

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Fachgebiet für Pathologie der Waldbäume

Histologische, physiologische und molekularbiologische Untersuchungen
im Wirt-Pathogen-System Buche (*Fagus sylvatica* L.) - *Phytophthora*
citricola Saw. und Bedeutung extrazellulärer Proteine des Pathogens für
die Interaktion

Roberto Luis Portz

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. D. R. Treutter
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. W. Oßwald
2. Univ.-Prof. Dr. R. Matyssek

Die Dissertation wurde am 04.12.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 09.01.2009 angenommen.

Portz R, Koehl J, Fleischmann F, Fromm J, Pascholati S, Oßwald W (2008)
Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica*
saplings infected with *Phytophthora citricola*. (submitted for Plant Pathology)

Fleischmann F, Koehl J, Portz R, Beltrame AB, Oßwald W (2005) Physiological
changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and
the contribution of its elicitor "Citricolin" to pathogenesis. Plant Biology 7: 650-658

INHALTSVERZEICHNIS

I EINLEITUNG.....	1
1 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND MODELLSYSTEME.....	1
1.1 <i>Phytophthora</i>-Krankheitskomplex.....	1
1.2 Erregereigene Substanzen	3
1.3 Pflanzeigene Substanzen und Reaktionen	6
2 ZIELE DER ARBEIT	7
II MATERIAL UND METHODEN.....	9
1 CHEMIKALIEN UND SONSTIGE MATERIALIEN	9
2 KULTURMEDIEN	11
3 PUFFER UND LÖSUNGEN	11
3.1 Kohlehydratnachweis	11
3.2 Gelfiltration	12
3.3 Elektrophorese	12
3.3.1 Tris-Glycin-SDS-PAGE.....	13
3.3.2 Tris-Tricin-SDS-PAGE	14
3.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	15
3.3.4 Westernblot	15
3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	16
3.4 Färbungslösungen für Polyacrylamidgele und Westernblot.....	17
3.4.1 Silbernitratfärbung	17
3.4.2 Coomassie-Färbung	17
3.4.3 Entwicklung des Westernblots	18
3.5 Wasserstoffperoxyd-Nachweis	18
3.6 Extraktion von Nucleinsäuren.....	19
3.6.1 Extraktion von RNA	19
3.6.2 Extraktion von DNA	19
4 KULTIVIERUNG DER PFLANZEN UND DES PATHOGENS	19
4.1 Anzucht von Buchensämlingen (<i>Fagus sylvatica</i> L.).....	19
4.2 Anzucht von Buchensämlingen für ein „Split-root-System“	20
4.3 <i>Phytophthora</i>-Kultur und Sporangien- bzw. Zoosporengewinnung.....	21
4.3.1 Direkte Bestimmung der Zoosporenzahl mit Hilfe einer Thomakammer.....	21
4.4 <i>Phytophthora</i> Kulturfiltratgewinnung.....	21
5 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER PROTEIN- UND ZUCKERKONZENTRATIONEN.....	22
5.1 Bestimmung des Proteingehalts.....	22
5.2 Zucker-Analytik	22
5.2.1 Anthron-Test.....	22
5.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC).....	23
5.2.2.1 Bestimmung des Zuckergehaltes des <i>Phytophthora</i> -Kulturfiltrates.....	23
5.2.2.2 Bestimmung des Zuckergehaltes des Pflanzenmaterials.....	23
6 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS ROHEM KULTURFILTRAT VON <i>PHYTOPHTHORA CITRICOLA</i>	24
6.1 Flüssigkeitschromatographie (FPLC).....	24
6.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
6.3 Isoelektrische Fokussierung.....	25

6.4 Färbung der Polyacrylamidgele	26
6.4.1 Silbernitratfärbung.....	26
6.4.2 Coomassie-Färbung.....	26
6.5 Westernblot	26
6.5.1 Proteintransfer.....	26
6.5.2 Antikörpermarkierung und Entwicklung der Westernblots.....	27
6.6 Auswertung von Polyacrylamidgele	28
6.7 Enzymaktivität verschiedener Hydrolasen	28
7 ERFASSUNG VON ÖKOPHYSIOLOGISCHEN PARAMETERN	29
7.1 Wasseraufnahme und Wasserpotential	29
7.2 Gaswechsel- und Chlorophyll-Fluoreszenz	29
8 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	29
8.1 Visuelle Beobachtungen	29
8.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	30
9 NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG VON DNA AUS <i>PHYTOPHTHORA</i> <i>CITRICOLA</i>	30
9.1 Probennahme	30
9.2 DNA-Extraktion	30
9.3 UV-Quantifizierung isolierter DNA und RNA	31
9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)	31
9.5 Quantitative PCR (qPCR)	32
10 REVERSE TRANSKRIPTION UND BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION IN INFIZIERTEN BUCHENSÄMLINGEN	33
10.1 Probenahme	33
10.2 RNA-Extraktion	33
10.3 cDNA-Synthese	34
10.4 Bestimmung der Genexpression	34
11 AGAROSEGELELEKTROPHORESE	36
12 BIO-ASSAYS	36
12.1 Aktivitätstests	36
12.2 Infektionsversuche	38
12.2.1 Split-root-System.....	40
12.2.2 Einfluss des Wasserstandes auf das Ausmaß der Infektion	41
12.2.3 Einfluss der Inokulumdichte auf die Infektion	41
12.2.4 Ethylenmessungen.....	42
12.2.5 Infektionsversuch zur anschließenden Bestimmung der Genexpression	44
13 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG	44
III ERGEBNISSE	45
1 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS DEM KULTURFILTRAT VON <i>PHYTOPHTHORA CITRICOLA</i>	45
1.1 Aufreinigung des <i>P. citricola</i> - Elicitin „Citricolin“ aus rohem Kulturfiltrat	46
1.1.1 Westernblot und SDS-PAGE der Proteine aus der A2-Fraktion vom <i>P.</i> <i>citricola</i> -Kulturfiltrat und Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein	46
1.2 Biologische Wirkung des gereinigten Citricolins	47

1.2.1 Aktivität des gereinigtes Citricolin von <i>P. citricola</i> an Tabakblättern	47
1.2.1.1 Hypersensitive Reaktion (HR).....	47
1.2.1.2 Zeitlicher und konzentrationsabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure und Katalase auf die hypersensitive Reaktion nach Elicitierung	48
1.2.1.3 H ₂ O ₂ -Nachweis mittels Diaminobenzidin (DAB) Färbung nach Elicitierung	50
1.2.2 Einfluss von Citricolin auf die Physiologie von Buchen- und Tabakblättern.....	52
1.3 Aufreinigung von <i>P. citricola</i>-Proteinen aus der A1-Fraktion	52
1.3.1 Westernblot und SDS-PAGE der Proteine aus der A1-Fraktion des <i>P.</i> <i>citricola</i> -Kulturfiltrats und Immunisierung mit Antikörpern gegen β-Cryptogein	52
1.4 Biologische Wirkung der A1-Fraktion	53
1.4.1 Biotest der A1-Fraktion aus dem fraktionierten Kulturfiltrat von <i>P. citricola</i> an Buchenblättern	53
1.4.2 Einfluss der Fraktionen 8 - 14 der Gesamtfraktion A1 auf die Physiologie von Buchenblättern.....	54
1.5 Aufreinigung und Charakterisierung des Welkefaktors aus dem Kulturfiltrat von <i>P. citricola</i>	57
1.5.1 <i>Phytophthora</i> -Kulturmedium	57
1.5.1.1 SDS-PAGE der Kulturfiltrate	60
1.5.1.2 Biotest an Buchenblättern.....	61
1.5.2 Aufreinigung eines Welkefaktors aus dem Kulturfiltrat von <i>P. citricola</i> ..	62
1.5.2.1 Biotest der Fraktionen an Buchenblättern.....	64
1.5.2.2 Elektrophorese (SDS-PAGE).....	66
1.5.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)	67
1.6 Biologische Wirkung des Welkefaktors von <i>P. citricola</i> an Buchenblättern.....	68
1.6.1 Makroskopische Symptome.....	68
1.6.2 Mikroskopische Symptome.....	69
1.7 Enzymaktivität von <i>Phytophthora</i> extrazellulären Proteinen	72
2 INFektion VON BUCHENSÄMLINGEN MIT <i>PHYTOPHTHORA CITRICOLA</i>	73
2.1 Einfluss der Inokulation mit <i>P. citricola</i> auf die Physiologie und den Infektionsverlauf von Buchensämlingen	73
2.2 Split-root-System von Buchensämlingen infiziert mit <i>P. citricola</i>	76
2.2.1 Physiologische Parameter.....	76
2.2.2 Quantifizierung der <i>P. citricola</i> -DNA	77
2.2.3 Symptomausprägung an Wurzeln.....	77
2.2.4 Korrelation der Photosynthese und Menge an <i>P. citricola</i>	78
2.2.5 Einfluss der Infektion auf den Zuckergehalt.....	79
2.2.6 Korrelation der Zuckergehalte mit der Menge an <i>P. citricola</i>	80
2.3 Einfluss des Wasserstandes auf die Infektion von Buchensämlingen durch <i>P. citricola</i>	82
2.3.1 Einfluss des Wasserstandes auf das Infektionsausmaß.....	82
2.3.2 Einfluss des Wasserstandes auf die Photosynthese, Wasseraufnahme und Wasserpotential infizierter Buchensämlinge	83
2.4 Einfluss der Inokulumdichte auf die Infektion von Buchensämlingen durch <i>P. citricola</i>	83

2.4.1 Einfluss der Inokulumdichte auf die Wasseraufnahme.....	83
2.4.2 Einfluss der Inokulumdichte von <i>P. citricola</i> auf die Gehalte an löslichen Zuckern in Wurzeln und Blättern infizierter Buchen	85
2.5 Induktion der Ethylenbiosynthese nach Infektion mit <i>P. citricola</i>.....	87
2.6 Elektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen nach Infektion mit <i>P. citricola</i>.....	89
2.7 Infektionsverlauf und Genexpression in Buchenkeimlingen inokuliert mit <i>P. citricola</i>	93
2.7.1 Einfluss von <i>P. citricola</i> auf die Physiologie der Buchensämlinge.....	93
2.7.2 Relative Genexpression in Blättern und Wurzeln infizierter Buchensämlinge.....	97
IV DISKUSSION	101
1 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS DEM KULTURFILTRAT VON <i>PHYTOPHTHORA CITRICOLA</i>.....	101
1.1 Rolle des Citricolins in der Wirt-Pathogen Interaktion <i>Fagus sylvatica</i> - <i>P. citricola</i>	101
1.1.1 Einfluss von Citricolin auf die Physiologie von Buchen- und Tabakblättern	101
1.1.2 Hypersensitive Reaktion und H ₂ O ₂ -Nachweis an Tabak nach Behandlung mit Citricolin	102
1.2 Extrazelluläre Metabolite von <i>P. citricola</i> als Virulenzfaktoren in der Interaktion mit <i>Fagus sylvatica</i>	103
1.2.1 Charakterisierung des Welkefaktors von <i>P. citricola</i>	103
1.2.2 Wirkmechanismus des Welkefaktors und Bedeutung im Wirt-Pathogen-System Buche - <i>P. citricola</i>	105
2 WIRT-PATHOGEN-INTERAKTION VON <i>PHYTOPHTHORA CITRICOLA</i> UND <i>FAGUS SYLVATICA</i>	106
2.1 Einfluss der Inokulation mit <i>P. citricola</i> auf die Physiologie und den Infektionsverlauf an Buchensämlingen	107
2.1.1 Einfluss des Pathogenbefalls auf die Physiologie	107
2.1.2 Split-root-System.....	109
2.1.3 Einfluss des Wasserstandes und Inokulumdichte	111
2.1.4 Induktion der Ethylenbiosynthese	113
2.2 Veränderungen in der Histologie	114
2.3 Veränderungen in der Genexpression.....	115
2.4 Erklärungsmodell	118
V LITERATURVERZEICHNIS	120

ZUSAMMENFASSUNG

Phytophthora citricola Saw. wurde als bedeutsames und aggressives Pathogen an Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) charakterisiert. Buchensämlinge, die mit dem Pathogen inokuliert wurden, zeigten nach wenigen Tagen einen starken Einbruch der Netto-CO₂-Aufnahmerate, der stomatären Leitfähigkeit und der Transpiration. Zudem zeigten das Wasserpotential, sowie die Quantenausbeute von Photosystems II einen leichten Einbruch vor dem Auftreten der ersten Symptome an Blättern. Typische Welkesymptome wurden erst nach dem deutlichen Absinken der zuletzt beschriebenen Parameter beobachtet. Quantitative PCR-Analysen an infizierten Buchensämlingen zeigten, dass eine *P. citricola* Infektion überwiegend an der Hauptwurzel und dem Wurzelhals begann, und dass das Pathogen fähig war, bis ins Hypokotyl einzuwachsen. Elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchung zeigten zudem, dass nach Infektion viele Zellen plasmolysierten und teilweise kam es zur Auflösung von Zellverbänden, ohne dass diese Zellen von Hyphen direkt penetriert wurden. Daraus wurde die mögliche Beteiligung von Toxinen oder hydrolytischen Enzymen abgeleitet.

Um dies zu überprüfen, wurde die Aufreinigung der Proteine aus dem *P. citricola*-Kulturfiltrat mittels FPLC durchgeführt. Zuerst wurde das Protein Citricolin (Elicitin) zur Homogenität gereinigt und an Buchensämlingen getestet; es erwies sich allerdings als wirkungslos. Demgegenüber reduzierte es bei Tabakblättern die Netto-CO₂-Aufnahmerate sowie die stomatäre Leitfähigkeit und verursachte die für Elicitine typischen Blattnekrosen. Die weitere Aufreinigung des *P. citricola*-Kulturfiltrates ergab eine Fraktion, die im Biotest ähnliche Welkesymptome verursachte, wie sie auch nach einer *P. citricola*-Wurzelinfektion an Blättern zu beobachten waren. Diese, als „Welkefaktor“ bezeichnete Proteinfraction, wurde mit Hilfe elektrophoretischer Methoden genauer charakterisiert. Die SDS-PAGE-Auftrennung resultierte in mindestens drei Proteinbanden (10, 25 und 75 kDa) mit sauren isoelektrischen Punkten. Diese Proteinfraction hemmte die Wasseraufnahme und reduzierte sowohl die Photosynthese als auch die Chlorophyll-Fluoreszenz im Buchentest. Zusätzliche histologische Untersuchungen an mit Welkefaktor behandelten Buchensämlingen zeigten die lokale Auflösung der Mittellamelle und die Desintegration von Zellwandstrukturen. Die aktive Fraktion zeichnete sich auch durch hydrolytische Aktivität aus, die hauptsächlich auf α - und β -Glucosidasen zurückzuführen war.

In weiterführenden Versuchen mit *P. citricola* inokulierten Buchensämlingen wurde gezeigt, dass sowohl die Hemmung der Photosynthese, als auch die Wasseraufnahme negativ mit der Konzentration von *P. citricola* in den Wurzeln korreliert war. Ein Schwellenwert zwischen 40 und 50 ng *P. citricola*-DNA mg⁻¹

Trockengewicht reichte aus, um beide Parameter signifikant zu beeinflussen. Es wurde zudem gezeigt, dass der Anstieg der Infektion in den Wurzeln mit der Abnahme aller löslichen Zucker korrelierte. Das aufwändige Split-root-Infektionssystem lieferte zudem Hinweise dafür, dass Invertasen lokal und systemisch für die Spaltung von Saccharose in mit *P. citricola* infizierten Wurzeln von Bedeutung sind.

Zusätzlich zeigten Buchensämlinge, die mit *P. citricola* inokuliert waren, eine zur Kontrolle signifikant gesteigerte Ethylenbildung, die mit der transienten, systemischen Expression der 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Oxidase (ACO) in Blättern zu erklären war. Auch für die Expression von Genen des Primär- und Sekundärstoffwechsels konnten deutliche Reaktionen der Pflanze auf den *Phytophthora* - Befall beobachtet werden. Für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcS) wurde eine Downregulation während der Pathogenentwicklung gemessen, was mit dem Einbruch der Photosynthese einherging. Die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcL) zeigte dagegen keine signifikanten Veränderungen in ihrem Expressionsmuster während des Infektionsverlaufes. Außerdem wurde eine Upregulation des Aquaporin-Gens vornehmlich in Blättern infizierter Buchensämlinge detektiert. In Wurzeln wurde, im Gegensatz zur Upregulation des Osmotin-Gens in Blättern, eine Downregulation nachgewiesen. Das Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT)-Gen zeigte nur in Buchenblättern eine signifikante Downregulation 6 und 144 Stunden nach Inokulation.

ABSTRACT

In the last decade *Phytophthora citricola* Saw. was described as an important and aggressive pathogen on European beech (*Fagus sylvatica* L.).

Inoculated beech seedlings, grown under controlled conditions, showed a significant decrease in net photosynthesis, stomatal conductance and transpiration as compared to controls. The electron quantum yield of photosystem II and leaf water potential were significantly impaired when wilt symptoms on leaves were visible.

Quantitative PCR analysis of beech saplings proved that *P. citricola* mainly infected the main root and that the pathogen was able to grow from infected roots up into the hypocotyl tissue.

Transmission electron microscopy (TEM) studies clearly showed that after infection many cells plasmolysed and the cell structure disintegrated without having been penetrated directly by hyphae.

For verification FPLC was used to characterize proteins from the culture filtrate of *P. citricola*. The purified protein Citricolin, an elicitor was tested on beech, but it proved to be ineffective to cause symptoms seen on beech saplings being infected with the root pathogen. However, Citricolin treatment on tobacco leaves caused a decreased gas exchange and stomatal conductance as well as leaf necrosis.

Further purification of the *P. citricola* culture filtrate resulted in a protein fraction that caused similar wilt symptoms as found on leaves of beech saplings infected with *P. citricola*. This so called "wilting factor" was further characterized by electrophoresis techniques. The separation by SDS-PAGE resulted in at least three protein bands (10, 25 and 75 kDa) with acidic isoelectric points. This fraction inhibited the water uptake and decreased photosynthesis as well as chlorophyll fluorescence in infected beech saplings. Additional histological investigations on beech seedlings treated with the wilting factor showed the disintegration of the middle lamella and of further cell wall structures. The active fraction was characterized by its hydrolytic activity that was mainly due to α - and β -glucosidases.

Further studies on beech saplings inoculated with *P. citricola* revealed that inhibition of photosynthesis as well as water uptake was negatively correlated with the amount of *P. citricola* present in roots. A threshold of 40 to 50 ng *P. citricola*-DNA mg⁻¹ dry weight was sufficient to affect both parameters significantly. In addition it was shown that the increase of infection in roots correlated with the decrease of all soluble sugar. The split-root infection system gave evidence for invertases being locally and systemically important to convert sucrose into glucose and fructose.

Beech saplings inoculated with *P. citricola* revealed a significantly increased ethylene biosynthesis, as compared to controls, that was due to the transient systemical

expression of 1-Aminocyclopropane-1-carbon acid oxidase (ACO) in leaves. In addition, significant reactions of inoculated plants regarding the expression of genes of the primary and secondary metabolism could be observed. In parallel with the breakdown of photosynthesis, a down-regulation of the small subunit of Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase (RbcS) was measured during the ongoing root infection. However, the large RbcL subunit did not show a significant change in leaves of infected plants. Furthermore an up-regulation of the aquaporin gene mainly in leaves of inoculated beech saplings was detected. In contrast to the up-regulation of the osmotin gene in leaves a down-regulation in roots was found. Finally a significant down-regulation of the coffee acid-O-methyltransferase (COMT) gene was monitored in beech leaves between 6 and 144 hours after inoculation.

I EINLEITUNG

1 BEGRIFFSBESTIMMUNGEN UND MODELLSYSTEME

1.1 *Phytophthora*-Krankheitskomplex

Phyto-Pathosysteme bestehen aus pflanzlichen Wirten und ihren Krankheitserregern, deren Beziehung als antagonistische Symbiose bezeichnet wird (Bailey, 1983). Dabei kann die Entwicklung von Wirt-Pathogenkomplexen zwischen beiden an der Pathogenese beteiligten Komponenten als Koevolution charakterisiert werden (Parlevliet, 1979), die auf einen zunehmenden Grad der Spezialisierung gerichtet ist und schließlich zu Gen-für-Gen-Beziehungen führt (Frank, 1992).

Phytophthora-Pathogene sind seit langem als aggressive meist bodenbürtige Wurzelzerstörer sowohl an krautigen als auch an vielen Holzpflanzen bekannt und sind weltweit im Pflanzenbau als Schadorganismen von Bedeutung (Erwin und Ribeiro, 1996). *Phytophthora* wird gemeinsam mit Kieselalgen, Braunalgen und Goldalgen in das Reich der Chromista eingeordnet (Familie Phytiaceae, Ordnung Peronosporales, Klasse Oomycetes, Abteilung Oomycota) (Hawksworth, 1995; Erwin und Ribeiro, 1996; Kumar und Rzhetsky, 1996; Cavalier-Smith, 1998; Kirk *et al.*, 2001; Agrios, 2005). Grund für die neue taxonomische Einordnung sind nicht-pilzliche Merkmale der Oomycota: die Zellwand enthält ein Mikrofibrillenskelett aus Zellulose, sowie 1-3-Glucane statt Chitin, die Zoosporen sind heterokont begeißelt, eine Ergosterolbiosynthese unterbleibt. Das coenozytische Myzel der Oomyceten bildet keine Septierungen.

Oomyceten haben die Fähigkeit zur sexuellen Reproduktion durch Bildung dickwandiger Oosporen nach der Vereinigung zweier nach Reduktionsteilung haploider Gameten, Antheridium und Oogonium. Diese findet allerdings nur gelegentlich statt. Zahlreiche Oomyceten zeigen eine an ein aquatisches Milieu angepasste Lebensweise. Sie bilden durch asexuelle Vermehrung doppelt begeißelte Zoosporen, die sich im Wasser selbständig fortbewegen können und als wesentliche Infektions- und Dispersionsorgane der Pathogene fungieren. Bei einigen Gattungen (z. B. *Bremia* und *Peronospora spp.*) ist jedoch eine Anpassung an das Landleben unter Rückbildung der mobilen Stadien der Zoosporen zu beobachten (Schlösser, 1997).

Bei *Phytophthora*-Arten ist die Feuchtigkeit ebenso wichtig für die Fortbewegung und damit für das Überleben (Erwin und Ribeiro, 1996; Agrios, 2005). Alle bodenbürtigen *Phytophthora*-Arten besitzen einen gemeinsamen Infektionszyklus (s. Abb. 1.1).

Optimale Temperatur- und pH-Bedingungen und von Pflanzen abgegebene Wurzelexsudate regen die dickwandigen, sexuell gebildeten Oosporen zur Keimung in der Rhizosphäre an. Angelockt von Wurzelexsudaten schwimmen die austretenden Zoosporen bei ausreichender Bodenfeuchte aktiv zu den Feinwurzeln der potentiellen Wirtspflanze und dringen im Bereich der Streckungszone der Feinwurzeln in die Epidermiszellen ein. Die innerhalb weniger Tage in den Wirtszellen gebildeten Zoosporen können nach ihrer Freisetzung bei genügend hoher Bodenfeuchte ständig Neuinfektionen am Wirt hervorrufen (Börner, 1997; Oßwald, 2004).

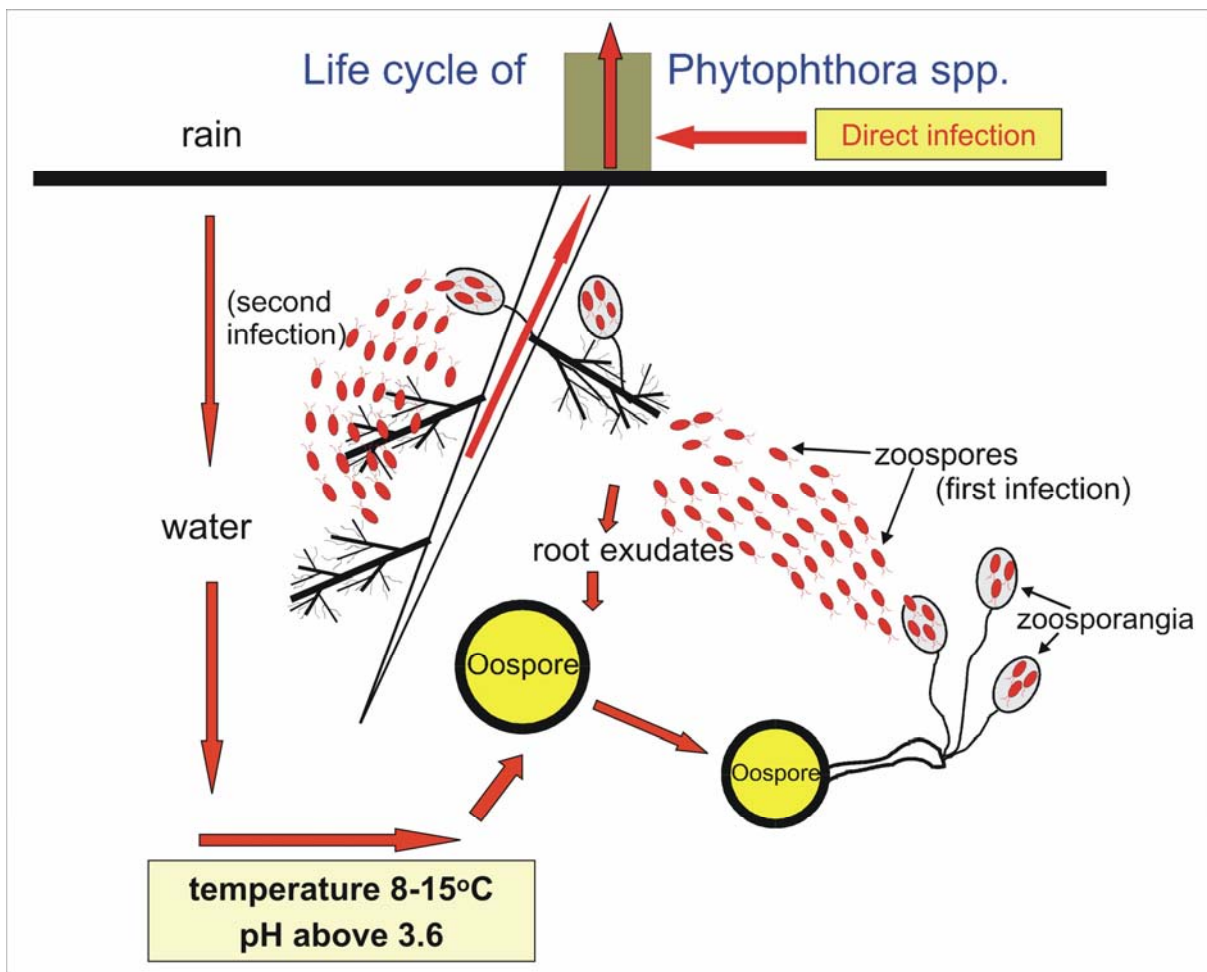


Abbildung 1: Infektionszyklus von bodenbürtigen *Phytophthora*-Arten (Oßwald, 2004).

Typische Symptome von an *Phytophthora* erkrankten Gehölzen stellen nekrotische Schleimflussflecken an der Stammbasis und Wurzelfäule dar (Erwin und Ribeiro, 1996). An Standorten mit zeitweiliger Staunässe wird die *Phytophthora*-Wurzelfäule besonders gefördert, da hier ideale Bedingungen für eine Infektion über Zoosporen gegeben sind (Hartmann und Blank, 1998). Vor dem Absterben der Bäume werden

an den Blättern in der gesamten Krone Chlorosen, Nekrosen und Welke sichtbar (Oßwald *et al.*, 2004).

Verantwortlich für das verstärkte Auftreten der *Phytophthora*-Erkrankungen wird unter anderem der hohe Stickstoffeintrag in die Wäldern gemacht, was zu verminderter Mycorrhiza-Besiedelung und damit zu einer Schwächung der Bäume führt. Auch der Klimawandel, der ein häufiges Auftreten von milden, feuchten Perioden im Winter und Frühling sowie zunehmende Trockenheit im Sommer auslöst, kann eine Ursache für das Baumsterben sein. *Phytophthora*-Arten sind in der Lage, bei Temperaturen zwischen 2° C und 8° C Sporangien und Zoosporen zu bilden. So kommt es zu einer zunehmenden Population der Pathogene und damit auch zu einer zunehmenden Feinwurzelzerstörung, während die Bäume durch die sommerlichen Trockenperioden noch zusätzlich gestresst sind und ihr Wurzelsystem nicht ausreichend regenerieren können (Jung *et al.*, 1996; Jung und Blaschke, 1996). Die Anfälligkeit der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) gegenüber *P. cactorum*, *P. cambivora* und *P. syringae* ist seit langem bekannt (Day, 1938). Neuerdings wurde auch in Nord- und Süddeutschland über das Vorkommen von *P. cambivora*, *P. citricola* und *P. syringae* in erkrankten Buchenbeständen berichtet (Jung und Blaschke, 1996; Hartmann und Blank, 1998; Jung, 2004).

Phytophthora citricola ist seit längerem als Verursacher einer Wurzel- und Rindenfäule an Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*) mit nachfolgendem Blatt- und Zweigsterben bekannt (Brasier und Strouts, 1976). Nechwatal *et al.* (2001) isolierten *P. citricola* aus dem Rhizosphärenboden von Buchen (*Fagus sylvatica*) und zeigten in Infektionsversuchen ein großes Schädigungspotential des Pathogens am Wurzelsystem der Bäume. Nachfolgende Arbeiten charakterisierten *P. citricola* als wichtige und aggressive Art an Rotbuche (Fleischmann *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Jung *et al.*, 2005). Bei zwei Jahre alten Buchensämlingen führte die Infektion mit *P. citricola* nach Knospenaustrieb zu einer signifikanten Reduktion von Netto-CO₂-Aufnahmerate und Transpiration. Einige Tage vor Beginn der Welke waren Photosynthese und Transpiration der Buchensämlinge nahezu auf Null abgesunken. Die Pflanzen litten zu diesem Zeitpunkt unter starkem Trockenstress (Fleischmann *et al.*, 2002). Neben einer Reduktion der physiologischen Parameter, zeigten die Autoren auch eine deutliche Zerstörung des Wurzelsystems durch das Pathogen.

1.2 Erregereigene Substanzen

Die Bedeutung biochemischer Faktoren bei der Wirt-Pathogen-Interaktion wurde schon am Ende des 19. Jahrhunderts durch die Arbeiten von de Bary mit zellfreien Kulturfiltraten *Sclerotinia* befallener Karotten erkannt (Graniti, 1991). Die Funktion

von Toxinen in der Ätiologie ist dabei im Verlauf der Geschichte der Phytopathologie kontrovers geblieben (Daly, 1987).

Hydrolytische Enzyme spielen eine große Rolle für das Eindringen von Pathogenen in die Wirtspflanze. Sie helfen dem Pathogen, Zellwandbestandteile in kleine Bruchstücke zu spalten, um sie so aufzulösen (Börner, 1997). Die Produktion hydrolytischer Enzyme durch *Phytophthora* wurde bereits 1978 von McIntyre und Hankin nachgewiesen. Sie konnten zeigen, dass *P. citricola* unter anderem Cellulasen, Lipasen, Amylasen und Proteasen absonderte (McIntyre und Hankin, 1978). Benhamou und Côté (1992) registrierten die Produktion von Pektinasen durch *P. parasitica* var. *nicotianae*.

Eine mögliche Beteiligung am Einbruch des Wassertransportes im Xylem infizierter Pflanzen haben nach Ansicht von Duniway (1977) auch vom Pathogen abgegebene Toxine. Auch Wolf *et al.* (1954) und Schramm *et al.* (1954) sehen in ihren Untersuchungen mit infizierten Tabakpflanzen einen engen Zusammenhang zwischen von *P. parasitica* var. *nicotianae* abgegebenen Toxinen und dem Zusammenbruch des Wassertransportes im Xylem. Als Toxin wird in der Phytopathologie nach einer Definition von Wood (1967) eine Substanz bezeichnet, die Protoplasten von Pflanzen unabhängig von ihrer Herkunft oder chemischen Natur schädigt oder abtötet. Damit werden mikrobielle Produkte zusammengefasst, die nicht-enzymatisch in geringen Konzentrationen schädigend auf Pflanzen wirken (Rudolph, 1976). Eine weitere Präzisierung erfolgte durch Durbin (1983) sowie Scheffer und Livingston (1984), die als Toxine nur die Produkte des mikrobiellen Stoffwechsels bezeichneten, die sichtbare Schäden am pflanzlichen Gewebe verursachen und in die Krankheitsentwicklung involviert sind (Pathogenitäts- oder Virulenzfaktoren).

Die Arbeiten von Wolf (1933) deuteten bereits an, dass *Phytophthora* phytotoxische Verbindungen sezerniert. Aufgrund der Fällbarkeit mit Magnesiumsulfat wurde vermutet, dass es sich bei den toxischen Komponenten des Kulturfiltrates um Proteine handeln könnte. Zahlreiche Arbeiten belegen die Synthese toxischer Verbindungen durch *Phytophthora*-Arten in Flüssigkultur (Rönnebeck, 1956; Paxton, 1972; Csinos und Hendrix, 1977; Plich und Rudnicki, 1979). Csinos und Hendrix (1977) bestätigten, dass *P. cryptogea* Toxine produziert, die an in Kulturfiltrat inkubierten Tabakblättern deutliche Welkesymptome hervorriefen. 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).

Im Zusammenhang mit der pflanzlichen Reaktion auf einen pathogenen Angriff ist der Begriff biotischer Elicitor für diejenigen Substanzen aus dem pilzlichen Metabolismus definiert worden, die typische Abwehrreaktionen der Pflanze im

inkompatiblen Verhältnis zu induzieren in der Lage sind (Ebel und Scheel, 1992; Kogel und Beißmann, 1992). Elicitoren können Reaktionen unspezifisch in einem breiten Wirtsspektrum oder spezifisch nur in den Pflanzen hervorrufen, die durch das betreffende Pathogen befallen werden (Yoshikawa, 1983; Yoshikawa *et al.*, 1993). Die vom Pathogen produzierten Elicitoren sind Substanzen verschiedener Stoffklassen, darunter Kohlehydrate, Proteine, Glykoproteine und Fettsäuren (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Kamoun, 2005). Verschiedene Pathogene der Gattung *Phytophthora* geben Elicitoren in ihr Kulturmedium ab. Dabei konnten Ricci *et al.* (1989; 1992) Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 kDa nachweisen. Von diesen Autoren wurden diese Proteine als „Elicitine“ zusammengefasst. Neben *Phytophthora*-Arten wurden Elicitine auch bei *Pythium vexans* nachgewiesen (Huet *et al.*, 1995). Bezüglich ihrer Nettoladung werden basische und saure Elicitine unterschieden (Birch *et al.* 1997). Basische β -Elicitine sind 50- bis 100-mal toxischer als saure α -Elicitine (Keller *et al.*, 1996; Birch *et al.*, 1997). Für *P. quercina* erbrachten Heiser *et al.* (1999) den Nachweis, dass es sich bei der phytotoxischen Komponente im Kulturfiltat um Elicitine handelte.

In zahlreichen Experimenten an mit Elicitinen behandeltem Tabak waren die Bildung von Blattnekrosen und zugleich die Akkumulation von „pathogenesis-related proteins“ (PR-Proteine) festzustellen (Bonnet *et al.*, 1986). Es trat eine Resistenz gegen die nachfolgende Inokulation mit *P. nicotianae* auf (Ricci *et al.*, 1989). Ponchet *et al.* (1999) zeigten, dass Elicitine in der Lage sind, sowohl eine hypersensitive Reaktion (HR) als auch eine systemisch erworbene Resistenz (SAR) zu induzieren. Kamoun *et al.* (1994) zeigten, dass Elicitine möglicherweise als Avirulenzfaktoren fungieren. Untersuchungen an verschiedenen *Phytophthora*-Arten ergaben, dass Isolate, die Elicitine produzierten, an Tabak nicht pathogen waren. Umgekehrt konnte an *P. parasitica* var. *nicotianae* eine starke Virulenz gegenüber Tabak beobachtet werden (Ponchet *et al.*, 1999). Auch Kamoun *et al.* (1994) fanden einige *P. parasitica* Isolate, die Elicitine produzierten und Tabak infizieren konnten. Auch eine Herabregulierung der Transkription von Elicitingenen während der kompatiblen Interaktion, d.h. während des Infektionsvorganges, wäre denkbar (Colas *et al.*, 2001). Colas *et al.* (2001) zeigten, dass die Transkription von Elicitingenen einiger *in vitro* Elicitine produzierender Isolate von *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* während der Infektion von Tabak herabgeregelt wird.

Im Versuch mit Tabakblättern zeigte sich sehr deutlich, dass die Elicitine von *P. quercina* die Auflösung von Biomembranen, besonders der Chloroplasten auslösten (Giefing, 1997). Erste mikroskopische Untersuchungen von Blättern mit *P. quercina* infizierter Eichen im Freiland zeigten eine Schädigung der Membranstrukturen der Chloroplasten (Heyne, 2002).

1.3 Pflanzeneigene Substanzen und Reaktionen

Höhere Pflanzen sind dem ständigen Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen ausgesetzt, von denen jedoch nur eine vergleichsweise geringe Zahl zur Infektion und damit zur Auslösung von Krankheiten in der Lage ist (Panopoulos et al 1984; Gabriel und Rolfe 1990).

Pflanzen reagieren auf biotischen oder abiotischen Stress mit der Expression von Genen, deren Produkte auf vielfältige Weise den Abwehrstatus der Pflanze erhöhen können (Heldt, 1996; Wasternack und Hause, 2000; Buchanan *et al.*, 2005). Während des frühen Stadiums der Abwehrantwort aktiviert der Wirt vielfältige Abwehrmechanismen. Diese Aktivierung ist ein Versuch der Pflanze, die Infektion und die Verbreitung des Pathogens einzuschränken. Zu diesen Abwehrmechanismen gehören die Induktion der Genexpression und die Produktion von PR-Proteinen, die Verstärkung von Zellwänden, sowie die Akkumulation von phenolischen Substanzen, die eine toxische Wirkung auf das Pathogen haben (Dixon and Lamb, 1990; van Kan *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1994; Smith, 1996; Dangl und Jones, 2001; Kessler und Baldwin, 2003; Agrios, 2005). Neuland stellen in mancher Hinsicht auch die Untersuchungen der biochemischen Abwehrmechanismen gegen einen Pathogenbefall an holzigen Pflanzen dar (Brummer, 2002). Es ist jedoch anzunehmen, dass holzige Pflanzen ähnliche Verbindungen zur Pathogenabwehr induzieren, wie krautige Pflanzen (Oßwald, 2000).

Zur erfolgreichen Abwehr von Oomyceten konnte nachgewiesen werden, dass Proteine der Familie PR-5, die so genannten Osmotine, innerhalb der Gruppe der thaumatinähnlichen Proteine, für Oomyceten toxisch sind. Osmotine hemmen das Wachstum von Oomyceten irreversibel (Elstner *et al.* 1996). 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 wurden. Vleeshouwers *et al.* (2000) beschreiben für *Solanum tuberosum* eine positive Korrelation zwischen der Expression von PR-1 (PR-1-Typ, unbekannt)-, PR-2 (β -1,3-Glucanasen)-, PR-5 (thaumatinähnlichen Proteinen)-Genen und der Resistenz verschiedener Kartoffelsorten gegen *Phytophthora infestans*.

Ein zusätzlicher Abwehrmechanismus ist die so genannte hypersensitive Reaktion (HR), die über oxidativen Stress vermittelt wird und zum Absterben von Pflanzengewebe im Bereich eines Infektionsherdes führt, wodurch die Ausbreitung von Pflanzenpathogenen, die auf lebende Zellen angewiesen sind, verhindert wird (Pennazio, 1995).

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).

Im weiteren Verlauf einer Infektion werden durch pflanzeneigene Botenstoffe Signale in nicht befallene Gewebe weitergegeben, die auch dort zur Auslösung von Abwehrreaktionen führen und die Entstehung von Sekundärinfektionen behindern (Ryals *et al.*, 1996). Eine Reihe von pflanzenendogenen Signalstoffen, die in die Stresstoleranz bzw. die Pathogenabwehr involviert sind, ist bereits bekannt. Zu nennen sind hier beispielsweise Salicylsäure, Benzoesäure, Jasmonsäure oder Ethylen (Buchanan *et al.*, 2005).

2 ZIELE DER ARBEIT

Um zu klären, auf welche Weise bodenbürtige *Phytophthora*-Arten ihre Wirte befallen und schließlich abtöten, muss der Effekt der Pathogene auf die Physiologie der infizierten Wirtspflanzen untersucht werden (Oßwald *et al.*, 2004). Die Untersuchung von mit verschiedenen *Phytophthora*-Arten infizierten holzigen Pflanzen ergab, dass physiologische Parameter wie Netto-CO₂-Aufnahmerate, Transpiration, stomatäre Leitfähigkeit, hydraulische Leitfähigkeit der Wurzeln und das Wasserpotential im Xylem gegenüber den Kontrollpflanzen deutlich erniedrigt waren (Duniway, 1977; Dawson und Weste, 1984; Ploetz und Schaffer, 1989; Brummer, 2001; Fleischmann *et al.*, 2002). Zudem kam es zu einem deutlichen Elektrolytverlust der Wurzeln als Antwort auf eine Infektion (Cahill *et al.*, 1985).

Fraglich ist, auf welche Weise *Phytophthora*-Pathogene derartig massive Schäden auslösen können. Die Produktion von hydrolytischen Enzymen und toxischen Substanzen durch *Phytophthora* konnte bereits bei einigen Interaktionen nachgewiesen werden (McIntyre und Hankin, 1978; Benhamou und Côté, 1992; Heiser *et al.*, 1999). Noch nicht vollständig geklärt ist jedoch, welche Metabolite von *Phytophthora citricola* für die Welkeerscheinungen an infizierten Buchen verantwortlich sein könnten. In diesem Zusammenhang galt es zuerst die Rolle der *P. citricola* Elicidine abzuklären.

Bereits gut beschrieben sind die nach einer Infektion mit *P. citricola* auftretenden Symptome, wie Welke der Blätter, das Abknicken der Blattstiele und schließlich das Absterben der Sämlinge. Unklar war bislang jedoch die Art und der Verlauf der Infektion von Buchenwurzeln durch *P. citricola*. Auch das Ausmaß der Infektion, welches die beschriebenen oberirdischen Symptome verursacht, sollte untersucht werden. So war es Ziel dieser Arbeit, mittels histologischer (inter- und intrazelluläres Wachstum in der Wurzel), physiologischer (Photosynthese, Wasserpotential,

Transpiration, Ethylen) und molekulargenetischer Methoden (quantitative PCR (qPCR)) die Art und den Verlauf der Infektion von Buchensämlingen durch *P. citricola* zu untersuchen und die zeitliche Abhängigkeit der Symptomausprägung von der Infektionsstärke zu analysieren. Zudem sollte die Wechselwirkung zwischen dem Wirt und dem Pathogen durch die Analyse wichtiger Genexpressions-Studien, die sowohl lokal in der Wurzel nach einer Infektion, als auch systemisch in den Blättern auftreten, komplettiert werden. Ein wichtiger Aspekt dabei war die anschließende Verknüpfung der Daten der Genexpression mit physiologischen und biochemischen Parametern.

