

2h inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgt die Reaktion mit Goat-anti-rabbit IgG, gekoppelt mit alkalischer Phosphatase, 2h bei 37°C. Nach weiteren Waschschritten, zuletzt mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>, wurde die Färbereaktion durchgeführt, wobei pro Well 100µl Substratlösung (1mg 4-Nitrophenylphosphat ml Substratpuffer<sup>-1</sup> (9,7ml Diethanolamin 100ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub><sup>-1</sup>, pH=9,8)) einpipettiert wurden. Nach 2h erfolgte die Analyse im ELISA-Reader bei 405nm.

### 2.3.4 Phenolanalyse in Wurzelproben mittels HPLC (nach Brunner, 2000)

#### 2.3.4.1 Probenvorbereitung

Die Wurzelproben von 6 Kontroll- und 6 mit *P. quercina* infizierten Pflanzen (siehe 2.2.3.1.2) wurden eingefroren, lyophilisiert und jeweils als Sammelproben in der Kugelmühle zerkleinert. Zur Polyphenolextraktion wurden 100mg Trockensubstanz in ein Eppendorfgefäß eingewogen. Nach Zugabe von 500µl Methanol und als Standard 6-Methoxy-flavon [0,1mg·ml<sup>-1</sup>] wurden die Proben am Schüttler kurz durchgemischt. Die Extraktion erfolgte 30min bei 4-8°C im Ultraschallbad. Der Ansatz wurde 10min bei 10000rpm und -10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres Eppendorfgefäß überführt und die Proben bis zur Analyse im Gefrierschrank gelagert. Für die HPLC-Analyse wurden die Proben ca. 10min temperiert. 10µl der Probe wurden für die Analyse in der HPLC-Anlage benötigt.

#### 2.3.4.2 HPLC-Analysen

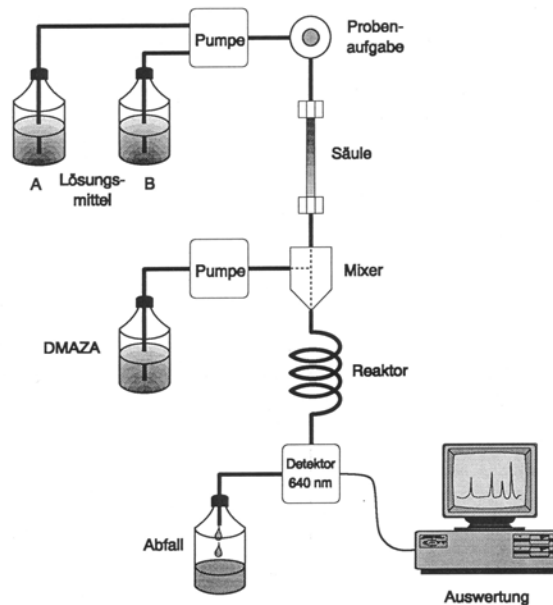
Mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) erfolgte die Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe der Eichenwurzeln. Die Flavanole wurden nach ihrer Auftrennung durch ein Nachsäulenderivatisierungsverfahren erfaßt. Die Methode beruht auf der Bildung eines blauen Komplexes der Flavanole mit dem selektiven DMAZA-Reagens. Dazu wurden die getrennten phenolischen Verbindungen mit einer 1% p-Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA)-Lösung in 3N methanolischer Schwefelsäure versetzt. Dies geschah in einem Reaktor aus gestrickten PTFE-Kapillaren (Länge 13m, Kapillardurchmesser 0,5mm). Nach einer Reaktionszeit von 3min konnte die Komplexbildung der Flavanole mit DMAZA bei 640nm quantitativ bestimmt werden.



## HPLC-Ausrüstung mit Nachsäulenderivatisierung:

Probengeber:	Gilson Abimed Modell 231
Pumpen:	Kontron Modell 422 S Kontron Modell 422 Gynkotek Model 300 C
Detektoren:	Kontron UVICON 720 LC micro Kontron BIO-TEK 540+ Diode Array Detektor
Datenverarbeitung:	Kontron BIO-TEK KromaSystem 2000 Version 1.83
Säule:	125nm x 4mm (ID), Shandon ODS Hypersil 3µm
Lösungsmittel:	A: 5% Ameisensäure B: Methanol, gradient grade
Flow:	0,6ml min <sup>-1</sup>
DMAZA:	0,6ml min <sup>-1</sup>

Es wurden Chromatogramme bei der für Flavanole nach Derivatisierung mit DMAZA optimalen Wellenlänge von 640nm ausgewertet. Die Analysenzeit betrug 160min.



**Abbildung 2.2.** Schematische Darstellung des HPLC-Systems mit Nachsäulenderivatisierung.

## 2.3.4.3 Qualitative Auswertung

Mit Hilfe der Retentionszeit, der Absorptionsmaxima und den typischen Kurvenverläufen können Substanzen identifiziert oder zumindest einer bestimmten Stoffgruppe zugeordnet werden. Dazu vergleicht man ihre Spektren mit denen bekannter Substanzen. Bei unseren Arbeiten konnten wir die Erfahrungswerte für die Phenole Catechin und Gallocatechin an Apfel von Prof. Dr. D. Treutter zum Vergleich mit unseren Ergebnissen heranziehen.

## 2 Material und Methoden

### 2.3.4.4 Quantitative Auswertung

Mit Hilfe von Eichfaktoren lässt sich aus der Peakfläche der Chromatogramme die Konzentration der dem jeweiligen Peak entsprechenden Substanz berechnen. Als Bezugsgröße diente die Trockensubstanz. Zur Berechnung der Konzentration [mg·g Trockensubstanz<sup>-1</sup>] wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Konz (i)} = \frac{\text{RF(i)} \cdot \text{A(i)}}{\text{RF(iS)} \cdot \text{A(iS)}} \cdot \text{MF} \cdot \text{Konz(iS)}$$

Konz	Konzentration
RF	Responsfaktor = Konzentration/Peakfläche
A	Peakfläche
MF	Multiplikationsfaktor, der die Konzentration auf 1g bezieht
i	Einzelpeak
iS	interner Standard

Als Responsfaktor zur Konzentrationsberechnung von Flavanolen wurde Catechin verwendet:  $2,283 \cdot 10^{-5}$ .

### 2.3.5 Proteinextraktionsmethoden

#### 2.3.5.1 Proteinextraktion für den Double-Antibody-„Sandwich“-ELISA

Die Proteinextraktion erfolgte gemäß dem Protokoll zum AGRI-SCREEN *Phytophthora* detection Kit, NEOGEN Corporation

#### 2.3.5.2 Proteinextraktion für den indirekten ELISA

50mg Trockensubstanz wurden mit 1ml Carbonatpuffer, 50mM, pH=9,6 extrahiert.

#### 2.3.5.3 Proteinextraktion zur Untersuchung von Peroxidasen

100mg in flüssigem Stickstoff gemörserteres Frischmaterial wurden mit 1-1,5ml Natriumphosphatpuffer, 50mM, pH=5,6 mit 0,5M Saccharose und 1M NaCl, sowie 1% PVPP auf Eis unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der Extrakt bei 14500g und 4°C für 20min zentrifugiert. Es erfolgten eine Volumenbestimmung und

Proteinbestimmung nach Bradford. Vor der Verwendung auf Polyacrylamidgelen wurde der Extrakt gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  dialysiert (MWCO der Dialysemembran: 12-14000Da, MEDICELL) und lyophilisiert.

### 2.3.5.4 Proteinextraktion zur Untersuchung von PR-Proteinen

50mg Trockensubstanz wurden mit 1ml Natriumacetatpuffer (0,1M), pH=5,5 mit 1% PVPP 20min bei 4°C auf dem Rotationsrad extrahiert. Nach Zentrifugation für 15min bei 15000rpm und 4°C wurde der Überstand weiter verwendet.

Es erfolgte eine Dialyse gegen  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  (Dialysemembran mit MWCO 12-14000Da, Medicell) und Volumenbestimmung und eine Proteinbestimmung nach Bradford. Anschließend wurde der Extrakt lyophilisiert.

### 2.3.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

#### 2.3.6.1 Methode der Polyacrylamidgelelektrophorese

- Prinzip der Elektrophorese:

Die Elektrophorese dient der Auftrennung geladener Makromoleküle. Entsprechend ihrer Nettoladung wandern Moleküle im elektrischen Feld. Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dabei werden die Proteine mit negativ geladenem Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, so daß sämtliche Moleküle einen Überschuß an negativer Ladung besitzen. Im elektrischen Feld erfolgt eine Wanderung der negativ geladenen Proteine zur Anode. Das Polyacrylamidgel stellt dafür die Matrix dar. Die Porenweite des Polyacrylamidgels bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine, wobei kleine Proteine schneller zur Anode wandern als große. Die Beweglichkeit der Proteine im Gel ist proportional dem Logarithmus ihrer Molekulargewichte. Das bei der Auftrennung entstehende Proteinbandenmuster läßt sich durch Färbemethoden sichtbar machen. Das Molekulargewicht der untersuchten Proteine kann anhand von Standards errechnet werden.

## 2 Material und Methoden

- Substanzen zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen:

Polyacrylamid-Gele bestehen aus Ketten von polymerisiertem Acrylamid, die untereinander durch N,N'-Methylen-bis-Acrylamid vernetzt sind. Ammoniumperoxydisulfat (APS) liefert die Startradikale zur Polymerisation. Tetramethyldiamin (TEMED) dient als Katalysator. Die Porenweite des Gels wird durch die Menge an Acrylamidmonomeren und Vernetzermolekülen (Bisacrylamid) pro Volumeneinheit Polymerisationslösung bestimmt. Die Elektrophorese erfolgt bei konstantem pH-Wert (pH = 8,8) in Pufferlösung, welche als Elektrolyt den Stromfluß innerhalb des elektrischen Feldes ermöglicht.

- Diskontinuierliche PAGE:

Bei der diskontinuierlichen PAGE durchwandern die Proteine ein niedrigprozentiges Sammelgel mit leicht saurem pH-Wert (pH=6,8) und treten dann in das Trenngel mit pH=8,8 ein. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung nach Molekulargewicht. An der Grenze zwischen Sammelgel und Trenngel bilden alle Proteine eine einheitliche Startfront, was die Schärfe der Auftrennung erhöht.

### 2.3.6.2. Durchführung der Elektrophorese

Lösungen und Puffer:

- Acrylamid-Stammlösung, 30%

Acrylamid	30,0 g	
bis-Acrylamid	0,8 g	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml
	filtern	

- SDS-Lösung, 10% (fehlt bei nativer PAGE)

SDS	10,0 g	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml

- APS-Lösung, 10% (frisch angesetzt)

APS	0,1 g	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1 ml

- TEMED, unverdünnt

- Probenpuffer (Sample-Buffer)
 

Sammelgelpuffer (s.u.)	2,5 ml	
Glycerin	2,0 ml	
Bromphenolblau	5,0 mg	
$\beta$ -Mercaptoethanol	1,0 ml	(fehlt bei nativer PAGE)
SDS-Lösung, 10%	2,0 ml	(fehlt bei nativer PAGE)
H <sub>2</sub> O bidest.	2,5 ml	
- Trenngelpuffer (1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8)
 

Tris	18,17 g	
HCl <sub>konz</sub> (32%)	2,00 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml
- Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-Puffer, pH 6,8)
 

Tris	6,05 g	
HCl <sub>konz</sub> (32%)	4,00 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml
- Lauf-Puffer (Tank-Buffer), pH 8,3
 

	Konzentrat:	Tris	15,0 g
		Glycin	72,0 g
		H <sub>2</sub> O bidest.	800 ml
		mit HCl <sub>konz</sub> (32%)	auf pH 8,3 einstellen
		H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml
Verdünnung 1:5		Konzentrat	200 ml
		SDS (0,1%)	1,0 g (fehlt bei nativer PAGE)
		H <sub>2</sub> O bidest.	ad 1000 ml

Für die Durchführung der Elektrophorese wurde eine Gleichspannungsquelle (Power Pac BIO RAD) sowie eine Elektrophoreseapparatur (Mini-PROTEAN®II Electrophoresis Cell, BIO RAD) verwendet. Die Apparatur besteht aus zwei Pufferreservoiren, welche die Kathode bzw. die Anode enthalten und zwei Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befindet. Die beiden fertigen Gele werden zwischen Kathode und Anode in die Apparatur eingebaut.

- Vorbereitung der Elektrophoreseapparatur: Vor dem Gießen der Gele wurden für jedes Gel eine große und eine kleine Glasplatte, sowie zwei 0,75mm-Spacer (Abstandshalter) mit Ethanol gereinigt und in die Gießhalterung eingebaut.

## 2 Material und Methoden

- Herstellung der Gele: Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und nach dessen Polymerisation das Sammelgel. Das Pipettierschema für die verwendeten Gele ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Zur Auftrennung von PR-Proteinen wurde 12% SDS-Gele mit 4% Sammelgelen verwendet. Zur Untersuchung von Peroxidasen stellten wir 5% native Gele ohne Sammelgel her. Die Mengenangaben sind für zwei Mini-Gele (80mm · 55mm · 0,75mm) berechnet.

Pipettierschema für Polyacrylamidgele:

Gel, Prozentigkeit	Acrylamid-Lsg., 30% [ml]	Sammelgel-puffer bzw. Trenngelpuffer [ml]	bd H <sub>2</sub> O [ml]	SDS-Lsg., 10% [μl] (fehlt bei nativer PAGE)	TEMED [μl]	APS-Lsg., 10% [μl]
Sammelgel						
4	1,3	2,5	6,2	100	10	50
Trenngel						
12	4,0	2,5	3,5	100	5	50
5	1,6	2,5	5,9	100	5	50

Die fertige Trenngellösung wurde mit einer Spritze zügig zwischen die beiden Glasplatten eingefüllt. Das Trenngel wurde mit etwas H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> überschichtet, um eine gerade Oberkante des Gels zu erhalten. Die Polymerisationszeit betrug 1h. Überschüssiges Wasser wurde vor dem Einfüllen des Sammelgels entfernt. Das Sammelgel wurde analog zum Trenngel hergestellt und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Die Polymerisationszeit betrug wiederum 1h.

- Auftrag der Proben und Gellauf: Die Gele wurden in die Halterung mit den Elektroden eingespannt und die Innenkammer (Kathode) mit Laufpuffer gefüllt. Die Apparatur wurde in den Puffertank eingesetzt und die Außenkammer (Anode) ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt. Der Kamm im Sammelgel wurde entfernt. Die in Probenpuffer gelösten Proben und der Standard wurden mit einer Hamiltonpipette in die Geltaschen pipettiert. Als Standard wurde zur Untersuchung von PR-Proteinen der Broad Range Prestained Standard von BIO RAD verwendet. Der Gellauf erfolgte bei konstanter Stromstärke.

Gellauf für Mini-Gele:

Spannung	Stromstärke	Zeit
200 V	60 mA const.	1 - 1,5 h

### 2.3.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine in denaturierter Form aufgetrennt. Der Probenpuffer, in dem sich die Proteine befinden, enthält SDS, welches nahezu alle nicht kovalenten Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört, und Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken zu Sulfhydrylgruppen reduziert.

### 2.3.6.4 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (native PAGE)

- Prinzip der nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese: Bei der nativen Gelelektrophorese werden die Proteine nicht mit denaturierenden Reagenzien in Verbindung gebracht. Die native Gelelektrophorese ohne SDS und ohne Mercaptoethanol erlaubt i.d.R. eine grobe Auftrennung von Proteinen, wobei deren Aktivität erhalten bleibt. Allerdings kann das Molekulargewicht von Proteinen in einem nativen Gel nicht ermittelt werden, da die Wanderungsgeschwindigkeit sowohl von der Größe als auch vom Ladungszustand der Proteine abhängt.
- Durchführung der nativen PAGE und Peroxidase-Aktivitätsfärbung: Bei der nativen PAGE wurde analog zur SDS-PAGE verfahren, wobei kein SDS und kein Mercaptoethanol verwendet wurden. Nach dem Lyophilisieren wurden die Proben in nativem Probenpuffer aufgenommen und auf ein 5% natives Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur Herstellung des nativen Polyacrylamidgels siehe Pipettierschema unter 2.3.6.2. Die Fokussierung erfolgte 2h bei 60mA, wobei eine Überhitzung des Pufferreservoirs durch Wechseln des Puffers, Durchführung in einem Kühlraum und ein gekühltes Wasserbad vermieden wurde. Nach dem Lauf wurde das Gel 30min in 10mM Na-Phosphatpuffer, pH=6,0 mit 150mM NaCl (PBS) gebadet. Die Färbung erfolgte in  $0,6\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  4-Chloro-1-naphthol und 0,16%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS bis deutlich violette Spuren erschienen.

### 2.3.7 Western Blots von Polyacrylamidgelen (Semi-Dry-Blots)

Prinzip des Western-Blots: Es wird eine Acrylamidgelelektrophorese durchgeführt und das Proteinmuster anschließend aus dem Gel in einer Semi-Dry Transfer Cell auf eine PVDF-Membran transferiert (geblottet). Dies ist dann möglich, wenn die

## 2 Material und Methoden

Proteine negativ geladen sind (beladen mit SDS). Im elektrischen Feld wandern sie in Richtung Anode und bleiben dabei an der Blot-Membran hängen. Auf der Membran sind die Proteine für die dann folgende Markierung mit spezifischen Antikörpern leichter zugänglich als im Gel. Die spezifischen primären Antikörper binden an alle Proteine, die ein passendes Epitop besitzen. Andere Proteine werden nicht gebunden. Primäre Antikörper werden i.d.R. aus Kaninchen gewonnen. Dies bietet die Möglichkeit, sekundäre Antikörper (aus Ziege) gegen Antikörper aus Kaninchen zu verwenden. Diese werden in einem zweiten Markierungsschritt auf die Membran aufgebracht und binden an allen Stellen, an denen sich primäre Antikörper befinden. Durch Kopplung eines Enzyms an die sekundären Antikörper können diese in einer enzymkatalysierten Farbreaktion sichtbar gemacht werden: Alkalische Phosphatase katalysiert die Dimerisierung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP) unter Bildung eines hellblauen Indigofarbstoffs, wobei 4-Nitroblau-Tetrazolium (NBT) zum blauvioletten, unlöslichen Formazan reduziert wird.

### 2.3.7.1 Lösungen, Puffer, Antiseren

- Blotting Puffer

Glycin	2,930 g	
Tris	5,810 g	
SDS	0,375 g	
H <sub>2</sub> O bidest.	700 ml	
Methanol	200 ml	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

- Tris-HCl, 1M -Stammlösung (SL)

Tris	12,11 g	
H <sub>2</sub> O bidest.	80 ml; mit 1N HCl auf pH7,5 bringen	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml

- NaCl, 5 M -Stammlösung (SL)

NaCl	29,2 g	
H <sub>2</sub> O bidest.		ad 100 ml



- TBS (Tris Buffer Saline)

Tris-HCl, 20 mM, pH = 7,5

150 mM NaCl

d.h.:	Tris-SL	20 ml	
	NaCl-SL	30 ml	
	H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

- TBS-BSA (Blocking-Solution):

BSA, 1% in TBS

d.h.:	BSA	10 g	
	Tris-SL	20 ml	
	NaCl-SL	30 ml	
	H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

- TBST (Tris Buffer Saline + Tween 20)

Tween 20, 0,5% in TBS

d.h.:	Tween 20	500 µl	
	Tris-SL	20 ml	
	NaCl-SL	30 ml	
	H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

- Entwicklungslösung

Tris-HCl, 100 mM, pH=9,5

NaCl, 100 mM

MgCl<sub>2</sub>, 5 mM

d.h.:	Tris	12,11 g	
	NaCl-SL	20 ml	
	MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1,02 g	
	H <sub>2</sub> O bidest.	800 ml	
	mit 1 N HCl auf pH=9,5 einstellen		
	H <sub>2</sub> O bidest.		ad 1000 ml

- NBT (Konzentrat)

NBT	75 mg
N,N'-Dimethyl-Formamid, 70%	1 ml

- BCIP (Konzentrat)

BCIP	50 mg
H <sub>2</sub> O bidest.	1 ml
N,N'-Dimethyl-Formamid, 70%	1 ml

- Antikörperlösungen: Die Antikörper wurden in TBS-BSA verdünnt.

## 2 Material und Methoden

### – Primäre Antikörper:

Antiserum aus Kaninchen gegen basische Chitinasen aus Kartoffelblättern; Verdünnung 1:2500  
(Von Herrn Prof. Dr. E. Kombrink, Max Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Antiserum aus Kaninchen gegen basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen aus Kartoffelblättern; Verdünnung 1:1500  
(Von Herrn Prof. Dr. E. Kombrink, Max Planck Institut für Züchtungsforschung, Köln, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Antiserum aus Kaninchen gegen saure Chitinase aus Kichererbse; Verdünnung 1:1500  
(Von Herrn Prof. Dr. W. Barz, Westfälische Universität Münster, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Antiserum aus Kaninchen gegen Osmotin aus Tabak:

PR-S  $\rightarrow$  erkennt extrazelluläre (PR-S) und vakuoläres (AP24) Osmotin

Pep2  $\rightarrow$  erkennt nur vakuoläres Osmotin (AP24)

Verdünnungen 1: 5000

(Von Frau Dr. A. S. Ponstein, MOAGEN International, Leiden, Niederlande, freundlicherweise zur Verfügung gestellt.)

Anmerkung: MOAGEN gehört der Fa. Zeneca an.

### – Sekundäre Antikörper: Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (BIO RAD 172-1016), Verdünnung 1:2000.

#### 2.3.7.2 Herstellung des Western-Blots

- SDS-PAGE: Die Proben wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt.
- Transblotting in der BIO RAD Transblot<sup>®</sup> SD Transfer Cell: Ein großes Filterpapier wurde in Blotting-Puffer getränkt und auf die Anode aufgelegt. Die Membran (porablot, Machery-Nagel) wurde kurz in Methanol, dann in Blotting-Puffer getränkt und auf das Filterpapier gelegt. Das SDS-Gel wurde ca. 1min in Blotting-Puffer getränkt und auf die Membran aufgebracht. Auf das Gel wurde ein in Blotting-Puffer getränktes, kleineres Filterpapier gelegt. Eventuelle Luftblasen wurden durch Flachrollen mit einem Glasstab herausgedrückt. Oben auf wurde die Kathode gelegt. Das Blotting wurde bei  $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$  Gelfläche durchgeführt. Für obige Mini-Gele sind dies  $36,6\text{mA}$  über 45min. Der Blot wurde kurz in TBS und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gewaschen. Zur Aufbewahrung wurde er in Filterpapier eingeschlagen und getrocknet.

- Antikörpermarkierung des Blots (Antibody-Probing):
    - Der trockene Blot wurde in Methanol angefeuchtet und kurz in TBS gewässert.
    - Um eine unspezifische Wechselwirkung der Antikörper mit der Membran zu vermeiden, wurde diese mit Protein abgesättigt. Dazu wurde der Blot 1-1,5h bei Raumtemperatur in TBS-BSA (Blocking-Solution) inkubiert.
    - Markierung mit primären Antikörpern: Die Antikörper wurden in TBS-BSA verdünnt (Verdünnungen der einzelnen Antikörper siehe 2.3.7.1). Der Blot wurde auf eine mit Parafilm bespannte Glasplatte auf dem 3D-Schüttler aufgelegt und 2-2,5ml Antikörper-Lösung mit einer Eppendorfpipette aufgetropft, so daß die Membran vollständig benetzt und die Antikörperlösung leicht in Bewegung war. Die Inkubationszeit betrug 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot dreimal 5min in TBST und einmal 5min in TBS gewaschen.
    - Markierung mit sekundären Antikörpern: Es wurde wie mit primären Antikörpern verfahren. Die Inkubationszeit betrug 1h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Blot wieder dreimal 5min in TBST und einmal 5min in TBS gewaschen.
  - Entwicklung des Blots: Der Blot wurde 30-120s (nach Augenschein) in der frisch angesetzten Entwicklungslösung geschwenkt:
    - 25ml Entwicklungslösung
    - 100µl NBT-SL
    - 75µl BCIP-SL
- Vor dem Trocknen wurde der Blot kurz in TBS und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gewaschen.

## 2.4 Mikroskopische Untersuchungen

Alle mikroskopischen Untersuchungen wurden an ca. 4 Wochen alten, 5-7 Tage infizierten Eichensämlingen durchgeführt. Zur Infektion wurde Zoosporensuspension von *P. quercina* mit einer Dichte von ca. 1 Zoospore pro µl verwendet. Als Kontrollen wurden gleich alte gesunde Pflanzen verwendet. Zur Untersuchung wurden Gewebeproben aus der Wurzel ca. 1-1,5cm oberhalb der Wurzelspitze genommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.4.1 Licht- und transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen ohne spezifische Markierungen

#### 2.4.1.1 Lichtmikroskopische Untersuchungen

Die Fotografie der lichtmikroskopischen Präparate erfolgte auf KODAK Extrachrome 64T Professional Colour Reversal Film.

##### 2.4.1.1.1 Einbettung in Historesin (Glycomethacrylat), Färbung mit Safranin O/Azur II

- Fixierung: Wurzelproben von ca. ½cm Länge wurden in 2,5% Glutaraldehyd (25% Glutaraldehyd wurde 1:10 mit 0,1M Phosphatpuffer, pH=7,5 verdünnt) fixiert. Dazu wurden die Proben 30min im Vacuumexsiccator infiltriert und anschließend mindestens 24h (bis 8d) bei Raumtemperatur auf der Wippe inkubiert. Danach wurde 30min mit Phosphatpuffer, 0,1M, pH=7,5 gespült. Alternativ wurde auch mit 3% Formaldehyd und 2% Glutaraldehyd in PBS, pH=7,2 1h bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS, pH=7,2 gespült.

- Entwässerung und Infiltration: Die Proben wurden nacheinander in folgende Lösungen überführt, wobei wiederum auf der Wippe inkubiert wurde:

30min 50% Ethanol

30min 70% Ethanol

30min 99% Ethanol

Nach 2h Vorinfiltration in aktiviertem Glycomethacrylat in Ethanol im Verhältnis 1:1 wurden die Proben mindestens 2d mit reinem aktiviertem Glycomethacrylat infiltriert.

- Einbettung: Die Proben wurden in Kunststofförmchen mit aktiviertem Glycomethacrylat und Härter im Verhältnis 15:1 (150µl Härter + 2000µl Historesin) eingebettet. Die Förmchen wurden mit einer Folie luftdicht abgeschlossen (Sauerstoffausschluß). Die Polymerisation dauerte 1h bei Raumtemperatur.

- Schneiden: 2µm starke Semidünnschnitte (Leitz-Grundschlittmikrotom 1400 mit Hartmetallmesser) wurden in Wasser aufgefangen. Sie glätteten sich auf der Wasseroberfläche und wurden auf Objektträger platziert. Die Schnitte wurden bei 40°C im Trockenschrank getrocknet.

- Färbung mit Safranin O / Azur II (angelehnt an Gutmann, 1995): Dieses Färbereagens färbt Phenole, lignifizierte Zellwände, Pektine, saure Mucopolysaccharide und Reservestärke;

Die Schnitte wurden 1min mit 1% Safranin O in 50% Ethanol gefärbt und kurz mit  $H_2O_{bidest.}$  gespült. Danach erfolgte 2-3min Färbung mit 0,5% Azur II in  $H_2O_{bidest.}$  und wiederum Spülen mit  $H_2O_{bidest.}$ . Anschließend wurden die Präparate mit Druckluft trockengeblasen und bei 40°C im Trockenschrank vollständig getrocknet (ca. 10min). Die Schnitte wurden mit Kanadabalsam unter einem Deckglas eingeschlossen.

### 2.4.1.1.2 DMAZA-Färbung an frischen Präparaten

Handschnitte wurden 5-15min in 1% DMAZA in Butanol/HCl im Verhältnis 4:1 bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend in 99% Ethanol entfärbt. Nach Abdampfen des Ethanols wurden die Objekte mit Kanadabalsam unter ein Deckglas eingeschlossen.

### 2.4.1.1.3 Einbettung in SPURR-Epoxydharz und Färbung mit Toluidinblau

Die Einbettung in SPURR ist an sich eine für die Transmissionselektronenmikroskopie geeignete Methode. Für die Lichtmikroskopie eignet sie sich weniger, da SPURR für wässrige Färbelösungen nicht optimal durchlässig ist. Die Herstellung von lichtmikroskopischen Schnitten solcher Präparate dient vielmehr der Auswahl guter Präparate bzw. Wahl von Präparatausschnitten, die dann für die Elektronenmikroskopie weiter verwendet werden. Dennoch wurden von derartigen Präparaten relativ gute Bilder erzielt, so daß dieses Verfahren hier aufgeführt wird.

- Schneiden: Von einem vorher mit einer Rasierklinge getrimmten Objekt wurden an einem Ultramikrotom 600nm - 1µm dicke Schnitte hergestellt. Dazu wurde ein breites Diamantmesser verwendet. Die auf der Wasseroberfläche schwimmenden Schnitte wurden mit einer Drahtschlinge gefischt und auf Objektträger aufgesetzt. Die Schnitte wurden auf einer Heizplatte bei max. 60°C angetrocknet.
- Färbung: Gefärbt wurde ¼h mit 0,05% Toluidinblau in  $H_2O_{dest.}$ , anschließend wurde kurz mit  $H_2O_{dest.}$  entfärbt. Die Schnitte wurden mit Immersionsöl unter einem Deckglas eingeschlossen.

## 2 Material und Methoden

### 2.4.1.2 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Alle transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Untersuchungen wurden an einem TEM Zeiss EM 10C bei 80KV Beschleunigungsspannung durchgeführt. Zur Herstellung von transmissionselektronenmikroskopischen Präparaten, die keiner weiteren immunologischen Markierung unterzogen werden sollten, konnte eine relativ starke Fixierung mit Glutaraldehyd eingesetzt werden. Als Einbettmedium diente SPURR-Epoxidharz.

- Fixierung und Kontrastierung: Wurzelstücke von ca. ½cm Länge wurden 1-2h 50mM Cacodylate-Puffer, pH=7 mit 6%Glutaraldehyd fixiert (Vernetzung von Proteinen). Anschließend wurde dreimal 15min mit Cacodylate-Puffer gewaschen. Über Nacht wurden die Proben bei 4°C im Kühlschrank in 2% Osmiumtetroxid in 50mM Cacodylate-Puffer, pH=7 kontrastiert und fixiert (Osmium kontrastiert ungesättigte Fettsäuren und vernetzt Lipide). Anschließend wurde wieder dreimal 15min mit Cacodylate-Puffer gewaschen, dann zweimal unter kurzem Schütteln mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> gespült. Es folgte eine weitere Kontrastierung für 15min mit 1% Uranylacetat in 20% Ethanol.
- Entwässerung: Entwässert wurde mit einer aufsteigenden Ethanolreihe, wobei die Proben am Rotationsrad geschüttelt wurden:
  - 15min 25% Ethanol
  - 15min 50% Ethanol
  - 15min 70% Ethanol
  - zweimal 15min 100% Ethanol
- Einbettung: Die Präparate wurden 15min in 100% Ethanol und SPURR im Verhältnis 1:1 bei Raumtemperatur inkubiert, dann im Vakuumexsiccator mit SPURR infiltriert. Nach Erneuern des SPURR wurden sie über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Die Einbettung erfolgte in Gelatinekapseln (PLANO) oder Kunststofförmchen bei 70°C im Trockenschrank.
- Trimmen und Schneiden der Objekte am Ultramikrotom: Aus den Objekten wurde mit einer Rasierklinge eine Pyramide getrimmt. Die Oberseite wurde mit einem Glasmesser geebnet. Für lichtmikroskopische Voruntersuchungen wurden mit einem breiten Diamantmesser 600nm - 1µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden mit einer Drahtschlinge aus dem Wasser gefischt und auf Objektträger aufgesetzt. Diese

Präparate wurden im Lichtmikroskop betrachtet, um eine für die Transmissionselektronenmikroskopie geeignete Stelle auszuwählen. An der ausgewählten Stelle des Objektes wurde eine kleinere Pyramide getrimmt. Mit einem Diamantmesser mit schmaler Klinge wurden 80nm starke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mit einer kleineren Drahtschlinge von oben von der Wasseroberfläche aufgenommen und auf M50 Kupfernetzchen (ATHENE-Netzchen 100 mesh, PLANO G209-2) aufgesetzt.

- Kontrastierung mit Bleicitrat nach Reynolds (1963): Die Kontrastierung erfolgte mit folgender Lösung:

1,33g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$   
1,76g NaCitrat  
+ 30ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$   
+ 8ml 1N NaOH  
auf 50ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auffüllen

Die Kontrastierungslösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch durch einen Papierfilter filtriert. Ein Tropfen der filtrierten Lösung wurde in eine mit Parafilm ausgelegte Petrischale neben einige Natriumhydroxidplättchen gegeben. Die Netzchen wurden mit den Schnitten auf den Tropfen aufgelegt und die Schale sofort mit einem Deckel abgedeckt. Nach 10min Inkubationszeit wurden die Netzchen mit der Pinzette gefaßt und in zwei Schälchen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  gespült.

Bespannen von Grids mit FORMVAR-Film: FORMVAR wurde auf Raumtemperatur erwärmt. Eine Schale wurde mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  bis zum Rand gefüllt, so daß sich eine leichte Kuppe bildete. Mit einem Glasstab wurde die Wasseroberfläche abgestrichen, um aufschwimmenden Schmutz zu entfernen. Ein Objektträger wurde zu  $\frac{3}{4}$  in FORMVAR eingetaucht. Sobald der Film trocken war, wurden die Kanten mit einer Rasierklinge aufgeritzt. Beim Eintauchen des Objektträgers in die Wasserschale schwamm dann der Film auf der Wasseroberfläche auf. Mit einer Pinzette wurden die Grids auf den Film aufgelegt. Ein zurechtgeschnittenes Filterpapier wurde auf den mit Grids belegten Film gelegt. Dieses wurde mitsamt dem Film aus dem Wasser gezogen. Der Film konnte in einer leicht geöffneten Petrischale langsam trocknen.

## 2 Material und Methoden

### 2.4.2 Immunohistochemie

Die hier durchgeführten immunohistochemischen Untersuchungen dienten dem Nachweis des Elicitins Quercinin in mit *Phytophthora quercina* infiziertem Wurzelgewebe von Eichensämlingen. Folgende Antiseren wurden verwendet:

12nm Colloidal Gold-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (DIANOVA 44122).  
Verdünnung: 1:30 bis 1:50 in Tris/NaCl, pH=8,2 mit 0,3% BSA

1nm Gold-Conjugate Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (British Bio Cell International, über PLANO Wetzlar).  
Verdünnung: 1:400 in PBS/BSA 0,5%, pH=7,2

Antikörper gegen Cryptogein: Polyclonal antibody CB 608 raised against CRY, crude antiserum from rabbit  
Bezugsquelle: M. Ponchet, Institut National de la Recherche Agronomique, Centre de Recherches d'Antibes, Station de botanique et de pathologie végétales.

**Verdünnung: 1:500 bis 1:2000 in PBS/BSA 0,5%**

Cy<sup>TM</sup>3-conjugated AffiniPure Goat-Anti-Rabbit IgG (H+L) (DIANOVA 111-165-003).  
**Verdünnung für die Immunofluoreszenzmarkierung: 1:200 in PBS/BSA 0,5%**

Normal Goat-Serum (DIANOVA 005-000-001): 3-5% in PBS/BSA 0,5%

Rabbit-IgG Normalserum (SIGMA I-5006) für die TEM: 1:250 bis 1:1000 in PBS/BSA 0,5%

#### 2.4.2.1 Prinzip immunohistochemischer Untersuchungen

Das Verfahren ist analog zu einem indirekten ELISA. Die Probe wird mit spezifischen primären Antikörpern inkubiert. In den hier durchgeführten Untersuchungen handelt es sich dabei um polyklonales Antiserum, spezifisch gegen Cryptogein von *Phytophthora cryptogea* (CB608). Die primären Antikörper erkennen in der Probe vorhandenes Antigen, hier Quercinin, und binden an dieses. Die gebundenen primären Antikörper wiederum werden von sekundären Antikörpern, welche eine Markierung tragen, abgegriffen. Die Markierung ist im Falle der Immunofluoreszenz ein Fluoreszenzfarbstoff. Im Fluoreszenzmikroskop bzw. im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop ist an den fluoreszierenden Stellen das Antigen zu lokalisieren. Bei der Immunogoldmarkierung sind die sekundären Antikörper mit Goldpartikeln



konjugiert. Diese sind elektronendicht, d.h. sie erscheinen im Transmissions-elektronenmikroskop als schwarze Punkte.

Als Kontrollansätze wurden nicht infizierte, gesunde Gewebestücke derselben Prozedur unterzogen wie infizierte Wurzelstücke und infizierte Wurzelstücke in einem weiteren Ansatz in Kaninchen-Normalserum ohne spezifische Antikörper inkubiert.

Insgesamt wurden folgende Ansätze hergestellt:

- 1.) Mit *Phytophthora quercina* infizierte Wurzel mit Antigen Quercinin, inkubiert in Kaninchen-Serum spezifisch gegen Quercinin.
- 2.) Mit *Phytophthora quercina* infizierte Wurzel mit Antigen Quercinin, inkubiert in Kaninchen-Normalserum ohne Spezifität gegen Quercinin.
- 3.) Gesunde Wurzel ohne das Antigen Quercinin, inkubiert mit Kaninchen-Serum spezifisch gegen Quercinin.

### 2.4.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung

- Fixierung: Herstellung der Fixierungslösung (3% Formaldehyd in PBS, pH=7,2): 3g Paraformaldehyd wurden mit 40ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> und 1 Tropfen 1M NaOH auf <70°C unter Rühren erwärmt bis die Lösung klar wurde und dann auf 50ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 50ml zweifach konzentriertem PBS, pH=7,2 wurde der pH-Wert mit 1N HCl auf 7,2 korrigiert. Zur besseren Vernetzung der Proteine im Objekt kann 0,25% Glutaraldehyd zugesetzt werden. Die Fixierungslösung kann im Exsiccator an der Wasserstrahlpumpe infiltrierte werden. Bei den hier hergestellten Proben wurde darauf allerdings verzichtet, um eventuell gelöstes Antigen nicht auszuwaschen.

Die Gewebestücke wurden 45min in der Fixierungslösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal kurz in PBS gespült.

- Schneiden: Am Schlittenmikrotom wurden 60(-100)µm dicke Schnitte hergestellt und in PBS aufgenommen. Nach Herstellung aller Schnitte wurden diese in PBS, pH=7,2/Tween 0,2% dreimal 10min gespült.

- Aldehydblockierung: Aldehydgruppen im Gewebe wurden durch 40min Inkubation in 10mM Glycin in PBS, pH=7,2/Tween 0,2% bei Raumtemperatur blockiert. Danach wurde wiederum zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal mit PBS, pH=7,2 gespült.

## 2 Material und Methoden

- Proteinblock: Zur Absättigung eventueller Bindungsstellen für Serumproteine wurde 40min mit 3-5% Ziege Normalserum und 1% BSA in PBS, pH=7,2 bei Raumtemperatur blockiert.
- Inkubation mit primären Antikörpern: Die Schnitte wurden 120min bei 37°C oder über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in spezifischem Anti-Cryptogein Kaninchenserum, 1:500 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5% bzw. unspezifischem primärem Kaninchen-Normalserum 1:250 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5% inkubiert. Danach wurde wiederum zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% gespült.
- Inkubation mit sekundären Antikörpern: Die Proben wurden 60min bei 37°C mit Cy3-markierten sekundären Antikörpern aus Ziege Anti-Rabbit 1:200 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5% inkubiert und zweimal 5min mit PBS, pH=7,2 gespült.

### 2.4.2.2.1 Fluoreszenzmikroskop

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Schnitte wurden auf Objektträger übertragen und unter dem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axiophot) mit der Filterkombination Exciter 546nm, Dichroic 575nm, Emitter 590nm betrachtet. Die Fotografie erfolgte auf Kodak 320 T und Fujichrome Provia 1600.

### 2.4.2.2.2 Laser Scanning Mikroskop

Die wie oben beschrieben vorbereiteten Schnitte wurden in Probenfelder auf mit Teflon beschichtete Objektträger übertragen und unter dem Konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM 5) bei einer Wellenlänge von 543nm betrachtet. Bei dieser Wellenlänge ist die von den Cy3-markierten Antikörpern abgegebene Fluoreszenz maximal. Bei 633nm ist die Autofluoreszenz von Zellwänden deutlich sichtbar, so daß auf diese Weise ein Hintergrundbild der betrachteten Gewebebereiche erhalten wurde. Dieses konnte mit entsprechender Software mit der Fluoreszenzaufnahme überlagert werden, so daß Gewebe und Fluoreszenzmarkierung in einem Bild deutlich wurden.

### 2.4.2.3 Immunogoldmarkierung

#### 2.4.2.3.1 Markierung nach Fixierung und Einbettung

- Fixierung: Herstellung der Fixierungslösung siehe 2.4.2.2.

Wurzelstücke von ca. ½cm Länge wurden 1h bei Raumtemperatur in der Fixierungslösung inkubiert. Anschließend wurden die Proben viermal 10min mit PBS, pH=7,2 gewaschen.

- Entwässerung: Entwässert wurde mit einer aufsteigenden Ethanolreihe, wobei am Rotationsrad geschüttelt wurde:

15min 25% Ethanol

15min 50% Ethanol

15min 70% Ethanol

zweimal 15min 100% Ethanol

- Einbettung: Als Einbettmittel wurde LRWhite verwendet. Das Einbettmittel wurde ¼h im Vacuumexsiccator an der Wasserstrahlpumpe infiltriert, dann erneuert und nochmals infiltriert. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C darin inkubiert. Die Einbettung erfolgte nach erneuter Infiltration und Erneuerung des Einbettmittels in Gelatinekapseln oder Kunststofförmchen bei 55°C 24h. Die Proben konnten im Trockenschrank langsam auskühlen.
- Trimmen und Schneiden am Ultramikrotom siehe 2.4.1.2

Die auf Nickelgrids aufgebrauchten Ultradünnschnitte wurden der Markierungsprozedur unterzogen. Dazu wurden die Grids senkrecht mit dem Rand in zuvor mit einer Rasierklinge leicht eingeritzte Gummistopfen eingeklemmt. So konnten die Lösungen von beiden Seiten an die Schnitte herangebracht werden.

- Aldehydblockierung: Nach 10min Waschen mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> wurden Aldehydgruppen 40min mit 10mM Glycin in PBS, pH=7,2/Tween 0,2% blockiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal 5min mit PBS, pH=7,2 gespült.
- Proteinblock: Zur Absättigung eventueller Bindungsstellen für Serumproteine wurde 40min mit 3-5% Ziege Normalserum und 1% BSA in PBS, pH=7,2 bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte erneut ein Waschschrift , zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal mit PBS, pH=7,2.

## 2 Material und Methoden

- Inkubation mit primären Antikörpern: Die Schnitte wurden 120min bei 37°C oder über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in spezifischem Kaninchenserum, 1:500 - 1:1000 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5%, bzw. unspezifischem primärem Kaninchen-Normalserum, 1:250 - 1:500 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5%, inkubiert. Danach wurde wiederum zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% gespült.
- Inkubation mit sekundären Antikörpern: Die Proben wurden 60min bei 37°C mit Gold-markierten sekundären Antikörpern aus Ziege Anti-Rabbit 1:30 - 1:50 (12nm Gold-Konjugat), bzw. 1:400 (1nm Gold-Konjugat) verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5% inkubiert und anschließend zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2%, einmal mit PBS, pH=7,2 und zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült.
- Es folgte die Kontrastierung mit Bleicitrat nach Reynolds (1963), wie unter 2.4.1.2 beschrieben.

### 2.4.2.3.2 Markierung vor endgültiger Fixierung und Einbettung

- Vorfixierung: Wurzelstücke von ca. 1cm Länge wurden insgesamt 1h in 3% Formaldehyd in PBS, pH=7,2 fixiert, wobei nach ½h Inkubationszeit die Enden der Proben mit einer scharfen Rasierklinge nochmals nachgeschnitten wurden. Dann wurden die Proben nochmals ½h in derselben Fixierungslösung inkubiert. Durch dieses Verfahren erhielten wir eine glatte, gut fixierte Oberfläche, wobei die Zellen durch das nochmalige Nachschneiden an der Schnittfläche des Präparates offen lagen. Der apoplastische Raum, wie auch die angeschnittenen Protoplasten waren nun für die nachfolgenden Inkubationsschritte mit den Antikörperlösungen zugänglich. Nach der Fixierung wurden die Proben mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% mehrmals gespült.
- Aldehydblockierung: Freie Aldehydgruppen wurden 40min mit 10mM Glycin in PBS, pH=7,2/Tween 0,2% blockiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal mit PBS, pH=7,2 gespült.
- Proteinblock: Zur Absättigung eventueller Bindungsstellen für Serumproteine wurde 40min mit 3-5% Normalserum von Ziege und 1% BSA in PBS, pH=7,2 bei Raumtemperatur blockiert. Es folgte erneut ein Waschschrift, zweimal mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal mit PBS, pH=7,2.

- Inkubation mit primären Antikörpern: Die Schnitte wurden 120min bei 37°C oder über Nacht im Kühlschrank bei 4°C in spezifischem Kaninchenserum, 1:500 - 1:1000 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5%, bzw. unspezifischem primärem Kaninchen-Normalserum, 1:250 - 1:500 verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5%, inkubiert. Danach wurde wiederum zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und mehrmals mit PBS, pH=7,2 gespült.
- Inkubation mit sekundären Antikörpern: Die Proben wurden 60min bei 37°C mit Gold-markierten sekundären Antikörpern aus Ziege Anti-Rabbit 1:30 - 1:50 (12nm Gold-Konjugat), bzw. 1:400 (1nm Gold-Konjugat) verdünnt in PBS, pH=7,2/BSA 0,5% inkubiert und anschließend zweimal 5min mit PBS, pH=7,2/Tween 0,2% und einmal mit PBS, pH=7,2 gespült.
- Fixierung: Es folgte eine weitere, stärkere Fixierung mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS, pH=7,2 für 30min. Danach wurde einige Male mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült.
- Silberverstärkung (Silver Enhancing Kit SEK B 250, British Biocell International) (nur bei Verwendung von 1nm Gold-Konjugaten): Es wurde nach dem Protokoll von British Biocell, Silver Enhancing Kit verfahren, wobei 6min mit der Lösung inkubiert wurde. Danach wurde einige Male mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült.
- Kontrastierung: 1h wurde bei Raumtemperatur mit 2% Osmiumtetroxid in 50mM Cacodylate-Puffer, pH=7 kontrastiert, dann wieder mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gespült.
- Die Proben wurden mit einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und, wie oben beschrieben, in SPURR eingebettet.
- Trimmen und Schneiden der Objekte am Ultramikrotom: Bei diesem Verfahren wurde darauf geachtet, daß die mit Antikörpern markierte Oberfläche der Präparate beim Trimmen der Objekte mit der Rasierklinge nicht beschädigt wurde. Auf die Auswahl einer besonders geeigneten Stelle anhand von lichtmikroskopischen Schnitten musste hier verzichtet werden. Ansonsten wurde wie unter 2.4.1.2 beschrieben verfahren. Es wurden nur Schnitte aus der obersten Zellschicht für unsere Analysen verwendet. Da für die hier untersuchten Wurzelzellen in etwa ein Durchmesser von 20µm angenommen werden konnte, die Schnittdicke am Ultramikrotom aber nur 0,08µm betrug, konnten wir annehmen, daß wir uns auch nach Herstellung etlicher Schnitte noch in der obersten, markierten Zellschicht bewegten.

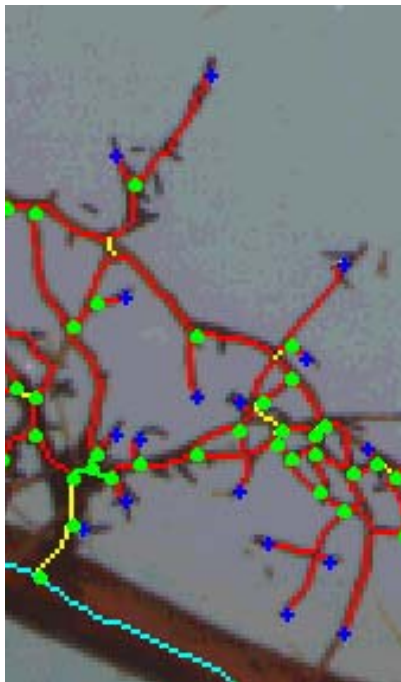
## 2.5 Morphologische Untersuchungen an Wurzelsystemen

### 2.5.1 Vorbereitung der Wurzeln

Die Wurzeln wurden vorsichtig aus dem Substrat genommen und mit Leitungswasser gewaschen. Bis zum Scannen erfolgte die Aufbewahrung in Wasser, eventuell über Nacht im Kühlschrank.

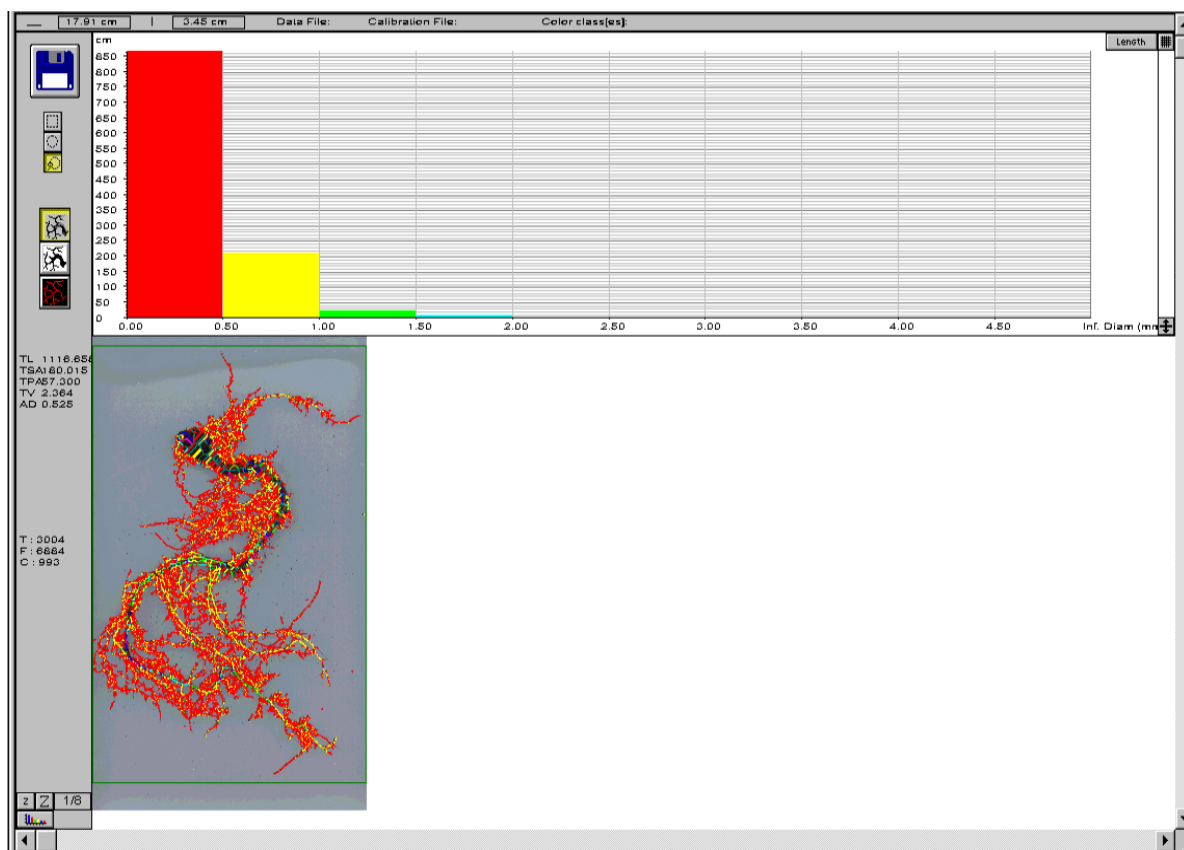
### 2.5.2 Einscannen der Wurzeln und morphologische Analyse

Zum Scannen wurde ein Flachbettscanner verwendet, auf dem eine flache Wasserschale installiert werden konnte. Die Wurzeln wurden mit einer Pinzette im Wasser ausgebreitet und mit Hilfe einer aufgelegten Plexiglasplatte flach gedrückt. Zur Auswertung des eingescannten Wurzelsystems wurde die WinRhizo<sup>TM</sup>Pro Bildanalyse-Software von Regent Instruments Inc., Quebec, Canada verwendet. Diese ermöglichte eine detaillierte Analyse der Wurzelmorphologie (Arsenault et al. 1995, Bauhus und Messier 1999 (a)) . Das Gesamte Wurzelsystem wurde in Durchmesserklassen von 0,5mm Dickenunterschieden aufgegliedert. Am Bildschirm konnte die Aufgliederung anhand der Überlagerung des Wurzelsystems mit farbigen Linien verfolgt werden.

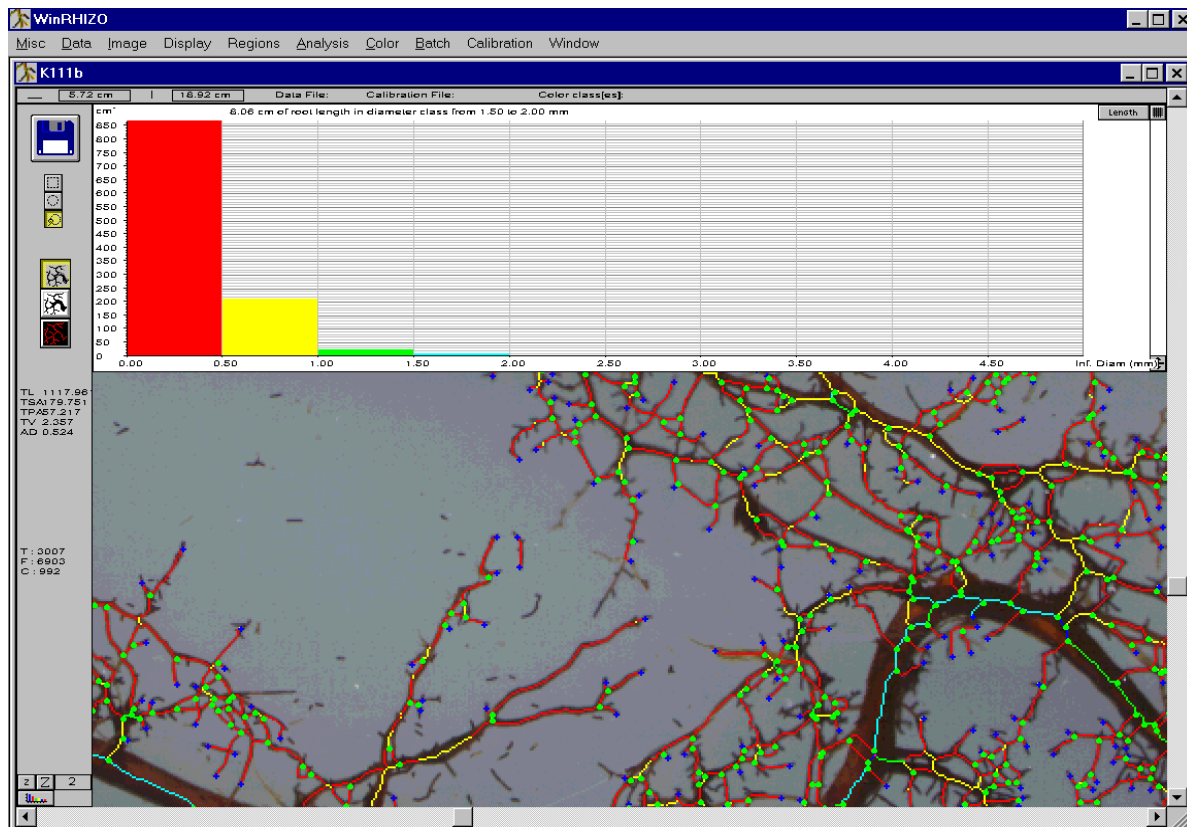


**Abbildung 2.3.** Markierung der Wurzeln für die morphologische Analyse mit WinRhizo. 0-0,5mm Durchmesser: Rote Linien; >0,5-1mm Durchmesser: gelbe Linien; >1-1,5mm Durchmesser: grüne Linien; >1,5-2mm Durchmesser: blaue Linien; Wurzelspitzen: blaue Kreuze; Verzweigungen: grüne Punkte.

Für unsere Auswertung unterteilten wir das Wurzelsystem in Fein- (0-1,5mm Durchmesser) und Grobwurzeln (>1,5-4,5mm Durchmesser). Folgende Parameter konnten im Rahmen der morphologischen Analyse (für das gesamte Wurzelsystem oder für die einzelnen Durchmesserklassen) ermittelt werden: Wurzellänge, Anzahl der Wurzelspitzen, Anzahl der Verzweigungen, durchschnittlicher Durchmesser, projizierte Fläche, Oberfläche, Volumen und Volumen pro Bodenvolumen. Für unsere Untersuchungen waren die Wurzellänge und die Anzahl von Wurzelspitzen besonders aussagekräftig. Diesen Parametern wurde daher in Bezug auf das gesamte Wurzelsystem und auf Fein- und Grobwurzeln besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Jeder Parameter konnte – aufgeschlüsselt nach Durchmesserklassen – in einem Balkendiagramm gemeinsam mit dem Analysenbild am Bildschirm betrachtet werden. Als Beispiel hierfür dienen die folgenden Abbildungen.



## 2 Material und Methoden



B (2.4)

**Abbildung 2.4 (A-B).** Wurzelmorphologische Analyse mit WinRhizo. **A**, Übersicht. **B**, Vergrößerung eines Wurzelbereiches: Einteilung des Wurzelsystems in Durchmesserklassen; Im Balkendiagramm ist die Länge der einzelnen Wurzeldurchmesserklassen dargestellt.

### 2.5.3 Ermittlung der Trockengewichte der Wurzeln

Die Wurzeln wurden eingefroren und lyophilisiert. Im trockenen Zustand ließen sich die Feinwurzeln leicht von den Grobwurzeln abtrennen. Beide Fraktionen wurden getrennt gewogen.