II MATERIAL UND METHODEN

1 CHEMIKALIEN UND SONSTIGE MATERIALIEN

Chemikalie	Bezugsquelle
Absolute QPCR Rox Mix	ABgene
Absolute SYBR Green Rox Mix	ABgene
Acrylamid	Sigma
Agar	Caelo
Agarose	Life Technologies
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merk
Anthron	Sigma
Ampholyte (pH-Bereich 9,6 - 4,45)	BioRad
Bis-Acrylamid	Sigma
Bradford-Reagenz	BioRad
Bromphenolblau ($C_{19}H_9Br_4NaO_5S$)	Merck
5-Bromo-4-Chlor-3-Indylphosphat (BICP)	Sigma
Borsäure (H_3BO_3)	Merck
Bovine Serum Albumin (BSA)	Merck
Calciumcarbonat ($CaCO_3$)	Merck
Calciumchlorid ($CaCl_2 \cdot 2 H_2O$)	Roth
Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Roth
Citronensäure ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	Merck
Cupffersulfat ($CuSO_4 \cdot 5 H_2O$)	Merck
Diaminobenzidin (DAB)	Fluka
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
DNase I	ThermoScientific
DNeasy Kit	Qiagen
dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol, absolut	Roth
Ethidiumbromid	BioRad
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma
Eisensulfat ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$)	Merck
Formaldehyd (37 %)	Merck
Fructose	Merck

Glucose	Fluka
Glycerin (87 %)	Roth
Hot Star Taq-Polymerase	Qiagen
Salzsäure (H ₂ SO ₄)	Merk
Kaliumhexacyanoferrat K ₃ [Fe(CN) ₆]	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (H ₂ KPO ₄)	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Merck
Kupfersulfat (CuSO ₄)	Riedel - de Haën
L-Asparagin	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merk
Magenesiumsulfat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	Merck
Manganchlorid (MnCl ₄ * 4 H ₂ O)	Sigma
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Sigma
Natriumcitrat (C ₆ H ₈ O ₇ Na ₃ * 2H ₂ O)	Merck
Natriummolibdat (NaMoO ₄ * 2 H ₂ O)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Fluka
Natriumsulfid.(Na ₂ S ₂ O ₅ *H ₂ O)	Merck
N,N'-Dimethyl-Formamid (70 %)	Sigma
4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck
PCR-Standard (100 Basenpaar Leiter)	Biosciences
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	Sigma
Primer für qualitative und quantitative PCR	Metabion
Resin Phytopure	Biosciences
Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit	ABgene
Saccharose	Merck
Silbernitrat (AgNO ₃)	Merck
Sodiumdodecylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa)	Sigma
Tricin	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethane 99 % ((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	Aldrich
Thiaminhydrochlorid	Serva
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Merk
Wizard DNA clean up System	Promega
Xylose	Roth
Zinksulfat (ZnSO ₄ * 7 H ₂ O)	Merck

2 KULTURMEDIEN

V8-Medium / Karottensaftmedium

Gemüse-/ Karottensaft	200 mL
CaCO ₃ (gefällt)	3 g
Agar	18 g
	ad 1 L H ₂ O _{dest.}

Bei 120 ° C und 1,2 atü 30 min autoklavieren.

M1-Medium

Glucose	15 g
L-Asparagin	2 g
CaCl ₂ * 2 H ₂ O	10 mg
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,1 mg
KH ₂ PO ₄	0,47 g
K ₂ HPO ₄	0,26 g
Thiaminhydrochlorid	1 mg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg
CuSO ₄ * 5 H ₂ O	0,02 mg
NaMoO ₄ * 2 H ₂ O	0,02 mg
MnCl ₄ * 4 H ₂ O	0,02 mg
	ad 1 L H ₂ O _{dest.}

Bei 120 ° C und 1,2 atü 30 min autoklavieren. Die Glucose erst nach dem Abkühlen des Kulturmediums zugeben.

3 PUFFER UND LÖSUNGEN

3.1 Kohlehydratnachweis

Anthron-Reagenz

Anthron	200 mg
H ₂ SO ₄ _{konz.}	100 mL
auf Eis mischen, anschließend zugeben:	
H ₂ O _{bidest.}	30 mL
Ethanol (96 %)	8 mL

Die entstanden Lösung muss eine zitronengelbe Farbe aufweisen. Diese Lösung ist nur wenige Tage im Kühlschrank haltbar.

3.2 Gelfiltration

Probenpuffer I (1 M Phosphatpuffer pH 7,0 + 1,5 M NaCl)

KH ₂ PO ₄	27,2 g
NaCl	87,7 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}
K ₂ HPO ₄	34,8 g
NaCl	87,7 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Lösungen auf pH 7,0 einstellen.

Laufpuffer I (100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 + 0,15 M NaCl)

Probenpuffer I	200 mL
	ad 2 L H ₂ O _{bidest.}

Probenpuffer II (200 mM Citratpuffer pH 4 + 1,5 M NaCl)

Citronensäure * H ₂ O	42,028 g
NaCl	87,7 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}
Natriumcitrat * 2H ₂ O	58,82 g
NaCl	87,7 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Lösungen auf pH 4,0 einstellen.

Laufpuffer II (20 mM Citratpuffer pH 4 + 0,15 M NaCl)

Probenpuffer II	200 mL
	ad 2 L H ₂ O _{bidest.}

3.3 Elektrophorese

Acrylamid-Lösung (30 %/49,5 %)

Acrylamid	30 g/ 48 g
Bis-Acrylamid	0,8 g/ 1,5 g
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

SDS-Lösung (10 %)

Natriumdodecylsulfat (SDS)	10 g
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin) unverdünnt

APS-Lösung (10 %)

Ammoniumperoxodisulfat (APS)	0,1 g
	ad 1 mL H ₂ O _{bidest.}

immer frisch ansetzen.

3.3.1 Tris-Glycin-SDS-PAGE

Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl)

Tris(hydroxymethyl)aminomethane 18,17 g
ad 100 mL H₂O_{bidest.}

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 8,8 einstellen.

Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl)

Tris 6,05 g
ad 100 mL H₂O_{bidest.}

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 6,8 einstellen.

Probenpuffer

Sammelgelpuffer 2,5 mL
Glycerin (87 %) 2 mL
Bromphenolblau 5 mg
SDS-Lösung (10 %) 2 mL
H₂O_{bidest.} 2,5 mL

Laufpuffer

Tris 3 g
Glycin 14,4 g
H₂O_{bidest.} 800 mL
Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 8,3 einstellen.
SDS-Lösung (10 %) 10 mL
ad 1 L H₂O_{bidest}

Trenngel (12 %/ 15 %)

Acrylamid-Lösung (30 %) 4 mL/ 5 mL
Trenngelpuffer 2,5 mL/ 2,5 mL
H₂O_{bidest.} 3,5 mL/ 2,5 mL
SDS-Lösung (10 %) 100 µL/ 100 µL
TEMED 5 µL/ 5µL
APS-Lösung (10 %) 50 µL/ 50 µL

Das Trenngel wurde mit 1 mL Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberkante des Gels zu erhalten.

Sammelgel (4 %)

Acrylamid-Lösung (30 %) 1,3 mL
Sammelgelpuffer 2,5 mL
H₂O_{bidest.} 6,2 mL
SDS-Lösung (10 %) 100 µL
TEMED 10 µL
APS-Lösung (10 %) 50 µL

3.3.2 Tris-Tricin-SDS-PAGE

Gelpuffer (2,5 M Tris-HCl)

Tris	30,33 g
SDS-Lösung (10 %)	3 mL
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 8,45 einstellen.

Probenpuffer

Anodenpuffer	2,5 mL
Glycerin (87 %)	1,2 mL
Mercaptoethanol	0,2 mL
Bromphenolblau	5 mg
SDS	0,4 g

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 6,8 einstellen. 30 min bei 40 ° C im Wasserbad inkubieren.

Kathodenpuffer

Tris	12,11 g
Tricin	17,92 g
H ₂ O _{bidest.}	800 mL
SDS-Lösung (10 %)	10 mL

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 8,25 einstellen.
ad 1 L H₂O_{bidest.}

Anodenpuffer

Tris	24,22 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Durch Zugabe von HCl_{konz.} (32 %) pH-Wert auf 8,9 einstellen.

Trenngel (16,5 %)

Acrylamid-Lösung (49,5 %)	2,5 mL
Gelpuffer	2,5 mL
Glycerin (87 %)	1,15 mL
H ₂ O _{bidest.}	1,35 mL
TEMED	15 µL
APS-Lösung (10 %)	50 µL

Das Trenngel wurde mit 1 mL Ethanol überschichtet, um eine gerade Oberkante des Gels zu erhalten.

Sammelgel (4 %)

Acrylamid-Lösung (49,5 %)	0,25 mL
Gelpuffer	0,78 mL
H ₂ O _{bidest.}	2,1 mL

TEMED	10 µL
APS-Lösung (10 %)	40 µL

Sowohl für die Herstellung von Tris-Glycin-, als auch Tris-Tricin-Gelen, wurde die Sammelgellösung auf ein polymerisiertes Trenngel gegossen und ein Kamm zur Probenaschenbildung eingesetzt. Nach dem Auspolymerisieren wurden die Proben und Standards aufgetragen und bei konstanter Stromstärke aufgetrennt (siehe II-6.2).

3.3.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

<u>Kathodenpuffer</u>	NaOH (40 mM)
<u>Anodenpuffer</u>	H ₂ PO ₃ (20 mM)
<u>IEF-Gel (5 %)</u>	
Acrylamid-Lösung (30 %)	1,3 mL
Glycerin (87 %)	2,4 mL
Ampholyte (40 %)	0,6 mL
(pH-Bereich 9,6 - 4,45)	
H ₂ O _{bidest.}	7 mL
TEMED	20 µL
APS-Lösung (10 %)	50 µL

3.3.4 Westernblot

<u>Blottingpuffer</u>	
Glycin	2,93 g
Tris	5,81 g
SDS	0,375 mL
H ₂ O _{bidest.}	700 mL
Methanol	200 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}
<u>Tris-HCl 1 M Stammlösung (SL)</u>	
Tris	12,11 g
H ₂ O _{bidest.}	80 mL
Durch Zugabe von HCl (1N) pH Wert auf 7,5 einstellen.	
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}
<u>NaCl 5 M Stammlösung (SL)</u>	
NaCl	29,2 g
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

TBS

Tris-HCl SL	20 mL
NaCl SL	30 mL
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

TBS-BSA

BSA	10 g
Tris-HCl SL	20 mL
NaCl SL	30 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

TBS-T

Tween 20	500 µL
Tris-HCl SL	20 mL
NaCl SL	30 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Antikörper

Antikörper gegen α -Cryptogein von *Phytophthora cryptogea* zur Verfügung gestellt von Dr. Kauffmann, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Université Louis Pasteur, Strasbourg Cedex, Frankreich, wurden 1:2000 in TBS-BSA verdünnt.

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

TBE-Puffer

Tris	54 g
Borsäure	27 g
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) 0,5 M	20 mL (2,922 g)
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Bromphenolblau (Farbmarker)

Bromphenolblau	1 mg
TBE-Puffer	1 mL

Bei -20° C aufbewahren.

Agarosegel (klein/ groß)

Agarose	0,6 g/0,9 g
TBE-Puffer	40 mL/ 60 mL

mischen und in Mikrowelle aufkochen lassen. Kurz abkühlen lassen.

Ethidiumbromid	1 µL/1 µL
----------------	-----------

3.4 Färbungslösungen für Polyacrylamidgele und Westernblot

3.4.1 Silbernitratfärbung

Fixierlösung

Essigsäure (100 %)	10 mL
Methanol	40 mL
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

Waschlösung

Ethanol	100 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Silbernitratlösung

Silbernitrat	0,2 g
	ad 200 mL H ₂ O _{bidest.}

Entwicklungslösung

Na ₂ CO ₃	30 g
H ₂ O _{bidest.}	900 mL
Formaldehyd (37 %)	0,5 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Stopplösung

Essigsäure (100 %)	10 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

Entfärbelösung

Na ₂ S ₂ O ₂ *H ₂ O	8 g
in H ₂ O _{bidest.} lösen	
K ₃ [Fe(CN) ₆]	5 g
	ad 500 mL H ₂ O _{bidest.}

3.4.2 Coomassie-Färbung

Fixierlösung

Trichloressigsäure (TCA)	12 g
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

Waschlösung

Färbe-Reagenz A	10 mL
	ad 40 mL H ₂ O _{bidest.}

Entwicklungslösung

Färbe-Reagenz A	8 mL
H ₂ O _{bidest.}	32 mL

Färbe-Reagenz B	0,8 mL
Methanol	10 mL
<u>Entfärbelösung</u>	
Methanol	250 mL
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

3.4.3 Entwicklung des Westernblots

NBT-Lösung

4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)	75 g
70 % N,N'-Dimethyl-Formamid	1 mL

BCIP-Lösung

5-Bromo-4-Chlor-3-Indylphosphat (BCIP)	50 mg
N,N'-Dimethyl-Formamid (70 %)	1 mL
H ₂ O _{bidest.}	1 mL

Entwicklungslösung

Tris	12,11
NaCl SL	20 mL
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	1,02 g
H ₂ O _{bidest.}	800 mL
Durch Zugabe von HCl (1M) pH-Wert auf 9,5 einstellen.	
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

3.5 Wasserstoffperoxyd-Nachweis

MES-Puffer (pH 6,5)

2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	1,952 g
	ad 1 L H ₂ O _{bidest.}

DAB-Lösung (0,1 %)

Diaminobenzidin (DAB)	0,25 g
MES-Puffer	250 mL
stets frisch angesetzt.	

3.6 Extraktion von Nucleinsäuren

3.6.1 Extraktion von RNA

Extraktionspuffer

Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	20 g
Polyvinylpyrrolidon (PVP)	20 g
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	9,3 g
NaCl	116,88 g
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

Die Lösung wird autoklaviert, anschließend

Spermidine	0,5 g
------------	-------

β-Mercaptoethanol	2 %
-------------------	-----

vor Gebrauch zugegeben.

DEPC-H₂O

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	20 mL
	ad 100 mL H ₂ O _{bidest.}

3.6.2 Extraktion von DNA

Für die Extraktion der DNA wurde das DNeasy Plant Kit (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben mit Hilfe des Wizard DNA Clean Up Systems (Promega, Deutschland).

4 KULTIVIERUNG DER PFLANZEN UND DES PATHOGENS

4.1 Anzucht von Buchensämlingen (*Fagus sylvatica* L.)

Die verwendeten Buchensamen stammten aus dem Reifejahr 2002, Herkunft 81010 (Hessen Forst Samendarre, Wolfgang Rodenbacher Chaussee 10, 63457 Hanau). Das Saatgut wird bei -10° C in luftdichten Kunststoffsäcken gelagert. In diesem Zustand befindet sich das Saatgut noch in der Dormanz und wird deshalb 48 Tage vor dem Aussattermin stratifiziert. Die getrockneten und eingefrorenen Bucheckern wurden aufgetaut und intensiv (bis zu zweimal täglich) angefeuchtet. Für die Keimung muss das Saatgut eine Feuchte von 35 bis 40 % erreichen. Überschüssiges Wasser muss bei diesem Prozess zügig abfließen können, weshalb das Saatgut in Plastikschaalen mit Vermiculit ausgelegt und bei 3-5° C im Kühlschrank inkubiert wurde. Das keimende Saatgut wurde in „root trainer“ mit sterilem Vermiculit

überführt und unter zusätzlicher Belichtung ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 20°C bis zur weiteren Verwendung kultiviert.

4.2 Anzucht von Buchensämlingen für ein „Split-root-System“

Nach erfolgreicher Stratifizierung und Keimung des Buchensaatgutes wurde die Spitze der Keimwurzel (ca. 2 cm) unter sterilen Bedingungen entfernt (s. Abb. 2). Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass die primäre Wurzelspitze, die den höchsten Cytokiningehalt aufweist, entfernt wird und dadurch die Dominanz der Hauptwurzel unterbindet und die Induktion von Seitenwurzeln ermöglicht wird (Taiz und Zeiger, 2000). Die gewonnenen Buchensämlinge wurden in „root trainer“ mit Vermiculit überführt und unter zusätzlicher Belichtung ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) bei 20°C bis zur weiteren Verwendung kultiviert.

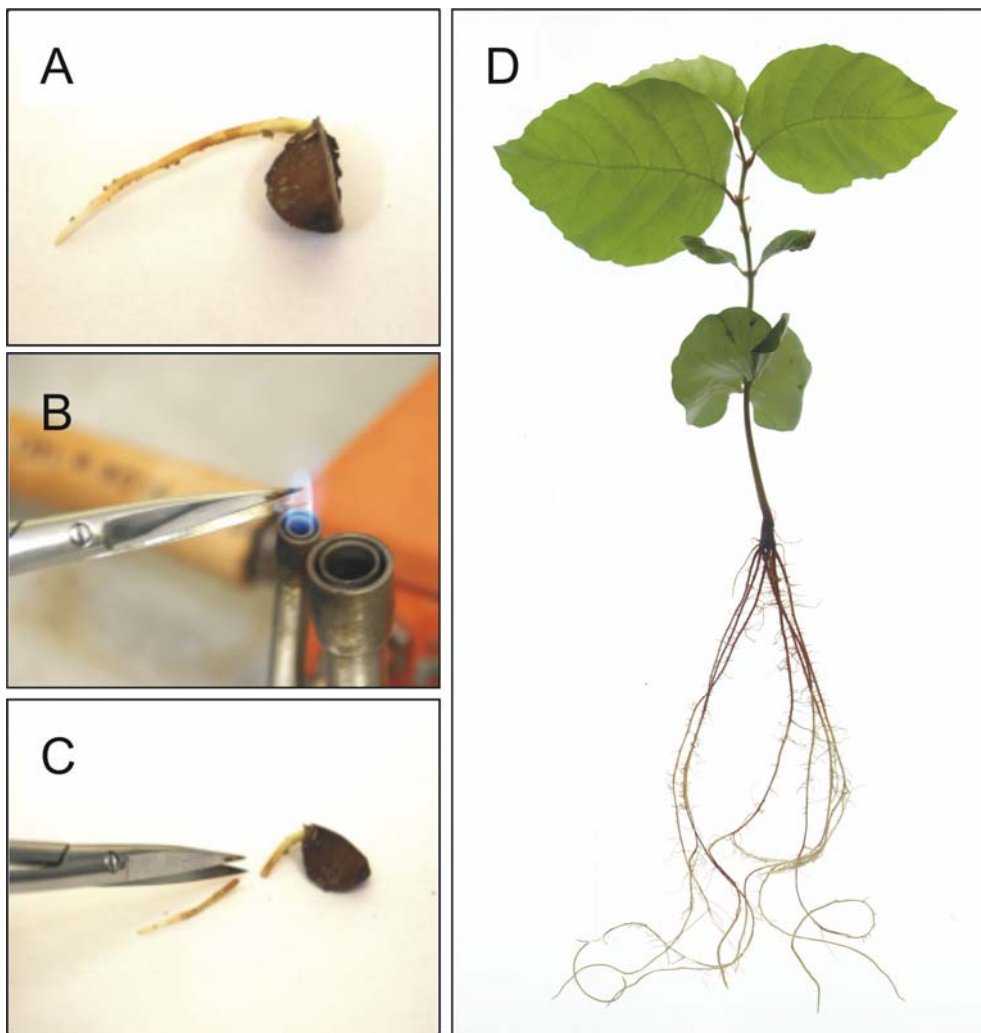


Abbildung 2: Induktion von Seitenwurzeln an Buchensämlingen: (A) Saatgut mit Keimwurzel ca. 2 cm; (B) Sterilisierung; (C) Entfernung der Keimwurzelspitze, (D) Buchensämling mit induzierten Seitenwurzeln.

4.3 *Phytophthora*-Kultur und Sporangien- bzw. Zoosporengewinnung

Für alle Infektionsversuche wurden Kulturen von *Phytophthora citricola* (Isolat Bu 137/7N - Mykothek Fachgebiet Pathologie der Waldbäume - TUM) verwendet. Die Kultivierung des Pathogens erfolgte auf Gemüsesaft- oder Karottensaftagar bei 18° C im Brutschrank (s. II. 2). Für die Erhaltung der Kultur wurden in regelmäßigen Abständen mit *P. citricola* überwachsene „Agarplugs“ unter sterilen Bedingungen auf frische Agarplatten übertragen.

Um die Sporangienbildung zu induzieren, wurden mehrere Agarplatten mit *P. citricola* beimpft und bei 18° C für 3 Tage im Brutschrank kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Platten für 4 bis 5 Tage mit sterilem H₂O_{dest.} überschichtet, um die Nährstoffe aus dem Agar zu lösen. Das Wasser wurde täglich 2-3 mal gewechselt. Um eine erfolgreiche Sporangienbildung zu bekommen, wurden die Platten erneut für 5 bis 10 Tage mit sterilem H₂O_{dest.} überschichtet. Teilweise wurde das Wasser 24 Stunden vor Inokulation durch Wurzelexsudate von Buchensämlingen ersetzt, um die Sporangienbildung verstärkt zu fördern. Nach erfolgter Sporangienbildung wurde der Deckel der Petrischale zur Sauerstoffzufuhr geöffnet und für 30 min im Kühlschrank bei 4° C inkubiert, um so die Entlassung der Zoosporen aus den Sporangien anzuregen. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen.

4.3.1 Direkte Bestimmung der Zoosporenzahl mit Hilfe einer Thomakammer

Die Thomakammer besteht aus 400 Kleinquadraten mit je 0,05 mm Kantenlänge. 16 Kleinquadrate bilden ein Großquadrat. Die Fläche eines Kleinquadrates misst 0,0025 mm², die eines Großquadrates 0,04 mm². Über jedem Kleinquadrat befindet sich ein Volumen von 0,00025 mm³, über jedem Großquadrat 0,004 mm³. Das Deckglas wird aufgelegt, am Rande fest auf den Objektträger gedrückt und bei einer 100fachen Vergrößerung lokalisiert. Es werden vier Großquadrate in der Diagonalen ausgezählt und daraus wird die Zahl der Zoosporen pro Milliliter mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$\text{Zoosporen mL}^{-1} = \frac{\text{Zahl der Zoosporen pro Großquadrat} \times 10^6}{4}$$

Die Zählung der Zoosporen in den vier Großquadraten erfolgte mindestens fünfmal.

4.4 *Phytophthora* Kulturfiltratgewinnung

P. citricola wurde in flüssigem M1-Medium kultiviert (s. II. 2). Das Medium wurde zu je 75 mL in Erlenmeyerkolben gefüllt und jeder Kolben wurde mit 10 Agarplugs mit 5

mal 5 mm Kantenlänge von 6 bis 7 Tage alten *P. citricola* Kulturen entnommen und überimpft. Als Kontrolle wurden Agarplugs ohne Pathogen verwendet. Die Kolben wurden 9 Tage im Dunkelraum bei ca. 20° C auf einem horizontalen Schüttler bei 150 U min⁻¹ inkubiert.

Nach 9 Tagen Inkubation wurde das beimpfte M1-Flüssigmedium zunächst durch einen Papierfilter abfiltriert und anschließend durch eine 5,0 µm- und letztlich durch eine 0,2 µm- Membran filtriert. Das Kulturfiltrat wurde zur weiteren Verwendung bei -25° C aufbewahrt.

5 PHOTOMETRISCHE BESTIMMUNG DER PROTEIN- UND ZUCKERKONZENTRATIONEN

5.1 Bestimmung des Proteingehalts

Zur Bestimmung des Proteingehaltes im *Phytophthora*-Kulturfiltrat wurde die Methode nach Bradford (1976), verwendet. Als Referenz wurde Rinderserumalbumin (BSA 100 mg mL⁻¹) in einer Konzentrationsreihe von 0 bis 12,5 µg mL⁻¹ verwendet, um so die unbekannt Proteingehalte zu ermitteln. Folgende Übersicht zeigt den Ansatz für 1 mL Probenvolumen:

	BSA [µL]	Probe [µL]	H ₂ O _{bidest.} [µL]	Bradford-Reagenz [µL]
BSA-Lösung	x	-	800 - x	200
Nullwert	-	-	800	200
Probe	-	x	800 - x	200

Die Proben wurden kurz gemixt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung am Photometer erfolgte bei 595 nm. Bei allen Proben wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

5.2 Zucker-Analytik

5.2.1 Anthron-Test

Der Kohlenhydratgehalt im *Phytophthora*-Kulturfiltrat wurde mittels Anthron-Reagenz bestimmt (s. II. 3.1). Als Referenz wurde Glucose in einer Konzentrationsreihe von 0 bis 200 µg mL⁻¹ verwendet. Folgende Übersicht zeigt den Ansatz für 1 mL Probenvolumen:

	Glucose [μL]	Probe [μL]	$\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ [μL]	Anthron-Reagenz [μL]
Glucose-Lösung	x	-	200 - x	800
Nullwert	-	-	200	800
Probe	-	x	200 - x	800

Die Proben wurden kurz gemixt und 7 min bei 100°C erhitzt. Nach dem Abkühlen konnte die Extinktion der gelbgrünen Lösung bei 578 nm photometrisch gemessen werden. Bei allen Proben wurde eine Dreifach-Bestimmung durchgeführt.

5.2.2 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

5.2.2.1 Bestimmung des Zuckergehaltes des *Phytophthora*-Kulturfiltrates

Vor dem Auftrag auf die HPLC wurden die Proben durch einen $0,2\ \mu\text{m}$ Nylonmembranfilter filtriert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -25°C aufbewahrt. Je $20\ \mu\text{l}$ des Kulturfiltrates wurden an der HPLC, bestehend aus einer L 6200/A Pumpe (Hitachi, Deutschland), einer HPX-87C Aminex-Säule (Bio-Rad Deutschland) und einem RI-Monitor 1755 Refraktionsindexdetektor (Bio-Rad Deutschland) bei 85°C aufgetrennt. Als Laufmittel diente entgastes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$. Die Flussrate betrug während der Messungen konstant $0,6\ \text{mL min}^{-1}$. Vor Messung der Proben wurde die HPLC-Säule anhand der Retentionszeiten mit Konzentrationsreihen von Glucose-, Fructose-, Xylose-, und Saccharose-Standardlösungen ($0,2$; $0,4$ und $0,6\ \text{mg L}^{-1}$) kalibriert.

5.2.2.2 Bestimmung des Zuckergehaltes des Pflanzenmaterials

Die Blatt- und Wurzelproben aus Infektionsversuchen wurden 24 Stunden gefriergetrocknet und anschließend in einer Kugelmühle für 2 min bei $7000\ \text{U min}^{-1}$ zu Pulver gemahlen.

Für die Bestimmung des Zuckergehaltes in den Proben wurden jeweils 20 mg des Pulvers extrahiert. Zu jeder Probe wurde $1,0\ \text{mL H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ zugegeben und im Reaktionsgefäß-Schüttler für 10 Sekunden gemischt. Das Gemisch wurde bei 80°C im Wasserbad für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei $12500\ \text{g min}^{-1}$ für 4 min zentrifugiert, und etwa $900\ \mu\text{L}$ des Überstandes in ein $2\ \text{mL}$ Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde die Extraktion mit je $0,5\ \text{mL H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ zweimal wiederholt. Die Inkubationszeit im dritten Schritt betrug nur noch 5 min. Abschließend wurde der Überstand für 4 min bei $12500\ \text{g min}^{-1}$ zentrifugiert und in ein neues $2\ \text{mL}$ Reaktionsgefäß überführt. Der Extrakt wurde bis zur weiteren Analyse bei -25°C aufbewahrt. Die Messungen wurden, wie in II-5.2.2.1

beschrieben, durchgeführt. Zur Kontrolle der Extraktion und der Messergebnisse wurden Mischproben aus Buchenblattmaterial (Blumenröther *et al.*, 2007) als Referenz mitextrahiert und analysiert.

6 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS ROHEM KULTURFILTRAT VON *PHYTOPHTHORA CITRICOLA*

6.1 Flüssigkeitschromatographie (FPLC)

Für die Aufreinigung der Proteine, die von *P. citricola* in das Kulturfiltrat abgegeben werden, wurde eine Gelfiltration verwendet. Die Verwendung einer HiPrep 16/60 Sephacryl S-100 High Resolution (Amersham, Schweden) Gelfiltrationssäule ermöglicht die Auftrennung und die Bestimmung der Molekulargewichte nativer Proteine im Bereich von 1 bis 100 kDa anhand von Standardproteinen. Die Säule wurde mit Laufpuffer equilibriert. Das gewonnene *P. citricola*-Kulturfiltrat (s. II. 4.4) wurde zuerst 20fach aufkonzentriert und bei 4° C 24 Stunden gegen H₂O_{dest.} dialysiert, lyophilisiert und in entsprechenden Probenpuffer aufgenommen. Je 2 mL Probe wurde auf die Gelfiltrationssäule bei einer Flussrate von 0,5 mL s⁻¹ aufgegeben (s. II. 3.2).

Pro Lauf wurden 30 5 mL-Fractionen aufgefangen und bis zur weiteren Verwendung bei -25 ° C aufbewahrt.

Das Ausschlussvolumen wurde experimentell durch Aufgabe von Dextran Blue bestimmt. Eine Kalibrierungsgerade zur Bestimmung unbekannter Molekulargewichte wurde mit Hilfe von Proteinstandards erstellt.

Die Retentionszeiten (K_{av}) der Standardprotein-Peaks wurden mit folgender Formel verrechnet:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V_e = Elutionsvolumen Protein

V_t = Gesamtvolumen Säulenmatrix

V_o = Ausschlussvolumen

Bei optimaler Trennleistung der Säule ergeben die K_{av} -Werte, aufgetragen gegen den Logarithmus der Molekulargewichte, eine lineare Funktion ($y = -0,1831x + 2,2196$, $R^2 = 0,87$). Die Molekulargewichte der unbekanntenen Proteine in der aufgetragenen Probe wurden durch Einsetzen ihrer K_{av} -Werte in die Geradengleichung ermittelt.

6.2 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Proteine, die von *P. citricola* ins Kulturfiltrat abgegebenen werden, darzustellen, wurde eine diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierten Bedingungen (SDS-PAGE) verwendet. Als Matrix für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine dienten Tris-Glycin-Gele als 4 %ige Sammel- bzw. 12,5 %ige oder 15 %ige Trenngele (Lämmli, 1970). Tris-Tricin-Gele wurden als 4 %ige Sammel- und 16,5 %ige Trenngele verwendet (Schägger und von Jagow, 1987) (s. II. 3.3.1 und II. 3.3.2).

Die Elektrophorese wurde jeweils mit (8 x 5,5 x 0,075 cm) Gelen in einer Mini-PROTEAN II Apparatur (Bio-Rad, Deutschland) durchgeführt. Die bei der Elektrophorese verwendeten Proben wurden zuerst bei 4° C 24 Stunden gegen H₂O_{dest.} dialysiert, lyophilisiert und in Probenpuffer (s. II. 3.3.1 und II. 3.3.2) aufgenommen. Die Probentaschen mit 25 µL Volumen wurden mit maximal 15 µL Probe befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanter Stromstärke von 30 mA pro Gel.

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine entweder direkt angefärbt (s. II. 6.4) oder mittels Westernblot (s. II. 6.5) auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die Molekulargewichte der angefärbten Proteinbanden konnten mit Hilfe der aufgetragenen Standards errechnet werden (s. II. 6.6).

6.3 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung dient zur Charakterisierung der im Kulturfiltrat von *P. citricola* befindlichen Proteine anhand ihres isoelektrischen Punktes. Für die Auftrennung der Proteine wurden 5 %ige native Acrylamidgele angefertigt (s. II. 3.3.3). Die Proben wurden bei 4° C 24 Stunden gegen H₂O_{dest.} dialysiert, lyophilisiert und in dem entsprechenden Probenpuffer (s. II. 3.3.3) aufgenommen. Die Fokussierung wurde bei einem steigenden Spannungsgradienten von 100 V (15 min), 200 V (60 min), 300 V (45 min) bis 400 V (30 min) durchgeführt. Die Proteine wurden im Anschluss mittels Silbernitratfärbung lokalisiert (s. II. 6.4.1).

Die isoelektrischen Punkte der angefärbten Proteinbanden konnten mit Hilfe der aufgetragenen Standards kalkuliert werden (s. II. 6.6).

6.4 Färbung der Polyacrylamidgele

6.4.1 Silbernitratfärbung

Die SDS-Tris-Glycin-, Tris-Ticin- und IEF-Gele wurden einer Silbernitratfärbung unterzogen; diese erfolgte modifiziert nach Blum *et al.* (1987). Folgende Übersicht zeigt den Verlauf der Färbung:

1. Fixieren	Fixierlösung	> 1h
2. Waschen	Waschlösung	2 x 5 min
	H ₂ O _{bidest.}	3 x 3 min
3. Färben	Silbernitratlösung	30 min
4. Waschen	H ₂ O _{bidest.}	30 s
5. Entwickeln	Entwicklungslösung	10 min
6. Stoppen	Stopplösung	10 min
7. Waschen	H ₂ O _{bidest.}	3 x 3 min
8. Entfärben	Entfärbelösung	5 min
9. Waschen	H ₂ O _{bidest.}	5 x 3 min
10. Wiederholung der Schritte drei bis sieben.		

Die Lösungen wurden wie in II. 3.4 beschrieben, hergestellt.

6.4.2 Coomassie-Färbung

Zur Färbung der Polyacrylamidgele wurde die Coomassie-Färbung nach Neuhoff *et al.* (1988), verwendet. Der Ablauf der Färbung ist in folgender Übersicht dargestellt:

1. Fixieren	Fixierlösung	> 1h
2. Waschen	Waschlösung	1 h
3. Entwickeln	Entwicklungslösung	> 3 h
4. Entfärben	Entfärbelösung	3 x 30 min
5. Waschen	H ₂ O _{bidest.}	30 min

Die Lösungen wurden wie in II. 3.4.2 beschrieben, hergestellt.

6.5 Westernblot

6.5.1 Proteintransfer

Nach der Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE werden diese auf eine Membran transferiert. Dazu werden das Gel und die Membran zwischen zwei in Blottingpuffer getränkte Filterpapierschichten gelegt, die ihrerseits Kontakt mit den beiden Elektroden haben. Durch Anlegen einer Spannungsquelle werden die geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran transferiert.

Sechs Filterpapiere (9,3 x 5,9 cm) wurden kurz in Blottingpuffer gebadet und auf die untere Elektrode aufgelegt. Die PVDF-Membran wurde zunächst mit Methanol angefeuchtet, ebenfalls kurz in Blottingpuffer getränkt und auf die Filterpapiere gelegt. Das Gel wurde zunächst kurz in Blottingpuffer inkubiert und danach auf der Membran positioniert. Schließlich wurden sechs kleine Filterpapiere (8,3 x 5,6cm) in Blottingpuffer getränkt und auf das Gel aufgelegt, so dass sie weder die Membran noch die unteren Filterpapiere berührten. Zuletzt wurde die obere Elektrode aufgelegt und durch Anschließen an eine Spannungsquelle 60 min bei einer konstanten Stromstärke von 36,6 mA pro Gel geblottet (s. II. 3.3.4).

6.5.2 Antikörpermarkierung und Entwicklung der Westernblots

Für die spezifische Detektion der Elicitine mittels Antikörper wurden die Proteine aus dem Kulturfiltrat von *P. citricola* auf eine PVDF-Membran transferiert und zunächst mit einem primären Antikörper aus Kaninchen gegen α -Cryptogein markiert, der wiederum mittels eines sekundären Antikörpers aus Ziege abgegriffen wird. An den sekundären Antikörper ist eine alkalische Phosphatase gekoppelt, welche unter Zugabe von BCIP (s. II. 3.4.3) eine enzymkatalysierte Reduktion von NBT bewirkt. Dies wird als blaues Präzipitat sichtbar. Antikörpermarkierung und Entwicklung der Blots sind in folgender Übersicht dargestellt:

1. Waschen	TBS	5 min
2. Proteinsättigung	TBS-BSA	1 h
3. Antikörpermarkierung	α -Cryptogein-Antikörper	1h
Dazu Parafilm auf eine Glasplatte spannen, Blot auflegen und am 3D-Schüttler unter langsamem Schwenken α -Cryptogein-Antikörperlösung mit der Pipette vorsichtig auftropfen, bis der Blot ganz benetzt wird. Nach Inkubationszeit Lösung entnehmen und zum nochmaligen Gebrauch einfrieren.		
4. Waschen	TBS-T	3 x 5 min
5. Antikörpermarkierung	Sekundärer Antikörper	1 h
Gleiches Verfahren wie bei Schritt 3		
6. Waschen	TBS-T	3 x 5 min
	TBS	5 min
7. Entwickeln	Entwicklerlösung	30 bis 120 s
8. Waschen	TBS	5 min
	H ₂ O _{bidest.}	5 min
Blots bei Raumtemperatur trocknen lassen und bei 4° C im Kühlschrank bis zu Auswertung aufbewahren.		

6.6 Auswertung von Polyacrylamidgele

Die Molekulargewichte bzw. isoelektrischen Punkte der unbekannt, angefärbten Proteinbanden, wurden anhand von Proteinmarkern mit Hilfe ihrer relativen Mobilität bestimmt. Die relative Mobilität (R_f) der Standardproteine wurde mit folgender Formel errechnet:

$$R_f = \frac{M1}{M2}$$

$M1$ = Lauffront der Proteinbande

$M2$ = Lauffront von Bromphenolblau

Bei optimaler Trennung der Standards auf dem Gel ergeben die R_f -Werte, aufgetragen gegen den Logarithmus der Molekulargewichte, eine lineare Funktion. Da das jeweilige Bandenmuster auch von Laufbedingungen, der Probe und der Gelzusammensetzung abhängt, sind die kalkulierten Werte mit Schwankungen behaftet.

6.7 Enzymaktivität verschiedener Hydrolasen

Zur weiteren Charakterisierung der Proteine, die von *P. citricola* ins Kulturfiltrat abgegeben werden, als auch nach der FPLC-Aufreinigung in dem fraktionierten Kulturfiltrat zu finden sind, wurden die jeweiligen Proben auf ihre hydrolytische Enzymaktivität getestet. Zuvor wurden die Proben bei 4° C 24 Stunden gegen $H_2O_{dest.}$ dialysiert, lyophilisiert und in Citratpuffer 0,5 M pH 6,0 aufgenommen. Alle Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Karin Pritsch - Institut für Bodenökologie - Helmholtz Zentrum München, durchgeführt. Als Referenz wurden 4-methylumbelliferone (MU) markierte Fluoreszenzsubstrate in einer Konzentrationsreihe von 0 bis 500 pmol MU verwendet. Die Aktivitäten für Cellobiohydrolase (40 min), Chitinase (20 min), Glucuronidase (60 min), α -Glucosidase (60 min), β -Glucosidase (20 min) und Xylanase, (60 min) mit entsprechender Inkubationszeit, wurden in einen Mikrotiterplattenansatz nach Pritsch *et al.* (2004) und Courty *et al.* (2005) in einer Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer mit einem Mikrotiterplatten-Leser (Varian, Australia) bei 360 nm Anregung (Excitation) und bei 450 nm Emission erfasst.

$$MU \text{ (pmol min}^{-1}\text{)} = \frac{\left(\frac{P \text{ (pmol)} - S \text{ (pmol)}}{\text{Zeit (min)}} \right)}{\text{Geradesteigung}}$$

P = Freigezetztes MU pmol^{-1} in Proben des *P. citricola* Kulturfiltrates

S = Freigezetztes MU pmol^{-1} des Substrats

7 ERFASSUNG VON ÖKOPHYSIOLOGISCHEN PARAMETERN

7.1 Wasseraufnahme und Wasserpotential

Die Wasseraufnahme wurde sowohl bei den Biotests mit verschiedenen Fraktionen des *P. citricola*-Kulturfiltrats, als auch bei den Infektionsversuchen durch Wiegen der Versuchsgefäße ermittelt. Aus den Differenzen der einzelnen Werte wurde die tägliche, sowie die gesamte Wasseraufnahme der Blätter bzw. der Sämlinge bestimmt.

Die Messung des Wasserpotentials wurde an Buchensämlingen nach dem Druckkammerverfahren nach Scholander *et al.* (1965) ermittelt. Dazu wurden die Buchensämlinge mit Hilfe eines Skalpell oberhalb des Hypokotyls abgetrennt. Die Messung des Wasserpotentials erfolgte jeweils um die Mitte der Photoperiode.

7.2 Gaswechsel- und Chlorophyll-Fluoreszenz

Die Gaswechselfmessungen wurden sowohl bei Behandlungsansätzen mit verschiedenen Fraktionen des *P. citricola*-Kulturfiltrats, sowie bei Infektionsversuchen an Buchensämlingen unter Verwendung eines CQP 130i CO₂/H₂O-Porometers (Walz, Deutschland) und eines BINOS 100 Gasanalysegerätes (Leybold-Heraeus, Deutschland) bei gegebener PAR von 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sowie mit dem LI-6400 Gerät (LI-COR, USA) bei gegebener PAR von 150 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, bestimmt. Die Lufttemperatur wurde automatisch auf 20° C eingestellt. Die relative Luftfeuchtigkeit in der Blatt-Messkammer wurde auf 35-45 % manuell eingeregelt. Bei Tabakblättern wurde die Messung bei gegebener PAR von 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ mit dem 130i CO₂/H₂O-Porometer und BINOS 100 Gasanalysegerät erfasst.

Die Chlorophyllfluoreszenzmessungen wurden an dunkel- und lichtadaptierten Blättern von Tabak und Buche durchgeführt. Die Messung der Chlorophyll-Fluoreszenz erfolgte mit dem Mini-PAM Chlorophyll Fluorometer (WALZ, Deutschland) nach Schreiber (1997) und Maxwell und Johnson (2000).

8 MAKROSKOPISCHE UND MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN

8.1 Visuelle Beobachtungen

Die Entwicklung der Schadsymptome an Blätter (Chlorosen, Nekrosen, Welke) und an Wurzeln der Versuchsansätze wurde über mehrere Tage mittels einer Digitalkamera aufgenommen.

8.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die histologische Untersuchung der infizierten Buchensämlinge wurden Proben aus unterschiedlichen Bereichen der Pflanze entnommen. Dazu wurden Sämlinge, die bereits leichte Symptome am Blattrand aufwiesen, ausgewählt. Mit Hilfe eines Skalpells wurden 0,5 cm Probe aus den verschiedenen Gewebe-Abschnitten der Pflanze gewonnen.

Die Dauerpräparate für die Transmissionselektronenmikroskopie, sowie die Aufnahmen wurden nach Brummer *et al.* (2002) in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Fromm, Institut für Holzforschung - Technische Universität München (TUM) hergestellt. Die TEM-Bilder wurden unter Verwendung eines Elektronenmikroskops (EM 10 C, Zeiss, Deutschland) mit integrierter Kamera auf Spezialfotopapier (Scientia EM-Film, Agfa) aufgenommen.

9 NACHWEIS UND QUANTIFIZIERUNG VON DNA AUS *PHYTOPHTHORA CITRICOLA*

9.1 Probennahme

Die infizierten Buchensämlinge bzw. die Kontrollpflanzen wurden entnommen und leicht abgetupft, um überschüssiges Wasser zu entfernen. Mit Hilfe eines Skalpells wurden Epikotyl, Hypokotyl, Blätter und Wurzeln, getrennt und in 2 mL Reaktionsgefäße eingewogen, umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 ° C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

9.2 DNA-Extraktion

Für die DNA-Extraktion wurden die Wurzelproben infizierter und nicht-infizierter Buchensämlinge unter flüssigem Stickstoff mit einer Kugelmühle MM2 (Retsch, Deutschland) homogenisiert und anschließend lyophilisiert. Nach Einwaage von 20 mg Pflanzenmaterial wurde für die Extraktion der DNA das DNeasy Plant Kit (Qiagen, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der Proben mit Hilfe des Wizard DNA Clean Up Systems (Promega, Deutschland).

Die Proben (je 100 µl DNA-Extrakt) wurden tiefgefroren und später für die PCR verwendet (s. II. 9.4).

9.3 UV-Quantifizierung isolierter DNA und RNA

Die Konzentration und Reinheit von DNA bzw. RNA wurde bei 260 nm und 280 nm photometrisch bestimmt. Eine Extinktion von 1 bei einer Wellenlänge von 260 nm (E_{260}) entspricht etwa $50 \mu\text{g DNA mL}^{-1}$ bzw. $40 \mu\text{g RNA mL}^{-1}$. Nach Einrechnen der Verdünnungsfaktoren erhält man die DNA- bzw. RNA-Konzentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$. Die Reinheit der isolierten DNA bzw. RNA kann durch Bildung des Quotienten aus E_{260} zu E_{280} erfolgen, da bei 280 nm etwaige Verunreinigungen durch Proteine oder Phenole aufgrund der Absorption von Aromaten detektiert werden können. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Nachweis von *P. citricola*-DNA im Gewebe der infizierten Buchensämlinge sowie aus reinem *Phytophthora*-Myzel wurde mit spezifischen Primern nach Schubert *et al.* (1999) durchgeführt. Diese Primer markieren einen DNA-Abschnitt von 711 Basenpaaren. In der folgenden Übersicht ist der PCR-Ansatz für 25 μL Probenvolumen dargestellt:

	[μL]
PCR-Puffer (10-fach, 15 mM MgCl_2)	2,5
dNTPs (je 5 mM)	0,5
Primer CITR 1 (5'-TCTTGCTTTTTTTGCGAGCC-3') (10 μM)	0,5
Primer CITR 2 (5'-CGCACCGAGGTGCACACAAA-3') (10 μM)	0,5
Taq-Polymerase (5 U mL^{-1})	0,25
Autoklaviertes $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$	19,25
Probe	1,0

Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Biometra, Deutschland) durchgeführt. Für die *P. citricola*-spezifischen Primer CITR 1 und CITR 2 wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer	Zweck
1	95	15 min	Denaturierung der DNA und Aktivierung der Hot Star Taq-Polymerase
2	62	30 s	Hybridisierung
3	72	1 min	Verlängerung

4	94	30 s	Denaturierung der DNA
5	62	30 s	Hybridisierung
6	72	1 min	Verlängerung
7	72	5 min	Finale Verlängerung
8	4		Abkühlung

Schritte vier bis sechs werden 34 mal wiederholt (insgesamt 35 Zyklen)

9.5 Quantitative PCR (qPCR)

Die quantitative Bestimmung der *P. citricola*-DNA in den infizierten Buchensämlingen erfolgte nach Böhm *et al.* (1999). In der folgenden Übersicht ist der quantitative PCR-Ansatz für 25 µL Probenvolumen dargestellt:

	[µL]
Absolute QPCR Rox Mix (2-fach)	12,5
Primer P5 (5'-TCAACCCTTTTAGTTGGGGGTC-3') (10 µM)	0,75
Primer P6 (5'-TTTAAAACAAAAGCTACTAGCCCAGAC-3') (10 µM)	0,75
Sonde F3 (5'-CTTTTTTTGCGAGCCCTATCATGGCGAp-3') (10 µM)	0,5
Autoklaviertes H ₂ O _{bidest.}	5,5
Probe	5,0

Die Sonde F3 war an 3'-Ende mit Fluoreszenzfarbstoff FAM, am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzquencher TAMRA markiert. Die Reagenzien bis auf die Probe wurden gut gemischt. Jeweils 20 µL der Mischung wurden in eine Vertiefung einer 96-Well Platte eingegeben und die Probe dazugegeben (je drei Wiederholungen). Die Detektion der Fluoreszenz und Berechnung der Ausgangsmenge von *P. citricola*-DNA in den Proben wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur [° C]	Dauer	Zweck
1	95	15 min	Denaturierung der DNA und Aktivierung der Hot Star Taq-Polymerase
2	62	1 min	Hybridisierung
3	94	15 s	Denaturierung der DNA

Schritte zwei bis drei werden 35 mal wiederholt

Durch den Sequence Detector wird die Menge der Pathogen-DNA in ng DNA mL⁻¹ Probenextrakt angegeben. Als Berechnungsgrundlage hierfür wird der Beginn des

Fluoreszenzanstiegs in einer Probe (C_t -Wert) linear mit dem dekadischen Logarithmus der DNA-Menge einer Eichreihe korreliert. Die in den Buchen vorhandene *P. citricola*-DNA [$ng\ mg^{-1}\ TG$] wurde anschließend mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$P. citricola - DNA [ng\ mg^{-1}\ TG] = \frac{\text{Berechnete Konzentration DNA [ng mL}^{-1}\ \text{DNA - Extrakt]}}{10 \times \text{Einwaage [mg]}}$$

10 REVERSE TRANSKRIPTION UND BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION IN INFIZIERTEN BUCHENSÄMLINGEN

10.1 Probenahme

Die infizierten Buchensämlinge bzw. die Kontrollpflanzen wurden wie in II. 9.1 beschrieben entnommen und aufbewahrt.

Die Blatt- und Wurzelproben aus dem Infektionsversuch wurden unter flüssigem Stickstoff in einer Kugelmühle homogenisiert und je 100 mg bis 300 mg der tiefgefrorenen Probe wurde in ein 2 mL Reaktionsgefäß überführt.

10.2 RNA-Extraktion

Jede Probe wurde mit 1 mL Extraktionspuffer ($65^\circ\ C$) (siehe II-3.6) versetzt und gemischt. Die Proben wurden bei $65^\circ\ C$ im Wasserbad für 10min inkubiert. Anschließend wurden 100 μL Resin Phytopure (Biosciences, Deutschland) zu den Proben gegeben und mit einem Reaktionsgefäß-Schüttler für 10 Sekunden gemischt. 500 μL des Extraktionspuffers ($-20^\circ\ C$) wurden den Proben zugegeben und nochmals für 10 Sekunden gemischt. Die Proben wurden danach auf einem Schüttler für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei $4^\circ\ C$ und 15000 g, für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 μL Reaktionsgefäß überführt. Daraufhin wurde die Extraktion wie oben beschrieben ein zweites Mal wiederholt. Die Überstände der ersten und zweiten Extraktion wurden vereinigt und mit 500 μL Isopropanol ($4^\circ\ C$) vermischt. Die Proben wurden für 60 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben wieder bei $4^\circ\ C$ und 15000 g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen.

Das entstandene Pellet wurde in 26,5 μL DEPC- H_2O angelöst. Zu jeder Probe wurde 3,5 μL DNase I (Thermo Scientific) gegeben, und für 15 min bei $37^\circ\ C$ im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit 100 μL Isopropanol gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei $4^\circ\ C$ und 15000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Das so entstandene Pellet wurde mit 1 mL Ethanol (70 %) und anschließend erneut mit 500 μL Ethanol (70 %) zweifach gewaschen. Nach jedem Waschschrift wurden

die Proben bei 4° C und 15000 g, für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde gefriergetrocknet und in 50 µL DEPC-H₂O angelöst. Die Extrakte wurden zur weiteren Verwendungen bei -80° C aufbewahrt.

10.3 cDNA-Synthese

Zur Analyse der Genexpression wurden unter der Verwendung von Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit (ABgene, Deutschland) die komplementäre DNA (cDNA) der zuvor extrahierten RNA aus Blättern und Wurzeln synthetisiert. Dazu wurden 2 µL des RNA-Extraktes mit 1 µL oligo dT-Primern (500 ng µL⁻¹) versetzt und mit DEPC-H₂O auf 12 µL aufgefüllt. Die Ansätze wurden dann für 5 min bei 70° C in einem Thermo-Cycler inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 4 µL ‚5x first strand synthesis Puffer‘ (2 µL 5 mM dNTP's, 1 µL Reverse-iT™ RTase Blend und 1 µL 100 mM DTT), wurden die Ansätze für 50 min bei 47° C inkubiert. Anschließend fand die Inaktivierung der reversen Transkriptase durch eine 10minütige Inkubation bei 75° C im Thermo-Cycler statt.

10.4 Bestimmung der Genexpression

Die *Real-time* qPCR wurde für folgende Gene unter Verwendung spezifischer Primer durchgeführt.

Gen	Primer-Sequenz
ACO	Fw 5'-CTG GTG GGA TCA TCT TAC TC-3' Rv 5'-CAA TAG AAT GGC GCA TAG GG-3'
ACS1	Fw 5'-GGT CTT CAC TGA AGGTCT TG-3' Rv 5'-CTG CTC TTT GAG TAG GTG AC-3'
ACS2	Fw 5'-TCC AAA CCG CAT AGT CATGG-3' Rv 5'-TGG TGAGGG CACAAG AAA AG-3'
Aquaporin	Fw 5'-CGG TGC TGT GAA AGC TCT TG-3' Rv 5'-TTC CCA GCA AAA ACC ATG AAG-3'
COMT	Fw 5'-AAC AAT GGC ATG GCT GGT CT-3' Rv 5'-CCA CCA CCA ACA TCA ATC AAT G-3'
RbcL	Fw 5'-AGC CAG TTG CTG GAG AAG AA-3' Rv 5'-ATG GTT GGG AAT TCA CGT TC-3'
RbcS	Fw 5'-ATG ATG GAC GTT ACTGGG TG-3' Rv 5'-GGA TAA GTC TTA CTG GCC TC-3'
Osmotin	Fw 5'-CCM AAC ACC YTA GAY GAR T-3' Rv 5'-GGR CAR AAS AYA ACC YTR TA-3'

18s RNA	Fw 5'-GAA CAA CTG CGA AAG CAT TTG C-3' Rv 5'-CCT GGT AAG TTT CCC CGT GTT G-3'
---------	--

Als nicht reguliertes Referenz-Gen wurde 18S ribosomale RNA verwendet. Die quantitative RT-PCR wurde mit einem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Deutschland) durchgeführt. In der folgenden Übersicht ist der RT-qPCR-Ansatz für 25 µL Probenvolumen dargestellt:

	[µL]
Absolute SYBR Green ROX Mix (2-fach)	12,5
Gen spezifischer Primer Fw (10 µM)	1,0
Gen spezifischer Primer Rv (10 µM)	1,0
Autoklaviertes H ₂ O _{bidest.}	5,5
Probe	5,0

Für die Genexpressions-Studien wurde folgendes Programm verwendet:

Schritt	Temperatur [° C]	Dauer	Zweck
1	95	15 min	Denaturierungsphase und Aktivierung der Hot Star Taq-Polymerase
2	95	30 s	Denaturierung der DNA
3	60	30 s	Hybridisierung
4	72	1 min	Verlängerung
5	72	5 min	Finale Verlängerung

Schritte zwei bis vier werden 35 mal wiederholt

Durch Auswertung der Fluoreszenzsignale des Detektor-Farbstoffs SYBR-Green im Verlauf der PCR-Reaktion mit der '7700 System Software' (ABgene) wurde für jede untersuchte Probe ein Ct-Wert ermittelt.

Jede cDNA-Probe wurde in 3-facher Wiederholung gemessen, der daraus resultierende Ct-Mittelwert ging in die nachfolgenden Berechnungen ein.

Die relative Genexpression wurde mit Hilfe des Relative Expression Software Tool (REST, Version 1.9.12-2005) nach Pfaffl *et al.* (2002) ausgewertet.

$$\text{relative Expression} = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{d\text{Ct Zielgen}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{d\text{Ct Referenzgen}(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}$$

E = Effizienz der PCR-Reaktion

Die Genexpression untersuchter Gene aus infizierten Buchensämlingen wurde relativ zu nicht-infizierten Kontrollpflanzen berechnet, um die *P. citricola*-bedingten Einflüsse im Vergleich zur Kontrolle darzustellen.

11 AGAROSEGELELEKTROPHORESE

Um nach einer PCR die Nukleinsäure-Fragmente auftrennen zu können, wurden die Proben auf ein Agarosegel, das mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid versetzt worden war, aufgetragen.

Das Agarosegel wurde nach Anleitung hergestellt und in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoreseapparatur (Bio-Rad, Deutschland) überführt (s. II. 3.3.5).

Anschließend wurden jeweils 10 μL der Proben mit 5 μL Bromphenolblau vermischt und in je eine Tasche des Gels eingegeben. Zudem wurde ein Standard mit DNA-Strängen bekannter Länge aufgetragen. Um ein elektrisches Feld zu erzeugen, wurde die Apparatur für 90 min einer Spannung von 80 V ausgesetzt.

Ethidiumbromid-Moleküle lagern sich in die Doppelstränge der DNA ein, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und die Fluoreszenz bei Anregung durch UV-Strahlung stark erhöht wird. Die Lichtintensität ist dabei proportional zu der vorhandenen DNA-Menge. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich der Probenbanden mit denen des Standards.

12 BIO-ASSAYS

12.1 Aktivitätstests

Zur Überprüfung und näheren Untersuchung der biologischen Aktivität der extrazellulären Proteine von *P. citricola* wurden verschiedene Biotests durchgeführt.

Die Biotests fanden in einer Klimakammer (York, Deutschland) statt. Es herrschte eine Kammerbeleuchtung von $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-2}$ PAR. Die Temperatur war auf 25°C eingestellt und die relative Luftfeuchte betrug 65 %. Der Tag-Nacht-Rhythmus wurde den Pflanzen mit einer Photoperiode von 14 Stunden angepasst.

A) Infiltration von Elicitin

Zur Untersuchung der Elicitoraktivität wurde das gereinigte Citricolin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in den apoplastischen Bereich von Tabakblättern infiltriert. Dazu wurde ein interkostaler Bereich eines Blattes ausgewählt, in den mit einer Nadel ein kleines Loch gestochen wurde. Von oben wurde diese Stelle mit einer 1 mL-Spritze ohne Nadel abgedeckt und gleichzeitig mit einem Finger die Unterseite der durchstochenen Stelle bedeckt.

Mit leichtem Druck auf die Spritze wurde der Inhalt in den angrenzenden Intrazellularraum infiltriert. Der infiltrierte Bereich konnte durch vorübergehend wässrig durchscheinendes Aussehen des Blattes genau bestimmt werden. Durch mehrfaches Einstechen konnten so große Bereiche des Blattes infiltriert werden. Anschließend erfolgte eine Bonitur der makroskopischen Symptome an Tabakblättern.

B) Detektion von H_2O_2

Mit Hilfe von Diaminobenzidin (DAB) kann Wasserstoffperoxid histologisch nachgewiesen werden. Bei Entstehung von H_2O_2 bildet sich in Verbindung mit DAB ein braunes Präzipitat im Gewebe, welches wiederum lichtmikroskopisch, nachdem die Blattpigmente mit Ethanol entfärbt wurden, detektiert werden kann.

Dazu wurde Citricolin ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) in die Interkostalfelder von Tabakblättern der Sorte Bel W3 infiltriert und stündlich Blattproben entnommen. Die frisch geerntete Probe wurde in eine Petrischale gelegt und mit einer 0,1 % DAB-Lösung (s. II. 3.5) vollständig bedeckt. Die Petrischale wurde luftdurchlässig verschlossen und in einen Vakuumexsikkator gestellt. Durch Anschließen einer Vakuumpumpe wurde ein Unterdruck erzeugt und für ca. 20 min aufrechterhalten. Dieser Schritt diente der vollständigen Entfernung von Luft aus dem Blattgewebe. Um das Eindringen der DAB-Lösung in die Pflanzenzelle zu ermöglichen, wurde der Unterdruck abrupt aufgehoben.

Erfolgreich infiltrierte Blatt-Proben wurden in erwärmtem Ethanol (100 % v/v) entfärbt. Schließlich wurden die Proben unter dem Lichtmikroskop auf eine Braunfärbung durch das entstandene Präzipitat untersucht.

C) Aufsaugen der Elicitinlösung und von *P. citricola* - Kulturfiltratfraktionen

Um mögliche physiologische Effekte von Citricolin auf Buchensämlinge und Tabakblätter zu untersuchen, wurden Buchensämlinge im Zweiblattstadium oberhalb ihrer Keimblätter abgeschnitten und mit dem Epikotyl in die zu testende Lösung getaucht. Analog wurden ganze Tabakblätter an ihrem Stängelgrund von der Pflanze abgetrennt und in Versuchslösung überführt. Die entsprechende Behandlungs- und Kontrolllösung bei Buchen und Tabakblättern wurde dann über den Transpirationsstrom aufgenommen. Anschließend wurden Gaswechsel- und Chlorophyll-Fluoreszenzmessungen der behandelten Blätter wie in II. 7.2 dargestellt, durchgeführt.

Analog zu den Citricolin-Biotests, wurde die Beteiligung von anderen möglichen Proteinen aus *P. citricola*-Kulturfiltrat an der auftretenden Symptomausprägung an

Buchenblättern untersucht. Neben den Tests auf biologische Aktivität der partiell gereinigten Proteine an im Labor angezogenen Buchensämlingen wurde die Toxizität dieser auch an Blättern adulter Bäume aus dem Freiland getestet.

12.2 Infektionsversuche

Für die Infektionsversuche wurden 3 bis 4 Monate alte Buchensämlinge verwendet. Die Pflanzen wurden nach sorgfältiger Säuberung der Wurzeln von Resten des Vermiculit in mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ befüllte Gefäße überführt. Für die Infektionsversuche wurde ein künstliches Inokulationssystem entwickelt, wie in Abbildung 3 dargestellt ist.

Die Inokulation der Pflanzen mit *P. citricola* erfolgte durch eine Zoosporensuspension oder durch jeweils drei Agarplugs (5 x 5 mm Kantenlänge), bei denen zuvor die Sporangien- bzw. Zoosporenbildung induziert worden war (s. II. 4.3). Die Kontrollpflanzen wurden mit sterilen, pathogenfreien Agarplugs versetzt.

Alle Versuchsansätze wurden unter zusätzlicher Beleuchtung ($70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), bei 20°C und etwa 45 % relativer Luftfeuchte durchgeführt.

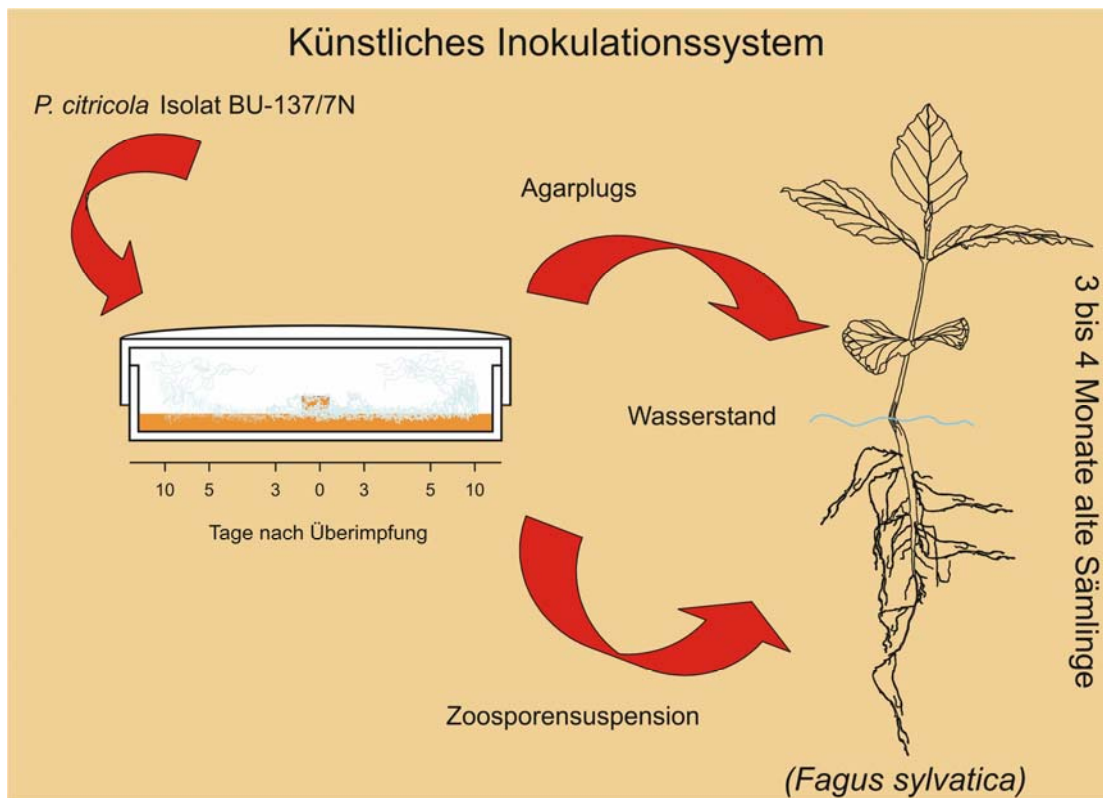


Abbildung 3: Darstellung des künstlichen Inokulationssystems von Buchensämlingen mit *P. citricola*.

Die analysierten Parameter sowie die Anzahl der Behandlungswiederholungen bei den durchgeführten Versuchen ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht der Infektionsversuche. (n.b. = nicht bestimmt)

Versuch	Behandlung (n)	Wasseraufnahme	Gaswechsel	Chlorophyll-Fluoreszenz	Wasserpotential	Kohlenhydrat Analyse	qPCR
Infektionsverlauf	Nicht inokuliert (40)	1 x täglich	1 x täglich,	1 x täglich,	1 x täglich,	n.b.	n.b.
	Inokuliert (40)		ein Blatt pro Sämling	zwei Blätter pro Sämling	je 5 Sämlinge		
	0 % Inokuliert (6)		1 x täglich,	1 x täglich,	3 bzw. 4 Sämlinge,		
Split-root-System	50 % Inokuliert (8)	1 x täglich	zwei Blätter pro Sämling	zwei Blätter pro Sämling	11 und 13 Tage	Wurzel	ja
	100 % Inokuliert (8)				nach Inokulation		
Wasserstand	Nicht inokuliert (5)	Tagesgang	1 x täglich	1 x täglich	Erntezeitpunkt	Hypokotyl	ja
	Inokuliert (10)		ein Blatt pro Sämling	zwei Blätter pro Sämling		Wurzelsegmente	
Inokulumdichte	Nicht inokuliert (5)	Tagesgang	n.b.	n.b.	n.b.	Blätter	ja
	Inokuliert (5)					Wurzel	
Ethylen	Geschlossen						
	Nicht inokuliert (10)	1 x täglich	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
	Inokuliert (10)						
Ethylen	Beitüftet						
	Nicht inokuliert (10)	1 x täglich	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	ja
Relative Genexpression	Inokuliert (10)						
	Nicht inokuliert (40)	Tagesgang	1 x täglich,	1 x täglich,	n.b.	n.b.	ja
Relative Genexpression	Inokuliert (40)		ein Blatt pro Sämling	zwei Blätter pro Sämling	n.b.	n.b.	ja

12.2.1 Split-root-System

Um zu klären, wie viel Wurzelbiomasse mit *P. citricola* infiziert sein muss, damit eine nachhaltige Schädigung bzw. Absterben der Buchenpflanze beobachtet werden kann, wurde ein „Split-root-System“ etabliert, bei dem das Wurzelsystem so modifiziert wurde, dass anstelle einer Hauptwurzel mehrere gleichberechtigte Wurzeln gebildet wurden (s. Abb. 2). Dies ermöglichte die getrennte Untersuchung einzelner Wurzeln eines Wurzelsystems mit 0 %, 50 % und 100 % Infektion. Abbildung 4 zeigt das Wurzelsystem eines Buchensämlings durch Trennwände unterteilt. Der Wasserstand wurde 2,5 cm unterhalb des Wurzelhalses bei allen Sämlingen eingestellt. Bei der 100 % Inokulation wurden die Kammern A und B mit jeweils drei *P. citricola*-Agarplugs versetzt (s. II. 10.2). Bei einer 50 %igen Infektion des Wurzelsystems wurde nur der Kammer B Inokulum zugesetzt. Die Kontrollpflanzen wurden mit sterilen, pathogenfreien Agarplugs versetzt. Die Ernte erfolgte 11 und 13 Tagen nach Inokulation. Dabei wurden zuerst Sämlinge geerntet, die zuvor einen deutlichen Rückgang der Wasseraufnahme um mindestens 60 % im Vergleich zu Kontrollen zeigten (s. II. 12.2, Tab. 1).

Die Probenahme wurde wie in II. 9.1 beschrieben, durchgeführt und die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C aufbewahrt.

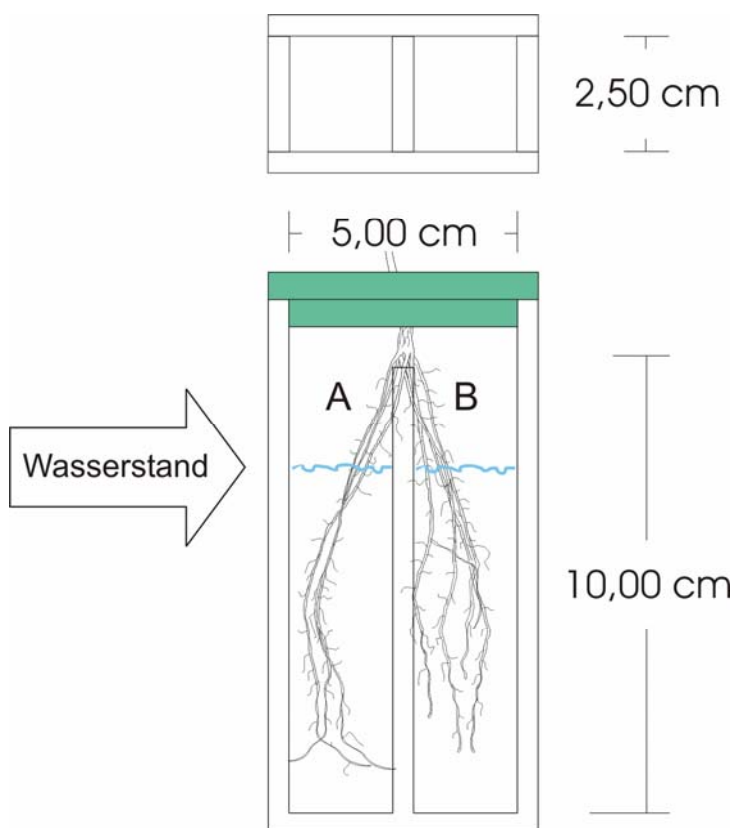


Abbildung 4: Inokulation einer Buchenpflanze im Split-root-System mit unterteilten Kammern.

12.2.2 Einfluss des Wasserstandes auf das Ausmaß der Infektion

Um den Einfluss des Wasserstandes auf das Ausmaß der Infektion untersuchen zu können, wurde ein Infektionsversuch mit zwei unterschiedlichen Wasserständen als Behandlung durchgeführt. Für eine Behandlungsvariante wurde der Wasserstand direkt unterhalb des Hypokotyls eingestellt und für die andere Variante 2,5 cm darunter. Die Inokulation wurde mit jeweils drei Agarplugs (5 x 5 mm) pro Sämling durchgeführt. Nach Rückgang der Wasseraufnahme um 60 % wurden die Buchensämlinge geerntet, in vier Segmente unterteilt (s. Abb. 5) und ihr Gehalt an *Phytophthora*-DNA mittels qPCR bestimmt (s. II. 9.3.1).

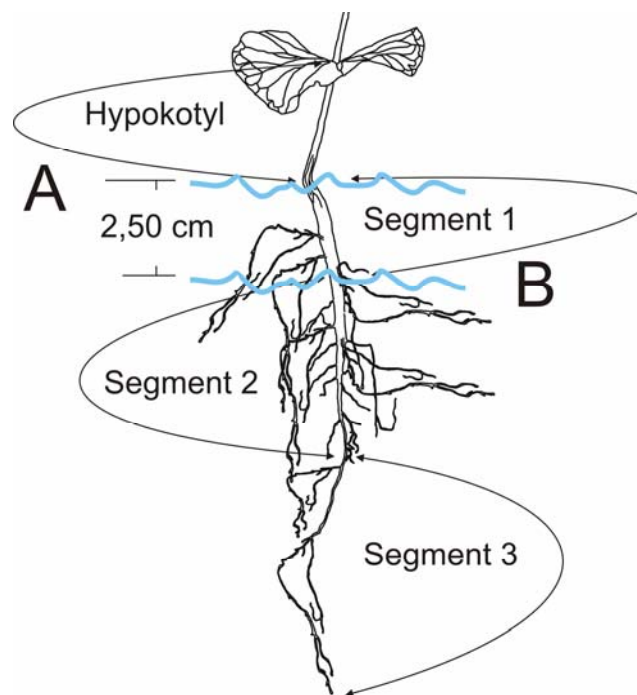


Abbildung 5: Wasserstand am Wurzelhals (A) und 2,5 cm unterhalb (B). Hypokotyl und Wurzelsegmente 1-3 wurden mit qPCR analysiert.

12.2.3 Einfluss der Inokulumdichte auf die Infektion

Um den Einfluss der Inokulumdichte auf die Infektion zu untersuchen, wurde eine Zoosporen-Konzentrationsreihe von *P. citricola* hergestellt. Die Zoosporengewinnung wurde wie in II. 4.3 beschrieben, durchgeführt. Die Bestimmung der Zoosporenzahl wurde mit Hilfe einer Thomakammer ermittelt (s. II. 4.3.1). Für die Verdünnungsreihe diente als Ausgangspunkt eine Suspension von $12,5 \times 10^5$ Zoosporen mL^{-1} . Als Behandlungsvarianten wurden Konzentrationen von 10^2 , 10^4 und 10^5 Zoosporen mL^{-1} hergestellt. Für alle Behandlungsvarianten wurde der Wasserstand direkt unterhalb des Hypokotyls eingestellt. Die Ernte erfolgte 9 Tage nach Inokulation. Die

Probenahme wurde wie in II. 9.1 beschrieben durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

12.2.4 Ethylenmessungen

Um das Maximum der Ethylenbiosynthese der infizierten bzw. Kontrollpflanzen darzustellen, wurden zwei Systeme etabliert. Die Induktion der Ethylenbiosynthese in infizierten und nicht-infizierten Buchensämlingen wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen detektiert. In beiden Fällen wurden die Buchensämlinge zunächst in Falcongefäße mit je 50 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ überführt und mit je drei Agarplugs einer *P. citricola*-Kultur inokuliert, bei der zuvor die Sporangien- und Zoosporenbildung induziert wurde (s. II. 4.3). Danach wurden die Ansätze in Glasröhren mit einem Gesamtvolumen von 250 mL positioniert. Die Glasröhren wurden mit Gummistopfen gasdicht verschlossen (s. Abb. 6). In Versuchsansatz 1 wurden die Glasröhren während der gesamten Versuchsdauer nicht geöffnet (= geschlossenes System), in dem zweiten Versuchsansatz dagegen wurden die Glasröhren täglich zum gleichen Zeitpunkt für ca. 30 min direkt nach der Entnahme der Gasprobe belüftet (= offenes System).



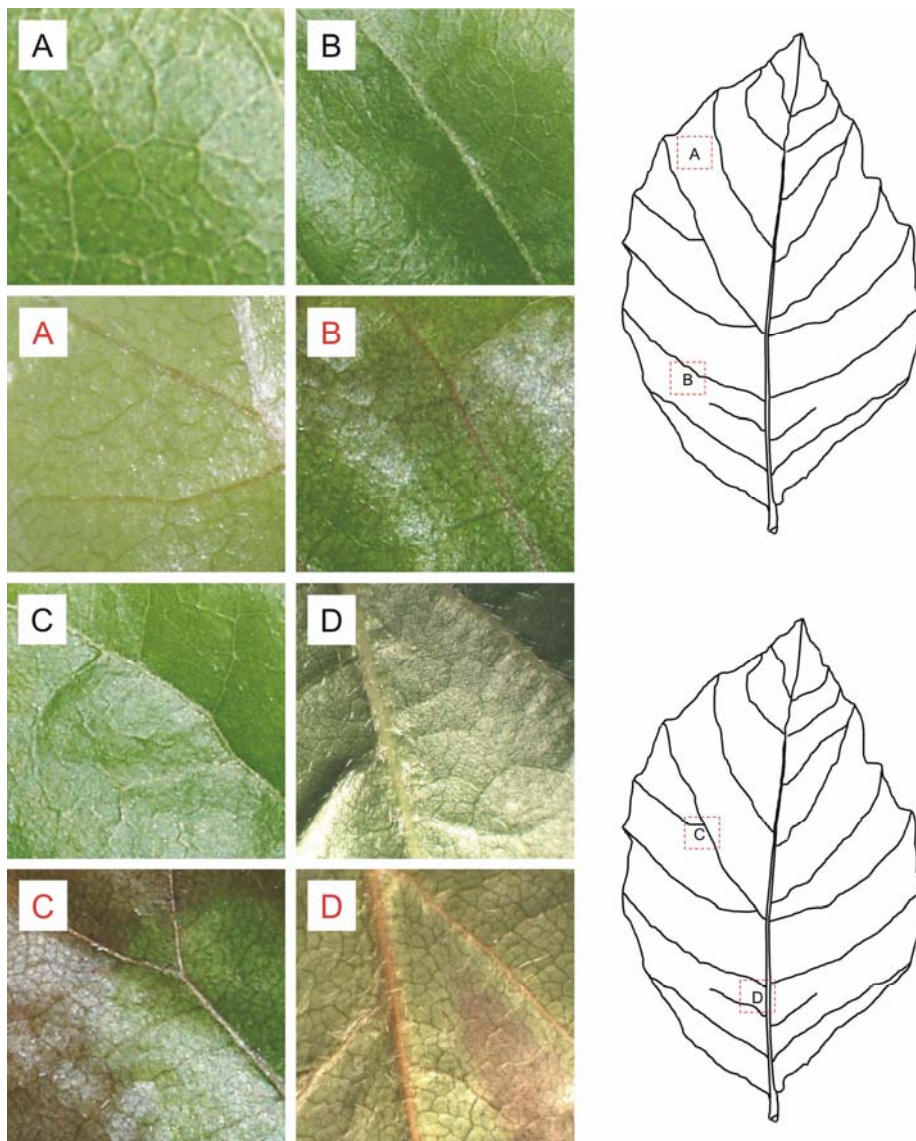
Abbildung 6: Glasröhren mit Kontrollpflanzen und inokulierten Buchensämlingen (A), Aufsicht auf Glasröhren mit Gummistopfen (B).

In regelmäßigen Abständen von jeweils 24 Stunden wurde mit 1 mL-Insulinspritzen der Luftraum in den Glasröhren durchmischt und daraus anschließend 1mL Gasgemisch entnommen. Die Proben wurden in einen Gaschromatographen Varian 3300 (Varian, USA) injiziert und analysiert. Das von den Pflanzen produzierte Ethylen wurde an Hand von Ethylen-Eichgas (Linde, Deutschland) quantifiziert (Eichfaktor 244 pmol mL^{-1}).

Für die Berechnung der von jeder Pflanze produzierten Ethylenmenge wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Ethylen} \left[\text{pmol mg}^{-1} \text{ FG} \right] = \frac{\text{Areas} \times \text{Volumen Luftraum} \left[\text{mL} \right] \times \text{Eichfaktor} \left[\text{pmol mL}^{-1} \right]}{\text{Areas Eichgas} \times \text{FG}}$$

Die Bonitur- und Symptomauswertung erfolgte bei den Ethylenversuchen mit Hilfe einer Symptomscala, wie in Abbildung 7 dargestellt.



*Abbildung 7:
Schematische
Darstellung der
Symptome an
Buchenblättern bei
Ethylenversuchen.
Symptome
inokulierter
Buchensämlinge
sind in mit roten
Buchstaben
gekennzeichneten
Bildern dargestellt;
(A) Verfärbung der
Blattadern, (B)
Nekrose der
Blattadern, (C)
starke Nekrose
am Blattrand und
(D) Welke mit
starker Nekrose
der Haupt-
Blattadern.
Schwarze
Buchstaben
zeigen die
entsprechenden
Bereiche an
Kontrollblättern
an.*

12.2.5 Infektionsversuch zur anschließenden Bestimmung der Genexpression

Für die Inokulation der Buchensämlinge diente eine Suspension von $14 \cdot 10^4$ Zoosporen mL^{-1} . Der Wasserstand wurde direkt unterhalb des Hypokotyls eingestellt. Es wurden nach 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden inokulierte sowie Kontrollpflanzen entnommen ($n=3$). Die RNA-Extraktion, cDNA-Synthese und Genexpressions-Analyse wurden wie in II. 10 beschrieben, durchgeführt. Bei diesem Versuch wurden zusätzlich nach 120 Stunden Blatt- und Wurzelprobe für die elektronenmikroskopische Untersuchung entnommen und entsprechend analysiert (s. II. 8.2).

13 STATISTISCHE DATENAUSWERTUNG

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit Hilfe des Statistikprogramms *SPSS 13.0* (Leibnitz-Rechenzentrum, Deutschland) durchgeführt. Alle Daten wurden auf ihre Normalverteilung (Shapiro-Wilk-Test) getestet.

Um die Mittelwerte zu vergleichen wurde ein *t-Test* bei unabhängigen Stichproben verwendet. Um die Varianz zwischen mehreren Gruppen zu vergleichen wurde die ANOVA (Analysis of Variance) verwendet. Da neben dem Gesamtergebnis aber auch von Interesse war, welche Gruppen sich signifikant voneinander unterscheiden (in der Regel nicht jede Gruppe von jeder anderen), wurde zusätzlich der Tukey-Test als post-hoc-Test durchgeführt. Die Korrelation der Daten wurden zweiseitig nach Person berechnet.

Die Signifikanzgrenzen wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p \leq 0,05$ * signifikant), 1 % ($p \leq 0,01$ ** hoch signifikant) und 0,1 % ($p \leq 0,001$ *** höchst signifikant) dargestellt.

III ERGEBNISSE

1 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS DEM KULTURFILTRAT VON *PHYTOPHTHORA CITRICOLA*

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten verschiedene extrazelluläre Proteine, die *P. citricola* in das Flüssigkulturmedium abgibt, isoliert und charakterisiert werden. Weiterhin sollte geklärt werden, ob diese Proteine mit dem Vorkommen von typischen Welkesymptomen an Buchenblätter nach einem Befall mit dem Pathogen beteiligt sind.

Der Auftrag von *P. citricola*-Kulturfiltrat auf eine FPLC-Säule diente zur Aufreinigung der Proteine, die in das flüssige M1-Medium abgegeben wurden (s. II. 6.1). Zwei Hauptfraktionen, A1 und A2, konnten durch diese Methode isoliert werden (s. Abb. 1.1). Die A1-Fraktion beinhaltet Proteine mit molekularen Massen zwischen 12 kDa und 162 kDa, die A2-Fraktion dagegen wies Proteine mit molekularen Massen zwischen 2,6 kDa und 11 kDa auf.

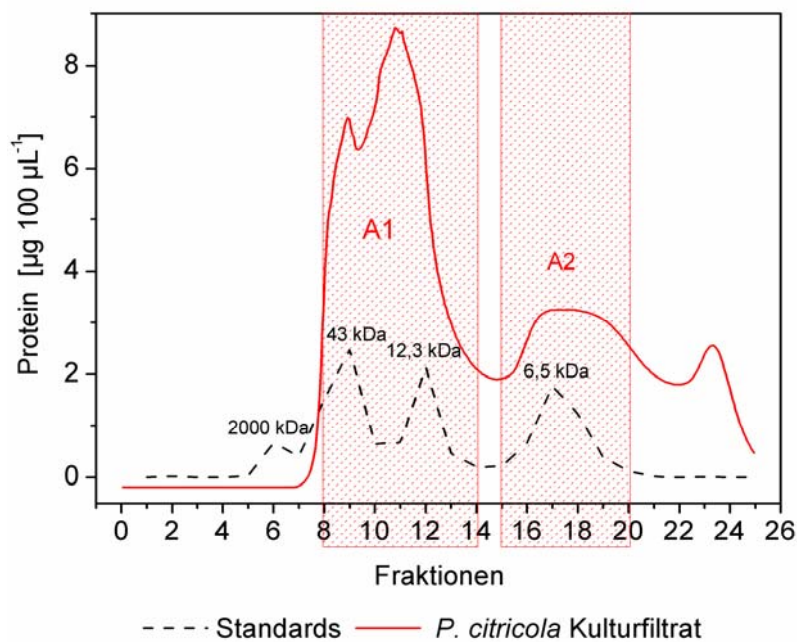


Abbildung 1.1: FPLC-Elutionsprofil der Standards (210 nm), Blue Dextran (2000 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Cytocrom C (12,3 kDa), Aprotinin (6,5 kDa) und *P. citricola* Kulturfiltrat (210 nm), A1-Fraktion (8 - 14), A2-Fraktion (15 - 20).