### 2.5.4 Für die morphologische Analyse berechnete Größen

Root Length Density (RLD)	$[\text{cm} \cdot \text{cm}^{-3}]$
Root Length Density (RLD) der Feinwurzeln	$[\text{cm} \cdot \text{cm}^{-3}]$
Root Length Density (RLD) der Grobwurzeln	$[\text{cm} \cdot \text{cm}^{-3}]$
Specific Root Length (SRL)	$[\text{cm} \cdot \text{mg TG}^{-1}]$
Specific Root Length (SRL) der Feinwurzeln	$[\text{cm} \cdot \text{mg TG}^{-1}]$
Specific Root Length (SRL) der Grobwurzeln	$[\text{cm} \cdot \text{mg TG}^{-1}]$
Root Tip Density (RTD)	$[\text{Anzahl} \cdot \text{cm}^{-3}]$
Root Mass Density (RMD) der Feinwurzeln	$[\text{mg TG} \cdot \text{cm}^{-3}]$
Root Mass Density (RMD) der Grobwurzeln	$[\text{mg TG} \cdot \text{cm}^{-3}]$



## 2.6 Physiologische Untersuchungen

### 2.6.1 Chlorophyllfluoreszenzmessung

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz erfolgte mit dem Mini-PAM (Puls-Amplituden-Modulation) Chlorophyll Fluorometer von WALZ (nach Schreiber, 1997 und Maxwell und Johnson, 2000)

- Prinzip der Chlorophyllfluoreszenzmessung: Die durch Lichtabsorption entstehenden Anregungszustände des Chlorophylls können entweder photochemisch umgesetzt werden, in Wärme übergehen oder als Fluoreszenz abstrahlen. Nach dem Energieerhaltungsgesetz besteht folgende Beziehung:

$$\text{Fluoreszenz} + \text{Photochemie} + \text{Wärme} = 1$$

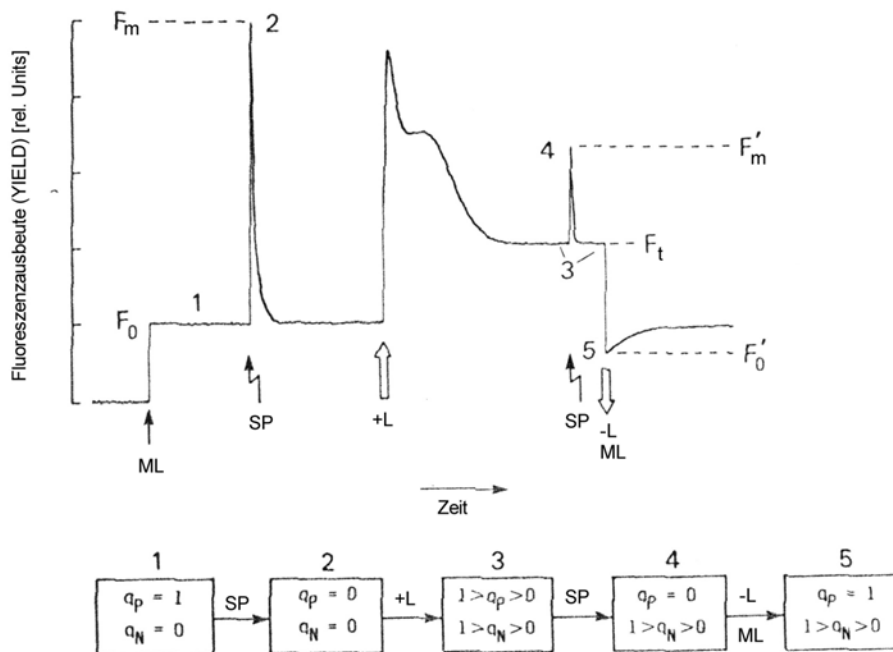
Wärme und Fluoreszenz können durch zwei Fluoreszenzmessungen kurz vor und während eines sättigenden Lichtimpulses ermittelt werden. Es lassen sich also aus der Fluoreszenzmessung direkte Rückschlüsse auf die Photochemie ziehen. Eine höhere Fluoreszenz bedeutet ein geringeres photochemisches Quenching, d. h. die Anregungsenergie des Lichtes wird photosynthetisch schlechter ausgenutzt. Fluoreszenzänderungen unter *in vivo* Bedingungen stammen praktisch ausschließlich von Chlorophyll a, das im PSII lokalisiert ist. Die Chlorophyllfluoreszenz liefert Information über den Status von PSII. Sie gibt Auskunft darüber, in welchem Ausmaß das vom Chlorophyll absorbierte Licht von PSII ausgenutzt wird. Der Elektronenfluß durch PSII repräsentiert unter gewissen Bedingungen die Photosyntheserate.

Das Meßprinzip der Mini-PAM besteht im Wesentlichen darin, daß die photochemische Energieumwandlung in PSII durch einen sehr starken Lichtimpuls abgesättigt wird, wodurch die Quantenausbeute von PSII kurzfristig auf Null gedrückt und die Quantenausbeuten der Fluoreszenz sowie der strahlungslosen Dissipation (Wärme) maximal stimuliert werden. Die Quantenausbeute von PSII läßt sich nach dieser Methode näherungsweise folgendermaßen bestimmen:

$$\begin{aligned} \text{Quantenausbeute von PSII} &= (F_m - F_0) / F_m && \text{(dunkeladaptiertes Blatt),} \\ \text{bzw. Quantenausbeute von PSII} &= (F_m - F_t) / F_m' && \text{(lichtadaptiertes Blatt).} \end{aligned}$$

## 2 Material und Methoden

$F_0$  ist die an einem dunkeladaptierten Blatt zu einem gegebenen Zeitpunkt gemessene Fluoreszenzausbeute und  $F_m$  die zu diesem Zeitpunkt durch einen sättigenden Lichtimpuls induzierbare maximale Fluoreszenz. Die Fluoreszenz im Dunkeln ( $F_0$ ) wird mit der MiniPAM durch sehr kurze, gepulste Lichtimpulse einer LED mit Emissionsmaximum im kurzwelligen Rot (650nm) angeregt. Das Meßlicht ist so schwach, daß keine Probenveränderung erfolgt. Darauf folgt ein sättigender Lichtimpuls, wobei  $F_m$  bestimmt wird. Auch die Messung der Fluoreszenz im Licht wird durch das Pulsprinzip ermöglicht. Die Unterscheidung zwischen Fluoreszenzlicht und anderen Lichtsignalen erfolgt anhand des durch das gepulste Meßlicht hervorgerufenen an/aus-Musters. Wird an einem lichtadaptierten Blatt gemessen, so wird folgende Nomenklatur verwendet:  $F_t$  ist die zu einem bestimmten Zeitpunkt gemessene Fluoreszenz bei Lichtadaptation,  $F_m'$  ist die während eines sättigenden Lichtimpulses gemessene maximale Fluoreszenz. Verdeutlicht werden die Zusammenhänge in folgendem Schema:



**Abbildung 2.5.** Schematische Darstellung der Meßsignale bei der Messung der Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln und im Licht. Kontinuierliche Beleuchtung an +L, kontinuierliche Beleuchtung aus -L, Meßlicht ML, sättigender Lichtimpuls SP. (Van Kooten und Snel 1990)

(Zur Erläuterung der Abkürzungen siehe nächste Seite.)

Dunkeladaptiertes Blatt:

$$F_m - F_0 / F_m = F_v / F_m \approx 0,83 \text{ Quantum Yield}$$

Lichtadaptiertes Blatt:

$$F_m' - F_t / F_m' = \Delta F / F_m' = \text{Quantum Yield}; \quad 0,83 > \text{Quantum Yield} > 0,00$$

F Fluoreszenzausbeute (YIELD)

F<sub>0</sub> Minimale Fluoreszenz (im Dunkeln bei gepulstem Meßlicht)

F<sub>m</sub> Maximale Fluoreszenz (nach sättigendem Lichtimpuls ohne Beleuchtung außer des gepulsten Meßlichtes)

F<sub>t</sub> Minimale Fluoreszenz (bei kontinuierlicher Beleuchtung)

F<sub>m</sub>' Maximale Fluoreszenz (nach sättigendem Lichtimpuls bei kontinuierlicher Beleuchtung)

q<sub>p</sub> Photochemisches Quenching;  $q_p = F_m' - F_t$

q<sub>N</sub> Nicht photochemisches Quenching;  $q_{NP} = F_m - F_m'$

F<sub>v</sub> Variable Fluoreszenz;  $F_v = F_m - F_0$

- Durchführung der Chlorophyllfluoreszenzmessungen: Die Dunkelfluoreszenzmessungen wurden am Ende der Dunkelphase durchgeführt. Pro Pflanze wurden zwei Blätter gemessen. Anschließend wurden die Pflanzen ca. 1h an Licht adaptiert ( $80$  bzw.  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ ) und unter diesen Bedingungen erneut gemessen.

## 2.6.2 Gaswechsellmessung

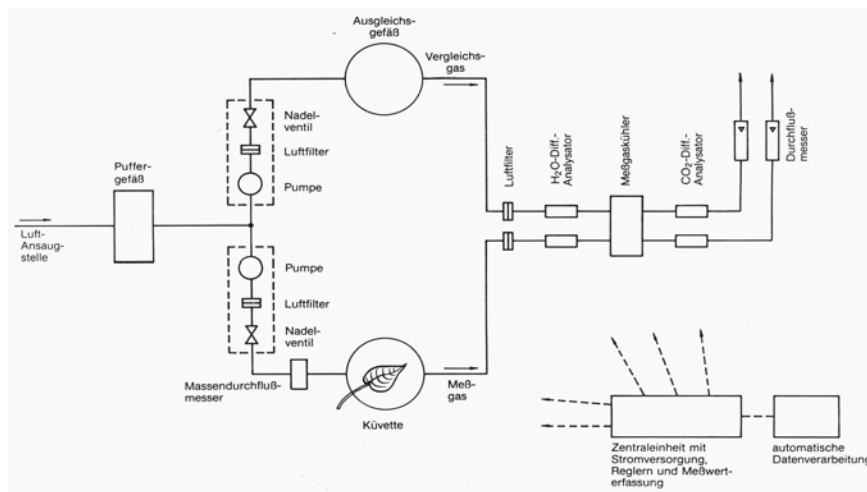
Pro Pflanze wurden zwei Blätter für die Gaswechsellmessungen verwendet, die groß genug waren, daß sie in die Meßküvette des Porometers eingespannt werden konnten. Es wurden von oben her gesehen die ersten beiden in Frage kommenden Blätter verwendet.

### 2.6.2.1 Gerätebeschreibung und Wirkungsweise

Die Gaswechsellmessungen wurden mit einem CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O Porometer der Firma WALZ erhoben.

Generelle Wirkungsweise (nach Lange, 1984):

## 2 Material und Methoden



**Abbildung 2.6.** Blochschaubild zur Wirkungsweise des Porometersystems (nach Lange, 1984).

Außenluft wird angesaugt und zunächst durch ein Puffergefäß geleitet um kurzfristige Schwankungen in  $\text{CO}_2$ -Gehalt und Luftfeuchtigkeit auszugleichen. Hinter dem Puffergefäß teilt sich der Luftstrom in den Meß- und Vergleichsgasstrom; beide werden durch Membranpumpen gefördert und durch Nadelventile manuell eingestellt. Das Meßgas durchströmt einen Massendurchflußmesser und die Porometerküvette, deren Volumen im Vergleichsgasstrom durch ein Ausgleichsgefäß kompensiert wird. Hinter Küvette bzw. Ausgleichsgefäß befindet sich das IR-Analysengerät (BINOS 100). Erst wird die Differenz im Wasserdampfgehalt und dann diejenige im  $\text{CO}_2$ -Gehalt zwischen beiden Gasströmen gemessen. Der  $\text{CO}_2$ -Analysator besitzt eine gewisse Querempfindlichkeit für Wasserdampf. Man kann den dadurch entstehenden Fehler rechnerisch ausgleichen oder Meß- und Vergleichsgas werden vor dem  $\text{CO}_2$ -Analysengerät in einem Meßgaskühler auf eine konstante Taupunkttemperatur von  $2^\circ\text{C}$  eingestellt. Beide Möglichkeiten sind, je nach Bauart des eingesetzten Gerätes, verwendet worden. Nach der Analyse werden die beiden Gasströme über Schwebekörper-Durchflußmesser abgeblasen.

### 2.6.2.2 Durchführung der Gaswechsellmessungen für den Infektionsversuch 1998

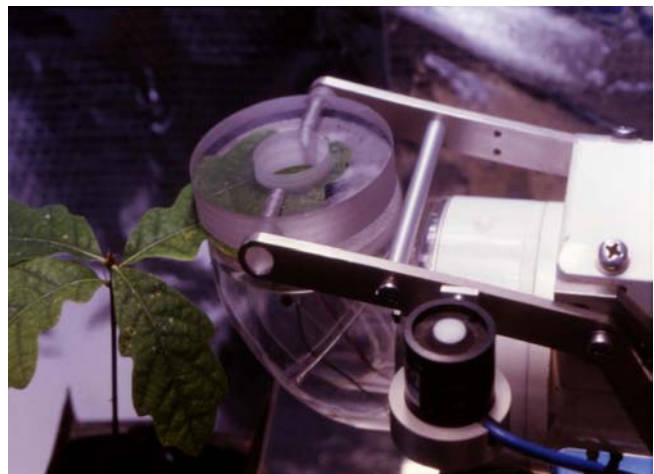
Alle Gaswechsellmessungen wurden vor Ort in der Gewächshauskammer durchgeführt. Die Messungen wurden um ca. 8:00 begonnen und ca. 14:00 beendet. Die Lichtintensität in der Gewächshauskammer betrug ca.  $100 - 200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ .

Die relative Luftfeuchte lag bei ca. 30 - 60%, die Temperatur in der Kammer betrug 20°C. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration betrug normalerweise 350 - 460ppm und stieg während der Messung bei Anwesenheit einer Person und geöffneter Tür auf maximal 630ppm an. Der Luftdruck lag bei 962 - 970hPa und wurde am Beginn jedes Meßtages am BINOS aktualisiert. Die zur Messung verwendete Luft wurde über einen Schlauch aus der Gewächshaus-Nebenkammer angesaugt. Temperatur und Luftfeuchte verhielten sich ähnlich wie in der Meßkammer. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration lag ebenfalls bei 350 - 460ppm. Die Kammer, aus der die Luft angesaugt wurde, wurde während der Messungen nicht betreten.

Zur Messung wurden die Pflanzen unter eine konstante Lichtquelle gestellt (HÖHNLE-Scheinwerfer, OSRAM Powerstar HQI-TS 400W/D eingestellt auf 750µmol·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup> mit Einbeziehung des unter Tags vorhandenen Raumlichtes). Um die Aufheizung der Meßküvette mit dem Meßblatt zu minimieren, wurde unterhalb des Scheinwerfers ein Ventilator installiert. Die Durchflußgeschwindigkeit durch die Meßküvette wurde auf 600ml·min<sup>-1</sup> eingestellt. Es wurde mit Meßgaskühler, eingestellt auf 2°C, gemessen. Die folgenden Abbildungen zeigen den Aufbau während der Messungen.



A



B

**Abbildung 2.7 (A-B).** Gaswechsellung an einem Eichenblatt mit dem Porometer. **A,** Messaufbau. **B,** Küvette des Porometers mit eingespanntem Eichenblatt.

## 2 Material und Methoden

### 2.6.2.3 Durchführung der Gaswechselfmessungen für die Infektionsversuche 2000

Die Gaswechselfmessungen wurden in einem auf ca. 20°C temperierten Raum durchgeführt. Um die Meßbedingungen den Anzuchtverhältnissen anzugleichen, wurden ähnliche Lichtintensitäten für die Messung gewählt. Die in Wasser kultivierten Pflanzen (siehe 2.2.3.1.3) wurden bei  $200\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$  gemessen, die in Substrat angezogenen zweijährigen Eichen (siehe 2.2.3.2.3) bei  $750\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$ . Als Lichtquelle diente ein HÖHNLE- Scheinwerfer mit OSRAM Powerstar HQI-TS 400W/D. Die für die Messungen verwendete Luft wurde aus dem Freien angesaugt. Die CO<sub>2</sub>-Konzentration lag bei ca. 350ppm. Die Taupunkttemperatur wurde durch Vorschaltung eines Gefäßes zur Luftbefeuchtung und eines Meßgaskühlers auf 17°C eingestellt. Die Durchflußgeschwindigkeit durch die Meßküvette wurde auf  $600\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$  eingestellt. Es wurde ohne Wasserausfällung vor dem CO<sub>2</sub>-BINOS gemessen und der entstehende Fehler bei der Ermittlung der CO<sub>2</sub>-Differenz rechnerisch mit der DIAGAS-Software beseitigt.

## **2.7 Versuchsaufbau und Überblick über anschließende Messungen**

Der Aufbau einiger, komplizierterer Versuchsansätze soll hier gesondert erläutert werden. Alle anderen Versuchsansätze sind bei den entsprechenden Untersuchungsmethoden beschrieben und sollen hier nicht ein weiteres Mal angeführt werden. Die Untersuchungsmethoden, die bei den hier beschriebenen Versuchen verwendet wurden, sind ebenfalls an den entsprechenden Stellen bei den Methoden nachzulesen (Querverweise sind angegeben).

2.7.1 Infektionsversuch von Eichensämlingen mit *Phytophthora quercina* 1998

Versuchsaufbau:

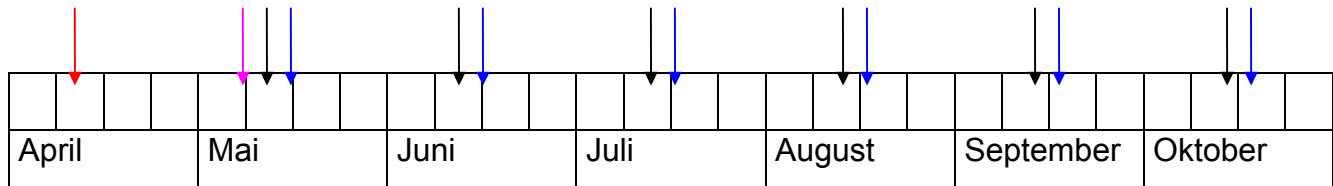


**Abbildung 2.8.** Infektionsversuch 1998 in der Gewächshauskammer des Versuchsgutes der TUM in Dürnast.

9 Kästen Kontrollpflanzen und 9 Kästen infizierte Pflanzen wurden in zwei Blöcken aufgestellt. Zwischen den Blöcken bestand ein Abstand von ca. 40cm. Ein Kasten enthielt 17 Roottrainer mit je einer Eiche. Aus 6 Kontrollkästen und 6 Kästen infizierter Eichen wurden unter den 17 Pflanzen 8 für die Messungen ausgewählt. Die Kriterien für die Auswahl waren eine gut handhabbare Wuchshöhe und ausreichend große Blätter, um daran Gaswechsellmessungen mit der Porometermeßküvette durchführen zu können. Es wurde dabei nicht nach dem äußeren Erscheinungsbild (z.B. Chlorosen oder sonstige Blattverfärbungen) selektiert. 6 Kästen wurden als Kontrollen behandelt und 6 Kästen mit *Phytophthora quercina* infiziert. In der Mitte des Versuchzeitraumes wurden die beiden Blöcke ausgetauscht, um einen Standorteinfluß auf deren Entwicklung auszuschließen.

## 2 Material und Methoden

Einen Überblick über den Ablauf des Wurzel-Inokulationsversuch 1998 gibt folgende schematische Abbildung:



Aussaat



Umsetzen in infiziertes Substrat, bzw. in Kontroll-Substrat



Fluten für 48h



Gaswechselfmessungen (siehe 2.6.2.2), anschließend Einscannen der Wurzel für morphologische Untersuchungen (siehe 2.5.2) und Einfrieren für spätere ELISA-Messungen (siehe 2.3.3.1)

**Abbildung 2.9.** Schematische Darstellung des Versuchsablaufes des Wurzel-Inokulationsversuches 1998

Ausführlichere Informationen zu den durchgeführten Arbeiten enthält der folgende Zeitplan. In der rechten Spalte des Zeitplanes wird die jeweils nach der letzten Flutung verstrichene Zeit angegeben. Diese Information schien uns wichtig, da währenddessen von einem Fortschreiten der Infektion ausgegangen werden kann. Alle Arbeiten wurden schnellstmöglich durchgeführt, dennoch wurden aber z.T. bis zu 18 Tage nach der Flutung benötigt.



<b>Ausführungen und Ereignisse</b>	<b>Datum</b>	<b>Alter [Wochen]</b>
<b>Aussaat</b>	<b>9.4.98</b>	
Umsetzen in infiziertes Substrat bzw. nicht infiziertes Kontroll-Substrat	13. -15.5.98	5
<b>Fluten 1</b>	<b>16. - 18.5.98</b>	
		<b>Vergangene Zeit seit der letzten Flutung [Tage]</b>
<b>Der 18.5.98 wurde als Zeitpunkt Null der Infektion definiert.</b>		
<b>Gaswechselformung 1</b>	<b>21. - 25.5.98</b>	<b>3 bis 7</b>
Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	bis 27.5.98	bis 8
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	bis 29.5.98	bis 10
<b>Störung der Temperaturregelung in der Gewächshauskammer: max. 30°C Lufttemperatur für max. 6h</b>	<b>8.6.98</b>	
<b>Fluten 2</b>	<b>10. - 12.6. 98</b>	
<b>Gaswechselformung 2</b>	<b>15. - 16.6.98</b>	<b>3 bis 4</b>
Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	bis 18.6.98	bis 5
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	bis 24.6.98	bis 11
<b>1. Düngung</b>	<b>8.7.98</b>	
<b>Fluten 3</b>	<b>11. - 13.7.98</b>	
<b>Gaswechselformung 3</b>	<b>14. - 15.7.98</b>	<b>1 bis 2</b>
Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	Kontrollen: bis 21.7.98 Infizierte Pflanzen: bis 28.7.98	Kontrollen: bis 8 Infizierte Pflanzen: bis 15
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	bis 31.7.98	bis 18
<b>2. Düngung</b>	<b>29.7.98</b>	
<b>Fluten 4</b>	<b>12. - 14.8.98</b>	
<b>Gaswechselformung 4</b>	<b>17. - 18.8.98</b>	<b>3 bis 4</b>

## 2 Material und Methoden

Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	Kontrollen: bis 27.8.98 Infizierte Pflanzen: bis 28.8.98	Kontrollen: bis 9 Infizierte Pflanzen: bis 10
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	bis 2.9.98	bis 15
Umstellen der Pflanzen	19.8.98	
Störung der Temperaturregelung in der Gewächshauskammer: max. 35°C Lufttemperatur für max. 24h	9.9.98	
<b>Fluten 5</b>	<b>9. - 11.9.98</b>	
Gaswechselformung 5	14. - 17.9.98	3 bis 5
Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	bis 21.9.98	bis 10
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	bis 25.9.98	bis 14
3. Düngung	27.9.98	
<b>Fluten 6</b>	<b>9. - 12.10. 98</b>	
Gaswechselformung 6	13. - 20.10.98	1 bis 8
Aufarbeitung Blätter (anschließend eingefroren)	bis 23.10.98	bis 11
Aufarbeitung Wurzel (anschließend eingefroren)	30.10.98	bis 18

Parallel zu den Gaswechselformungen wurden folgende Daten aufgenommen:

- Zustand der Pflanzen zu den Meßzeitpunkten:

Anhand eines Boniturschemas wurde der Zustand der Pflanzen vor den Messungen erfaßt. Die Stärke der beobachteten Chlorosen wurde folgendermaßen eingestuft:

0	... Kein Symptom
0,5	... Symptom nur leicht an einigen Blättern
1	... Symptom schwach
2	... Symptom stark
3	... Symptom sehr stark

Pro Pflanze wurde eine Zahl vergeben. Die von den 8 jeweils parallel untersuchten Pflanzen erhaltenen Summen wurden in einem Diagramm aufgetragen.

- Blattflächen und Blatt-Frischgewichte: Von den im Infektionsversuch 1998 eingesetzten Pflanzen wurden die Blätter im Anschluß an die Gaswechsellmessungen entfernt, zur Bestimmung des Frischgewichtes gewogen und zur Ermittlung der Blattfläche eingescannt. Das Trockengewicht wurde nach der Gefriertrocknung bestimmt.

### 2.7.2 Infektionsansatz zur Untersuchung der biochemische Abwehr in Eichenwurzeln

Die Probennahme erfolgte 0 bis 14 Tage nach der Infektion. Von jeder Wurzel wurden die unteren 4cm („unten“) und die daran anschließenden 2cm („oben“) abgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Pro Erntetag wurden die Segmente von 40 Sämlingen gepoolt. Es standen demnach folgende Proben zur Verfügung:

Probe Nr.	Erntetage	Segmente	
1	0, 1, 2	unten	oben
2	3, 4, 5	unten	oben
3	6, 7, 8	unten	oben
4	9, 10, 11	unten	oben
5	12, 13, 14	unten	oben

Als Negativkontrolle wurden nicht infizierte Wurzelspitzen von 6-8cm Länge verwendet. Im weiteren erfolgten die Proteinextraktion nach 2.3.5.4, die Proteinbestimmung nach 2.3.1, die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach 2.3.6 und die Herstellung von Western-Blots nach 2.3.7.

### 2.7.3 Infektionsansatz zum parallelen Nachweis von *Phytophthora quercina* und Quercinin im Wurzelgewebe

Eichensämlinge mit ca. 10cm langen Keimwurzeln wurden an den Wurzelspitzen mit Zoosporensuspension infiziert (siehe 2.2.3.1.4) und nach 1-5 Tagen beerntet. In den aus den Wurzelproben erhaltenen Proteinextrakten (siehe 2.3.5.2) wurde *P. quercina* über einen indirekten ELISA quantifiziert und parallel dazu das Toxin Quercinin nachgewiesen (siehe 2.3.3.2). Zur Identifikation von Quercinin wurde Antiserum gegen das homologe Elicitin Cryptogein verwendet.

### 2.8 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung hatte zum Ziel, signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungen oder aber Gleichheit im Verhalten von Kontroll- und infizierten Pflanzen zu belegen. Wurden verschiedene Stichproben gemessen, in unserem Fall Kontrollpflanzen und infizierte Pflanzen aus verschiedenen Containern, so handelte es sich hierbei um unabhängige Stichproben. Anders war dies, wenn Pflanzen vor und nach der Infektion gemessen und die beiden berechneten Mittelwerte verglichen wurden. In diesem Fall lagen abhängige Stichproben vor. Es wurde grundsätzlich für unabhängige wie für abhängige Stichproben der verteilungsgebundene, parametrische t-Test zum Mittelwertvergleich verwendet. Bei abhängigen Stichproben führten bereits geringere Unterschiede zu Signifikanz. Vor dem t-Test wurden die Daten auf die geforderten Testvoraussetzungen geprüft: 1.) Normalverteilung der Grundgesamtheit, 2.) Gleichheit der Varianzen (F-Test) (entfällt bei abhängigen Stichproben). Ergab der F-Test eine Verletzung der Testvoraussetzungen, d.h. 1.) Median/Mittelwert  $<0,9$  oder  $>1,1$  oder 2.) Ungleichheit der Varianzen, so wurde anstatt des t-Tests der parameterfreie U-Test von Mann und Whitney verwendet. Der U-Test hat eine geringere Effizienz (95%) als der t-Test, was bei der Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt wurde.

#### 2.8.1 Statistische Auswertung der Gaswechseldaten

##### 2.8.1.1 Statistische Auswertung des Wurzel-Inokulationsversuchs 1998

Bei den physiologischen Daten, die jeden Monat an gesunden und kranken Pflanzen erhoben wurden, handelte es sich um unabhängige Stichproben. Grundsätzlich wurde der t-Test zur statistischen Analyse verwendet.

Folgende Stichproben zeigten keine Normalverteilung: Netto-Photosyntheserate der infizierten Pflanzen im August, Transpirationsrate der Kontrollpflanzen im Oktober, Leitfähigkeit für Wasserdampf der Kontrollpflanzen im August und Oktober, Water User Efficiency im Juli, August und September. In diesen Fällen wurde der U-Test von Mann und Whitney zum Vergleich der Mittelwerte der Kontroll- und infizierten Pflanzen verwendet.

### 2.8.1.2 Statistische Auswertung der Wurzel-Inokulationsversuche 2000

- Infektion von Eichensämlingen in Wasser: Zur statistischen Auswertung wurde zum Vergleich der Messungen an den Tagen 0 und 1 der t-Test für abhängige Stichproben verwendet, da es sich bei diesen Messungen um dieselben Pflanzen vor und nach den Infektion handelte. An den Tagen 6 und 14 wurden verschiedene Pflanzen gemessen und daher der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Für die Transpirationsrate, Netto-Photosyntheserate und Leitfähigkeit für Wasserdampf am Tag 14 war der t-Test ungeeignet, da die Varianzen der beiden Stichproben nicht gleich waren. Aus diesem Grund wurde hier der parameterfreie U-Test von Mann und Whitney angewendet.
- Infektion von zweijährigen Eichen in Substrat: Bei den statistisch verglichenen Mittelwertpaaren von Kontrollpflanzen und infizierten Pflanzen handelte es sich hier wiederum um unabhängige Stichproben. Es wurde wieder mit dem t-Test gearbeitet.

### 2.8.2 Statistische Auswertung der Chlorophyllfluoreszenzdaten

- Infektion von Eichensämlingen in Wasser: Zum Vergleich der Mittelwerte der Tage 0 und 1 wurde der t-Test für abhängige Stichproben eingesetzt. Für die Tage 6 und 14 wurde der t-Test für unabhängige Stichproben verwendet.
- Infektion von zweijährigen Eichen in Substrat: Alle Mittelwertpaare wurden mit dem t-Test für unabhängige Stichproben verglichen.

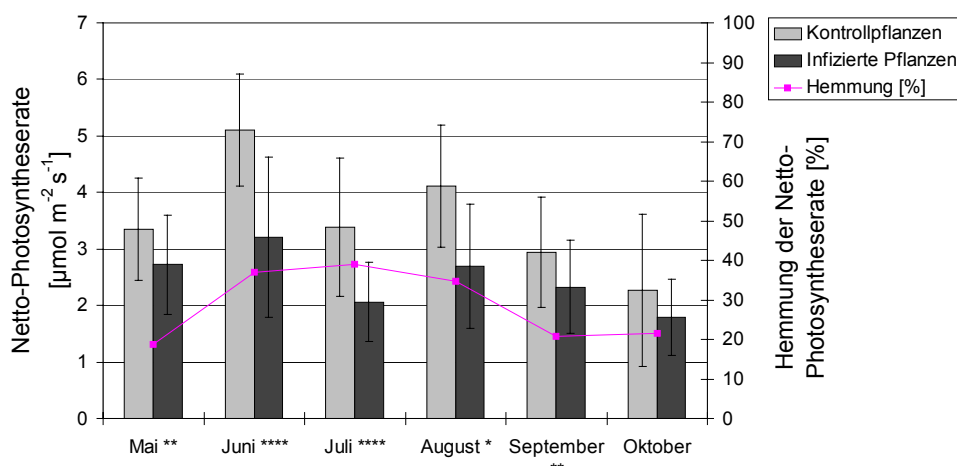
### 2.8.3 Statistische Auswertung der wurzelmorphologischen Daten

Bei den wurzelmorphologischen Daten handelte es sich um unabhängige Stichproben. Sofern die Voraussetzungen für den t-Test erfüllt waren, wurde dieser verwendet. In allen anderen Fällen wurde der U-Test von Mann und Whitney eingesetzt. Dies war der Fall bei: Root Length Density im Juli und August; Specific Root Length im Juli; Root Tip Density im Juli und August; Root Length Density der Feinwurzeln im Juli und August; Specific Root Length der Feinwurzeln im Mai, Juni, Juli, September und Oktober; Root Length Density der Grobwurzeln im Juli und September; Specific Root Length der Grobwurzeln im Juli und September.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Physiologische Veränderungen auf Blattebene nach Infektion der Wurzel mit *Phytophthora quercina*

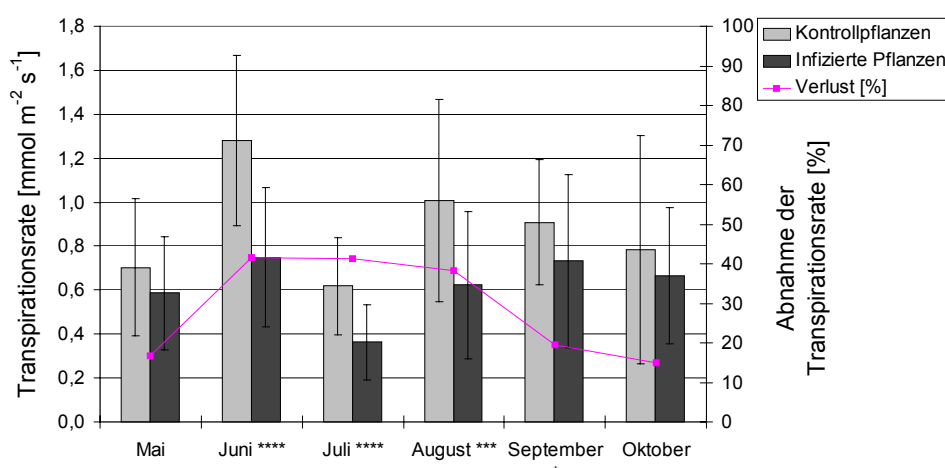
#### 3.1.1 Physiologische Messungen an Wurzel-Inokulationsversuchen 1998



**Abbildung 3.1.** Netto-Photosyntheserate bei Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Beobachtung über eine Vegetationsperiode. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Die Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.1*) der Kontrollpflanzen nahm zu Beginn der Vegetationsperiode ausgehend von  $3,35 \pm 0,91 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Monat Mai auf einen Maximalwert von  $5,10 \pm 0,99 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Juni zu. Bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes im Oktober war ein Rückgang der Netto-Photosyntheseraten gesunder Eichenpflanzen zu verzeichnen, wobei ein leichter Einbruch der Kurve im Juli zu bemerken war. Das Minimum wurde mit  $2,27 \pm 1,35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  im Oktober erreicht. Die Netto-Photosynthesewerte der mit

*Phytophthora quercina* infizierten Eichensämlinge folgten denjenigen der Kontrollen, allerdings auf einem niedrigeren Niveau. Bereits 3 Tage nach der Inokulation, dargestellt in der Meßreihe Mai, lagen die Netto-Photosyntheseraten der infizierten Pflanzen mit  $2,72 \pm 0,87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  um 19% niedriger als die Kontrollwerte. Es wurde ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% bestätigt. Die Verminderung der Netto-Photosyntheserate durch die Infektion wurde im Juni und Juli mit 37% bzw. 39% noch deutlicher. Infizierte Pflanzen erreichten im Juni nur einen maximalen Mittelwert von  $3,21 \pm 1,41 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Während beider Sommermonate lagen deutliche Unterschiede zu den Kontroll-Eichen auf einem Signifikanzniveau von 0,01% vor. Auch im August war eine niedrigere Netto-Photosyntheserate an kranken Eichen zu bemerken. Im Vergleich zu den Kontrollwerten lag eine Verminderung um 35% vor. Die statistische Auswertung ergab einen signifikanten Unterschied der beiden Mittelwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen mit 1% Irrtumswahrscheinlichkeit lag auch noch im September vor. Den kleinsten Mittelwert wiesen die infizierten Pflanzen wie auch die Kontrollen im Oktober auf. Mit  $1,79 \pm 0,67 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  war die Netto-Photosyntheserate der infizierten Pflanzen statistisch nicht mehr von dem entsprechenden Kontrollwert von  $2,27 \pm 1,35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  abzusetzen.

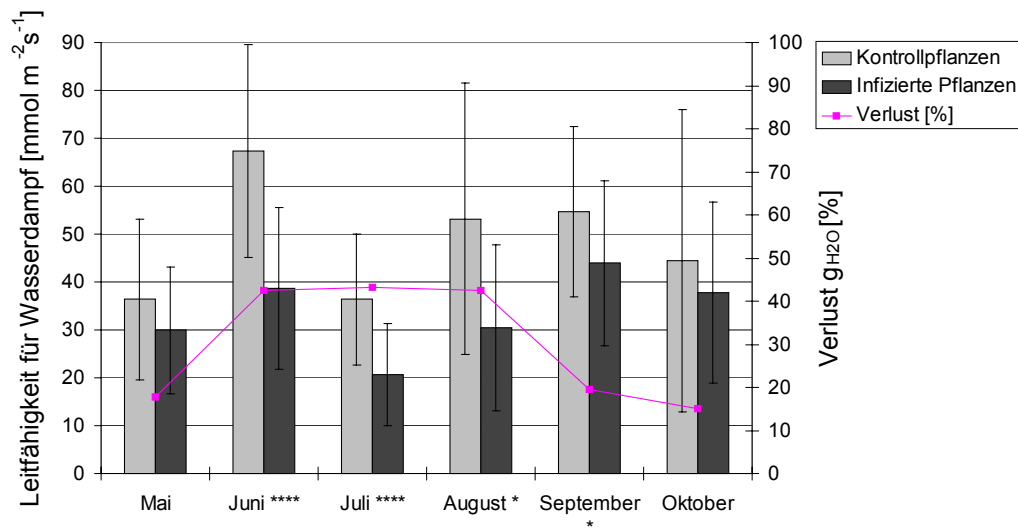


**Abbildung 3.2.** Transpirationsrate bei Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Beobachtung über eine Vegetationsperiode. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Die Transpirationsrate (*Abbildung 3.2*) der Kontrollpflanzen verhielt sich ähnlich wie die oben dargestellte Netto-Photosyntheserate. Im Mai wurde an den gesunden Pflanzen ein Mittelwert von  $0,70 \pm 0,31 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gemessen. Bereits zu diesem Zeitpunkt, 3 Tage nach der Infektion, ließen sich niedrigere Transpirationswerte an infizierten Pflanzen feststellen. Diese lagen bei  $0,58 \pm 0,25 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , was einer Verminderung um 17% entspricht. Wie die Netto-Photosyntheseraten stiegen auch die Transpirationsraten aller Pflanzen von Mai bis Juni an. Maximale Kontrollwerte lagen bei  $1,28 \pm 0,39 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , maximale Meßwerte an infizierten Pflanzen bei  $0,75 \pm 0,32 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Das bedeutet eine um 41% geringere Transpirationsrate und wurde statistisch mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01% erwartungsgemäß bestätigt. Im Juli lagen weiterhin 41% Verminderung der Transpirationsrate infolge der Infektion vor und es wurde ein entsprechender signifikanter Unterschied auf einem Niveau von 0,01% berechnet. Kontroll- wie auch infizierte Pflanzen lieferten im Juli die niedrigsten Meßwerte. Nach diesem Einbruch lagen die Meßpunkte für die Kontrollpflanzen im August wieder im Rahmen der von Juni ausgehenden absteigenden Tendenz bis zum Ende der Vegetationsperiode. Die Transpirationsrate infizierter Pflanzen zeigte nach dem Einbruch im Juli einen steten Anstieg bis September, dem ein nur leichter Rückgang im Oktober folgte. Die Meßreihe im August lieferte wiederum einen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1%. Die kranken Eichen erholten sich ab August wieder etwas und erreichten 62% der Kontrollwerte. Im September waren es wieder 82%, wobei noch ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollpflanzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% zu bemerken war. Am Ende des Untersuchungszeitraumes im Oktober lagen die Transpirationsraten der erkrankten Eichen sogar bei 85% der Kontrollwerte. Statistisch ließ sich hier kein Unterschied in den Behandlungen mehr fassen.



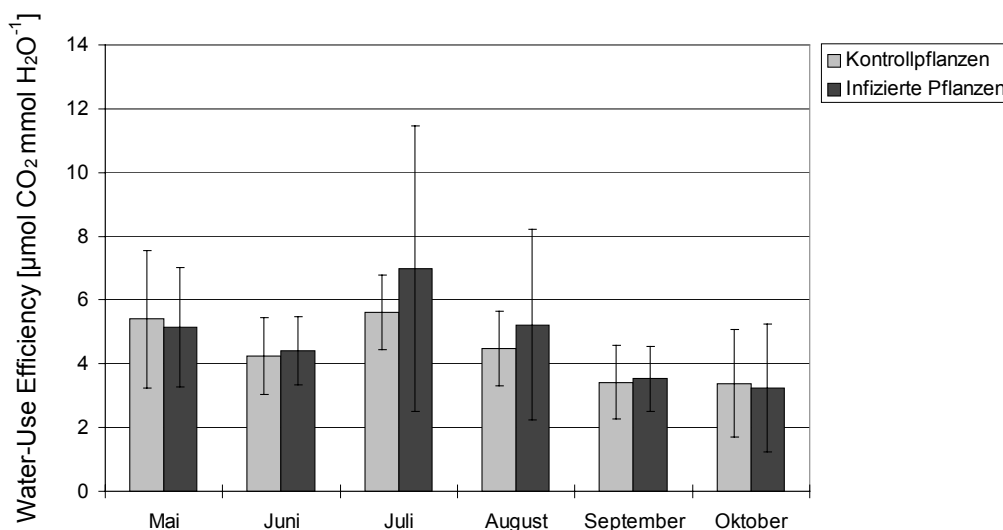


**Abbildung 3.3.** Stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ) bei Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Beobachtung über eine Vegetationsperiode. Mittelwerte von  $n=8$  Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Die stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.3*) verlief bei Kontroll- und infizierten Pflanzen parallel zur Transpirationsrate. Die an Kontrollpflanzen ermittelten Meßwerte betragen zu Beginn des Untersuchungszeitraumes nach der ersten Flutung im Mai  $36,42 \pm 16,80 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und die infizierten Eichen zeigten bereits einen Rückgang der Leitfähigkeit für Wasserdampf um 18%, was einem Wert von  $29,93 \pm 13,22 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  entspricht. Es lag jedoch noch kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungen vor. Die Kontrollpflanzen erreichten mit  $67,31 \pm 22,27 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  ihren Maximalwert im Juni, wohingegen die erkrankten Eichen erst im September maximale Leitfähigkeiten für Wasserdampf von  $43,91 \pm 17,24 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  aufwiesen. Während der Sommermonate Juni, Juli und August wurden die größten Schäden an infizierten Pflanzen gemessen. Die Leitfähigkeit für Wasserdampf betrug nur mehr 57-58% der Kontrollwerte. Für Juni und Juli wurden signifikante Unterschiede mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01% berechnet. Im August lag das Signifikanzniveau mit 5% etwas höher. Ebenfalls mit 5% Irrtumswahrscheinlichkeit unterschieden sich die Meßwerte im September. Die Leitfähigkeit für Wasserdampf nahm nach dem Einbruch im Juli sowohl bei Kontroll- als auch bei infizierten Eichen bis September zu. Im Herbst war eine Erholung der erkrankten Eichen zu verzeichnen. Diese erreichten im September

80% und im Oktober sogar 85% der Kontrollwerte. Statistisch war im Oktober kein Unterschied zu den gesunden Eichen mehr nach zu weisen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.1*), Transpirationsrate (*Abbildung 3.2*) und Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.3*) gesunder Pflanzen von Mai bis Juni anstiegen. Es folgte ein leichter Rückgang aller Werte bis Oktober – abgesehen von einem Einbruch aller physiologischen Größen im Juli. Infolge der Infektion war die physiologische Leistungsfähigkeit der Pflanzen deutlich reduziert. Mindestens von Juni bis September waren signifikante Unterschiede bei allen drei Meßgrößen vorhanden. Die Netto-Photosyntheserate der infizierten Pflanzen war sogar bereits 3 Tage nach der Inokulation (Mai) signifikant niedriger als die Kontrollwerte. Gegen Ende der Vegetationsperiode waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen mehr zu messen.



**Abbildung 3.4.** Water-Use Efficiency (WUE) bei Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Beobachtung über eine Vegetationsperiode. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Da für die Netto-Photosynthese- und Transpirationsrate ein annähernd paralleler Verlauf vorlag, ergaben sich bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Eichen vergleichbare Werte für die Water-Use Efficiency (*Abbildung 3.4*). Es lagen

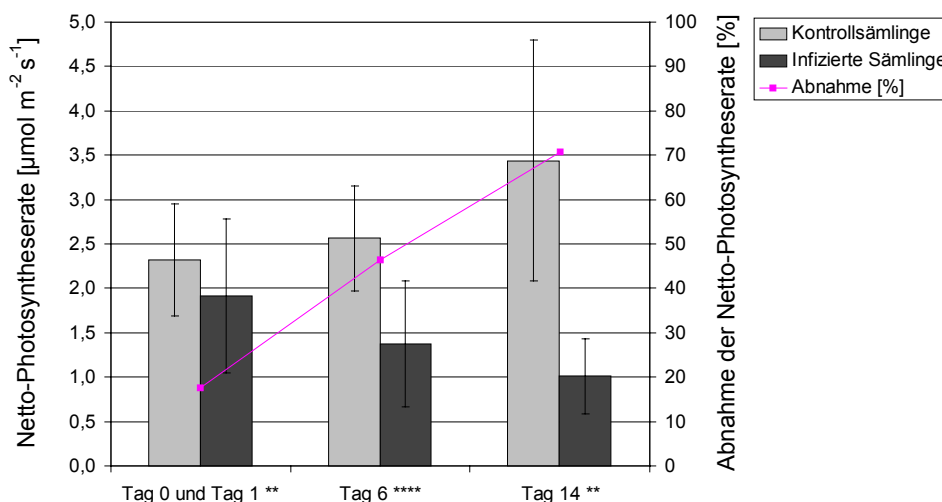
keine Unterschiede in den Behandlungen vor, d.h. die Infektion mit *P. quercina* hatte keinen erkennbaren Einfluß auf die Water-Use Efficiency.

### 3.1.2 Physiologische Messungen an Wurzel-Inokulationsversuchen 2000

#### 3.1.2.1 Infektion von Eichensämlingen in Wasser

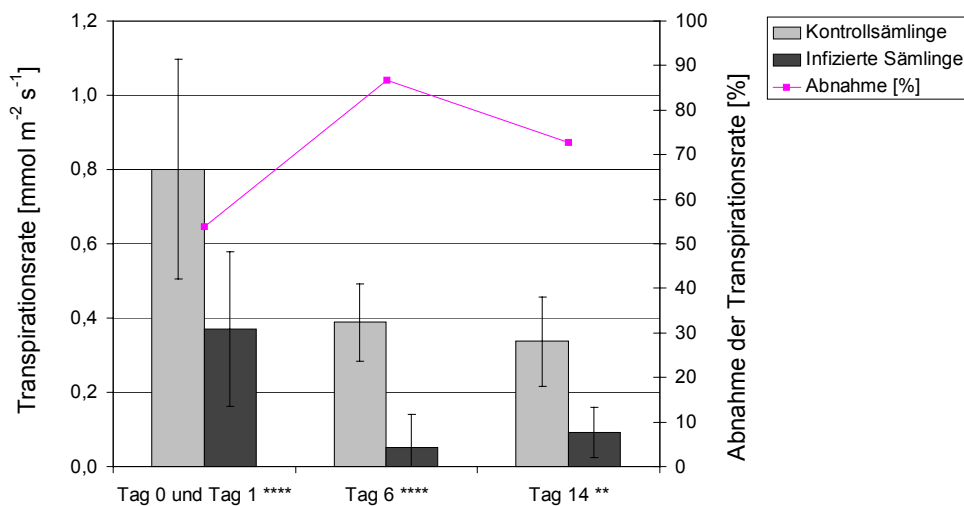
Dieser Infektionsansatz wurde durchgeführt, um die im Infektionsversuch 1998 erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen. Am Tag vor der Infektion, der als Tag 0 bezeichnet wird, und an den Tagen 1, 6 und 14 nach der Infektion wurden Gaswechsellmessungen mit dem Porometer durchgeführt und die Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln und im Licht bestimmt. Es ist zu beachten, daß dieselben Pflanzen vor der Infektion (Tag 0) und einen Tag nach der Infektion (Tag 1) gemessen wurden. Diese Pflanze wurden anschließend abgeerntet. Bei den Pflanze an den Tagen 6 und 14 handelt es sich um jeweils neue Stichproben.

##### 3.1.2.1.1 Gaswechsellmessungen



**Abbildung 3.5.** Netto-Photosyntheserate von Eichensämlingen. Effekte der Wurzelinfektion mit *P. quercina* durch Zoosporensuspension in Wasser. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

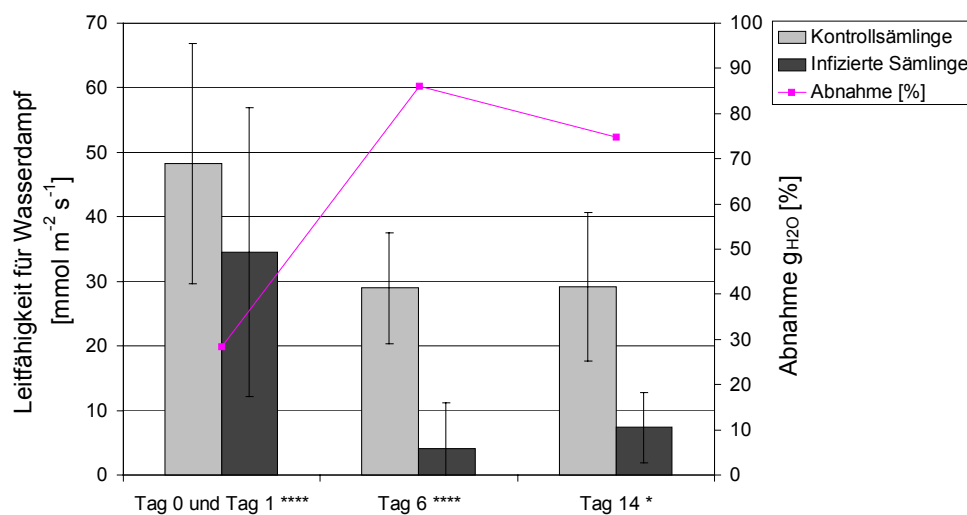
Vergleichende physiologische Untersuchungen von gesunden und infizierten Eichensämlingen ergaben, daß bereits einen Tag nach der Infektion die physiologische Aktivität deutlich gehemmt war. Die Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.5*) lag zu diesem Zeitpunkt bereits mit  $1,91 \pm 0,87 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  17% unter den am Vortag gemessenen Kontrollwerten von  $2,32 \pm 0,63 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die beiden Mittelwerte unterschieden sich signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,2%. Für die infizierten Pflanzen verschlechterte sich die Situation über den gesamten Versuchszeitraum zunehmend. 6 Tage nach der Infektion war die Netto-Photosyntheserate der infizierten Sämlinge mit  $1,37 \pm 0,71 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  um 46% niedriger als die der Kontrollen mit  $2,56 \pm 0,59 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , wobei sich die Mittelwerte auf einem Signifikanzniveau von 0,01% unterschieden. 14 Tage nach der Infektion betrug die Netto-Photosyntheserate der infizierten Sämlinge nur mehr  $1,01 \pm 0,42 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , das sind 29% der Kontrollwerte von  $3,44 \pm 1,36 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und die Mittelwerte unterschieden sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% signifikant voneinander.



**Abbildung 3.6.** Transpirationsrate von Eichensämlingen. Effekte der Wurzelinfektion mit *P. quercina* durch Zoosporensuspension in Wasser. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Die Transpirationsrate (*Abbildung 3.6*) ging von  $0,8 \pm 0,3 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gemessen an gesunden Pflanzen vor der Infektion am Tag 0 auf  $0,37 \pm 0,21 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , also um 54% am Tag 1 nach der Infektion zurück. Die beiden Mittelwerte unterschieden sich signifikant mit einer geringen Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01%. Während der nächsten Tage sank die Transpirationsrate der befallenen Pflanzen auf nahezu Null ab. 6 Tage nach der Infektion lag die Transpirationsrate mit  $0,05 \pm 0,09 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  im Mittel nur noch bei 13% gegenüber der zu diesem Zeitpunkt an Kontrollen gemessenen von  $0,39 \pm 0,1 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die beiden Mittelwerte unterschieden sich signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01%. Nach 14 Tagen war die Situation mit 27% Transpirationsrate bei den infizierten Pflanzen ähnlich, das waren  $0,09 \pm 0,07 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gegenüber  $0,34 \pm 0,12 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Das Signifikanzniveau lag hier bei 1%.



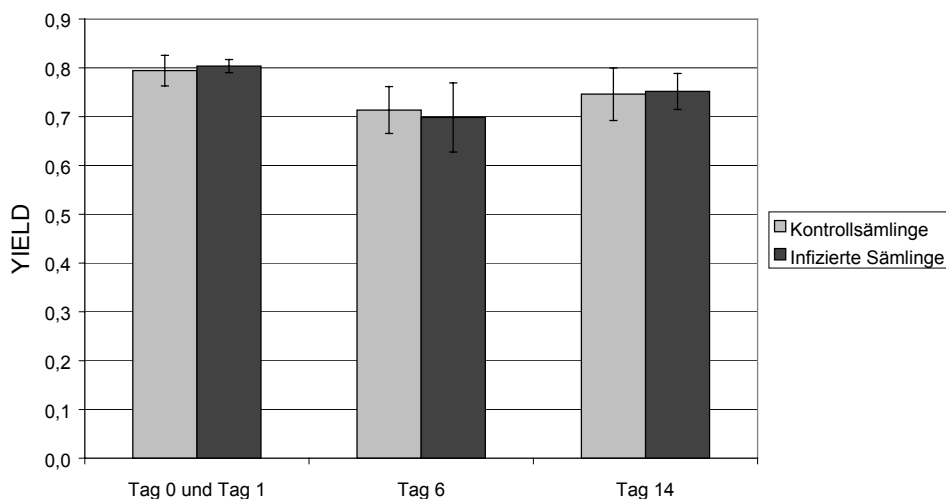
**Abbildung 3.7.** Leitfähigkeit für Wasserdampf von Eichensämlingen. Effekte der Wurzelinfektion mit *P. quercina* durch Zoosporensuspension in Wasser. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

*Abbildung 3.7* zeigt den zur Transpirationsrate parallelen Verlauf der Leitfähigkeit für Wasserdampf. Einen Tag nach der Infektion war die Leitfähigkeit für Wasserdampf um 28% gegenüber dem Vortag gesunken. Wurden vor der Infektion noch Werte von  $48,23 \pm 18,65 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  erreicht, so waren es am Tag nach der Infektion nur mehr  $34,58 \pm 22,40 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Der statistische Vergleich der beiden Mittelwerte ergab

einen signifikanten Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01%. 6 Tage nach der Infektion kam der Wasserhaushalt der Pflanze praktisch zu Erliegen und betrug mit  $4,04 \pm 7,17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  nur noch 14% gegenüber den Kontrollwerten von  $28,94 \pm 8,65 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die Mittelwerte wiesen einen signifikanten Unterschied auf mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01%. 14 Tage nach der Infektion lag das Mittel der an kranken Pflanzen gemessenen Werte mit  $7,35 \pm 5,45 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bei 25% der zeitgleich gemessenen Kontrollwerte von  $29,15 \pm 11,45 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Die beiden Mittelwerte unterschieden sich mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% signifikant.

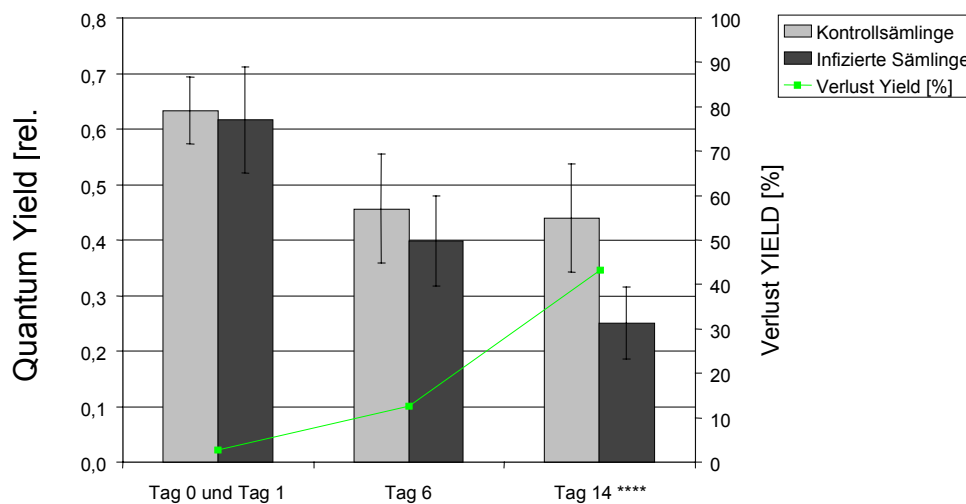
Zusammenfassend belegten die vergleichenden physiologische Untersuchungen von gesunden und infizierten Eichensämlingen bereits einen Tag nach der Infektion eine deutliche Hemmung der physiologischen Aktivität durch das Pathogen. 6 Tage nach der Infektion war die Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.5*) der infizierten Sämlinge um etwa 50% niedriger als die der Kontrollen und der Wasserhaushalt der infizierten Pflanzen kam praktisch zum Erliegen (*Abbildungen 3.6 und 3.7*).

### 3.1.2.1.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen



**Abbildung 3.8.** Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln. Effekte der Wurzelinfektion von Eichensämlingen mit *P. quercina* über Zoosporensuspension in Wasser. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Die Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln (*Abbildung 3.8*) wurde am Ende der Dunkelphase erfaßt. Die an Kontrollen und infizierten Pflanzen gemessenen Werte unterschieden sich über den Versuchszeitraum von insgesamt 14 Tagen nicht wesentlich voneinander, wobei die PS II Quantenausbeute Yield Werte zwischen 0,7 und 0,8 einnahm.