Um die Proteinzusammensetzung der einzelnen Fraktionen darzustellen, wurden diese auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Dabei konnte das Ergebnis der FPLC-Auftrennung aus Abbildung 1.1 bestätigt werden. Für die in der A1-Fraktion enthaltenen Proteine konnten hauptsächlich Proteinbanden mit molekularen Massen um 78 kDa, 45 kDa, 40 kDa und 18 kDa zugewiesen werden. A2 dagegen ausschließlich Proteine mit molekularer Masse um 8 kDa. (s. Abb. 1.2)

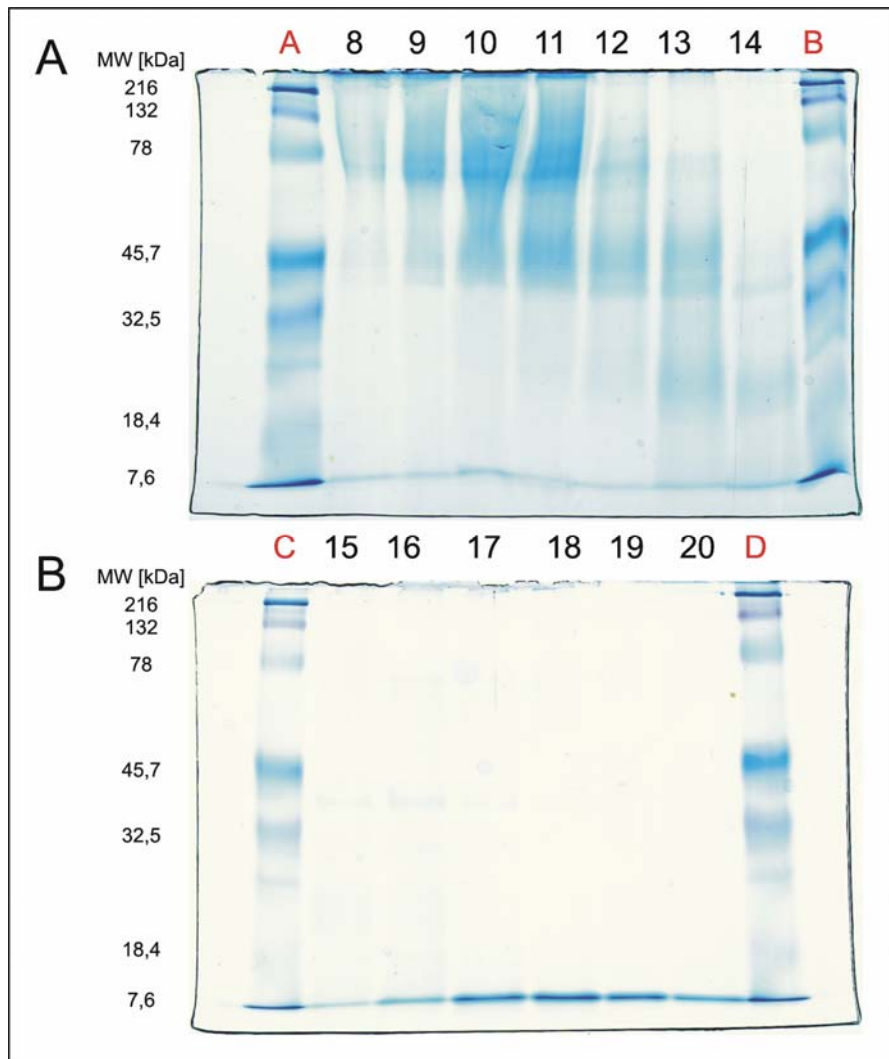


Abbildung 1.2: SDS-PAGE 12,5 % Tris-Glycin-Gel der A1-Fraktion (A) und A2-Fraktion (B) der Gelfiltration vom *P. citricola* Kulturfiltrat. Molekulargewicht-Standards (A, B, C und D); 25 µg Gesamtprotein pro Spur; Coomassie-Färbung.

1.1 Aufreinigung des *P. citricola*-Elicitin „Citricolin“ aus rohem Kulturfiltrat

1.1.1 Westernblot und SDS-PAGE der Proteine aus der A2-Fraktion vom *P. citricola*-Kulturfiltrat und Immunisierung mit Antikörpern gegen β-Cryptogein

P. citricola ist wie andere *Phytophthora*-Arten (Ricci *et al.*, 1989) auch in der Lage Elicitine ins flüssige Kulturmedium abzugeben, die als Citricolin beschrieben (Fleischmann *et al.*, 2005) wurden.

Koehl (2002) wies in einer Untersuchung mit Elicitinen aus dem Kulturfiltrat von *P. quercina* eine Wechselwirkung mit Antikörper gegen Elicitine von *P. cryptogea* und *P. megasperma* nach.

Aufgrund dieser Befunde wurden mit einem Westernblot die extrazellulär sezernierten Proteine von *P. citricola* durch Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein, einem basischen Elicitin von *P. cryptogea*, getestet.

Nach Auftragung der A2-Fractionen auf ein Tricin-Gel konnte eine deutliche Proteinbande mit einer molekularen Masse um 8 kDa detektiert werden, die für *Phytophthora* - Elicitine typisch ist (s. Abb. 1.3 A).

Abbildung 1.3 B zeigt, dass es zu einer Wechselwirkung des Antikörpers gegen β -Cryptogein mit Proteinen der A2-Fraktion kam. Die Proteinbande die nachgewiesen werden konnte, besitzt eine molekulare Masse um 8 kDa. Ebenfalls konnte in der gleichen Fraktion eine Proteinbande mit einer molekularen Masse um 25 kDa detektiert werden. Diese zusätzliche Reaktion könnte eine Trimerisierung des Elicitins sein, welche möglicherweise durch das Umpuffern nach der Gelfiltration stattfindet. Dadurch konnte festgestellt werden, dass Citricolin sowohl im nativen durch die Gelfiltration, als auch im denaturierten Zustand das gleiche Molekulargewicht besitzt.

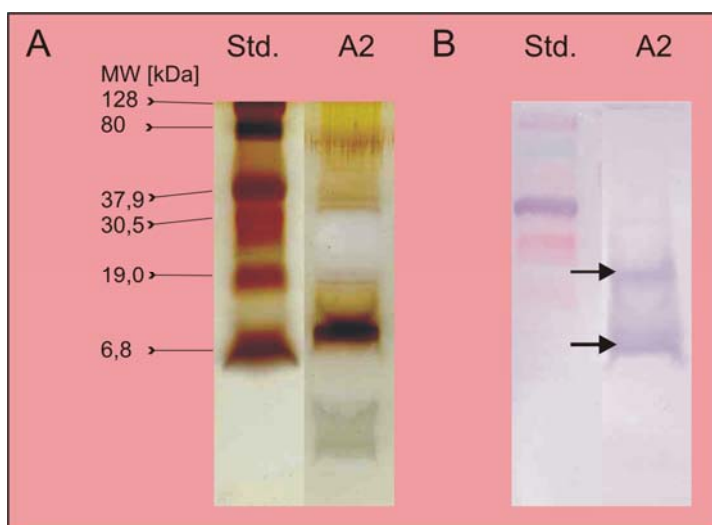


Abbildung 1.3: (A) Tris-Tricin-Gel (4 % Sammelgel und 16,5 % Trenngel) der im rohen und fraktionierten *P. citricola*-Kulturfiltrat enthaltenen Proteine (Silbernitrat-Färbung) und (B) Westernblot und Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein: (Std.) Molekulargewicht-Standards, A2-Fraktion (Fraktionen 15 bis 20); pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

1.2 Biologische Wirkung des gereinigten Citricolins

1.2.1 Aktivität des gereinigtes Citricolin von *P. citricola* an Tabakblättern

1.2.1.1 Hypersensitive Reaktion (HR)

Die Infiltration des Elicitins von *P. citricola* mit 1 μ g mL⁻¹ Protein in ein Tabakblatt (Sorte Bel W3) resultierte nach 24 Stunden in der Bildung von Nekrosen (s. Abb. 1.4 A). Als Kontrolle wurde H₂O_{bidest.} infiltriert, was weder eine chlorotische noch eine nekrotische Wirkung aufwies (s. Abb. 1.4 B).

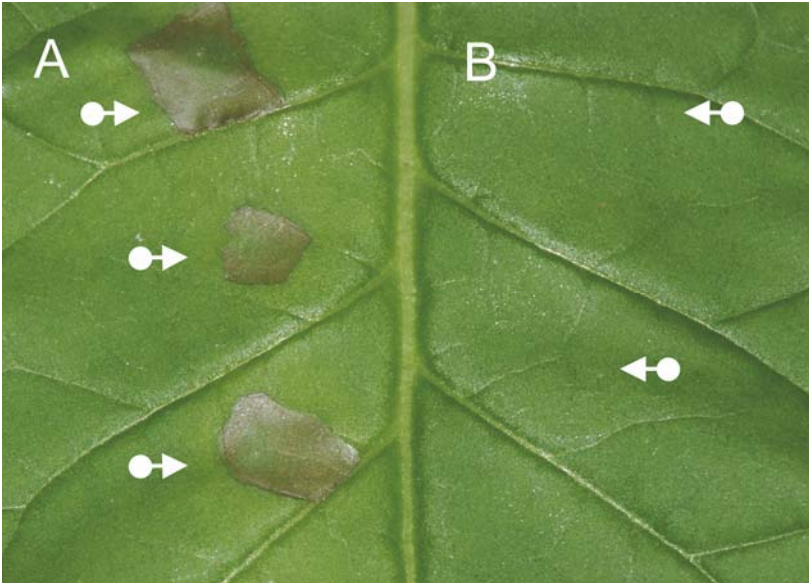


Abbildung 1.4:
 Tabakblatttest (Sorte Bel W3): Infiltration mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Citricolin; (A) Blattnekrosen als typische hypersensitive Reaktion auf Infiltration von Elicitinen, 24 Stunden nach Behandlung, (B) Kontrolle $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$; Pfeile zeigen den Infiltrationsbereich der Behandlung und entsprechende Kontrolle ohne Elicitin.

1.2.1.2 Zeitlicher und konzentrationsabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure und Katalase auf die hypersensitive Reaktion nach Elicitierung

Die Infiltration von Citricolin induziert, wie zuvor gezeigt, die Bildung von Nekrosen an Tabakblättern. Um die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit der Nekroseerscheinungen an mit Citricolin infiltrierten Tabakblättern zu untersuchen, wurden diese zusammen mit Ascorbinsäure und Katalase in ein Tabakblatt infiltriert. Es wurde festgestellt, dass mit zunehmender Konzentration von 0,2 M bis 1 M Ascorbinsäure die nekrotischen Effekte des Elicitins abnahmen. Bei der Behandlung mit Citricolin und 1M Ascorbinsäure zeigte sich eine hemmende Wirkung auf die Nekrosenbildung im Blattgewebe bis etwa 18 Stunden nach Behandlung (s. Abb. 1.5). Mit zunehmender Konzentration von 100 U bis 500 U an Katalase, kam es nur zu einer Verzögerung der Symptome. Dabei zeigte nur der mit Citricolin und 500 U Katalase infiltrierten Bereich keine Symptome bis etwa 10 Stunden nach Behandlung. Ab 48 Stunden nach Infiltration zeigten alle behandelten Bereiche deutlichen Nekrosen (s. Abb. 1.5).

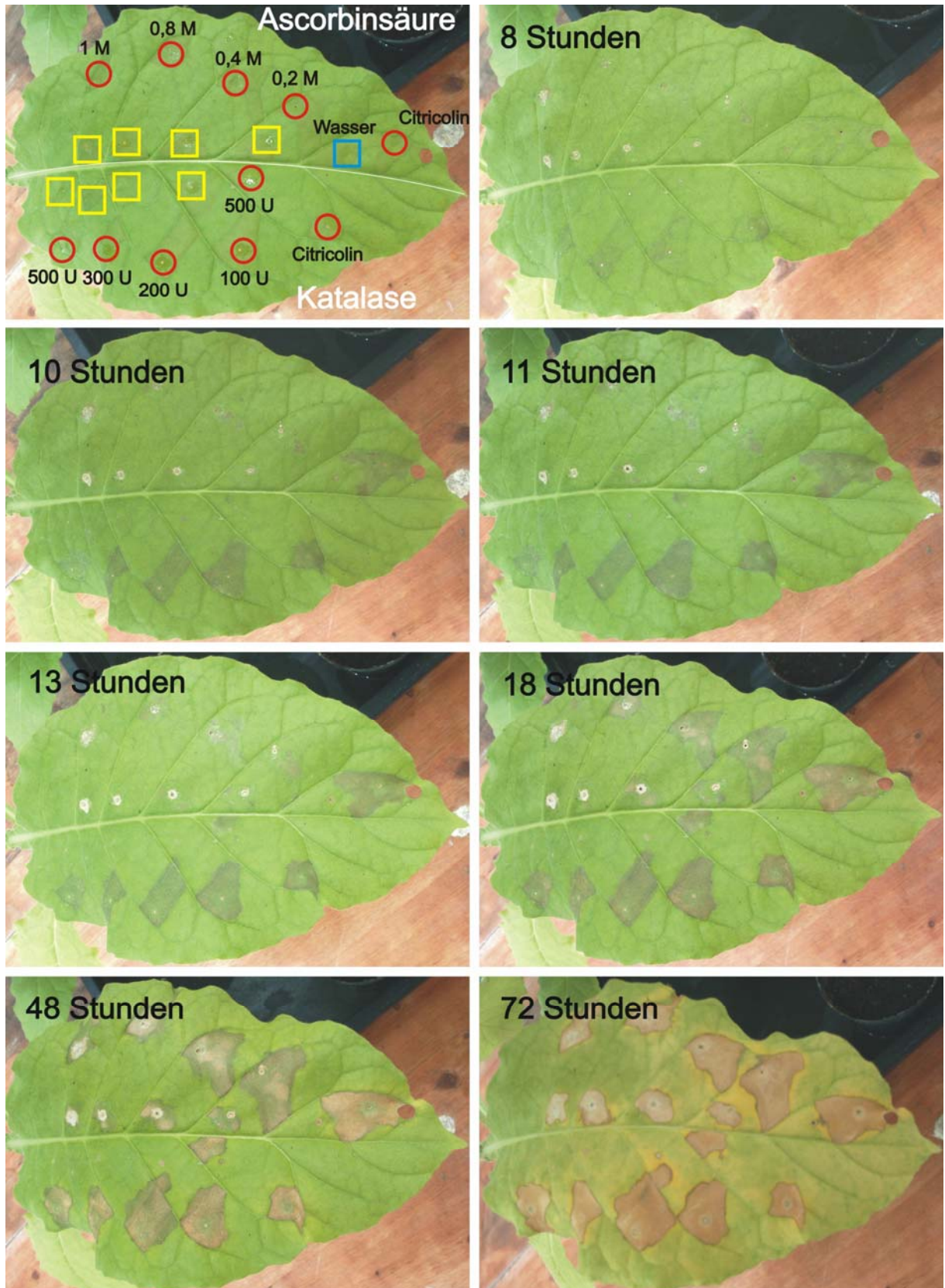


Abbildung 1.5: Zeitlicher und konzentrationsabhängiger Einfluss von Ascorbinsäure und Katalase auf die hypersensitive Reaktion nach Infiltration von Tabakblättern (Sorte Bel W3) mit Citricolin nach unterschiedlichen Zeitabständen. Die blaue Markierung zeigt den mit Wasser infiltrierten Bereich. Die roten Markierungen weisen

auf die Bereiche, die gleichzeitig mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Citricolin und mit unterschiedlichen Konzentrationen an Ascorbinsäure oder Katalase infiltriert waren, hin. Die gelben Markierungen weisen die Bereiche mit steigender Konzentration an Ascorbinsäure oder Katalase der Kontrolle (ohne Citricolin) aus.

1.2.1.3 H_2O_2 -Nachweis mittels Diaminobenzidin (DAB) Färbung nach Elicitierung

Die Proben für die DAB-Färbung wurden, wie in II. 12.1 beschrieben, aus den Tabakblättern (s. Abb. 1.5) nach 3, 8 und 11 Stunden entnommen.

Abbildung 1.6 A und B zeigt Blattzellen des Schwammparenchyms von Proben, die mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Citricolin behandelt wurden. Die in Abbildung 1.6 A dargestellte Probe wurde mit Citricolin, nicht mit aber Diaminobenzidin inkubiert, um die vorhandene Hintergrundfärbung im Vergleich zu den anderen Behandlungen berücksichtigen zu können. Die Schwammparenchymzellen in Abbildung 1.6 B wurden dagegen mit Citricolin und Diaminobenzidinlösung inkubiert. Die typische rot-braune Verfärbung weist auf eine lokale Akkumulation von H_2O_2 nach Elicitierung hin. Die Probe in Abbildung 1.6 C wurde mit 1 M Ascorbinsäure und mit Diaminobenzidinlösung behandelt. Wie erwartet zeigte sich keine Rotfärbung des Schwammparenchyms dieser nicht-elicitierten Kontrolle. Abbildung 1.6 D zeigt eine Behandlung des Parenchymgewebes mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Citricolin, 1 M Ascorbinsäure und anschließender Behandlung mit Diaminobenzidinlösung. Die Rotfärbung ist hier im Vergleich zu Abbildung 1.6 B deutlich reduziert, was auf eine Reduktion des gebildeten H_2O_2 durch die Ascorbinsäurelösung zurückzuführen ist.

Abbildungen 1.6 E und F zeigen, dass 3 Stunden nach Infiltration mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ Citricolin und DAB deutliche Rotfärbung im Gewebe bzw. an den Stomata zu erkennen ist, welche 8 Stunden nach Behandlung noch ausgeprägter erschienen (s. Abb. 1.6 G).

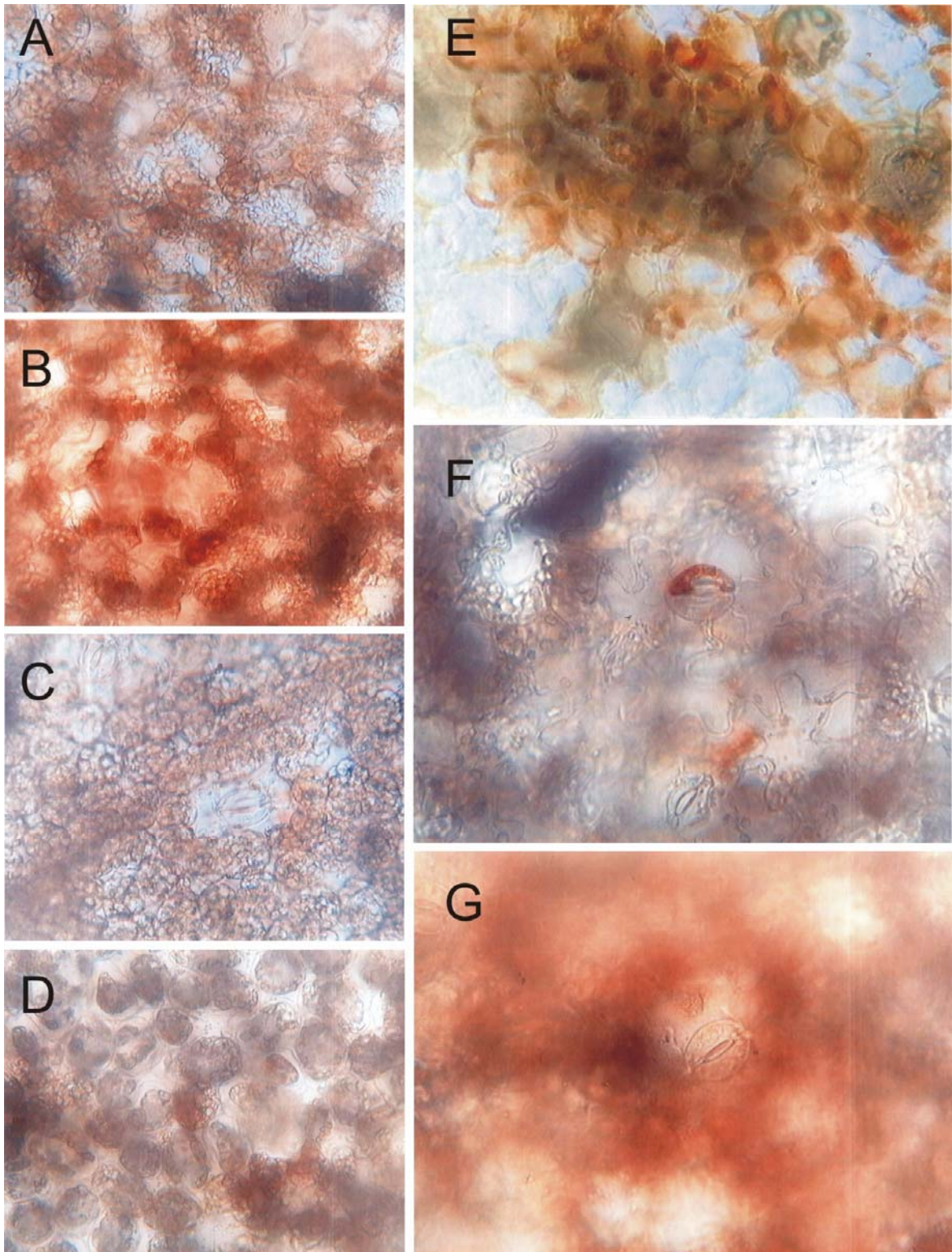


Abbildung 1-6: H_2O_2 -Nachweis in Tabakblättern mittels DAB-Färbung (0,1 % DAB-Lösung) nach Infiltration von Citricolin ($1\mu g mL^{-1}$). Probenahme nach 11 Stunden: (A) Elicitin $1\mu g mL^{-1}$ ohne DAB, (B) Elicitin $1\mu g mL^{-1}$ + DAB, (C) 1 M Ascorbinsäure + DAB, (D) Elicitin $1\mu g mL^{-1}$ + 1 M Ascorbinsäure + DAB. Probenahme nach 3 Stunden: (E und F) Elicitin $1\mu g mL^{-1}$ + DAB. Probenahme nach 8 Stunden: (G) Elicitin $1\mu g mL^{-1}$ + DAB.

1.2.2 Einfluss von Citricolin auf die Physiologie von Buchen- und Tabakblättern

Um den Einfluss von Citricolin auf die Physiologie von Buchen- und Tabakblättern untersuchen zu können, wurden die Blätter in einer Elicitinlösung ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) inkubiert. 24 Stunden nach Versuchsbeginn wurden zwei verschiedene Gaswechselfparameter gemessen (s. II. 7.2), die in Tabelle 1.1 zusammengefasst sind. Citricolin reduzierte nur bei Tabakblättern die Netto-CO₂-Aufnahmerate und die stomatäre Leitfähigkeit. Das Elicitin zeigte dagegen keinen Einfluss auf diese Parameter bei Buchenblättern. Auch 5 Tagen nach Inkubation waren keine Welkesymptome, Chlorosen oder Nekrosen bei Buchenblättern zu beobachten. Dagegen verursachte das Elicitin Citricolin zu diesem Zeitpunkt die für Elicitine typischen Blattnekrosen bei Tabakblättern. Aus diesem Grund kann das Elicitin von *P. citricola* als mögliche Ursache für die Symptomausprägung bei Buchensämlingen ausgeschlossen werden.

Tabelle 1.1: Vergleich von Symptomausbildung und Gaswechsel an Buchen- und Tabakblättern 3 Tage nach Behandlung mit 25 μg Citricolin. Netto-CO₂-Aufnahmerate in $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, stomatäre Leitfähigkeit in $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=3$; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und mit Elicitin behandelten Blättern nach einem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben ($p \leq 0,05$). (-) Symptome nicht vorhanden.*

	Symptome	Netto-CO ₂ -Aufnahmerate	Stomatäre Leitfähigkeit
Buche			
Kontrolle	-	$3,02 \pm 0,24$	$22,6 \pm 1,3$
Elicitin	-	$2,88 \pm 0,08$	$21,1 \pm 0,8$
Tabak			
Kontrolle	-	$4,75 \pm 0,54$	$25,9 \pm 4,7$
Elicitin	Nekrosen	$2,50 \pm 0,42$ *	$17,4 \pm 3,6$ *

1.3 Aufreinigung von *P. citricola*-Proteinen aus der A1-Fraktion

1.3.1 Westernblot und SDS-PAGE der Proteine aus der A1-Fraktion des *P. citricola*-Kulturfiltrats und Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein

In Gegensatz zur Fraktion A2 (s. III. 1.1.1, Abb. 1.3), zeigten die A1-Fraktion und das Kulturfiltrat keine definierbare Proteinbande in der SDS-PAGE (s. Abb. 1.7 A).

Abbildung 1.7 B zeigt, dass es jedoch zu einer leichten Wechselwirkung des Antikörpers gegen β -Cryptogein sowohl mit der A1-Fraktion als auch mit dem Kulturfiltrat (RK) kam. Die detektierte Proteinbande besitzt eine molekulare Masse um 8 kDa (s. Abb. 1.7 B). Damit konnte gezeigt werden, dass, wie bereits bei der A2-Fraktion, geringe Anteile an Citricolin auch in der A1-Fraktion und wie erwartet auch im rohen Kulturfiltrat zu finden sind.

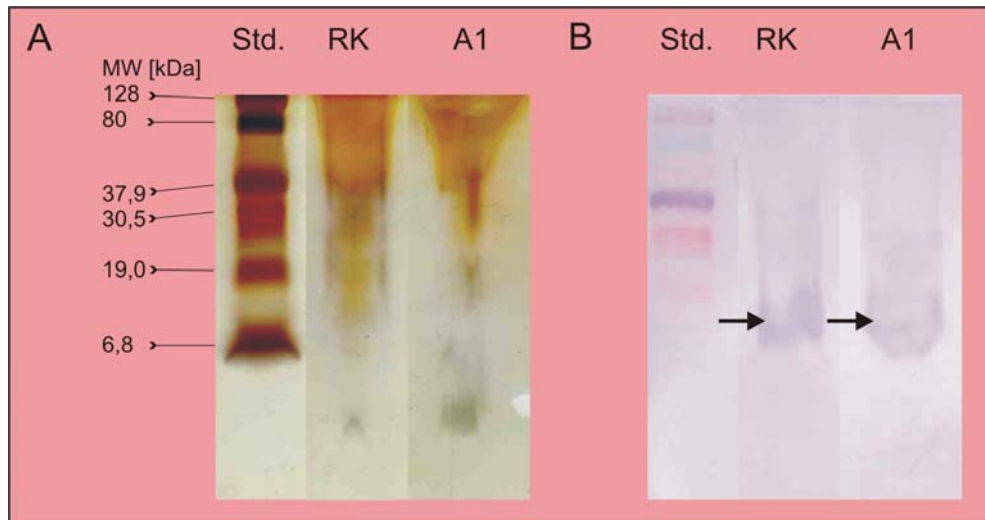


Abbildung 1.7: (A) Tris-Tricin-Gel (4 % Sammelgel und 16,5 % Trenngel) der im rohen und fraktionierten *P. citricola*-Kulturfiltrat (Rk und A1) enthaltenen Proteine (Silbernitrat-Färbung) und (B) Westernblot und Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein; pro Spur wurden 25 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

1.4 Biologische Wirkung der A1-Fraktion

1.4.1 Biotest der A1-Fraktion aus dem fraktionierten Kulturfiltrat von *P. citricola* an Buchenblättern

Die Elicitine von *P. citricola* zeigten, wie oben beschrieben, nach der Infektion mit *P. citricola* an Buchensämlingen (Blättern) keine schädigende Wirkung. Da aber trotzdem Symptome beobachtet werden, wurde angenommen, dass möglicherweise andere Proteine eine toxische Wirkung auf Buchenblätter ausüben könnten. Aus diesem Grund wurden die Fraktionen 8 bis 14 der A1-Fraktion näher untersucht (s. III. 1, Abb. 1.1). Dazu wurden Buchenblätter in einer Proteinlösung (25 μ g mL⁻¹) der jeweilige Fraktion inkubiert. Nach 48 Stunden induzierten die Fraktionen 8 und 10 starke Nekrosen an den behandelten Buchenblättern (s. Tab. 1.2).

Blätter, die in einer der anderen Fraktionen inkubiert wurden, zeigten dagegen keine oder sehr geringe Symptome nach dieser Zeit (s. Abb. 1.8). Auch die Fraktion 14 zeigte keine Wirkung bis zum Versuchende (s. Tab. 1.2).

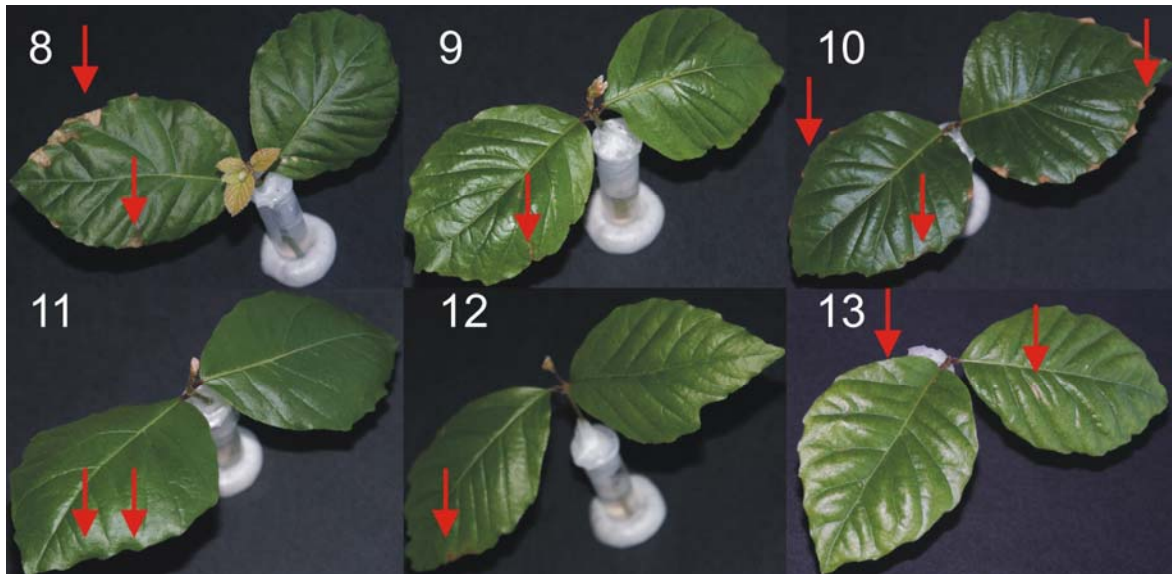


Abbildung 1.8: Nekrosenbildung an Buchenblättern 5 Tage nach Behandlung mit 25 μg Protein der Fraktionen 8 bis 13 des Kulturfiltrates von *P. citricola*.

Tabelle 1.2: Nekrosenbildung an Buchenblättern 5 Tage nach Behandlung mit 25 μg Protein der Fraktionen 8 bis 14 des Kulturfiltrates von *P. citricola*. Boniturschema: (-) Symptome nicht vorhanden, (+) schwache Symptome, (++) starke Symptome.

Fraktionen	Nekrosen (Stunden nach Inkubation)				
	24	48	72	96	120
8	+	++	++	++	++
9	-	-	-	+	+
10	+	++	++	++	++
11	-	-	-	-	+
12	+	+	+	+	+
13	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	-

1.4.2 Einfluss der Fraktionen 8 - 14 der Gesamtfraktion A1 auf die Physiologie von Buchenblättern

Die Fraktionen 8 bis 14 der Hauptfraktion A1 wurden vereint und der Einfluss der Gesamtfraktion auf die Photosynthese von Buchenblättern wurde untersucht. Eine Stunde nach Behandlungsbeginn mit 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein wurde an dem

Buchenblatt ein deutlicher Rückgang der Netto-CO₂-Aufnahmerate im Vergleich zum Kontrollblatt festgestellt. (s. Abb. 1.9).

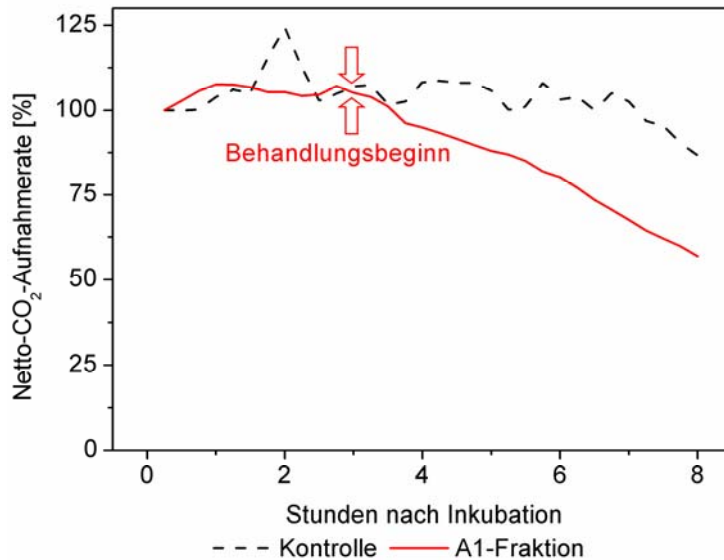


Abbildung 1.9: Online-Messung der Netto-CO₂-Aufnahmerate von Buchenblättern: Inkubation mit 30 µg mL⁻¹ Protein der A1-Fraktion. Sowohl die Kontrolle, als die mit A1-Fraktion behandelten Blätter wurden 3 Stunden mit H₂O_{dest.} vorinkubiert.

Auch hinsichtlich der Wasseraufnahme konnte ein deutlicher Effekt in der A1-Fraktion beobachtet werden. Die Buchenblätter, die in 30 µg mL⁻¹ Gesamtprotein inkubiert wurden, zeigten eine Reduktion der Wasseraufnahme bereits 90 min nach Behandlung. 5 Stunden nach Behandlung war die Wasseraufnahme im Vergleich zur Kontrolle nahezu auf Null reduziert (s. Abb. 1.10).

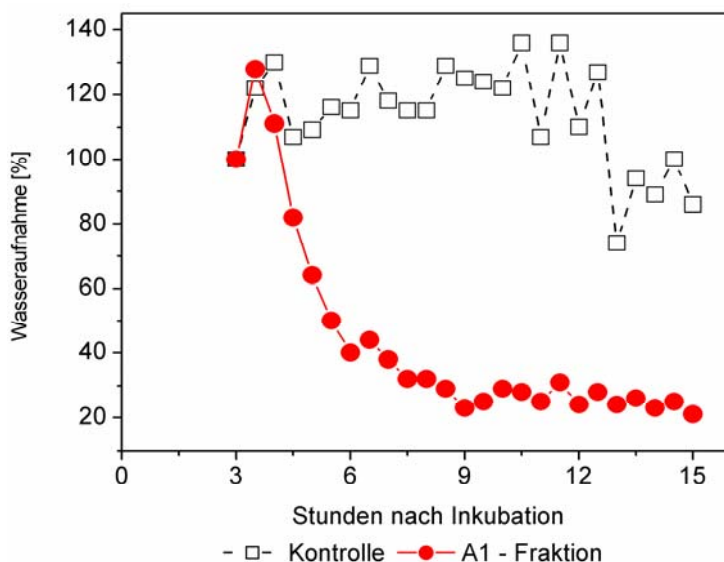


Abbildung 1.10: Wasseraufnahme [%] von Buchenblättern: Inkubation mit 30 µg mL⁻¹ Protein der A1-Fraktion. Sowohl die Kontrolle, als die mit A1-Fraktion behandelten Blätter wurden 3 Stunden mit H₂O_{dest.} vorinkubiert.

Um den Einfluss der A1-Fraktion auf die Wasseraufnahme der Buchenblätter genauer zu untersuchen, wurden die Blätter mit verschiedenen Konzentrationen behandelt. In einem weiteren Versuch wurde die Konzentration von 1 µg bis 30 µg

mL^{-1} Gesamtprotein gesteigert. Dabei zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Wasseraufnahme, wobei eine maximale Hemmung bereits bei einer Konzentration von $20 \mu\text{g Protein mL}^{-1}$ erreicht ist (s. Abb. 1.11).

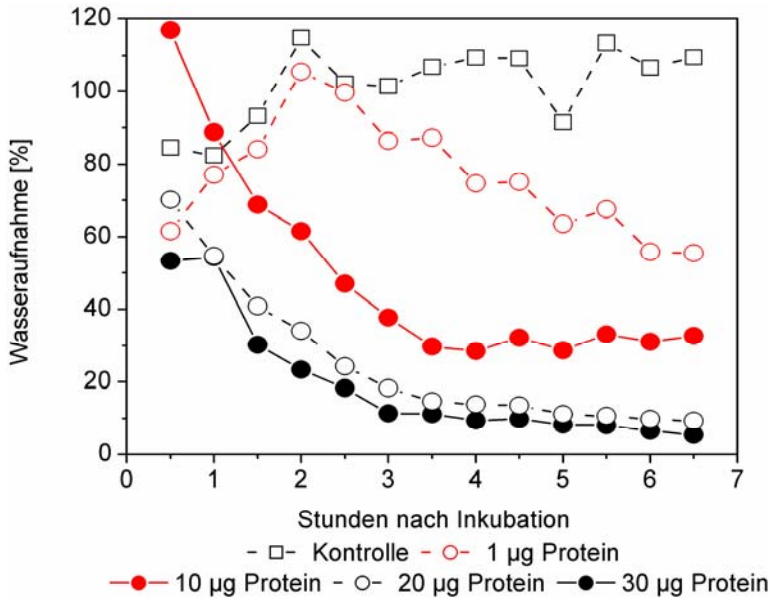


Abbildung 1.11:
Wasseraufnahme [%] von
Buchenblättern: Inkubation
mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$
und $30 \mu\text{g mL}^{-1}$
Protein der A1-Fraktion.

Gleichzeitig wurde die maximale Quantenausbeute des Photosystems II in den behandelten Buchenblättern bestimmt. Die Messung erfolgte in der Blattmitte. Die Abbildung 1.12 zeigt, dass die Quantenausbeute 2 Tage nach Inkubation mit $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein stark absank, sobald die ersten sichtbaren Welkesymptome auftraten. 3 Tage nach Versuchsbeginn wurden die Unterschiede bei dieser Proteinkonzentration noch deutlicher, da die photosynthetische Quantenausbeute zu diesem Zeitpunkt gegen Null ging. Die mit $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein behandelten Blätter zeigten ebenfalls eine Reduktion der Quantenausbeute um ca. 50 %, 4 Tage nach Inkubation. Blätter, die mit $1 \mu\text{g}$ und $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein behandelt wurden, zeigten dagegen keine Beeinträchtigung der Quantenausbeute im Vergleich zur Kontrolle.

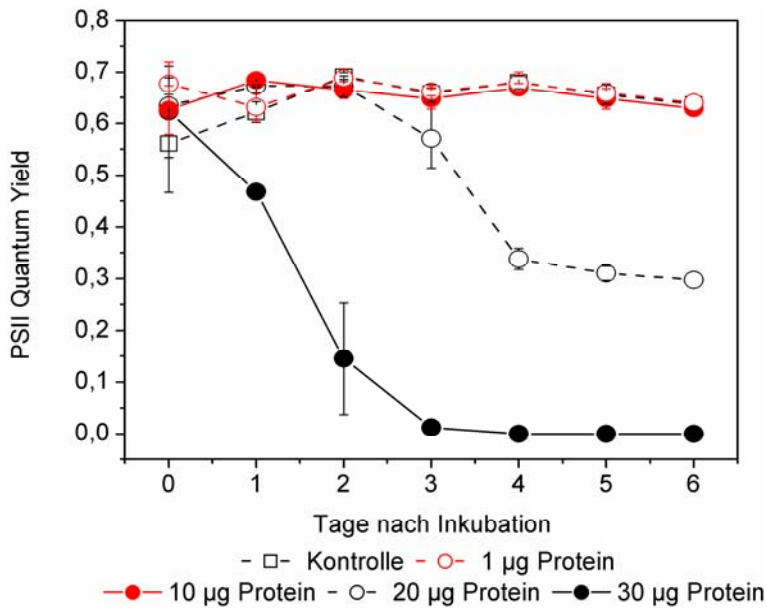


Abbildung 1.12: Maximale Quantenausbeute des Photosystems II von Buchenblättern: Inkubation mit $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ und $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ Protein der A1-Fraktion.

1.5 Aufreinigung und Charakterisierung des Welkefaktors aus dem Kulturfiltrat von *P. citricola*

1.5.1 *Phytophthora*-Kulturmedium

Ergebnisse von Martin (2005) zeigten, dass das Kulturfiltrat von *P. citricola* bereits alleine in der Lage war, die Wasseraufnahme von Buchenblättern zu hemmen. Mit dem in II. 5.2.1 beschriebenen Anthron-Test konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das rohe Kulturfiltrat, als auch die partiell gereinigte A1-Fraktion noch Zucker enthielten, die zu Beginn der *Phytophthora*-Flüssigkultur zugesetzt worden waren. Dieser Befund zeigte, dass die Zuckerkonzentrationen im Kulturfiltrat möglicherweise ein Problem darstellen, was die eigentliche biologische Aktivität der A1-Fraktion überlagern könnte. Zudem könnten nicht abgetrennte Zuckerpolymerer Probleme bei der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen machen (Alfenas und Brune, 1998).

Aus diesem Grund war es notwendig, die Zuckerkonzentration im Kulturmedium von *P. citricola* zu senken, um erneut eine aktive Fraktion daraus zu isolieren. Dazu wurde das Wachstum von *P. citricola* bei verschiedenen Glucose- und Asparagingehalten getestet. Der Versuchsansatz ist in Tabelle 1.3 dargestellt.

Tabelle 1.3: Zusammensetzung der Varianten des Kulturmediums von *P. citricola*.

Variante	Glucose [g L ⁻¹]	L-Asparagin [g L ⁻¹]
1	1	0,2
2	1	2
3	3	0,2
4	3	2

Die Auswirkungen der veränderten Konzentrationen an Glucose und L-Asparagin im M1-Medium auf das Myzelgewicht sind in Abbildung 1.13 dargestellt. Die Steigerung beider Variablen führte zu einer tendenziellen Zunahme des Myzelgewichts. Es konnte außerdem festgestellt werden, dass Variante 1 mit niedriger Glucose- und niedriger L-Asparaginkonzentration den kleinsten Myzelzuwachs zeigte.

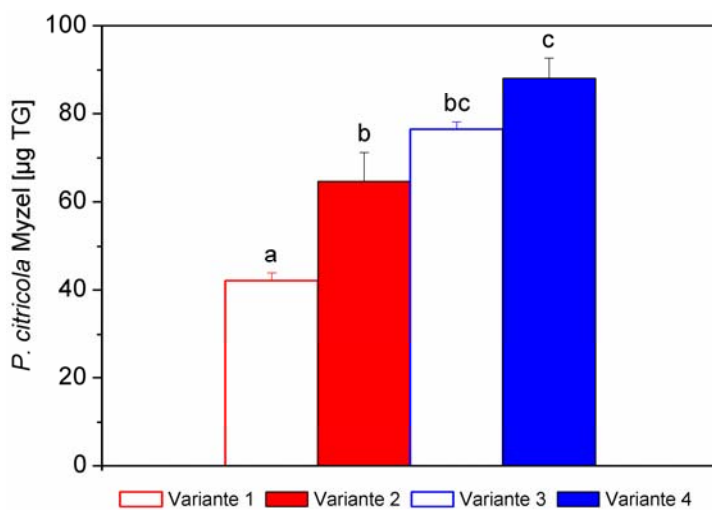


Abbildung 1.13: Einfluss der Mediumzusammensetzung auf das Myzelgewicht von *P. citricola*; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=12$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

In Tabelle 1.4 sind die Protein- und Glucosekonzentration vor und nach der Dialyse (MWCO 12-14 kDa) dargestellt. Die Dialyse führte in den Kulturfiltratvarianten zu einer durchschnittlichen Abnahme von 44 % der Proteinkonzentration. Die Glucosekonzentration nahm bei Variante 1 und 2 entsprechend um 46 % und 45 % ab. Bei den Varianten 3 und 4, welche einen hohen Glucoseanteil im Medium enthielt, war die Abnahme der Glucosekonzentration entsprechend um 86 % und 74 %. Es zeigte sich hier allerdings, dass im Vergleich zu Variante 1 und 2 die Restglukosekonzentration im Durchschnitt um 51 % höher waren.

Tabelle 1.4: Glucoseäquivalente (eq) und Proteingehalte vor ⁽¹⁾ und nach ⁽²⁾ Dialyse der Varianten. Glucoseäquivalente werden mit dem Anthron-Test bestimmt.

Variante	⁽¹⁾ Protein [mg L ⁻¹]	⁽²⁾ Protein [mg L ⁻¹]
1	1,7	1,1
2	2,0	1,0
3	1,8	1,2
4	2,0	0,9

Variante	⁽¹⁾ Glucose eq [mg L ⁻¹]	⁽²⁾ Glucose eq [mg L ⁻¹]
1	76,6	43,0
2	64,8	35,8
3	555,7	76,7
4	301,2	77,4

In Abbildung 1.14 sind die Anteile der Proteingehalte und der Glucoseäquivalent im Verhältnis zum Myzelgewicht von *P. citricola* dargestellt. Die Varianten 1 und 4 zeigten die höchsten Proteingehalte, unterschieden sich jedoch im Glucoseanteil. Variante 1 und 2 zeigten die niedrigsten Glucoseanteile.

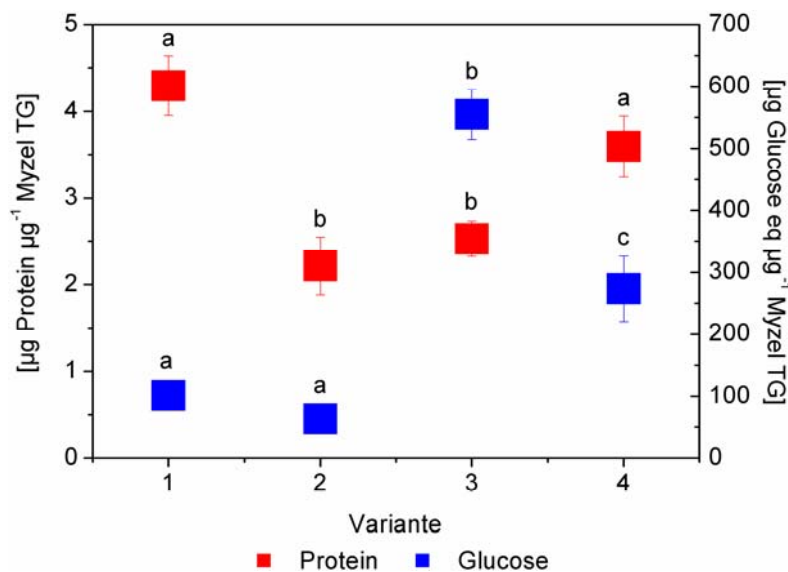


Abbildung 1.14: Einfluss der Mediumzusammensetzung auf die Proteinproduktion bzw. Zuckerverwertung in Bezug auf das Myzelgewicht von *P. citricola*; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=12$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

Mit dem Anthron-Test konnte nachgewiesen werden, dass in den vier Varianten noch Zuckeräquivalente nach der Dialyse vorhanden waren. Um zu überprüfen, ob in diesen noch Rest-Glucose enthalten war, die den vier Varianten zu Beginn der *Phytophthora*-Flüssigkultur zugesetzt wurde, wurde die Zucker-HPLC-Analyse eingesetzt. Die Elutionsprofile der einzelnen Varianten zeigten, dass keine Rest-Glucose mehr vorhanden war. Das Elutionsprofil zeigte jedoch eine Reihe unbekannter Zuckerpolymere, die wohl im Anthron-Test nachgewiesen wurden (s. Abb. 1.15).

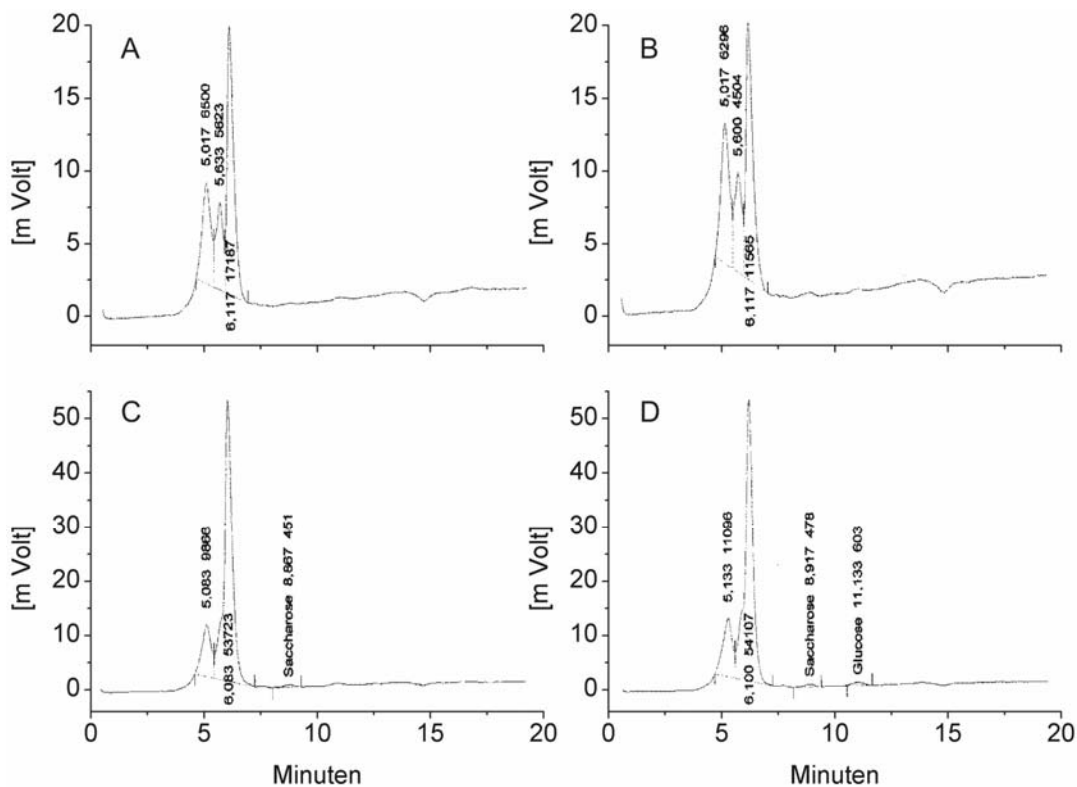


Abbildung 1.15: HPLC-Zucker-Elutionsprofil nach Dialyse der vier Kulturfiltratvarianten von *P. citricola*. (A) Variante 1; (B) Variante 2; (C) Variante 3 und (D) Variante 4.

1.5.1.1 SDS-PAGE der Kulturfiltrate

Um das Proteinmuster der vier Varianten darzustellen, wurden diese auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dabei zeigten alle Varianten ein ähnliches Proteinmuster (s. Abb. 1.16). Ein Unterschied, der auf dem Gel deutlich zu erkennen war, ist, dass die Varianten 3 und 4 keine doppelte Proteinbande um die 25 kDa zeigten, die bei den Varianten 1 und 2 vorhanden war.

Ein direkter Vergleich zwischen den Proteinmustern von rohem Kulturfiltrat (welches mit $10 \text{ g Glucose L}^{-1}$ angesetzt wurde) (s. III. 1.3.1, Abb. 1.7) und den vier

Kulturfiltratvarianten deutet auf eine negative Beeinflussung der Zucker in der Probe auf den normalen Ablauf der Elektrophorese hin.

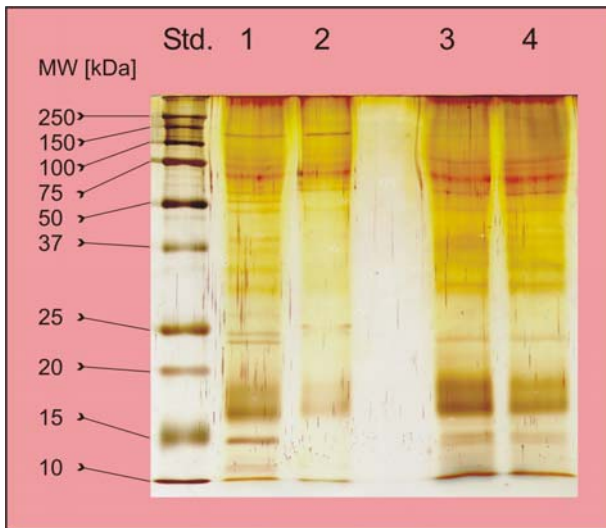


Abbildung 1.16: Kulturfiltrate von *P. citricola*: (Std.) Molekulargewicht-Standard, 1 bis 4 Kulturfiltrat Varianten. Pro Spur wurden 5 µg Gesamtprotein auf ein SDS-Tris-Glycin-Gel (4 % Sammelgel und 15 % Trenngel) aufgetragen (Geltasche der Probe 2 undicht); Silbernitrat-Färbung.

1.5.1.2 Biotest an Buchenblättern

In ersten Versuchen wurde der Einfluss der Varianten 1 bis 4 auf die hemmende Wirkung der Wasseraufnahme an Buchenblättern hin untersucht (s. Abb. 1.17). Varianten 3 und 4 zeigten im Vergleich zur Kontrolle tendenziell eine stärker hemmende Wirkung als die Varianten 1 und 2.

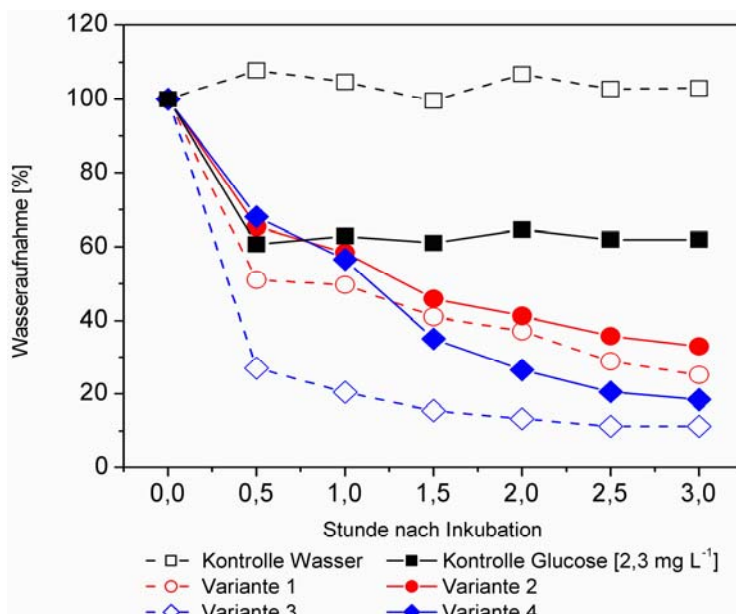


Abbildung 1.17: Wasseraufnahme [%] von Buchenblättern. Kontrolle: Buchenblätter in Wasser inkubiert. Varianten 1 bis 4: Behandlung der Buchenblätter mit je 30 µg Protein mL⁻¹ der Kulturfiltratvarianten 1 bis 4.

In Tabelle 1.5 sind die Schadsymptome der Varianten 1 bis 4 an Buchenblättern nach Inkubation dargestellt.

Tabelle 1.5: Symptomausbildung an Buchenblättern nach Behandlung mit 30 µg Protein mL⁻¹ der Kulturfiltratvarianten 1 bis 4. Boniturschema: (-) Keine Symptome, (+) leichte Nekrosen, (++) starke Nekrosen, (+++) Welke.

Varianten	Symptome (Stunden nach Inkubation)				
	24	48	72	96	120
1	+	++	+++	+++	+++
2	-	+	++	++	++
3	+	++	+++	+++	+++
4	-	+	++	++	++

Variante 1 und 3 führten 120 Stunden nach Inkubation zur Welke. Die behandelten Buchenblätter der Varianten 2 und 4 wiesen zu diesem Zeitpunkt starke Nekrosen auf bzw. war der gesamte Verlauf der Symptomausprägung in diesen beiden Varianten verzögert. Die Kontrollen zeigten 120 Stunden nach Inkubation keine Symptome.

1.5.2 Aufreinigung eines Welkefaktors aus dem Kulturfiltrat von *P. citricola*

Da bei der Variante mit der geringsten Zuckermenge sowohl eine ausreichende Proteinsegregation ins Kulturmedium als auch Myzelwachstum zu beobachten war (s. III. 1.5.1, Abb. 1.14), wurde Variante 1 als Ausgangsmedium für die weitere Proteinaufreinigung ausgewählt.

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte aus 8 Litern *P. citricola*-Kulturfiltrat, das für die Gelchromatographie, wie in II. 6.1 beschrieben, vorbereitet wurde. Bei der Resuspendierung des konzentrierten Kulturfiltrats zeigte sich, dass nur ein Teil der Proteine bei diesem pH-Wert in Lösung zu bringen war. Nichtlösliches Protein wurde abzentrifugiert und als Pellet bezeichnet. Das Pellet konnte vollständig in Probenpuffer II (200 mM Citratpuffer pH 4,0 + 1,5 M NaCl) angelöst werden.

Das in Abbildung 1.18 dargestellte Flussdiagramm zeigt die einzelnen Aufreinigungs- bzw. Detektionsschritte, welche im Anschluss durchgeführt wurden. Der Überstand (Ü) wurde aufgrund unterschiedlichen Laufpuffer in Überstand 1 (Ü1) und Überstand 2 (Ü2) getrennt getestet. Bei Ü1 wurde ein 100 mM Phosphatpuffer pH 7,0 + 0,15 M NaCl als Laufpuffer verwendet. Bei Ü2 und Pellet wurde ein 20 mM Citratpuffer pH 4,0 + 0,15 M NaCl, der den Proteinausfall reduziert hat, verwendet.

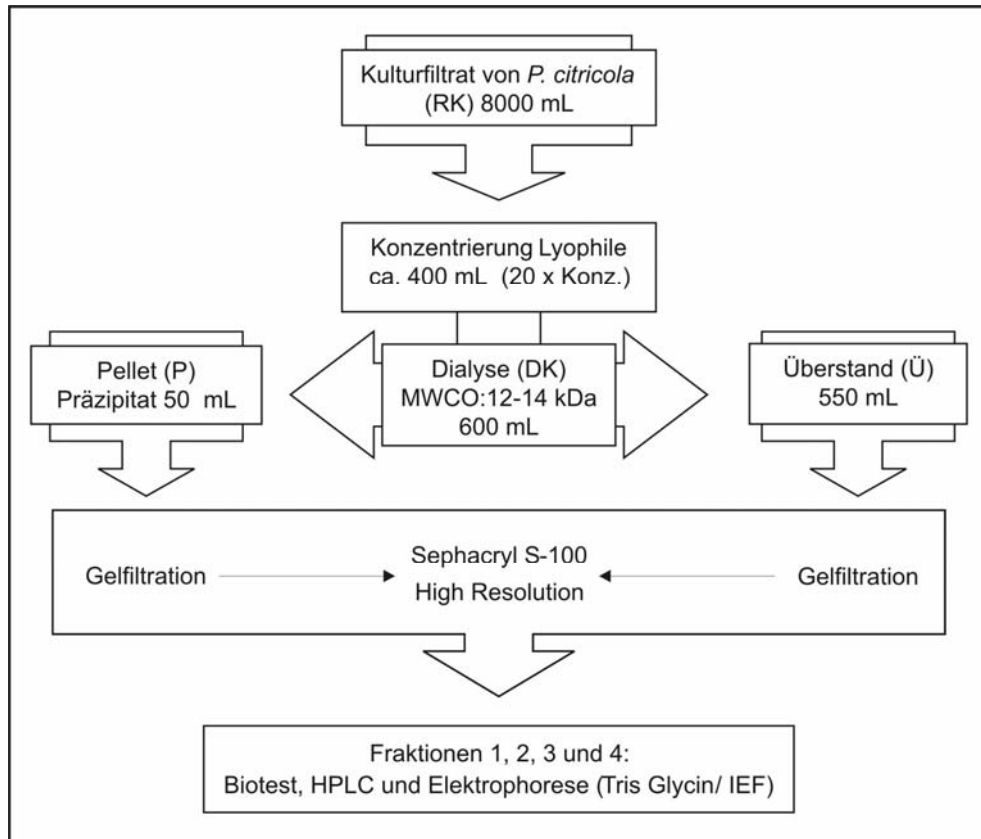


Abbildung 1.18: Übersicht zur Charakterisierung des Welkefaktors aus dem Kulturfiltrat von *P. citricola*.

Abbildung 1.19 zeigt das Chromatogramm eines typischen Laufs, der, wie skizziert, in vier Fraktionen aufgeteilt wurde.

Die Berechnung für die molekularen Massen der unbekannt Proteine, die das Elutionsprofil der vier Fraktionen darstellt, erfolgte, wie in II. 6.1 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass nur die Fraktion 1 des Überstandes zwei Peaks aufwies, die einer kalkulierten Größe von 103,8 kDa und 120,6 kDa entsprechen. In der Fraktion 2 konnte kein Peak detektiert werden. Fraktion 3 zeigte dagegen einen Peak mit einer Größe von 5,4 kDa. Fraktion 4 des Überstandes wies einen Peak mit einer Größe von 2,6 kDa auf.

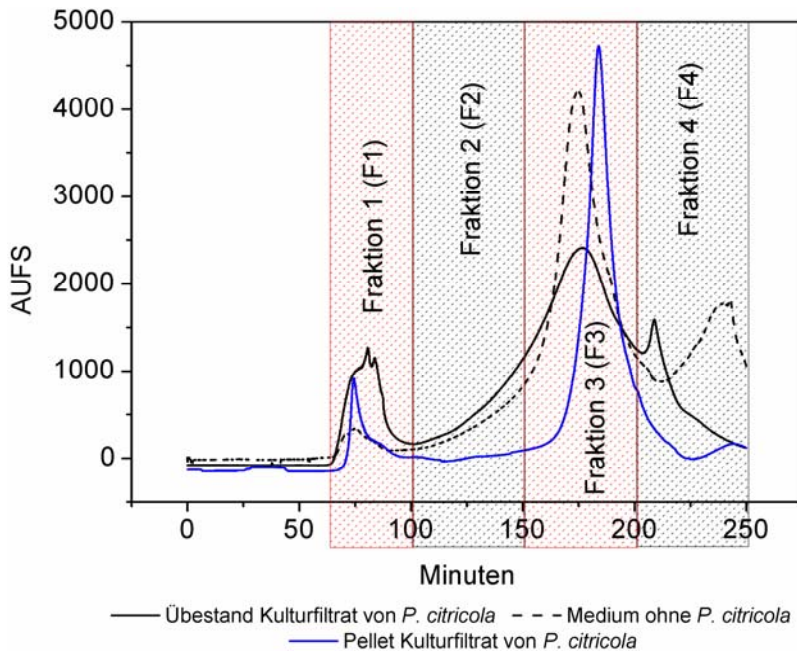


Abbildung 1.19: FPLC-Elutionsprofil des Kulturfiltrats von *P. citricola*, Medium ohne *P. citricola* und resultierendes Pellet nach Zentrifugation des Kulturfiltrats. Fraktionen 1 bis 4 entsprechen den gewonnenen Fraktionen.

1.5.2.1 Biotest der Fraktionen an Buchenblättern

Abbildung 1.20 zeigt die Menge an Protein und Zucker, der unterschiedlichen Fraktionen des Überstandes und des Pellets, die von den Buchenblättern durch den Transpirationsstrom aufgenommen wurden. Als Ergebnis zeigte sich an inkubierten Blätter, dass das Pellet und der Überstand der Fraktion 1, dargestellt in Abbildung 1.20 A, bereits 3 Stunden nach Inkubation zu den stärksten Welkesymptomen, im Vergleich zu Fraktion 2, 3 und 4 führten (s. Abb. 1.20 B, C und D). Das Buchenblatt nahm von Pellet und Überstand der Fraktionen 1 und 3 (s. Abb. 1.20 A und C) die gleiche Menge an Protein und Zucker auf. Es stellten sich jedoch 3 Stunden nach Inkubation stärkere Welkeerscheinungen durch die Fraktion 1 ein.

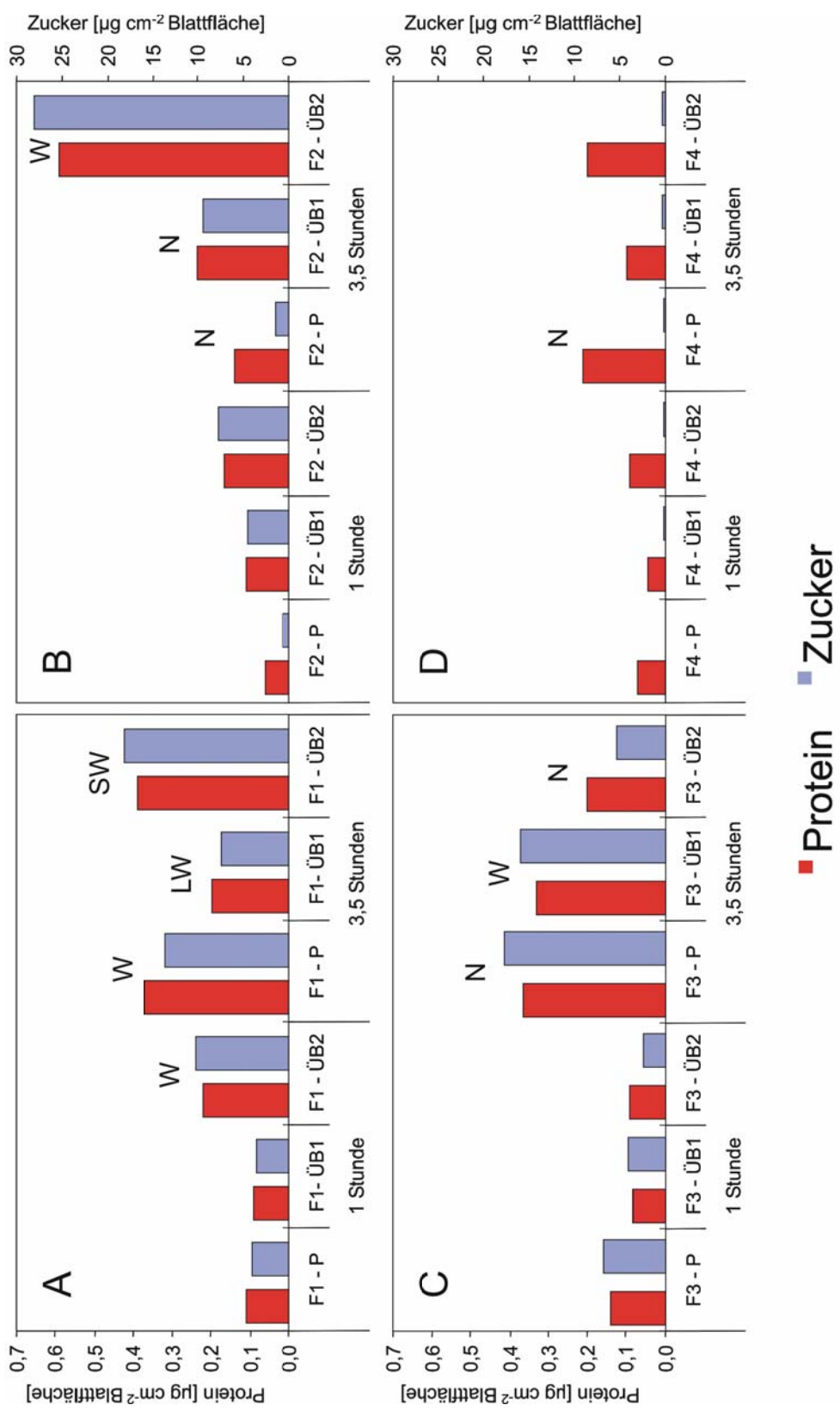


Abbildung 1.20: Aufnahme der Fraktionen F1 bis F4 des Kulturfiltrats von *P. citricola* durch Buchenblätter: Zeitlich dargestellt sind die Aufnahme in $\mu\text{g Protein bzw. Zucker pro cm}^{-2}$ Blattfläche der behandelten Blätter. Buchstaben deuten auf die Stärke der Symptome: (N) braune Läsionen, keine oder sehr geringe Welke; (W) leichte Welke; (LW) starke Welke; (SW) sehr starke Welke. Alle Blätter wurden in $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein inkubiert. A, B, C und D entspricht Fraktionen 1, 2, 3 und 4 der einzelnen Medien (s. Abb 1.19).

Abbildung 1.21 zeigt Welkesymptome an inkubierten Buchenblättern, welche durch Fraktionen aus dem Pellet oder den Überständen Ü1 und Ü2 hervorgerufen wurden.

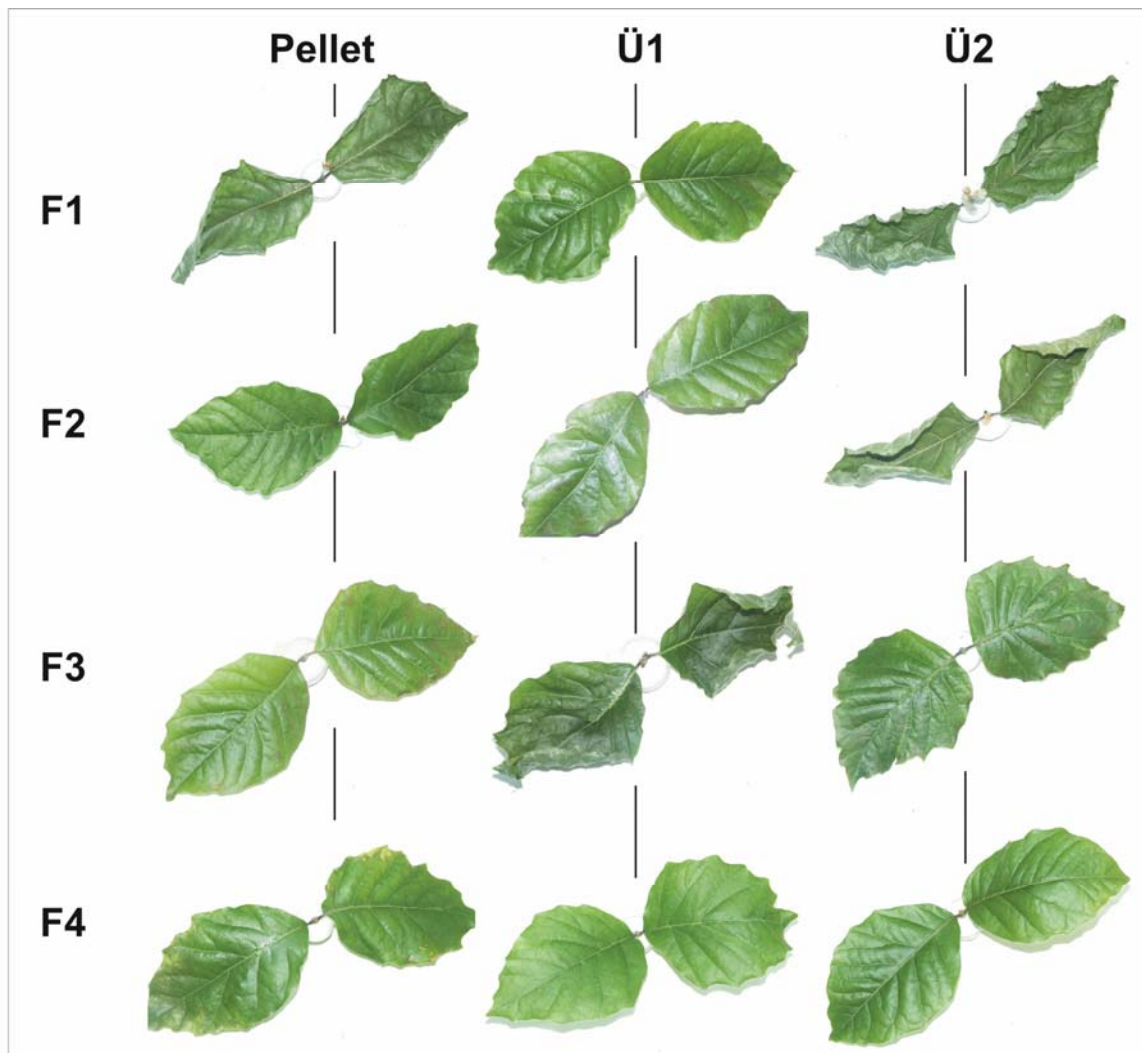


Abbildung 1.21: Welkesymptome an Buchenblättern nach Behandlung mit $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ Gesamtprotein den Fraktionen des Kulturfiltrats von *P. citricola* 24 Stunden nach Inkubation.

1.5.2.2 Elektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinmuster des rohen und dialysierten Kulturfiltrats, sowie des Pellets und des Überstandes sind in Abbildung 1.22 dargestellt.

Das rohe Kulturfiltrat (RK) lässt keine klare Strukturierung der Proteinbanden erkennen, im Gegensatz zum dialysierten Kulturfiltrat (DK). Die Proteinbanden des Überstandes (ÜB) entsprachen denen des dialysierten Kulturfiltrates. Das Pellet wies dagegen lediglich eine Proteinbande, im Bereich um 15 kDa auf.

Fraktion 1 verursachte die stärksten Welkesymptome an Buchenblättern (s. III. 1.5.2.1, Abb. 1.20 A). Deshalb wurde ein separates Proteinmuster, im Vergleich zum

Überstand und Pellet erstellt. Es zeigten sich schwache Banden im Bereich um 10 kDa, zwischen 25 und 30 kDa, sowie im Bereich um 75 kDa auf dem Gel (s. Abb. 1.22). Anhand einer Antikörpermarkierung mit β -Cryptogein zeigte sich, dass noch geringe Mengen an Citricolin in der Fraktion waren.

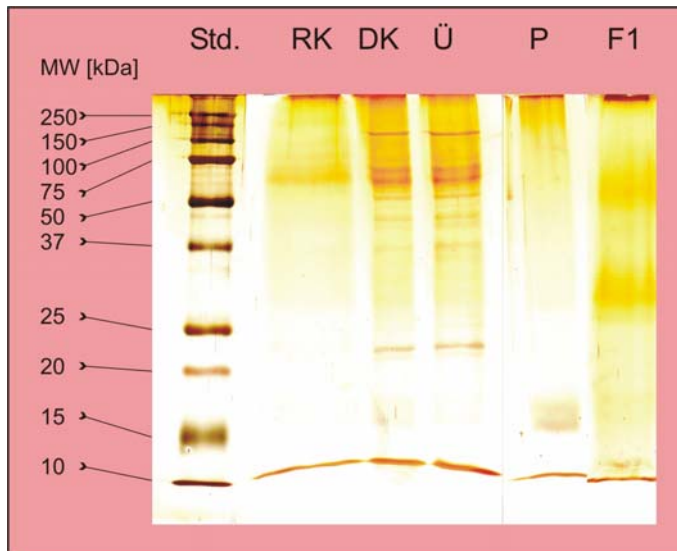


Abbildung 1.22: Kulturfiltrat von *P. citricola*: (Std.) Molekulargewicht-Standard, (RK) rohes Kulturfiltrat, (DK) dialysiertes Kulturfiltrat, (Ü) Überstand nach Zentrifugation, (P) Pellet nach Zentrifugation und (F1) Fraktion 1 des Kulturfiltrats von *P. citricola*. Pro Spur wurden 5 μ g Gesamtprotein auf ein SDS-Tris-Glycin-Gel (4 % Sammelgel und 15 % Trenngel) aufgetragen; Silbernitrat-Färbung.

1.5.2.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Um die Proteine der Fraktion 1 auf ihre isoelektrischen Punkte zu untersuchen, wurden diese auf ein 5 %iges natives Acrylamidgel aufgetragen (s. II. 6.3) und mittels Silbernitratfärbung lokalisiert (s. II. 6.4.1).

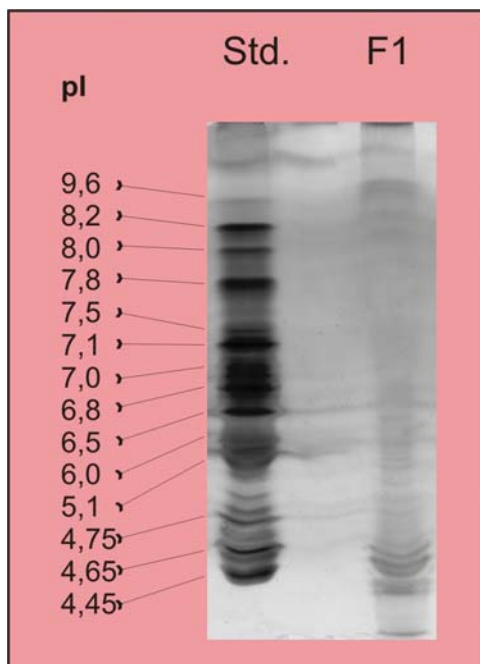


Abbildung 1.23: IEF-Gel von pI-Standard und Fraktion 1 aus *P. citricola* Kulturfiltrat 1 μ g Gesamtprotein werden auf ein PAGE-Gel 5 % aufgetragen; Silbernitrat-Färbung.

Es zeigte sich, dass hauptsächlich Proteinbanden im sauren pH-Bereich detektiert werden konnten. Die Abbildung 1.23 zeigt fünf Proteinbanden, die zwischen einem isoelektrischem Punkt von 4,75 und 4,45 lagen. Die Proteinbande mit dem niedrigsten pI liegt bei einem pI-Wert von 4. Proteinbanden im basischen Bereich konnten nicht eindeutig lokalisiert werden.

1.6 Biologische Wirkung des Welkefaktors von *P. citricola* an Buchenblättern

Da die Fraktionen 1, 2 und 3 der Überstände des Kulturfiltrats von *P. citricola* Welkeaktivitäten zeigten, wurde dies für die weiterführenden Versuche vereinigt.

1.6.1 Makroskopische Symptome

Neben den Tests auf biologische Aktivität an im Labor angezogenen Buchensämlingen, wurde die Toxizität der vereinigten Fraktion auch an Blättern adulter Bäume aus dem Freiland getestet. Abbildung 1.24 zeigt beispielhaft die Wirkung des Welkefaktors an Freiland-Blättern aus den Monaten Mai, Juni, Juli und August. Somit konnte sichergestellt werden, dass die unter Laborbedingungen beobachtete Welke nicht modellabhängig (Verwendung von Buchensämlingen) erfolgt, sondern auch an Buchenblättern aus dem Freiland zu verschiedenen Zeitpunkten altersunabhängig reproduzierbar war.

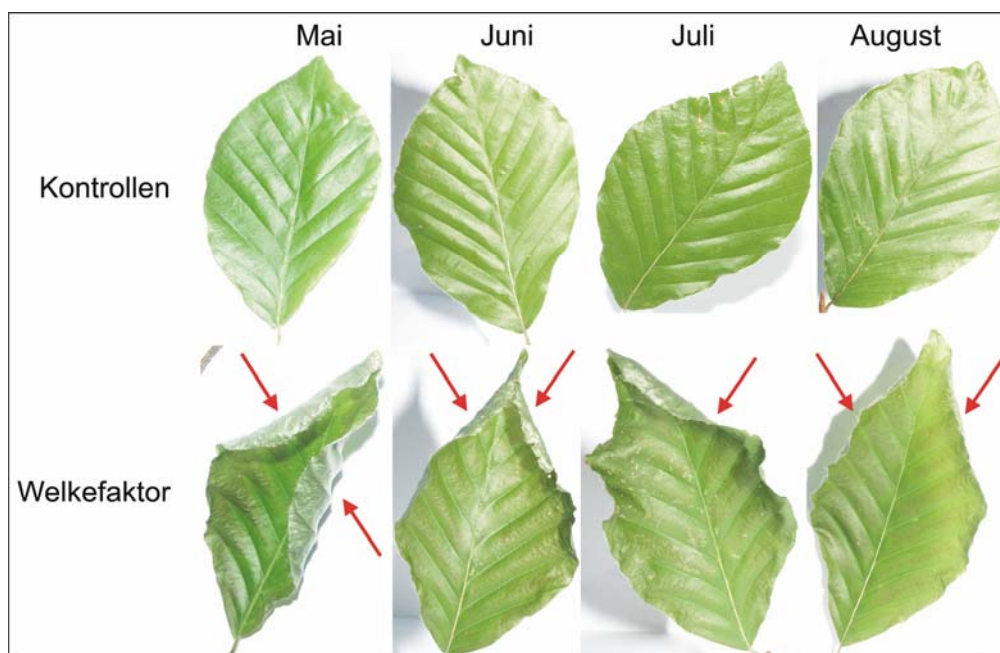


Abbildung 1.24 Wirkung des Welkefaktors an Freiland-Blättern aus den Monaten Mai, Juni, Juli und August 24 Stunden nach Inkubation in $10 \mu\text{g Protein mL}^{-1}$ des Welkefaktors. Kontrollblätter wurden in $20 \text{ mM Citratpuffer pH } 6,0$ inkubiert.

1.6.2 Mikroskopische Symptome

Um die Effekte des *P. citricola*-Welkefaktors auf histologischer Ebene an Buchenblättern zu untersuchen, wurden Blätter adulter Bäume aus dem Freiland genommen und in eine Lösung mit $10 \mu\text{g Protein mL}^{-1}$ des entsprechenden Welkefaktors inkubiert. Kontrollblätter wurden in 20 mM Citratpuffer pH 6,0 inkubiert. Die Probenahme für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen wurde aus Hauptblattnerven von Blättern, die bereits leichte Welke- bzw. Nekrosesymptome aufwiesen, genommen (s. Abb. 1.25). Die Vorbereitung der Proben, sowie die Bildaufnahmen wurden wie in II. 8.2 für inokulierte Buchensämlinge beschrieben, durchgeführt.

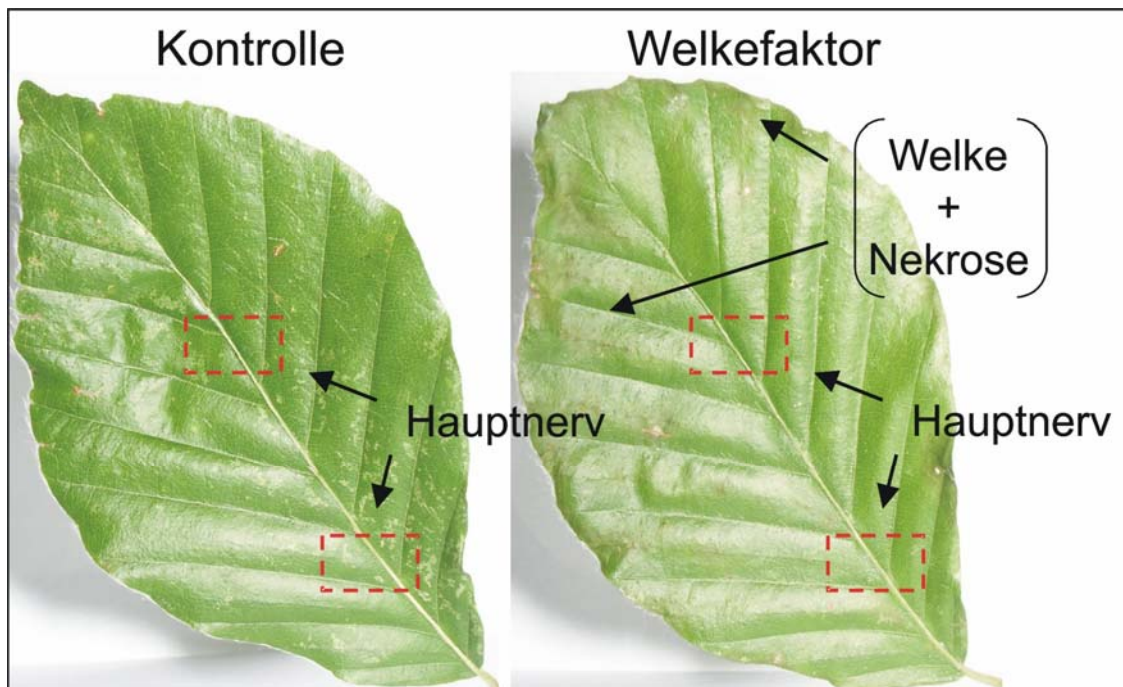


Abbildung 1.25: In Rot beprobte Bereiche aus Hauptblattnerven für die Elektronenmikroskopie (TEM) an Kontrolle und mit $10 \mu\text{g Protein mL}^{-1}$ des Welkefaktors behandelter Blätter.

Abbildung 1.26 A-C zeigt beispielsweise den Zustand von Leitungsgefäßen aus Hauptblattnerven von Kontrollblättern. Details zeigen intakte Zellen, bei denen weder ein Auflösen von Zellwänden noch eine Granulation des zellulären Inhalts, vorkommt.

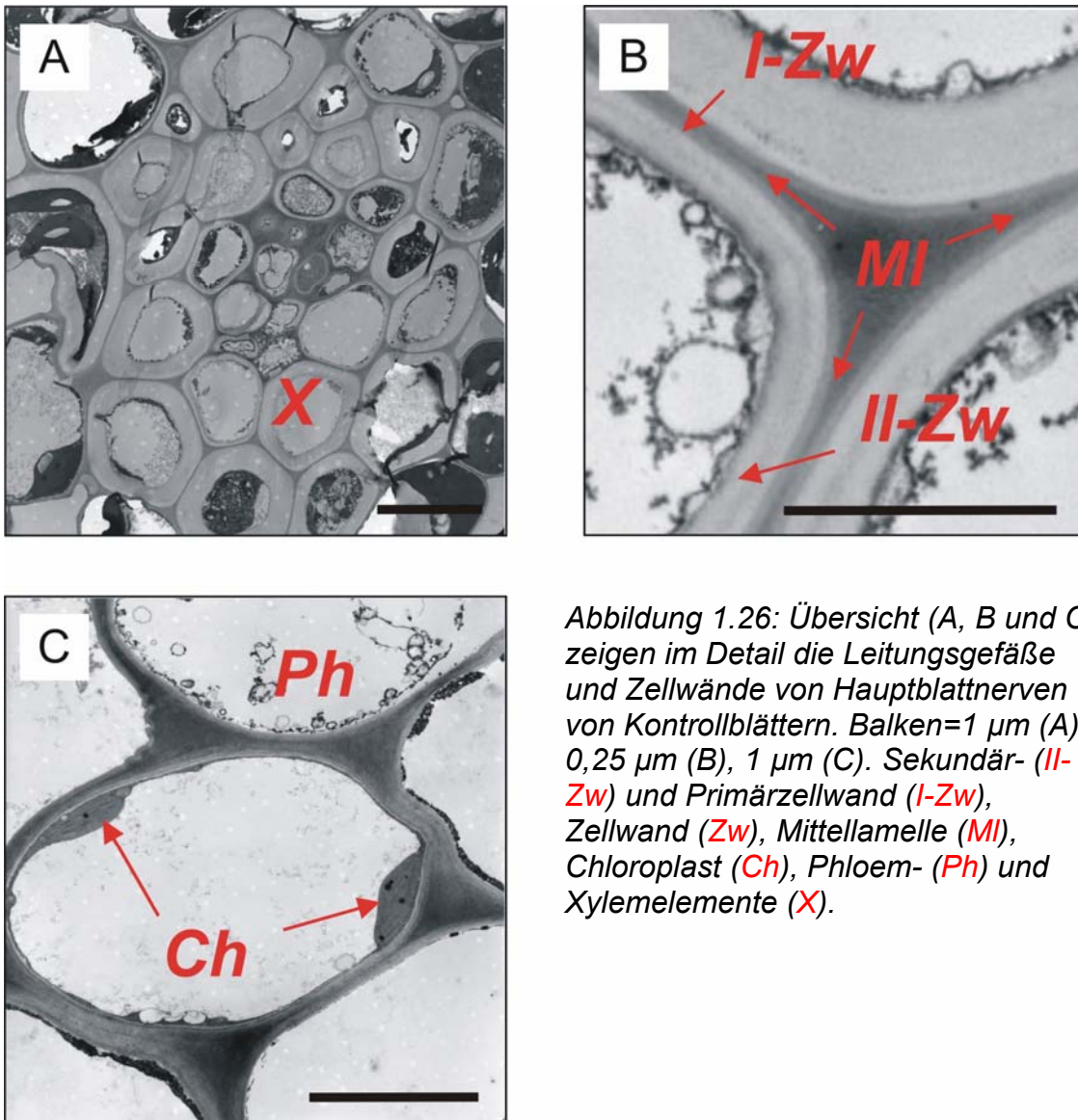


Abbildung 1.26: Übersicht (A, B und C) zeigen im Detail die Leitungsgefäße und Zellwände von Hauptblattnerven von Kontrollblättern. Balken=1 μm (A), 0,25 μm (B), 1 μm (C). Sekundär- (II-Zw) und Primärzellwand (I-Zw), Zellwand (Zw), Mittellamelle (MI), Chloroplast (Ch), Phloem- (Ph) und Xylemelemente (X).