**Abbildung 3.9.** Chlorophyllfluoreszenz im Licht ( $80\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Effekte der Wurzelinfektion von Eichensämlingen mit *P. quercina* über Zoosporensuspension in Wasser. Mittelwerte von  $n=8$  Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

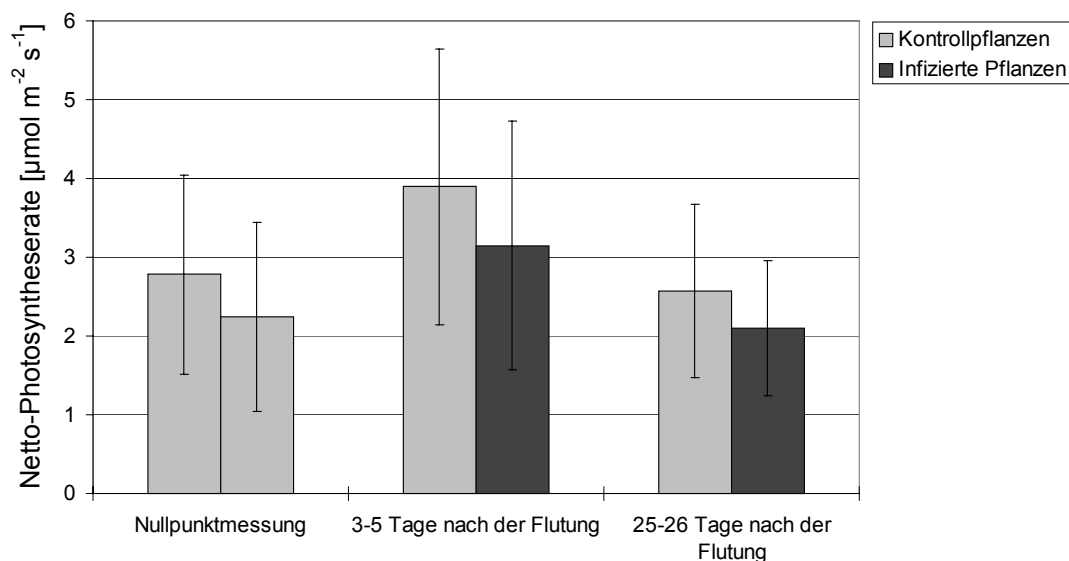
Die Versuchspflanzen wurden nach Messung der Chlorophyllfluoreszenz im Dunkeln ca. 1 Stunde an die neuen Lichtbedingungen akklimatisiert. Dann wurde unter konstanten Lichtverhältnissen von  $80\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  die Chlorophyllfluoreszenz erneut gemessen (*Abbildung 3.9*). Die gewählte Photonenflußstärke entsprach in etwa den Anzuchtbedingungen für die Eichensämlinge. Einen Tag nach der Infektion unterschied sich Quantum Yield mit 3% Einbuße noch nicht signifikant von den am Vortag an denselben Pflanzen gemessenen Kontrollwerten. Gerundet lagen beide Werte bei  $0,6 \pm 0,1$ . 6 Tage nach der Infektion lag die PS II Quantenausbeute mit  $0,40 \pm 0,08$  um 13% niedriger als die Kontrollwerte von  $0,46 \pm 0,10$ , es ließ sich jedoch noch kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Mittelwerten feststellen. Nach 14 Tagen betrug Quantum Yield der infizierten Sämlinge nur noch 57% der entsprechenden Kontrollwerte. Die Mittelwerte lagen bei  $0,25 \pm 0,07$  bzw.  $0,44 \pm 0,10$  in

der erwähnten Reihenfolge. Zwischen den Mittelwerten lag ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01% vor.

### 3.1.2.2 Infektion von zweijährigen Eichen in Substrat

Zweijährige Eichen wurden über Flutung in Substrat mit *P. quercina* infiziert, wobei die entsprechenden Kontrollpflanzen ohne Inokulum die gleiche Behandlung erfuhren. Die Nullpunktmessungen wurden vor der Flutung durchgeführt und dieselben Pflanzen 3-5 Tage nach der Infektion bzw. Flutung erneut gemessen. Diese Pflanzen wurden dann abgeerntet. Weitere physiologische Messungen wurden 25-26 Tage nach der Flutung vorgenommen. Bei diesen Eichen handelt es sich um jeweils einen neuen Pflanzensatz.

#### 3.1.2.2.1 Gaswechsellmessungen

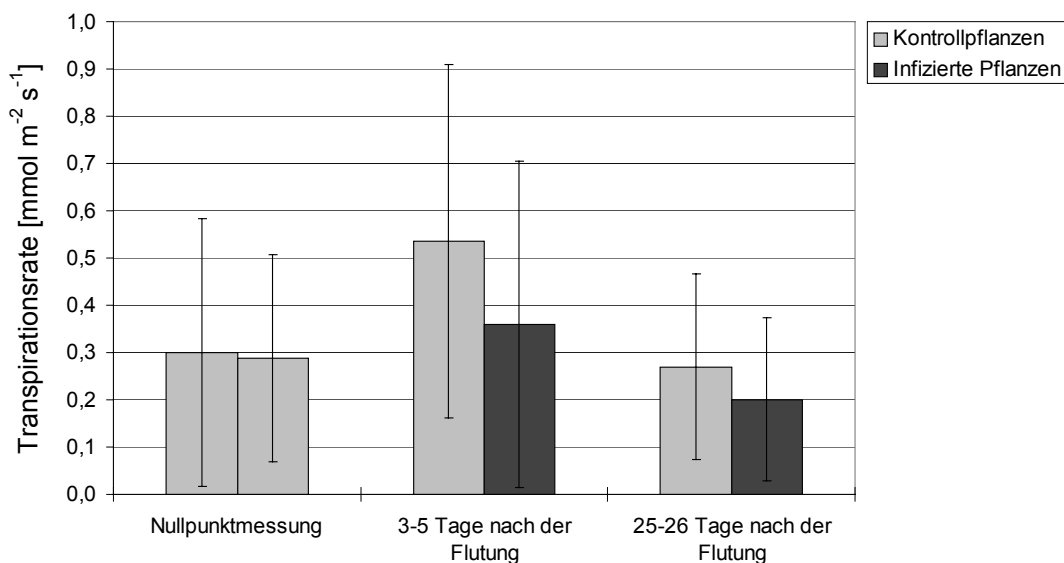


**Abbildung 3.10.** Netto-Photosyntheserate von zweijährigen Eichen. Vergleich von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=9 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Die Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.10*) von Kontroll- und infizierten Pflanzen war bei dem verwendeten Stichprobenumfang von 9 Pflanzen pro Meßzeitpunkt,



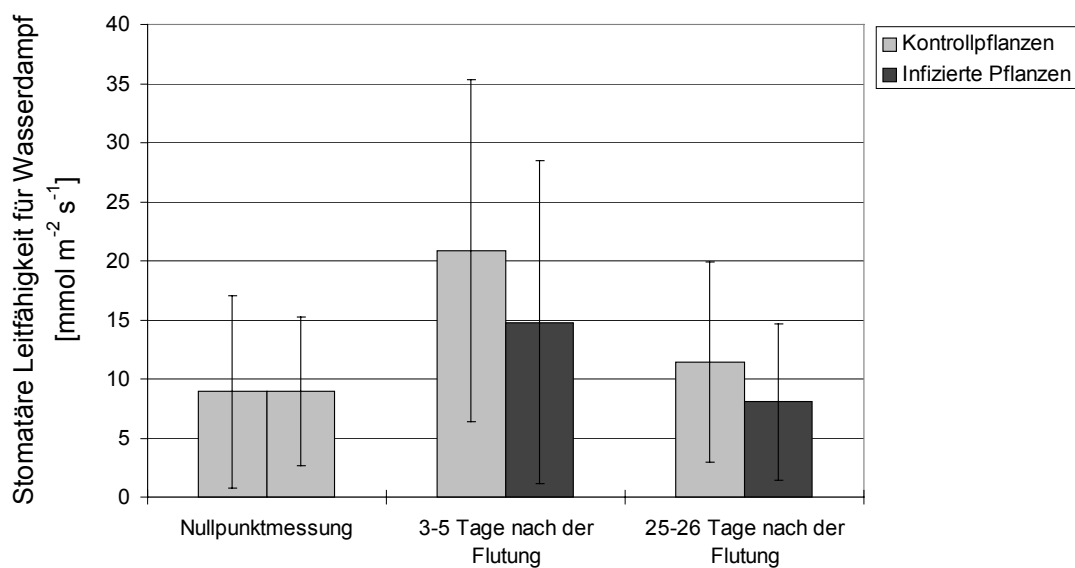
wobei pro Pflanze zwei Blätter gemessen wurden, im Mittel unterschiedlich, was anhand der Nullpunktmessung vor der Infektion bzw. Flutung deutlich wird. Die Mittelwerte betragen bei den Kontrollpflanzen  $2,78 \pm 1,26 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , bei den zu infizierenden Pflanzen  $2,24 \pm 1,20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Die Messung 3-5 Tage nach den Flutung ergab Netto-Photosyntheseraten auf insgesamt etwas höherem Niveau, die Relation der Gruppe infizierter Pflanzen mit  $3,15 \pm 1,58 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zu den Kontrollen mit  $3,90 \pm 1,75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  blieb aber in etwa gleich. Es ist zu beachten, daß die Flutung keinen negativen Effekt auf die Netto-Photosyntheserate der Kontrollpflanzen ausübt. Ein im Verhältnis ähnliches Bild bot sich 25-26 Tage nach der Infektion, dann wieder auf etwas niedrigerem Niveau, das etwa der Ausgangssituation entsprach. Es wurden Kontrollwerte von  $2,57 \pm 1,2 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und Werte von  $2,1 \pm 0,85 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  für kranke Pflanzen gemessen. Die Statistik zeigte, daß zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den Mittelwert-Paaren vorlagen.



**Abbildung 3.11.** Transpirationsrate von zweijährigen Eichen. Vergleich von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=9 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Eine ähnliche Situation wie bei der Netto-Photosyntheserate war auch bei der Transpirationsrate (Abbildung 3.11) zu beobachten. Zum Zeitpunkt der Nullpunktmessung ließen sich an Kontrollen mit  $0,30 \pm 0,28 \text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und zu

infizierenden Pflanzen mit  $0,29 \pm 0,22 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  im Mittel nahezu gleiche Werte messen. Nach der Flutung wurden Kontrollwerte von  $0,53 \pm 0,37 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  gemessen, das bedeutet eine leichte Steigerung der Transpirationsrate. Die infizierten Pflanzen wiesen eine Transpirationsrate von  $0,36 \pm 0,34 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  auf. Etwa 4 Wochen später lagen die Werte der Kontrollpflanzen bei  $0,27 \pm 0,20 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und die der infizierten Pflanzen bei  $0,20 \pm 0,17 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Sowohl 3-5 als auch 25-26 Tage nach der Flutung waren augenscheinlich geringe Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Transpirationsraten zu erkennen, diese ließen sich jedoch statistisch nicht fassen. Die verwendeten Pflanzen zeigten eine sehr große Variationsbreite in ihrer physiologischen Leistungsfähigkeit auf. Dies führte zu sehr großen Standardabweichungen, welche die Feststellung eines durch das Pathogen verursachten Effektes erschwerten.



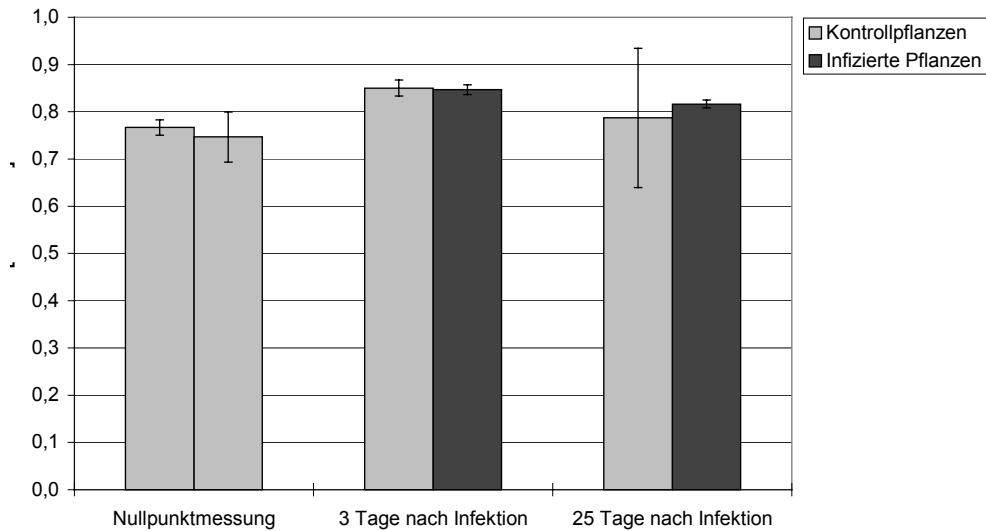
**Abbildung 3.12.** Stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf von zweijährigen Eichen. Vergleich von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=9 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Die stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.12*) verhielt sich parallel zu den oben dargestellten Transpirationsraten. Die zum Zeitpunkt der Nullpunktmessung nahezu identischen Mittelwerte der Kontrollstichprobe von

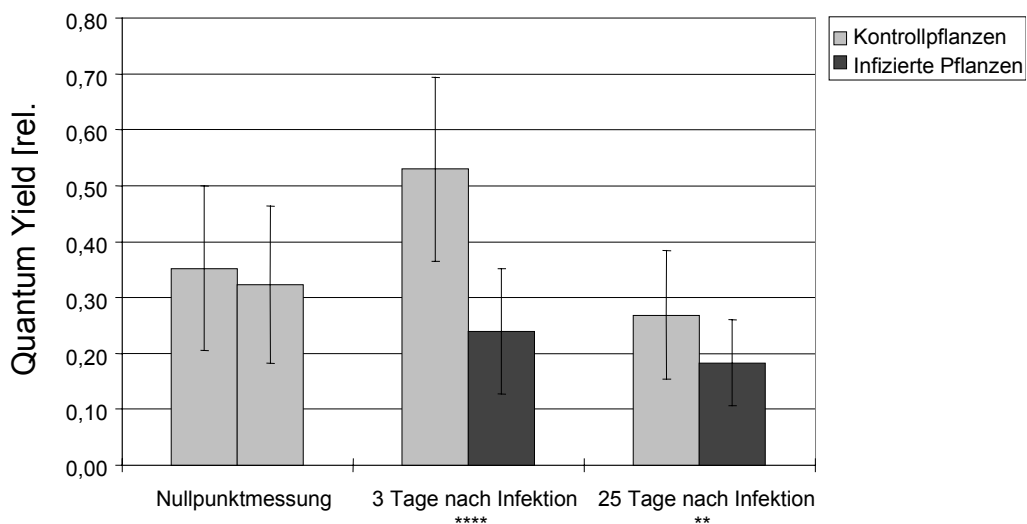
$8,90 \pm 8,16 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und der Stichprobe aus zu infizierenden Pflanzen von  $8,97 \pm 6,29 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  unterschieden sich nach der Flutung geringfügig voneinander und befanden sich insgesamt auf höherem Niveau. Es lagen Kontrollwerte von  $20,86 \pm 14,52 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  vor und für die infizierten Pflanzen ein Mittelwert von  $14,78 \pm 13,67 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Nach etwa 4 Wochen war die Situation ähnlich, aber wieder auf niedrigerem Niveau mit Kontrollwerten von  $11,46 \pm 8,48 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  und einem Mittelwert von  $8,07 \pm 6,62 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bei den infizierten Pflanzen. Statistisch ließen sich die geringen Unterschiede zwischen den Behandlungen nicht fassen. Wieder traten sehr große Standardabweichungen der Meßwerte auf.

Zusammenfassende Feststellungen: Dieser Versuchsansatz sollte zum einen die im Infektionsversuch 1998 gemachten Beobachtungen bestätigen und zum anderen die Frage klären, ob die Flutung die Physiologie der Eichen - auch der gesunden Pflanzen - beeinflußt. Es zeigte sich, daß die Flutung keinen negativen Effekt auf die gemessenen Größen Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.10*), Transpirationsrate (*Abbildung 3.11*) und stomatäre Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.12*) ausübt. An Kontrollpflanzen wurde sogar eine leichte Steigerung gemessen. Signifikante durch die Infektion bedingte Unterschiede konnten an diesen bereits etwas größeren Eichen in diesem Versuchsansatz nicht gemessen werden.

### 3.1.2.2.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen



**Abbildung 3.13.** Chlorophyllfluoreszenz von zweijährigen Eichen im Dunkeln. Vergleich von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=9 Pflanzen mit Standardabweichungen.



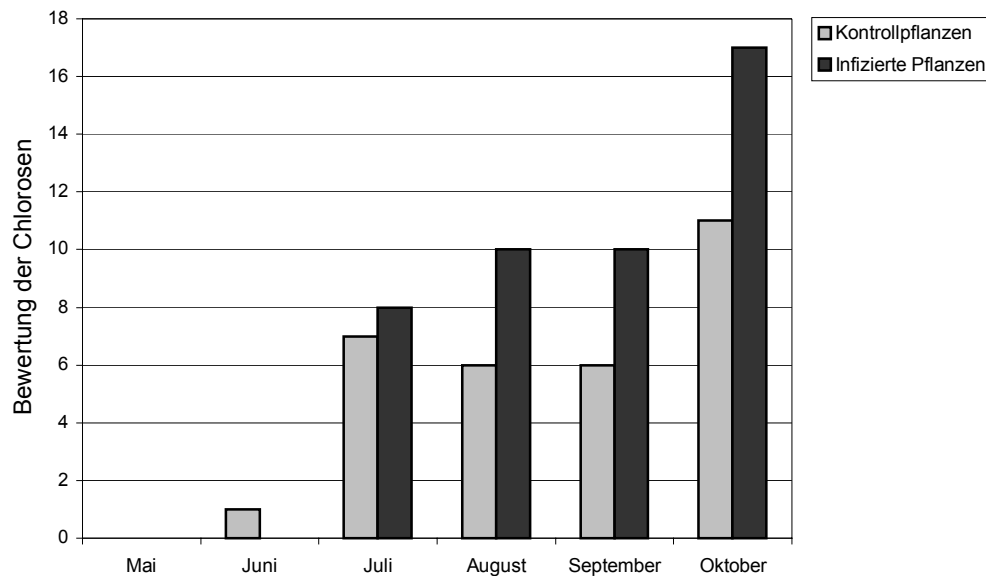
**Abbildung 3.14.** Chlorophyllfluoreszenz von zweijährigen Eichen im Licht ( $200\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Vergleich von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=9 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz an zweijährigen Eichen am Ende der Dunkelphase (*Abbildung 3.13*) ließ keinen Einfluß des Pathogens auf die Größe des Meßsignals erkennen. Zum Zeitpunkt der Nullpunktmessung lag noch keine Infektion vor. An Kontroll- und zu infizierenden Pflanzen wurden in etwa gleiche Yield-Werte gemessen. 3 Tage nach der Infektion bzw. Flutung und an dem weiteren Meßpunkt 25 Tage später ließen sich ebenfalls keine behandlungsspezifischen Unterschiede erkennen. Die PS II Quantenausbeute lag im gesamten Versuchszeitraum zwischen 0,7 und 0,9 rel. Units.

Die Messung der Chlorophyllfluoreszenz im Licht (*Abbildung 3.14*) wurde zu Beginn der Lichtphase nach 1h Vorinkubation im Licht durchgeführt. Bei der Nullpunktmessung vor der Infektion wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und zu infizierenden Pflanzen gemessen. Die Mittelwerte lagen mit  $0,35 \pm 0,15$  und  $0,32 \pm 0,14$  dicht beieinander. Nach der Infektion durch Flutung ergaben sich sehr deutliche behandlungsspezifische Differenzen im Verhalten der Chlorophyllfluoreszenz. Während die Werte der Kontrollpflanzen im Mittel auf  $0,53 \pm 0,16$  stiegen, fiel die Chlorophyllfluoreszenz bei den infizierten Pflanzen auf  $0,24 \pm 0,11$  stark ab. Es bestand ein signifikanter Unterschied mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,01%. Die nach 25 Tagen erhobenen Kontrollwerte von  $0,27 \pm 0,11$  und der Mittelwert von  $0,18 \pm 0,08$  für die infizierten Sämlinge ergaben keinen so deutlichen, aber dennoch signifikanten Unterschied zwischen gesunden und kranken Pflanzen auf einem Signifikanzniveau von 1%.

## 3.2 Weitere Blattuntersuchungen zum Inokulationsversuch 1998

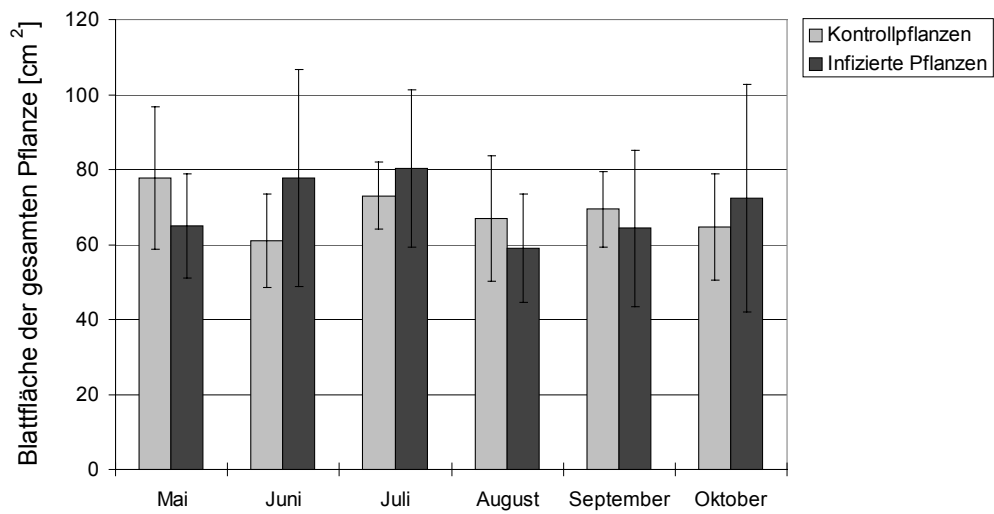
### 3.2.1 Zustand der Pflanzen zu den Meßzeitpunkten



**Abbildung 3.15.** Bonitur der im Infektionsversuch 1998 verwendeten Pflanzen. Entwicklung leichter Chlorosen während der Vegetationsperiode 1998. Mittelwerte von n=8 Pflanzen.

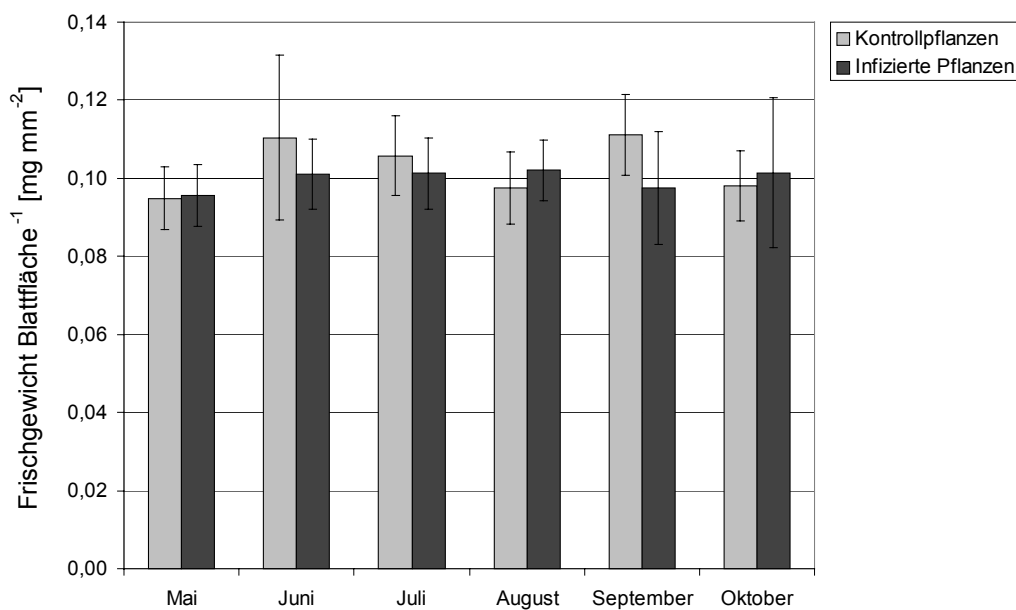
Das Aussehen der für die Messungen verwendeten Pflanzen wurde monatlich vor den Messungen bonitiert (*Abbildung 3.15*). Im Mai und Juni waren alle Blätter grün und es traten keine Chlorosen auf. Ab Juli entwickelten sich Chlorosen, wobei auch Kontrollpflanzen betroffen waren. Im Vergleich war eine schwache Verstärkung der Chlorosen von August bis Oktober infolge der Infektion zu erkennen. Nekrosen traten bis Juli nicht auf. Ab August entstanden an einigen wenigen Blättern kleine nekrotische Flecken, wobei hier kein Einfluss der Infektion zu erkennen war (*Abbildung zur Bonitur der Nekrosen nicht gezeigt*).

## 3.2.2 Frischgewichte der Blätter und Blattflächen



**Abbildung 3.16.** Blattflächen der gesamten Pflanzen. Für jeden Monat sind die Blattflächen von 8 Pflanzen gemittelt dargestellt. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

Die Summe der Flächen aller Blätter bewegte sich bei gesunden und infizierten Pflanzen im Mittel etwa zwischen 60 und 80cm<sup>2</sup>. Die Infektion beeinträchtigte die Blattgröße nicht (*Abbildung 3.16*).

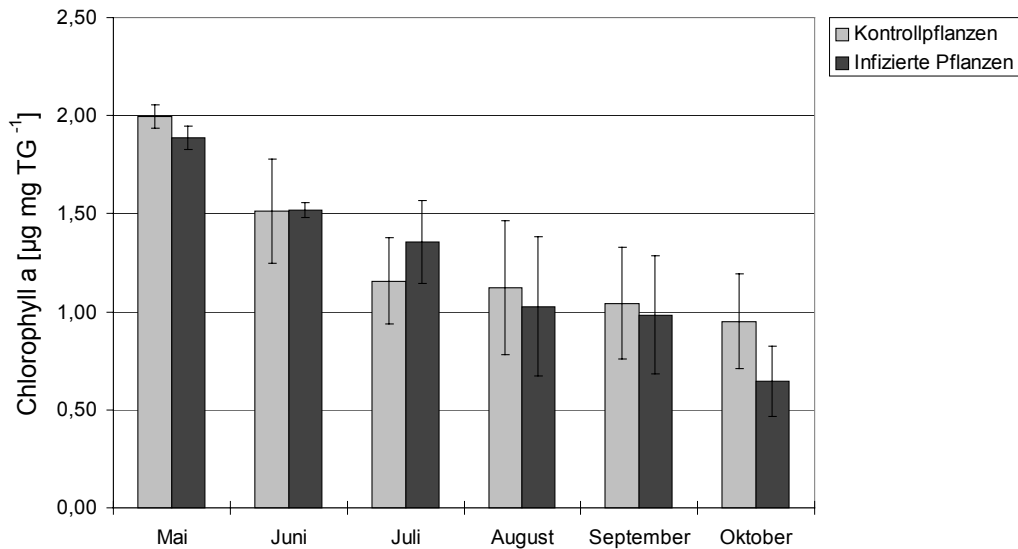


**Abbildung 3.17.** Die Frischgewichte aller Blätter einer Pflanzen bezogen auf die gesamte Blattfläche. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

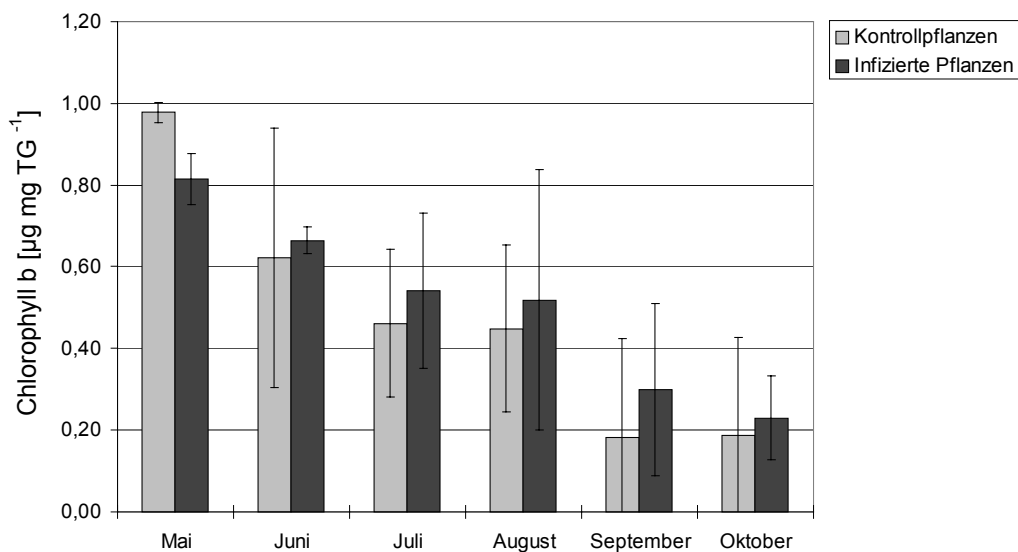
### 3 Ergebnisse

Das Frischgewicht der Blätter dividiert durch die Blattfläche ergab für Kontrollpflanzen und infizierte Eichensämlinge vergleichbare Werte. Ein durch die Infektion bedingter Effekt war nicht erkennbar (*Abbildung 3.17*).

#### 3.2.3 Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoidgehalten in den Blättern

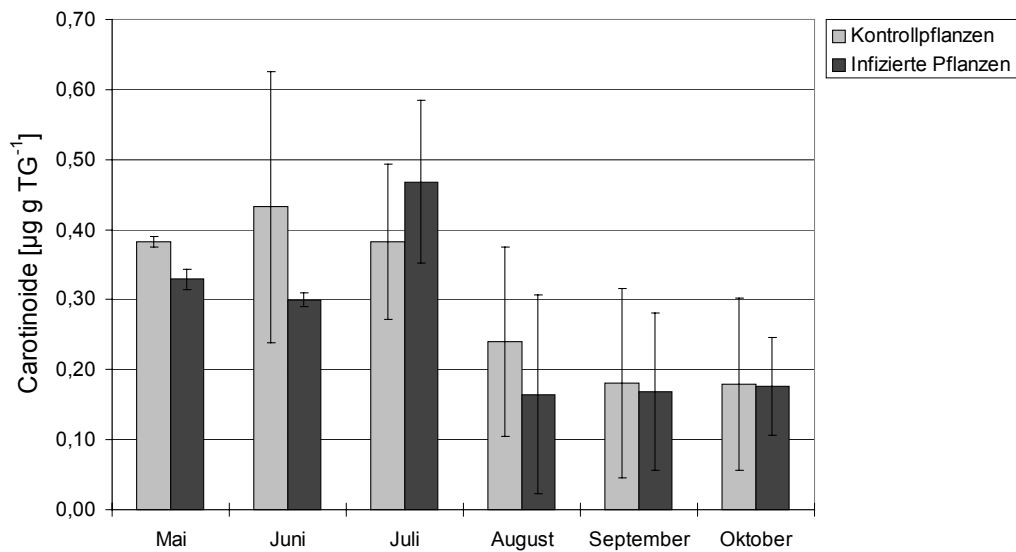


**Abbildung 3.18.** Gehalt an Chlorophyll a in den Blättern gesunder und mit *P. quercina* infizierter Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.



**Abbildung 3.19.** Gehalt an Chlorophyll b in den Blättern gesunder und mit *P. quercina* infizierter Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.



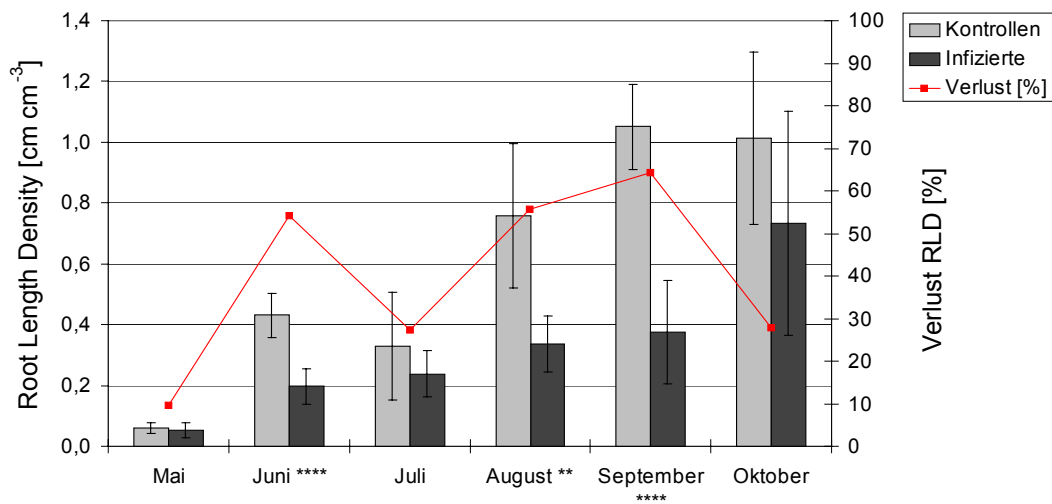


**Abbildung 3.20.** Gehalt an Carotinoiden in den Blättern gesunder und mit *P. quercina* infizierter Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

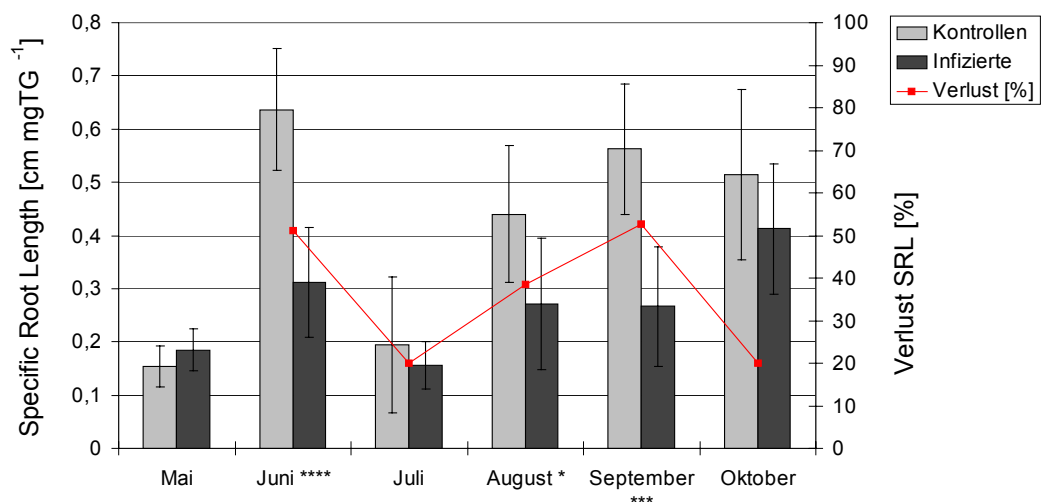
Die untersuchten Blattpigmente Chlorophyll a (*Abbildung 3.18*) und b (*Abbildung 3.19*), sowie Carotinoide (*Abbildung 3.20*) ließen während des Versuchszeitraumes von einer Vegetationsperiode keine Beeinträchtigung durch die Wurzelinfektion mit *P. quercina* erkennen. Abgesehen von einigen Schwankungen waren keine signifikanten Unterschiede zwischen gesunden Kontrollpflanzen und inokulierten Eichen zu messen. Auch die Berechnung der Chlorophyll a / Chlorophyll b-Rate, sowie der Chlorophyll / Carotinoide-Rate ergab keinen Zusammenhang mit der Infektion (*Abbildungen nicht gezeigt*). Allgemein nahm der Gehalt an Blattpigmenten gegen Ende der Vegetationsperiode ab.

### 3.3 Morphologische Untersuchung der infektionsbedingten Wurzelschäden aus dem Inokulationsversuch 1998

#### 3.3.1 Betrachtung der Schäden am Gesamtwurzelsystem

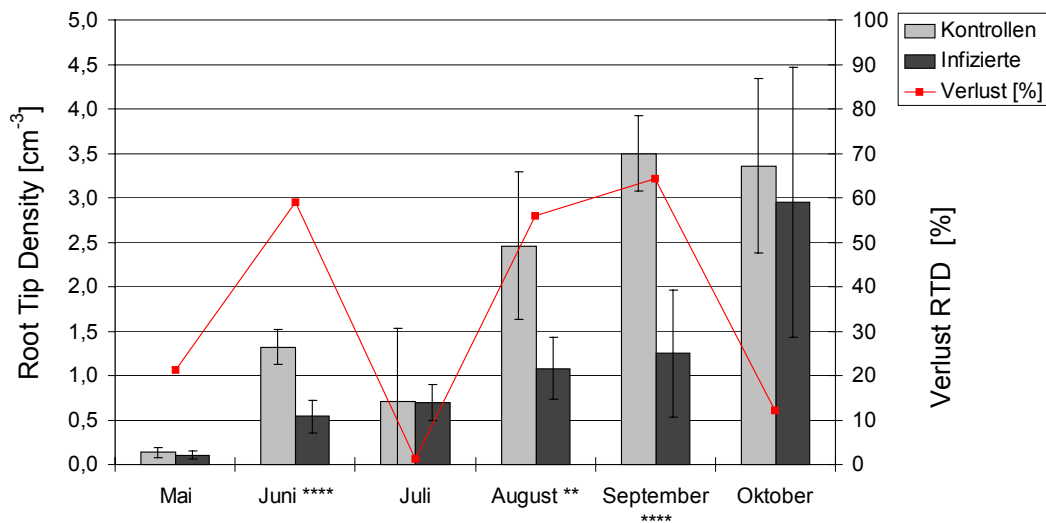


**Abbildung 3.21.** Root Length Density (RLD), entsprechend der Gesamt-Wurzellänge bezogen auf Volumeneinheit Substrat, bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.22.** Specific Root Length (SRL) bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

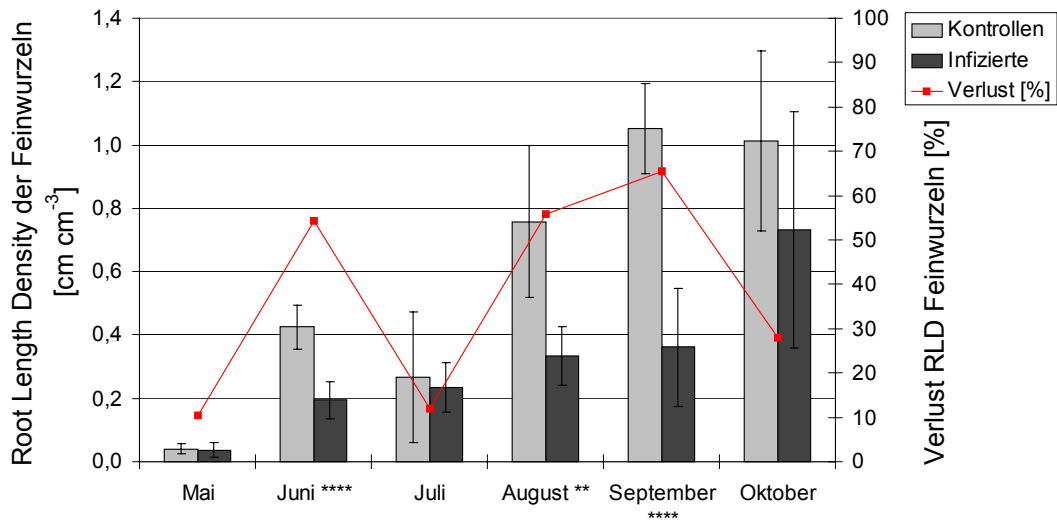
\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.23.** Root Tip Density (RTD), Anzahl Wurzelspitzen bezogen auf Volumeneinheit Substrat, bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen. \*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

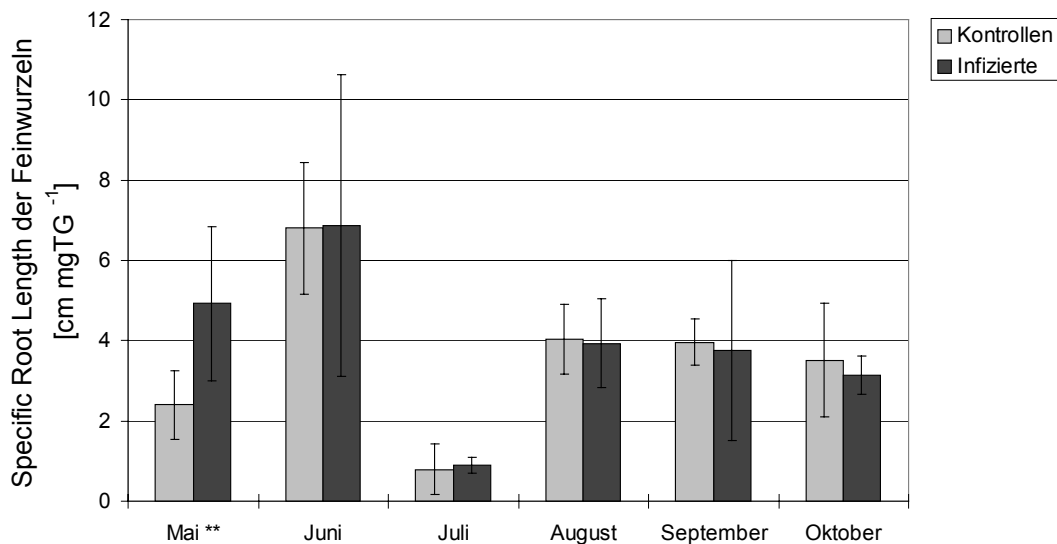
Die Schäden am Gesamtwurzelsystem wurden durch die Größen Root Length Density RLD (Abbildung 3.21), Specific Root Length SRL (Abbildung 3.22) und Root Tip Density RTD (Abbildung 3.23) charakterisiert. Bei allen drei Größen wurden im Mai noch keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungen festgestellt. Ab Juni entwickelten sich behandlungsbedingte Unterschiede. Eine Schädigung des Wurzelsystems durch den Pilz wurde anhand einer verminderten Gesamtwurzellänge und damit verbunden durch die Reduktion der Anzahl von Wurzelspitzen deutlich. Abgesehen vom Einbruch aller Werte im Juli konnte bis einschließlich September ein signifikanter Unterschied zur Kontrollbehandlung festgestellt werden. Im Oktober erholten sich die infizierten Pflanzen wieder. Die Unterschiede waren nicht mehr signifikant.

3.3.2 Schäden am Feinwurzelsystem (0-1,5mm Durchmesser)



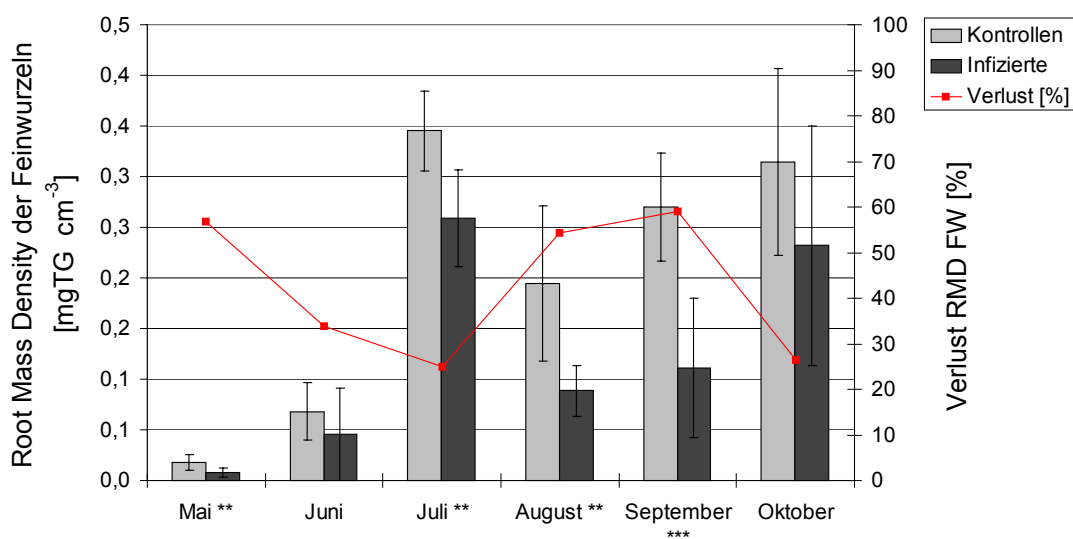
**Abbildung 3.24.** Root Length Density (RLD) der Feinwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.25.** Specific Root Length (SRL) der Feinwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.26.** Root Mass Density der Feinwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Wie aus dem Vergleich der *Abbildungen* 3.21 (RLD) und 3.24 (RLD der Feinwurzeln) hervorgeht, sind die Unterschiede in der gesamten Wurzellänge auf einen Verlust an Feinwurzeln zurückzuführen. Ausgehend von ähnlichen Werten bei gesunden und kranken Pflanzen zu Beginn der Vegetationsperiode im Mai war 5 Wochen später bereits eine deutliche Reduktion des Wurzellängenwachstums zu sehen. Bis September wurden auch hier signifikante Schäden sichtbar – mit Ausnahme des Einbruchs der Meßgrößen im Juli. Im Oktober wuchsen die Feinwurzeln der infizierten Pflanzen nach und näherten sich damit den Kontrollpflanzen an.

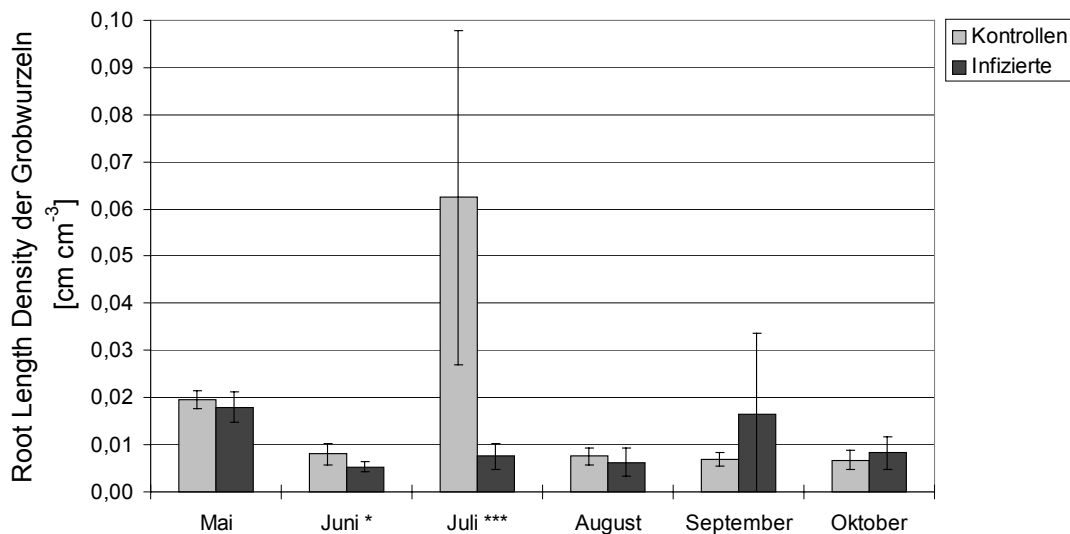
Bezogen auf das Trockengewicht zeigten sich keine behandlungsbedingten Unterschiede der Feinwurzellänge (Specific Root Length (SRL) der Feinwurzeln, *Abbildung* 3.25). Allerdings war festzustellen, daß der Stichprobenumfang von 8 Pflanzen an sich signifikante Unterschiede bei gleicher Behandlung zuließ, wie aus den Meßwerten im Monat Mai ersichtlich ist. Hier traten bei den infizierten Pflanzen signifikant höhere Werte für die SRL der Feinwurzeln auf.

Der Bezug der Trockengewichte der Feinwurzeln auf Volumeneinheit Substrat, Root Mass Density RMD, machte erneut den infektionsbedingten Schaden am Feinwurzelsystem deutlich (*Abbildung* 3.26). Während des gesamten Versuchs-

zeitraumes waren an infizierten Pflanzen Verluste von 25-59% zu beobachten. Im Oktober nahm die RMD der Feinwurzeln auch bei den infizierten Pflanzen zu.

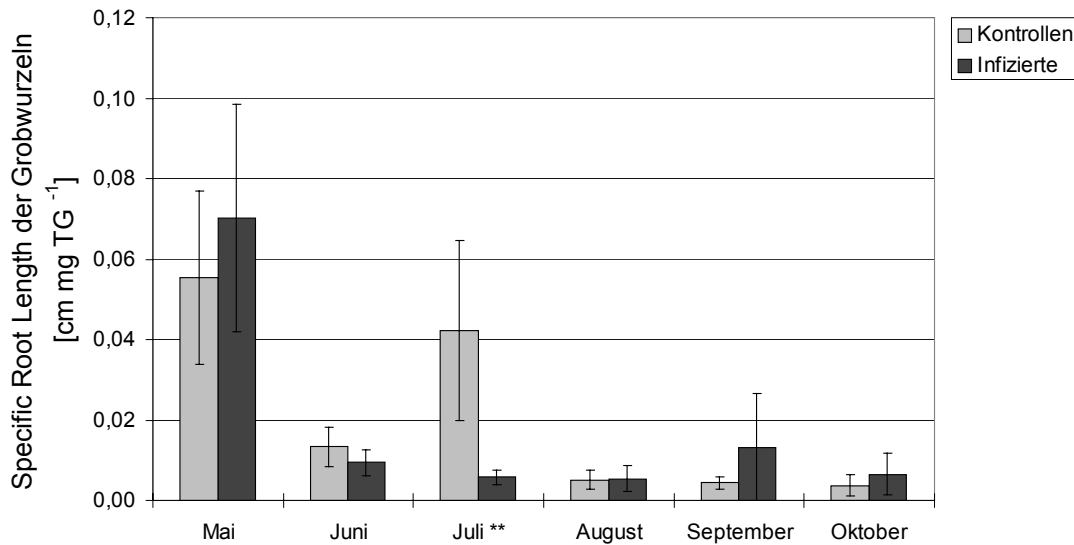
Anmerkung: Die Wurzelspitzen stellten die Enden der Feinwurzeln dar. Die im vorigen Kapitel für das gesamte Wurzelsystem berechnete Root Tip Density (RTD) stellt somit auch die RTD für die Feinwurzeln dar. Möglich wäre auch die Berechnung der RTD der Feinwurzeln bezogen auf das Gewicht der Feinwurzeln (Root Mass Density (RMD) der Feinwurzeln), was einer Specific Root Tip Density (SRTD) entspräche. In unserem Falle brachte die Berechnung der SRTD jedoch keine neuen Informationen (Abbildung nicht gezeigt). Wie aus dem Vergleich der *Abbildungen* 3.23 (RTD) und 3.26 (RMD der Feinwurzeln) hervorgeht, bestehen z.T. Korrelationen zwischen diesen beiden Parametern. Eine Division der RTD durch die RMD der Feinwurzeln führte daher zu keinen diskutierbaren Unterschieden zwischen Kontrollen und infizierten Pflanzen.

### 3.3.3 Schäden am Grobwurzelsystem (>1,5 – 4,5mm Durchmesser)



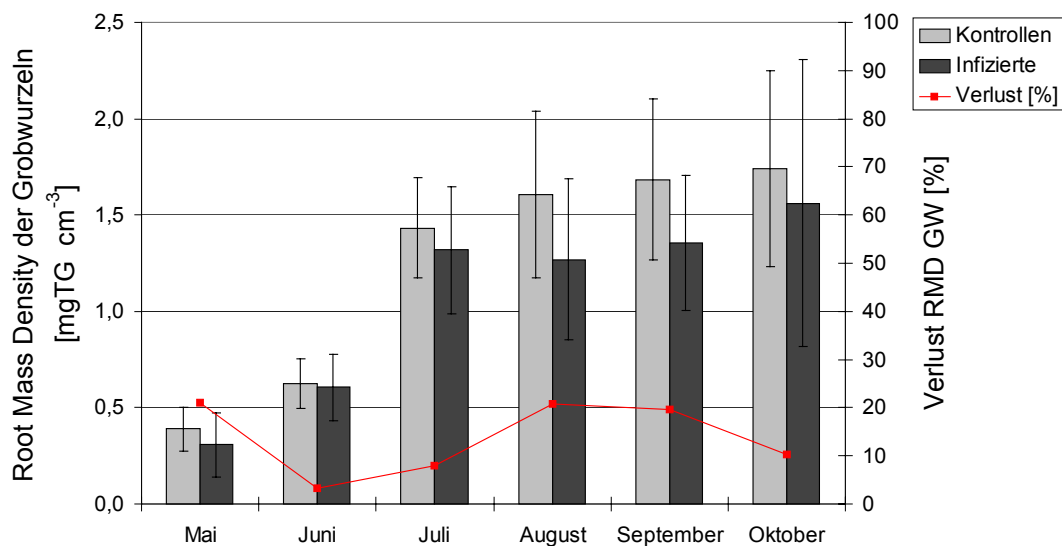
**Abbildung 3.27.** Root Length Density (RLD) der Grobwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.28.** Specific Root Length der Grobwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$



**Abbildung 3.29.** Root Mass Density der Grobwurzeln bei Kontrollpflanzen und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen. Mittelwerte von n=8 Pflanzen mit Standardabweichungen.

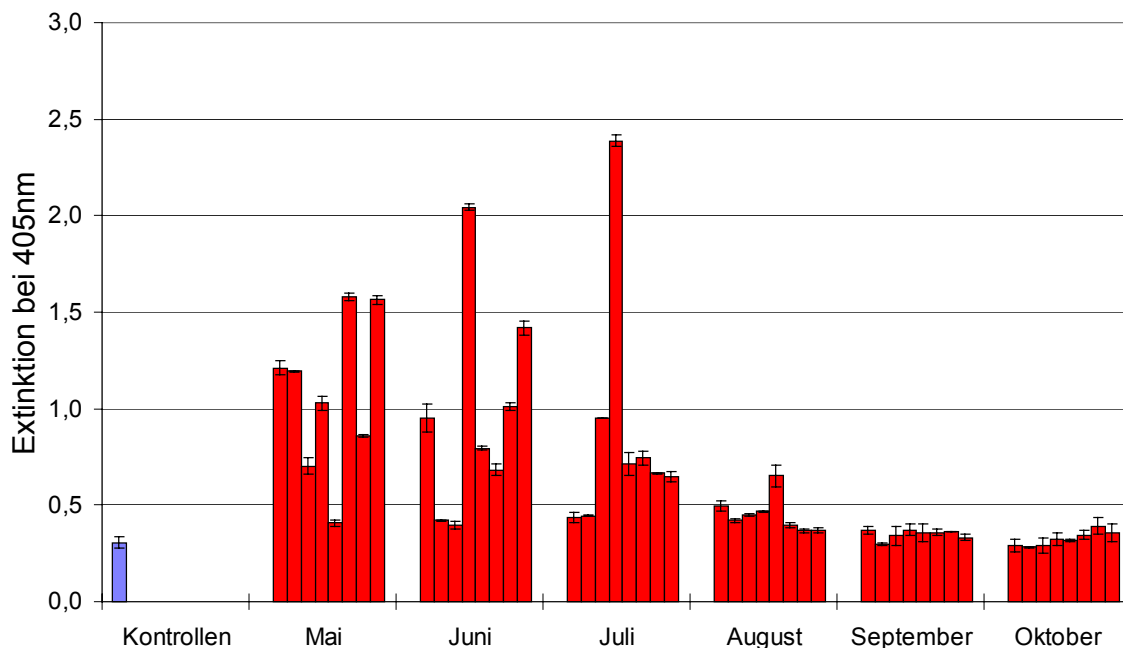
\*  $\alpha \leq 0,05$  \*\*  $\alpha \leq 0,01$  \*\*\*  $\alpha \leq 0,001$  \*\*\*\*  $\alpha \leq 0,0001$

Nach der statistischen Auswertung wurde deutlich, daß die durch *Phytophthora quercina* verursachten Schäden am Grobwurzelsystem weitaus geringer waren als an den Feinwurzeln. Die RLD der Grobwurzeln (*Abbildung 3.27*) bewegte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von Mai bis Oktober um 0,01 bis 0,02cm·cm<sup>-3</sup>. Eine Ausnahme bildete die Meßreihe im Juli mit extrem hohen Werten für die Grobwurzellänge der Kontrollpflanzen. Die Wurzelsysteme der Kontrollpflanzen erwiesen sich in diesem Monat als sehr heterogen, was in einer hohen Standardabweichung resultierte. Die SRL der Grobwurzeln (*Abbildung 3.28*) ergab die höchsten Werte im Mai. Zu diesem Zeitpunkt waren viele junge Grobwurzeln vorhanden, die eine relativ geringe Trockenmasse hatten. Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollbehandlung lag nur im Juli vor. Die Kontrollpflanzen wiesen in diesem Monat ausnehmend lange Grobwurzeln auf, die ein relativ geringes Trockengewicht ergaben. Pro Volumeneinheit Substrat, dargestellt in *Abbildung 3.29* als RMD, wurden bereits zu Versuchsbeginn im Mai infektionsbedingt bis zu 21% weniger Grobwurzeln ausgebildet, bzw. etwa 20% weniger im August und September. Im Juni lag der Verlust an RMD bei den Grobwurzeln nur bei 3%. Zu Versuchsende im Oktober war bei den Grobwurzeln noch ein Verlust an RMD von 10% vorhanden. Im allgemeinen war über die Vegetationsperiode gesehen ein Anstieg der RMD der Grobwurzeln bei beiden Behandlungen zu bemerken, der dem erwarteten Dickenwachstum entsprach.



### 3.4 Immunologische Untersuchungen

#### 3.4.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) zum Nachweis von *Phytophthora quercina*

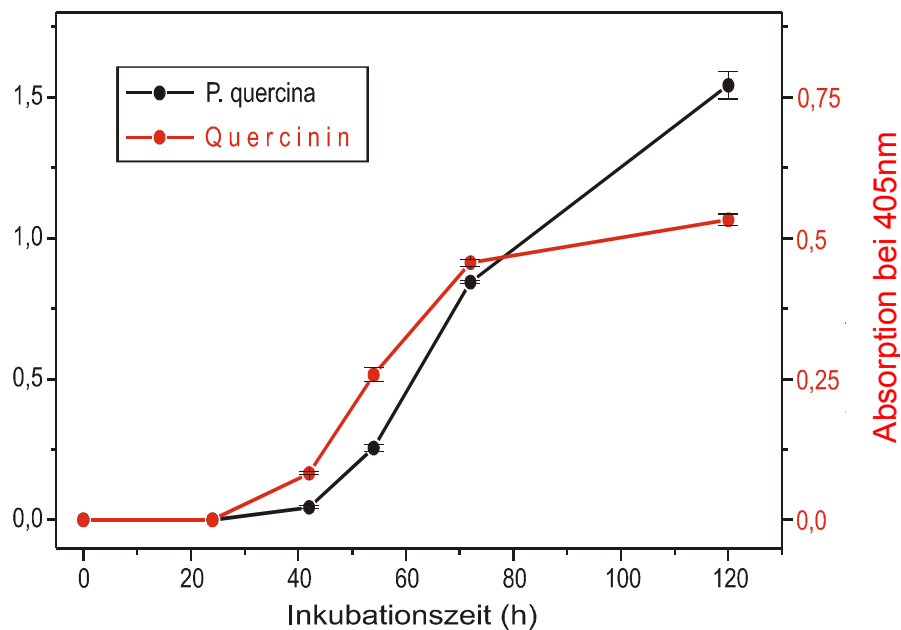


**Abbildung 3.30.** Nachweis von *P. quercina* in infizierten Feinwurzelpflanzen mittels eines Doppel-Antibody-Sandwich ELISA. Es handelt sich um die Wurzeln aus dem Infektionsversuch 1998, d.h. um dieselben Pflanzen, an denen auch die unter 3.1 und 3.3 dargestellten physiologischen und morphologischen Untersuchungen durchgeführt worden sind. Die Extinktionswerte der Kontrollwurzeln wurden über den gesamten Versuchszeitraum gemittelt (blauer Balken). Bei den infizierten Pflanzen sind die Extinktionswerte von pro Monat 8 Pflanzen einzeln dargestellt (rote Balken). Dargestellt sind die Extinktionswerte einer Doppelbestimmung mit Standardabweichungen.

*P. quercina* war von Mai bis Juli in den Feinwurzeln nachzuweisen (*Abbildung 3.30*). Die einzelnen Pflanzen ergaben sehr unterschiedliche Extinktionswerte. Deshalb wurde hier auch von einer monatlichen Mittelung der Meßergebnisse Abstand genommen. In den Monaten August bis Oktober war *P. quercina* nur in sehr geringem Ausmaß bzw. nicht mehr zu detektieren. Die Extinktionswerte der Kontrollwurzelpflanzen waren über den gesamten Versuchszeitraum ähnlich und wurden daher gemittelt. In *Abbildung 3.30* sind sie als ein Balken dargestellt. In den

gesondert untersuchten Grobwurzelproben konnte *P. quercina* nicht gefunden werden (Abbildung nicht gezeigt).

### 3.4.2 Immunologischer Nachweis von Quercinin in infizierten Eichenwurzeln



**Abbildung 3.31.** Immunologischer Nachweis von *P. quercina* und Quercinin in infizierten Eichenwurzeln mittels eines indirekten ELISA. 40h nach der Inokulation war Quercinin in den Wurzeln nachzuweisen. Parallel zur steigenden Elicitinmenge nahm auch die Nachweisbarkeit von *P. quercina* in den Wurzelproben zu.

Nach 40 Stunden konnte Quercinin in den Wurzeln infizierter Eichesamlinge über ELISA nachgewiesen werden (Abbildung 3.31). Zu diesem Zeitpunkt lag die Nachweisbarkeit des Pathogens erst knapp über der Nachweisgrenze. Von da an stieg die Menge Myzel in den Wurzelproben an. Am Versuchsende, 5 Tage nach der Inokulation, wurde die gröſste Menge an Pilz detektiert. Die Quercininmenge näherte sich ca. 70h nach der Infektion ihrem Maximum und stieg bis zum fünften Inkubationstag nur mehr leicht an (Abbildung 3.31).

## 3.5 Biochemische Abwehrreaktionen auf Pathogenbefall in der Wurzel

### 3.5.1 Proteinbestimmungen

3.5.1.1 Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen, basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen, saure Chitinasen, Osmotin PR-S und Osmotin pep2

Probe	mg TS in 6 Ansätzen	mg TS /ml	In Assay eingesetztes Volumen [ $\mu$ l]	E bei 595nm			MW <sub>Nullw.</sub>				
K	305,9	50,98	50	0,6700	0,6880	0,7000					
P	298,6	49,77	50	0,7700	0,7768	0,7903					
BSA				0,9541	0,9236	0,9322					
Nullwert				0,5571	0,5620	0,5627	0,5606				
Probe	E - Nullwert			MW <sub>BSA</sub>	$\mu$ g Protein /50 $\mu$ l Probe						
K	0,1094	0,1274	0,1394		2,91	3,39	3,71				
P	0,2094	0,2162	0,2297		5,57	5,75	6,11				
BSA	0,3935	0,3630	0,3716	0,3760	10	10	10				
Probe	$\mu$ g Protein/ml			MW <sub><math>\mu</math>g/ml</sub>	sd	$\mu$ g Protein/mg TS			MW ( $\mu$ g Protein/ mg TS)	sd	
K	58,19	67,76	74,14	66,70	6,56	1,14	1,33	1,45	1,31	0,13	
P	111,37	114,99	122,17	116,18	4,49	2,18	2,26	2,40	2,28	0,09	

**Tabelle 3.1.** Proteinbestimmung von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm junger Eichenwurzeln verwendet.

### 3.5.1.2 Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzbereichen markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen

Probe	mg TS in 3 Ansätzen	mg TS /ml	In Assay eingesetztes Volumen [µl]	E bei 595nm			MW <sub>Nullw.</sub>			
K 0-2	149,5	49,8	50	0,6759	0,6851	0,7148				
K 3-5	151,8	50,6	50	0,6497	0,6708	0,6794				
K 6-8	142,1	47,4	50	0,6725	0,6623	0,6630				
K 9-11	143,9	48,0	50	0,6369	0,6809	0,6866				
K 12-14	150,8	50,3	50	0,6028	0,6078	0,6234				
P 0-2	146,5	48,8	50	0,6493	0,6532	0,6714				
P 3-5	148,5	49,5	50	0,8231	0,8181	0,8429				
P 6-8	147,9	49,3	50	0,9014	0,8981	0,8880				
P 9-11	152,2	50,7	50	0,9069	0,8956	0,9082				
P 12-14	155,5	51,8	50	0,8967	0,9180	0,9041				
BSA				1,0855	1,0878	1,0788				
Nullwert				0,5793	0,5742	0,5695	0,5743			

Probe	E - Nullwert			MW <sub>BSA</sub>	µg Protein /50µl Probe		
K 0-2	0,1016	0,1108	0,1405		0,01	0,01	0,02
K 3-5	0,0754	0,0965	0,1051		0,01	0,03	0,03
K 6-8	0,0982	0,0880	0,0887		0,03	0,03	0,06
K 9-11	0,0626	0,1066	0,1123		0,07	0,14	0,17
K 12-14	0,0285	0,0335	0,0491		0,18	0,20	0,33
P 0-2	0,0750	0,0789	0,0971		0,60	0,66	0,76
P 3-5	0,2488	0,2438	0,2686		3,18	3,01	3,45
P 6-8	0,3271	0,3238	0,3137		4,06	4,28	3,98
P 9-11	0,3326	0,3213	0,3339		6,52	6,30	6,55
P 12-14	0,3224	0,3437	0,3298		6,32	6,74	6,47
BSA	0,5112	0,5135	0,5045	0,5097	10	10	10

Probe	µg Protein/ml			MW <sub>µg/ml</sub>	sd	µg Protein/mg TS			MW (µg Protein/ mg TS)	sd
K 0-2	0,14	0,15	0,32	0,20	0,08	0,003	0,003	0,006	0,004	0,002
K 3-5	0,22	0,52	0,69	0,48	0,20	0,004	0,010	0,014	0,009	0,004
K 6-8	0,69	0,68	1,16	0,84	0,22	0,014	0,014	0,024	0,018	0,005
K 9-11	1,47	2,77	3,34	2,53	0,78	0,031	0,058	0,070	0,053	0,016
K 12-14	3,56	3,96	6,65	4,72	1,37	0,071	0,079	0,132	0,094	0,027
P 0-2	11,94	13,25	15,16	13,45	1,32	0,244	0,271	0,311	0,275	0,027
P 3-5	63,69	60,29	69,03	64,34	3,60	1,287	1,218	1,395	1,300	0,073
P 6-8	81,17	85,66	79,63	82,15	2,56	1,646	1,737	1,615	1,666	0,052
P 9-11	130,50	126,06	131,01	129,19	2,22	2,572	2,485	2,582	2,546	0,044
P 12-14	126,49	134,85	129,40	130,25	3,46	2,440	2,602	2,496	2,513	0,067

**Tabelle 3.2.** Proteinbestimmung von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation. Als Probenmaterial wurden die unteren 4cm junger Eichenwurzeln verwendet. In diesem Bereich war die Infektion gesetzt worden. An jedem Tag wurden die Wurzeln von je 40 Pflanzen gepoolt. Je 3 Tage wurden in einer Probe zusammengefaßt. Diese sind dargestellt als Proben der Tage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11, 12-14.

### 3.5.1.3 Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzeln oberhalb der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische Chitinasen

Probe	mg TS	mg TS	In Assay eingesetztes Volumen [µl]	E bei 595nm			MW <sub>Nullw.</sub>
	in 3 Ansätzen	/ml					
K 0-2	155,6	51,9	50	0,7573	0,7502	0,7754	
K 3-5	152,4	50,8	50	0,7137	0,7096	0,7222	
K 6-8	150,5	50,2	50	0,7239	0,7081	0,7195	
K 9-11	156,0	52,0	50	0,7122	0,6923	0,7068	
K 12-14	155,0	51,7	50	0,7189	0,7137	0,7280	
P 0-2	150,2	50,1	50	0,7151	0,7447	0,7171	
P 3-5	152,8	50,9	50	0,7282	0,7199	0,7530	
P 6-8	159,3	53,1	50	0,7772	0,7496	0,7638	
P 9-11	149,1	49,7	50	0,7444	0,7342	0,7192	
P 12-14	156,7	52,2	50	0,7245	0,7396	0,7530	
BSA				0,9823	0,9667	1,0184	
Nullwert				0,5734	0,5504	0,5677	0,5638

Probe	E - Nullwert		MW <sub>BSA</sub>	µg Protein /50µl Probe		
K 0-2	0,1935	0,1864	0,2116	0,10	0,08	0,11
K 3-5	0,1499	0,1458	0,1584	0,08	0,08	0,09
K 6-8	0,1601	0,1443	0,1557	0,23	0,18	0,23
K 9-11	0,1484	0,1285	0,1430	0,24	0,23	0,25
K 12-14	0,1551	0,1499	0,1642	0,60	0,52	0,63
P 0-2	0,1513	0,1809	0,1533	0,67	0,77	0,75
P 3-5	0,1644	0,1561	0,1892	1,64	1,47	1,62
P 6-8	0,2134	0,1858	0,2000	1,90	1,81	2,09
P 9-11	0,1806	0,1704	0,1554	4,25	4,01	3,65
P 12-14	0,1607	0,1758	0,1892	3,78	4,13	4,45
BSA	0,4185	0,4029	0,4546	0,4253	10	10

Probe	µg Protein/ml			MW <sub>µg/ml</sub>	sd	µg Protein/mg TS			MW (µg Protein/ mg TS)	sd
K 0-2	2,05	1,54	2,28	1,96	0,31	0,039	0,030	0,044	0,038	0,006
K 3-5	1,66	1,59	1,89	1,71	0,13	0,033	0,031	0,037	0,034	0,003
K 6-8	4,50	3,51	4,59	4,20	0,49	0,090	0,070	0,092	0,084	0,010
K 9-11	4,70	4,64	5,07	4,80	0,19	0,090	0,089	0,097	0,092	0,004
K 12-14	11,97	10,36	12,54	11,62	0,92	0,232	0,201	0,243	0,225	0,018
P 0-2	13,48	15,35	15,07	14,64	0,82	0,269	0,307	0,301	0,292	0,016
P 3-5	32,82	29,40	32,50	31,57	1,54	0,644	0,577	0,638	0,620	0,030
P 6-8	37,90	36,10	41,83	38,61	2,39	0,714	0,680	0,788	0,727	0,045
P 9-11	84,91	80,12	73,06	79,36	4,87	1,709	1,612	1,470	1,597	0,098
P 12-14	75,55	82,66	88,96	82,39	5,47	1,446	1,582	1,703	1,577	0,105

**Tabelle 3.3.** Proteinbestimmung von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation. Als Probenmaterial wurden die oberen 4cm junger Eichenwurzeln verwendet. Der infizierte Wurzelspitzenbereich ist in dieser Probe nicht enthalten. An jedem Tag wurden die Wurzeln von je 40 Pflanzen gepoolt. Je 3 Tage wurden in einer Probe zusammengefaßt. Diese sind dargestellt als Proben der Tage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11, 12-14.

### 3.5.1.4 Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzelbereichen markiert mit Antikörpern gegen basische $\beta$ -1,3-Glucanasen

Probe	mg TS in 3 Ansätzen	mg TS /ml	In Assay eingesetztes Volumen [ $\mu$ l]	E bei 595nm			MW <sub>Nullw.</sub>
K 0-2	147,0	49,0	50	0,7073	0,7044	0,7007	
K 3-5	152,0	50,7	50	0,6839	0,6960	0,6924	
K 6-8	158,4	52,8	50	0,6921	0,6715	0,6773	
K 9-11	157,4	52,5	50	0,7126	0,7142	0,6996	
K 12-14	147,2	49,1	50	0,7195	0,7229	0,7006	
P 0-2	153,8	51,3	50	0,7185	0,7177	0,7162	
P 3-5	153,4	51,1	50	0,8286	0,8568	0,8597	
P 6-8	157,2	52,4	50	0,9377	0,9555	0,8526	
P 9-11	160,0	53,3	50	0,9287	0,8282	0,8494	
P 12-14	164,6	54,9	50	0,9656	0,8754	0,8489	
BSA				0,8908	0,8357	0,9538	
Nullwert				0,5724	0,5645	0,5625	0,5665

Probe	E - Nullwert			MW <sub>BSA</sub>	$\mu$ g Protein /50 $\mu$ l Probe		
K 0-2	0,1408	0,1379	0,1342		0,69	0,46	0,44
K 3-5	0,1174	0,1295	0,1259		1,03	0,93	0,54
K 6-8	0,1256	0,1050	0,1108		1,60	1,09	1,08
K 9-11	0,1461	0,1477	0,1331		2,88	2,35	1,41
K 12-14	0,1530	0,1564	0,1341		4,16	3,40	3,18
P 0-2	0,1520	0,1512	0,1497		6,44	5,20	3,46
P 3-5	0,2621	0,2903	0,2932		8,88	7,11	7,76
P 6-8	0,3712	0,3890	0,2861		13,86	11,24	7,56
P 9-11	0,3622	0,2617	0,2829		11,08	8,00	8,65
P 12-14	0,3991	0,3089	0,2824		12,21	9,45	8,64
BSA	0,3243	0,2692	0,3873	0,3270	10	10	10

Probe	$\mu$ g Protein/ml			MW <sub><math>\mu</math>g/ml</sub>	sd	$\mu$ g Protein/mg TS			MW ( $\mu$ g Protein/ mg TS)	sd
K 0-2	13,76	9,22	8,86	10,61	2,23	0,281	0,188	0,181	0,217	0,046
K 3-5	20,69	18,62	10,86	16,72	4,23	0,408	0,367	0,214	0,330	0,084
K 6-8	31,95	21,85	21,58	25,13	4,82	0,605	0,414	0,409	0,476	0,091
K 9-11	57,61	46,99	28,19	44,26	12,16	1,098	0,896	0,537	0,844	0,232
K 12-14	83,14	68,02	63,67	71,61	8,34	1,694	1,386	1,298	1,459	0,170
P 0-2	128,89	104,00	69,23	100,71	24,47	2,514	2,029	1,350	1,964	0,477
P 3-5	177,64	142,16	155,21	158,34	14,65	3,474	2,780	3,035	3,097	0,287
P 6-8	277,20	224,84	151,18	217,74	51,69	5,290	4,291	2,885	4,155	0,986
P 9-11	221,57	160,10	173,07	184,91	26,46	4,154	3,002	3,245	3,467	0,496
P 12-14	244,14	188,97	172,76	201,96	30,56	4,450	3,444	3,149	3,681	0,557

**Tabelle 3.4.** Proteinbestimmung von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation. Als Probenmaterial wurden die unteren 4cm junger Eichenwurzeln verwendet. In diesem Bereich war die Infektion gesetzt worden. An jedem Tag wurden die Wurzeln von je 40 Pflanzen gepoolt. Je 3 Tage wurden in einer Probe zusammengefaßt. Diese sind dargestellt als Proben der Tage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11, 12-14.

### 3.5.1.5 Proteinbestimmung für Western-Blots von nicht infizierten und infizierten Wurzeln oberhalb der Infektionsstelle markiert mit Antikörpern gegen basische $\beta$ -1,3-Glucanasen

Probe	mg TS in 3 Ansätzen	mg TS /ml	In Assay eingesetztes Volumen [ $\mu$ l]	E bei 595nm			MW <sub>Nullw.</sub>			
K 0-2	155,6	51,9	50	0,7798	0,7488	0,7420				
K 3-5	152,0	50,7	50	0,7187	0,7021	0,6964				
K 6-8	152,4	50,8	50	0,7373	0,7147	0,7415				
K 9-11	148,0	49,3	50	0,6290	0,6790	0,6904				
K 12-14	154,3	51,4	50	0,7724	0,7407	0,7838				
P 0-2	149,2	49,7	50	0,7406	0,7469	0,7648				
P 3-5	160,0	53,3	50	0,7837	0,7938	0,7925				
P 6-8	160,2	53,4	50	0,8113	0,7759	0,7821				
P 9-11	156,9	52,3	50	0,7473	0,7286	0,7796				
P 12-14	154,2	51,4	50	0,7601	0,7436	0,7283				
BSA				0,9996	0,9900	1,0077				
Nullwert				0,5889	0,5239	0,5755	0,5628			

Probe	E - Nullwert			MW <sub>BSA</sub>	$\mu$ g Protein /50 $\mu$ l Probe		
K 0-2	0,2170	0,1860	0,1792		0,20	0,12	0,22
K 3-5	0,1559	0,1393	0,1336		0,06	0,07	0,08
K 6-8	0,1745	0,1519	0,1787		0,41	0,29	0,54
K 9-11	0,0662	0,1162	0,1276		0,16	0,23	0,26
K 12-14	0,2096	0,1779	0,2210		1,03	0,82	1,33
P 0-2	0,1778	0,1841	0,2020		1,05	0,85	0,88
P 3-5	0,2209	0,2310	0,2297		2,14	2,01	2,62
P 6-8	0,2485	0,2131	0,2193		2,58	2,02	1,91
P 9-11	0,1845	0,1658	0,2168		4,23	3,80	4,97
P 12-14	0,1973	0,1808	0,1655		4,52	4,14	3,79
BSA	0,4368	0,4272	0,4449	0,4363	10	10	10

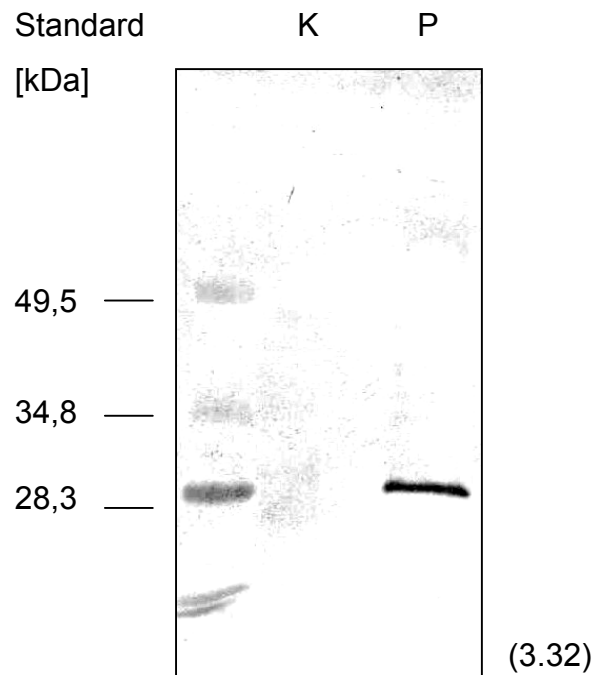
  

Probe	$\mu$ g Protein/ml			MW <sub><math>\mu</math>g/ml</sub>	sd	$\mu$ g Protein/mg TS			MW ( $\mu$ g Protein/ mg TS)	sd
K 0-2	4,09	2,44	4,46	3,66	0,88	0,079	0,047	0,086	0,071	0,017
K 3-5	1,14	1,45	1,58	1,39	0,19	0,022	0,029	0,031	0,027	0,004
K 6-8	8,23	5,71	10,86	8,27	2,10	0,162	0,112	0,214	0,163	0,041
K 9-11	3,19	4,55	5,17	4,30	0,83	0,065	0,092	0,105	0,087	0,017
K 12-14	20,58	16,41	26,51	21,17	4,14	0,400	0,319	0,515	0,412	0,081
P 0-2	21,00	17,09	17,66	18,58	1,72	0,422	0,344	0,355	0,374	0,035
P 3-5	42,83	40,25	52,33	45,13	5,19	0,803	0,755	0,981	0,846	0,097
P 6-8	51,52	40,49	38,14	43,38	5,83	0,965	0,758	0,714	0,812	0,109
P 9-11	84,58	76,01	99,39	86,66	9,66	1,617	1,453	1,900	1,657	0,185
P 12-14	90,45	82,89	75,87	83,07	5,95	1,760	1,613	1,476	1,616	0,116

**Tabelle 3.5.** Proteinbestimmung von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation. Als Probenmaterial wurden die oberen 4cm junger Eichenwurzeln verwendet. Der infizierte Wurzelspitzenbereich ist in diesen Proben nicht enthalten. An jedem Tag wurden die Wurzeln von je 40 Pflanzen gepoolt. Je 3 Tage wurden in einer Probe zusammengefaßt. Diese sind dargestellt als Proben der Tage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11, 12-14.

3.5.2 Nachweis von PR-Proteinen in Eichenwurzeln anhand von Western-Blots:  
Reaktionen auf Pathogenbefall mit *P. quercina*

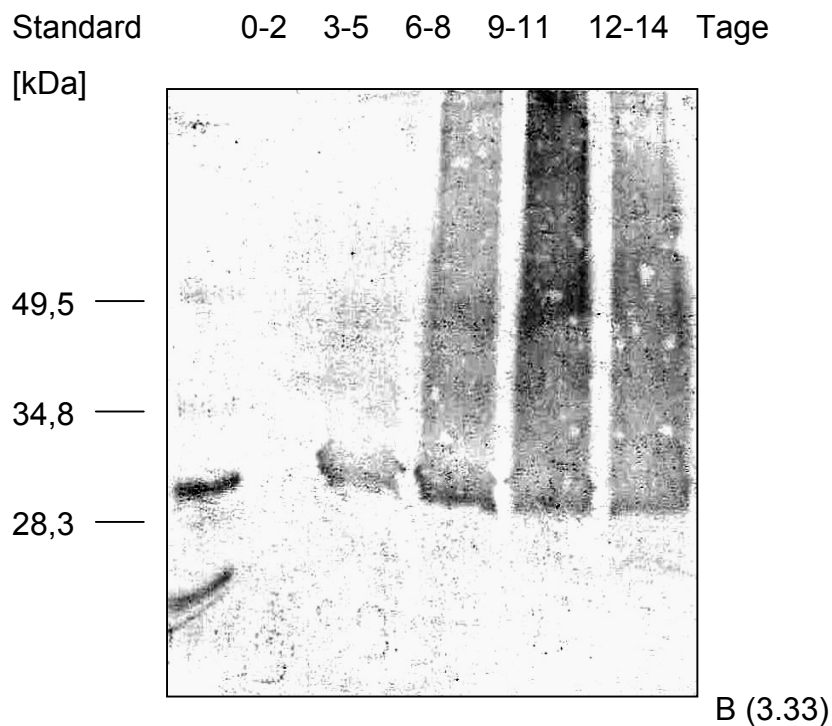
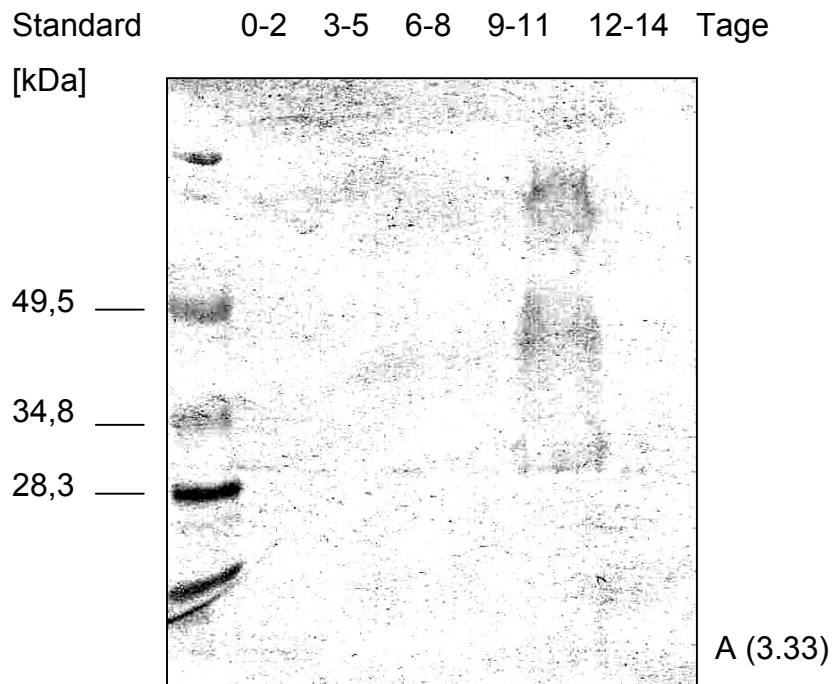
3.5.2.1 Nachweis von basischen Chitinasen



**Abbildung 3.32.** Nachweis von basischen Chitinasen in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Pro Spur wurden 25µg Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet.

Im unteren Bereich nicht infizierter junger Eichenwurzeln waren keine basischen Chitinasen nachzuweisen. In entsprechendem infiziertem Material dagegen trat nach der Markierung mit Antikörpern gegen basische Chitinasen aus Kartoffelblättern eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30kDa auf (*Abbildung 3.32*).





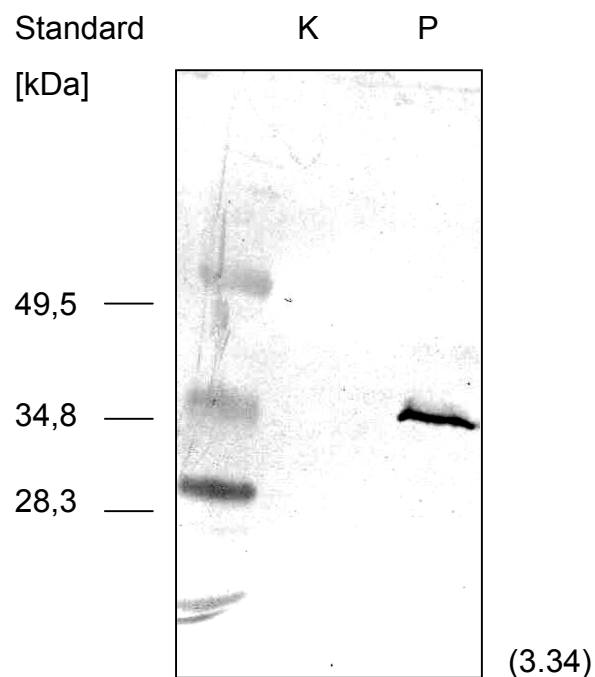
**Abbildung 3.33 (A-B).** Basische Chitinasen in Eichenwurzeln nach Infektion mit *P. quercina* am Infektionsort. Pro Spur wurden 50µg Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 4cm von nicht infizierten (**A**) und infizierten (**B**) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet. Das Probenmaterial von je 3 Tagen wurde in einer Probe zusammengefaßt, dargestellt als Probenstage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11 und 12-14.

Im unteren, unverholzten Abschnitt gesunder Eichenwurzeln konnten am Beginn der Inkubationszeit keine basischen Chitinasen nachgewiesen werden. Bis zum Tag 8

waren keine Banden auf dem Western-Blot sichtbar. Ab Tag 9 trat eine sehr schwache Kreuzreaktion mit den verwendeten Antikörpern gegen basische Chitinase aus Kartoffelblättern auf (*Abbildung 3.33A*). Anders ist das Ergebnis bei inokuliertem Wurzelmaterial. In Eichenwurzeln, die an der Wurzelspitze mit *P. quercina* infiziert worden waren, traten bis zum zweiten Tag nach der Infektion ebenfalls keine basischen Chitinasen auf. Ab dem Tag 3 nach der Inokulation waren jedoch Chitinasen an der Infektionsstelle nachweisbar (*Abbildung 3.33B*).

Im oberen Bereich infizierter Eichenwurzeln (ab 6 cm oberhalb der infizierten Wurzelspitze) war, im Vergleich zur Kontrolle, keine Induktion basischer Chitinasen nachzuweisen (*Abbildung nicht gezeigt*).

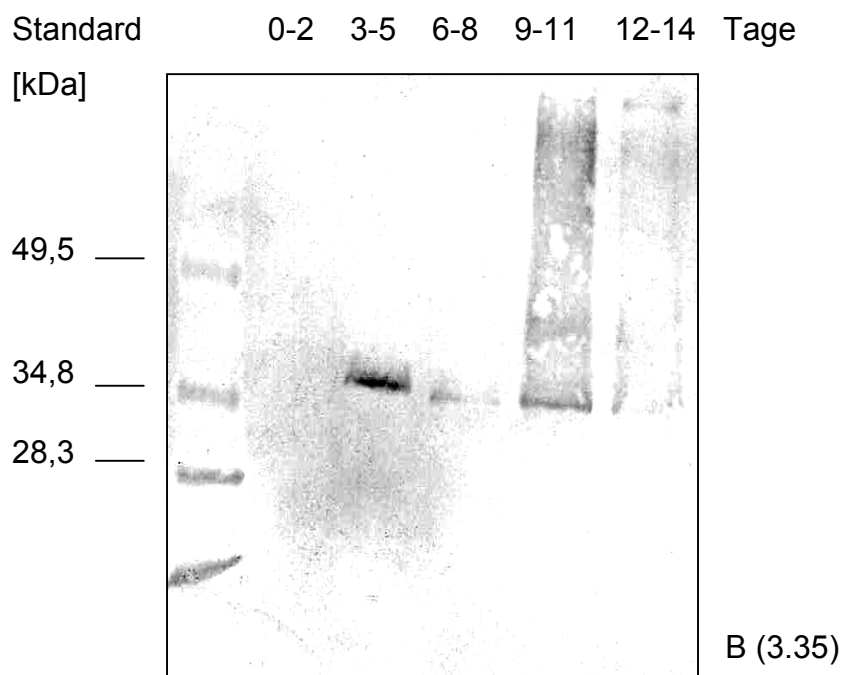
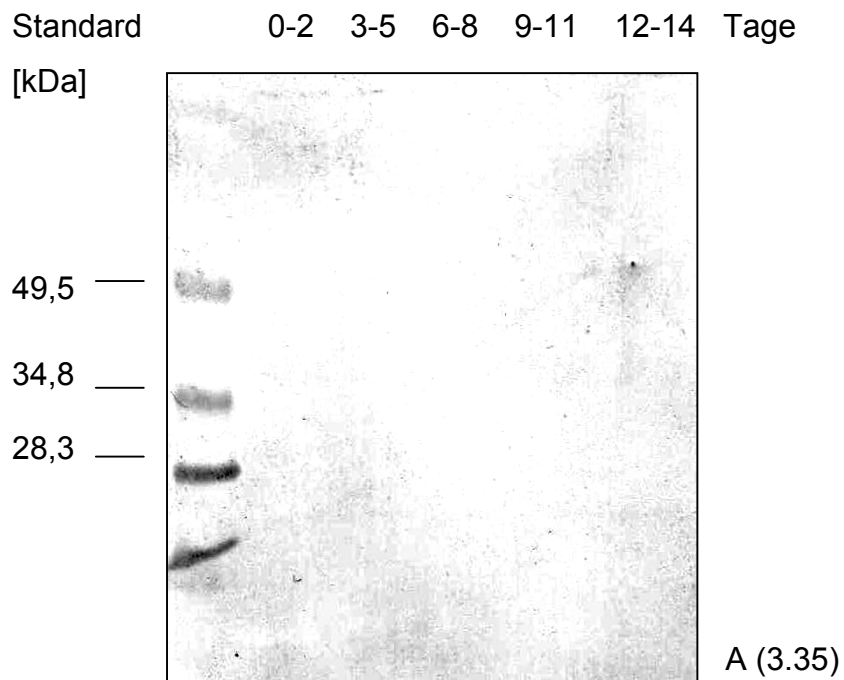
### 3.5.2.2 Nachweis von basischen $\beta$ -1,3-Glucanasen



**Abbildung 3.34.** Nachweis von basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Pro Spur wurden 25 $\mu$ g Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet.

In den Kontrollproben waren keine basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen nachzuweisen. Die Infektion mit *P. quercina* im Bereich der Wurzelspitze dagegen führte zu einer

deutlichen Anreicherung basischer  $\beta$ -1,3-Glucanasen mit einem Molekulargewicht von 35kDa direkt am Infektionsort (*Abbildung 3.34*).

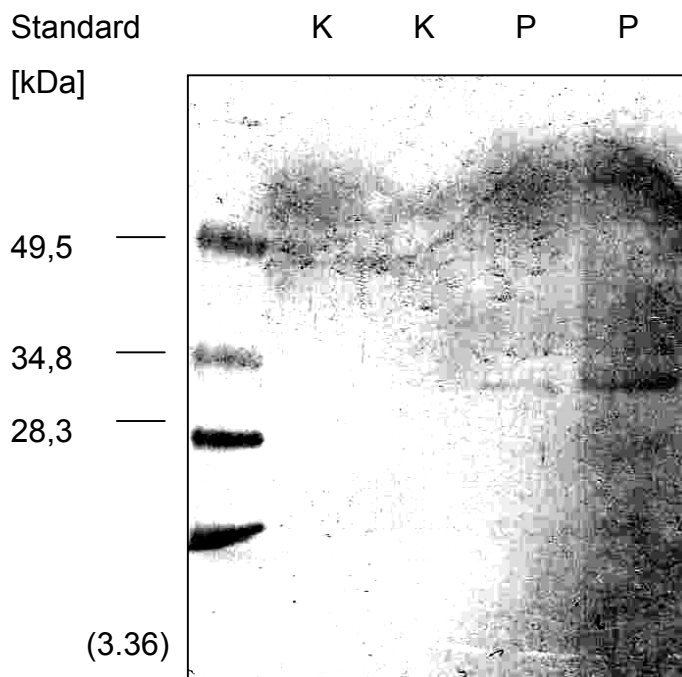


**Abbildung 3.35 (A-B).** Basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen in Eichenwurzeln nach Infektion mit *P. quercina* am Infektionsort. Pro Spur wurden 50 $\mu$ g Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 4cm von nicht infizierten (**A**) und infizierten (**B**) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet. Das Probenmaterial von je 3 Tagen wurde in einer Probe zusammengefaßt, dargestellt als Probenstage 0-2, 3-5, 6-8, 9-11 und 12-14.

Im Bereich der Wurzelspitze nicht infizierter Kontrollwurzeln konnten keine basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen nachgewiesen werden (*Abbildung 3.35A*). Durch Infektion mit *P. quercina* wurden direkt am Infektionsort basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen induziert. Diese waren ab dem dritten Tag nach der Infektion am Western-Blot nach Markierung mit Antikörpern gegen basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen aus Kartoffelblättern sichtbar. Es trat eine deutliche Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 35kDa auf (*Abbildung 3.35B*).

Im oberen Bereich infizierter Eichenwurzeln (ab 6 cm oberhalb der infizierten Wurzelspitze) war, im Vergleich zur Kontrolle, keine Induktion basischer  $\beta$ -1,3-Glucanasen nachzuweisen (*Abbildung nicht gezeigt*).

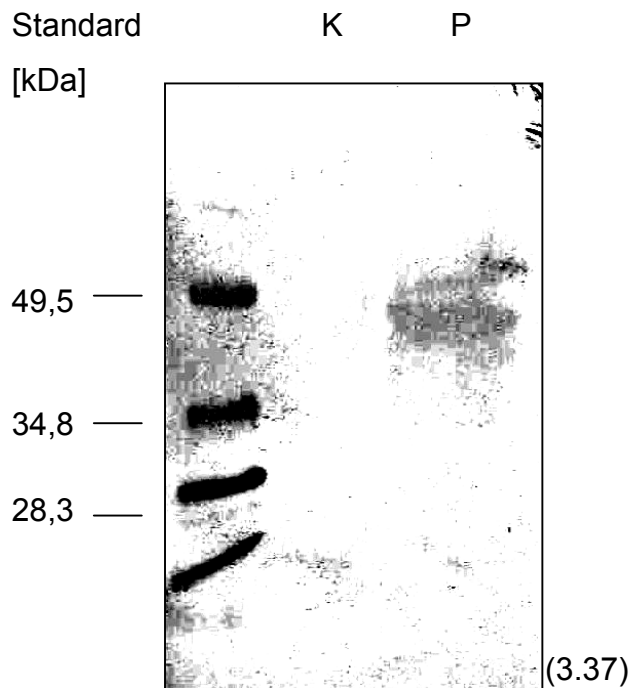
### 3.5.2.3 Nachweis von sauren Chitinasen



**Abbildung 3.36.** Nachweis von sauren Chitinasen in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Pro Spur wurden 25 $\mu$ g (links) bzw. 50 $\mu$ g (rechts) Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet.

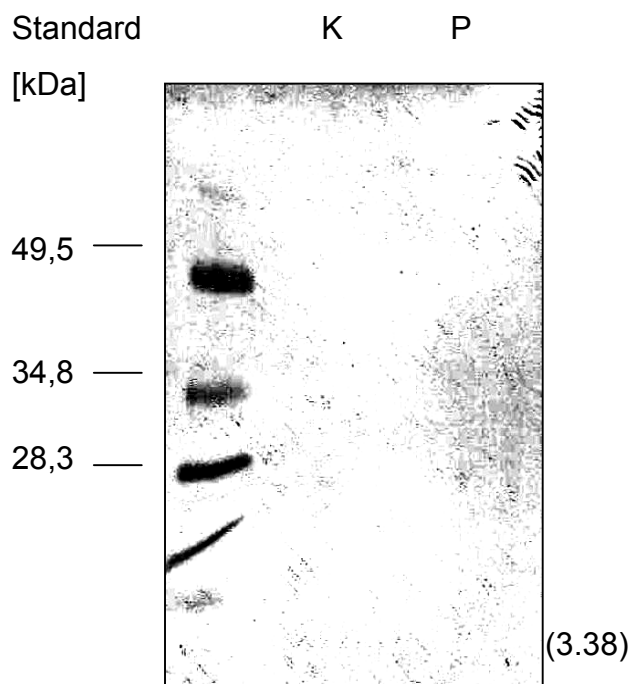
Saure Chitinasen wurden mit Antikörpern gegen Proteine aus Kichererbsen in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln detektiert. Nicht inokulierte Kontrollwurzeln wiesen dagegen keine sauren Chitinasen auf (*Abbildung 3.36*).

## 3.5.2.4 Nachweis von Osmotinen



**Abbildung 3.37.** Nachweis von Osmotinen (PR-S) in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Pro Spur wurden 100µg Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet.

Die eingesetzten Antikörper (PR-S) erkennen extrazelluläres (PR-S) und vakuoläres (AP24) Osmotin. In infizierten Eichenwurzeln wurde eine schwache Bande dieser Osmotine nachgewiesen. Kontrollproben enthielten keine kreuzreagierenden Proteine (*Abbildung 3.37*).

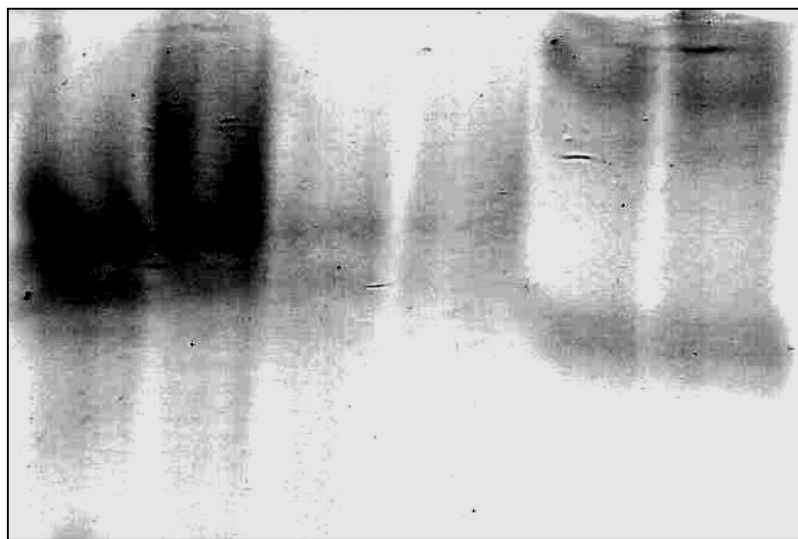


**Abbildung 3.38.** Nachweis von Osmotinen (pep2) in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Pro Spur wurden 100µg Gesamtprotein auf ein 14% SDS-Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die unteren 6cm von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichenwurzeln nach 1 Woche Inkubation verwendet.

Osmotine, die mit Antikörpern gegen pep2, welche nur vakuoläres Osmotin (AP24) erkennen, kreuzreagierten, konnten weder in mit *P. quercina* infizierten Eichwurzeln noch in gesundem Kontrollgewebe nachgewiesen werden. Auf dem dargestellten Western-Blot traten keine Banden auf (*Abbildung 3.38*).

### 3.5.2.5 Nachweis von Peroxidasen

K100µg K200µg P100µg P200µg POD2,5U POD5U



(3.39)

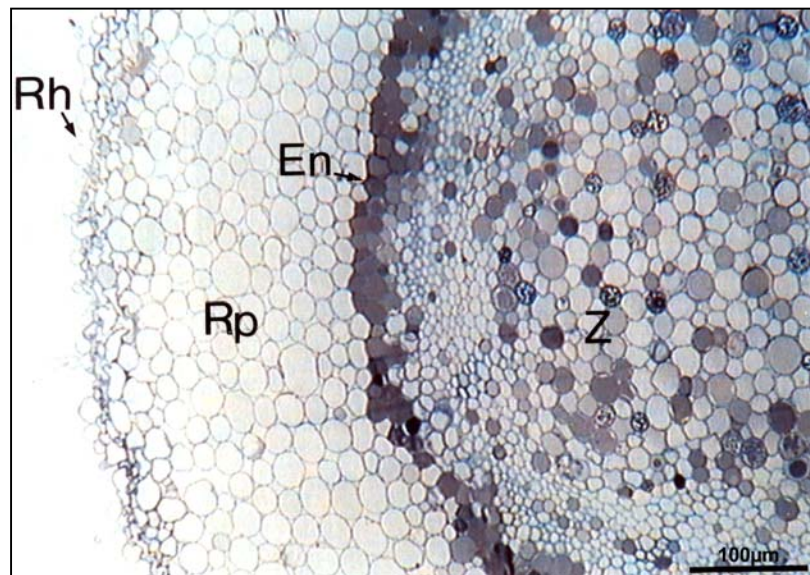
**Abbildung 3.39.** Nachweis von Peroxidasen in Eichenwurzeln und Reaktion auf Pathogenbefall mit *P. quercina*. Pro Spur wurden 100µg und 200µg Gesamtprotein auf ein 5% natives Gel aufgetragen. Als Probenmaterial wurden die gesamten Wurzeln von nicht infizierten (K) und infizierten (P) Eichen nach 1 Woche Inkubation verwendet. Die Proteine wurden aus Frischmaterial extrahiert. Als Standard wurden 2,5 Units und 5 Units Meerrettich-Peroxidase eingesetzt.

In nicht infizierten und mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln wurden Peroxidasen nachgewiesen. Die Mengen an Peroxidasen waren in gesunden Wurzeln größer. Die Banden, die aus gesundem Wurzelmaterial erhalten wurden, waren deutlich intensiver als diejenigen aus infizierten Wurzeln. Die Infektion mit *P. quercina* führte nach 1 Woche zu einer geringeren Menge an Peroxidasen im Wurzelgewebe (*Abbildung 3.39*).

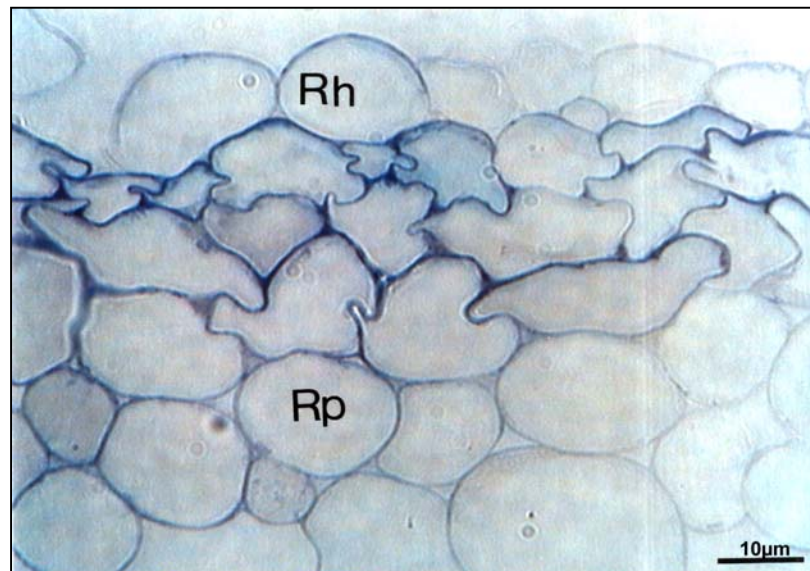
## 3.6 Mikroskopische Untersuchung von infiziertem und gesundem Wurzelgewebe

### 3.6.1 Lichtmikroskopie

#### 3.6.1.1 Mikroskopische Aufnahmen gesunder Eichenwurzeln

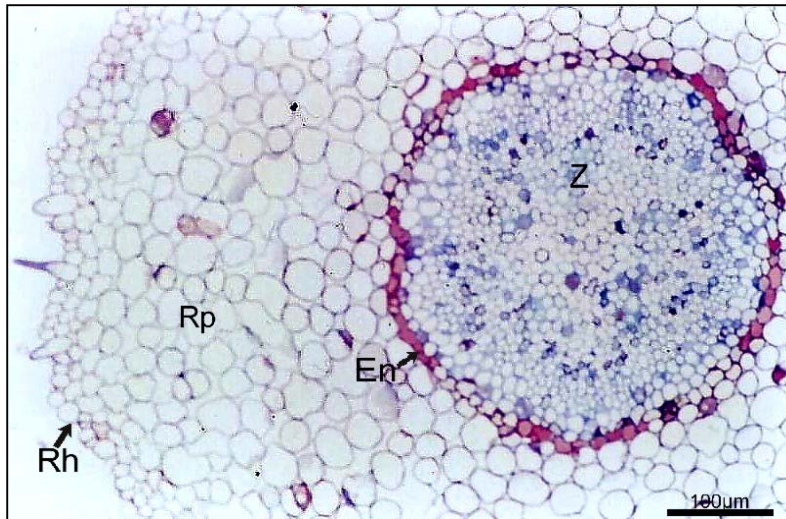


A (3.40)

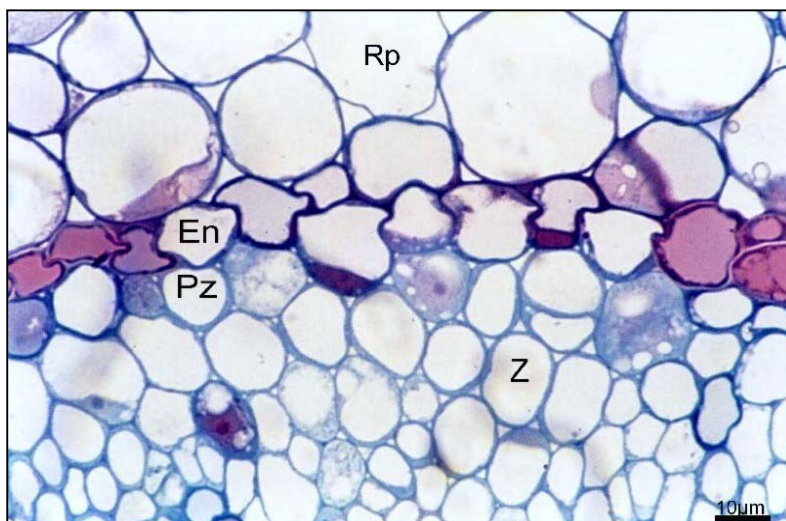


B (3.40)

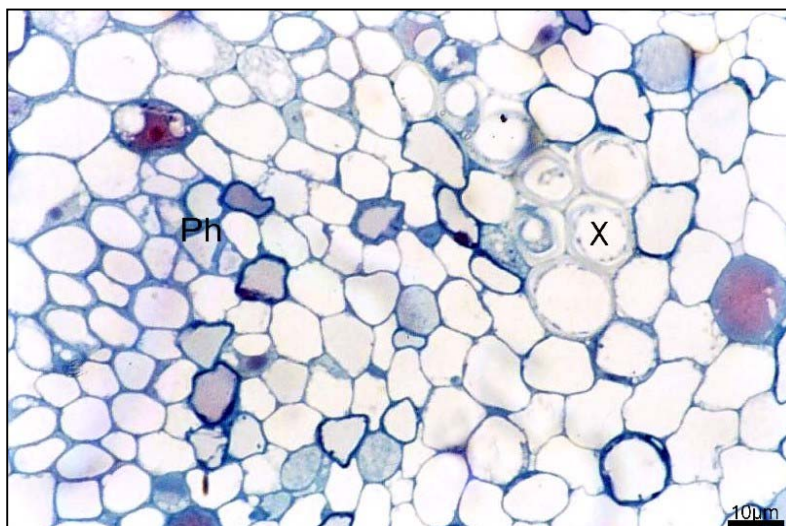
**Abbildung 3.40 (A-B).** Lichtmikroskopische Aufnahmen von gesunden Eichenwurzeln im Querschnitt. Färbung mit Toluidinblau. **A**, Übersichtsaufnahme von einer gesunden Eichenwurzel. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Rhizodermis und Teile des Rindenparenchyms. Balken = 10µm. Endodermis En, Rhizodermis Rh, Rindenparenchym Rp, Zentralzylinder Z.



A (3.41)



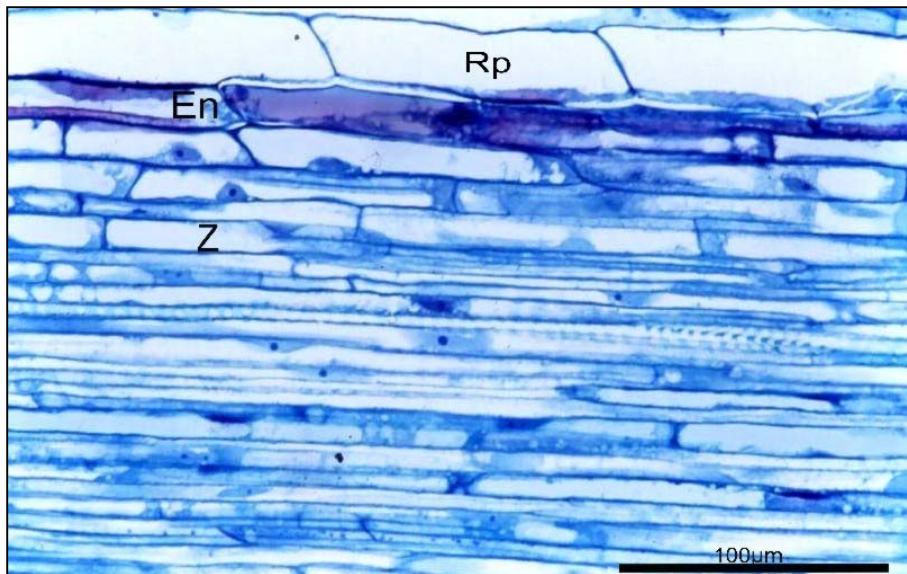
B (3.41)



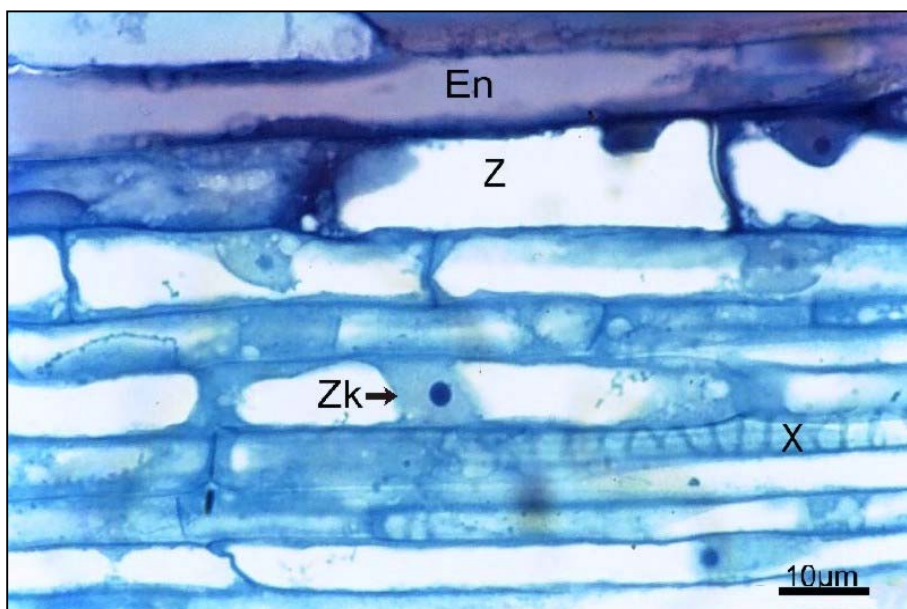
C (3.41)

**Abbildung 3.41 (A-C).** Lichtmikroskopische Aufnahmen von gesunden Eichenwurzeln im Querschnitt. Färbung mit Safranin O/Azur II. **A**, Übersichtsaufnahme von einer gesunden Eichenwurzel. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Endodermis und Perizykel als Grenze zwischen Rindenparenchym und Zentralzylinder. Balken = 10µm. **C**, Leitgewebe der gesunden Wurzel. Balken = 10µm. Endodermis En, Perizykel Pz, Phloem Ph, Rhizodermis Rh, Rindenparenchym Rp, Xylem X, Zentralzylinder Z.





A (3.42)



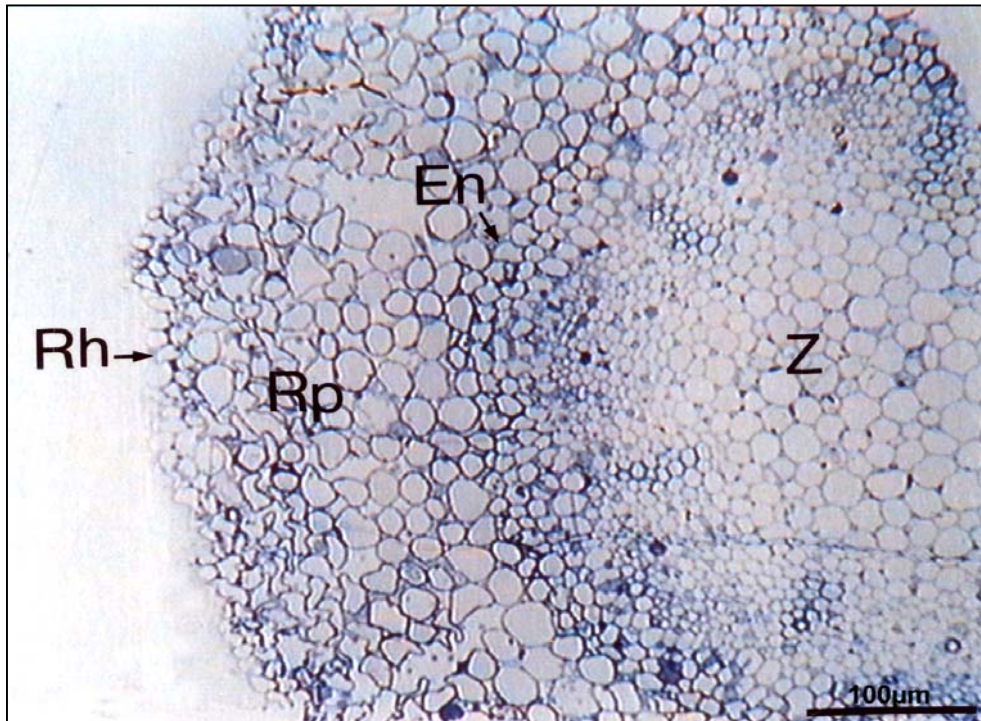
B (3.42)

**Abbildung 3.42 (A-B).** Lichtmikroskopische Aufnahmen einer gesunden Eichenwurzel im Längsschnitt. Färbung mit Toluidinblau. **A**, Übersichtsaufnahme mit Teilen des Rindenparenchyms und Zentralzylinders. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Endodermis und Teile des Zentralzylinders mit Trachee. Balken = 10µm. Endodermis En, Rindenparenchym Rp, Zentralzylinder Z, Zellkern Zk.