In Abbildung 1.27 sind die Hauptblattnerven aus den mit Welkefaktor behandelten Blättern dargestellt. Die Abbildung 1.27 A und B zeigen deutliche Auflösungserscheinungen der Zellwandstrukturen des Xylems. Im Phloem sind ebenfalls kollabierte Zellen vorhanden, in denen Plasmolyse und destrukturierte Chloroplasten sichtbar sind (s. Abb. 1.27 C). Im Xylem ist häufig ein Ablösen der Zellwand zu beobachten (s. Abb. 1.27 D).

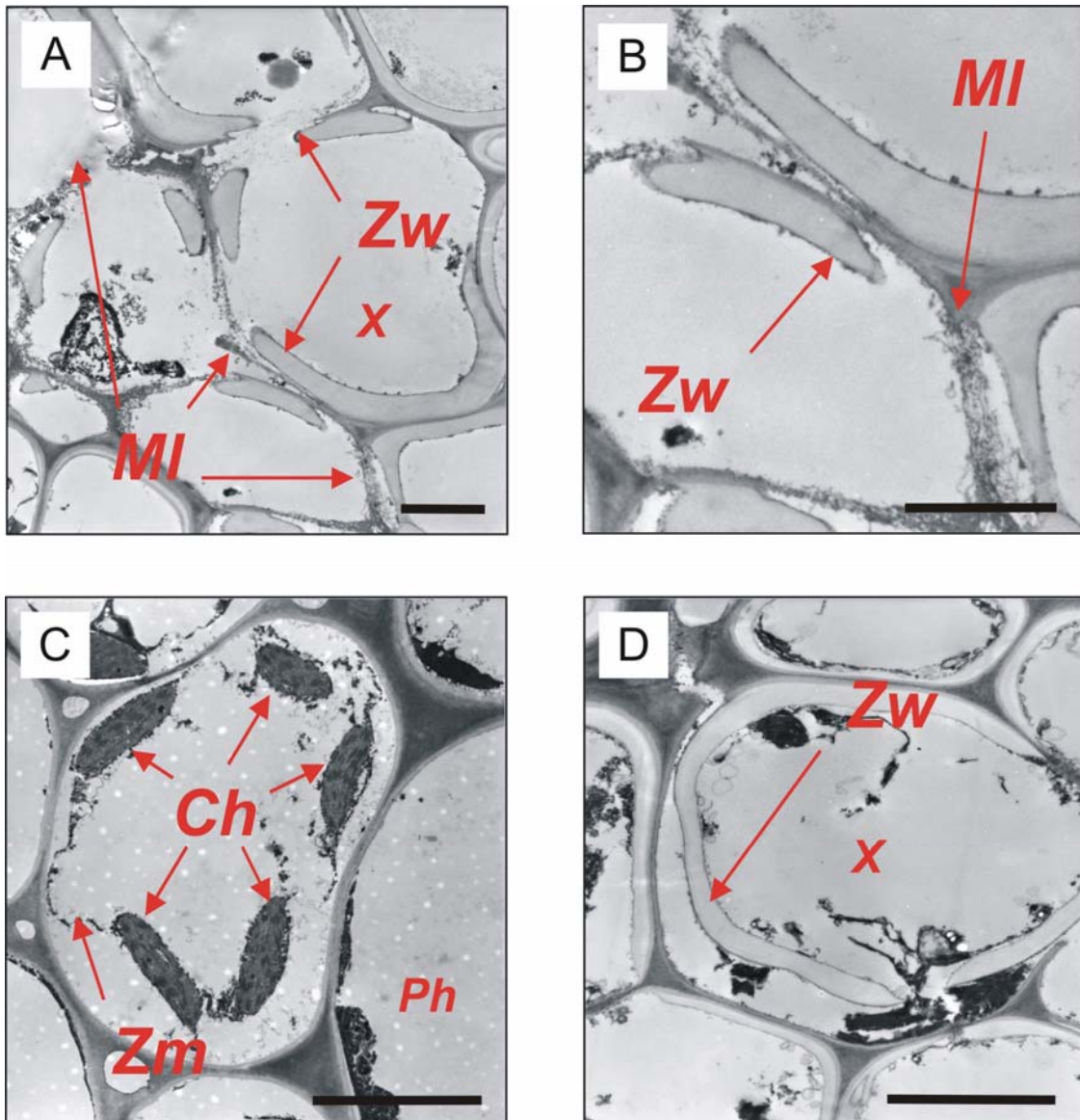


Abbildung 1.27: Übersicht (A, B, C und D) zeigen im Detail die Leitungsgefäße von Hauptblattnerven von Blättern, die mit dem Welkefaktor inkubierten waren. Balken=0,5 μm (A), 0,25 μm (B), 1 μm (C und D). Zellmembran (Zm), Zellwand (Zw), Mittellamelle (MI), Chloroplast (Ch) Phloem- (Ph) und Xylemelemente (X).

1.7 Enzymaktivität von *Phytophthora* extrazellulären Proteinen

Zur weiteren Charakterisierung der im Kulturfiltrat von *P. citricola* enthaltenen Proteine, welche an der Symptomausprägung und den beobachteten histologischen Befunden beteiligt sein könnten, wurde die Hydrolase-Aktivität im Kulturfiltrat bestimmt. In Abbildung 1.28 sind die Hydrolase-Aktivitäten der vier verschiedenen Kulturfiltratvarianten dargestellt. Vor allem eine starke α -Glucosidase- und β -Glucosidase-, aber auch eine geringe Cellobiohydrolase- sowie Xylanase-Aktivität konnte in den Proben detektiert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Cellobiohydrolase-Aktivität im Kulturfiltrat der Varianten 1 und 3 tendenziell niedriger war, im Vergleich zu den Varianten 2 und 4. Variante 4 zeigte die höchste Aktivität für Xylanase im Vergleich zu den Varianten 1, 2 und 3. Die Aktivität an α -Glucosidase war höher bei Varianten 1 und 2. Die β -Glucosidase-Aktivität wiederum war höher bei den Varianten 3 und 4. Die Variante 4 zeigt die höchste Aktivität an β -Glucosidase im Vergleich zu alle anderen Varianten.

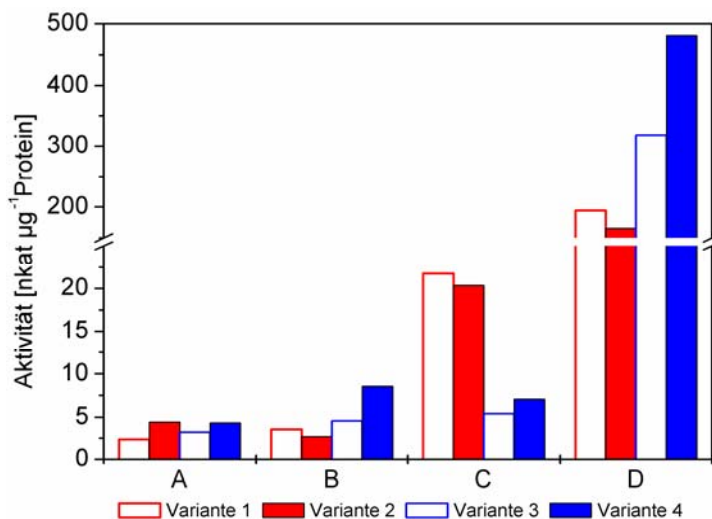


Abbildung 1.28: Enzymaktivität des *Phytophthora*-Kulturmediums: (A) Cellobiohydrolase-, (B) Xylanase-, (C) α -Glucosidase- und (D) β -Glucosidase-Aktivität..

In dem rohen Kulturfiltrat von *P. citricola* ließ sich eine deutliche Hydrolase-Aktivität nachweisen. Zur Untermauerung der bestehenden Hypothese, dass es sich bei dem Welkefaktor möglicherweise um hydrolytische Enzyme handelt, die sowohl lokal als auch systemisch am Abbau pflanzlicher Strukturen beteiligt sein könnten, wurde die Hydrolase-Aktivität in den mit Hilfe der Flüssigkeitschromatographie partiell gereinigten Fraktionen getestet. Diese Untersuchungen geben einen Hinweis auf die biologische Relevanz der Hydrolasen für die Wirt-Pathogen-Interaktion von *P. citricola* und Buche. Der anschließende Test auf Enzymaktivität zeigte deutlich höhere Werte, als im rohen Kulturfiltrat. Wiederum zeigte sich, dass α -Glucosidase und β -Glucosidase die stärksten Aktivitäten aufwiesen (s. Abb. 1.29).

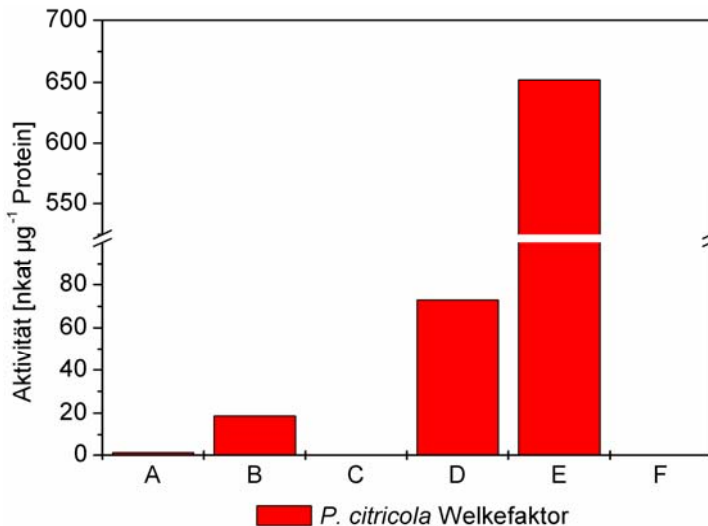


Abbildung 1.29:
Enzymaktivitäten der partiell gereinigten Fraktion A1: (A) Cellobiohydrolase-, (B) Xylanase-, (C) Glucuronidase-, (D) α -Glucosidase-, (E) β -Glucosidase- und (F) Chitinase-Aktivität

2 INFektion VON BUCHENSÄMLINGEN MIT *PHYTOPHTHORA CITRICOLA*

2.1 Einfluss der Inokulation mit *P. citricola* auf die Physiologie und den Infektionsverlauf von Buchensämlingen

Um den Einfluss von *P. citricola* auf die Blattphysiologie und Wasserhaushalt von Buchensämlingen zu untersuchen, wurden 3 Monate alte Pflanzen mit jeweils drei Pathogen bewachsenen Agarplugs (5 x 5 mm Kantenlänge) inokuliert. Während des gesamten Versuchszeitraumes von 7 Tagen wurden täglich der Blattgaswechsel, die Chlorophyll-Fluoreszenz und die Wasseraufnahme gemessen. Zusätzlich wurde das Wasserpotential der geernteten Sämlinge bestimmt. (s. II. 7 und II. 12.2) Die Tabelle 2.1 zeigt die Symptomentwicklung in Prozent von mit *P. citricola* inokulierten Buchensämlingen an den jeweiligen Erntetagen.

Die ersten Krankheitssymptome an mit *P. citricola* inokulierten Buchensämlingen wurden an den Keimblättern beobachtet. 3 Tagen nach Versuchsbeginn waren deutliche Welkesymptome an den Keimblättern zu erkennen. 4 bzw. 5 Tage nach Inokulation waren bereits 40 % und 87 % der Pflanzen betroffen. Leichte Welkeerscheinungen konnten erst ab 6 Tagen nach Inokulation am Blattrand beobachtet werden. Einen Tag später war die Welke bereits stark fortgeschritten, die Blätter begannen zu vertrocknen. Ab diesem Zeitpunkt waren 10 % der inokulierten Sämlinge abgestorben, 20 % und 50 % zeigten leichte oder deutliche Welkesymptome auf.

Tabelle 2.1: Symptomentwicklung an Buchensämlingen, inokuliert mit P. citricola. Die Symptombonitur an den jeweiligen Erntetagen ist in Prozent dargestellt; die Kontrollpflanzen zeigten keine Symptome nach dieser Zeit. (n) Zahl der bonitierten Buchensämlinge.

Tag	n	Welkesymptome [%]				
		Ohne	Deutliche Symptome an Keimblättern	Leichte Symptome an Blättern	Deutliche Symptome an Blättern	Abgestorbene Sämlinge
1	35	100	-	-	-	-
2	30	100	-	-	-	-
3	25	92	8	-	-	-
4	20	60	40	-	-	-
5	15	13	87	-	-	-
6	15	10	60	30	-	-
7	10	-	20	20	50	10

Aufgrund der Infektion mit *P. citricola* konnte ab dem zweiten Tag nach Inokulation eine Reduktion sowohl der Netto-CO₂-Aufnahmerate als auch der stomatären Leitfähigkeit bei inokulierten Buchensämlingen im Vergleich zur Kontrollpflanzen festgestellt werden. Deutlicher wurden diese Effekte ab dem vierten Tag nach Inokulation, in dem beide Parameter um 50 % im Vergleich zu Kontrollpflanzen reduziert waren. Durch eine steigende Symptomentwicklung an Blättern 2 Tage später, war die Netto-CO₂-Aufnahmerate und auch die stomatäre Leitfähigkeit fast zu 100 % reduziert. (s. Abb. 2.1 A und B)

Die Carboxylierung zeigte 2 Tage und ab 6 Tagen nach der Inokulation eine signifikante Reduktion, die durch den Anstieg der blattinternen CO₂-Konzentration nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 2.1 C).

Die Chlorophyll-Fluoreszenz wiederum zeigte eine signifikante Reduktion ab dem dritten Tag nach der Inokulation, zu einem Zeitpunkt in dem noch keine Welkeerscheinungen im Blattbereich beobachtet wurden. Mit deutlichen Welkesymptomen an den Blättern ab dem sechsten Tag, zeigte sich die Chlorophyll-Fluoreszenz um 50 % reduziert (s. Abb. 2.1 D).

Eine signifikante Reduktion sowohl des Wasserpotentials als auch der Wasseraufnahme an inokulierten Buchensämlingen konnte erst 6 Tage nach

Versuchsbeginn im Vergleich zu Kontrollpflanzen beobachtet werden (s. Abb. 2.1 E und F).

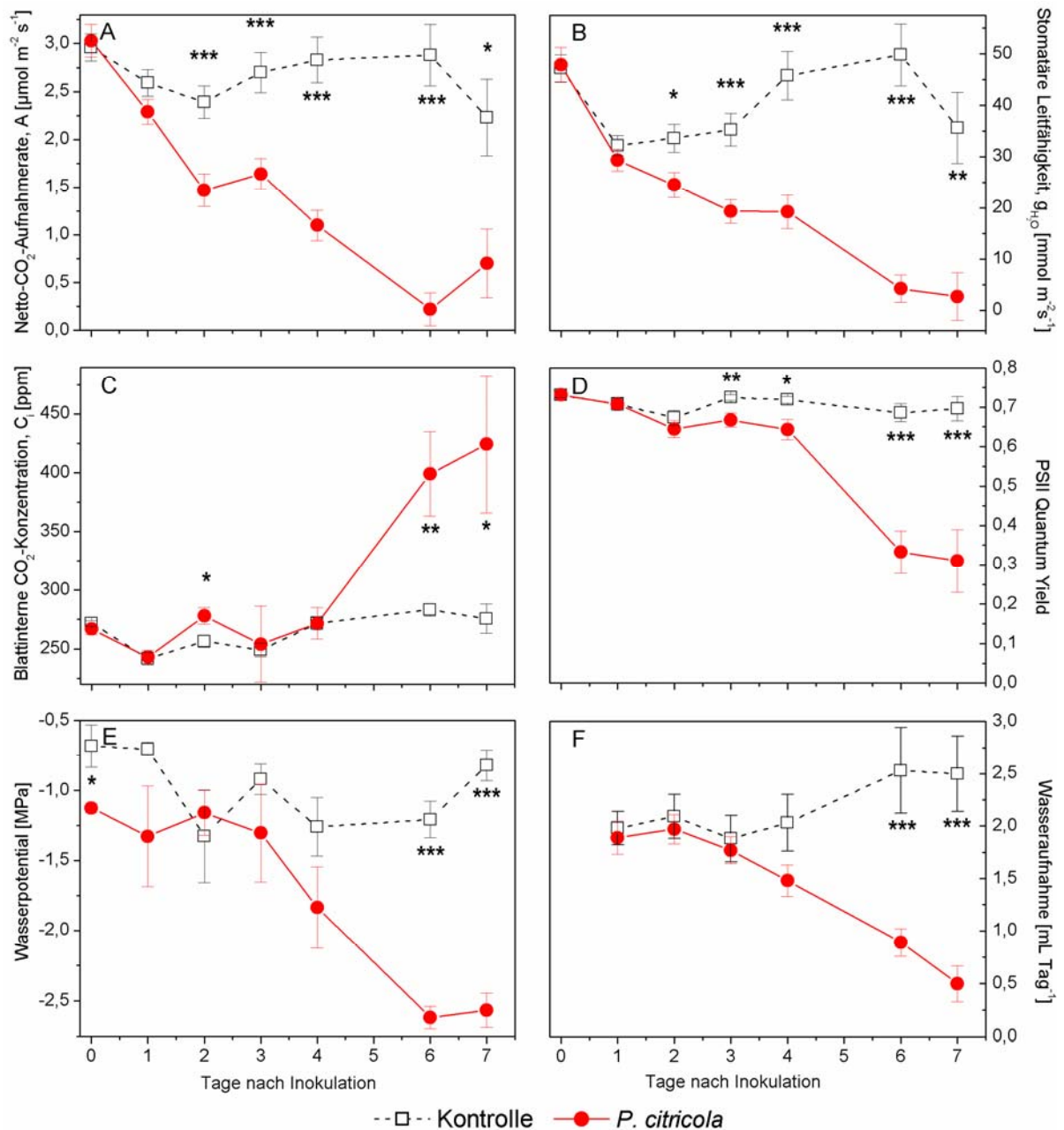


Abbildung 2.1: Einfluss von *P. citricola* auf den Blattgaswechsel, die Chlorophyll-Fluoreszenz und das Wasserpotential inokulierter Buchensämlinge: (A) Netto-CO₂-Aufnahmerate, (B) Stomatäre Leitfähigkeit, (C) Blattinterne CO₂-Konzentration, (D) Quantenausbeute des Photosystems II, (E) Blatt-Wasserpotential und (F) Wasseraufnahme; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=5$ bis zu 6 Tage und $n=10$ für 7 Tage nach Inokulation; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen nach einem zweiseitigen *t*-Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

2.2 Split-root-System von Buchensämlingen infiziert mit *P. citricola*

2.2.1 Physiologische Parameter

Um den Einfluss von *P. citricola* auf die Physiologie von Buchensämlingen bei einseitiger und zweiseitiger Inokulation zu untersuchen, wurde ein „Split-root-System“ verwendet, d.h. eine Kompartimentierung des Wurzelsystems, welche eine Abstufung der Infektion in 0 %, 50 % und 100 % ermöglicht (s. II. 10.2.1).

Die Inokulation der Pflanzen mit *P. citricola* erfolgte mit jeweils drei Pathogen bewachsenen Agarplugs (5 x 5 mm Kantenlänge). An inokulierten (50 % und 100 %) und nicht - inokulierten Buchensämlingen wurden über einen Zeitraum von 11 Tagen unterschiedliche ökophysiologische Parameter erfasst. (s. II. 7 und II. 12.2)

Die Netto-CO₂-Aufnahmerate und stomatäre Leitfähigkeit der inokulierten Sämlinge wurde erst relativ spät durch die Infektion negativ beeinflusst. Erst nach 10 Tagen erfolgt eine signifikante Abnahme der Netto-CO₂-Aufnahmerate und der stomatäre Leitfähigkeit bei den zweifach inokulierten Sämlingen (s. Abb. 2.2 A und C). Die Chlorophyll-Fluoreszenz der inokulierten Sämlinge zeigte im Vergleich zu den Kontrollpflanzen keine Beeinträchtigung (s. Abb. 2.2 B).

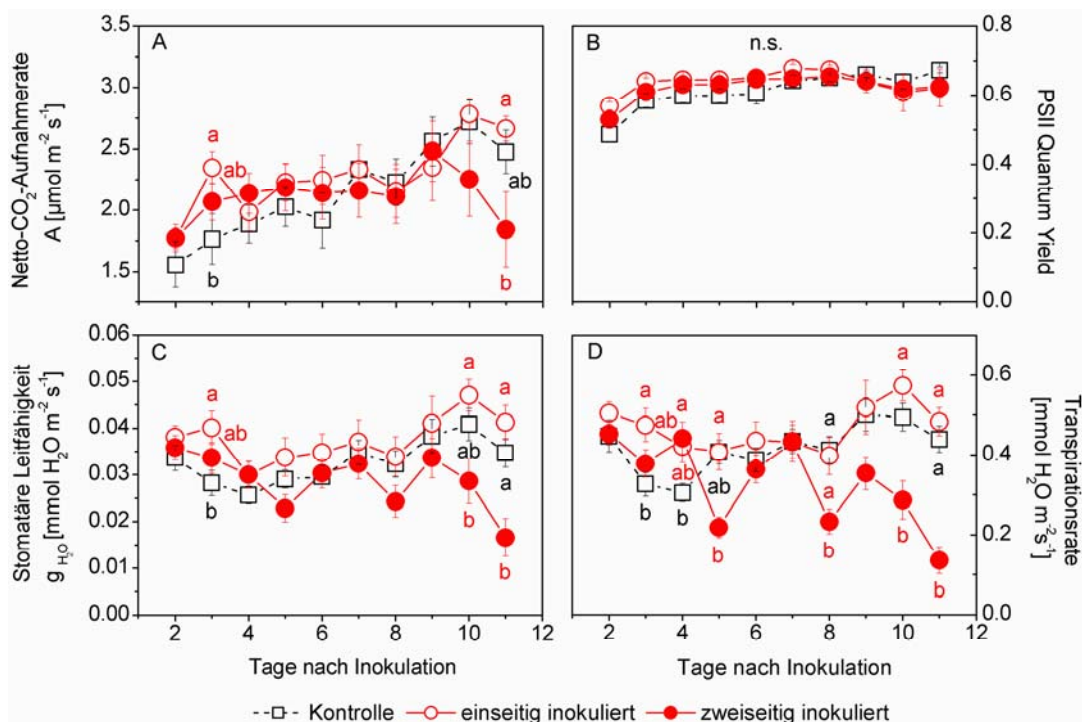


Abbildung 2.2: Einfluss von einseitiger und zweiseitiger Inokulation mit *P. citricola* auf die Blattphysiologie von Buchensämlingen in einem Split-root-System: (A) Netto-CO₂-Aufnahmerate, (B) Quantenausbeute des Photosystems II, (C) stomatäre Leitfähigkeit, und (D) Transpirationsrate; Mittelwerte ± Standardfehler, Kontrolle n=6 und inokulierten Pflanzen n=8; Unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

Veränderungen für die Transpirationsrate wurden bereits 8 Tage nach Inokulation für die zweifach inokulierten Pflanzen deutlich. Die einseitige Infektion zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf diese physiologischen Parameter (Abb. 2.2 D).

2.2.2 Quantifizierung der *P. citricola*-DNA

Des Weiteren wurde im Anschluss an den Infektionsversuch der *P. citricola*-DNA-Gehalt in den „split-Wurzeln“ mittels qPCR quantifiziert. Die Abbildung 2.3 zeigt die Menge an *P. citricola*-DNA bei einseitig und zweiseitig inokulierten Wurzeln der Buchensämlinge.

Die Pflanzenwurzeln, welche einseitig und zweiseitig inokuliert wurden, wiesen eine statistisch nicht unterschiedliche Menge an DNA des Pathogens auf. Der nichtinfizierte Wurzelteil der einseitig inokulierten Pflanzen wies dagegen keinen Pathogenbefall auf.

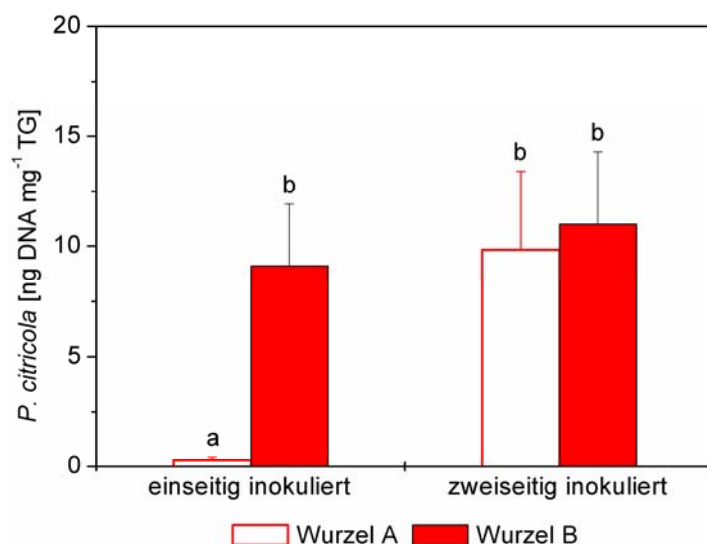


Abbildung 2.3: Menge an *P. citricola*-DNA bei einseitig und zweiseitig inokulierten Wurzeln von Buchensämlingen in einem Split-root-System. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=8$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

2.2.3 Symptomausprägung an Wurzeln

11Tage nach der Inokulation konnten Nekrosen an den Wurzeln festgestellt werden. Dabei zeigten sich die stärksten Symptome im Bereich direkt unterhalb des Wasserstandes (s. Abb. 2.4 B).

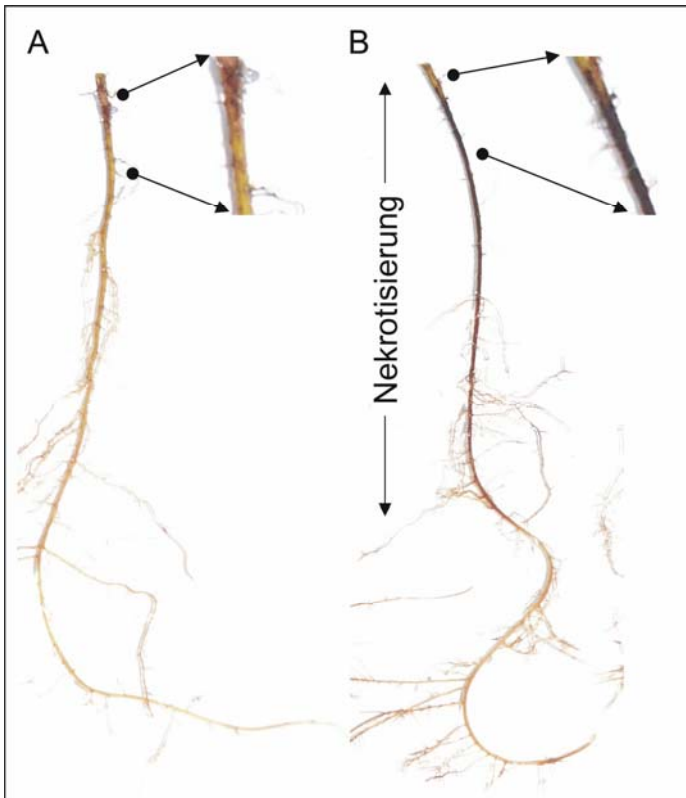


Abbildung 2.4: Einseitig inokulierte Wurzeln von Buchensämlingen in einem Split-root-System. (A) nicht inokulierte Wurzel; (B) inokulierte Wurzel.

2.2.4 Korrelation der Photosynthese und Menge an *P. citricola*

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Photosynthese und der Menge des Pathogens in den einseitig und zweiseitig inokulierten Wurzeln ableiten zu können, wurde eine Korrelation der Werte dargestellt.

Pflanzen, die einseitig mit *P. citricola* inokuliert wurden, zeigten keinen Zusammenhang zwischen dem Gehalt des Pathogens und der Reduktion der Photosynthese (s. Abb. 2.5 A).

Bei den Pflanzen, welche zweiseitig mit *P. citricola* inokuliert wurden, konnte eine negative Korrelation der Netto-CO₂-Aufnahmerate und der Menge an *P. citricola*-DNA in der Wurzel festgestellt werden. Dabei waren ca. 50 ng DNA mg⁻¹ Trockengewicht ausreichend, um die Assimilation der Pflanze fast vollständig zu reduzieren (s. Abb. 2.5 B).

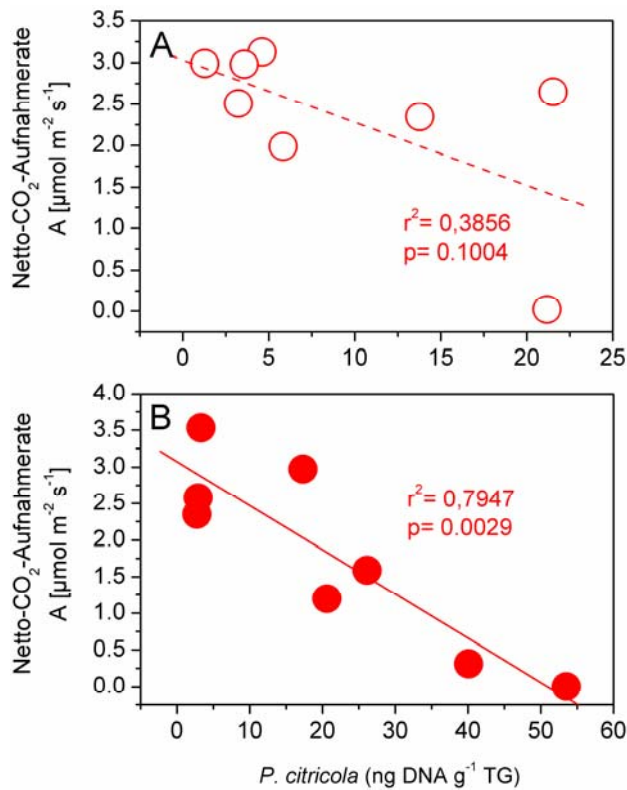


Abbildung 2.5: Netto-CO₂-Aufnahmerate in Abhängigkeit von der Menge an *P. citricola*-DNA in Wurzeln von Buchensämlingen in einem Split-root-System.

(A) einseitig inokulierten Wurzeln; (B) zweiseitig inokulierten Wurzeln. Jeder Punkt entspricht der Summe an *P. citricola*-DNA des gesamten Wurzelsystems bzw. dem Mittelwert von 20 Messungen pro Blatt der Netto-CO₂-Aufnahmerate; pro Sämling wurden zwei Blätter gemessen, $n=8$.

2.2.5 Einfluss der Infektion auf den Zuckergehalt

Um den Einfluss einer *P. citricola*- Infektion auf den Kohlenhydrat- Haushalt der Wurzel abschätzen zu können, wurde der Gehalt an löslichen Zuckern bestimmt. Die Gehalte an Saccharose, Glucose, Fructose und der Gesamtzuckergehalt nach Inokulation sind in Abbildung 2.6 dargestellt.

Bei einseitiger und zweiseitiger Inokulation nahm die Konzentration an Saccharose in beiden Wurzelteilen, im Verhältnis zur Kontrolle gleich ab. Bei zweiseitiger Inokulation waren die Konzentrationen an Saccharose deutlich niedriger im Vergleich zur Kontrolle und den einseitig inokulierten Wurzeln (s. Abb. 2.6 A). Die Gehalte für Glucose und Fructose zeigten einen Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen. Auffällig ist der signifikante Anstieg an Glucose und Fructose der nicht infizierten Seite von einseitig inokulierten Wurzeln im Verhältnis zur Kontrolle (s. Abb. 2.6 B und C). Das Pathogen zeigte auf die Summe der löslichen Zucker keinen signifikanten Einfluss im Vergleich zur Kontrolle (s. Abb. 2.6 D).

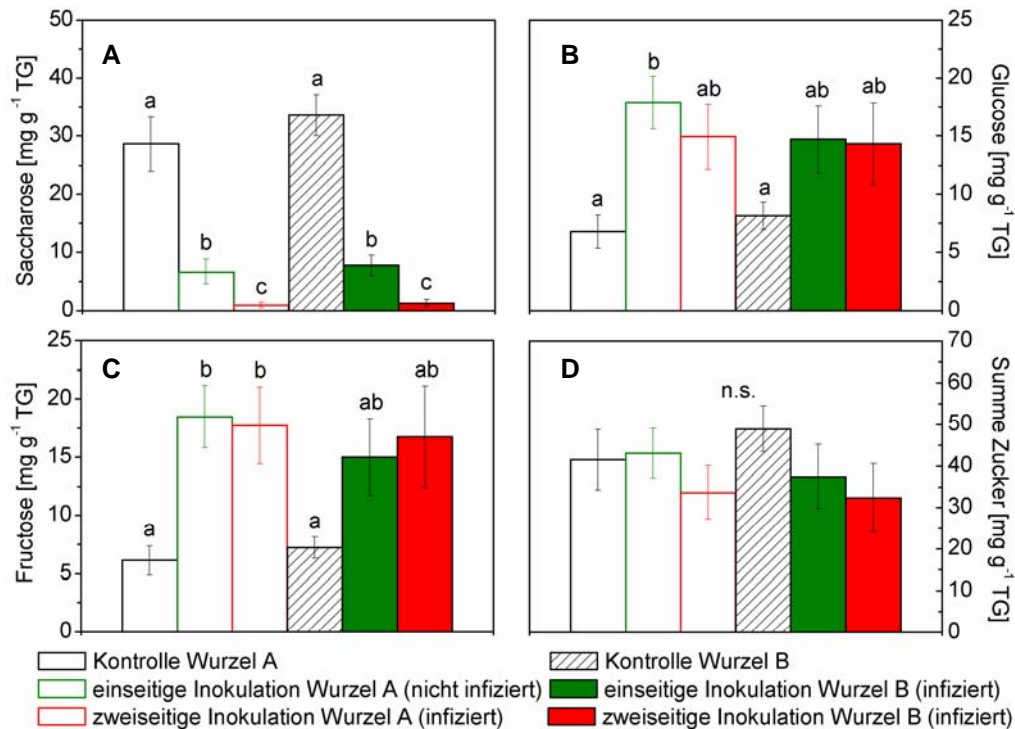


Abbildung 2.6: Zuckergehalt in der Wurzel von Buchensämlingen ohne bzw. mit *P. citricola* in einem Split-root-System. Mittelwerte \pm Standardfehler, Kontrolle $n=6$ und inokulierten Pflanzen $n=8$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

2.2.6 Korrelation der Zuckergehalte mit der Menge an *P. citricola*

Um einen möglichen Zusammenhang einer *P. citricola* Infektion auf die Konzentration der löslichen Zucker in der Wurzel darzustellen, wurde die Menge des Pathogens mit den einzelnen Zuckerarten korreliert. Sowohl die Gesamtsumme der löslichen Zucker, als auch die Gehalte an Saccharose, Glucose und Fructose wiesen eine signifikante negative Korrelation mit der Menge an *Phytophthora*-DNA auf. Sowohl bei einseitig als auch zweiseitig inokulierten Pflanzen zeigte sich bei einer Zunahme des Pathogens auf ca. 20 ng bzw. 50 ng DNA mg⁻¹ Trockengewicht eine Abnahme aller löslichen Zucker auf nahezu Null (s. Abb. 2.7 und 2.8).

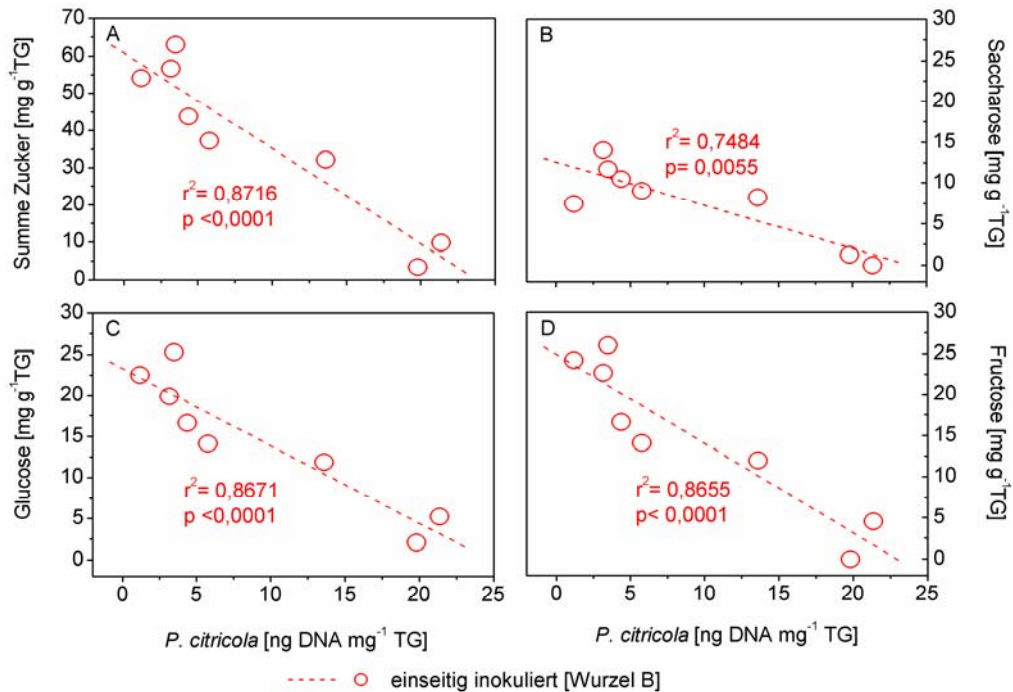


Abbildung 2.7: Zuckergehalt bei einseitig inokulierten Wurzeln (Wurzel B) von Buchensämlingen in einem Split-root-System in Abhängigkeit von der Menge an *P. citricola*-DNA: (A) Summe Zucker, (B) Saccharose, (C) Glucose, (D) Fructose, $n=8$. Die Korrelationen sind zweiseitig auf dem Niveau von $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$ signifikant.

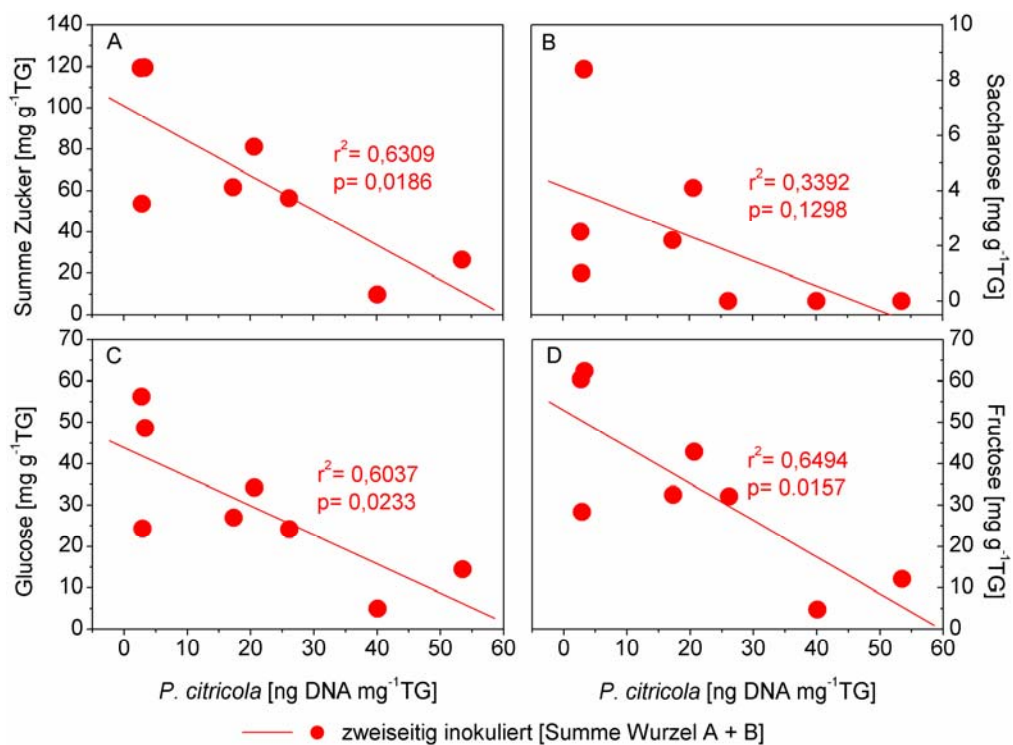


Abbildung 2.8: Zuckergehalt bei zweiseitig inokulierten Wurzeln von Buchensämlingen in einem Split-root-System in Abhängigkeit von der Menge an *P. citricola*-DNA: (A) Summe Zucker, (B) Saccharose, (C) Glucose, (D) Fructose, $n=8$.

Die Korrelationen sind zweiseitig auf dem Niveau von $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$ signifikant.

2.3 Einfluss des Wasserstandes auf die Infektion von Buchensämlingen durch *P. citricola*

2.3.1 Einfluss des Wasserstandes auf das Infektionsausmaß

Auf Grund von Freilanduntersuchungen wurde angenommen, dass *P. citricola* zunächst und bevorzugt Feinwurzeln adulter Bäume infiziert. Im Laborversuch, bei dem ein Sämlings-Testansatz verwendet wurde, zeigte sich jedoch, dass ein massiver Befall der oberen Hauptwurzel erfolgt, sogar ein Einwachsen in das Hypokotyl konnte mittels qPCR nachgewiesen werden. Seitenwurzeln wiesen dagegen nur eine geringe Infektion auf.

Dieser Befund warf die Frage auf, in wie weit die Infektionsbedingungen - vor allem der Wasserstand und die Inokulumdichte - im Labor - Testansatz den Infektionsverlauf beeinflussen. Um diese Frage klären zu können, wurde ein Infektionsversuch mit unterschiedlichem Wasserstand in Erlenmeyerkolben durchgeführt (s. II. 10.2.2).

In Abbildung 2.9 ist deutlich zu erkennen, dass ein massives Einwachsen von *Phytophthora* in das Hypokotyl hauptsächlich bei einem Wasserstand am Wurzelhals auftrat, wohingegen der Befall der übrigen Wurzelsegmente tendenziell niedriger war. Die Pflanzen mit niedrigerem Wasserstand wiesen nach Infektion einen geringeren Befall durch *P. citricola* im Hypokotyl auf.