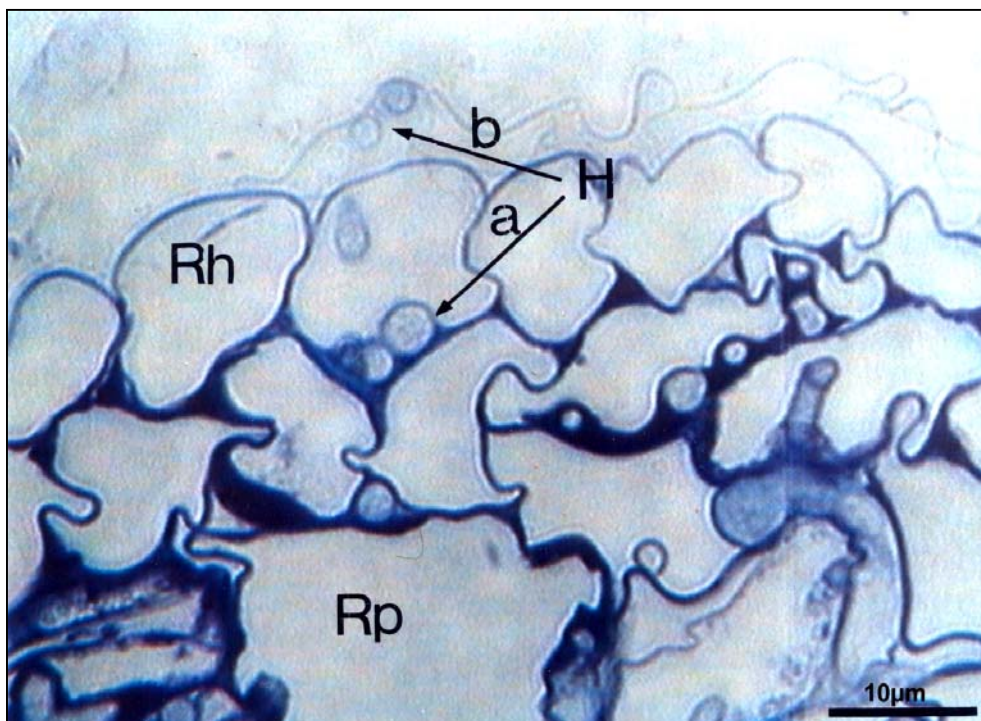
Die *Abbildungen* 3.40-3.42 zeigen gesunde Kontrollwurzeln von *Quercus robur* L., eingebettet in SPURR Epoxidharz und gefärbt mit Toluidinblau (*Abbildungen* 3.40 und 3.42) bzw. Historesin und gefärbt mit Safranin O/Azur II (*Abbildung* 3.41). Wie aus den Übersichtsaufnahmen junger, unverholzter Wurzeln zu ersehen ist (*Abbildungen* 3.40 A und 3.41 A), waren die Pflanzenzellen gesunder Wurzeln voll turgeszent. Die Zellen der Rhizodermis bildeten einen dichten Verband und stellten nach außen hin eine Barriere dar (*Abbildung* 3.40 B). Das sich daran anschließende

Rindenparenchym wurde von im Querschnitt rundlichen und in Längsrichtung gestreckten Zellen gebildet, die großteils vom Tonoplasten ausgefüllt waren (*Abbildungen* 3.40 A und B, 3.41, 3.42 A). Das Cytoplasma mit den Zellorganellen bildete einen dünnen Saum, der im Lichtmikroskop nur schwer zu erkennen war (*Abbildung* 3.41 B). In Rindenparenchymzellen waren häufig Zellkerne erkennbar, die der Cytoplasmamembran im Schnitt bohnenförmig anlagen (*Abbildungen* 3.41 B, 3.42 A). Zwischen den gleichmäßig angeordneten Parenchymzellen befanden sich mehr oder weniger große Interzellularen. Die Endodermis war als äußerste Schicht des Zentralzylinders nach beiden Färbungen deutlich zu erkennen. Mit Toluidinblau trat eine kräftigere Blaufärbung auf (*Abbildung* 3.40), bei der Safranin O/Azur II-Färbung markierte das rote Safranin die Endodermiszellen besonders stark (*Abbildung* 3.41 A und B). Der auf die Endodermis folgende Perizykel ließ sich strukturell nur stellenweise vom übrigen Gewebe abgrenzen (*Abbildung* 3.41 B). Das Parenchym des Zentralzylinders bestand aus kleineren Zellen mit kleineren Interzellularen (*Abbildungen* 3.40 A, 3.41 A und C). Auch hier waren im Schnitt in einigen Zellen Zellkerne mit Nucleoli erkennbar (*Abbildung* 3.42 A). Im Längsschnitt wurde die Vernetzung der Zellkerne mit der Cytoplasmamembran über Plasmabrücken verdeutlicht (*Abbildung* 3.42 B). Das Leitgewebe war in dem untersuchten, relativ jungen Wurzelabschnitt zum Teil noch nicht voll ausdifferenziert (*Abbildung* 3.41 C). Ältere Xylemgefäße waren an ihrer vieleckigen Form, den fehlenden Interzellularen und den verdickten Zellwänden zu erkennen. Bei jüngeren Gefäßen konnten die Lumina noch von Resten des Protoplasten ausgefüllt sein. Die Siebröhren des Phloems bildeten mit Geleitzellen und Phloemparenchym ebenfalls Gruppen ohne Interzellularen. Größere Phloemgefäße wurden von kleineren Geleitzellen flankiert. Das Phloem befand sich im Querschnitt junger Wurzeln zwischen dem Xylem (*Abbildung* 3.41 C).

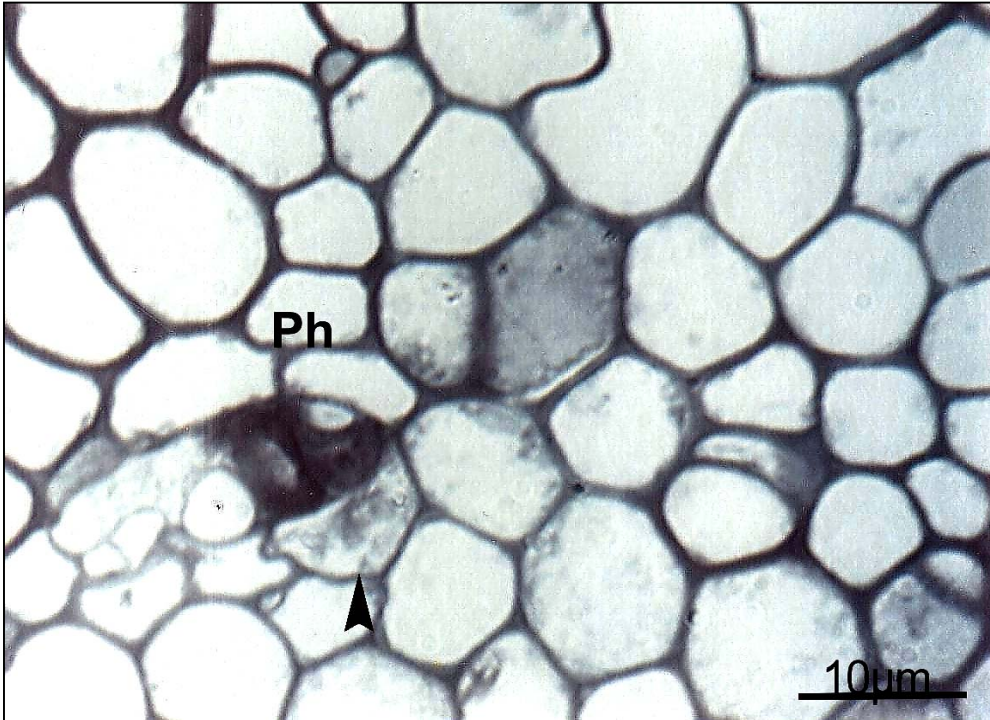
3.6.1.2 Mikroskopische Aufnahmen mit *Phytophthora quercina* infizierter Eichenwurzeln



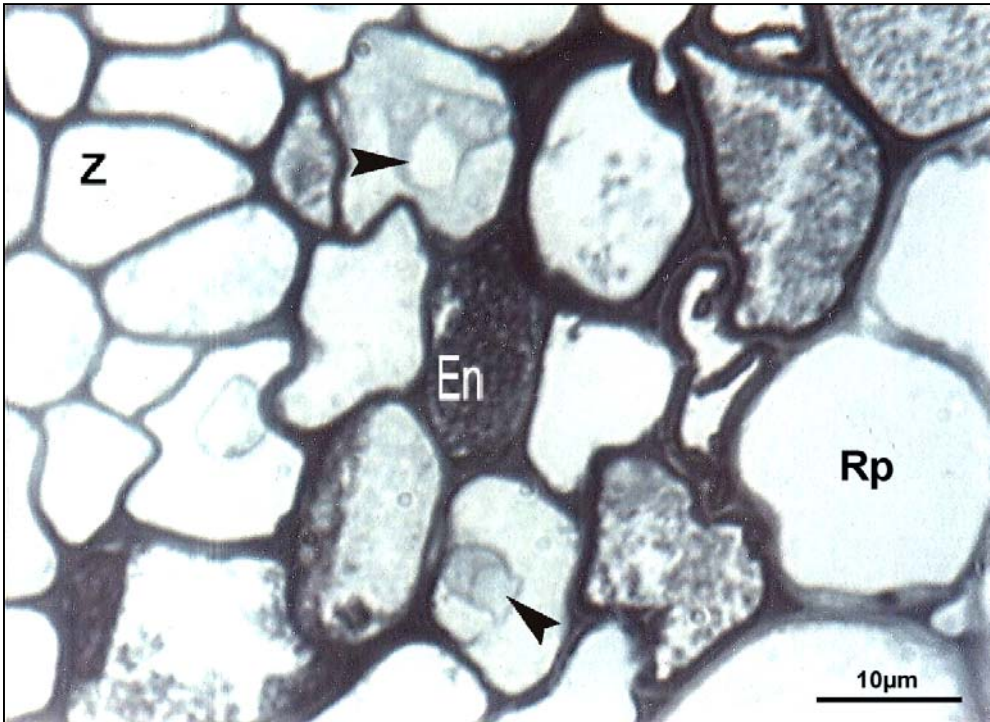
A (3.43)



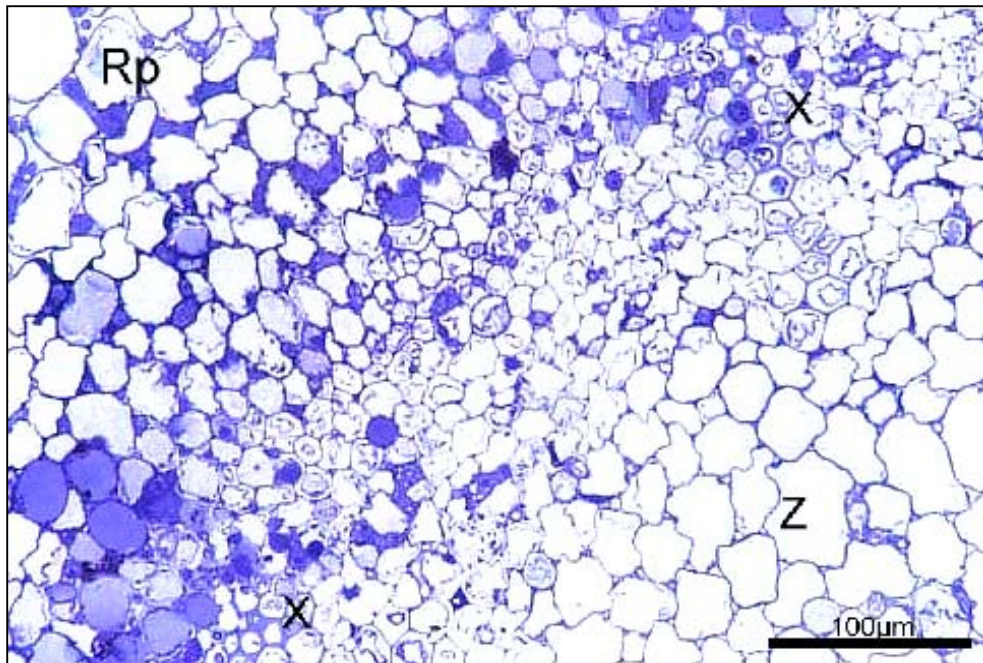
B (3.43)



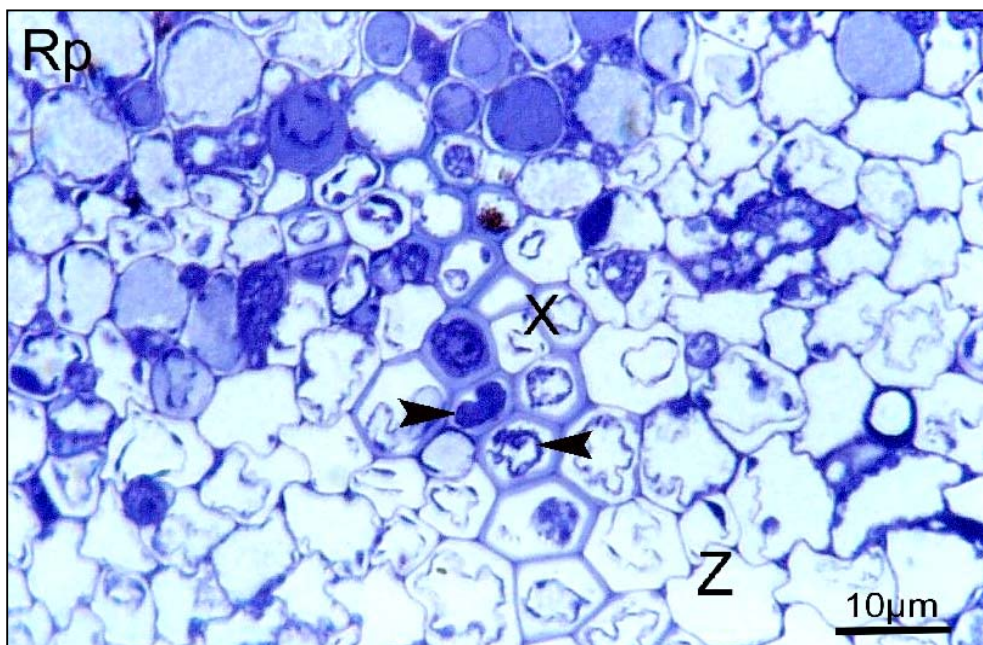
C (3.43)



D (3.43)

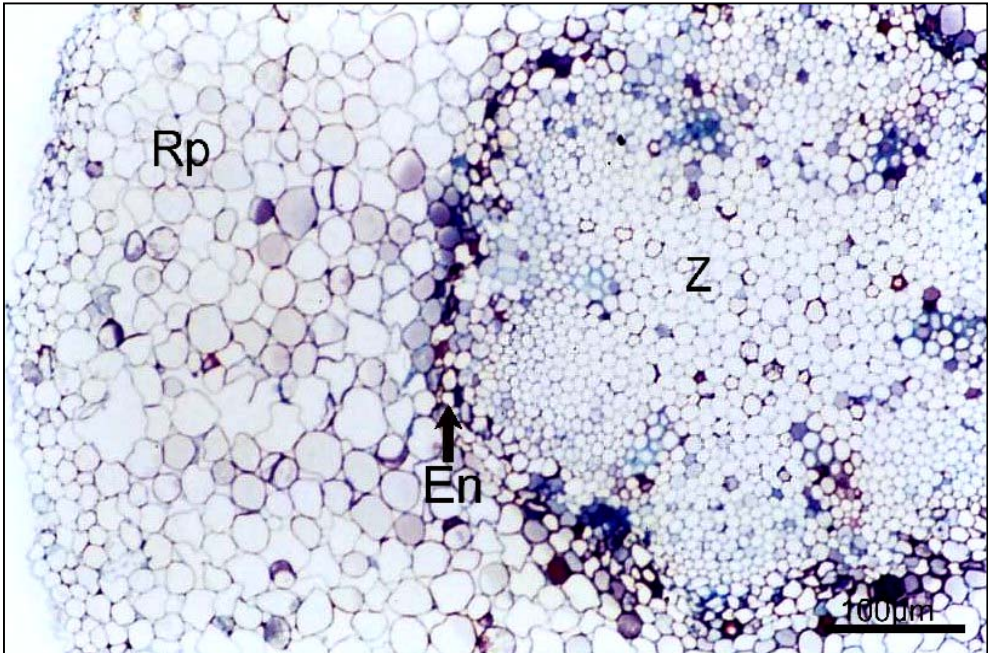


E (3.43)

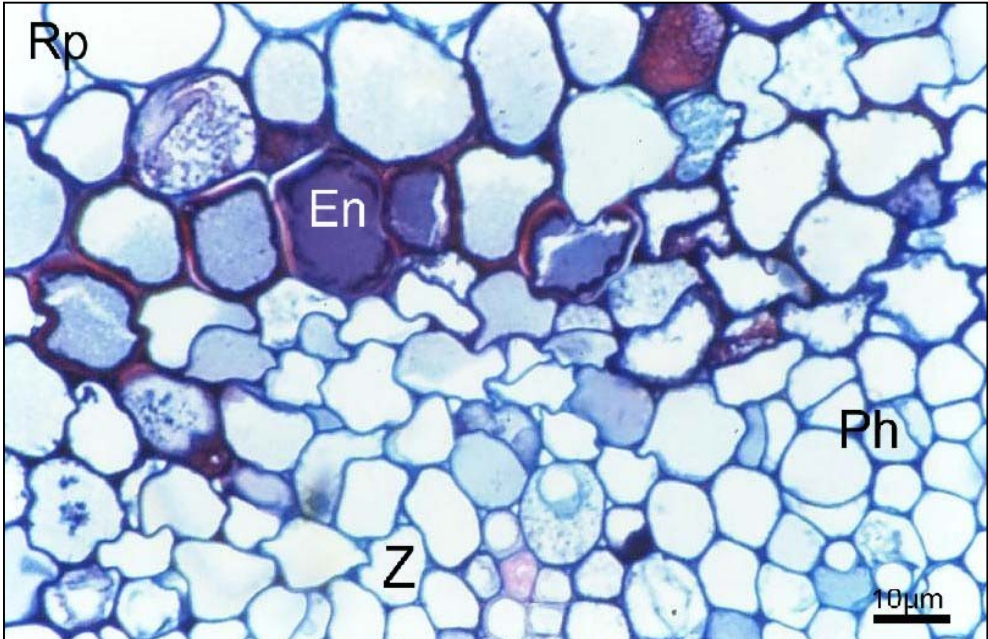


F (3.43)

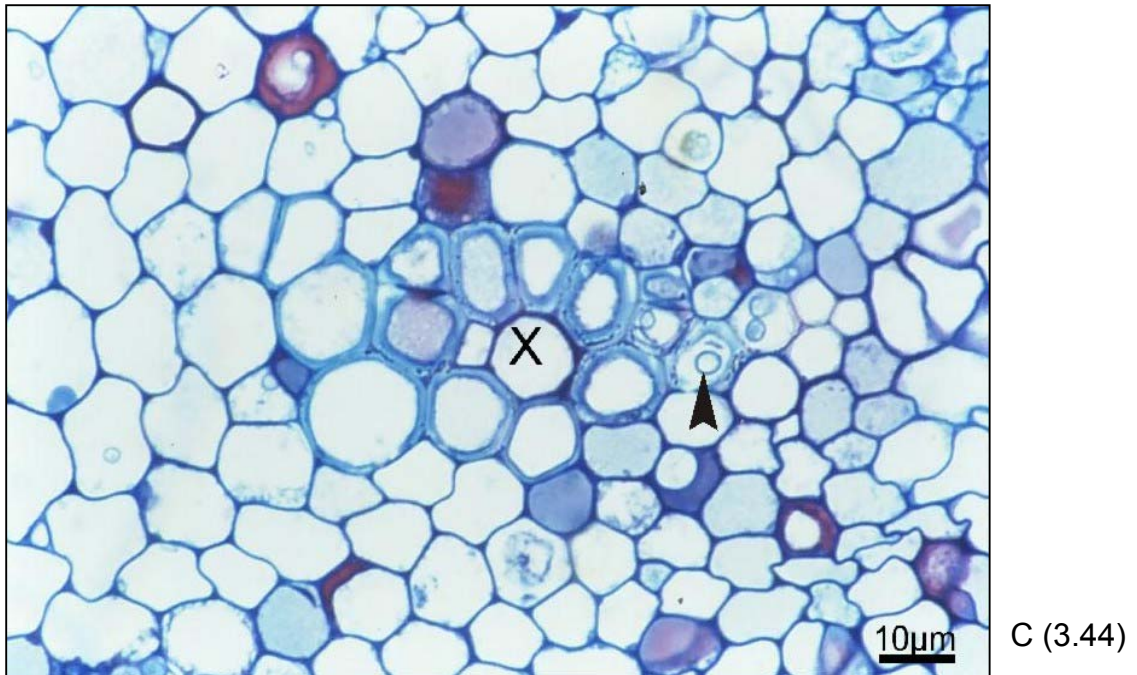
**Abbildung 3.43 (A-F).** Lichtmikroskopische Aufnahmen von mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln im Querschnitt. Färbung mit Toluidinblau. **A**, Übersichtsaufnahme einer infizierten Eichenwurzel. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Rhizodermis und Rindenparenchym mit starkem Pilzbefall. Balken = 10µm. **C**, Phloem mit interzellulärer Hyphe (Pfeilspitze). **D**, Detail der Endodermis mit intrazellulären Hyphen (Pfeilspitzen). **E**, Ausschnitt aus Rindenparenchym und Zentralzylinder einer sehr stark von *P. quercina* besiedelten Eichenwurzel. Balken = 100µm. **F**, Detail aus E. Xylem mit deutlicher durch den Pilz verursachter Plasmolyse (Pfeilspitzen) (vgl. die Aufnahme von gesundem Xylem in Abbildung 3.41 C). Balken = 10µm. Endodermis En, Hyphe a interzellulär, b intrazellulär, Phloem Ph, Rhizodermis Rh, Rindenparenchym Rp, Xylem X, Zentralzylinder Z.



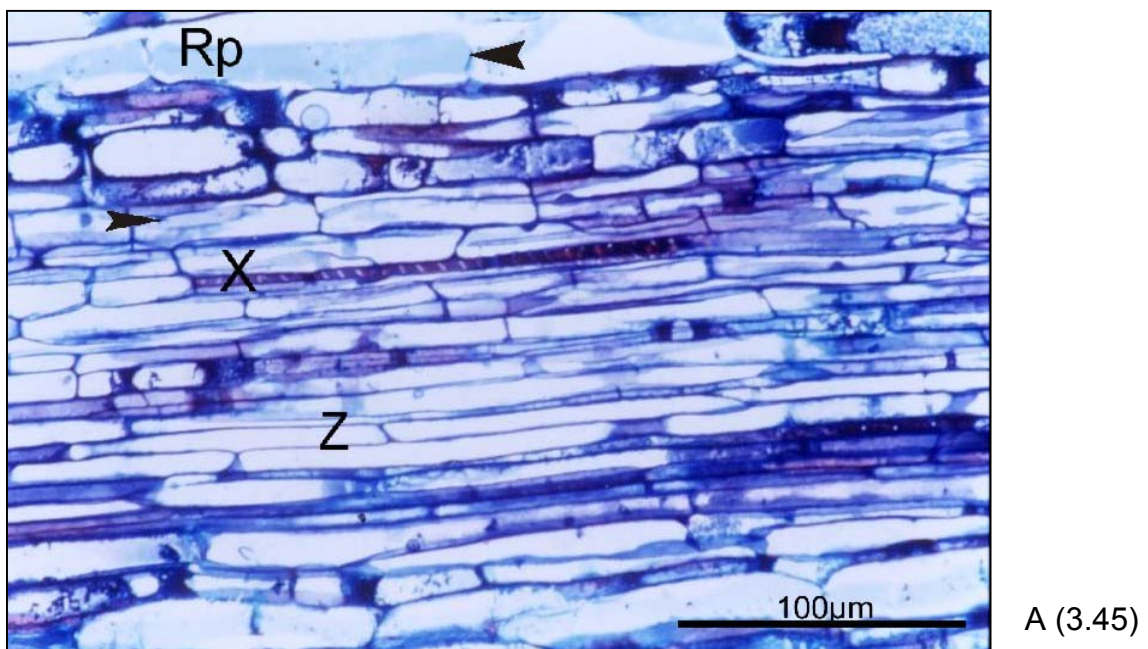
A (3.44)

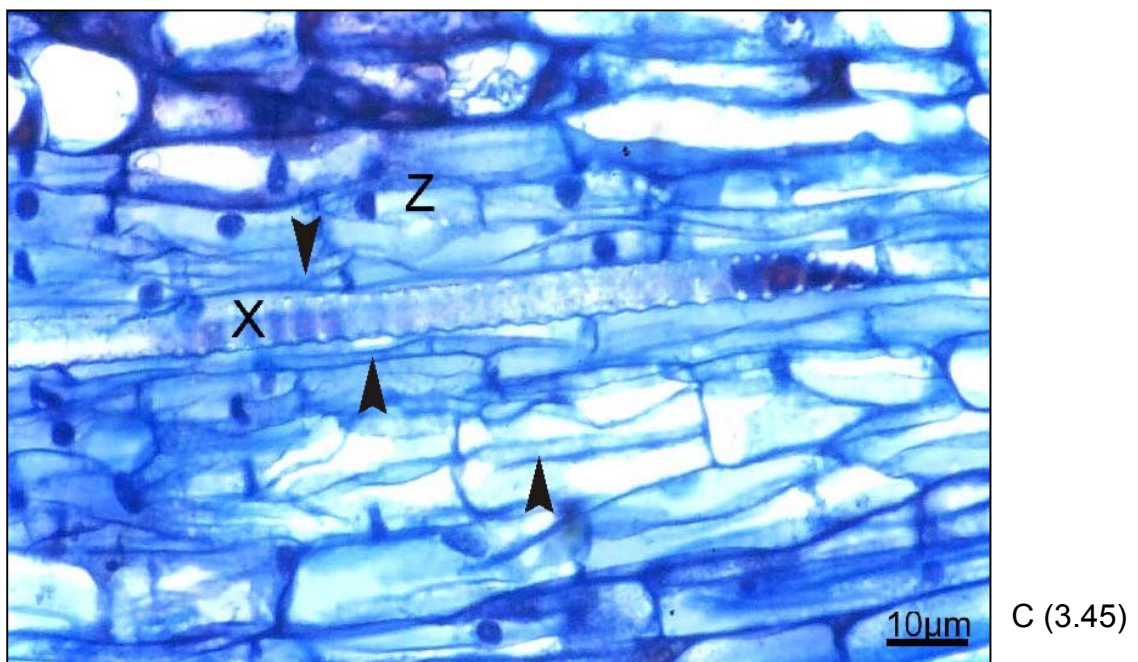
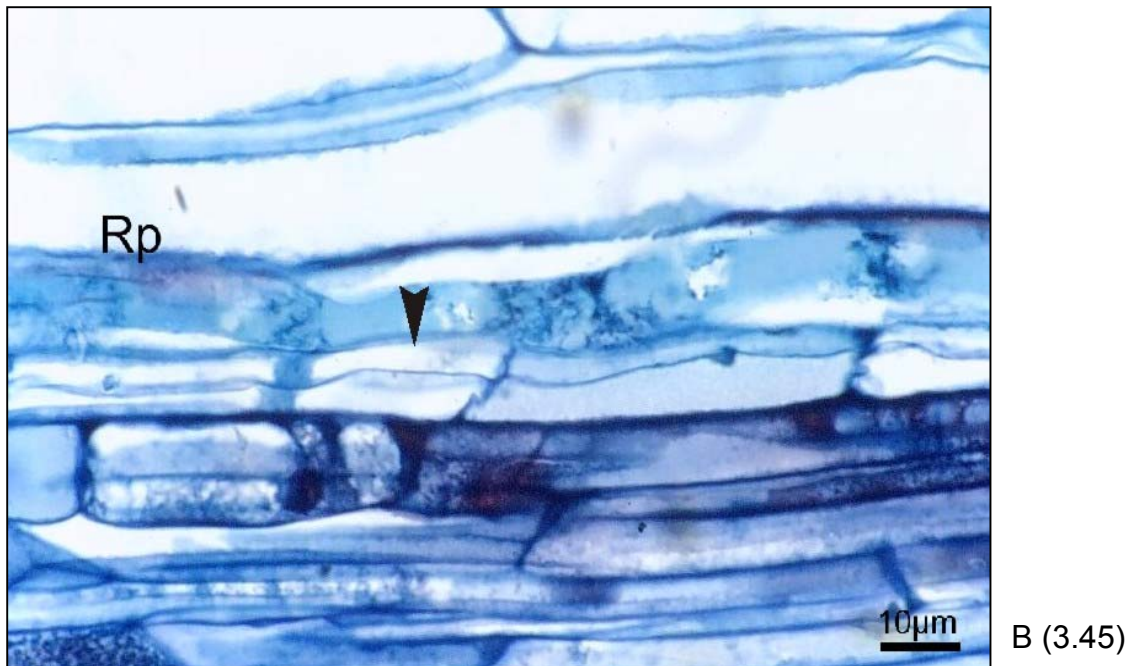


B (3.44)



**Abbildung 3.44 (A-C).** Lichtmikroskopische Aufnahmen einer infizierten Eichenwurzel. Färbung mit Safranin O/Azur II. **A**, Übersichtsaufnahme. Balken = 100μm. **B**, Detail aus A. Durch den Pilzbefall geschädigte Endodermis. **C**, Detail aus A. Xylem mit intratrachealen Hyphen (Pfeilspitze). Endodermis En, Phloem Ph, Rindenparenchym Rp, Xylem X, Zentralzylinder Z.





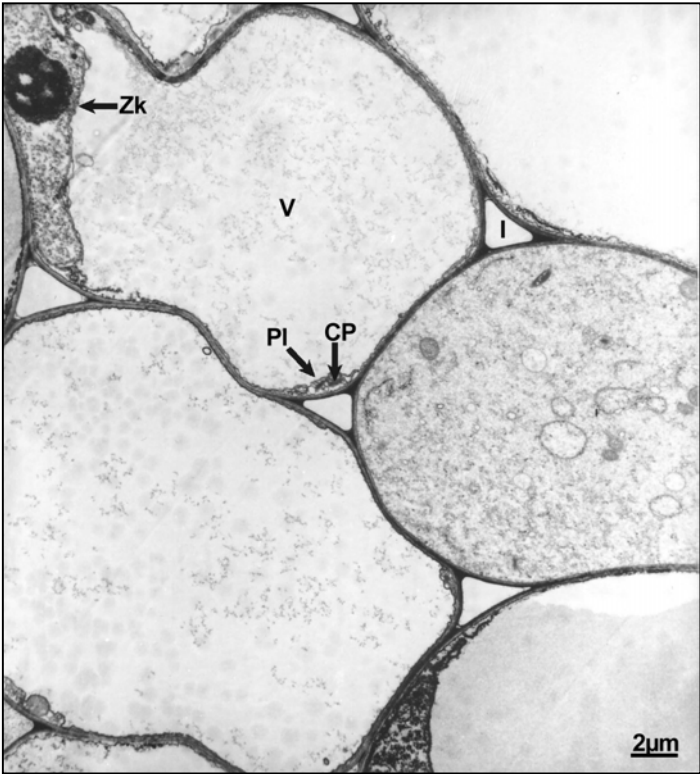
**Abbildung 3.45 (A-C).** Längsschnitte durch eine mit *P. quercina* infizierte Eichenwurzel. Färbung mit Toluidinblau. **A**, Übersichtsaufnahme am Übergang vom Rindenparenchym zum Zentralzylinder. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Von Hyphen durchzogenes Rindenparenchym. Balken = 10µm. **C**, Detail aus A. Zentralzylinder mit Trachee und zahlreichen in Längsrichtung verlaufenden Hyphen. Balken = 10µm. Rindenparenchym Rp, Xylem X, Zentralzylinder Z. Pfeilspitzen kennzeichnen einige der Hyphen.



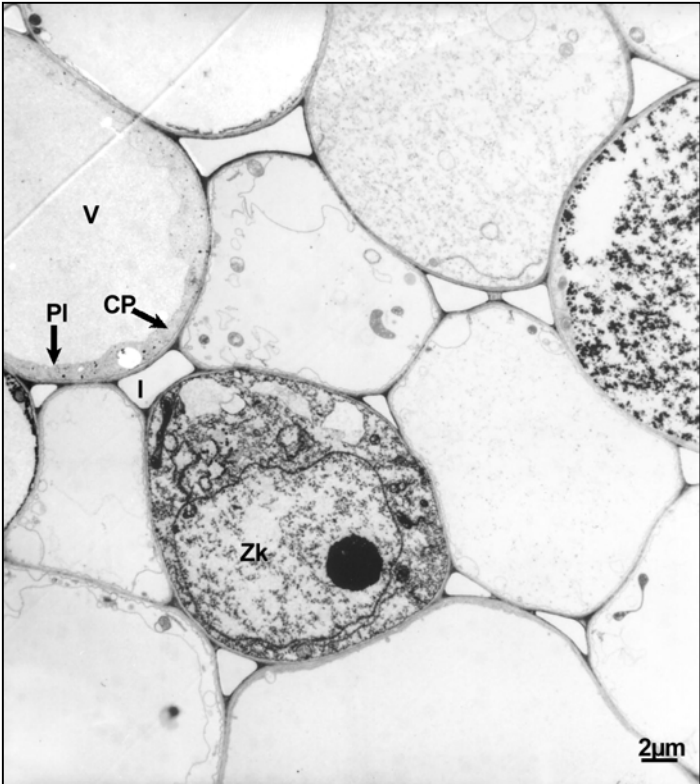
In den *Abbildungen* 3.43-3.45 sind mit *P. quercina* infizierte Eichenwurzeln dargestellt. Die Präparate wurden in SPURR Epoxidharz eingebettet und mit Toluidinblau gefärbt (*Abbildungen* 3.43 und 3.45) bzw. in Historesin eingebettet und mit Safranin O/Azur II gefärbt (*Abbildung* 3.44). Die Rhizodermis der infizierten Wurzel wurde von Pilzhypen penetriert (*Abbildung* 3.43 B). Das gesamte Rindenparenchym war mehr oder weniger von Pilzhypen durchsetzt (*Abbildung* 3.43 A und B). Dabei wuchsen die Hypen ohne erkennbare Bevorzugung einer Richtung sowohl antiklin als auch periklin. Die Rindenparenchymzellen hatten an Turgeszenz verloren. *P. quercina* bildete inter- und intrazelluläre Hypen. Längsschnitte infizierter Wurzeln zeigten, daß die longitudinal gestreckten Rindenparenchymzellen von langen Hypen durchzogen waren (*Abbildung* 3.45 A und B). Dabei waren die Zellwände in Längsrichtung oft vollständig aufgelöst (*Abbildung* 3.45 B). Zellkerne waren fast nicht mehr erkennbar, jedoch waren die Nucleoli noch vorhanden (*Abbildung* 3.45 A). Sogar die Endodermis, welche in gesunden Wurzeln einen dichten Zylinder bildet, wurde von Hypen penetriert, wobei meistens inter-, selten aber auch intrazelluläre Hypen zu finden waren (*Abbildungen* 3.43 C, 3.44 A und B). Die deutlichere Färbung der Endodermis mit Toluidinblau und Safranin, die an gesunden Wurzeln zu beobachten war, trat hier wesentlich schwächer oder gar nicht auf. Hypen drangen auch in den Zentralzylinder der Eichenwurzel und in Xylemgefäße ein (*Abbildungen* 3.43 F, 3.44 C). Einzelne Tracheen waren von Hypen oder amorphem Material blockiert (*Abbildung* 3.43 F). In Siebröhren wurde *Phytophthora* nicht beobachtet, mitunter aber interzelluläre Hypen im Bereich des Phloems (*Abbildung* 3.43 D).

3.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Gesundes Wurzelgewebe:



A (3.46)

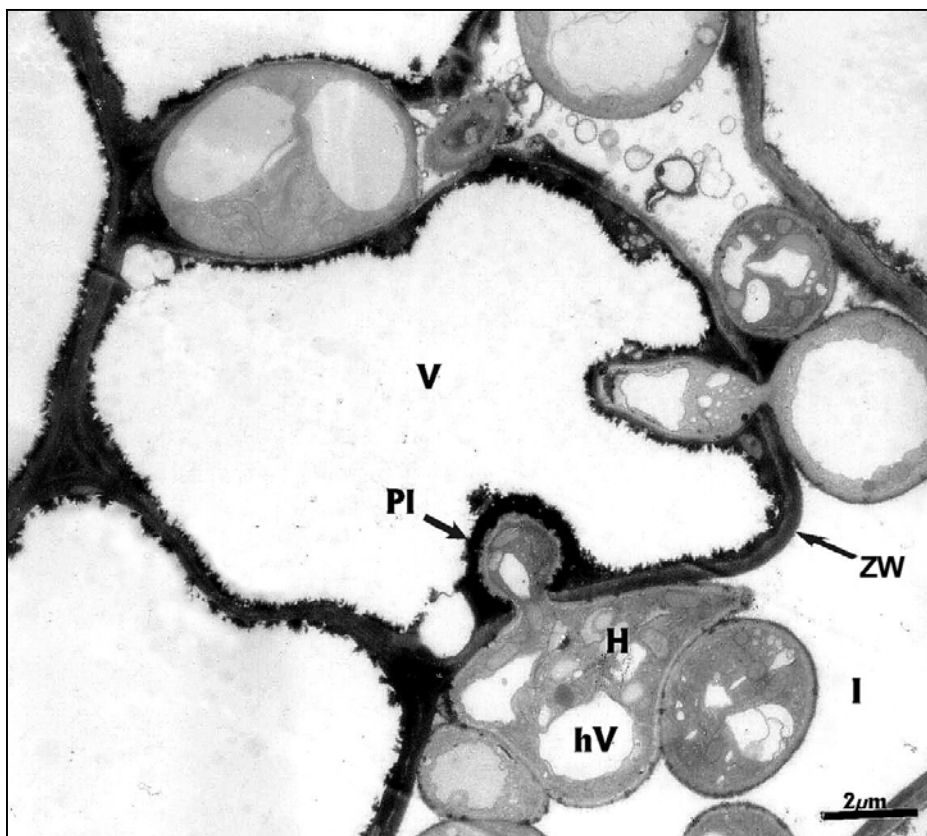


B (3.46)

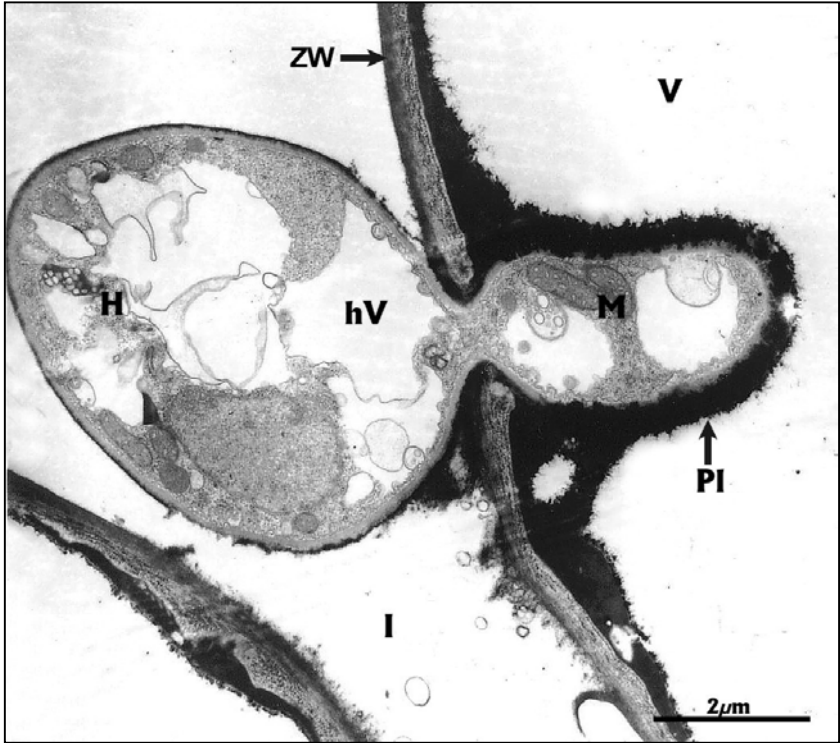
**Abbildung 3.46 (A-B).** Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen einer gesunden Eichenwurzel. **A** und **B**, Rindenparenchym. Balken = 2 $\mu$ m. Cytoplasma CP, Interzellulare I, Plasmalemma PI, Vakuole V, Zellkern Zk.

Die Aufnahmen von gesundem Wurzelgewebe zeigen intakte turgeszente Rindenparenchymzellen mit einem meist dünnen Cytoplasmasaum, Zellkernen und Nucleoli. Die Parenchymzellen waren im Querschnitt rundlich und wurden zum Großteil vom Tonoplasten ausgefüllt. Der Zellwand lag ein dünner Cytoplasmasaum auf. Mitunter waren Zellkerne mit Nucleoli in der Schnittebene getroffen. Zwischen den Zellen waren kleine Interzellularen vorhanden (*Abbildung 3.46 A und B*).

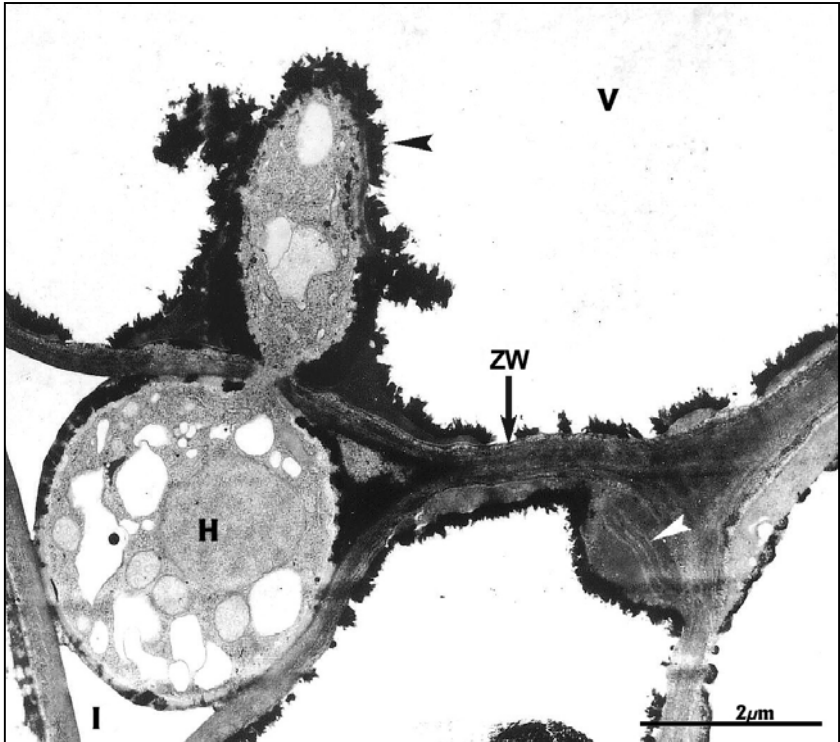
Infiziertes Wurzelgewebe:



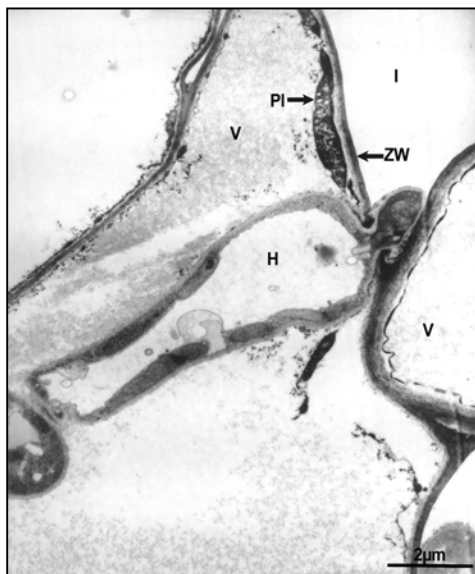
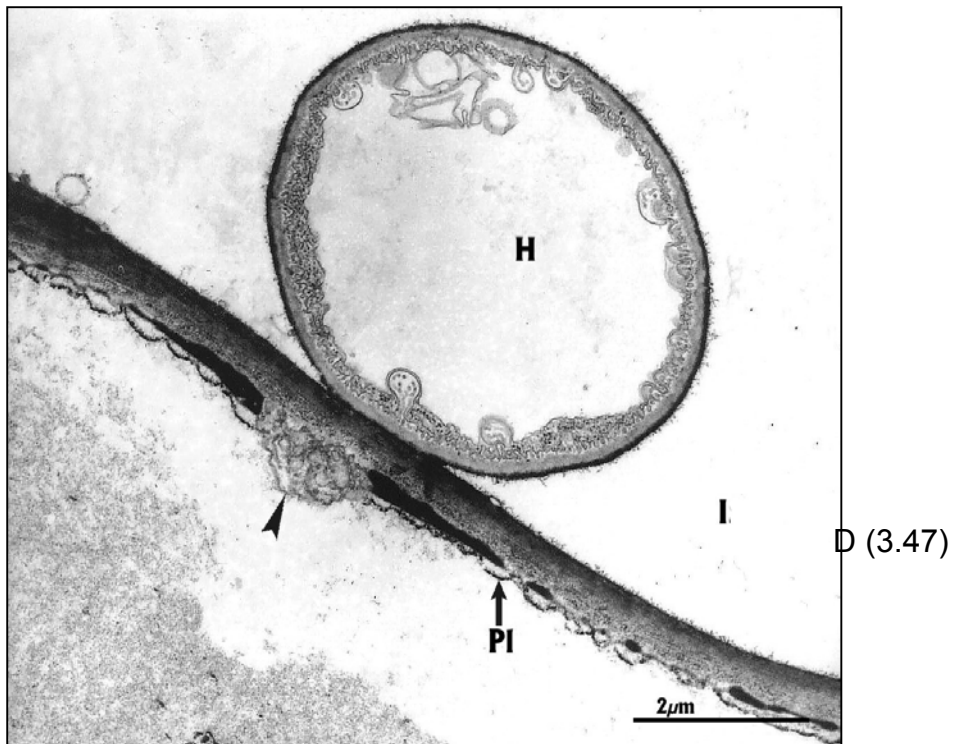
A (3.47)



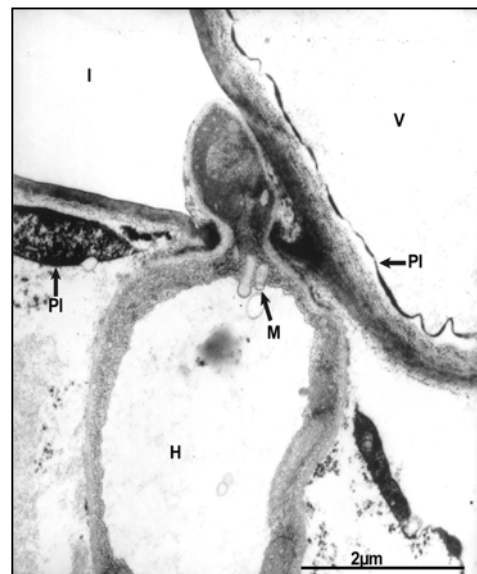
B (3.47)



C (3.47)



E (3.47)

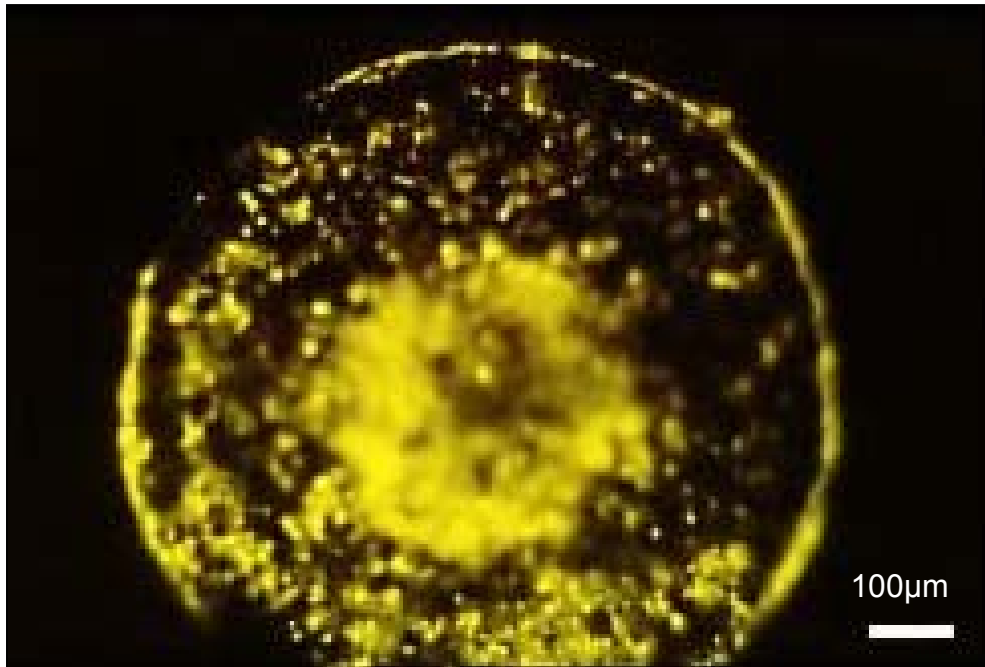


F (3.47)

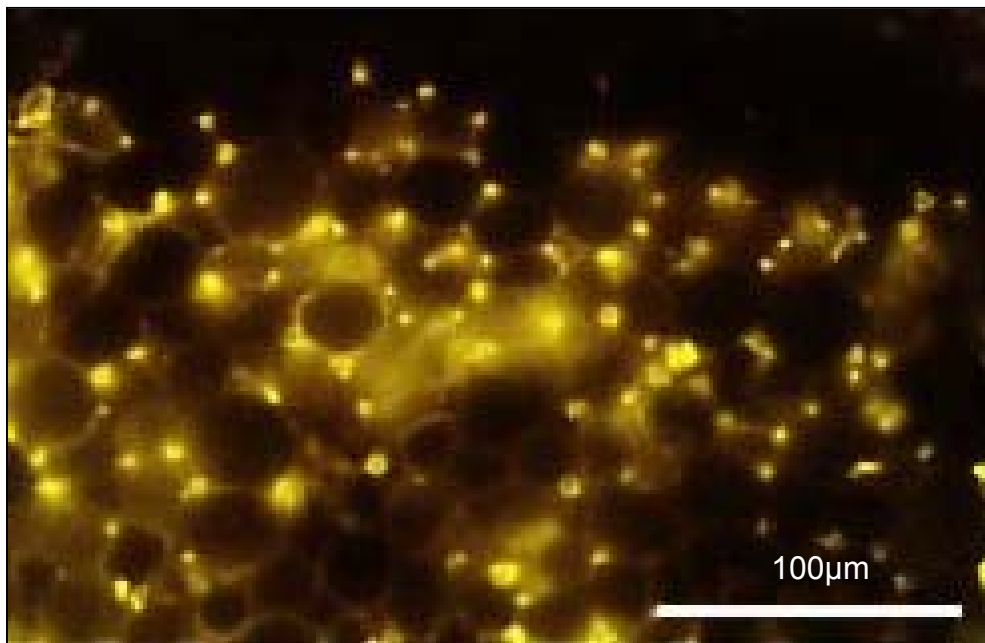
**Abbildung 3.47 (A-F).** Aufnahmen einer mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzel. **A, B** und **C**, In Rindenparenchymzellen eindringende Hyphe. Ablagerung von elektronendichtem (schwarze Pfeilspitze in C) und weniger elektronendichtem Material (weiße Pfeilspitze in C). Balken = 2 $\mu$ m. **D**, Eine interzellulär wachsende Hyphe berührt die Zellwand einer Pflanzenzelle im Rindenparenchym. Abwehrreaktion in der Pflanzenzelle (Pfeilspitze). Balken = 2 $\mu$ m. **E**, Eine intrazelluläre Hyphe durchstößt die pflanzliche Zellwand nach außen. Balken = 2 $\mu$ m. **F**, Detail aus E. Ansammlung von pilzlichem Cytoplasma und Zellorganellen an der Penetrationsstelle beim Durchtritt der Hyphe durch die pflanzliche Zellwand. Balken = 2  $\mu$ m. Hyphe H, Vakuole der Hyphe hV, Interzellulare I, Mitochondrium M, Plasmalemma der Pflanzenzelle PI, Vakuole der Pflanzenzelle V, Zellwand der Pflanzenzelle ZW.

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen an infiziertem Wurzelgewebe zeigten die Perforation der pflanzlichen Zellwand bei der Penetration durch die Hyphen (*Abbildung 3.47 A, B, C, E und F*). Die Hyphe schwoh an den Penetrationsstellen mehr oder weniger stark an, bildete jedoch kein deutlich erkennbares Appressorium aus. Die Zellwand schien lokal aufgelöst zu werden. Beim Eintritt der Hyphe in die Zelle wurde die Cytoplasmamembran der Wirtszelle zunächst nach innen gedrückt und noch nicht durchbrochen (*Abbildung 3.47 A und B*). An der Penetrationsstelle war häufig eine Ansammlung von Cytoplasma und Zellorganellen beim Pilz zu beobachten (*Abbildung 3.47 E und F*). Elektronendichtes Material wurde an der Innenseite des Plasmalemmas sowohl penetrierter als auch benachbarter Zellen angelagert (*Abbildung 3.47 A-C*). Daneben konnten auch weniger elektronendichte Ablagerungen auf Zellwänden beobachtet werden, die von elektronondichtem Material bedeckt waren (*Abbildung 3.47 C*). Infolge der Infektion waren weder Cytoplasmastrukturen noch Zellorganellen der Pflanzenzellen mehr zu erkennen. Das Cytoplasma an der Penetrationsstelle und oft der gesamten Zelle wurde elektronendicht (*Abbildung 3.47 A*).

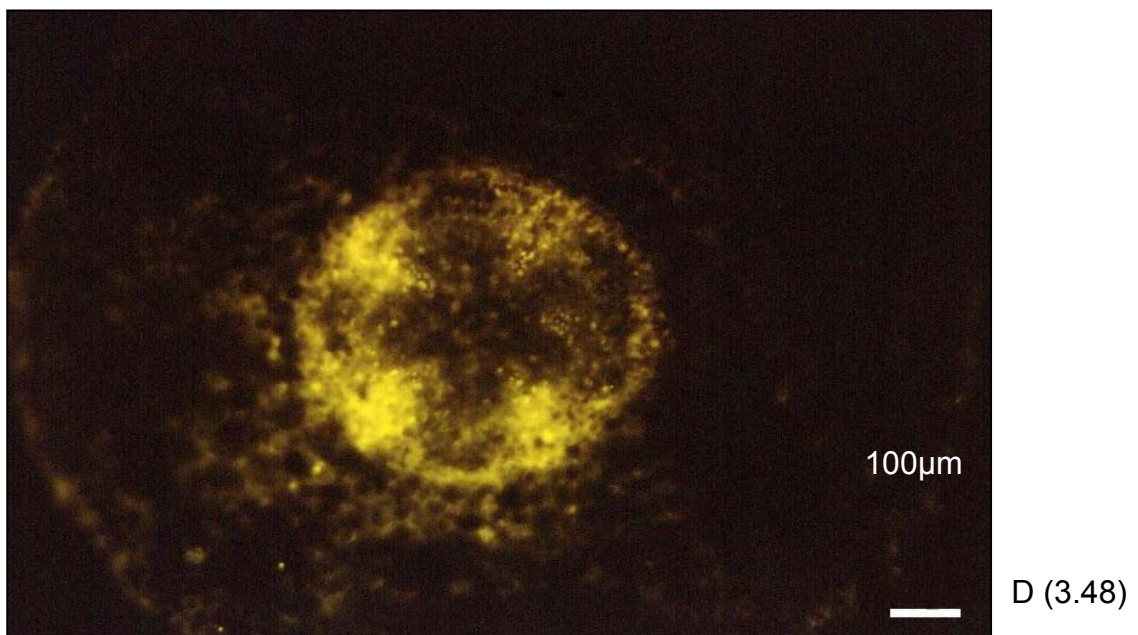
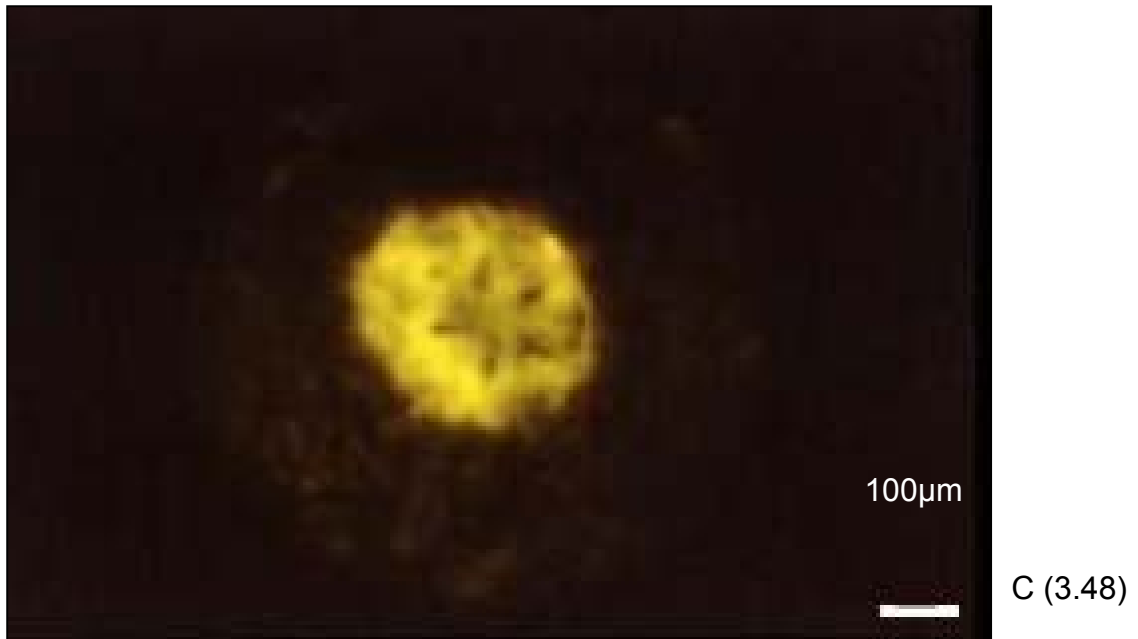
3.6.3 Immunofluoreszenzmarkierung



A (3.48)

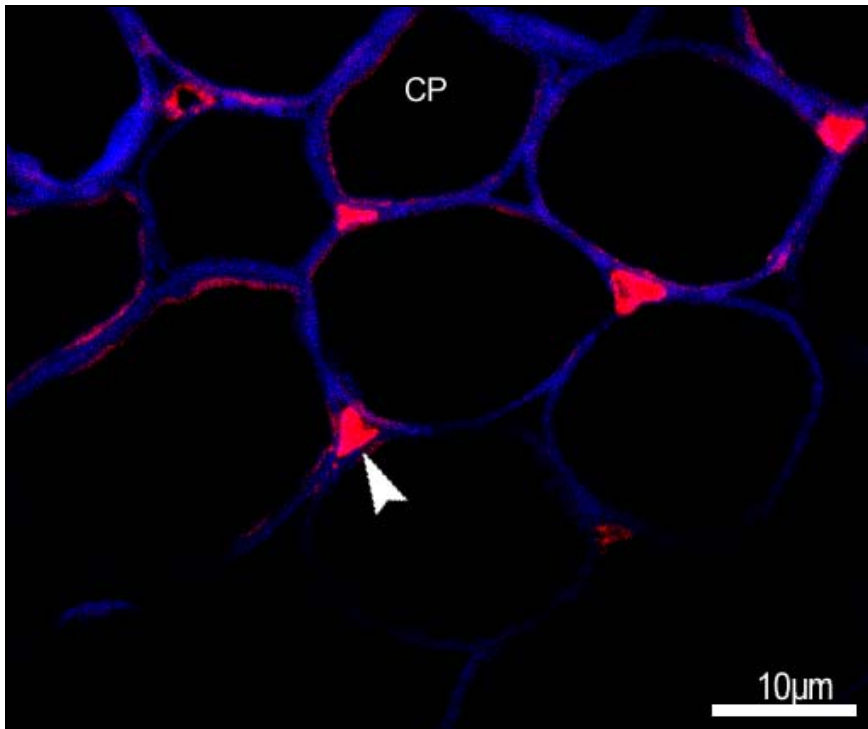


B (3.48)

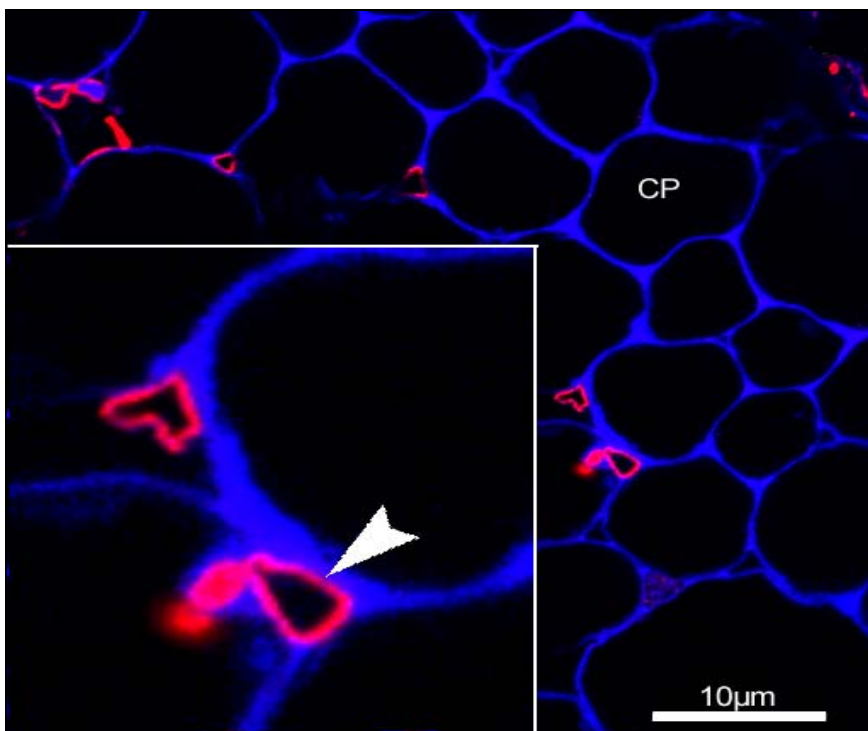


**Abbildung 3.48 (A-D).** Immunofluoreszenzaufnahmen von gesunden und mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Das toxische Protein Quercinin ist mittels spezifischer Antikörper markiert. **A**, Erkrankte und mit spezifischen Antikörpern gegen das Elicitin Cryptogein, als Analogon zu Quercinin, spezifisch markierte Wurzel. Balken = 100µm. **B**, Detail aus A. Rindenparenchym mit zahlreichen fluoreszierenden Hyphen. Balken = 100µm. **C**, Die Probe ist identisch mit der unter A und B dargestellten. Die Behandlung mit primärem Antiserum war jedoch ohne spezifische Antikörper durchgeführt worden. Es trat keine Fluoreszenz im Rindenparenchym auf. Balken = 100µm. **D**, Aufnahme einer gesunden Eichenwurzel nach identischer Behandlung wie A und B, d.h. mit spezifischen Antikörpern im primären Antiserum. Auch hier trat keine Fluoreszenz im Rindenparenchym auf. Balken = 100µm.

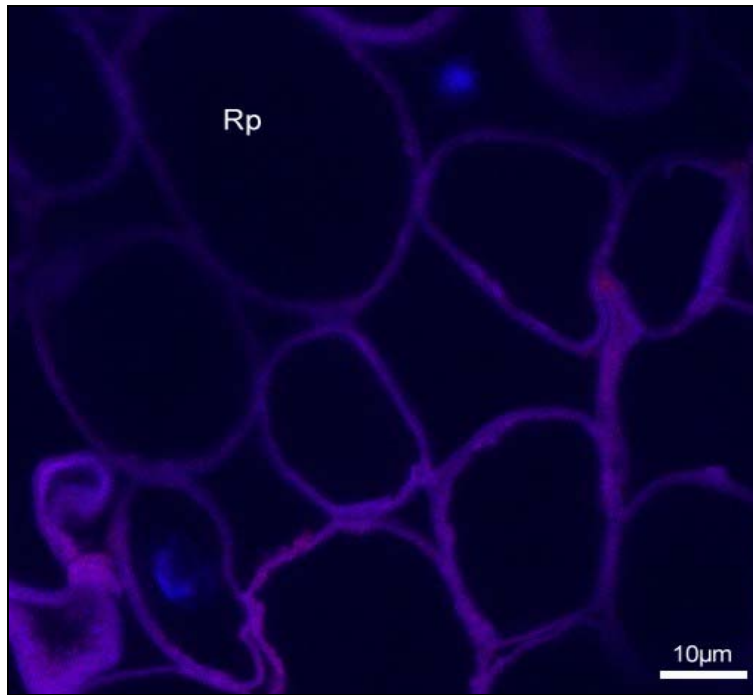




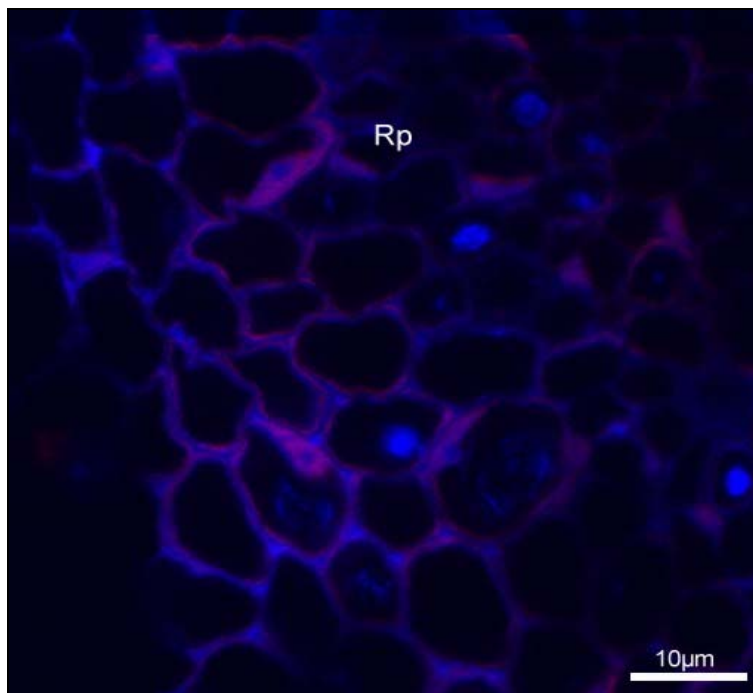
A (3.49)



B (3.49)



C (3.49)



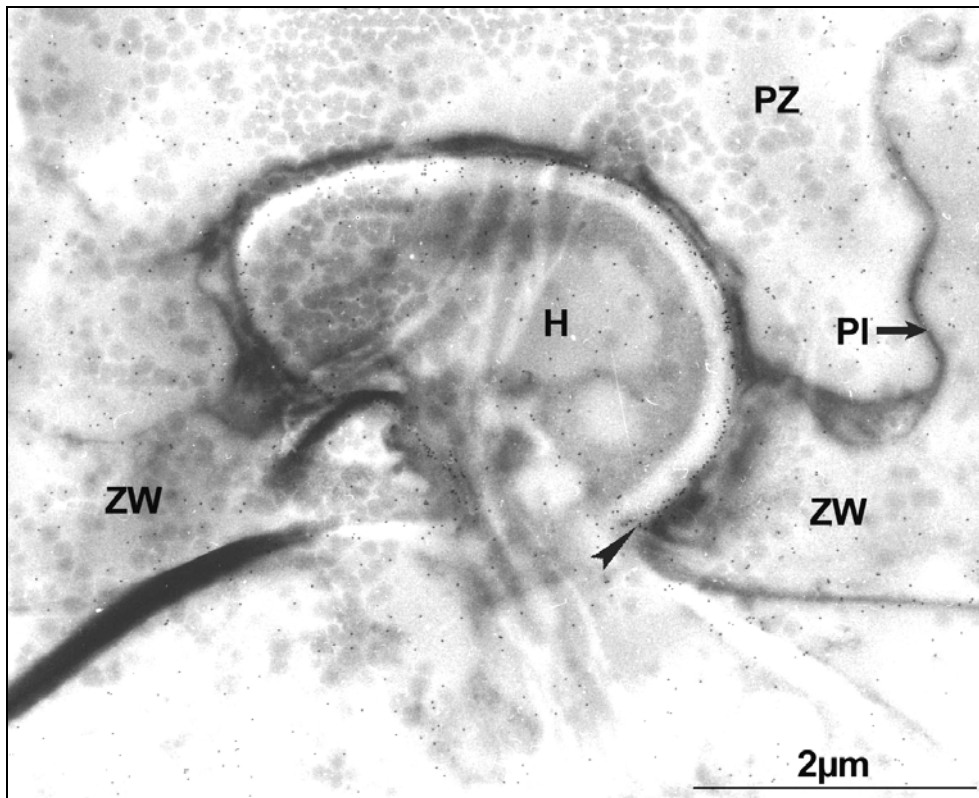
D (3.49)

**Abbildung 3.49 (A-D).** Immunofluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mit *P. quercina* infiziertem und gesundem Wurzelgewebe im Konfokalen Laser Scanning Mikroskop. **A** und **B**, Infizierte und mit spezifischen Antikörpern gegen Elicitin markierte Wurzelproben. In den Interzellularen des Rindenparenchyms befinden sich stark fluoreszierende Hyphen (Pfeilspitzen). Die in die Pflanzenzelle eindringende Hyphe ist vollständig markiert. Das Cytoplasma ist zum Teil schwach markiert. **C**, Identische Probe wie unter A und B, aber unspezifisch behandelt. Balken = 10μm. **D**, Gesunde Eichenwurzel ohne Pilz nach Behandlung mit spezifischen Antikörpern gegen Elicitin. Balken = 10μm. Rindenparenchym Rp.

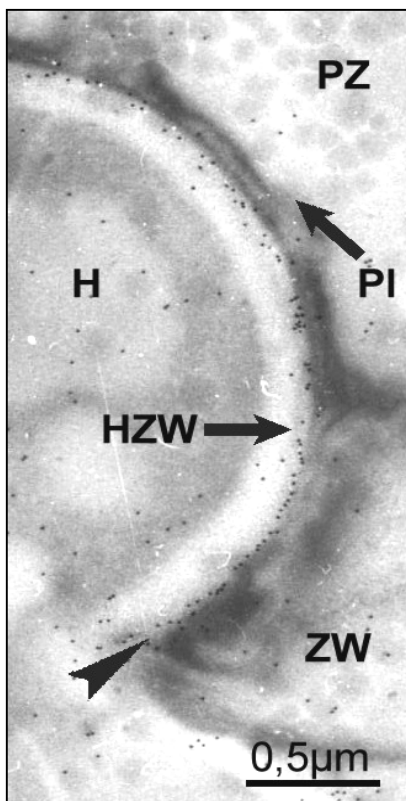
Dargestellt sind Schnitte infizierter Eichenwurzeln, markiert mit dem spezifischen anti-Cryptogein Antikörper, der, wie bereits gezeigt (Heiser et al. 1999) auch das *P. quercina* Peptid Quercinin spezifisch erkennt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte über einen Cy3-markierten sekundären Antikörper. Die Kontrollen waren zum einen infizierte Wurzeln, inkubiert in unspezifischem Kaninchen pre-immune Serum zusammen mit dem sekundären Cy3-markierten Antikörper, um auszuschließen, daß keine anderen Proteine des Kaninchenserums als die spezifischen Antikörper an das Pflanzengewebe binden (*Abbildungen* 3.48 C, 3.49 C). Zum anderen ist eine nicht infizierte Wurzel dargestellt, die ebenfalls mit dem spezifischen anti-Cryptogein Antikörper in Kombination mit dem sekundären Cy3-markierten Antikörper behandelt wurde (*Abbildungen* 3.48 D, 3.49 D).

Es wird deutlich, daß Quercinin in den Zellwänden von Hyphen im Rindenparenchym der Eichenwurzeln lokalisiert war (*Abbildungen* 3.48 A und B, 3.49 A und B). Der Zentralzylinder zeigte eine relativ starke Autofluoreszenz, so daß die spezifische Fluoreszenz der Hyphen dort nicht zu erkennen war. Unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigten infizierte Kontrollproben, die in unspezifischem Kaninchen pre-immune Serum inkubiert wurden, keine Fluoreszenz im Bereich des Rindenparenchyms (*Abbildung* 3.48 C). Diese Schnitte waren dunkel mit Ausnahme der Autofluoreszenz des Zentralzylinders. Nicht infizierte Kontrollwurzeln, inkubiert in Serum mit spezifischen Antikörpern, lieferten vergleichbare Ergebnisse (*Abbildung* 3.48 D). Die am Fluoreszenzmikroskop gewonnenen Ergebnisse wurden durch Untersuchungen am konfokalen Laser Scanning Mikroskop bestätigt. In spezifisch markierten, infizierten Proben wurden fluoreszierende Hyphen im Rindenparenchym gefunden (*Abbildung* 3.49 A und B). An wenigen Stellen wurde sogar eine Markierung am Plasmalemma der von Hyphen penetrierten Pflanzenzellen festgestellt (*Abbildung* 3.49 A). Aus *Abbildung* 3.49 B gewinnt man den Eindruck, daß das Peptid Quercinin an der Spitze der Hyphe in die penetrierte Wirtszelle abgegeben wird. Mit dem pre-immune Serum behandelte infizierte Kontrollproben zeigten keine Fluoreszenz (*Abbildung* 3.49 C). Auch bei der Kontrollprobe von nicht infiziertem Gewebe trat in Abwesenheit des Antigens erwartungsgemäß keine Fluoreszenz auf (*Abbildung* 3.49 D).

3.6.4 Immunogoldmarkierung



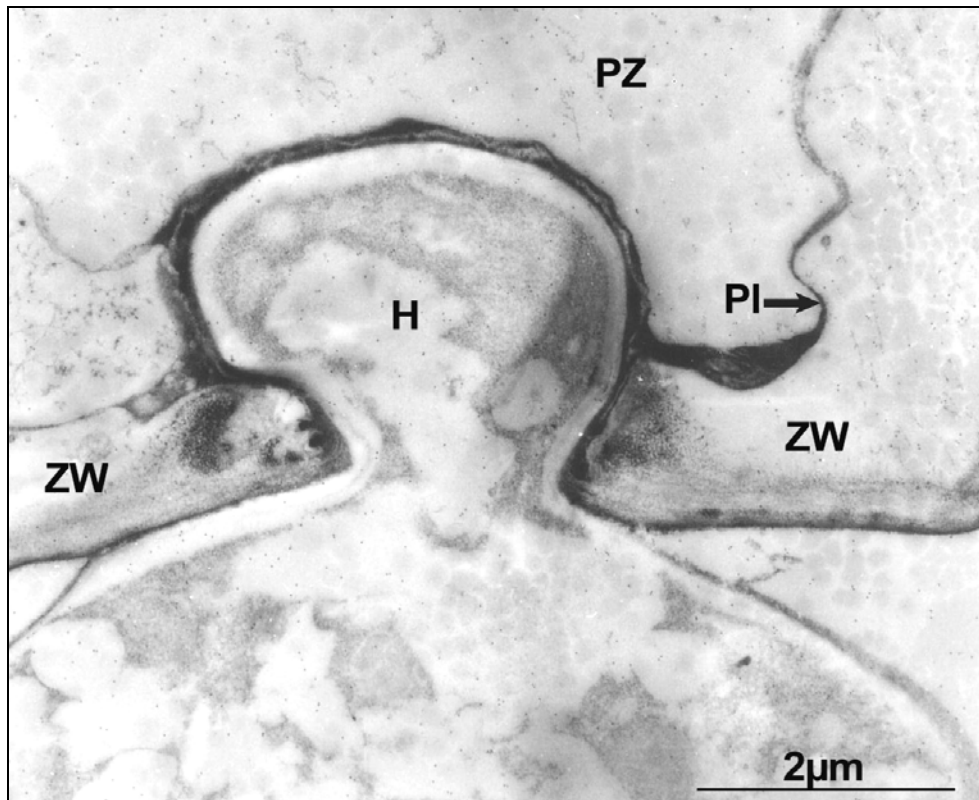
A (3.50)



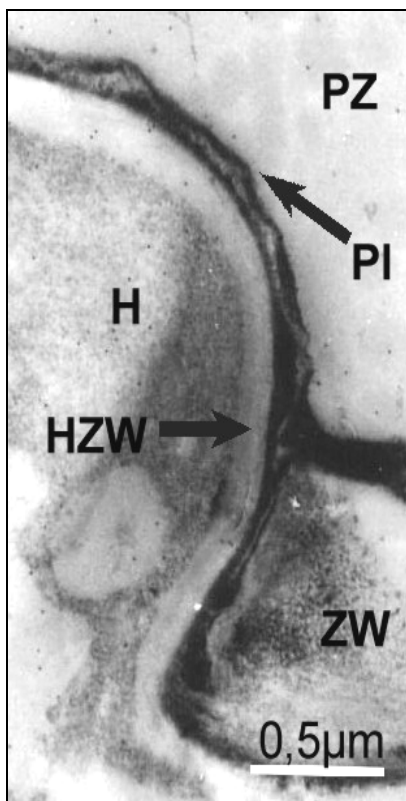
**Abbildung 3.50 (A-B).** Lokalisierung von Quercinin in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. **A**, Hyphe beim Eindringen in eine pflanzliche Zelle. Markierung mit spezifischen Antikörpern gegen Elicitin. Starke Markierung der pilzlichen Zellwand an der Penetrationsstelle der Hyphe durch die Zellwand der Pflanze (Pfeilspitze). Balken = 2µm. **B**, Detailansicht der Penetrationsstelle aus A. Deutliche Häufung von Goldpartikeln entlang der Außenseite der Hyphenzellwand. Balken = 0,5µm. Hyphe H, Zellwand der Hyphe HZW, Pflanzenzelle PZ, Plasmalemma PI, Zellwand ZW.

Anmerkung: Bei den Flecken im Hintergrund handelt es sich um Artefakte, die während der Entwicklung der Negative entstanden sind.

B (3.50)

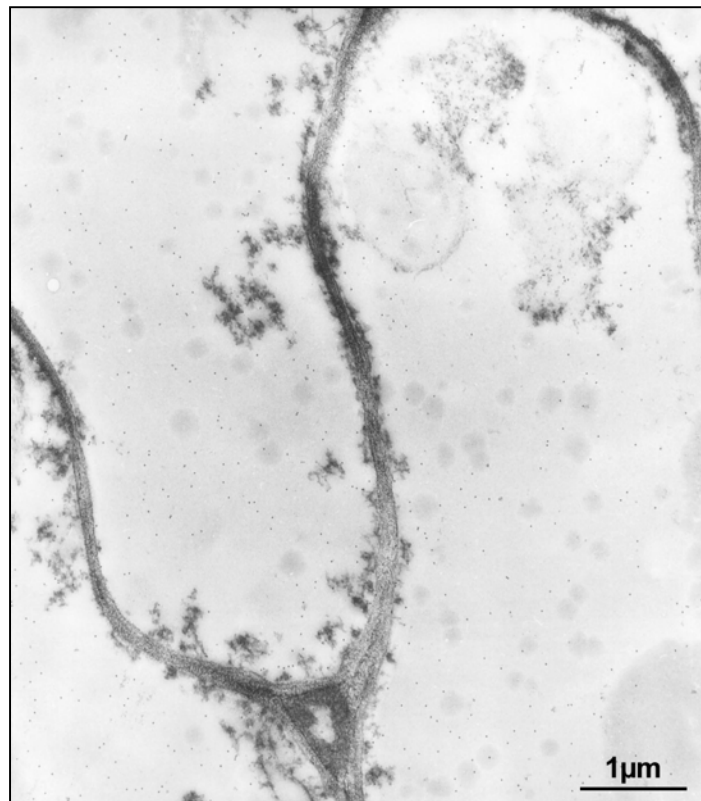


A (3.51)



B

(3.51)



C

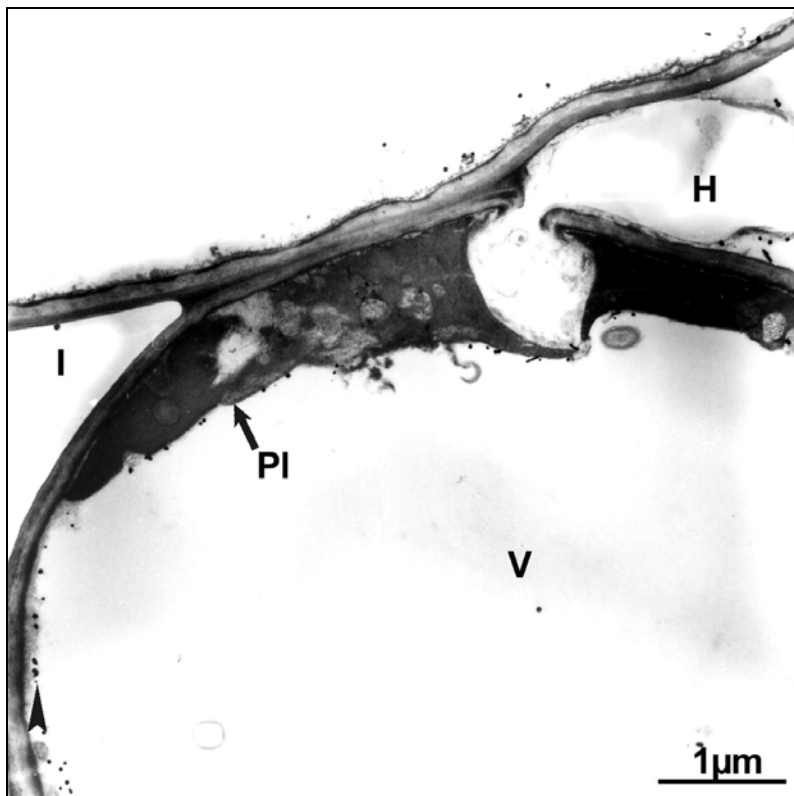
(3.51)

**Abbildung 51 (A-C)** Kontrollaufnahmen **A**, Behandlung mit unspezifischem primärem Serum. Keine spezifische Markierung. Balken = 2 $\mu$ m. **B**, Detail aus A. Balken = 0,5 $\mu$ m. **C**, Ausschnitt aus dem Rindenparenchym einer gesunden Pflanzenzelle ohne spezifische Markierung. Hyphe H, Zellwand der Hyphe HZW, Pflanzenzelle PZ, Plasmalemma PI, Zellwand ZW.

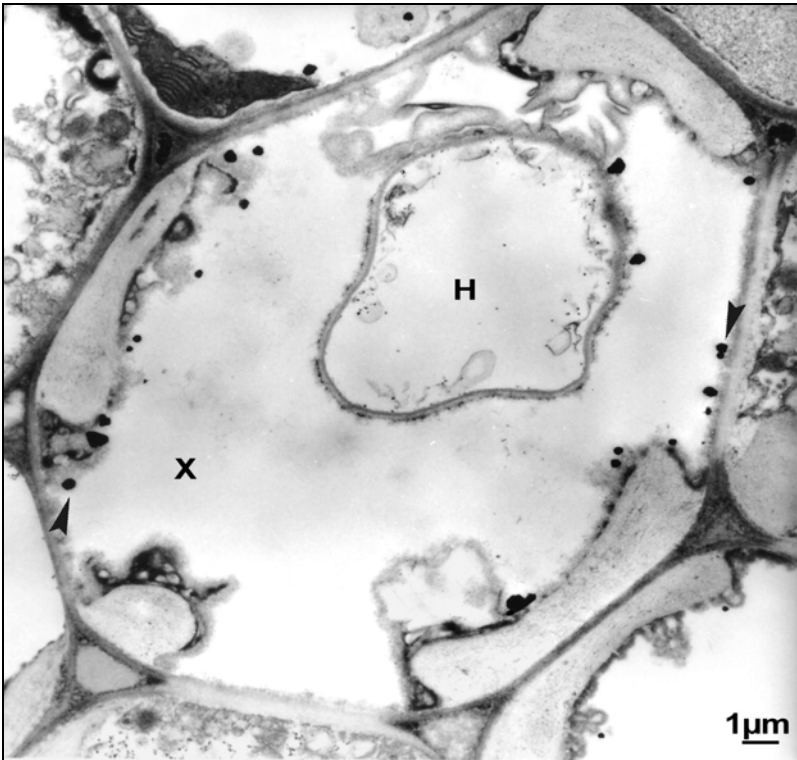
Die *Abbildungen 3.50-3.53* zeigen immunogoldmarkierte Wurzelpräparate. Die Bilder stammen aus zwei methodisch etwas unterschiedlichen Ansätzen (siehe Kapitel 2. Material und Methoden). Nach dem ersteren Verfahren war, neben einer relativ starken Hintergrundmarkierung, eine perlschnurartige Aufreihung von Goldpartikeln an der Außenseite von Hyphenzellwänden zu beobachten und zwar nur an Hyphen, die soeben in eine Pflanzenzelle eindringen oder eingedrungen waren (*Abbildung 3.50 A und B*). Die Markierung war dabei auch in jenem Bereich der Hyphe vorhanden, der sich innerhalb der Breite der pflanzlichen Zellwand befand. Bei dem unspezifisch behandelten Präparat der infizierten Wurzel sah man lediglich eine allgemeine Hintergrundmarkierung (*Abbildung 3.51 A und B*). Die Aufnahme einer gesunden Eichenwurzel, welche analog zu den infizierten Präparaten spezifisch behandelt worden war, ließ ebenfalls nur eine Hintergrundmarkierung erkennen (*Abbildung 3.51 C*).



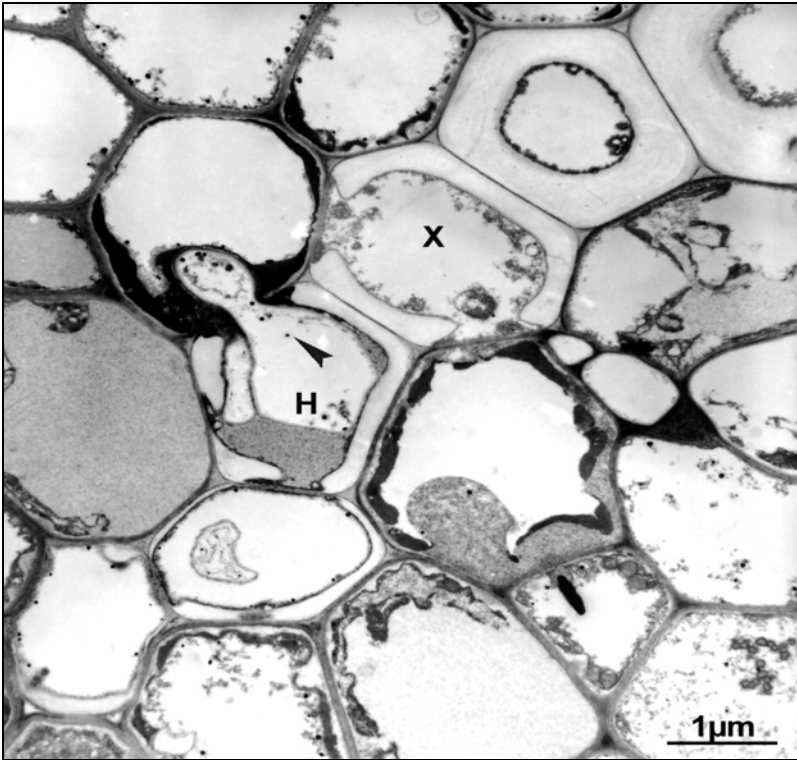
A (3.52)



B (3.52)

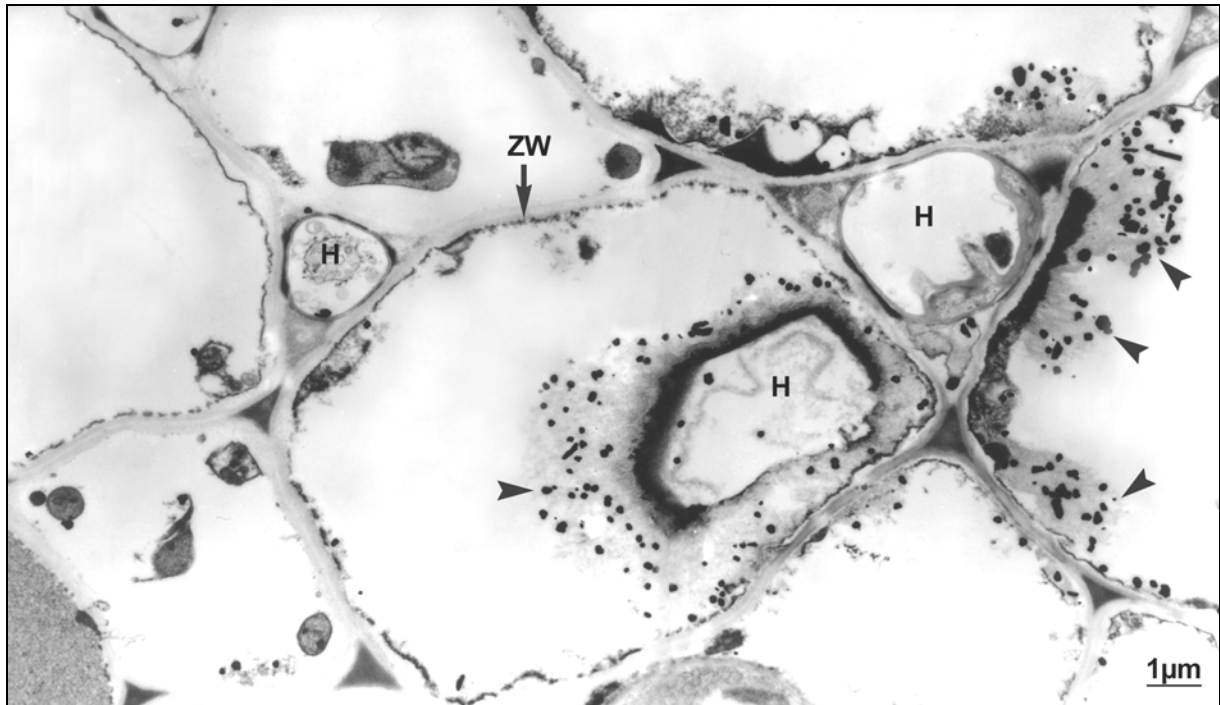


C (3.52)



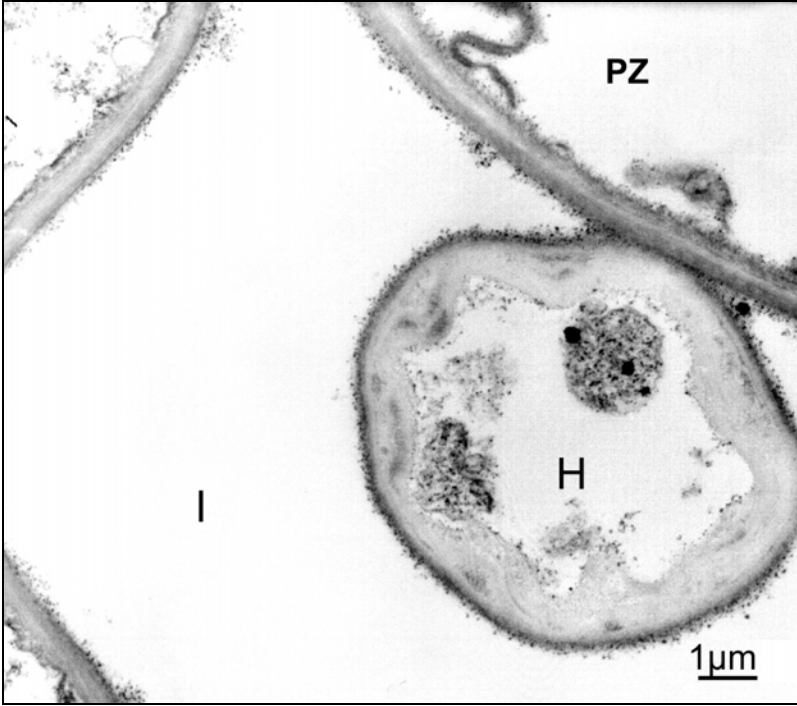
D (3.52)



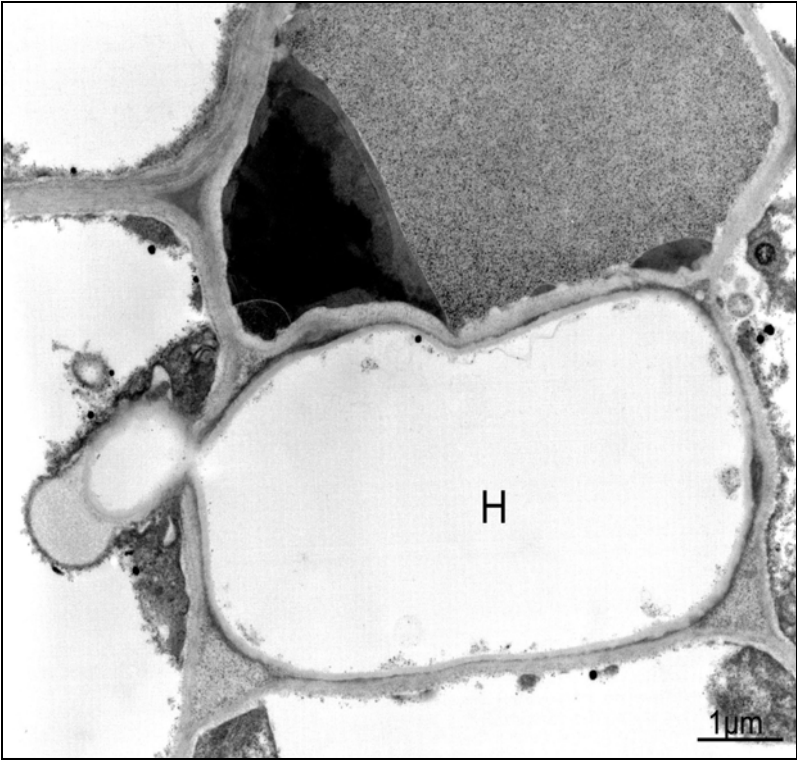


E (3.52)

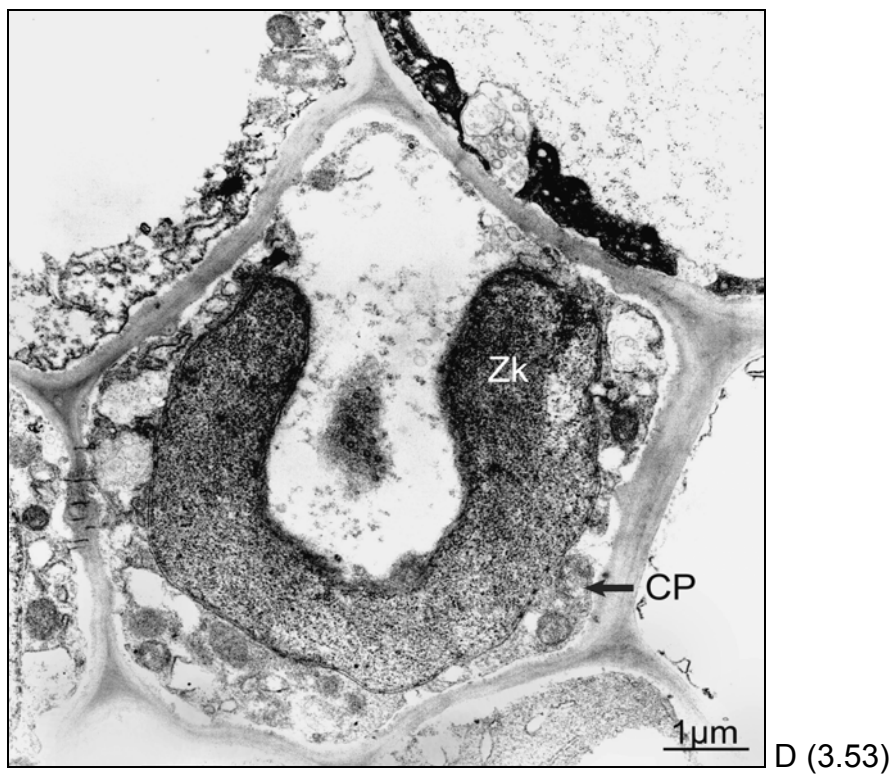
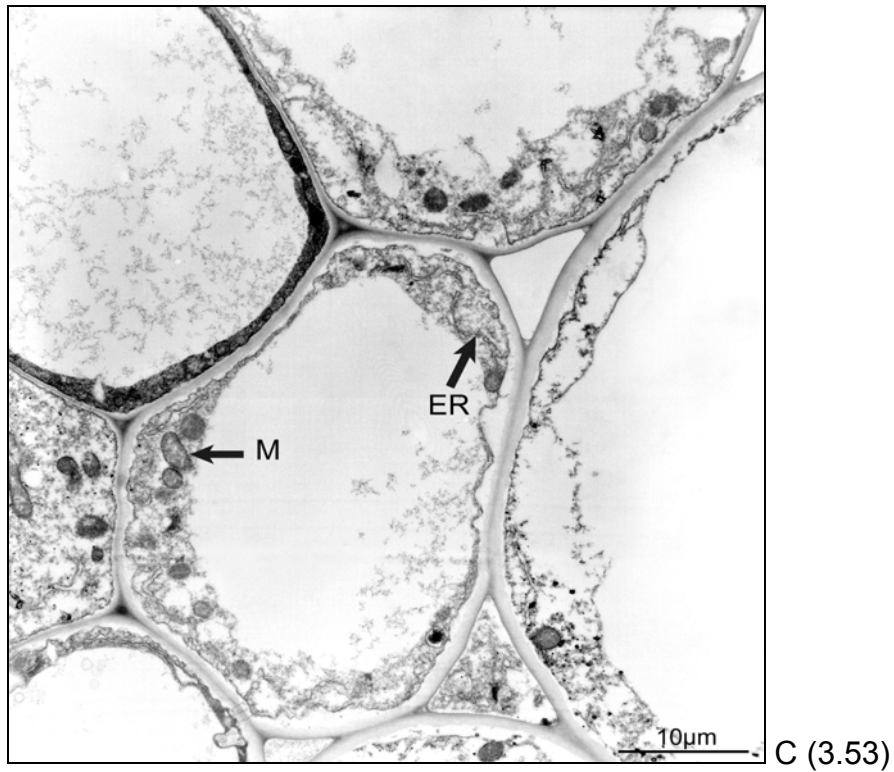
**Abbildung 3.52 (A-E).** Lokalisierung des Elicitins Quercinin in mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. **A**, Interzellulär wachsende Hyphen im Rindenparenchym. Goldpartikel der Außenseite der Hyphe und einige Markierungspunkte an der Außenseite der pflanzlichen Zellwand in der Nähe der interzellulären Hyphe. Mögliche Abwehrreaktion der Pflanzenzelle am Berührungspunkt von Hyphe und Zellwand (Pfeilspitze). Balken = 1 $\mu$ m. **B**, Hyphe beim Eindringen in eine Rindenparenchymzelle. Markierungspunkte entlang des Plasmalemmas der Wirtszelle (Pfeilspitze). Balken = 1 $\mu$ m. **C** und **D**, Hyphen im Xylem. Markierungspunkte in oder an Hyphen, sowie an der Tracheeninnenwand. **E**, Starke Markierungen einer die Hyphen umgebenden Matrix im Zellinneren (Pfeilspitzen). Balken = 1 $\mu$ m. Hyphe H, Interzellulare I, Plasmalemma PI, Pflanzenzelle PZ, Vakuole V, Xylem X, Zellwand ZW.



A (3.53)



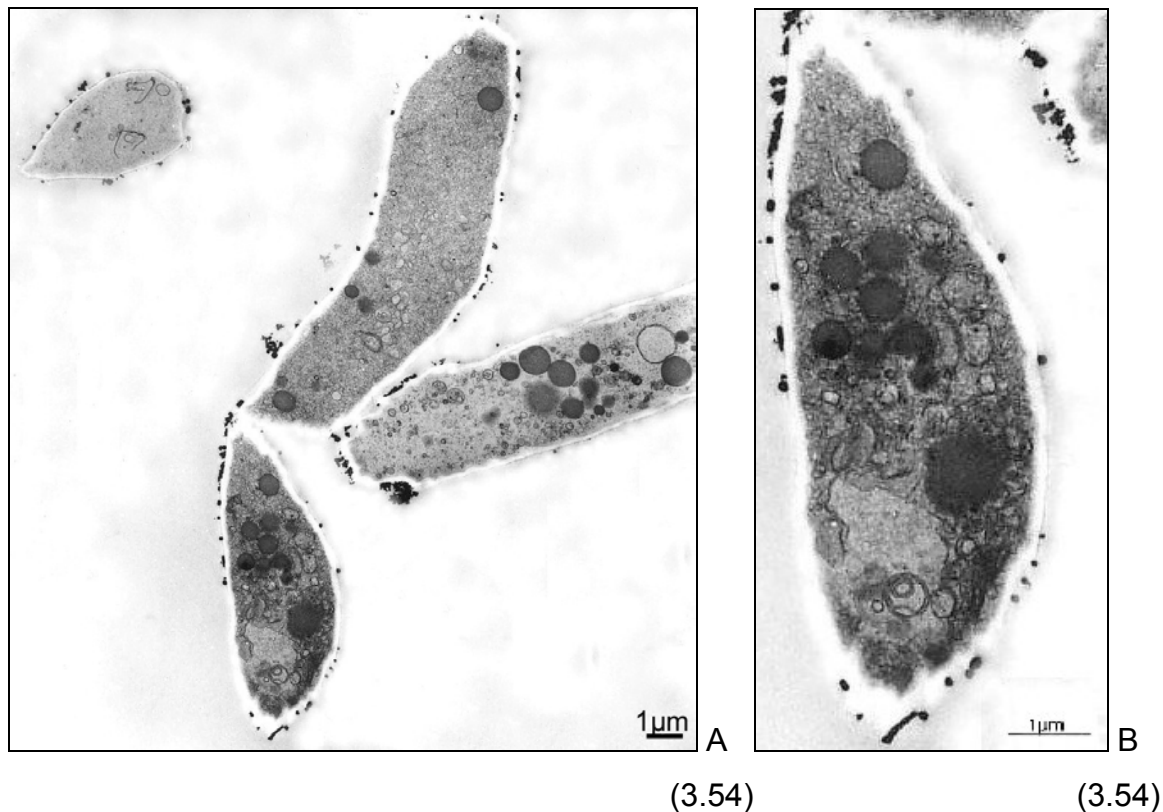
B (3.53)

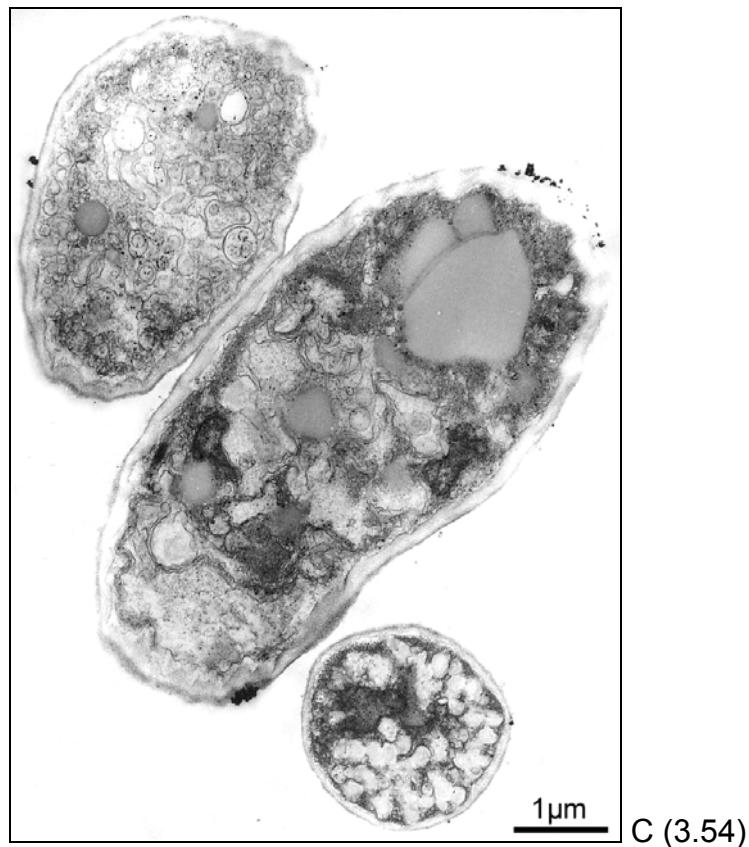


**Abbildung 3.53 (A-D).** A und B, Unspezifisch behandelte Probe einer infizierten Wurzel. Keine Markierung interzellulärer Hyphen im Rindenparenchym. Balken = 1 $\mu$ m. C und D, gesunde Kontrollwurzeln nach Behandlung mit spezifischen Antikörpern gegen Elicitin. C, Balken = 10 $\mu$ m. D, Balken = 1 $\mu$ m. Cytoplasma CP, Endoplasmatisches Retikulum ER, Hyphe H, Interzellulare I, Mitochondrien M, Plasmalemma PI, Pflanzenzelle PZ, Vakuole V, Xylem X, Zellkern ZK.

In diesem Ansatz wurde eine spezifische Reaktion der primären Antikörper mit Quercinin auch an Hyphen in Interzellularen des Rindenparenchyms beobachtet (*Abbildung 3.52 A*). Dabei befand sich die Markierung wiederum an der Außenseite der Hyphenzellwand. Einige Goldpartikel waren auch an der Außenseite von Wirtszellwänden in der Nähe interzellulärer Hyphen zu finden (*Abbildung 3.52 A*). Mitunter war auch eine schwache Markierung des Cytoplasmas von penetrierten Wirtszellen zu erkennen (*Abbildung 3.52 B*). An und in der Nachbarschaft von Hyphen, die in Protoxylemelemente eingedrungen waren, befanden sich ebenfalls einige Markierungspunkte (*Abbildungen 3.52 C und D*). In infizierten Kontrollproben, inkubiert in pre-immune Rabbitserum, waren die Zellwände der Hyphen nicht markiert. Dargestellt sind wieder zwei Situationen: zum einen eine interzelluläre (*Abbildung 3.53 A*), zum anderen eine in die Wirtszelle eingedrungene Hyphe (*Abbildung 3.53 B*). Beide Abbildungen lassen eine schwache Hintergrundmarkierung erkennen. In nicht infizierten Kontrollwurzeln war ebenfalls keine Markierung zu finden (*Abbildungen 3.53 C und D*). Alle Zellen waren voll turgeszent. Cytoplasmastrukturen, Zellorganellen und Zellkerne waren zu sehen.

#### Immunogoldmarkierungen an Myzelproben:



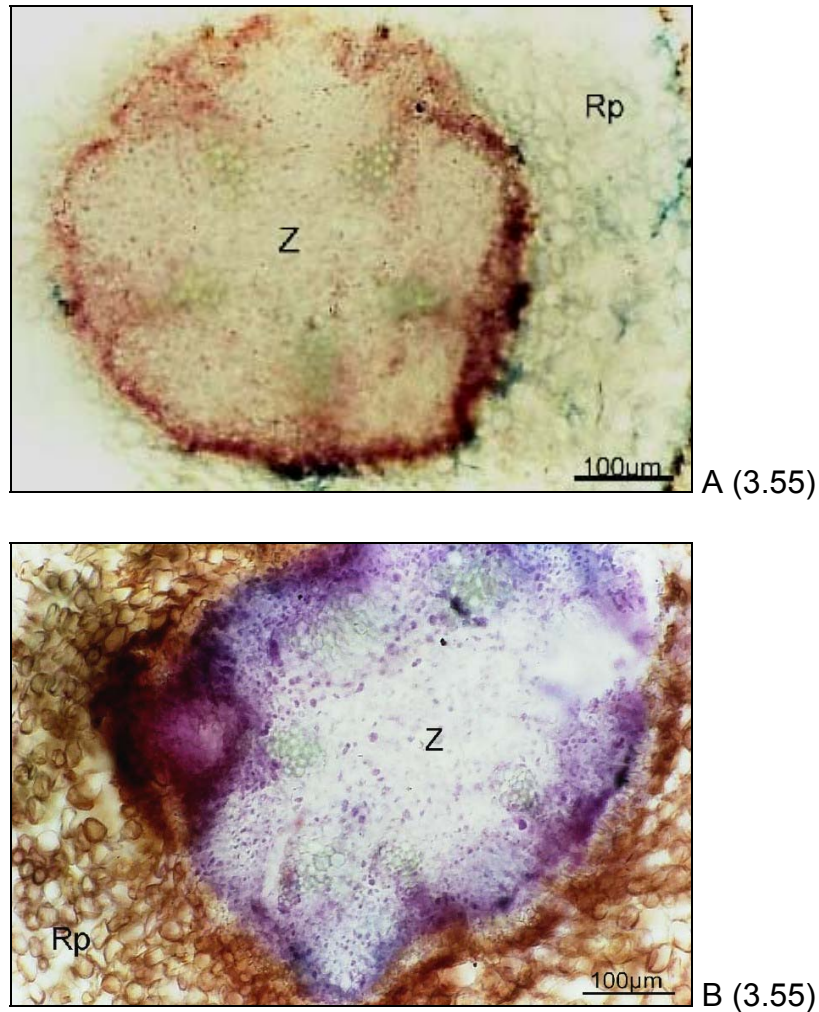


**Abbildung 3.54 (A-C).** Nachweis von Quercinin in Myzel von *P. quercina* (V8-Agarkultur) durch Immunogoldmarkierung. **A**, Quercinin, markiert von spezifischen Antikörpern gegen das Elicitin Cryptogein, an der gesamten Hyphenoberfläche. Balken = 1µm. **B**, Detail von A. Balken = 1µm. **C**, Dieselbe Probe wie A und B, aber unspezifisch behandelt. Keine Akkumulation von Goldpartikeln. Balken = 1µm.

Um die an infizierten Wurzeln gewonnenen Ergebnisse weiter abzusichern, wurde Myzel von *P. quercina* untersucht, welches auf V8-Agar kultiviert worden war. In den mit anti-Cryptogein Antikörpern behandelten Proben war Quercinin deutlich an der Außenseite von Hyphenzellwänden zu lokalisieren (*Abbildungen 53A und B*). Myzel, das in unspezifischem Kontrollserum inkubiert worden war, zeigte keine Markierung (*Abbildung 53C*).

## 3.7 Erste Untersuchung zur möglichen Induktion von Phenolen

### 3.7.1 Mikroskopischer Nachweis von Phenolen mit DMAZA



**Abbildung 3.55.** Handschnitte von Frischpräparaten von Eichenwurzeln nach Behandlung mit DMAZA. **A**, Kontrolle. Leichte Blaufärbung stellenweise im Rindenparenchym. Balken =100µm. **B**, Mit *P. quercina* infizierte Eichenwurzel. Zentralzylinder stark violett gefärbt. Keine Blaufärbung im Rindenparenchym. Balken = 100µm. Rindenparenchym Rp, Zentralzylinder Z.

Bei der hier an mikroskopischen Schnitten frischer Präparate verwendeten Methode wurde ein Verfahren eingesetzt, bei dem Phenole durch DMAZA spezifisch gefärbt werden sollten. Diese Methode ist analog zu der im Folgenden ebenfalls durchgeführten Analyse mittels HPLC, bei welcher die aus den Wurzeln extrahierten phenolischen Verbindungen mit DMAZA derivatisiert wurden. An frischem Gewebe wäre nach Behandlung mit DMAZA eine Blaufärbung von Phenolen zu erwarten gewesen.

Bei der vorliegenden Untersuchung trat nach Behandlung von gesunden Wurzeln mit DMAZA eine schwache bläuliche Färbung an einigen Stellen im Rindenparenchym auf. Der Zentralzylinder war am Rand etwas braun-rötlich gefärbt (*Abbildung 3.55 A*). Bei infizierten Eichenwurzeln war nach Inkubation in DMAZA im Rindenparenchym keine bläuliche Färbung zu finden. Das Rindenparenchym hatte eine braune Farbe. Der Zentralzylinder war dagegen stark violett gefärbt (*Abbildung 3.55 B*).

### 3.7.2 Phenolanalyse in Wurzelproben mittels HPLC

Nach Derivatisierung der Phenolextrakte von Kontroll- und mit *P. quercina* infizierten Pflanzen (siehe 2.3.4) mit DMAZA und Auftrennung in der HPLC-Anlage ergaben sich bei 640nm Absorptionskurven mit 7 Peaks. Die Peaks Nr. 2 und 5 konnten anhand von Erfahrungswerten an Apfel von Prof. Dr. D. Treutter, Lehrstuhl für Obstbau der TUM, den Stoffgruppen Gallocatechin und Catechin zugeordnet werden. Die Flächen unter den Peaks und das damit errechnete spezifische Gewicht für beide Stoffgruppen sind in *Tabelle 6* dargestellt.

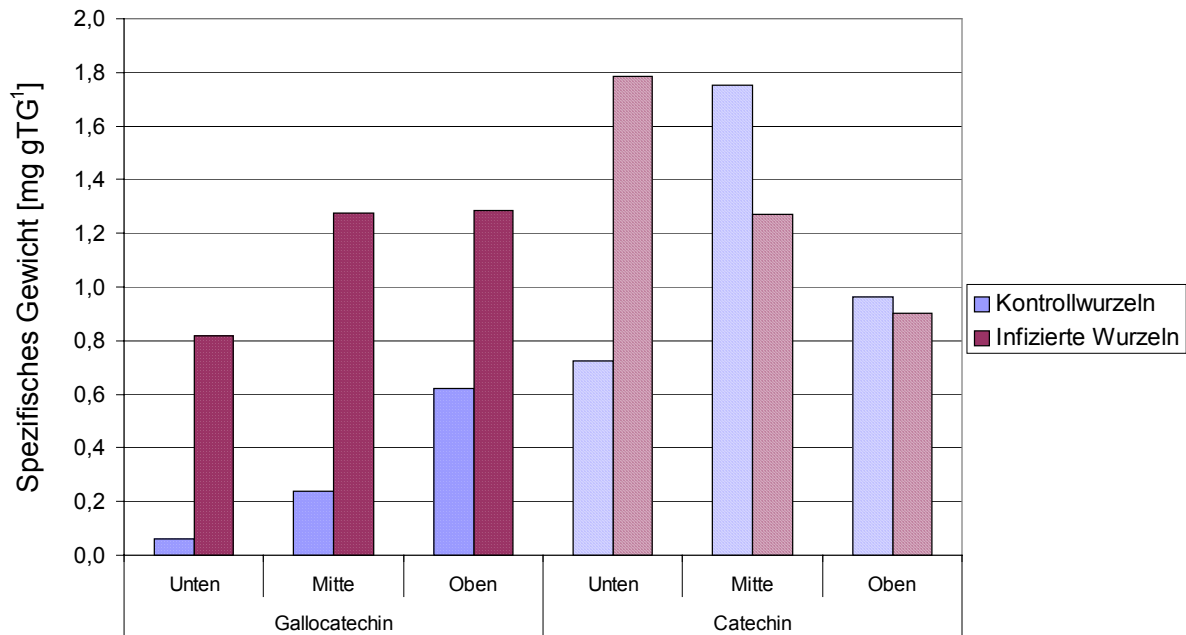
Flächen [mV min <sup>-1</sup> ]	Galocatechin				Catechin		
Peak Nr.:	1	2	3	4	5	6	7
K oben	6,5947	50,4403	2,7022	6,4298	78,0968	1,0154	2,2603
P oben	21,3917	114,1472	12,7955	6,7165	79,9690	4,1964	0,2910
K Mitte	2,3217	26,0929	2,8634	20,2976	193,4033	0,8707	3,1349
P Mitte	19,8089	119,5665	11,1410	8,9315	119,0027	3,7743	1,5459
K unten	1,1230	7,0309	1,5730	5,0149	85,9388	0,1203	1,4336
P unten	12,4218	82,9304	10,1050	15,8073	181,1684	1,6360	1,2361

Spezifisches Gewicht [mg gTG <sup>-1</sup> ]	Galocatechin				Catechin		
Peak Nr.:	1	2	3	4	5	6	7
K oben	0,0813	0,6221	0,0333	0,0793	0,9633	0,0125	0,0279
P oben	0,2412	1,2872	0,1443	0,0757	0,9018	0,0473	0,0033
K Mitte	0,0210	0,2361	0,0259	0,1837	1,7500	0,0079	0,0284
P Mitte	0,2115	1,2768	0,1190	0,0954	1,2708	0,0403	0,0165
K unten	0,0095	0,0592	0,0132	0,0422	0,7235	0,0010	0,0121
P unten	0,1225	0,8177	0,0996	0,1559	1,7864	0,0161	0,0122

**Tabelle 3.6.** Auftrennung von Phenolextrakten gesunder und mit *P. quercina* infizierter Wurzeln mittels HPLC. Die Wurzeln wurden in 3 Segmente unterteilt. 'Unten' entspricht dem infizierten Wurzelspitzenbereich, 'Mitte' entspricht einem Übergangsbereich und 'Oben' entspricht einem nicht infizierten oberen Wurzelabschnitt. Dargestellt sind die Flächen der einzelnen Peaks und die damit berechneten spezifischen Gewichte der phenolischen Verbindungen. Es wurden Sammelproben von jeweils 6 Pflanzen untersucht.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.56.** Gallocatechin und Catechin in gesunden und mit *P. quercina* infizierten Eichenwurzeln. Die Wurzeln wurden in 3 Segmente unterteilt. 'Unten' entspricht dem infizierten Wurzelspitzenbereich, 'Mitte' entspricht einem Übergangsbereich und 'Oben' entspricht einem nicht infizierten oberen Wurzelabschnitt.

In nicht infizierten Eichenwurzeln nahm der Anteil an Gallocatechin in der Wurzel nach oben hin zu (*Abbildung 3.56*, dunkelblaue Balken). Nach der Infektion mit *P. quercina* im Bereich der Wurzelspitze war der Anteil an Gallocatechin in allen Wurzelabschnitten drastisch erhöht, wobei die steigende Tendenz von unten nach oben in der Wurzel erhalten blieb (*Abbildung 3.56*, dunkelrote Balken). Auch für die Verbindung Catechin ergab sich eine Induktion nach Pathogenbefall im unteren Wurzelbereich, wogegen im mittleren und oberen Wurzelabschnitt keine erhöhte Catechinbildung auftrat (*Abbildung 3.56*, hellblaue und hellrote Balken).