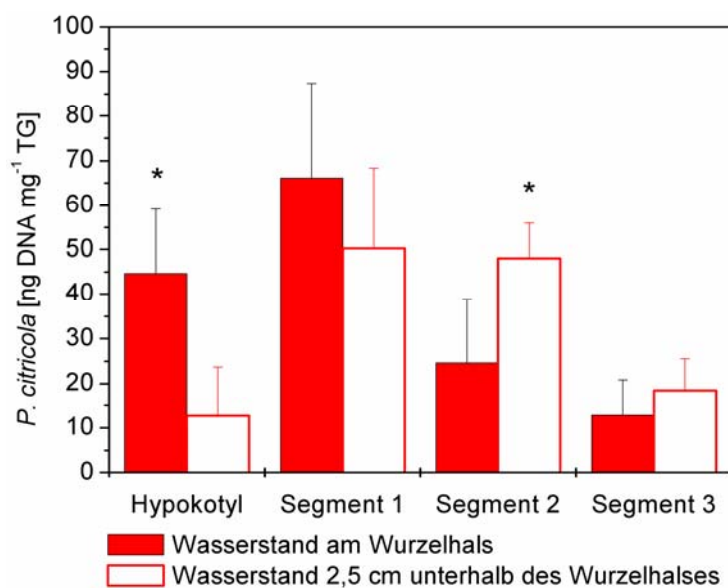


Abbildung 2.9: Menge an *P. citricola*-DNA im Hypokotyl und in den Wurzelsegmenten von inokulierten Buchensämlingen bei unterschiedlichen Wasserständen. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=10$; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Behandlungen nach einem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$).

2.3.2 Einfluss des Wasserstandes auf die Photosynthese, Wasseraufnahme und Wasserpotential infizierter Buchensämlinge

Auf physiologischer Ebene wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen der Inokulation und den Wasserständen festgestellt. Der Infektionseffekt ist jedoch signifikant im Vergleich zur Kontrollpflanzen an Pflanzen, die mit niedrigerem Wasserstand inokuliert wurden, vorhanden. Abbildung 2.10 zeigt, dass eine Reduktion der CO₂-Aufnahmerate (s. Abb. 2.10 A), der Wasseraufnahme (s. Abb. 2.10 B) und des Wasserpotentials festgestellt werden konnte (s. Abb. 2.10 D). Die Chlorophyll-Fluoreszenz der inokulierten Sämlinge zeigte jedoch im Vergleich zu den Kontrollpflanzen keine Beeinträchtigung (s. Abb. 2.10 C).

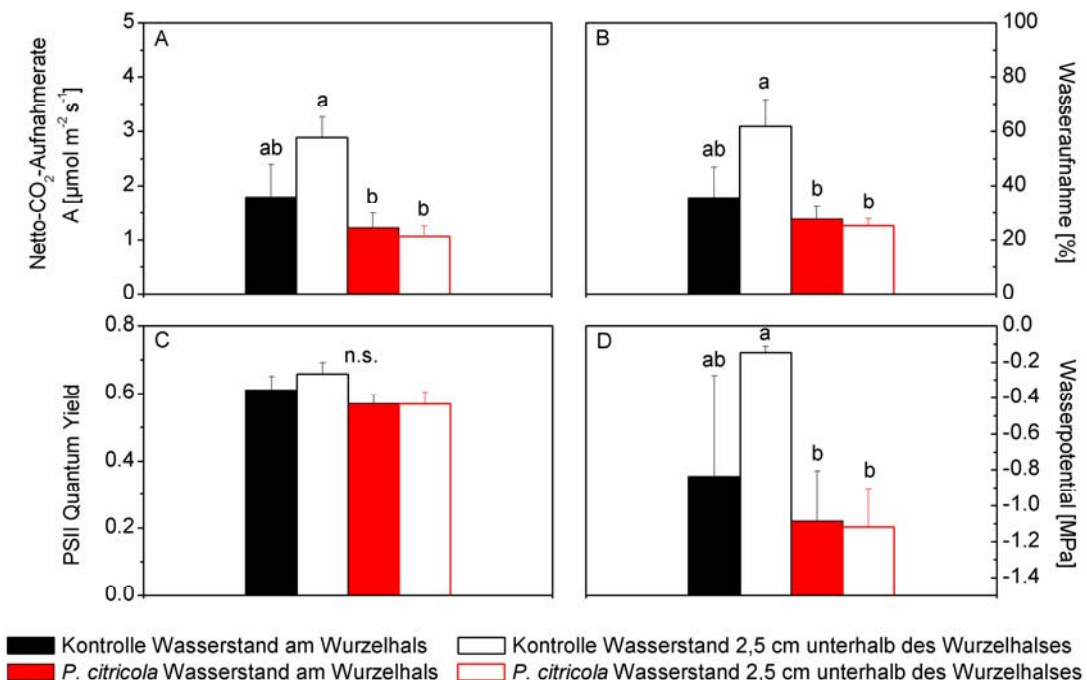


Abbildung 2.10: Einfluss der Inokulation mit *P. citricola* auf die Physiologie von Buchensämlingen bei unterschiedlichen Wasserständen zum Erntezeitpunkt: (A) Netto-CO₂-Aufnahmerate, (B) Wasseraufnahme, (C) Quantenausbeute des Photosystems II, und (D) Wasserpotential; Ernte der inokulierten Pflanzen nach Reduktion der Wasseraufnahme um 60 %; Mittelwerte \pm Standardfehler, Kontrolle $n=5$ und inokulierten Pflanzen $n=10$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

2.4 Einfluss der Inokulumsdichte auf die Infektion von Buchensämlingen durch *P. citricola*

2.4.1 Einfluss der Inokulumsdichte auf die Wasseraufnahme

Um den Einfluss der Inokulumsdichte auf die Infektion zu untersuchen, wurde eine Zoosporen-Konzentrationsreihe von *P. citricola* angesetzt (s. II. 10.2.3).

In Abbildung 2.11 ist die konzentrationsabhängige Abnahme der Wasseraufnahme von Buchensämlingen dargestellt, die mit verschiedenen Zoosporenkonzentrationen inokuliert wurden. Es zeigte sich, dass für die Hemmung der Wasseraufnahme eine Konzentrationsschwelle erreicht werden muss. Eine Konzentration von 125 Zoosporen mL^{-1} ist dafür nicht ausreichend, wohingegen eine Konzentration von $12,5 \cdot 10^3$ Zoosporen mL^{-1} bereits zu einer sichtbaren Hemmung der Wasseraufnahme führt. Erst bei einer Konzentration von $12,5 \cdot 10^4$ mL^{-1} ist die Wasseraufnahme ab Tag 7 nach Infektionsbeginn deutlich gehemmt, in deren Folge dann irreversible Welkesymptome auftraten.

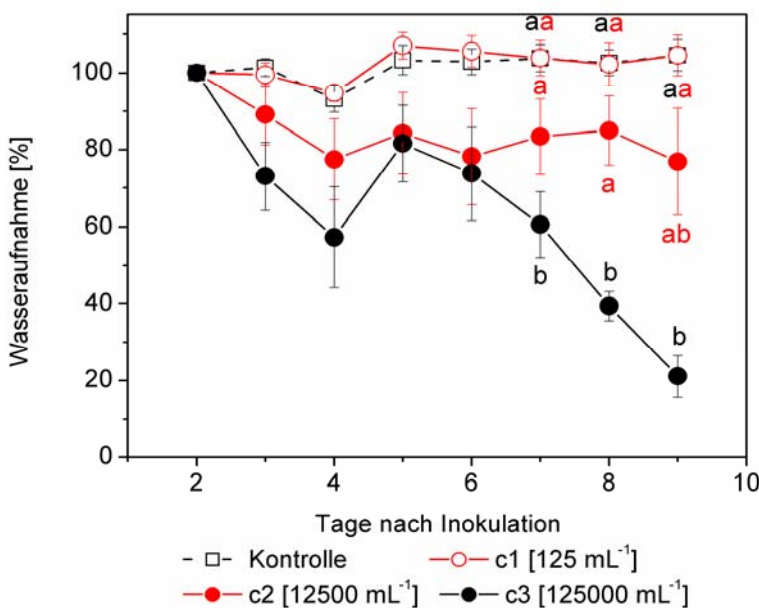


Abbildung 2.11: Hemmung der Wasseraufnahme bei Buchensämlingen nach Inokulation mit *P. citricola* in unterschiedlichen Zoosporenkonzentrationen: [c1] 125, [c2] 12500, [c3] 125000 Zoosporen mL^{-1} ; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=5$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

Die quantitative PCR - Analyse bestätigt diese Korrelation zwischen Infektionsstärke (ng *Phytophthora* - DNA pro mg Trockensubstanz) und Hemmung der Wasseraufnahme. Der Vergleich der Wachstumsdaten für *P. citricola* mit der Hemmung der Wasseraufnahme durch eine Zoosporenkonzentration von $12,5 \cdot 10^3$ zeigt deutlich, dass eine lineare Korrelation besteht und eine durch Extrapolation der Daten ($y = 129,6404 - 2,9677x$) empirisch bestimmte Schwellenkonzentration von 43,6 ng *P. citricola*-DNA pro Milligramm Wurzeltrockensubstanz bereits ausreichte, den Xylemwasserfluss zu 100 % zu blockieren. Der mit Rot markierte Bereich in welchen die mit *P. citricola* inokulierten Buchensämlinge irreversible Welkesymptome zeigten (s. Abb. 2.12).

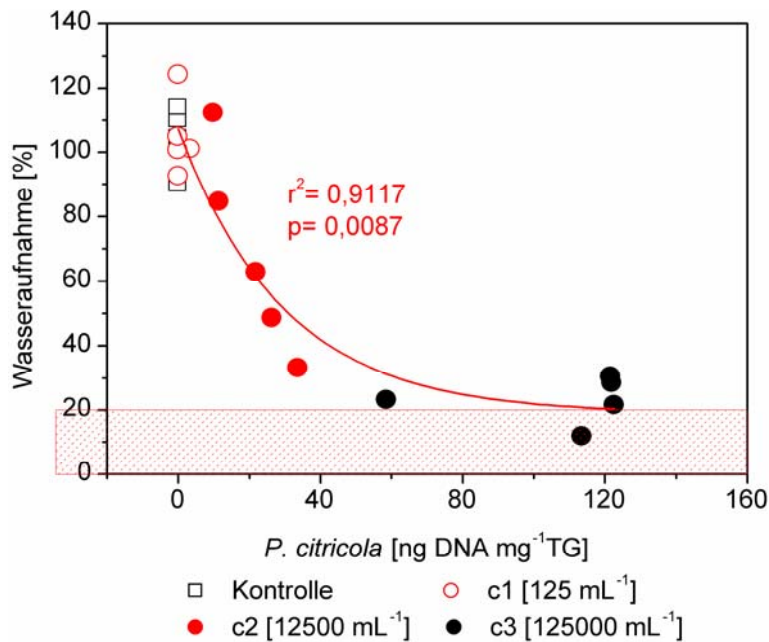


Abbildung 2.12: Hemmung der Wasseraufnahme bei inokulierten Buchensämlingen in Abhängigkeit der Menge an *P. citricola*-DNA: [c1] 125, [c2] 12500, [c3] 125000 Zoosporen mL⁻¹, n=5. Die Korrelation ist zweiseitig auf dem Niveau von p ≤ 0,01 signifikant.

2.4.2 Einfluss der Inokulumdichte von *P. citricola* auf die Gehalte an löslichen Zuckern in Wurzeln und Blättern infizierter Buchen

Um den Einfluss der Inokulumdichte von *P. citricola* auf die Gehalte an Saccharose, Glucose und Fructose in Wurzeln und Blättern infizierter Buchen zu untersuchen, wurden diese mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt (s. II. 5.2.2.2).

Pflanzen, die mit $12,5 \cdot 10^4$ Zoosporen mL⁻¹ inokuliert wurden, zeigten eine signifikante Reduktion aller gemessenen löslichen Zucker in der Wurzel im Vergleich zu Kontrollen und den Pflanzen, die mit der niedrigsten Zoosporen Konzentration inokuliert wurden (s. Abb. 2.13 A). Der Effekt, den die mittlere Zoosporenkonzentration ($12,5 \cdot 10^3$ mL⁻¹) auf die löslichen Zucker Saccharose, Glucose und Fructose aufwies, war nicht signifikant von der niedrigsten oder höchsten Konzentration zu unterscheiden, zeigte aber eindeutig den konzentrationsabhängigen Trend der Zuckergehalte von der Inokulumdichte in der Wurzel. In Blättern inokulierter Pflanzen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied für die Gehalte löslicher Zucker im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (s. Abb. 2.13 B).

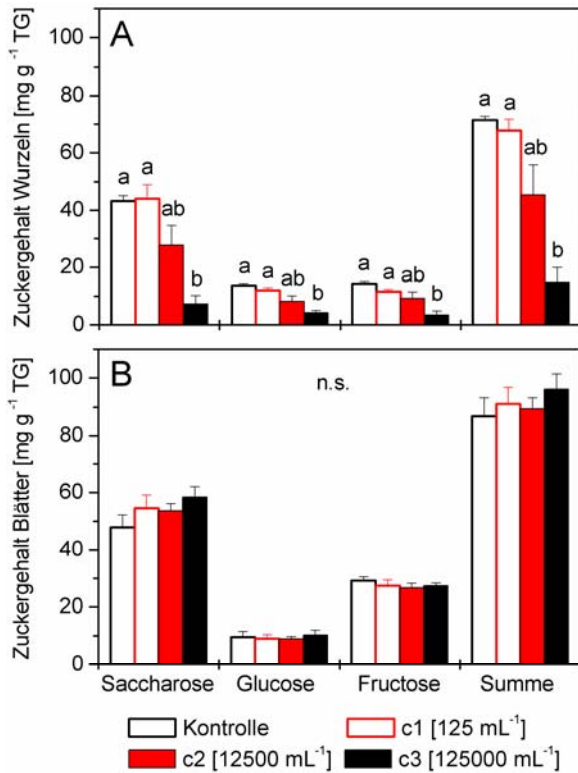


Abbildung 2.13: Zuckergehalte in Wurzeln (A) und Blättern (B) von Buchensämlingen nach Infektion mit unterschiedlichen Zoosporenkonzentrationen: [c1] 125, [c2] 12500, [c3] 125000 Zoosporen mL^{-1} ; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=5$; unterschiedliche Buchstaben zeigen signifikante Unterschiede der Mittelwerte nach Tukey $p \leq 0,05$.

Wie in Abbildung 2.14 zu erkennen ist, bestehen negative Korrelationen zwischen den Zuckergehalten infizierter Wurzeln und der Menge an *Phytophthora*-DNA bzw. Inokulumdichte.

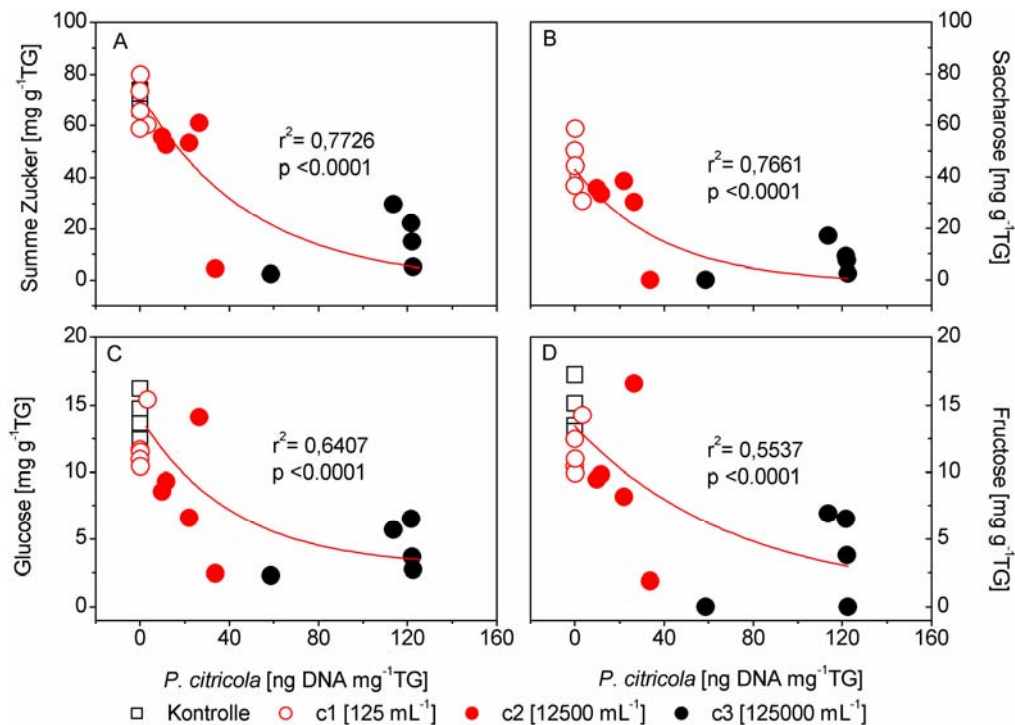


Abbildung 2.14: Wurzelzuckergehalt inokulierter Buchensämlinge in Abhängigkeit von der Menge an *P. citricola*-DNA: (A) Summe Zucker, (B) Saccharose, (C)

Glucose, (D) Fructose; [c1] 125, [c2] 12500, [c3] 125000 Zoosporen mL^{-1} , $n=5$. Die Korrelationen sind zweiseitig auf dem Niveau von $p \leq 0,0001$ signifikant.

2.5 Induktion der Ethylenbiosynthese nach Infektion mit *P. citricola*

Neben physiologischen Parametern wurde sowohl die Ethylenbiosynthese in den Blättern infizierter Buchensämlinge, als auch die Korrelation der Produktion von Ethylen mit dem Ausmaß der Infektion untersucht (s. II. 10.2.4).

Im ersten Versuch wurden Buchensämlingen mit *P. citricola* inokuliert und in einem geschlossenen System untersucht. In diesem konnte festgestellt werden, dass schon 2 Tage nach der Inokulation ein signifikanter Anstieg der Ethylenbildung im Vergleich zu Kontrollpflanzen erfolgte (s. Abb. 2.15 A).

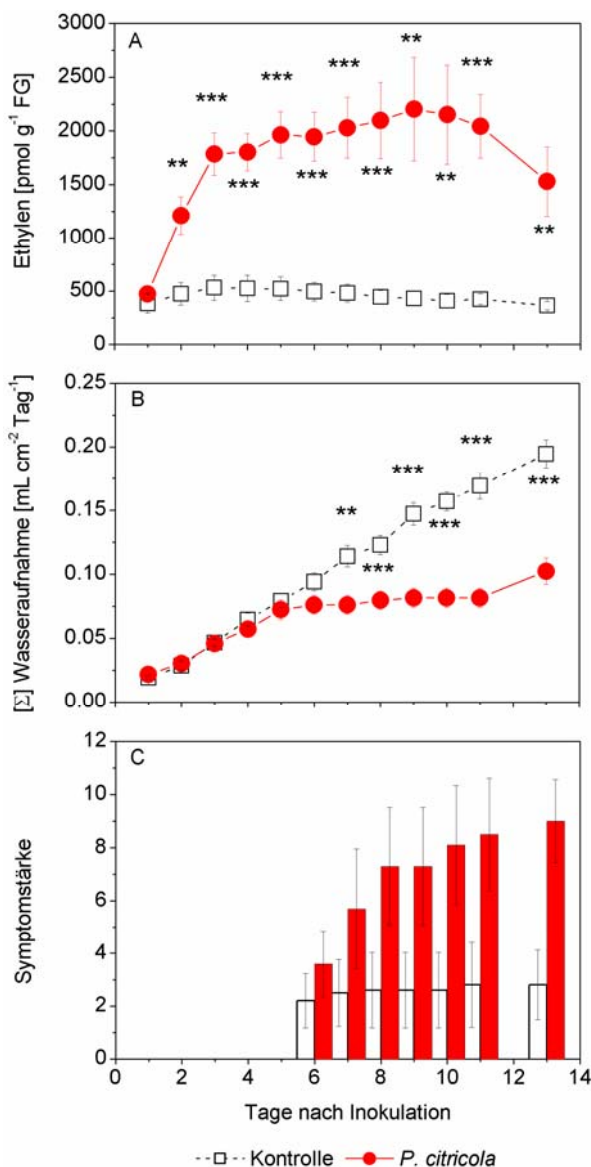


Abbildung 2.15: Einfluss der Inokulation mit *P. citricola* auf die Ethylenbiosynthese und Symptomentwicklung bei Buchensämlingen in einem geschlossenen System: (A) Ethylen, (B) Summe der Wasseraufnahme, (C) Symptomstärke (Bewertungsschema siehe II-10.2.4); Mittelwerte ± Standardfehler, $n=10$; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen nach einem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Das Auftreten leichter Verbräunungen in den Blattadern war eines der ersten Symptome im Blattbereich. Diese Verbräunungen konnten bereits 6 Tage nach der Inokulation festgestellt werden. Die Symptomstärke nahm erwartungsgemäß über den gesamten Versuchsverlauf hinweg zu (s. Abb. 2.15 C). Das Vorkommen von Symptomen ging mit einem signifikanten Rückgang der Wasseraufnahme einher (s. Abb. 2.15 B). 13 Tage nach Inokulation konnte tendenziell ein Rückgang der produzierten Ethylenmengen beobachtet werden. Die Ethylenkonzentration war jedoch im direkten Vergleich zu nicht - inokulierten Pflanzen noch deutlich erhöht (s. Abb. 2.15 A).

Ähnlich wie beim geschlossene System wurde im belüfteten System ein Anstieg der Ethylenkonzentration schon 24 Stunden nach der Inokulation beobachtet. Jedoch war in diesem System eine biphasische Produktion dieses Hormons deutlich zu erkennen. Die beiden Peaks zeigten ein Maximum nach 2 bzw. 6 Tagen bei je ca. 1500 pmol g⁻¹ FG Ethylen, was in etwa die dreifache Menge der von Kontrollpflanzen produzierten Ethylenmenge darstellt (s. Abb. 2.16).

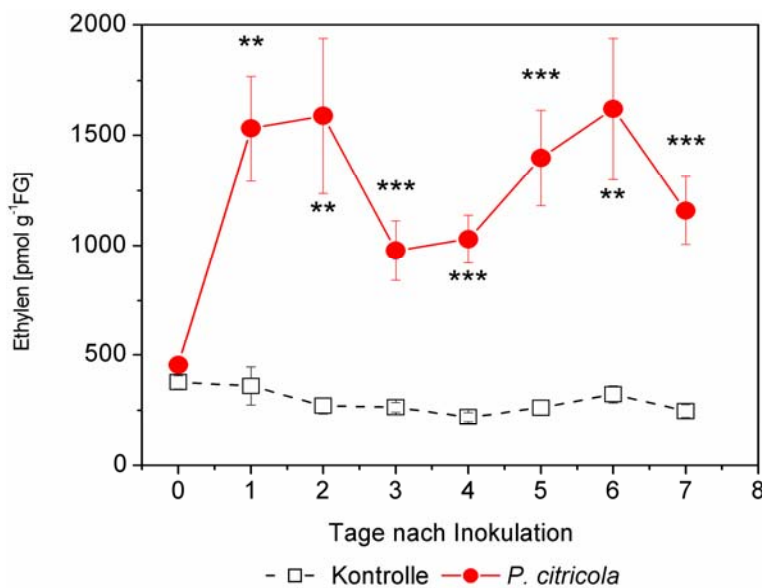


Abbildung 2.16: Einfluss der Inokulation mit *P. citricola* auf die Ethylenbiosynthese bei Buchensämlingen in einem belüfteten System. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=10$; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen nach einem zweiseitigen t-Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

2.6 Elektronenmikroskopische (TEM) Aufnahmen nach Infektion mit *P. citricola*

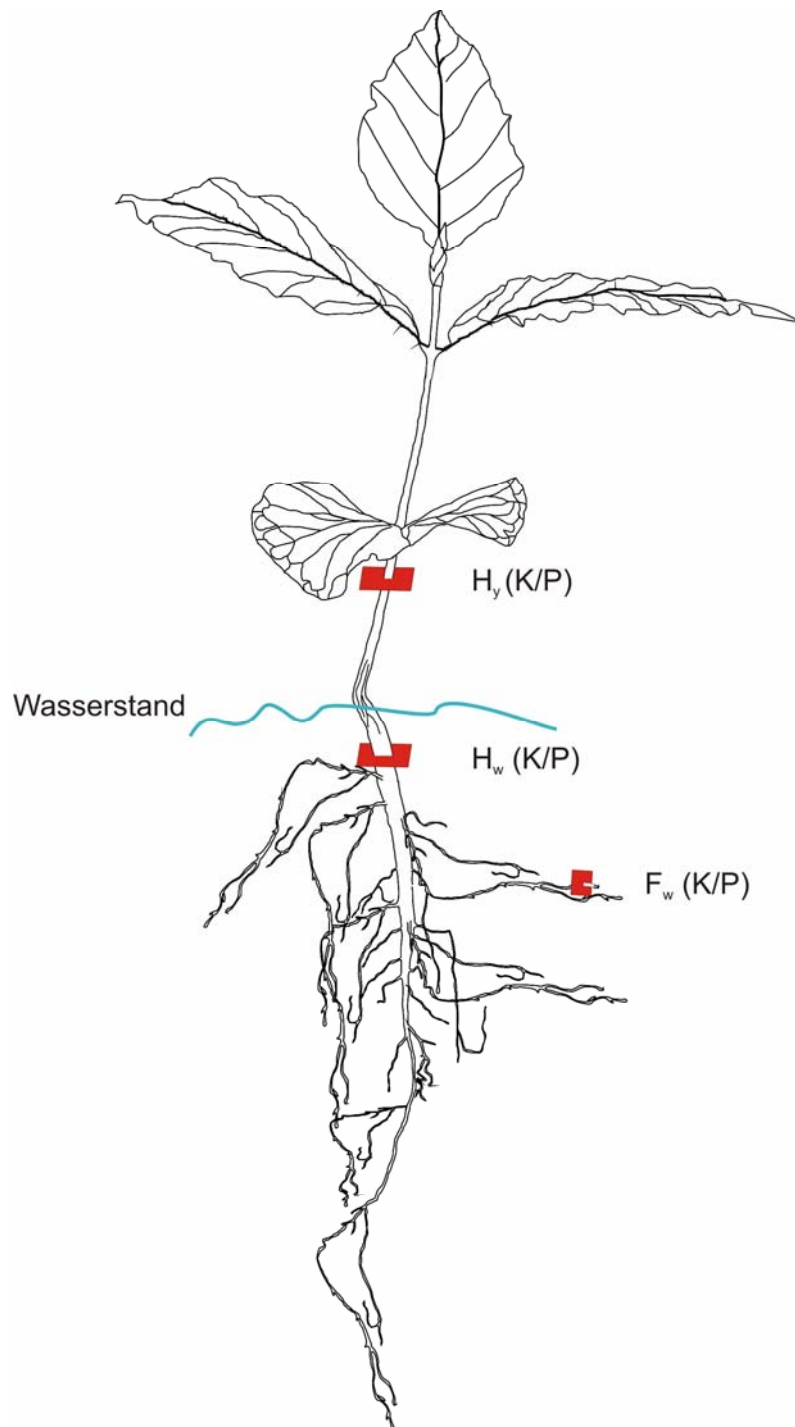


Abbildung 2.17: Bereiche der Probenentnahme für die Elektronenmikroskopie (TEM). (K) Kontrolle, (P) mit *P. citricola* infizierter Buchensämling: Hypokotyl (H_y), Hauptwurzel (H_w) und Feinwurzel (F_w).

Die elektronenmikroskopische (TEM) Untersuchung wurde an einem mit *P. citricola* inokulierten Buchensämling und an einer Kontrollpflanze durchgeführt (s. II. 10.2.5).

Die Proben wurden nach den ersten Welkeerscheinungen am Blattrand, aus unterschiedlichen Bereichen der Pflanze entnommen (s. Abb. 2.17). Beprobte Gewebe aus dem Hypokotyl, den Haupt- und Feinwurzeln (s. Abb. 2.17, rote Markierungen). Die Herstellung der Dauerpräparate und der Aufnahmen erfolgte wie in II. 8.2 beschrieben.

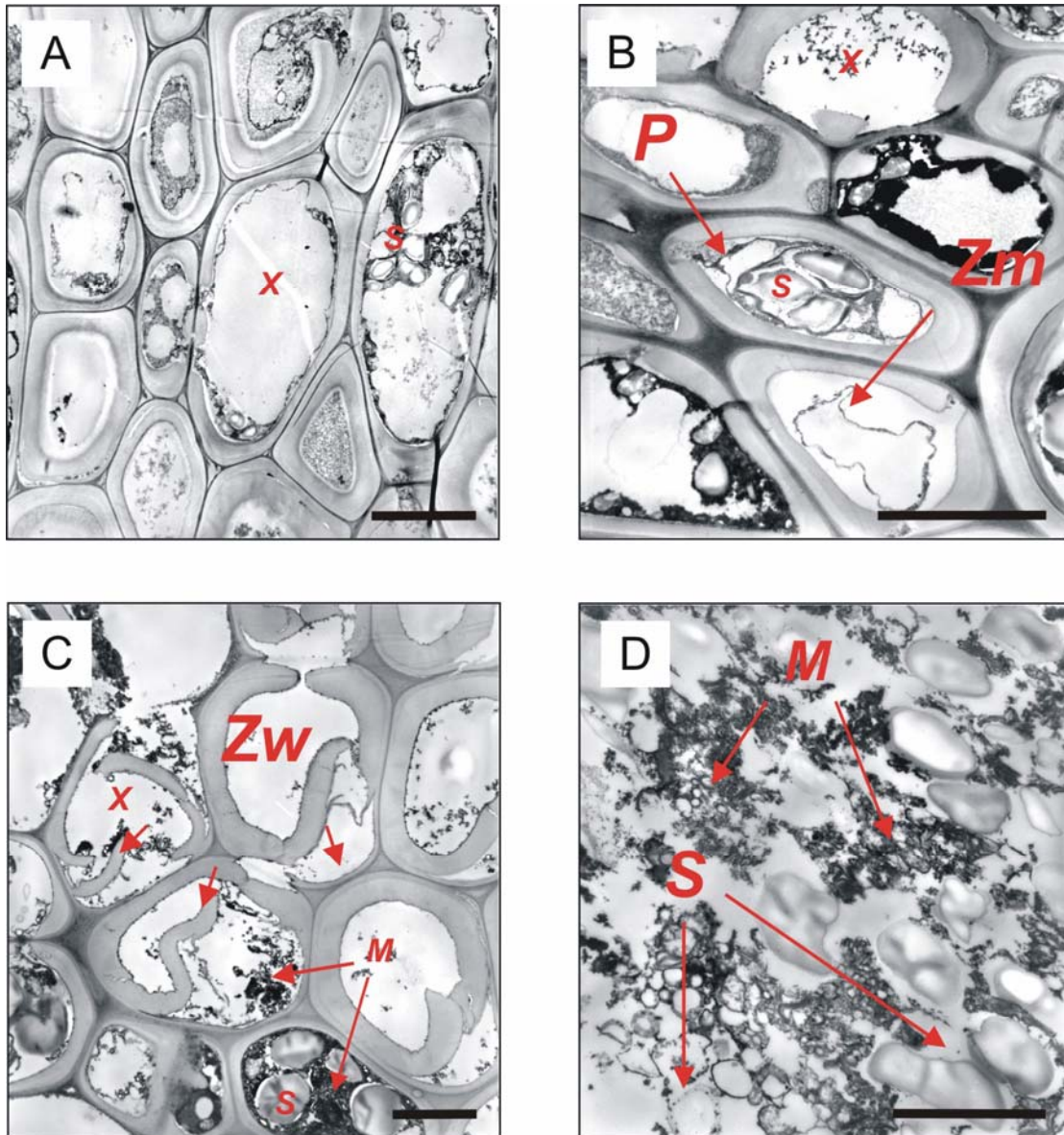


Abbildung 2.18: Aufnahmen aus dem Hypokotyl eines nicht (A/B) und eines mit *P. citricola* infizierten Buchensämlings (C/D). (A) zeigt die Ausdifferenzierung von Xylemelementen (X). Balken=1 µm. (B) weist auf Parenchymzellen (P) mit Stärkekörnern (S) als auch auf die Bildung und Ausdifferenzierung von Xylemelementen mit Plasmolyse der Zellmembran (Zm) hin. Balken=1 µm. (C) weist auf die Auflösung und Auftrennung der Zellwand (Zw) im Xylembereich (X) hin. Balken=0,5 µm. (D) zeigt im Detail das Auftreten von Stärkekörnern (S) begleitet von elektronendichtem Material mit unbekannter Herkunft (M). Balken=0,5 µm.

Aufnahmen aus dem Epikotyl des Kontroll- als auch des infizierten Buchensämlings zeigten im Bereich von Xylem und Phloem, keine Veränderungen. In Abbildung 2.18 A und B ist zu erkennen, dass Kambium, Xylem und Phloem der Kontrollpflanze weder eine Deformation noch eine Ruptur oder ein Auflösen der Zellwand aufwiesen. Nach einer Infektion mit *P. citricola* zeigen sich oftmals Veränderungen der Zellwand, wie es im Xylembereich des Hypokotyls deutlich zu erkennen ist (s. Abb. 2.18 C). In einigen Fällen ist ein vollständiges Auflösen der Primärzellwand und der Mittellamelle zu sehen. Ebenso scheint der Anteil der eingelagerten Stärke in Parenchymzellen infizierter Sämlinge gegenüber der Kontrolle deutlich geringer. Stärkekörner zeigten sich meistens von elektronendichtem Material mit unbekannter Herkunft begleitet (s. Abb. 2.18 D).

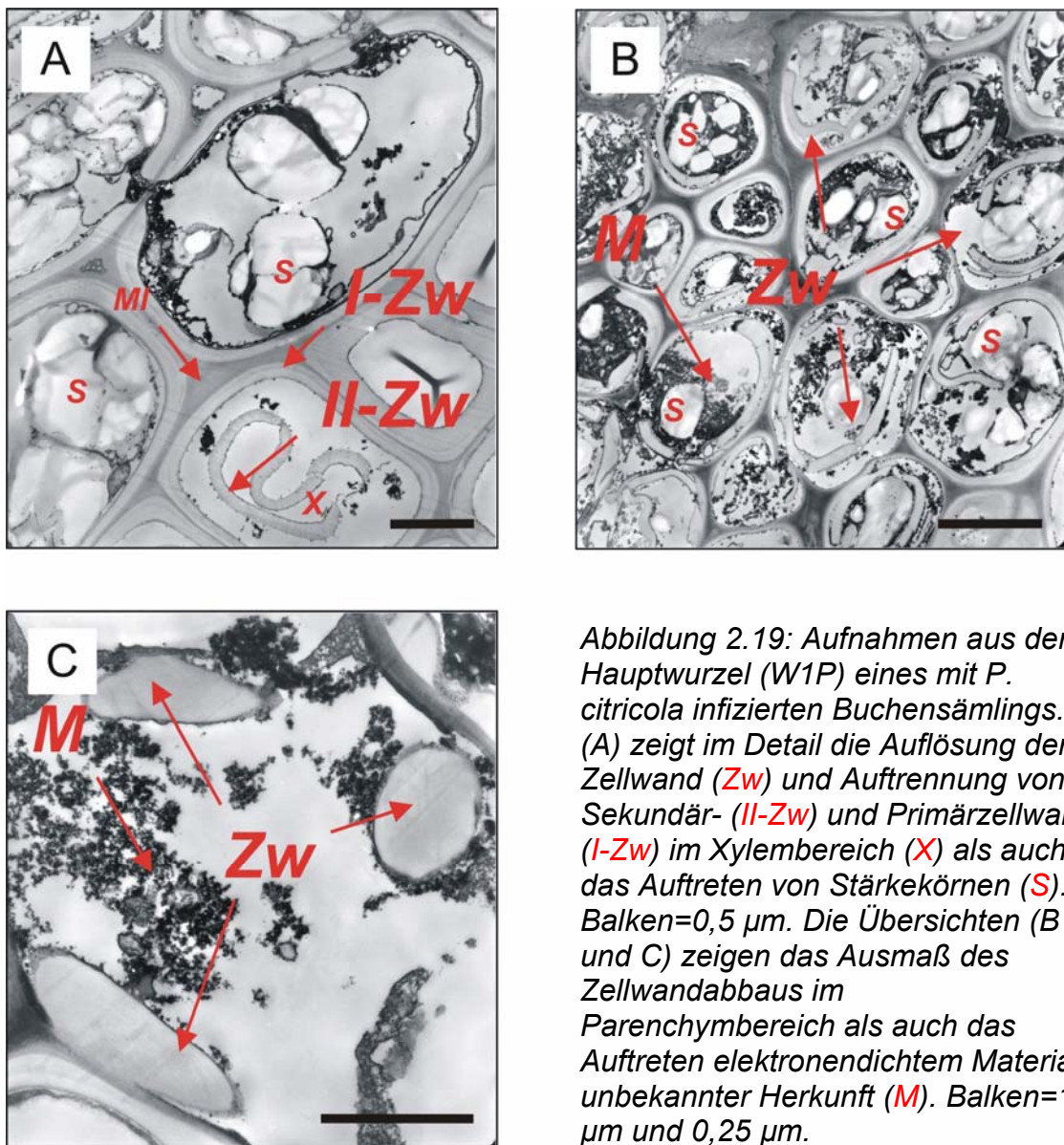


Abbildung 2.19 zeigt Aufnahmen aus der Hauptwurzel einer inokulierten Pflanze. Deutlich zu sehen ist ein Ablösen der Primär- von der Sekundärzellwand des Xylems (s. Abb. 2.19 A) sowie eine partielle Auflösung der Zellwand von Parenchymzellen (s. Abb. 2.19 B). Detailaufnahme zeigt die Auflösung der Zellwand von Parenchymzellen außerdem das gehäufte Auftreten von amorphem Material (s. Abb. 2.19 C).

Die in Abbildung 2.20 dargestellten Gewebebereiche der Feinwurzel einer Kontrollpflanze weisen keine morphologischen Auffälligkeiten auf. In Abbildung 2.21 ist der Querschnitt einer infizierten Feinwurzel dargestellt. Sowohl im Inter- als auch Intrazellulärbereich sind Hyphen von *P. citricola* deutlich zu erkennen. Hinsichtlich einer möglichen Abwehrreaktion der Pflanze wurden keine Barrieren bzw. Ligninablagerungen, die ein Eindringen des Pathogens verhindern könnten, festgestellt. Hier kann ein drastischer Abbau der Zellwand und Mittellamelle im Kambium und in Xylemelementen festgestellt werden.

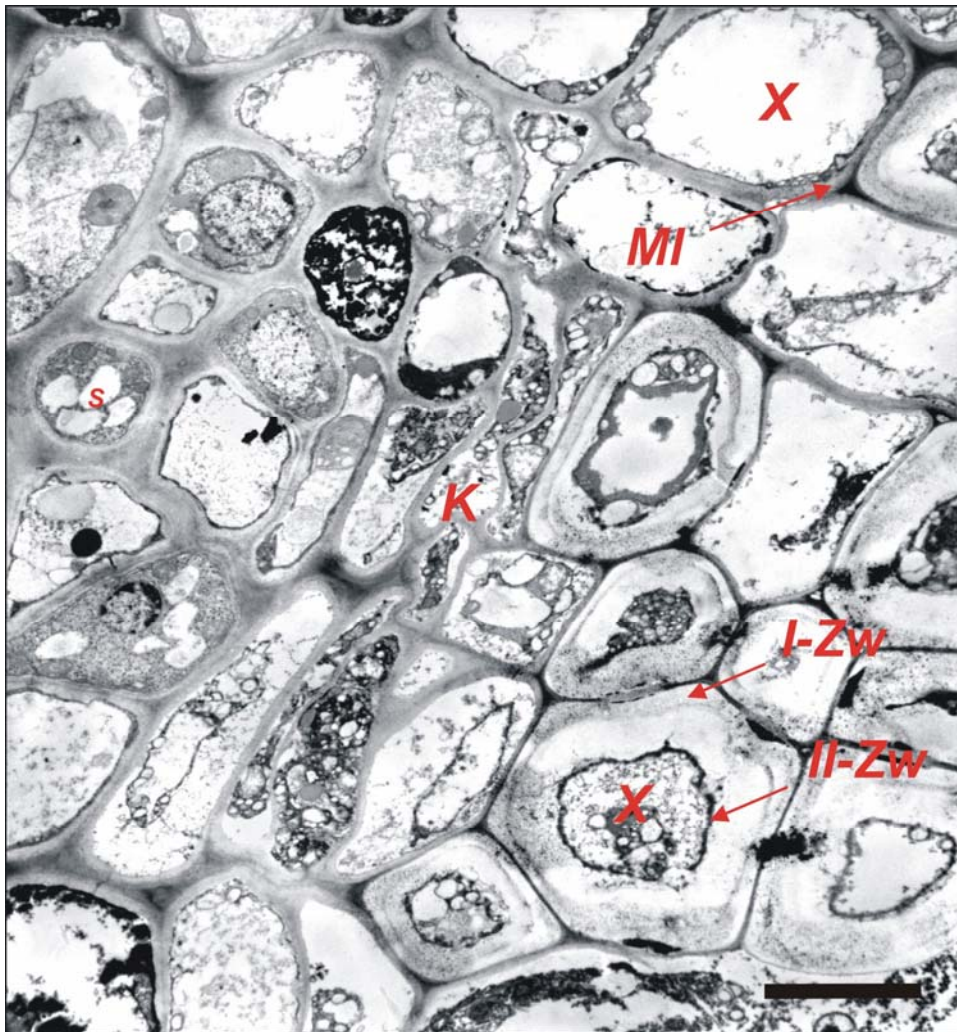


Abbildung 2.20: Aufnahme einer gesunden Feinwurzel eines nicht infizierten Buchensämlings im Querschnitt dargestellt. Balken=1 μ m. Sekundär- (II-Zw) und

Primärzellwand (*I-Zw*), Mittellamelle (*MI*), Kambium (*K*), Stärkekörnern (*S*) und Xylemelementen (*X*).