## 4 DISKUSSION

### **4.1 *Phytophthora quercina* beeinträchtigte die Physiologie junger Stieleichen negativ.**

Bevor auf den Einfluß des Pathogens *Phytophthora quercina* auf die physiologische Leistungsfähigkeit von *Quercus robur* L. eingegangen wird, sollen die gemessenen physiologischen Größen an sich diskutiert und mit anderen Arbeiten verglichen werden, um sich eine Vorstellung von der Konstitution der verwendeten Versuchspflanzen zu machen. *Quercus robur* L. wird zu den lichtliebenden Baumarten gezählt (Gross et al. 1996). Die photosynthetisch aktive Strahlung, denen ausgewachsene Bäume im Freiland ausgesetzt sind, ist um ein Vielfaches höher als die hier bei der Pflanzenanzucht im Gewächshaus herrschende. Bei den hier verwendeten Versuchspflanzen handelt es sich um an Schattenbedingungen gewöhnte Eichen. Untersuchungen von Schatteneffekten auf die Physiologie von Stieleichen zeigten, daß sich unter diesen Bedingungen größere Blätter mit weniger Stomata pro Blattflächeneinheit, mehr Chlorophyll pro Trockengewicht und einem höheren Chlorophyll / Carotinoid-Verhältnis bilden (Gross et al. 1996). Die Leitfähigkeit für Wasserdampf ist unter Schattenbedingungen geringer und ebenso die Netto-Photosyntheserate – eine ausreichende Wasserversorgung vorausgesetzt. Behält man die genannten Voraussetzungen vor Augen, so werden die allgemein relativ niedrigen physiologischen Werte der verwendeten Versuchspflanzen verständlich.

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde in einem über eine ganze Vegetationsperiode angelegten Versuch an getopften Eichensämlingen im Gewächshaus das Verhalten der infizierten Pflanzen über einen Zeitraum von sechs Monaten beobachtet. Dabei wurde die Infektion der in infiziertem Substrat wachsenden Eichen durch Flutung gesetzt und monatlich durch wiederkehrende Flutungszyklen immer wieder angestoßen. Kontrollpflanzen wurden einer gleichen Behandlung bei fehlendem Inokulum unterzogen. Dadurch konnte ein monatlicher Vergleich von kranken und gesunden Bäumen durchgeführt werden.

Es war zu bemerken, daß *P. quercina* an den hier verwendetet noch sehr jungen Eichen von den Wurzeln aus eine sehr schnelle Veränderung der an den Blättern meßbaren physiologischen Leistungen der Pflanzen bewirkte. Netto-Photosyntheserate (A) (*Abbildung 3.1*), Transpirationsrate (E) (*Abbildung 3.2*) und Leitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ) (*Abbildung 3.3*) sanken bereits drei Tage nach der Infektion um fast 20% gegenüber den zeitgleich gemessenen Kontrollwerten ab. Ähnliche Untersuchung von Schaffer und Ploetz (1987) an Avocadosämlingen, infiziert mit dem Wurzelpathogen *Phytophthora cinnamomi*, zeigten vergleichbare Reaktionen. Eine signifikante Reduktion von A, E und  $g_{H_2O}$  wurde hier nach einer Woche gemessen. Die Unterschiede zu den nicht inokulierten Pflanzen vergrößerten sich nach 2 und 3 Wochen noch.

Dieses Phänomen wurde in einem weiteren Versuchsansatz an Eichensämlingen mit soeben ausdifferenzierten Blättern bestätigt. Hier wurde die Infektion ohne Substrat in Wasser gesetzt, indem eine Zoosporensuspension als Inokulum diente. Bereits nach einem Tag wurde eine Reduktion der Netto-Photosyntheserate um nahezu 20% gemessen (*Abbildung 3.5*). Noch gravierender waren die Verluste bei der Transpirationsrate (*Abbildung 3.6*) und Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.7*). Junge Pflanzen schienen besonders anfällig gegenüber *P. quercina* zu sein. An zweijährigen Eichen konnte eine so kurzfristige Schädigung von Netto-Photosyntheserate und Wasserhaushalt nicht beobachtet werden (*Abbildungen 3.10-3.12*). Allerdings ist es interessant, die parallel aufgenommen Ergebnisse der Chlorophyllfluoreszenzmessungen damit zu vergleichen. Diese werden im einzelnen noch weiter unten diskutiert (siehe 4.1.2). Hier soll nur darauf hingewiesen werden, daß auch an den zweijährigen Eichen drei Tage nach der Infektion eine signifikante Reduktion der Chlorophyllfluoreszenz im Licht auftrat (*Abbildung 3.14*), wohingegen sich die Netto-Photosyntheseraten von Kontroll- und infizierten Pflanzen zu diesem Zeitpunkt zwar geringfügig, aber nicht signifikant unterschieden (*Abbildung 3.10*).

##### 4.1.1 Zur Erklärung der Reduktion der Netto-Photosyntheserate sind verschiedene Ursachen denkbar.

Zu den Mechanismen, die bei kranken Pflanzen im einzelnen zu einer verminderten Netto-Photosyntheserate führen können, sind noch wenige Untersuchungen gemacht worden. Viele Gründe sind denkbar, die bei den vorliegenden Untersuchungen zu

einer Reduktion der Netto-Photosyntheserate infolge der Infektion geführt haben könnten. Zum einen könnte eine Schädigung im Wasserhaushalt der Störung bei der CO<sub>2</sub>-Fixierung vorausgegangen sein. Zahlreiche Arbeiten belegen, daß die Netto-Photosyntheserate bei Wassermangel niedriger ist als bei ausreichender Wasserversorgung (Dougherty und Hinckley 1981, Epron et al. 1992, Roupsard et al. 1996, Weber und Gates 1990). Denkbar ist auch eine Reduktion der CO<sub>2</sub>-Fixierung über biochemische Prozesse, die von pilzlichen Toxinen ausgelöst werden könnten. Damit ist das Thema der Funktion der Elicitin-Proteine angeschnitten, welche *P. quercina*, wie auch zahlreiche andere *Phytophthora*-Arten, synthetisiert. Die Lokalisation des Elicitins Quercinin in der Wurzel und der mögliche Transport in der Pflanze soll aber erst weiter unten ausführlicher diskutiert werden (siehe 4.9.2 und 4.9.3). Interessant ist, an dieser Stelle die Arbeit von McDonald und Cahill (1999) zu erwähnen. Dort wird für das Wirt-Pathogen-System Sojabohne-*Phytophthora sojae* ein Faktor beschrieben, welcher das Schließen von Stomata induziert. Dieser Faktor wirkte sowohl direkt an den Stellen, an welchen vom Pathogen hypersensitiver Zelltod induziert wurde als auch in einiger Entfernung davon. Für die Untersuchungen wurden an der Epidermis nach entsprechender Präparation die Öffnungsweiten der Stomata gemessen.

Möglich ist auch eine endogene Regulation der Photosynthese über die Veränderung des Phytohormonspiegels als Folge der Wurzelinfektion (Sharkey 1985). Wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten morphologischen Untersuchungen belegten, wurde vor allem das Feinwurzelsystem der Pflanzen gravierend durch den Pilz geschädigt (*Abbildung 3.24*. Morphologische Veränderungen werden im einzelnen unter 4.6 angesprochen.). Dies könnte zu einer verminderten Synthese von Cytokininen, die bei Keimlingen im Wurzelapex gebildet werden (Mohr Schopfer 1992), geführt haben. Cahill et al. (1986) belegten dies für mit *Phytophthora cinnamomi* infizierte Eukalyptus-Sämlinge. Nach Kende 1971 ist die Cytokinin-Versorgung von den Wurzeln her notwendig, um Chlorosen und Proteinabbau zu verhindern. Cytokinine stimulierten die Bildung von Chlorophyll und die Proteinsynthese, begleitet von einer Öffnung der Stomata (Farquhar und Sharkey 1982). Bei fehlendem Cytokinin durch den Verlust an intakten Wurzelspitzen könnten bei den hier behandelten Versuchen dementsprechend die umgekehrten Effekte eingetreten sein. Allerdings war ein durch die Infektion verminderter Chlorophyllgehalt bei den Versuchspflanzen nicht meßbar (*Abbildungen 3.18 und 3.19*).

Abscisinsäure (ABA) kann ebenfalls im Zusammenhang mit einer Schädigung des Wurzelsystems diskutiert werden. Bei Trockenstreß wird ABA von den Wurzeln freigesetzt und über den Xylemstrom in die Blätter transportiert, wo sie das Schließen der Stomata induziert (Triboulot et al. 1996). Bei verschiedenen Baumarten sind bei Trockenstreß höhere Konzentrationen an ABA im Xylemsaft und in Apoplasten von Blättern nachgewiesen worden (Triboulot et al. 1996). Für die hier diskutierten Versuche bedeutet dies, daß eine durch den starken Verlust an Feinwurzeln zu Trockenstreß analoge Situation (siehe hierzu auch 4.1.3) möglicherweise über erhöhte ABA-Konzentrationen zu niedrigeren Netto-Photosynthese- und Transpirationsraten geführt haben könnte. Solche möglichen Veränderungen der Cytokinin- und ABA-Konzentrationen müßten bei dem hier behandelten Wirt-Pathogen-System noch weiter untersucht werden.

#### 4.1.2 Chlorophyllfluoreszenzmessungen zeigten die infektionsbedingte Reduktion der photochemischen Effizienz.

Als Indikator für alle Prozesse, welche die Photosynthese mehr oder weniger direkt beeinflussen, kann auch die Chlorophyllfluoreszenz dienen (Schreiber und Bilger 1993). Die Fluoreszenzausbeute steht, umgekehrt proportional, in direktem Zusammenhang mit der Photosynthese (Schreiber 1997). Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden in zwei Versuchsansätzen, einmal an in Wasser kultivierten jungen Eichensämlingen mit soeben ausdifferenzierten Blättern, zum anderen an zweijährigen getopften Eichen, parallel zu Gaswechselfmessungen durchgeführt. Die Chlorophyllfluoreszenz wurde einerseits im Dunkeln am Ende der Dunkelphase gemessen ( $F_v/F_m$ ), andererseits unter Lichtbedingungen ( $\Delta F/F_m'$ ). Bei den jungen Eichensämlingen ebenso wie bei den zweijährigen Pflanzen traten im Dunkeln keine infektionsbedingten Veränderungen auf. Die Quantenausbeute Yield (Quantum Yield) lag in beiden Fällen nahe dem postulierten Wert von 0,83 rel. Units (vgl. *Abbildung 2.5*, Abschnitt 2.6.1). Das bedeutet, daß bei beiden Behandlungen ähnliche Werte für  $F_0$  und  $F_m$  vorlagen. Ein Anstieg von  $F_0$  hätte auf einen Schaden am PSII hinweisen können (Krause und Weis 1984), was hier nicht der Fall zu sein scheint. Im Licht änderte sich das Verhalten. Bei den jungen Eichensämlingen traten über den Versuchszeitraum von 14 Tagen immer größere Unterschiede zwischen gesunden und kranken Pflanzen auf (*Abbildung 3.9*). Die Wurzelinfektion

mit *P. quercina* führte hier zu einer Abnahme der Quantum Yield-Werte um bis zu ca. 40%. Eine ähnliche Situation war auch bei den zweijährigen Eichen zu beobachten (Abbildung 3.14). Schreiber und Bilger (1993) weisen darauf hin, daß eine verringerte PSII Quantenausbeute im Licht,  $\Delta F/F_m'$ , bei gleichbleibender PSII Quantenausbeute dunkeladaptierter Pflanzen,  $F_v/F_m$ , auf Schäden auf der Ebene der enzymatischen Dunkelreaktionen hindeuten könnte. Untersuchungen von Luque et al. (1999) an mit *Phytophthora cinnamomi* infizierten einjährigen Korkeichen, *Quercus suber* L., belegten ebenfalls eine Verminderung der photochemischen Effizienz durch das Pathogen. Dreißig Tage nach der Infektion traten hier signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und infizierten Eichen auf.

Eine weitere Ursache für eine verminderte photochemische Effizienz kann bei der durch Feinwurzelverlust bedingten Störung des Wasserhaushalts zu suchen sein. Durch die Schädigung von Feinwurzeln kann es für die Pflanzen zu einer ähnlichen Situation kommen, wie sie auch bei Trockenstreß vorliegt. Wie Untersuchungen von Epron et al. (1992) an *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. zeigten, sinkt unter diesen Bedingungen auch die photochemische Effizienz. Detailliertere Versuche zur Reaktion der photochemischen Effizienz von PSII auf Trockenstreß wurden von Epron und Dreyer (1992) an *Q. petraea* durchgeführt. Das nicht photochemische ( $q_{NP}$ ) und das photochemische ( $q_P$ ) Quenching wurden von der genannten Arbeitsgruppe bei zunehmendem Wasserdefizit gemessen. Nach anfänglicher Steigerung von  $q_{NP}$  bei unverändertem  $q_P$  nahmen bei zunehmendem Wasserdefizit beide Größen ab, begleitet von Veränderungen in der Membranstruktur auf zellulärer Ebene. Eine Veränderung von  $\Delta F/F_m'$  (Quantum Yield unter Lichtbedingungen; im Original bezeichnet als  $F_v/F_m$ ) war allerdings erst bei sehr starkem Trockenstreß meßbar, was auf eine größere Toleranz gegenüber Trockenheit bei dieser Eichenart hinweist. Die Versuchspflanzen waren, wie oben erwähnt, an Schattenbedingungen bei ausreichender Bewässerung gewöhnt, wodurch eine schnellere Reaktion von Quantum Yield auf die Infektion, bzw. den dadurch erzeugten Trockenstreß erklärt werden kann.

4.1.3 Infektionsbedingte Störungen im Wasserhaushalt führten zu einer Reduktion der Transpirationsrate ( $E$ ) und der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf ( $g_{H_2O}$ ).

Bei der Transpirationsrate  $E$  und der stomatären Leitfähigkeit für Wasserdampf  $g_{H_2O}$  entwickelten sich infektionsbedingt signifikante Unterschiede zu den Kontrollen. In dem 1998 von Mai bis Oktober laufenden Infektionsversuch traten signifikante Unterschiede bei  $E$  und  $g_{H_2O}$  von Juni bis September auf (*Abbildungen* 3.2 und 3.3). Bestätigt wurden diese Ergebnisse an in Wasser über Zoosporen infizierten Eichensämlingen (*Abbildungen* 3.6 und 3.7). Bei dem hier durch die Zoosporensuspension vorliegenden starken Infektionsdruck sanken  $E$  und  $g_{H_2O}$  bereits am Tag nach der Infektion hoch signifikant gegenüber den Kontrollwerten (*Abbildungen* 3.6 und 3.7). Eine der Ursachen für das Absinken von  $E$  und  $g_{H_2O}$  nach Infektion könnte die Schädigung des Wurzelsystems sein. Dadurch wird die Wasserleitung in der Pflanze behindert (Ayres 1980, Sterne et al. 1978), wie bereits im Zusammenhang mit dem Verhalten von Netto-Photosyntheserate und photochemischer Effizienz (4.1.1 und 4.1.2) angedeutet worden ist. Die fehlende Nachleitung von Wasser aus der Wurzel kann Trockenstreß erzeugen, welcher eine verminderte Transpirationsrate und stomatären Leitfähigkeit bedingt (Ayres 1980). Zu diesem Ergebnis führten auch die Untersuchungen von Luque et al. (1999) am Infektionssystem Korkeiche-*Phytophthora cinnamomi*. Sterne et al. (1978) führten bereits 1978 Versuche an Avocado-Bäumen durch, die natürlicherweise mit *P. cinnamomi* infiziert waren. Auch hier war eine Reduktion von  $E$  und  $g_{H_2O}$  im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollbäumen festzustellen. Der Beleg, ob bei den in den vorliegenden Versuchen eingesetzten Pflanzen tatsächlich eine zu Trockenstreß analoge Situation vorlag, müßte durch Messung des Blatt-Wasserpotentials noch erbracht werden. Für das Wirt-Parasit-System Avocado-*P. cinnamomi* liegen von Sterne et al. (1978) Messungen des Xylemdruckpotentials (entspricht dem Blatt-Wasserpotential) vor. Dieses lag sowohl tagsüber als auch nachts bei erkrankten Bäumen niedriger als bei gesunden. Diese Beobachtung spricht also für Trockenstreß nach *Phytophthora*-Infektion.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die Frischgewichte der Blätter und die Blattflächen erfaßt. Der Quotient Frischgewicht / Blattfläche, der für die einzelnen Pflanzen ermittelt wurde, war von der Infektion mit *P. quercina* nicht beeinflusst (*Abbildung* 3.17). Es könnte jedoch sein, daß sich deutliche Welkesymptome im

System Stieleiche-*P. quercina* erst über einen längeren Zeitraum entwickeln. Welke ist an sich ein charakteristisches Merkmal von Wurzelinfektionen, auch bei feuchten oder sogar nassen Standortbedingungen, wie z.B. bei der Wurzelfäule an *Carthamus tinctorius* durch *Phytophthora cryptogea (drechsleri)* (Ayres 1980). Einen Beleg für den infektionsbedingten Wassermangel liefern von Ayres (1980) beschriebene Versuche an *Carthamus tinctorius*, bei denen Blätter infizierter ebenso wie gesunder Pflanzen abgeschnitten und mit Wasser versorgt wurden. Blätter beider Behandlungen erreichten bei diesen Untersuchungen denselben relativen Wassergehalt.

## **4.2 Infektionsbedingte Chlorosen entwickeln sich wahrscheinlich erst über einen längeren Zeitraum.**

Bei einer Wurzelinfektion entstehen oft Chlorosen, bevor es zu deutlichen Welkesymptomen kommt (Ayres 1980). Die Bonitur der 1998 von Mai bis Oktober untersuchten Pflanzen ergab ab Juli geringfügig stärkere Chlorosen bei den infizierten Pflanzen (*Abbildung 3.15*). Bis Oktober wurden die Unterschiede zu den Kontrollpflanzen etwas deutlicher. Die Bestimmung der Gehalte an Chlorophyll a und b und an Carotinoiden ergab aber keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollwerten (*Abbildungen 3.18-3.19*). Diese Ergebnisse lassen, im Vergleich zu den im Freiland zu beobachtenden Schäden an Eichen (Donaubauer 1998, Jung und Blaschke 1996), vermuten, daß zur Ausbildung deutlicher oberirdischer Symptome ein längerer Zeitraum notwendig sein könnte.

## **4.3 Infektionsversuch 1998: Einige Meßgrößen wichen im Juli vom erwarteten Kurvenverlauf ab; Am Ende der Vegetationsperiode erholte sich das System wieder.**

In dem 1998 von Mai bis Oktober durchgeführten Infektionsversuch trat im Juli bei den physiologischen und morphologischen Messungen ein deutlicher, nicht dem sonstigen Kurvenverlauf folgender Einbruch auf. Sowohl Kontrollpflanzen als auch

infizierte Eichen waren davon betroffen. Sämtliche ermittelten physiologischen Daten, wie die Netto-Photosyntheserate (*Abbildung 3.1*), die Transpirationsrate (*Abbildung 3.2*) und die Leitfähigkeit für Wasserdampf (*Abbildung 3.3*) waren in diesem Monat niedriger als erwartet. Dasselbe Verhalten zeigten auch die wurzelmorphologischen Auswertungen. Hier waren die Kontrollwerte niedriger als erwartet (Root Length Density *Abbildung 3.21*, Specific Root Length *Abbildung 3.22*, Root Tip Density *Abbildung 3.23*). Dadurch traten in diesem Monat nach der statistischen Auswertung bei den genannten Meßgrößen keine signifikanten Unterschiede auf. Wie aus *Abbildung 3.24* für die Root Length Density der Feinwurzeln und *Abbildung 3.27* für die Root Length Density der Grobwurzeln hervorgeht, sind die Abweichungen der Meßgrößen für das Gesamtwurzelsystem auf eine Abnahme an Feinwurzeln, besonders bei den Kontrollpflanzen, und ein unerwartet starkes Wachstum an dickeren Grobwurzeln, wiederum verstärkt bei den Kontrollpflanzen, zurückzuführen.

An den Blättern konnten im Juli keine makroskopischen Veränderungen beobachtet werden. Auch das Verhältnis von Frischgewicht zu Blattfläche war in diesem Monat nicht anders als sonst (*Abbildung 3.17*). Die Bestimmung der Gehalte an Chlorophyll a und b ergab ebenfalls keine Abweichungen (*Abbildungen 3.18* und *3.19*). Allerdings war der Gehalt an Carotinoiden sowohl bei Kontroll- als auch bei infizierten Pflanzen im Juli unerwartet hoch (*Abbildung 3.20*).

Die immunologischen Untersuchungen zum Nachweis von *P. quercina* in den Wurzeln ergaben für Juli bei den infizierten Pflanzen plausible Werte (*Abbildung 3.30*). Im allgemeinen ging aber die Nachweisbarkeit für das Pathogen in diesem Monat zurück, was seinen Grund wahrscheinlich in der Zersetzung infizierter Feinwurzelbereiche hatte. Infizierte Feinwurzeln fehlten infolge dessen möglicherweise bei der Präparation der Wurzeln für den Immunoassay. Durch den unterschiedlichen Zersetzungsgrad der infizierten Feinwurzeln kamen vermutlich auch die großen Abweichungen zwischen den einzelnen Pflanzen zustande. Bei den Kontrollpflanzen lag, wie erwartet, auch im Juli keine Infektion vor (*Abbildung 3.30*). Die Schwankungen der Kontrollpflanzen konnten also nicht durch eine Kontamination mit *P. quercina* bedingt gewesen sein.

Als Ursache für die genannten Abweichungen der Meßwerte kommt in Betracht, daß möglicherweise eine Infektion unbekannter Art vorlag, die zu einem starken Verlust an Feinwurzeln, besonders bei den Kontrollpflanzen, und dadurch zu einem



Rückgang der physiologischen Leistungsfähigkeit geführt haben könnte. Möglich wäre der Eintrag einer Infektion über das Flutwasser, das mittels Schläuchen zugeführt wurde.

Eine weitere Möglichkeit wäre, daß Pflanzen und Pathogen durch Störungen bei der Temperaturregelung im Gewächshaus Schaden genommen haben. Die erste Störung, bei der die Lufttemperatur auf 30°C stieg und der Schaden nach 6h behoben wurde, trat allerdings bereits Anfang Juni auf (siehe 2.7.1), d. h. vor den Juni-Messungen. Diese zeigten aber noch keine Abnormalitäten.

Denkbar ist auch, daß die Anfang Juli durchgeführte erste Düngung der Pflanzen zu einem Rückgang an Feinwurzeln geführt hat. Mit der Düngung wurde erst relativ spät begonnen, weil der Einfluß des Düngers auf die Vitalität des Pilzes ungeklärt war, die Pflanzen, auch die Kontroll-Eichen, aber bereits leichte Chlorosen entwickelten und eine Düngung unter diesen Umständen unumgänglich schien.

Am Ende der Vegetationsperiode war zu bemerken, daß die physiologische Leistungsfähigkeit der Kontrollpflanzen, bedingt durch den beginnenden Herbst, abnahm, wohingegen die Werte bei den infizierten Eichen weniger stark zurückgingen. Die morphologischen Untersuchungen an den Wurzelsystemen zeigten, daß die Root Length Density (*Abbildung 3.21*), Specific Root Length (*Abbildung 3.22*), Root Tip Density (*Abbildung 3.23*) bei den Kontrollpflanzen leicht abnahmen, bei den infizierten Eichen aber sogar anstiegen.

Möglicherweise war für die Erholung des Wurzelsystems der infizierten Pflanzen im Oktober eine Schwächung des Pathogens durch die bereits oben angesprochenen Störungen bei der Temperaturregelung in der Gewächshauskammer verantwortlich. Neben dem Ausfall der Kühlung Anfang Juni, trat ein weiterer Ausfall Anfang September auf (siehe 2.7.1).

#### **4.4 *Phytophthora quercina* wurde im Infektionsversuch 1998 über ELISA nachgewiesen.**

Der Nachweis von Pathogenen mit Hilfe des ELISA ist eine oft praktizierte Methode (Hahn und Werres 1997, Schlenzig et al. 1999, Werres et al. 1997). Im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen wurde *Phytophthora quercina* in den im Anschluß an

die physiologischen und morphologischen Untersuchungen präparierten Wurzelproben mit Hilfe des Double-Antibody-„Sandwich“-ELISA detektiert (*Abbildung 3.30*). Es zeigte sich, daß generell die Nachweisbarkeit des Pathogens in den Wurzelproben der einzelnen Pflanzen sehr unterschiedlich war. Wie bereits oben angesprochen, war der Grund dafür womöglich das Abfallen zersetzter, infizierter Feinwurzelbereiche. In den Monaten Mai, Juni und Juli war *P. quercina* in allen untersuchten infizierten Wurzelsystemen mehr oder weniger stark nachzuweisen. In den Augustproben sank die Nachweisbarkeit des Pathogens drastisch ab, was möglicherweise auf nicht mehr vorhandene Feinwurzeln (*P. quercina* ist ein reines Feinwurzelpathogen) zurückgehen könnte. In den nachfolgenden beiden Monaten war das Pathogen nicht mehr in den Wurzeln zu detektieren. Die trotz Flutung nicht mehr einsetzende Infektion in den Monaten September und Oktober ist wahrscheinlich mit dem Ausfall der Klimakammer während der Flutung im September (an einem Samstag) zu erklären. Die Kammertemperatur stieg für 20 Stunden auf 33 Grad an. Aus der Literatur ist bekannt, daß bodenbürtige *Phytophthora*-Pathogene bei diesen Temperaturen absterben. In den Monaten September und Oktober regenerierte sich das Feinwurzelsystem nahezu wieder vollständig (*Abbildung 3.24*).

### **4.5 Auswirkung der Flutung auf die Pflanzen**

Die Infektion der Eichen durch das Bodenpathogen *P. quercina* erfolgt bei genügend hohem Bodenwasser über Zoosporen (Kuan und Erwin 1982). Wie die Arbeiten von Matheron und Mircetich (1985) belegen, besteht eine Korrelation zwischen der Flutungsdauer und der Stärke der Infektion. Dieser Zusammenhang wurde von der genannten Arbeitsgruppe am Beispiel von *Juglans hindsii*, infiziert mit vier verschiedenen *Phytophthora*-Arten demonstriert. Neben der Tatsache, daß die Flutung für die Infektion von Wurzeln durch Zoosporen notwendig war, muß aber auch beachtet werden, daß sich zuviel Nässe bei den Versuchen möglicherweise negativ auf die zu untersuchenden Meßgrößen ausgewirkt haben könnte. Durch andere Arbeiten ist belegt worden, daß es bei übermäßigem Wasserangebot durch Flutung zum Schließen von Stomata (Kozlowski 1982, Tang und Kozlowski 1982) und zu Wachstumsinhibition (Ploetz und Schaffer 1989, Tang und Kozlowski 1982) - v.a. an den Wurzeln (Drew und Lynch 1980, Tang und Kozlowski 1982) - kommen

kann. Dabei sind die Reaktionen auf Flutung, in Abhängigkeit von der Baumart, dem Alter der Pflanze, Bodenfaktoren und Zeitpunkt und Dauer der Flutung sehr variabel (Kozlowski 1982, McLeod et al. 1999). Untersuchungen von Davies und Flore (1986) an *Vaccinium ashei* Reade haben gezeigt, daß bei Flutung bereits nach einem Tag die Netto-Photosyntheserate und auch die photochemische Effizienz (Quantum Yield) deutlich zurückgehen. Kozlowski (1982) und Ploetz und Schaffer (1989) berichten ebenfalls von einer schnellen Reduktion der Netto-Photosynthese- und der Transpirationsrate (Ploetz und Schaffer 1989) bei gefluteten holzigen Pflanzen. Bereits bei einer Flutung von nur einigen Stunden war der Gasaustausch zwischen Boden und Luft drastisch reduziert (Kozlowski 1982). Innerhalb weniger Stunden war der Sauerstoffgehalt des Bodens von den Boden-Mikroorganismen verbraucht (Drew und Lynch 1980, Kozlowski 1982). Die Folgen waren eine Abnahme der Permeabilität von Wurzelmembranen und eine reduzierte Aufnahme von Mineralien. Molekularer Sauerstoff ist auch für die Bildung physikalischer Barrieren gegen die Penetration der Wurzel durch Pathogene notwendig (Drew und Lynch 1980). Sauerstoffgestreßte Pflanzen geben größere Mengen an löslichen Metaboliten und auch Ethanol ab (Davison und Tay 1987). Dadurch wird die chemotaktische Bewegung der mobilen Zoosporen entlang von Wurzeloberflächen noch stimuliert, was für *Phytophthora cinnamomi* gezeigt werden konnte (Davison und Tay 1987). An Untersuchungen im Freiland konnte auch belegt werden, daß Bakterien und Actinomyceten als Antagonisten von *P. cinnamomi* durch Flutung geschädigt werden. Insgesamt kann es durch die Flutung zu einer Prädisposition der Pflanzen für eine Infektion kommen (Kuan und Erwin 1982).

Prädisponierend für eine Infektion können auch trockenere Perioden, die für die Pflanzen zu Wassermangel führen, sein. Wird der Wassermangel von zu feuchten Bodenverhältnissen gefolgt, so ist ein begünstigender Effekt auf *Phytophthora* zu bemerken (Bernhardt und Grogan 1982). Auch das Substrat hat einen deutlichen Einfluß auf die Flutungstoleranz. Ploetz und Schaffer (1989) haben gezeigt, daß die Flutung von Avocado in torfhaltigem Substrat auch nach fünf Tagen noch keinen Effekt hatte, wohingegen in kalkhaltigem Medium eine Reaktion auftrat. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß an zweijährigen, in einer Torfmischung wachsenden Eichen nach zweitägiger Flutung ebenfalls kein negativer Effekt auf die untersuchten physiologischen Parameter auftrat (*Abbildungen* 3.10-3.14). Aus diesem Grund ist auch anzunehmen, daß die im Infektionsversuch 1998

untersuchten Eichen nicht durch die Flutungszyklen geschädigt wurden. Anzumerken ist hier, daß die Daten der *Abbildungen* 3.5-3.9 an in Wasser kultivierten Eichen erhoben wurden. Unter diesen extremen Bedingungen war allerdings schon zu erkennen, daß sich die Staunässe auf die dort untersuchten Meßgrößen negativ auswirkte.

#### **4.6 An den Wurzeln ließen sich durch *Phytophthora quercina* bedingte gravierende morphologische Schäden schon nach wenigen Wochen feststellen.**

In dem Infektionsversuch 1998 wurden die Wurzelsysteme aller Pflanzen im Anschluß an die physiologischen Untersuchungen morphologisch ausgewertet. Dazu wurden die Wurzeln bildlich mit Hilfe eines Scanners erfaßt und mit der WinRhizo-Software analysiert. Die Software erlaubte die Berechnung einer Reihe von Parametern, die Auskunft über den Zustand des Wurzelsystems geben konnten. Zur Berechnung der Root Length Density (RLD) [ $\text{cm} \cdot \text{cm}^{-3}$ ] wurde die Gesamtlänge aller Wurzeln eines Wurzelsystems auf Volumeneinheit Substrat bezogen. Dieser Parameter gibt Auskunft über den Verlust an Wurzellänge infolge der Infektion. Wie aus *Abbildung* 3.21 hervorgeht, traten etwa einen Monat nach der Infektion erste signifikante Unterschiede zur Kontrollbehandlung auf. Die infizierten Pflanzen blieben bis fünf Monate nach der Infektion in deutlichem Rückstand. Der Verlust an Gesamtwurzellänge war auf einen starken Feinwurzelverlust zurückzuführen, wie durch den Vergleich der *Abbildungen* 3.21 und 3.24 hervorgeht. Die RLD der Grobwurzeln war dagegen von der Infektion nicht beeinflusst (*Abbildung* 3.27). Mit der RLD wird die Netto-Bilanz von Neubildung und Zersetzung der Wurzeln erfaßt. Der Wurzelumsatz wurde dadurch möglicherweise unterschätzt. Von Kosola et al. (1995) wurden daher die Lebensspannen von Feinwurzeln ausgewachsener Citrus-Bäume in Gegenwart von *Phytophthora nicotianae* untersucht. Bei starkem Infektionsdruck nahmen die Lebensspannen ab. Das gleiche Wirt-Pathogen-System wurde auch von Graham (1995) verwendet. Diese Versuche führten zu dem Ergebnis, daß eine Korrelation zwischen der Toleranz von Citrus-Arten gegenüber dem Pathogen und ihrer Fähigkeit zur Regeneration von Wurzeln in Gegenwart des Pathogens bestand.

Inwieweit auch *Quercus robur* L. zur Regeneration von Feinwurzeln trotz Anwesenheit von *Phytophthora quercina* fähig ist, wäre eine noch weiter zu untersuchende Frage. In den durchgeführten Versuchen war im Monat Oktober, am Ende der Vegetationsperiode, eine leichte Erholung der RLD bei infizierten Pflanzen festzustellen (*Abbildung* 3.21). Wenn es zu einer Regeneration von Wurzeln käme, müßten nach dem Absterben der Hauptwurzel laterale Wurzeln in ihrem Wachstum gestärkt werden. Untersuchungen von Pagès et al. (1992) zeigten, daß nach dem Absterben der Pfahlwurzel von *Q. robur*-Keimlingen bereits vorhandene Seitenwurzeln nur geringfügig in ihrer Wachstumsrate zunehmen und zeitlich im Wachstum begrenzt waren, während neu gebildete Seitenwurzeln schneller und zeitlich unbegrenzt wuchsen.

Eine ähnliche Entwicklung wie bei der RLD war auch bei der Gesamtwurzellänge dividiert durch das Trockengewicht der Wurzeln, Specific Root Length (SRL) [ $\text{cm} \cdot \text{mgTG}^{-1}$ ], zu bemerken. Von Juni bis September traten signifikante Unterschiede zwischen infizierten Pflanzen und Kontrollbäumen auf (*Abbildung* 3.22). Die infizierten Eichen wiesen in diesem Zeitraum eine geringere SRL auf. Dies bedeutet, daß bei geringerer Wurzellänge ein im Verhältnis zu den Kontrollen höheres Trockengewicht vorhanden war. Für den Parameter Root Tip Density (RTD) [ $\text{cm}^{-3}$ ] (*Abbildung* 3.23) war von Mai bis Oktober ebenfalls ein ähnlicher Verlauf wie bei der RLD festzustellen. Dies bedeutet, daß sich mit der Gesamtlänge an Feinwurzeln auch deren Anzahl änderte. Dies war zu erwarten, da bei den von uns untersuchten Wurzelsystemen die Wurzelspitzen die Enden der Feinwurzeln darstellten (mit Ausnahme stark geschädigter Wurzelbereiche, bei denen die Feinwurzeln bereits fehlten). Die Root Tip Density (RTD) für das gesamte Wurzelsystem stellt somit auch die RTD für die Feinwurzeln dar. Möglich wäre auch die Berechnung der RTD bezogen auf das Gewicht der Feinwurzeln (Root Mass Density (RMD) der Feinwurzeln), was einer Specific Root Tip Density (SRTD) entspräche. Im vorliegenden Falle brachte die Berechnung der SRTD jedoch keine neuen Informationen (*Abbildung* nicht gezeigt). Wie aus dem Vergleich der *Abbildungen* 3.23 (RTD) und 3.26 (RMD der Feinwurzeln) hervorgeht, bestand eine Korrelation zwischen diesen beiden Parametern. Eine Division der RTD durch die RMD der Feinwurzeln führte daher zu keinen diskutierbaren Unterschieden zwischen Kontrollen und infizierten Pflanzen.

Sowohl Fein- als auch Grobwurzeln nahmen infektionsbedingt an Trockenmasse ab, was die Größen Root Mass Density (RMD) der Feinwurzeln [ $\text{mgTG}\cdot\text{cm}^{-3}$ ] (Abbildung 3.26) und RMD der Grobwurzeln (Abbildung 3.29) [ $\text{mgTG}\cdot\text{cm}^{-3}$ ] zeigen.

Aus den dargestellten morphologischen Untersuchungen läßt sich erkennen, daß in die einzelnen Quotienten im Grunde immer wieder die Feinwurzellänge eingeht. Der Verlußt an Feinwurzeln, die von *P. quercina* infiziert werden und im Laufe der Zeit durch Zersetzungsprozesse vom Wurzelsystem abfallen, ist der gravierendste Schaden. Dies wurde bereits von Blaschke (1994) beobachtet. Man kann sich vorstellen, daß dadurch die Erschließung des Bodens zur Aufnahme von Bodenwasser und Nährsalzen beeinträchtigt ist, da das Feinwurzelsystem für die Ausnutzung des Bodens durch die Pflanzen von entscheidender Bedeutung ist (Bauhus und Messier 1999 (b)). Im Freiland könnten niedrige RLD-Werte möglicherweise zum Teil durch eine umso besser ausgebildeten Mykorrhiza ausgeglichen werden (Bauhus und Messier 1999 (b)). Die Mykorrhiza spielt als Schutz der Pflanzenwurzeln vor einer Infektion eine bedeutende Rolle (Marx 1975). Hier soll dieses umfangreiche Thema nur kurz erwähnt werden. Neben dem direkten Schutz vor Pathogenen, beispielsweise gezeigt in der Arbeit von Marx (1975) an der Wurzelinfektion von Kiefer mit *Phytophthora cinnamomi* oder allgemeiner diskutiert bei Dassi et al. (1998), soll auch darauf hingewiesen werden, daß die Mykorrhiza die Toleranz der Pflanzen gegenüber verschiedenen Streßfaktoren, wie einem extremen pH-Wert des Bodens, extremen Temperaturen, Trockenheit und Toxinen, erhöht (Marx 1975). Umgekehrt bedeutet eine geschädigte Mykorrhiza eine höhere Krankheitsanfälligkeit der Pflanzen.

### **4.7 Auf mikroskopischer Ebene waren deutliche Schäden wenige Tage nach der Infektion erkennbar.**

#### 4.7.1 Braun verfärbte Wurzelbereiche waren durchsetzt von Hyphen.

Es ist bekannt, daß *Phytophthora* erste Läsionen innerhalb von 8-16h nach dem Eindringen in das Wurzelgewebe des Wirtes hervorruft (Cahill et al. 1989). Bei den hier dargestellten Untersuchungen traten 48h nach der Inokulation von Eichenwurzeln mit *Phytophthora quercina* die ersten makroskopisch erkennbaren

Symptome auf. Ca. 1,5cm oberhalb der Wurzelspitze im Bereich der Zellstreckungszone war eine leichte Braunfärbung zu erkennen. Diese Beobachtung deckt sich mit der Beschreibung von Hickman (1970), daß Zoosporen von *Phytophthora* an der Zellstreckungszone akkumulieren und encystieren. Die Verfärbung breitete sich in den nächsten Tagen über die Wurzelspitze aus und schritt auch weiter nach oben vor. Für die mikroskopischen Untersuchungen wurden die Wurzeln noch etwas länger (insgesamt 5-7 Tage) inkubiert, um stark infizierte Wurzelbereiche in den mikroskopischen Schnitten vorzufinden. In den dargestellten lichtmikroskopischen Aufnahmen infizierter Wurzeln (Abschnitt 3.6.1.2) konnte *Phytophthora* im gesamten Wurzelquerschnitt gefunden werden. Besonders das Rindenparenchym war durchsetzt von zahlreichen Hyphen. Eine ähnliche Beobachtung beschreiben Widmer et al. (1998) an mit *Phytophthora nicotianae* bzw. *Phytophthora palmivora* infizierten Citruswurzeln. In diesem Infektionssystem hatten die Hyphen das gesamte Rindenparenchym besiedelt und waren bereits nach 48h in den Zentralzylinder und in das Leitgewebe eingedrungen. Auch bei den vorliegenden Untersuchungen konnten Hyphen im Zentralzylinder und sogar in Protoxylemgefäßen gefunden werden (*Abbildung* 3.44 C). Diese Beobachtung ist von besonderem Interesse, weil sich daraus die Frage ergibt, ob das Elicitin Quercinin, welches von *P. quercina* sekretiert wird, vom Infektionsort in den Wurzeln über den Transpirationsstrom in die Blätter gelangen könnte (siehe dazu auch 4.9.3).

#### 4.7.2 Im Lichtmikroskop ließ sich die inter- und intrazelluläre Besiedelung des Pflanzengewebes beobachten.

Im Rindenparenchym konnten zahlreiche inter- und intrazelluläre Hyphen festgestellt werden (*Abbildungen* 3.43 A, B, E). Interzellulär wachsende Hyphen lösten die Mittellamelle auf (*Abbildung* 3.43 B). Die Folgen waren die Abtrennung von Zellen und die Auflösung von Zellverbänden im Rindenparenchym. Ähnliche Beobachtungen wurden von Beagle-Ristaino und Rissler (1983) an Sojabohne, infiziert mit *Phytophthora megasperma* var. *glycinea*, und Børja et al. (1995) an Fichtenwurzeln, infiziert mit dem Oomycet *Pythium dimorphum*, gemacht. Die zitierten Autoren beschreiben ein ähnliches Wachstumsmuster von Hyphen im äußeren Rindenbereich der Wurzeln. Im Gegensatz zu Børja et al. (1995), die beobachteten, daß im Zentralzylinder intrazelluläres Wachstum vorherrschte, konnten keine deutlichen

Unterschiede im Wachstumsmuster zwischen Zentralzylinder und Rinde festgestellt werden (*Abbildung 3.43 E*). Die Zellen der Endodermis, welche in gesunden Wurzelgewebe einen dichten Verband bildeten (*Abbildung 3.41 B*) wurden von *P. quercina* penetriert, wobei auch interzelluläre Hyphen auftraten (*Abbildung 3.43 D*). In dem untersuchten Zellstreckungsbereich war die Endodermis unverdickt (*Abbildungen 3.43 D und 3.44B*). Cahill et al. (1989) belegten diese Beobachtung ebenfalls.

Im allgemeinen sind pathogene Pilze, einschließlich *Phytophthora* sp. (Clarke 1966), fähig, hydrolytische Enzyme zu synthetisieren. Diese Exoenzyme können die Penetration des Pflanzengewebes durch den Abbau zahlreicher polymerer Kohlenhydrate in pflanzlichen Zellwänden erleichtern (Albersheim et al. 1969, Benhamou et al. 1993, Benhamou und Côté 1992). Unter Berücksichtigung der mikroskopischen Beobachtungen könnten Exoenzyme an der Penetration der Wirtszellen beteiligt sein, da in infiziertem Gewebe die Mittellamelle aufgelöst und die penetrierten Zellen fast nicht deformiert sind. In dieser Hinsicht korrelieren die gezeigten Ergebnisse mit denen von Benhamou und Côté (1992) für mit *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* infizierte Tabakwurzeln.

#### 4.7.3 Die Infektion führte zu gravierenden zellulären Veränderungen auf licht- und elektronenmikroskopischer Ebene.

Der auffälligste Unterschied zwischen infizierten und nicht infizierten Eichenwurzeln auf lichtmikroskopischer Ebene war die generelle Auflösung des Gewebeverbandes. Sowohl Zellen mit interzellulär wachsenden Hyphen als auch benachbarte und sogar weiter vom Pilz entfernte Zellen zeigten dieselben Symptome. Widmer et al. (1998) berichten vom Kollaps von Rindenparenchymzellen in der Nachbarschaft von Hyphen 72h nach der Inokulation von Citruswurzeln mit *Phytophthora palmivora* oder *Phytophthora nicotianae*. Hanchey und Wheeler (1971) beobachteten einen deutlichen Zusammenbruch von Zellen bei Wurzeln von anfälligem Tabak bereits 3h nach der Inokulation mit *P. nicotianae*. Ähnliche Ergebnisse schildern auch Tippet et al. (1977) von Untersuchungen an Eukalyptus. Das Schrumpfen des Protoplasten wurde hier 24h nach der Infektion mit *Phytophthora cinnamomi* beobachtet. Das gleiche Pathogen wurde von Cahill et al. (1989) zur Infektion zahlreicher Wirtspflanzen, einschließlich mehrerer Baumarten, verwendet. Die Granulation des Cytoplasmas, das Schrumpfen des Protoplasten und die Auflösung von Zellwänden



begleiteten die Infektion bei allen Species. Bei dem vorliegenden Infektionssystem fanden ähnliche Veränderungen in den Wirtszellen statt. In einigen Fällen konnte eine Ablösung des Plasmalemmas von der Zellwand genau an den Stellen beobachtet werden, wo interzelluläre Hyphen an der Wirtszellwand anlagen (*Abbildung 3.47 D*). Dieses Phänomen ist auch an mit *Phytophthora megasperma* var. *sojae* infizierten Wurzeln der Sojabohne beobachtet worden (Slusher et al. 1974).

Auf elektronenmikroskopischer Ebene konnte infolge der Infektion eine Desintegration von Zellorganellen in den Wirtszellen beobachtet werden. Weder intakte Nuclei, noch weitere Zellorganellen wie Mitochondrien, Golgi-Vesikel oder endoplasmatisches Reticulum konnten gefunden werden. Das Cytoplasma der Pflanzenzellen war amorph und elektronendicht (siehe transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen Abschnitt 3.6.2). Jang und Tainter (1990) untersuchten die Interaktion von Kiefernkalluszellen mit *Phytophthora cinnamomi* und fanden, daß die Organellen der Kalluszellen, sowie auch granuläres Material im Cytoplasma ungewöhnlich elektronendicht waren. Hanchey und Wheeler (1971) berichteten von rudimentären Dictyosomen und einem dilatierten endoplasmatischem Reticulum in mit *P. nicotianae* infizierten Tabakwurzeln. Untersuchungen von Freytag et al. (1994) an lebenden Zellen von Tomate, infiziert mit *Phytophthora infestans*, zeigten ebenfalls, daß die Bildung kleiner Aggregate im Cytoplasma die erste sichtbare Antwort auf einen Angriff des Pilzes war.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde in der Nähe eindringender Hyphen eine Akkumulation vom pilzlichen Cytoplasma beobachtet. Mit dem pilzlichen Plasmalemma verschmelzende Vesikel und Mitochondrien waren in dieser Region zu finden (z.B. *Abbildung 3.47 F*). Ähnliches findet sich in den Darstellungen von Freytag et al. (1994) über die Infektion von Tomatenzellen mit *Phytophthora infestans*. Beim Eindringen der Hyphen in die pflanzliche Zelle wurde das Plasmalemma der Pflanzenzelle weiter von der Zellwand gelöst. Ähnliches wurde von Ehrlich und Ehrlich (1966) beim Vordringen der Haustorien von *Phytophthora infestans* in Kartoffelblättern beschrieben. Später füllten die Hyphen die Wirtszelle weiter aus, wobei die pflanzliche Cytoplasmamembran häufig zerstört wurde (*Abbildung 3.47 E*).

### 4.7.4 Die Infektion löste strukturelle Abwehrreaktionen der Pflanze aus.

Untersuchungen von Cahill und Weste (1983) haben gezeigt, daß die Zerstörung des Plasmalemmas möglicherweise ein essentieller Schritt zur Auslösung der biochemischen Abwehrreaktionen in der Wirtspflanze ist, welche letztendlich zum Wachstumsstopp des Pathogens und zu Resistenz führen können. Im Rahmen dieser Arbeit an Eichenwurzeln konnte beobachtet werden, daß die in Pflanzenzellen eindringenden Hyphen zwischen Zellwand und Plasmalemma weiterwachsen (z.B. *Abbildung 3.47 B*), bis, in einem fortgeschrittenen Stadium, die Cytoplasmamembran durchbrochen wird (z.B. *Abbildung 3.47 E*). Es scheint auch einige Hinweise zu geben, daß der Bereich von Cytoplasmamembran und Zellwand noch intakt sein muß, um eine effektive Callosebildung zu ermöglichen (Hinch et al. 1985). Bei den untersuchten mit *Phytophthora* infizierten Eichenwurzeln wurden mehr oder weniger elektronendurchscheinende Ablagerungen mit dunklen Einschlüssen gefunden. Der Vergleich mit anderen Arbeiten legt nahe, daß diese Strukturen möglicherweise Callose enthalten könnten (Enkerli et al. 1997, Stark-Urnau und Mendgen 1995, Trillas et al. 2000). Solche Ablagerungen an Zellen des Wirtsgewebes in der Nachbarschaft von Hyphen befanden sich zwischen Zellwand und Plasmalemma (*Abbildung 3.47 D*). Der Vergleich von anfälligen (kompatiblen) mit resistenten (inkompatiblen) Interaktionen zwischen verschiedenen Wirtspflanzen und Pathogenen hat gezeigt, daß die Bildung von Callose eine Erscheinung bei inkompatiblen Systemen ist (Børja et al. 1995, Cahill und Weste 1983, Stanghellini et al. 1993, Widmer et al. 1998). Andererseits gibt es auch Belege dafür, daß die Bildung von Callose nicht nur auf inkompatible Interaktionen beschränkt ist (Cahill et al. 1989, Trillas et al. 2000). Es scheint vielmehr eine Frage der Zeit zu sein, bis anfällige Pflanzen ebenfalls eine nachweisbare Menge an Callose bilden (Cahill et al. 1989, Trillas et al. 2000). Neben Callose ähnlichen Ablagerungen wurden bei mit *Phytophthora* infizierten Eichenwurzeln weitere, im Transmissionselektronenmikroskop anders aussehende strukturelle Abwehrreaktionen besonders an den Zellen gefunden, die in engem Kontakt zu Hyphen standen. Diese Ablagerungen waren elektronendicht und befanden sich an der Innenseite des Plasmalemmas von penetrierten und von benachbarten Zellen (*Abbildungen 3.47 A-C*). Zwischen der Zellwand eindringender Hyphen und der Cytoplasmamembran der Wirtszelle wurde eine elektronendichte Matrix aufgebaut. Die eindringenden Hyphen wurden von

dieser Schicht elektronendichten Materials eingeschlossen (z.B. *Abbildung 3.47 B*). Diese Beobachtung wurde auch an anderen *Phytophthora*-Arten gemacht (Ehrlich und Ehrlich 1966, Jang und Tainter 1990). Nach Jang und Tainter (1990) wäre eine Beteiligung von Tanninen am Aufbau dieser Struktur im Rahmen der Pathogenabwehr denkbar.

## 4.8 Biochemische Abwehrreaktionen auf den Pathogenbefall in der Eichenwurzel

### 4.8.1 Bildung von PR-Proteinen

#### 4.8.1.1 Die Bildung von basischen und sauren Chitinasen und basischen $\beta$ -1,3-Glucanasen wurde am Infektionsort durch das Pathogen induziert.

Es konnte gezeigt werden, daß direkt am Infektionsort die Synthese von sauren und basischen Chitinasen (*Abbildungen 3.32 und 3.33 B*) und basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen (*Abbildungen 3.34 und 3.35 B*) induziert wird. Drei Tage nach der Inokulation des Wurzelspitzenbereiches unverholzter junger Eichenwurzeln traten auf Western-Blots nachweisbare Mengen an basischen Chitinasen und basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen auf. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung von Sharma et al. (1993) an mit *Pythium* sp. infizierten Fichtenwurzeln. Bei diesen Untersuchungen wurden 2 Tage nach der Infektion 8 verschiedene Chitinase-Isoformen detektiert. In Kontrollproben waren 2 Chitinasen konstitutiv exprimiert, jedoch keine Glucanasen. Die Kontrollproben gesunder Eichenwurzeln enthielten nach drei Tagen weder basische Chitinasen (*Abbildung 3.33 A*) noch basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen (*Abbildung 3.35 A*). Die Molekulargewichte lagen für basische Chitinasen bei 30kDa und für basische Glucanasen bei 35kDa. Die Größe der gefundenen Proteine stimmt mit anderen Untersuchungen von Chitinasen und  $\beta$ -1,3-Glucanasen überein (Azarkan et al. 1997, Vogelsang und Barz 1993). Der Versuchsansatz wurde über 14 Tage hin verfolgt. Während dieses Zeitraumes war nur mehr eine geringfügige Zunahme an basischen Chitinasen (*Abbildung 3.33 B*) und basischen  $\beta$ -1,3-Glucanasen (*Abbildung 3.35 B*) in den infizierten Wurzelbereichen festzustellen. In den Kontrollproben traten

lediglich während der Inkubationstage 9-11 geringe Mengen an basischen Chitinasen auf - in allen übrigen Proben waren keine Banden zu detektieren -, was wahrscheinlich auf die Inkubationsbedingungen für die Sämlinge zurückzuführen ist (*Abbildung 3.33 A*). Es wurde kein Substrat, sondern eine Wasserkultur verwendet, um möglichst keimfreie Bedingungen zu schaffen (siehe 2.2.3.1.4 in Material und Methoden). Diese Verhältnisse könnten für die Pflanzen einen Stressfaktor dargestellt haben, der möglicherweise zur Induktion von Chitinasen geführt hat.  $\beta$ -1,3-Glucanasen waren in den Kontrollproben zu keiner Zeit nachzuweisen (*Abbildung 3.35 A*). Saure Chitinasen wurden nach 1 Woche detektiert (*Abbildung 3.36*). Hier wurde der zeitliche Verlauf der Synthese nicht weiter untersucht. Nach einer Woche ergab sich ein deutlicher Unterschied zu den Kontrollen, in denen keine sauren Chitinasen nachzuweisen waren (*Abbildung 3.36*). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß direkt am Ort der Infektion innerhalb einiger Tage basische und saure Chitinasen und basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen synthetisiert wurden.

##### 4.8.1.2 In infizierten Eichenwurzeln wurden extrazelluläre Osmotine synthetisiert.

Untersuchungen an mit dem Tabakmosaikvirus infiziertem Tabak (Woloshuk et al. 1991) und an mit *Phytophthora infestans* infizierten Tomatenpflanzen (Woloshuk et al. 1991, Zhu et al. 1996) demonstrieren die Induktion von Osmotinen bei Pathogenbefall und ihre Beteiligung an der Pathogenabwehr. Aus mit dem Tabakmosaikvirus infizierten Tabakpflanzen konnten Osmotine, 24kDa große Proteine, isoliert werden, die im Bioassay mit *P. infestans* die Lyse von Sporangien und eine Hemmung des Hyphenwachstums bewirkten (Woloshuk et al. 1991). Einen weiteren Beleg für die Beteiligung von Osmotinen speziell an der Abwehr von Oomyceten geben die Arbeiten von Zhu et al. (1996). Transgene Tomaten mit einem höheren Osmotinlevel zeigten eine höhere Resistenz gegen die Infektion mit *P. infestans*.

Im Rahmen dieser Arbeiten konnte an mit *Phytophthora quercina* infiziertem Wurzelmaterial eine Kreuzreaktion mit dem PR-S-Antikörper nachgewiesen werden. Dieser Antikörper greift sowohl extrazelluläres (PR-S) als auch vakuoläres (AP24) Osmotin ab (*Abbildung 3.37*). Da in weiteren Western-Blots mit Antikörpern, welche ausschließlich vakuoläres Osmotin (AP24) erkennen (Antikörperbezeichnung: pep2), keine Banden gefunden wurden (*Abbildung 3.38*), kann davon ausgegangen werden,

daß der PR-S- Antikörper ein extrazelluläres Osmotin erkannte. In Kontrollproben wurden keine Osmotine gefunden (*Abbildungen 3.37 und 3.38*).

#### 4.8.1.3 In infiziertem Wurzelgewebe konnten weniger Peroxidasen nachgewiesen werden als in gesundem.

Über das Verhalten von Peroxidase-Isoenzymen infolge von Infektionen liegen zahlreiche Arbeiten vor, die sich jedoch selten mit Wurzeln und oft mit Zellsuspensionskulturen befassen (Egea et al. 2001, Bruce und West 1989, Messner und Boll 1994). Asiegbu et al. (1994) untersuchten Peroxidasen in Fichtenwurzeln im Zusammenhang mit einer Infektion durch *Heterobasidion annosum*. Im Rahmen der zitierten Arbeit wird gezeigt, daß die Peroxidaseaktivität insgesamt infolge der Infektion auf das Zwei- bis Dreifache ansteigt. Okey et al. (1997) beschreiben im Falle des *Phytophthora*-Brandes an Kakao ebenfalls eine infektionsbedingte Erhöhung der Peroxidaseaktivitäten. Vor diesem Hintergrund überraschte das vorliegende Ergebnis. Es wurden Peroxidase-Aktivitätsgele mit Proteinextrakten gesunder und infizierter Eichenwurzeln hergestellt. Es zeigte sich, daß in gesunden Kontrollwurzeln größere Mengen an Peroxidasen nachzuweisen waren als in mit *Phytophthora quercina* infizierten Wurzeln (*Abbildung 3.39*). Weitere Untersuchungen müßten diesen von uns beobachteten Sachverhalt noch näher klären. Detailliertere Untersuchungen der Arbeitsgruppen Bruce und West (1989), Egea et al. (2001) und Messner und Boll (1994) an Isoenzymmustern von Peroxidasen zeigen jedoch auch, daß die Reaktion der einzelnen Peroxidase-Isoenzyme auf eine Infektion durchaus unterschiedlich sein kann. Egea et al. (2001) beschreiben eine positive Korrelation des Peroxidase-Levels mit der Resistenz von Pfeffer-Zellsuspensionskulturen gegen *Phytophthora capsici*. Resistente Varietäten hatten einen höheren Peroxidase-Level als anfällige Varietäten. Weitere Untersuchungen müssten diese Zusammenhänge bei Eichenwurzeln noch klären.

#### 4.8.2 Erste Untersuchungen wiesen auf eine infektionsbedingte Induktion von Phenolen hin.

Im Rahmen der normalen Zelldifferenzierung werden spezialisierte Zellen gebildet, in denen Phenole synthetisiert und in der Vakuole gespeichert werden. Solche Phenole

speichernden Zellen sind in den meisten Geweben vorhanden, wobei oft eine zufällige Verteilung zu beobachten ist (Beckmann 2000). Die induzierte Synthese phenolischer Verbindungen ist jedoch ein allgemeines Merkmal bei Wirt-Pathogen-Interaktionen (Cahill und McComb 1992). Im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr spielen Phenole als Lignin-Vorläufersubstanzen eine wichtige Rolle. So ist belegt, daß ein Anstieg von Phenylalaninammoniumlyaseaktivität (PAL-Aktivität) eng mit einem Anstieg an löslichen Phenolen und einer gesteigerten Lignifizierung verbunden ist (Cahill und McComb 1992). Zudem zeigen phenolische Verbindungen (Phytoalexine) fungitoxische Aktivität (Cahill und McComb 1992). Beispielsweise wirken trans-Zimtsäure und p-Coumarsäure hemmend auf das Wachstum von *Phytophthora cinnamomi* (Cahill und McComb 1992). Zum Nachweis von Phenolen wurden, in einer Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. D. Treutter, seine Methode der Nachsäulenderivatisierung mit Dimethylaminozimtaldehyd (DMAZA) eingesetzt.

Auf diese Weise wurde versucht, mikroskopische Schnitte spezifisch zu färben. Hierbei traten allerdings auf beträchtliche methodische Schwierigkeiten auf. Wahrscheinlich war dies durch Auswaschung an sich schon geringer Phenolmengen im Rahmen der Präparation bedingt. Auch an frischen Handschnitten von gesunden und infizierten Wurzeln kam es nicht zu der erwarteten typischen Blaufärbung. Diese war lediglich im Wurzelrindenbereich von Kontrollwurzeln angedeutet (*Abbildung 3.55 A*). Vermutlich war das Gewebe in der gewählten Schnittebene durch die starke Infektion bereits sehr geschädigt.

Ergänzend zu den mikroskopischen Untersuchungen wurden Proben für eine Phenolanalyse mittels HPLC hergestellt. Die ca. 10cm langen Keimwurzeln junger Eichensämlinge wurden an der Wurzelspitze mit Zoosporensuspension infiziert. Nach 5-7 Tagen Inkubationszeit wurden die Wurzeln in drei Abschnitte unterteilt. Somit enthielt eine untere Probe die infizierten Wurzelspitzen – dieser Bereich war auch mikroskopisch auf Phenole untersucht worden, eine mittlere Probe einen Übergangsbereich von infiziertem zu nicht infiziertem Gewebe und eine obere Probe einen Wurzelabschnitt ohne Pilz. Nach Derivatisierung mit DMAZA konnten, anhand von Erfahrungswerten an Apfel von Prof. Dr. D. Treutter, die Flavonoide Catechin und Galocatechin identifiziert werden (*Tabelle 3.6* und *Abbildung 3.56*). Im Falle von Galocatechin war in der gesunden Wurzel eine deutliche Zunahme von der Wurzelspitze nach oben hin zu bemerken. Infizierte Proben beinhalteten wesentlich

mehr Gallocatechin, ebenfalls mit steigender Tendenz nach oben. Für Catechin konnte nur für die unteren, infizierten Wurzelabschnitte eine deutliche Induktion durch *P. quercina* gemessen werden.

Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Cahill und McComb (1992) an mit *P. cinnamomi* infizierten Eukalyptuswurzeln erzielt. Cahill und McComb (1992) stellten fest, daß der Gehalt an löslichen Phenolen bei der resistenten Art *Eucalyptus calophylla* nach Infektion dreimal so hoch war wie bei der anfälligen Art *Eucalyptus marginata*. Die induzierten Phenole beinhalteten auch Catecholderivate.

Der untere Wurzelbereich war von uns auch im Transmissionselektronenmikroskop untersucht worden. Hier waren elektronendichte Ablagerungen festzustellen (*Abbildungen* 3.47 A-C, siehe auch Abschnitt 4.7.4), welche auf phenolische Substanzen oder Tannine zurückgehen könnten (Cahill et al. 1989).

## **4.9 Das Elicitin Quercinin wurde von *Phytophthora quercina* im Wurzelgewebe synthetisiert.**

### 4.9.1 Quercinin war in infiziertem Wurzelgewebe über ELISA nachzuweisen.

Ziel dieses Versuchsansatzes war, das Mycelwachstum von *Phytophthora quercina* in der Eichenwurzel und parallel dazu die Produktion von Quercinin nachzuweisen. Es wurden primäre Antikörper gegen Cryptogein, welche nachweislich auch an Quercinin binden (Heiser et al. 1999) verwendet. Vorausgehende Arbeiten von Heiser et al. (1999) haben gezeigt, daß *P. quercina* Quercinin in Flüssigkultur produziert und daß dieses Elicitin auf Western-Blots von Antikörpern gegen Cryptogein spezifisch gebunden wird. Für die vorliegenden Versuche wurden junge Eichen-Keimwurzeln als Probenmaterial verwendet. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 5 Tagen hin genommen. Mit Hilfe des ELISA war festzustellen, daß *P. quercina* 1-2 Tage nach der Inokulation meßbare Mengen an Quercinin produzierte, noch bevor ein deutliches Mycelwachstum eintrat. Wie Tercé-Laforgue et al. (1992) belegen, stieg die Synthese von Cryptogein bei *Phytophthora cryptogea* bereits vor der Sekretion des Proteins an. Der Beginn der Sekretion wurde von Tercé-Laforgue et al. (1992) zwischen Tag 2 und 4 festgestellt. Diese Beobachtung deckt sich in etwa mit den für *P. quercina* erhaltenen Ergebnissen. Ab etwa 70h nach

der Inokulation erreichte die Quercininmenge ein Maximum, das sich auch bei weiterem Mycelwachstum nicht mehr wesentlich änderte (*Abbildung* 3.31). In der zitierten Arbeit von Tercé-Laforge et al. (1992) wurde eine Mycel-Flüssigkultur verwendet. Hier nahmen die Sekretion und Synthese von Cryptogein ab, sobald die Stickstoffquelle im Medium fast erschöpft war. Kamoun et al. (1997) stellten fest, daß *Phytophthora infestans in vitro* mehr Elicitin (INF1) bildet als *in vivo*. An infizierten Kartoffelpflanzen waren die höchsten Konzentrationen in einem Stadium zu messen, als es bereits zu Sporulation und Blattnekrosen kam (Kamoun et al. 1997).

#### 4.9.2 Quercinin wurde in Zellwänden von Hyphen und in infiziertem Wirtsgewebe immunologisch nachgewiesen.

Quercinin wurde immunocytochemisch mit Hilfe von Immunofluoreszenz- und Immunogoldmarkierungstechniken im Gewebe der Wirtspflanze lokalisiert. Bei diesen Experimenten wurden wiederum Antikörper gegen Cryptogein, deren Spezifität gegenüber Quercinin von Heiser et al. (1999) nachgewiesen worden ist, verwendet. 5-7 Tage nach der Inokulation trat eine starke Immunofluoreszenzmarkierung an Hyphen im Rindenparenchym auf (*Abbildungen* 3.48 A und B). Mit Hilfe eines Konfokalen Laser Scanning Mikroskops konnte gezeigt werden, daß nur die Zellwand des Pathogens markiert war (*Abbildungen* 3.49 A und B). Man konnte den Eindruck gewinnen, daß Quercinin in die besiedelte Wirtszelle abgegeben wird (*Abbildung* 3.49 B). Meistens war die Immunofluoreszenzmarkierung auf die Hyphen beschränkt. In seltenen Fällen war auch die Cytoplasmamembran von Pflanzenzellen, in die Hyphen eingedrungen waren, markiert (*Abbildung* 3.49 A). Die Immunofluoreszenzexperimente wurden mehrmals wiederholt, wobei sich immer das gleiche Bild bot, wie in den *Abbildungen* 3.48 und 3.49 dargestellt. Immunogoldmarkierungen zeigten erneut, daß Quercinin in Hyphenzellwänden lokalisiert war (*Abbildungen* 3.50 A und B, 3.52 A). Goldmarkierungen wurden häufig an in die Pflanzenzelle eindringenden Hyphen gefunden (*Abbildung* 3.50). Wie die *Abbildung* 3.50 B zeigt, zog sich ein perlschnurartiges Band von Markierungspunkten entlang der Außenseite der pilzlichen Zellwand. Die Markierung war auch an dem Hyphenabschnitt, der sich innerhalb der Breite der pflanzlichen Zellwand befand, vorhanden. Daneben konnte man erkennen, daß Quercinin in den apoplastischen Raum abgegeben wurde (*Abbildung* 3.52 A) und daß es auch im Cytoplasma



befallener Zellen zu finden war (*Abbildung 3.52 E*). Es konnte gezeigt werden, daß eindringende Hyphen von einer gelatineartigen Matrix umgeben waren, was auch von Coffey und Wilson (1995) an Haustorien von *Phytophthora infestans* beobachtet worden ist. Eine solche gelatineartige Matrix wurde in gesundem Wurzelgewebe nicht gefunden. Diese Struktur könnte entweder Teil einer Abwehrreaktion des Wirtes oder eine Bildung der Hyphen sein. Innerhalb dieser Matrix konnten relativ große Mengen an Quercinin gefunden werden (*Abbildung 3.52 E*). Weitere Hyphen, die auf *Abbildung 3.52 E* zu finden sind, zeigten keine Markierungen an den Zellwänden. Diese Hyphen produzierten möglicherweise zum Zeitpunkt der Untersuchung an dieser Stelle kein Quercinin.

Proben, bei denen Mycelkulturen auf das Vorkommen von Quercinin hin untersucht wurden, bestätigten, daß die Produktion von Quercinin nicht an den Infektionsprozeß gebunden ist, sondern unabhängig von der Präsenz des Wirtspflanzengewebes abläuft. Dies war zu vermuten, da die Sekretion von Quercinin in Flüssigkultur, also ohne Gegenwart von Eichenwurzeln, von Heiser et al. (1999) bereits nachgewiesen worden war. Auch in den von uns untersuchten Mycelproben waren Goldmarkierungen an der Außenseite der Hyphen zu finden (*Abbildungen 3.54 A und B*).

#### 4.9.3 Quercinin kann vermutlich an pflanzliche Cytoplasmamembranen binden und wird möglicherweise im Xylem in der Pflanze transportiert.

Da die Aminosäuresequenzierung von Quercinin eine Homologie von 95% zu Cryptogein belegt hat (noch unveröffentlichte Daten), könnten man annehmen, daß sich das Elicitin von *P. quercina* auf zellulärer Ebene in ähnlicher Weise verhält wie Cryptogein. Es wurde gezeigt, das Elicitine an pflanzliche Plasmamembranen binden können (Ponchet et al. 1999, Pugin und Guern 1996, Vauthrin et al. 1999). So könnte Quercinin, welches in infiziertem Wurzelgewebe freigesetzt wird, mit spezifischen am Plasmalemma gebundenen Rezeptoren interagieren (Wendehenne et al. 1995). Boissy et al. (1999) vermuten, daß es sich bei den Plasmamembranrezeptoren um Kalziumkanäle handeln könnte. Eine weitere Signaltransduktion könnte zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies wie Superoxid und Wasserstoffperoxid führen, wie es für Cryptogein gezeigt worden ist (Pugin und Guern 1996, Tavernier et al. 1995). Vauthrin et al. (1999) belegten auch, daß Elicitine pflanzliche Sterole binden. Da *Phytophthora*-Pathogene nicht in der Lage sind, Sterole selbst zu

synthetisieren (Boissy et al 1999, Hendrix 1970, Weete 1989; Ponchet et al. 1999), könnten sie die Elicidine benutzen, um sich Sterole aus pflanzlichen Cytoplasmamembranen zu beschaffen (Boissy et al. 1999, Ponchet et al. 1999, Vauthrin et al. 1999). Sterole sind für das Mycelwachstum und auch für die Fruktifikation von entscheidender Bedeutung (Hendrix 1965, Ponchet et al. 1999). Untersuchungen von Hendrix (1965) zeigten, daß in Gegenwart von Cholesterol eine deutliche Steigerung des Mycelwachstums bei *Phytophthora megasperma* var. *sojæ* und *Phytophthora parasitica* zu beobachten war. Bei *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora capsici* und *P. parasitica* wurden die Produktion von Sporangien und die Freisetzung von Zoosporen durch Cholesterol angeregt. Ohne Sterole wurden zwar sporangienähnliche Strukturen angelegt, es kam aber zu keiner Freisetzung von Zoosporen. Boissy et al. (1999) zeigten, daß die pflanzlichen Sterole Sitosterol und Stigmasterol die Oosporenbildung am effektivsten anregten. Ponchet et al. (1999) vermuten, daß die Bildung eines Elicitin-Sterol-Komplexes notwendig ist, um an Tabakzellkulturen und Tabakpflanzen Reaktionen hervorzurufen. Daneben wurde belegt, daß nur mit Sterolen beladene Elicidine an ihren Plasmamembranrezeptor binden können. Durch das Herauslösen von Sterolen wird die Struktur der pflanzlichen Zellmembran gestört. Dies führt möglicherweise zu Zelltod und zur Ausbildung von Nekrosen (Boissy et al. 1999).

Breiman und Barash (1981) nehmen an, daß Phytotoxine in die durch *Phytophthora citrophthora* an Citrus hervorgerufene Symptomentwicklung auch entfernt von den infizierten Wurzelbereichen involviert sind. Cahill et al. (1989) beobachteten an mehreren anfälligen Pflanzenarten, daß *Phytophthora*-Pathogene die Wurzeln infizierten und später Chlorosen an den Blättern hervorriefen. Zanetti et al. (1992) bewiesen mit Hilfe der ELISA-Technik, daß *Phytophthora*-Elicidine relativ kurze Zeit nach erfolgter Wurzelinfektion in den Keim- und Folgeblättern von Tabak nachgewiesen wurden. Vergleichbare Untersuchungen stehen bei der Interaktion von Stieleiche mit *P. quercina* noch aus. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Hyphen von *P. quercina* auch im Xylem zu finden waren (*Abbildungen* 3.44 C, 3.52 C und D). Berücksichtigt man diese Tatsache, könnte Quercinin im Xylem transportiert und in den Blättern akkumuliert werden, so daß es bei der Auslösung der für die Infektion von *Quercus robur* L. mit *Phytophthora quercina* typischen Blattsymptome mit beteiligt sein könnte. Für Tabakblätter ist gezeigt worden, daß bereits 0,5mg Quercinin ml<sup>-1</sup> schwere Schäden an allen Membransystemen der Pflanzenzelle hervorriefen (Heiser

et al. 1999). Die Zerstörung der Membransysteme des Chloroplasten war begleitet von Blattchlorosen (Heiser et al. 1999). Die Wanderung von Cryptogein in Tabakblättern und nachfolgende Nekrotisierung wurde auch von Devergne et al. (1992) gezeigt. Ähnliche Untersuchungen an mit *P. quercina* infizierten Eichen stehen noch aus und könnten Gegenstand weiterer Forschung sein.

#### 4.9.4 Hintergrundreaktionen bei den Immunomarkierungen waren methodisch bedingt.

Generell führte die Immunfluoreszenzmarkierung zu sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen, wohingegen bei der Immunogoldmarkierung ein Kompromiß zwischen der Erhaltung der antigenen Strukturen sowie der Fixierung und Einbettung gefunden werden mußte. Dieses Problem wurde auch von Koulen (2000) angesprochen. Alle Zellstrukturen sollten gut fixiert werden, da sie für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erhalten werden mußten, während andererseits das Antigen für die Antikörper weiterhin zugänglich sein sollte. Aus diesem Grund wurden die zunächst verwendeten 12nm großen Goldpartikel (*Abbildungen 3.50 - 3.51*) bei weiteren Ansätzen durch kleinere 1nm große Partikel ersetzt. Diese wurden mit Hilfe einer Silberverstärkung vergrößert und dadurch im Elektronenmikroskop sichtbar gemacht (*Abbildungen 3.52 - 3.54*). Von den kleineren Goldkonjugaten versprachen wir uns eine bessere Durchdringung des Pflanzengewebes. Eine weitere methodische Verbesserung war die Markierung kleiner Wurzelgewebe- bzw. Mycelstücke vor der endgültigen Fixierung und Einbettung (*Abbildungen 3.52 - 3.54*), anstelle der davor durchgeführten Markierung von Ultradünnschnitten bereits fixierter und eingebetteter Präparate (*Abbildungen 3.50 - 3.51*). Die Probenstücke wurden fixiert und an der Oberfläche markiert, wie unter 2.4.2.3.2 beschrieben. Die methodischen Verbesserungen brachten eine Reduktion der Hintergrundreaktionen.

Eine weitere Verbesserung zukünftiger Untersuchungen könnte die Verwendung von Antiserum gegen Quercinin bringen. Dieses Antiserum lag zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchungen noch nicht vor. Daher wurde Antiserum gegen das zu 95% homologe (noch unveröffentlichte Daten) Cryptogein verwendet, wie oben bereits bemerkt worden ist. Gegenwärtig wird an der Sequenzierung von Quercinin und an der Herstellung spezifischer Antikörper gearbeitet.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit der Infektion von *Quercus robur* L. mit dem Wurzelpathogen *Phytophthora quercina*. Junge Stieleichen (Sämlinge bis zweijährige Pflanzen) wurden an den Wurzeln mit *P. quercina* inokuliert.

Physiologische Untersuchungen auf Blattebene belegten eine signifikante Schädigung durch die Infektion. Zu diesem Ergebnis führte ein über sechs Monate angelegter Infektionsversuch und ergänzend dazu weitere Untersuchungen über kürzere Zeiträume. Netto-Photosyntheserate, Transpirationsrate und Leitfähigkeit für Wasserdampf sanken bereits drei Tage nach der Infektion um fast 20% gegenüber den zeitgleich gemessenen Kontrollwerten ab. Am empfindlichsten reagierten sehr junge Eichensämlinge. Chlorophyllfluoreszenzmessungen ergaben, daß die photochemische Effizienz unter Lichtbedingungen (gemessen als Quantum Yield  $\Delta F/F_m'$ ) an jungen infizierten Eichensämlingen innerhalb von vierzehn Tagen um 40% gegenüber den Kontrollwerten absank. Messungen am Ende der Dunkelphase ergaben keine Veränderungen von Quantum Yield ( $F_v/F_m$ ). Dies könnte auf die Regeneration der Photosyntheseprozesse während der Dunkelphase schließen lassen.

Eine der Hauptursachen für die Schädigung physiologischer Prozesse auf Blattebene könnte die infektionsbedingte Störung des Wasserhaushalts gewesen sein. Zu diesem Schluß führten die parallel zu den physiologischen Messungen festgestellten morphologischen Schäden an den infizierten Wurzelsystemen. Mittels einer morphologischen Bildanalyse eingescannter Wurzelsysteme wurde ein deutlicher Rückgang bei der Root Length Density (RLD) und der Root Tip Density (RTD) festgestellt. Die Abnahme der RLD infolge der Infektion war auf den Verlust an Feinwurzeln (0-1,5mm Durchmesser) zurückzuführen. Die RLD der Feinwurzeln verhielt sich parallel zur RLD des gesamten Wurzelsystems. Die Feinwurzeln waren nach vier Wochen schon zu über 50% vom Wurzelsystem abgefallen. Der Verlust an Feinwurzeln könnte wahrscheinlich zu Problemen bei der Wasseraufnahme geführt haben. Dadurch könnte es für die Pflanzen zu einer ähnliche Situation gekommen sein, wie sie auch bei Trockenstreß vorliegt. Die Vergleiche mit Reaktionen auf Trockenstreß, wie sie in anderen Arbeiten beschrieben werden, zeigen, daß die

physiologischen Reaktionen auf Blatteben in beiden Fällen große Ähnlichkeiten aufweisen.

Begleitend zu unserem Inokulationsversuch wurde die Wurzelinfektion mittels ELISA verfolgt. *P. quercina* war während der ersten drei Monate in den Wurzeln nachzuweisen. Später konnte das Pathogen aufgrund des starken Verlustes an infizierten Feinwurzeln, die bereits vom Wurzelsystem abgefallen waren, mit dieser Methode nicht mehr nachgewiesen werden.

Mikroskopische Untersuchungen zeigten an unverholzten Wurzeln deutliche histologische und zelluläre Schäden bereits wenige Tage nach der Infektion mit *P. quercina*. Anhand von licht- und elektronenmikroskopischen Analysen konnte das inter- und intrazelluläre Wachstum der Hyphen verfolgt werden. An Penetrationsstellen war die pflanzliche Zellwand lokal aufgelöst. Es wurden Ansammlungen von Cytoplasma mit Zellorganellen innerhalb der Hyphen in der Nähe der Penetrationsstellen festgestellt. An diesen Stellen löste sich auch das Plasmalemma der Wirtszelle häufig von der Zellwand ab. Das pflanzliche Cytoplasma wurde elektronendicht. Strukturelle Abwehrreaktionen innerhalb der Wirtszellen wurden beobachtet. Vergleiche mit anderen histologischen Arbeiten an mit verschiedenen *Phytophthora*-Arten infizierten Wurzeln holziger Pflanzen legen nahe, daß es sich bei den von uns festgestellten elektronendurchlässigen Ablagerungen um Callose haltige Strukturen handelt. Diese Ablagerungen befanden sich an Penetrationsstellen an der Innenseite der pflanzlichen Zellwand. Vergleiche zu anderen Arbeiten lassen vermuten, daß in der auffallend elektronendichten Matrix um eindringende Hyphen phenolische Substanzen enthalten sein könnten. Unsere Untersuchungen von Extrakten aus Eichenwurzeln mittels HPLC belegten jedenfalls einen erhöhten Gehalt an den Phenolen Catechin und Gallocatechin in infizierten Wurzelbereichen.

Im Rahmen der biochemischen Pathogenabwehr induzierte der *Phytophthora*-Befall die Bildung von PR-Proteinen. Anhand von Western-Blots konnte nachgewiesen werden, daß basische und saure Chitinasen, basische  $\beta$ -1,3-Glucanasen und extrazelluläre Osmotine bei Infektion vermehrt gebildet werden.

Es wurden einige Untersuchungen zur Sekretion und Lokalisation des von *P. quercina* synthetisierten Elicitins Quercinin unternommen. Quercinin wurde parallel zum Myzelwachstum von *P. quercina* mittels ELISA nachgewiesen. Nach 70 Stunden erreichte die Quercininmenge ihr Maximum. Wie Fluoreszenz- und Immunoglodmarkierungen an mikroskopischen Schnitten zeigten, war Quercinin an

Hyphenzellwänden lokalisiert. Daneben konnte man den Eindruck gewinnen, daß Quercinin vermehrt an den Spitzen von in Pflanzenzellen eindringenden Hyphen sekretiert wird. Eine schwache Markierung von Cytoplasmamembranen könnte auf eine mögliche Bindung dieses Elicitins an das Plasmalemma von Wirtszellen hindeuten. Die von uns beobachtete Invasion von Tracheen gibt Anlaß zu der Vermutung, daß Quercinin im Wasserleitsystem der Pflanzen transportiert wird.

## Literaturverzeichnis

**ALBERSHEIM P, JONES TM, ENGLISH PD.** 1969. Biochemistry of the Cell Wall in Relation to Infective Processes. *Annual Review of Phytopathology* **7**: 171-193

**AGROIS GN.** 1997. Plant Pathology, 4. Edition, Harcourt / Academic Press

**ARSENAULT J-L, POULCUR S, MESSIER C, GUAY R.** 1995. WinRHIZO™, a Root-measuring System with a Unique Overlap Correction Method. *Hort Science* **30** (4): 906

**ASIEGBU FO, DANIEL G, JOHANSSON M.** 1994. Defence related reactions of seedling roots of Norway spruce to infection by *Heterobasidion annosum* (Fr.) Bref.. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **45**: 1-19

**AYRES PG.** 1980. Responses of stomata to pathogenic microorganisms. In: Stomatal Physiology. JARVIS PG and MANSFIELD TA eds. S.E.B. Sem. Ser. Vol. 8. Cambridge University Press (1980): 205-221

**AZARKAN M, ARMANI A, NUS M, VANDERMEERS A, ZERHUONI S, SMOLDERS N, LOOZE Y.** 1997. *Carica papaya* latex is a rich source of class II chitinase. *Phytochemistry* **46** (8): 1319-1325

**BAUHUS J, MESSIER C.** 1999. (a) Image Analysis: Evaluation of Fine Root Length and Diameter Measurements Obtained Using RHIZO Image Analysis. *Agronomy Journal* **91**: 142-147

**BAUHUS J, MESSIER C.** 1999. (b) Soil exploitation strategies of fine roots in different tree species of the southern boreal forest of eastern Canada. *Canadian Journal of Forest Research* **29**: 260-273

**BEAGLE-RISTAINO JE, RISSLER JF.** 1983. Histopathology of Susceptible and Resistant Soybean Roots Inoculated with Zoospores of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Phytopathology* **73** (4): 590-595

**BECKMAN CH.** 2000. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 101-110

**BENHAMOU N, BROGLIE K, CHET I, BROGLIE R.** 1993. Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. *The Plant Journal* **4** (2): 295-305

- BENHAMOU N, CÔTÉ F.** 1992. Ultrastructure and cytochemistry of pectin and cellulose degradation in tobacco roots infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* **82** (4): 468-478
- BERNHARDT EA, GROGAN RG.** 1982. Effect of Soil Matric Potential on the Formation and Indirect Germination of Sporangia of *Phytophthora parasitica*, *P. capsici* and *P. cryptogea*. *Phytopathology* **72**: 507-511
- BIRCH PRJ, UNKLES S, LACOURT I, DUNCAN JM.** 1997. Heterologous expression of a basic elicitor gene from *Phytophthora cryptogea* in *P. infestans*. *Scottish Crop Research Institute, Annual Report 1996/97*: 148-151
- BLANK R, HARTMANN G.** 1993. Eichensterben in Norddeutschland – Symptomatik und mögliche Ursachen. Bayerische Akademie der Wissenschaften 1991. Rundgespräche der Kommission für Ökologie. 5 Zustand und Gefährdung der Laubwälder. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München 1993
- BLASCHKE, H.** 1994. Decline symptoms on roots of *Quercus robur*. *European Journal of Forest Pathology* **24**: 386-398
- BONNET P, POUPET A, ABAD P, VENARD P, CARDIN L.** 1986. Induction de nécroses foliaires, de protéines b et de résistance dans les interactions tabac-*Phytophthora*. *Agronomie* **6** (9) : 829-837
- BOISSY G, O'DONOHUE M, GAUDEMER O, PEREZ V, PERNOLLET J-C, BRUNIE S.** 1999. A structure of elicitor-ergosterol complex: A recent addition to Sterol Carrier Protein family. *Protein Science* **8**: 1191-1199
- BØRJA I, SHARMA P, KREKLING T, LÖNNEBORG A.** 1995. Cytopathological response in roots of *Picea abies* seedlings infected with *Pythium dimorphum*. *Phytopathology* **85** (4): 495-501
- BRASIER CM.** 1992. Oak tree mortality in Iberia. *Nature* **360**: 539
- BRASIER CM.** 1996. *Phytophthora cinnamomi* and oak decline in southern Europe. Environmental constraints including climate change. *Annales des Sciences Forestières* **53**: 347-358
- BRASIER CM, COOKE DEL, DUNCAN JM.** 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5878-5883
- BRASIER CM, ROSE J, GIBBS JN.** 1995. An unusual *Phytophthora* associated with widespread alder mortality in Britain. *Plant Pathology* **44**: 999-1007



**BREIMAN A, BARASH I.** 1981. Partial Characterization of Phytotoxic Compounds in Culture Filtrates of *Phytophthora citrophthora*. *Phytopathologische Zeitschrift* **102**: 1-9

**BRUCE RJ, WEST CA.** 1989. Elicitation of Lignin Biosynthesis and Isoperoxidase Activity by Pectic Fragments in Suspension Cultures of Castor Bean. *Plant Physiology* (1989): 889-897

**BRUNNER J.** 2000. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Obstbau, Institut für landwirtschaftlichen und gärtnerischen Obstbau der TUM

**CAHILL D, LEGGE N, GRANT B, WESTE G.** 1989. Cellular and Histological Changes Induced by *Phytophthora cinnamomi* in a Group of Plant Species Ranging from Fully Susceptible to fully Resistant. *Phytopathology* **79** (4): 417-424

**CAHILL D, WESTE G.** 1983. Formation of callose deposits as a response to infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Transactions of the British Mycological Society* **80** (1): 23-29

**CAHILL DM, McCOMB JA.** 1992. A comparison of changes in phenylalanin ammonialyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **40**: 315-332

**CAHILL DM, WESTE GM, GRANT BR.** 1986. Changes in Cytokinin Concentrations in Xylem Extrudate following Infection of *Eucalyptus marginata* Donn ex Sm with *Phytophthora cinnamomi* Rands. *Plant Physiology* **81**: 1103-1109

**CAPASSO R, CRISTINZIO G, EVIDENTE A, VISCA C, FERRANTI P, Del VECCHIO BLANCO F, PARENTE A.** 1999. Elicitin 172 from an isolate of *Phytophthora nicotianae* pathogenic to tomato. *Phytochemistry* **50**: 703-709

**CLARKE DD.** 1966. Production of Pectic Enzymes by *Phytophthora infestans*. *Nature (London)* **5049**: 649

**COFFEY MD, WILSON UE.** 1995. Histology and Cytology of Infection and Disease Caused by *Phytophthora*. In: ERWIN DC, BARTNICKI-GARCIA S. *Phytophthora*. Ist Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology. APS Press. Third Printing, 1995.

**COLAS V, CONROD S, VENARD P, KELLER H, RICCI, P, PANABIERES F.** 2001. Elicitin Genes Expressed In Vitro by Certain Tobacco Isolates of *Phytophthora parasitica* Are Down Regulated During Compatible Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14** (3): 326-335

**COOKE DEL, DRENTH A, DUNCAN JM, WAGELS G, BRASIER CM.** 2000. A Molecular Phylogeny of *Phytophthora* and Related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* **30**: 17-32

**CSINOS A, HENDRIX JW.** 1977. Toxin produced by *Phytophthora cryptogea* active on excised tobacco leaves. *Canadian Journal of Botany* **55**: 1156-1162

**DARVAS JM, TOERIEN JC, MILNE DL.** 1984. Control of Avocado Root Rot by Trunk Injection with Phosethyl-Al. *Plant Disease* **68**: 691-693

**DASSI B, DUMAS-GAUDOT E, GIANINAZZI S.** 1998. Do pathogenesis-related (PR) proteins play a role in bioprotection of mycorrhizal tomato roots towards *Phytophthora parasitica* ? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **52**: 167-183

**DAVIES FS, FLORE JA.** 1986. Short-Term Flooding Effects on Gas Exchange and Quantum Yield of Rabbiteye Blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Plant Physiology* **81**: 189-292

**DAVISON EM, TAY FCS.** 1987. The effect of waterlogging on the infection of *Eucalyptus marginata* seedlings by *Phytophthora cinnamomi*. *New Phytologist* **105**: 585-594

**DEVERGNE J-C, BONNET P, PANABIERES F, BLEIN J-P, RICCI P.** 1992. Migration of the fungal protein cryptogein within tobacco plants. *Plant Physiology* **99**: 843-847

**DONAUBAUER E.** 1998. The role of pathogens in present oak decline in Europe – a literature review. *European Journal of Forest Pathology* (1998): 91-98

**DOUGHERTY PM, HINCKLEY TM.** 1981. The influence of severe drought on net photosynthesis of white oak (*Quercus alba*). *Canadian Journal of Botany* **59**: 335-341

**DREW MC, LYNCH JM.** 1980. Soil anaerobiosis, microorganisms, and root function. *Annual review of Phytopathology* **18**: 37-66

**EGEA C, AHMED AS, CANDELA M, CANDELA ME.** 2001. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cells by *Phytophthora capsici*. *Journal of Plant Physiology* **158**: 151-158

**EHRlich MA, EHRlich HG.** 1966. Ultrastructure of the hyphae and haustoria of *Phytophthora infestans* and hyphae of *P. parasitica*. *Canadian Journal of Botany* **44**: 1495-1503

**ELSTNER EF, OßWALD W, SCHNEIDER I.** 1996. Phytopathologie: allgemeine und biochemische Grundlagen. Spektrum Akademischer Verlag

**ENKERLI K, HAHN MG, MIMS CW.** 1997. Immunogold localization of callose and other plant cell wall components in soybean roots infected with the oomycete *Phytophthora sojae*. *Canadian Journal of Botany* **75**: 1509-1517

**EPRON D, DREYER E.** 1992. Effects of severe dehydration on the leaf photosynthesis in *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: photosystem II efficiency, photochemical and nonphotochemical fluorescence quenching and electrolyte leakage. *Tree Physiology* **10**: 273-284

**EPRON D, DRYER E, BRÉDA N.** 1992. Photosynthesis of oak trees [*Quercus petraea* (Matt.)Liebl.] during drought under field conditions: diurnal course of net CO<sub>2</sub> assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. *Plant, Cell and Environment* **15**: 809-820.

**ERWIN DC, RIBEIRO OK.** 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press

**FARQUHAR GD, SHARKEY TD.** 1982. Stomatal Conductance and Photosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology* **33**: 317-345

**FEFEU S, BOUAZIZ S, HUET J-C, PERNOLLET J-C, GUITTET, E.** 1997. Three-dimensional solution structure of  $\beta$  cryptogein, a  $\beta$  elicitor secreted by a phytopathogenic fungus *Phytophthora cryptogea*. *Protein Science* **6**: 2279-2284

**FERNANDEZ-ESCOBAR R, GALLEGO FJ, BENLLOCH J, INFANTE J, De ALGABA P.** 1999. Treatment of oak decline using pressurized injection of antifungal materials. *European Journal of Forest Pathology* **29**: 29-38

**FREYTAG S, ARABATZIS N, HAHLBROCK K, SCHMELZER E.** 1994. Reversible cytoplasmic rearrangements precede wall apposition, hypersensitive cell death and defense-related gene activation in potato / *Phytophthora infestans* interactions. *Planta* **194**: 123-135

**GIBBS JN.** 1995. *Phytophthora* root disease of alder in Britain. *Bulletin OEPP / EPPO Bulletin*. **25**: 661-664

**GIBBS JN, LIPSCOMBE MA, PEACE AJ.** 1999. The impact of *Phytophthora* disease on riparian populations of common alder (*Alnus glutinosa*) in southern Britain. *European Journal of Forest Pathology* **29**: 39-50

**GIEFING M.** 1997. Diplomarbeit. Lehrstuhl für Phytopathologie der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der TUM

**GRAHAM JH.** 1995. Root Regeneration and Tolerance of Citrus Rootstocks to Root Rot Caused by *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathology* **85**: 111-117

**GROSS K, HOMLICHER A, WEINREICH A, WAGNER E.** 1996. Effect of shade on stomatal conductance, net photosynthesis, photochemical efficiency and growth of oak saplings. *Annales des Sciences Forestières* **53**: 279-290

**GUEST DI, GRANT BR.** 1991. The complex action of phosphonates as antifungal agents. *Biological Review* **66**: 159-187

**GUTMANN M.** 1995. Improved staining procedures for photographic documentation of phenolic deposits in semithin sections of plant tissue. *Journal of Microscopy* **179** (2): 277-281

**HAHN R, WERRES S.** 1997. Development of a dot immunobinding assay to detect *Phytophthora* spp. in naturally dark-rooted woody plants. *Annals of Applied Biology* **130**: 453-466

**HAMMERSCHMIDT R.** 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 77-84

**HANCHEY P, WHEELER H.** 1971. Pathological changes in ultrastructure: tobacco roots infected with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* **61**: 33-39

**HARTMANN G BLANK R.** 1992. Winterfrost, Kahlfraß und Prachtkäferbefall als Faktoren im Ursachenkomplex des Eichensterbens in Norddeutschland. *Forst und Holz* **47**: 443-452

**HEISER I, FROMM J, GIEFING M, KOEHL J, JUNG T, OBWALD W.** 1999. Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P. citricola* and *P. gonapodyides* toxins on tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37** (1), 73-81

**HENDRIX JW.** 1965. Influence of Sterols on Growth and Reproduction of *Pythium* and *Phytophthora* spp.. *Phytopathology* **55**: 790-797

**HENDRIX JW.** 1970. Sterols in growth and reproduction of fungi. *Annual Review of Phytopathology* **8**: 111-130

**HEYNE C.** 2002. Dissertation. Life Science Center Weihenstephan, Departement Ökologie, Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume. (In Arbeit)

**HICKMAN CJ.** 1970. Biology of *Phytophthora* Zoospores. *Phytophthora Symposium*. *Phytopathology* **60**: 1128-1135

**HINCH JM, WETHERBEE R, MALLETT JE, CLARKE AE.** 1985. Response of *Zea mays* Roots to infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Protoplasma* **126**: 178-187

**HOCK B, ELSTNER EF.** 1995. Schadwirkungen auf Pflanzen. Lehrbuch der Pflanzentoxikologie. Spektrum, Akademischer Verlag, 3. Auflage

**HOFFMANN GM, NIENHAUS F, POEHLING H-M, SCHÖNBECK F, WELTZIEN HC, WILBERT H.** 1994. Lehrbuch der Phytomedizin, 3. Auflage, Blackwell Wissenschafts-Verlag

**HUET JC, NESPUOLOS C, PERNOLLET JC.** 1992. Structures of elicitin isoforms secreted by *Phytophthora drechsleri*. *Phytochemistry* **31**: 1471-1476

**HUET JC, PERNOLLET JC.** 1989. Amino acid sequence of cinnamomin, a new member of the elicitin family, and its comparison to cryptogein and capsicein. *FEBS Letters* **257**: 302-306

**JACKSON TJ, BURGESS T, COLQUHOUN I, HARDY GESTJ.** 2000. Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Plant Pathology* **49**: 147-154

**JANG JC, TAINTER FH.** 1990. Cellular Responses of Pine Callus to Infection by *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* **80**: 1347-1352

**JUNG T, BLASCHKE H.** 1996. *Phytophthora* Root Rot in Declining Forest Trees. *Phyton* (Horn, Austria) **36** (3): 95-102

**JUNG T.** 1996. Dissertation. Lehrstuhl für Forstbotanik der LMU München

**JUNG T, COOKE D, BLASCHKE H, DUNCAN J, OßWALD WF.** 1999. *Phytophthora quercina* sp. Nov., a new species causing root rot on European oak species. *Mycological Research* **103** (7): 785-798

**KAMOUN S, HONÉE G, WEIDE R, LAUGÉ R, KOOMAN-GERSMANN M, de GROOT K, GOVERS F, de WIT PJGM.** 1999. The Fungal Gene *Avr9* and the Oomycete Gene *inf1* Confer Avirulence to Potato Virus X on Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12** (5): 459-462

**KAMOUN S, van WEST P, de JONG AJ, de GROOT KE, VLEESHOUWERS VGAA, GOVERS F.** 1997. A Gene Encoding a Protein Elicitor of *Phytophthora infestans* Is Down-Regulated During Infection of Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** (1): 13-20

**KAMOUN S, YOUNG M, FÖRSTER H, COFFEY MD, TYLER BM,** 1994. Potential Role of Elicitins in the Interaction between *Phytophthora* Species and Tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* **60** (5): 1593-1598

**KELLER H, BLEIN J-P, BONNET P, RICCI P.** 1996. Physiological and Molecular Characteristics of Elicitin-Induced Systemic Acquired Resistance in Tobacco. *Plant Physiology* **110**: 365-376

**KOSOLA KR, EISSENSTAT DM, GRAHAM H.** 1995. Root demography of mature citrus trees: the influence of *Phytophthora nicotianae*. *Plant and Soil* **171**: 283-288

**KOULEN P.** 2000. A Sensitive Method to Detect Antigens at the EM Level. *European Microscopy and Analysis*. Juli 2000: 17-18

**KOZLOWSKI TT.** 1982. Water Supply and Tree Growth. Part II Flooding. *Forest Abstracts* **43** (3): 145-161

**KRAUSE H, WEIS E.** 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* **5**: 139-157

**KUAN T-L, ERWIN DC.** 1982. Effect of Soil Matric Potential on *Phytophthora* Root Rot of Alfalfa. *Phytopathology* **72** (5): 543-548

**LANGE OL.** 1984. CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O-Porometer zur Messung von CO<sub>2</sub>-Gaswechsel und Transpiration an Pflanzen unter natürlichen Bedingungen. 1.203/ August 1984, Heinz Walz GmbH, Effeltrich

**LUQUE J, COHEN M, SAVÉ R, BIEL C, ÁLVAREZ IF.** 1999. Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L.. *Annales des Sciences Forestières* **56**: 19-26

**MARÇAIS B, DUPUIS F, DESPREZ-LOUSTAU ML.** 1993. Influence of water stress on susceptibility of red oak (*Quercus rubra*) to *Phytophthora cinnamomi*. *European Journal of Forest Pathology* **23**: 295-305

**MARX DH.** 1975. The Role of Ectomycorrhizae in the Protection of Pine from Root Infection by *Phytophthora cinnamomi*. In: *Biology and Control of Soil-Borne Plant Pathogens, Third International Symposium on Factors Determining the Behaviour of Plant Pathogens in Soil*, held at the University of Minnesota, Minneapolis, 5-12 September 1973 in Conjunction with the Second International Congress of Plant Pathology. Edited by BRUEHL GW: 112-115

**MATHERON ME, MIRCETICH SM.** 1985. Influence of Flooding Duration on the Development of *Phytophthora* Root Rot and Crown Rot of *Juglans hindsii* and Paradox Walnut Rootstocks. *Phytopathology* **75** (9): 973-976

**McDONALD KL, CAHILL DM.** 1999. Evidence for a transmissible factor that causes rapid stomatal closure in soybean at sites adjacent to and remote from hypersensitive cell death induced by *Phytophthora sojae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**: 197-203

**McLEOD KW, McCARRON JK, CONNER WH.** 1999. Photosynthesis and water relations of four oak species: impact of flooding and salinity. *Trees* **13**: 178-187

**MESSNER B, BOLL M.** 1994. Extracellular peroxidases of suspension culture cells of spruce (*Picea abies*): fungal elicitor-induced inactivation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **36**: 81-90

- MILLER PM.** 1955. V-8 Juice Agar as a General-purpose Medium for Fungi and Bacteria. *Phytopathology* **45**: 461-462
- MOHR H, SCHOPFER P.** 1992. Pflanzenphysiologie, 4. Auflage. Springer Verlag: 407
- NES WD, HEFTMANN E.** 1981. A comparison of triterpenoids with steroids as membrane components. *Journal of Natural Products* **44**: 377-400
- NESPOULOUS C, HUET JC, PERNOLLET JC.** 1992. Structure-function relationship of  $\alpha$  and  $\beta$  elicitins, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* **186**: 551-557
- OKEY EN, DUNCAN EJ, SIRJU-CHARRAN G, SREENIVASAN TN.** 1997. *Phytophthora* Cancer Resistance in Cacao: Role of Peroxidase, Polyphenoloxidase and Phenylalanine Ammonia-lyase. *Phytopathology* **145**: 295-299
- OBWALD WF.** 2000. Biochemical defence reactions of woody plants infested with *Phytophthora* or *Pythium* fungi. Proceedings of the Cost Action G4. Multidisciplinary Chestnut Research, Thessaloniki, Greece, May 2000. Eds.: WILHELM E, DIAMANDIS S: 1-15
- OBWALD WF, JUNG T, NECHWATAL J, SCHLENZIG A, FLEISCHMANN F.** 2001. Significance of *Phytophthora*s and *Pythium* for oak, alder and spruce decline. *Journal of Forest Science* **47** (Special Issue): 96-103
- PAGÈS L, PIERRE N, PETIT P.** 1992. Growth correlations within the root system of young oak trees. Root Ecology and its Practical Application 3. ISSR Symp. Wien, Univ. Bodenkultur, 1991, KUTSCHERA L, HÜBL E, LICHTENEGGER E, PERSSON H, SOBOTIK M (eds.) – Verein für Wurzelforschung, Klagenfurt: 505-508
- PAXTON JD.** 1972. Toxin production by *Phytophthora megasperma* Drechsl. Var. *sojae* Hild.. In: WOOD RKS, BALLIIO A, GRANITI A (eds.), Phytotoxins in Plant Disease. Academic Press, Inc., London and New York
- PEREZ V, HUET J-C, NESPOULOUS C, PERNOLLET J-C.** 1997. Mapping the Elicitor and Necrotic Sites of *Phytophthora* Elicitins with Synthetic Peptides and Reporter Genes Controlled by Tobacco Defense Gene Promoters. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** (6): 750-760
- PERNOLLET J-C, SALLANTIN M, SALLÉ-TOURNE M, HUET J-C.** 1993. Elicitin isoforms from seven *Phytophthora* species: comparison of their physico-chemical properties and toxicity to tobacco and other plant species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **42**: 53-67

**PLICH M, RUDNICKI RM.** 1979. Studies of the Toxins of *Phytophthora cactorum* Pathogenic to Apple Trees. I. Isolation, some of the properties and activities of a toxin produced by the fungus cultured in vitro. *Phytopathologische Zeitschrift* **94**, 270-278

**PLOETZ RC, SCHAFFER B.** 1989. Effects of Flooding and *Phytophthora* Root Rot on Net Gas Exchange and Growth of Avocado. *Phytopathology* **79** (2): 204-208

**PONCHET M, PANABIÈRES F, MILAT M-L, MIKES V, MONTILLET J-L, SUTY L, TRIANTAPHYLIDES C, TIRILLY Y, BLEIN J-P.** 1999. Are elicitors cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* **56**: 1020-1047

**PUGIN A, GUERN J.** 1996. Mode of action of elicitors: involvement of plasma membrane functions. *Comptes rendus de l' Académie des Sciences (Paris), Sciences de la vie* **319**: 1055-1061

**RECORBET G, BESTEL-CORRE G, DUMAS-GAUDOT E, GIANINAZZI S, ALABOUVETTE C.** 1998. Differential accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and chitinase isoforms in tomato roots in response to colonization by either pathogenic or non-pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Microbiological Research* **153**: 257-263

**REYNOLDS ES.** 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* **17**: 208-212

**RICCI P, BONNET P, HUET J-C, SALLANTIN M, BEAUVAIS-CANTE F, BRUNETEAU M, BILLARD V, MICHEL G, PERNOLLET J-C.** 1989. Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *European Journal of Biochemistry* **183**: 555-563

**RÖNNEBECK W.** 1956. Ein phytotoxisches Prinzip aus *Phytophthora infestans* de Bary. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **63** (7): 385-389

**ROUPSARD O, GROSS P, DREYER E.** 1996. Limitation of photosynthesis activity by CO<sub>2</sub> availability in the chloroplasts of oak leaves from different species and during drought. *Annales des Sciences Forestières* **53**: 243-254

**SCHAFFER B, PLOETZ R.** 1987. Effects of *Phytophthora* root rot and flooding on net gas exchange of potted avocado seedlings. *Hort Science* **22** (4): 1141

**SCHLENZIG A, HABERMAYER J, ZINKERNAGEL V.** 1999. Serological detection of latent infection with *Phytophthora infestans* in potato stems. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **106** (3), 221-230



**SCHRAMM RJ, WOLF FT.** 1954. The transpiration of black shank-infected tobacco. *Journal of the Mitchell Society*. December 1954: 255-261

**SCHREIBER U, BILGER W.** 1993. Progress in Chlorophyll Fluorescence Research: Major Developments During the Past Years in Retrospect. *Progress in Botany* **54**: 151-173

**SCHREIBER U.** 1997. Chlorophyllfluoreszenz und photosynthetische Energieumwandlung: Einfache einführende Experimente mit dem Teaching-PAM Chlorophyll Fluorometer. 2.120/01.97, 1. Ausgabe, Heinz Walz GmbH, Effeltrich

**SHARKEY TD.** 1985. Photosynthesis in intact leaves of C<sub>3</sub>-plants: physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* **51** (1): 53-105

**SHARMA P, BØRJA D, STROUGAARD P, LÖNNEGORG A.** 1993. PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium* sp. isolate include chitinases, chitosanases and  $\beta$ -1,3-glucanases. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **43**: 57-67

**SLUSHER RL, HAAS DL, CAROTHERS ZB, CINCLAIR JB.** 1974. Ultrastructure at the host-parasite interface of *Phytophthora megasperma* var. *sojae* in soybean rootlets. *Phytopathology* **64**: 834-840

**STANGHELLINI ME, RASMUSSEN SL, VANDEMARK GJ.** 1993. Relationship of callose deposition to resistance of lettuce to *Plasmopara lactucae-radicis*. *Phytopathology* **83**: 1498-1501

**STARK-URNAU M, MENDGEN K.** 1995. Sequential deposition of plant glycoproteins and polysaccharides at the host-parasite interface of *Uromyces vignae* and *Vigna sinensis*. *Protoplasma* **186**: 1-11

**STERNE RE, KAUFMANN MR, ZENTMYER GA.** 1978. Effect of *Phytophthora* Root Rot on Water Relations of Avocado: Interpretation with a Water Transport Model. *Phytopathology* **68**: 595-602

**TANG ZC, KOZLOWSKI TT.** 1982. Some physiological and morphological responses of *Quercus macrocarpa* seedlings to flooding. *Canadian Journal of Forest Research* **12**: 196-202

**TAVERNIER E, WENDEHENNE D, BLEIN J-P, PUGIN A.** 1995. Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiology* **109**: 1025-1031

**TERCÉ-LAFORGUE T, HUET J-C, PERNOLLET J-C.** 1992. Biosynthesis and Secretion of Cryptogein, a Protein Elicitor Secreted by *Phytophthora cryptogea* *Plant Physiology* **98**: 936-941

**TIPPET JT, O'BRIEN TP, HOLLAND AA.** 1977. Ultrastructural changes in eucalypt roots caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological Plant Pathology* **11**: 279-286

**TRIBOULOT MB, FAUVEAU ML, BRÉDA N, LABEL P, DREYER E.** 1996. Stomatal conductance and xylem-sap abscisic acid (ABA) in adult oak trees during a gradually imposed drought. *Annales des Sciences Forestières* **53**: 207-220

**TRILLAS MI, COTXARRERA L, CASANOVA E, CORTADELLAS N.** 2000. Ultrastructural changes and localization of chitin and callose in compatible and incompatible interactions between carnation callus and *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **56**: 107-116

**Van KOOTEN O, SNEL JFH.** 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research* **25**: 147-150

**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

**VAUTHRIN S, MIKES V, MILAT M-L, PONCHET M, MAUME B, OSMAN H, BLEIN J-P.** 1999. Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**: 335-342

**VLEESHOUVERS VGAA, van DOOIJEWERT W, GOVERS F, KAMOUN S, COLON LT.** 2000. Does basal *PR* gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiological and Molecular Plant Pathology* **57**: 35-42

**VOGELSANG R, BARZ W.** 1993. Purification, characterization and differential hormonal regulation of a  $\beta$ -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* **189**: 60-69

**Von HEIJNE G, ABRAHMSSEN L.** 1989. Species-specific variation in signal peptide design. Implications for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Letters* **244**: 439-446

**WEBER JA, GATES DM.** 1990. Gas exchange in *Quercus rubra* (northern red oak) during a drought: analysis among photosynthesis, transpiration, and leaf conductance. *Tree Physiology* **7**: 215-225

**WEETE JD.** 1989. Structure and Function of Sterols in Fungi. *Advances in Lipid Research* **23**: 115-165

**WENDEHENNE D, BINET MN, BLEIN JP, RICCI P, BLEIN JIPI.** 1995. Evidence for specific, high affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Letters* **374**: 203-207

- WERRES S, HAHN R, THEMANN K.** 1997. Application of different techniques to detect *Phytophthora* spp. in roots of commercially produced *Chamaecyparis lawsoniana*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **104** (5): 474-482
- WESTE G, COOK D, TAYLOR P.** 1973. The invasion of native forest by *Phytophthora cinnamomi*. II. Post-infection vegetation patterns, regeneration, decline in inoculum, and attempted control. *Australian Journal of Botany* **21**: 13-29
- WIDMER TL, GRAHAM JH, MITCHELL DJ.** 1998. Histological Comparison of Fibrous Root Infection of Disease-Tolerant and Susceptible Citrus Hosts by *Phytophthora nicotianae* and *P. palmivora*. *Phytopathology* **88** (5): 389-395
- WOLF FT.** 1933. The pathology of tobacco black shank. *Phytopathology* **23**: 605-612
- WOLF FT, WOLF FA.** 1954. Toxicity as a factor in tobacco black shank. *Journal of the Mitchell Society* (December 1954): 244-255
- WOLOSHUK CP, MEULENHOF JS, SELA-BUURLAGE M, van den ELZEN PJM, CORNELISSEN BJC.** 1991. Pathogen-Induced Proteins with Inhibitory Activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell* **3**: 619-628
- ZANETTI A, BEAUVAIS F, HUET CJ, PERNOLLET JC.** 1992. Movement of elicitors, necrosis-inducing proteins secreted by *Phytophthora* sp. In tobacco. *Planta* **187**: 163-170
- ZENTMYER GA, ERWIN DC.** 1970. Development and Reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology* **60**: 1120-1127
- ZENTMYER GA.** 1973. Control of *Phytophthora* Root Rot of Avocado with p-Dimethylaminobenzenediazo Sodium Sulfonate (Dexon). *Phytopathology* **63**: 267-272
- ZHU B, CHEN THH, Li PH.** 1996. Analysis of late-blight disease resistance and freezing tolerance in transgenic potato plants expressing sense and antisense genes for an osmotin-like protein. *Planta* **198**: 70-77
- ZIEGLER R, EGGLE K.** 1965. Zur quantitativen Analyse der Chloroplastenpigmente. I. Kritische Überprüfung der spektralphotometrischen Chlorophyllbestimmung. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen* **41**: 11-37

## **Danksagung**

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Oßwald. Ich konnte ein interessantes und aktuelles Thema im Rahmen meiner Dissertation bearbeiten. Während der Zeit, die ich bei ihm im Lehrbereich Phytopathologie der Waldbäume, Departement für Ökologie des Life Science Centers Weihenstephan verbracht habe, konnte ich immer mit einer guten Zusammenarbeit und mit Unterstützung durch Rat und Tat rechnen. Ich möchte mich besonders für das Vertrauen bedanken, das mir mit dem Überlassen des Themas entgegengebracht wurde. Dieses fand ich bei vielen Gelegenheiten immer wieder bestätigt.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Rainer Matyssek für all seine Hilfe bei meinen physiologischen Messungen. Dr. Helmut Blaschke hat mir oft mit Literatur, interessanten Denkanstößen und Hilfe sowohl bei meinen physiologischen Messungen als auch bei den morphologischen Untersuchungen von Wurzelsystemen geholfen. Bei meinen physiologischen Arbeiten halfen mir auch oft die Ratschläge von Dr. Thorsten Grams und Dr. Karl-Heinz Häberle weiter. Nikolaus Hofmann und Thomas Feuerbach waren oft benötigte Helfer bei technischen Problemen und Fragen. Dank auch Dr. Hans J. Schuck, und Dr. Klaus Lang für konstruktive Gedanken und viele Auskünfte.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Prof Dr. Erich F. Elstner bedanken. Seine Anregungen waren sehr wertvoll. Ein Dank auch an Dr. Ingrid Heiser und Julia Koehl für allen Rat und alle Hilfen.

Dank schulde ich auch Prof. Dr. Jörg Fromm, an dessen Lehrstuhl für Holzforschung ich den Großteil der mikroskopischen Untersuchungen durchführen konnte. Bei der praktischen Ausführung meiner histologischen Arbeiten und den Immunmarkierungen mikroskopischer Präparate war ich auf die unentbehrliche Hilfe von Dr. Matthias Arend angewiesen. Bei Prof. Dr. Treutter konnte ich dankenswerter Weise mikroskopische Untersuchungen und Analysen zum Phenolgehalt von Wurzelproben durchführen. Hierbei war Dr. Christof Leser unersetzlich. Meine Untersuchungen am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnte ich freundlicherweise bei Prof. Dr. Schleifer mit Hilfe von Dr. Michael Schmid durchführen. Dr. Alexandra Schlenzig schulde ich Dank für die Durchführung der ELISA-Arbeiten.

Ein herzliches Dankeschön auch meinem Kollegen Dr. Frank Fleischmann, nicht nur für fachliche Bereicherungen. Auch bei Schwierigkeiten mit dem Computer war seine oft zeitintensive Hilfe sehr wertvoll. Bedanken möchte ich mich auch bei Christiane Koziolk, die mir oft bereitwillig behilflich war. Zu nennen sind auch die Kollegen Katja Patzner, Alessandra Kozovits, Dr. Alexandra Schlenzig, Christian Heyne und Ilja Reiter, die ebenfalls oft Rat wußten und den Arbeitsalltag durch Kollegialität angenehm machten.

Danke auch den Technischen Assistentinnen Renate Meisel und Johanna Lebherz, die viele Routinearbeiten für mich übernommen haben, sowie allen meinen studentischen Hilfskräften. Bei der handwerklichen Ausführung diverser Arbeiten half mir Peter Kuba weiter.

Weiterhin gebührt mein Dank Dr. Thomas Jung, der mir die *Phytophthora quercina*-Kulturen zur Verfügung gestellt hat.

Ich danke auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Projektes.

Vielen Dank meinem Ehemann Franz, der mich während meiner Dissertation in vieler Hinsicht unterstützt hat. Ein besonders herzlicher Dank gilt meinen Eltern Hildegard und Anton Giefing, meiner Schwiegermutter Maria Brummer und meiner Schwägerin Anita Haberthaler mit Familie. Ohne ihre Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen, meine Dissertation trotz der Geburt unseres Sohnes innerhalb dieses Zeitraumes fertig zu stellen. Meinem Vater sei für die vielen Stunden des Korrekturlesens gedankt. Ein Dank auch meinem Bruder und allen meinen Freunden, die mir durch das Gespräch, durch Abwechslung im Alltag und auch durch musikalische Bereicherungen Durchhaltevermögen für meine Arbeit geschenkt haben.

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

---

Name:	Maria Brummer, geb. Giefing
Anschrift:	Gutenbergstraße 15, 85646 Anzing
Geburtsdatum / -ort:	22. Mai 1972 in München
Staatesangehörigkeit:	österreichisch
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind
Eltern:	Hildegard und Anton Giefing

### Ausbildung:

---

1979-1991	Rudolf-Steiner-Schule München-Daglfing
1991	Abitur am Gymnasium Erding
1991 – 1994	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Innsbruck
1994	Vordiplom an der Universität Innsbruck
1994 – 1997	Studium der Biologie (Diplom) an der Technischen Universität München
1997	Diplomarbeit (Untersuchung von Phytophthora-Toxinen (Elicitinen) im Zusammenhang mit dem Eichensterben) bei Prof. Dr. Erich F. Elstner, Lehrstuhl für Phytopathologie, Departement Ökologie, Life Science Center Weihenstephan der Technischen Universität München
1997	Hauptdiplom an der Technischen Universität München
1997 – 2001	Dissertation bei Prof. Dr. Wolfgang Oßwald, Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume, Departement Ökologie, Life Science Center Weihenstephan, Technische Universität München