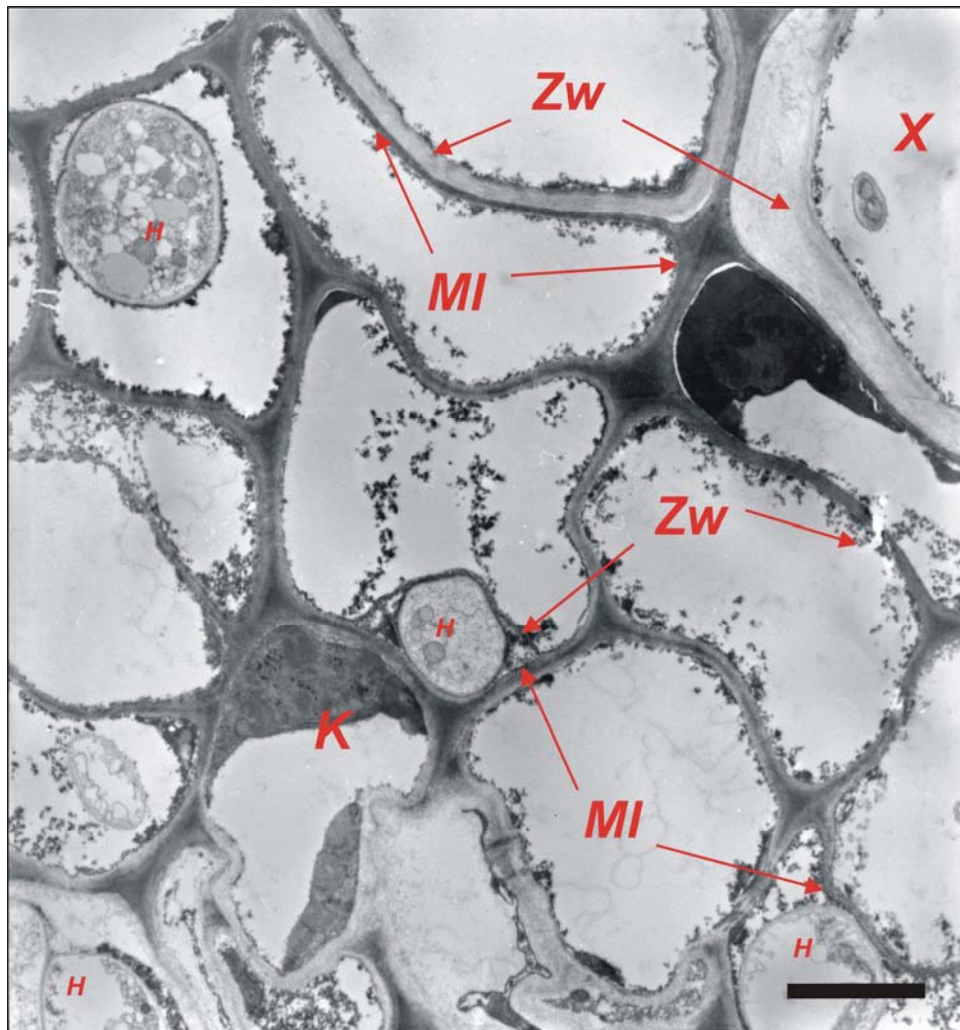


Abbildung 2.21: Aufnahme aus der Feinwurzel eines mit *P. citricola* infizierten Buchesämlings. Übersicht zeigt intra- und interzellulär wachsende Hyphen (*H*) mit Zellen, die deutliche Zellwandveränderungen zeigen. Balken=1 μm . Zellwand (*Zw*), Mittellamelle (*MI*), Kambium (*K*) und Xylemelementen (*X*).

2.7 Infektionsverlauf und Genexpression in Buchenkeimlingen inokuliert mit *P. citricola*

2.7.1 Einfluss von *P. citricola* auf die Physiologie der Buchensämlinge

Um den Einfluss von *P. citricola* auf die Physiologie und anschließende Verknüpfung der Daten mit der Genexpression wichtiger Enzymen des Primär- und Sekundärmetabolismus an inokulierten Buchensämlinge zu untersuchen, wurden diese wie in II. 7.2 und II. 10.2.5 beschrieben durchgeführt.

Die inokulierten Buchensämlinge zeigten eine signifikante Reduktion der gemessenen physiologischen Prozesse (s. Abb. 2.22), ähnlich wie bei bereits zuvor

durchgeführten Versuchen (s. III. 2.1; III. 2.2 und III. 2.3). Abbildung 2.22 A zeigt, dass eine fortschreitende Reduktion der CO_2 -Aufnahmerate ein Tag nach Inokulation erfolgte. 5 Tage nach der Inokulation konnte ein tendenzieller Anstieg der C_i Werte festgestellt werden (s. Abb. 2.22 B). Die stomatäre Leitfähigkeit der inokulierten Sämlinge zeigte eine signifikante Reduktion im Vergleich zu Kontrollpflanzen ab 3 Tage nach Infektion (s. Abb. 2.22 C). Die Transpirationsrate hingegen lag bereits 2 Tage signifikant unter den Kontrollwerten (s. Abb. 2.22 D).

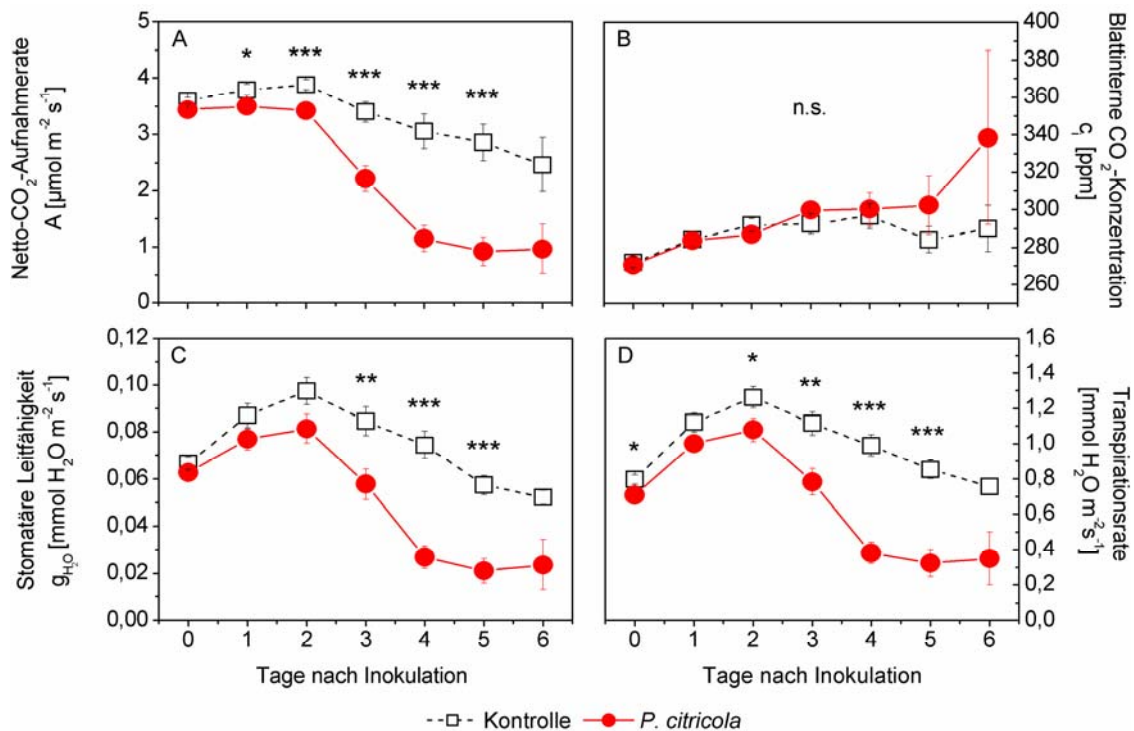


Abbildung 2.22: Einfluss von *P. citricola* auf die Photosyntheseparameter von inokulierten Buchensämlingen: (A) Netto- CO_2 -Aufnahmerate, (B) Blattinterne CO_2 -Konzentration, (C) stomatäre Leitfähigkeit und (D) Transpirationsrate; Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=5$; Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen nach einem zweiseitigen t -Test für unabhängige Stichproben (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Um das Ausmaß der Infektion während des Krankheitsverlaufs zu ermitteln, wurden die Mengen an *P. citricola* in Buchenwurzeln zu unterschiedlichen Zeitabständen quantifiziert (s. II. 9.5 und II. 10.2.5).

Die Abbildung 2.23 zeigt die Menge an *P. citricola*-DNA bei inokulierten Buchensämlingen pro Erntezeitpunkt. Deutlich erkennbar ist, dass der Pathogengehalt während des gesamten untersuchten Zeitraumes unter 25 ng DNA pro Wurzel-Trockengewicht blieb.

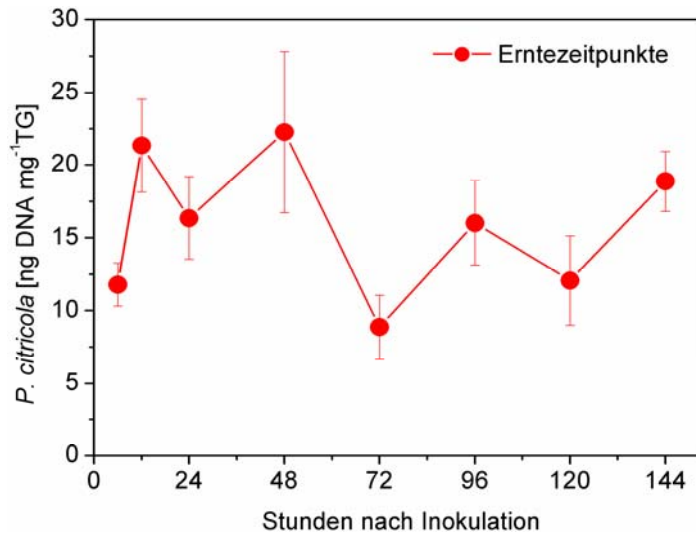


Abbildung 2.23: Menge an *P. citricola*-DNA bei inokulierten Buchensämlingen pro Erntezeitpunkt. Mittelwerte \pm Standardfehler, $n=5$.

Mit dem Ziel, die Unterschiede in der Blattphysiologie zwischen inokulierten und nicht inokulierten Buchensämlinge zu veranschaulichen, wurde die Assimilationsrate gegen die Transpiration zu verschiedenen Zeitpunkten aufgetragen. Die Ausgleichsgerade entspricht einer visuellen Darstellung des Wassernutzungskoeffizienten (WUE). Abbildung 2.24 zeigt die WUE der Kontrollpflanzen im Vergleich zu *P. citricola* infizierte Buchensämlinge über einen Zeitraum von 144 Stunden. Es wird deutlich, dass die WUE der Kontroll-Sämlinge zeitabhängig stark zunahm. Eine ähnliche, jedoch weit schwächer ausgeprägte Reaktion zeigten auch infizierte Sämlinge.

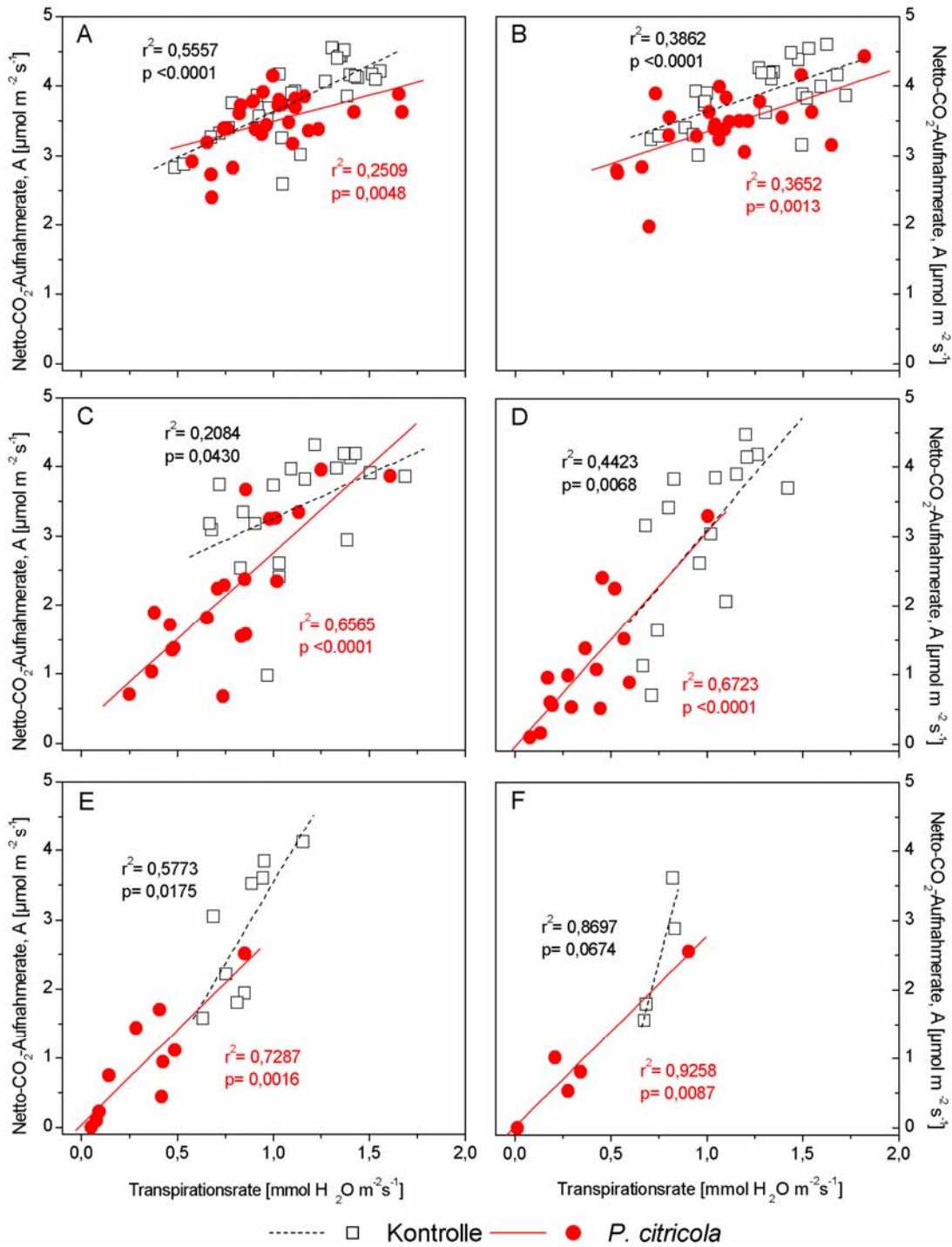


Abbildung 2.24: Wassernutzungskoeffizient von Buchensämlingen inokuliert mit *P. citricola*. (A, B, C, D, E, F) deuten auf 24, 48, 72, 96, 120 und 144 Stunden nach Inokulation. Die Korrelationen sind zweiseitig auf dem Niveau von $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ und $p \leq 0,001$ signifikant.

2.7.2 Relative Genexpression in Blättern und Wurzeln infizierter Buchensämlinge

Um den Einfluss der Infektion durch *P. citricola* auf die Genexpression von inokulierten Buchensämlingen zu untersuchen, wurden diese in unterschiedlichen Zeitpunkten abgeerntet (s. II. 12.2.5) und die Expression wichtiger Enzyme des primär und sekundär Metabolismus untersucht (s. II. 10.4).

Ein direkter Vergleich der Induktions- oder Repressionsverläufe von inokulierten Buchensämlingen und Kontrollpflanzen zeigte unterschiedliche Antworten im Verlauf und im Ausmaß der Expression von analysierten Genen des Blatt- und Wurzelbereichs.

In den Blättern der inokulierten Buchensämlinge wurde keine Veränderung des Expressionslevels für das RbcL-Gen im Verlauf der Infektion beobachtet (s. Abb. 2.25 A). Das RbcS-Gen zeigte dagegen eine signifikante Repression 48 und 144 Stunden nach Inokulation. Eine tendenzielle Repression dieses Gens konnte über den gesamten Versuchszeitraum hinweg beobachtet werden (s. Abb. 2.25 B). Das Aquaporin-Gen war dagegen den überwiegenden Teil des Infektionsversuchs deutlich hoch reguliert. Die auffälligste Induktion wurde dabei 72 Stunden nach Inokulation detektiert (s. Abb. 2.25 C). Osmotin zeigte eine signifikante Induktion der Genexpression 24 Stunden nach der Inokulation und einen tendenziellen Induktionsverlauf bis 72 Stunden nach der Inokulation (s. Abb. 2.25 D). Für das COMT-Gen wurde eine signifikante Repression nach 6 und 144 Stunden nach der Inokulation festgestellt (s. Abb. 2.25 E). Für die an der Ethylenbildung beteiligten Gene ACO und ACS1 wurde eine signifikante Induktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten beobachtet: Es ist zu erkennen, dass das ACO-Gen eine deutliche Induktion 48 und 72 Stunden nach der Inokulation aufweist. Das ACS1-Gen dagegen zeigt eine signifikante Induktion ab 48 Stunden nach der Inokulation bis zum Ende des Versuches. Das ACS2-Gen zeigte dagegen keine signifikante Veränderung des relativen Expressionslevels in der untersuchte Zeit. Hier konnte jedoch festgestellt werden, dass ACS2 ein Maximum bei 24 Stunden nach der Inokulation zeigte während ACS1 in der gleichen Zeit ein lokales Minimum aufwies. (s. Abb. 2.25 F, G und H)

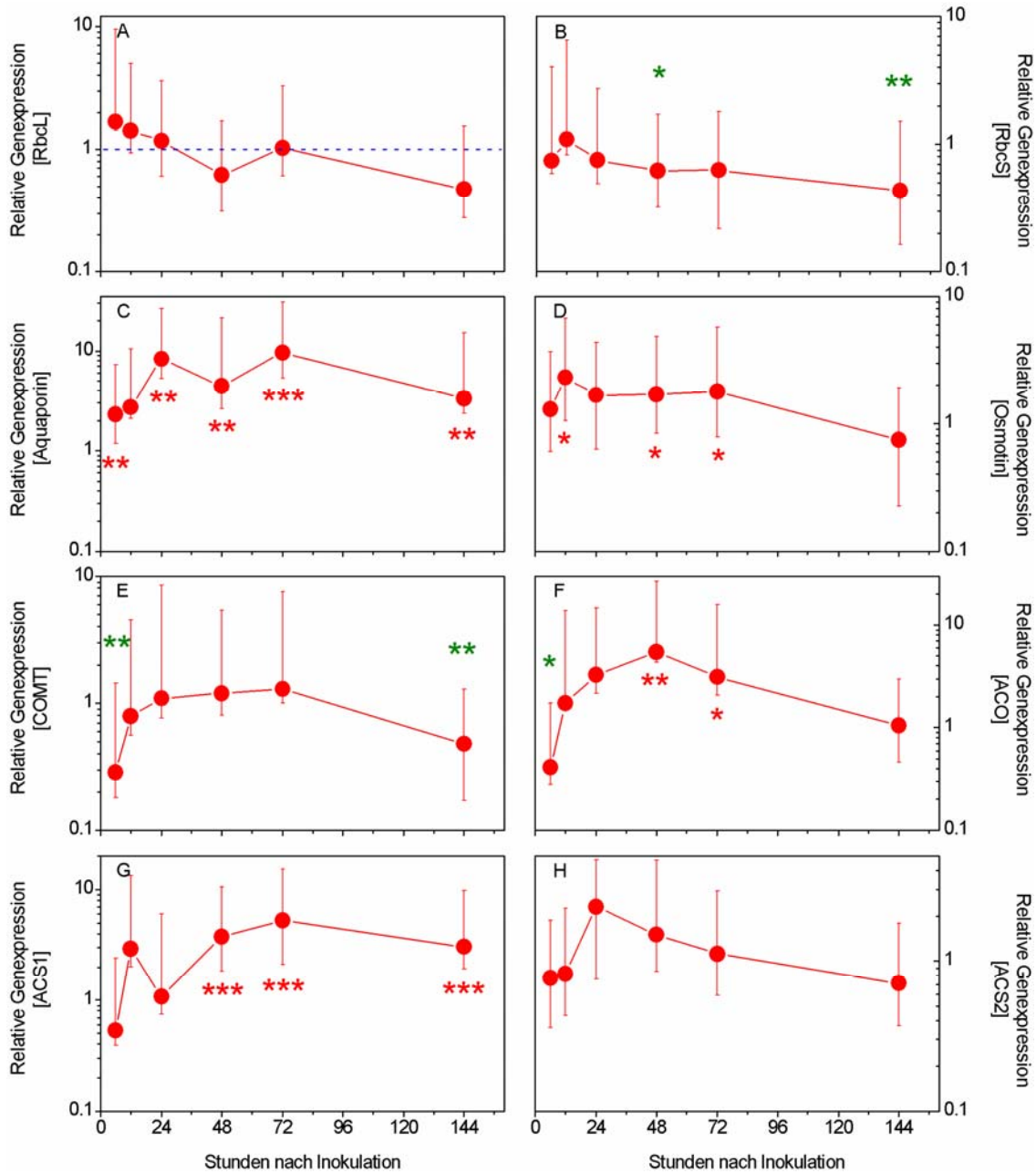


Abbildung 2.25: Relative Genexpression in Blättern infizierter Buchensämlinge: (A) große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcL), (B) kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcS), (C) Aquaporin, (D) Osmotin, (E) Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT), (F) 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Oxidase (ACO), (G) 1-Aminocyclopropan -1-carbonsäure Synthase 1 (ACS1) und (H) 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Synthase 2 (ACS2); Up- (rote Sterne) und Downregulation (grüne Sterne); Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen. Median \pm Standardfehler, $n=3$. Berechnung mittels REST (Relative Expression Software Tool) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die relative Genexpression in den infizierten Buchenwurzeln zeigte im Gegensatz zu den im Blatt analysierten Genen keine deutliche Reaktion der Pflanze auf den Pathogenbefall (s. Abb. 2.26).

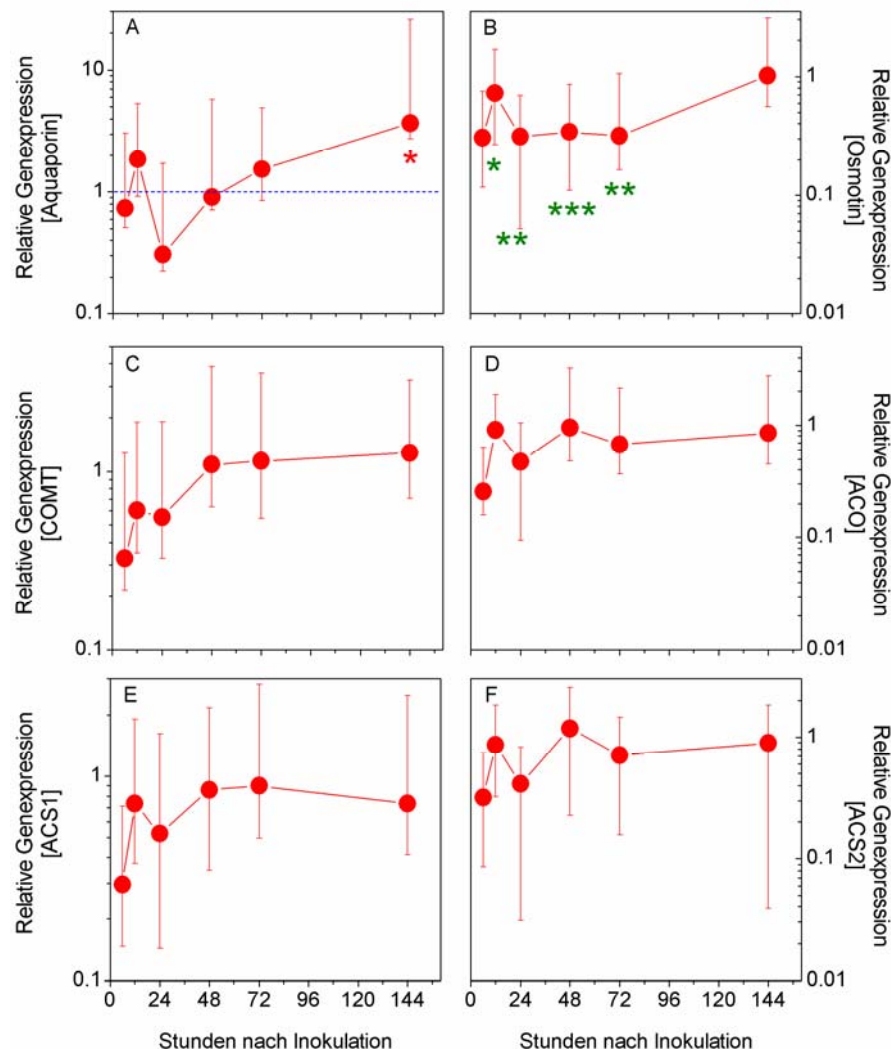


Abbildung 2.26: Relative Genexpression in Wurzeln infizierter Buchensämlinge: (A) Aquaporin, (B) Osmotin, (C) Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT), (D) 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Oxidase (ACO), (E) 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Synthase 1 (ACS1), und (F) 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Synthase 2 (ACS2); Up- (rote Sterne) und Downregulation (grüne Sterne); Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle und inokulierten Pflanzen Median \pm Standardfehler, $n=3$. Berechnung mittels REST (Relative Expression Software Tool) (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

In Abbildung 2.26 A und B ist zu erkennen, dass nur das Aquaporin- und das Osmotin-Gen eine signifikante Induktion- bzw. Repression aufwiesen. Dabei konnte für das Aquaporin-Gen eine signifikante Induktion nur 144 Stunden nach der

Inokulation beobachtet werden. Für das Osmotin-Gen wurde eine signifikante Repression zwischen 24 und 72 Stunden nach der Inokulation festgestellt.

Die relative Genexpression für COMT-, ACO-, ACS1- und ACS2- in der Wurzel zeigte weder signifikante Induktions- noch Repressionsverläufe zu den untersuchten Zeitpunkten (s. Abb. 2.26 C, D, E und F).

IV DISKUSSION

1 GEWINNUNG, CHARAKTERISIERUNG UND AUFREINIGUNG VON PROTEINEN AUS DEM KULTURFILTRAT VON *PHYTOPHTHORA CITRICALA*

Die Produktion von extrazellulären Proteinen durch unterschiedliche *Phytophthora*-Arten ist von vielen Autoren in der Literatur ausführlich beschrieben (Latijnhouwers *et al.*, 2003; Kamoun, 2005). Dazu gehören auch die als Elicitine beschriebenen 10 kDa Proteine, die in der Interaktion mit einigen Pflanzenarten eine Elicitoraktivität aufweisen. Andererseits können andere Proteine, die ebenfalls vom Pathogen abgegeben werden, als Pathogenitäts- oder Virulenzfaktor agieren. Noch nicht vollständig geklärt ist allerdings, welche Metabolite von *Phytophthora citricola* für die Welkeerscheinung an infizierten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) verantwortlich sein könnten. Aus diesem Grund wurde eine Aufreinigung der Proteine, die von *P. citricola* in das Kulturfiltrat abgegeben werden, vorgenommen und die Bedeutung dieser im Wirt-Pathogen-System Buche - *P. citricola* untersucht.

1.1 Rolle des Citricolins in der Wirt-Pathogen Interaktion *Fagus sylvatica* - *P. citricola*

1.1.1 Einfluss von Citricolin auf die Physiologie von Buchen- und Tabakblättern

Nach der Trennung der in das Kulturfiltrat von *P. citricola* abgegebenen Proteine in zwei Hauptproteinfraktionen A1 (molekulare Massen zwischen 12 und 162 kDa) und A2 (molekulare Massen zwischen 2,6 und 11 kDa) und dem Nachweis der in den Fraktionen enthaltenen Proteine durch SDS-PAGE (s. III. 1, Abb. 1.1 und Abb. 1.2), wurden Vorversuche zu ihrer biologischen Wirkung auf Buchensämlinge durchgeführt.

Durch Auftrag der A2-Fraktion auf eine SDS-PAGE, Durchführung eines Westernblots und anschließender Immunisierung mit Antikörpern gegen β -Cryptogein, wurde eine deutliche Proteinbande mit einer molekularen Masse um 8 kDa detektiert (s. III. 1.1, Abb. 1.3 A und B). Anhand dieser Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass es sich hier um ein Elicitin handelt. Dieses Elicitin wurde in Anlehnung an *P. citricola* als „Citricolin“ bezeichnet (Fleischmann *et al.*, 2005). Elicitine sind kleine, hoch konservierte Proteinen, die von allen *Phytophthora*-Arten produziert werden (Ponchet *et al.*, 1999; Yu, 1995). Elicitine werden nach ihrem isoelektrischen Punkt in basische β - oder saure α -Elicitine eingeteilt. Für alle *Phytophthora*-Arten wurde die Existenz von α -Elicitinen, gleichzeitig aber nur für

wenige die Existenz von basischen β -Elicitinen gezeigt (Panabieres *et al.*, 1997; Ponchet *et al.*, 1999). In Arbeiten von Nespoulous *et al.* (1992) wurden unterschiedliche Elicitine in einem Bio-Assay mit Tabakblättern verglichen. Die basischen β -Elicitine Cryptogein, Cinnamomin und β -Drechslerin zeigten dabei eine höhere Toxizität. Die sauren α -Elicitine Capsicein, Parasiticein und α -Drechslerin waren erst in höheren Konzentrationen toxisch. Bei Citricolin konnte gezeigt werden, dass es sich um ein α -Elicitin handelt (Fleischmann *et al.*, 2005). Nach Plich und Rudnicki (1979) könnte die Produktion eines Toxins eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen. Dubery *et al.* (1994) prägte bei ihrer Charakterisierung des Elicitins von *P. cactorum* auch den Begriff Toxin für das im Kulturfiltrat enthaltene Cactorein.

Bei der Wirkung der Elicitine in Tabak sind vor allem der Turgorverlust, der Abbau der Chloroplastenmembrane und die völlige Dekompartimentierung der Zellen zu beobachten (Milat *et al.*, 1991; Heiser *et al.*, 1999; Brummer *et al.*, 2002). Bruce *et al.* (1996) gehen davon aus, dass Elicitine keine Bedeutung für die Pathogenität haben. Manter *et al.* (2007) zeigten bei *Rhododendron macrophyllum*, *Lithocarpus densiflorus* und *Umbellularia californica* an mit *P. ramorum*-Elicitinen behandelten Blättern eine signifikante Reduktion der Chlorophyll-Fluoreszenz. Die Autoren zeigten ebenso erstmals einen negativen Einfluss von Elicitinen auf die Photosynthese an kompatiblen Wirten, unabhängig von einem durch das Pathogen verursachten Wassermangel.

Es wurde vermutet, dass das Elicitin von *P. citricola* für die Ausprägung von Blattnekrosen und Welkesymptomen an Buche beteiligt sein könnte. Citricolin erwies sich jedoch als wirkungslos an Buchensämlingen. Das Elicitin reduzierte jedoch bei Tabakblättern die Netto-CO₂-Aufnahmerate, die stomatäre Leitfähigkeit (s. III. 1.2, Tab. 1.1) und verursachte die für Elicitine typischen Blattnekrosen (s. III. 1.2, Abb. 1.4). Auch bei mit Citricolin behandelten Buchensuspensionskulturen konnte weder die Induktion einer hypersensitiven Reaktion, noch ein Elicitin vermittelter Zelltod gezeigt werden (Martin, 2005).

1.1.2 Hypersensitive Reaktion und H₂O₂-Nachweis an Tabak nach Behandlung mit Citricolin

Für eine inkompatible Wirt-Pathogen-Interaktion ist die hypersensitive Reaktion charakteristisch. Das eindringende Pathogen wird durch Elicitoren vom Wirt erkannt, anschließend werden entsprechende Abwehrmaßnahmen eingeleitet. Elicitoren können dabei Komponente des Pathogens oder des Wirtes sein (z.B. Zellwandbestandteile). Eine schnelle Reaktion, die bei der hypersensitiven Reaktion beobachtet werden kann, ist die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

wie z.B. Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) oder Hydroxylradikale ($\cdot OH$), was unter dem Begriff Oxidative Burst zusammengefasst wird (Elstner *et al.*, 1996). An Tabak (*Nicotiana tabacum*) konnten bereits mehrere Elicitorine verschiedener *Phytophthora*-Arten als Elicitoren eines Oxidative Burst identifiziert werden (Rust rucci *et al.*, 1996; Bourque *et al.*, 1998; Koehl *et al.*, 2003, Fleischmann *et al.*, 2005).

Um die Beteiligung von ROS an den Nekroseerscheinungen der mit Citricolin infiltrierten Tabakblätter zu untersuchen, wurden diese zusammen mit Ascorbinsäure und Katalase in ein Tabakblatt coinfiltriert. In pflanzlichen Zellen sind Ascorbinsäure und Katalase wichtige Mechanismen für die Sauerstoffdetoxifizierung (Elstner *et al.*, 1996). Es wurde festgestellt, dass mit zunehmender Konzentration von 0,2 M bis 1 M Ascorbinsäure die nekrotischen Effekte des Elicitins abnahmen. Allerdings zeigte sich auch, dass letztlich nur eine zeitliche Verzögerung der Symptomausprägung stattfand (s. III. 1.2.1.2, Abb. 1.5).

Nach DAB-Färbung wiesen die mit $1 \mu g mL^{-1}$ Citricolin infiltrierten Stellen die typische rot-braune Verfärbung auf, welche auf eine lokale Akkumulation von H_2O_2 hinweist (s. III. 1.2.1.3, Abb. 1.6). Die Diaminobenzidin-Färbung an einem mit $1 \mu g mL^{-1}$ Citricolin und 1 M Ascorbinsäure coinfiltriertem Tabakblatt zeigte jedoch eine Reduktion der Braunfärbung des Parenchymgewebes. Das wiederum deutet auf eine Reduktion des gebildeten H_2O_2 durch die Ascorbinl sung hin.

Koehl (2002) zeigte ebenfalls einen deutlichen Anstieg an H_2O_2 in Zellkulturen der Tabaksorte Bel W3 nach Elicitierung mit Kulturfiltrat von *P. quercina*. Die Zugabe von Katalase und Diphenyleniodonium (DPI) konnten allerdings nicht vollständig klären, ob es sich nach Elicitierung bei der primär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies um H_2O_2 oder Superoxid handelt.

1.2 Extrazelluläre Metabolite von *P. citricola* als Virulenzfaktoren in der Interaktion mit *Fagus sylvatica*

1.2.1 Charakterisierung des Welkefaktors von *P. citricola*

In der Literatur werden viele mögliche Ursachen für die Zerstörung des Wurzelsystems, die physiologischen Veränderungen und die daraus resultierende Welke angegeben (Ruppel, 1966; Tippett *et al.*, 1977; Dawson und Weste, 1984; Van Alfen, 1989, Benhamou und Côté, 1992).

Die aus dem Kulturfiltrat von *P. citricola* nach der Gelfiltration aufgetrennten Fraktionen wurden in Bio-Assays mit 3 Monate alten Buchensämlingen auf ihre biologische Aktivität untersucht. Da das Citricolin keine biologische Wirkung auf Buchen zeigte, wurden ausschließlich die entsalzten Fraktionen 8 bis 14 der

Hauptfraktion A1 (s. III. 1, Abb. 1.1 und Abb. 1.2 B) auf ihre Wirkung gegenüber Buchen getestet (s. III. 1.4.1, Abb. 1.8). Dabei stellte sich heraus, dass nur die Fraktion 14 keine Nekrosen hervorrufen konnte (s. III. 1.4.1, Tab. 1.2). Aus diesem Grund wurden die Fraktionen 8 bis 14 vereint und als „A1-Fraktion“ bezeichnet. Erste Biotests mit der partiell gereinigten A1-Fraktion resultierten in Welkesymptomen und einem Absterben der behandelten Buchensämlinge (Ritter, 2005; Martin, 2005). Parallel konnte in dieser Arbeit ein negativer Einfluss auf die Photosyntheseleistung (s. III. 1.4.2, Abb. 1.9) und die Wasseraufnahme (s. III. 1.4.2, Abb. 1.10) auf die mit A1-Fraktion behandelten Buchenblättern gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass für eine maximale Hemmung der Wasseraufnahme ein Proteinschwellenwert von $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ausreichte (s. III. 1.4.2, Abb. 1.11). Ferner konnte festgestellt werden, dass die eingesetzte Proteinkonzentration der A1-Fraktion einen deutlich geringeren Einfluss auf die photosynthetische Quantenausbeute als auf die Wasseraufnahme der Buchen aufwies (s. III. 1.4.2, Abb. 1.12). Dieser Einfluss auf die physiologischen Parameter an Buchensämlingen könnte allerdings auch mit einem osmotischen Effekt durch Glucose zu erklären sein, die zu Beginn der *Phytophthora*-Flüssigkultur zugesetzt wurde. Martin (2005) bestätigte diese Effekte auf Grund von histologischen Schäden an mit Nährmedium behandelten Kontrollpflanzen. Aus diesem Grund war es notwendig, die Zuckerkonzentration im Kulturmedium von *P. citricola* zu senken. Dabei wurde das Wachstum von *P. citricola* und das Protein-Zucker-Verhältnis bei verschiedenen Glucose- und Asparaginkonzentrationen getestet (s. III. 1.5.1, Tab. 1.3). Dabei zeigte *P. citricola* in den Mediumvarianten, die mit einer geringen Glucosekonzentration angesetzt wurden, sowohl ein ausreichendes Myzelwachstum als auch eine zufriedenstellende Proteinsegregation (s. III. 1.5.1, Abb. 1.13 und Abb. 1.14). Die unbekanntesten Zuckerarten, die in den Kulturfiltratvarianten nach der Dialyse erhalten blieben (s. III. 1.5.1, Tab. 1.4 und Abb. 1.15), könnten für die Reduktion der Wasseraufnahme verantwortlich sein (s. III. 1.5.1.2, Abb. 1.17); jedoch nicht für die Symptombildung an mit den Kulturfiltratvarianten inkubierten Buchenblättern (s. III. 1.5.1.2, Tab. 1.5).

Aus der weiterführenden Aufreinigung der Fraktionen aus dem *P. citricola*-Kulturfiltrat (s. III. 1.5.2) resultierte die hauptaktive Fraktion, welche als Welkefaktor bezeichnet wurde. Diese wurde dann mit Hilfe elektrophoretischer Methoden genauer charakterisiert. Zur Bestimmung des Molekulargewichts des möglichen Welkefaktors wurde eine Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silbernitratfärbung durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass noch eine Reihe von Proteinen in dieser Fraktion enthalten waren. Es zeigten sich Banden im Bereich um die 10 kDa, 25 kDa und 75 kDa auf dem Gel (s. III. 1.5.2.2, Abb. 1.22). Gleichfalls wurde die Charakterisierung der isoelektrischen Punkte in der aktiven Fraktion durchgeführt.

Die isoelektrische Fokussierung ergab, dass die Proteine, die dem möglichen Welkefaktor entsprechen, im sauren Bereich liegen (s. III. 1.5.2.3, 1.23).

1.2.2 Wirkmechanismus des Welkefaktors und Bedeutung im Wirt-Pathogen-System Buche - *P. citricola*

In der Literatur finden sich einige Berichte über verschiedene *Phytophthora*-Arten, welche durch das Abgeben phytotoxischer Komponenten Welke an den Blättern der jeweiligen Wirtspflanzen verursachen (Plich und Rudnicki, 1979; Shohet und Strange, 1989; Capasso *et al.*, 1997).

Insgesamt betrachtet, erscheint es wahrscheinlich, dass die hauptaktive Fraktion von *P. citricola* Substanzen enthält, die für die Zerstörung der Wasserleitbahnen, den Einbruch der Wasseraufnahme und damit für die Welkesymptome (s. III. 1.6.1, Abb. 1.24) verantwortlich sind. Die Behandlung der Buchensämlinge mit dem Welkefaktor führte zu einer Auflösung der pektinhaltigen Mittellamelle und der zellulose-, hemizellulose-, und pektinhaltigen Primär- und Sekundärwände (s. III. 1.6.2, Abb. 1.27). Hydrolytische Enzyme spielen eine große Rolle für das Eindringen von Pathogenen in die Wirtspflanze. Sie helfen den Pilzen Zellwandbestandteile in kleine Bruchstücke zu spalten, um sie so aufzulösen (Elstner *et al.*, 1996; Börner, 1997). Tippett *et al.* (1977) vermuteten als Ursache für einen Zusammenbruch der Vakuole, einem begleitenden Schrumpfen der Protoplasten und die Auflösung der Zellwände in Wurzeln von Eukalyptus diffundierbare Toxine oder hydrolytische Enzyme, die von *P. cinnamomi* abgegeben werden. Cahill *et al.* (1985) sahen die Ursache für Schädigungen der Plasmamembran mit andauerndem Elektrolytverlust bei Infektionsversuchen in der Absonderung von Toxinen durch *P. cinnamomi* bzw. in der Penetration durch Hyphen und dem daraus resultierenden enzymatischen Abbau. Ritter (2005) konnte mittels elektronenmikroskopischen Aufnahmen bei mit A1-Fraktion behandelten Buchensämlingen gleichfalls einen Abbau von Xylemzellwänden und Mittellamellen im Epikotyl feststellen und machte hydrolytische Enzyme, abgesehen von *P. citricola*, für die mikroskopischen und makroskopischen Symptome verantwortlich. Ein Nachweis der vermuteten Enzymaktivität wurde in diesem Teil der Arbeit vorgenommen. Sowohl in dem rohen *P. citricola*-Kulturfiltrat, als auch in dem partiell gereinigten Welkefaktor ließ sich eine deutliche Aktivität hydrolytischer Enzyme nachweisen. Vor allem wurde eine starke α -Glucosidase- und β -Glucosidase-, aber auch eine geringe Cellobiohydrolase- und Xylanase- Aktivität in den Proben detektiert (s. III. 1.7, Abb. 1.28 und Abb. 1.29). Diese Befunde deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen hydrolytischen Enzymen und dem Auftreten von Welke bei mit *P. citricola* infizierten Buchensämlingen hin. Przybył *et al.* (2006) zeigten bei Isolaten von *Ophiostoma ulmi* und *O. novo-ulmi* eine

signifikante Korrelation zwischen der *in vitro* Aktivität von Exoglucanasen und β -Glucosidasen und der Virulenz an *Ulmus minor*. Ähnliche Studien mit *Nectria ditissima*, *Colletotrichum gloeosporioides* und *Alternaria alternata* zeigten eine signifikante Korrelation zwischen der Virulenz dieser Pilze und ihrer Fähigkeit Pektinase (Perrin, 1984), Pectate Lyase B (Yakoby *et al.*, 2001) und Cellulase (Eshel *et al.*, 2002) zu produzieren.

Kamoun (2005) berichtete von dem Auftreten eines Nekrose- und Ethyleninduzierenden Proteins (necrosis- and ethylene-inducing protein, NEP1) und der Synthese von NEP1-ähnlichen Proteinen mit einer molekularen Größe von ca. 25 kDa durch unterschiedliche Pflanzenpathogene, einschließlich *Phytophthora*-Arten, die auch zur Virulenz beitragen könnten. Wie zuvor gezeigt (s. IV. 1.2.1), ist auch *P. citricola* in der Lage Proteine mit ähnlicher Größe zu sezernieren. Es ist jedoch noch nicht untersucht worden, ob diese auch zu den NEP1-ähnlichen Proteinen gehören. Qutob *et al.*, (2002) zeigten für *P. sojae* die Produktion eines 25.6 kDa necrosis-inducing Proteins. Die Autoren weisen darauf hin, dass dieses Protein eventuell die Kolonialisierung von Geweben des Wirtes durch das Pathogen während der Übergangsphase vom biotrophen zum nekrotrophen Wachstum erleichtern könnte.

Brummer (2001) konnte nachweisen, dass *P. quercina* das Elicitin Quercinin im Wurzelgewebe von *Quercus robur* synthetisiert und auch in die Wirtszellen abgibt. Es ist anzunehmen, dass ein ähnlicher Mechanismus auch für andere extrazelluläre Metaboliten von *P. citricola* existiert. Elstner *et al.* (1996) weist darauf hin, dass der Wassertransport durch direkte Besiedelung der Gefäße durch Hyphen, aber auch durch Toxine und Enzyme, die vom Pathogen abgegeben werden, beeinflusst werden kann. Die Beeinflussung des Transportes kann jedoch nicht isoliert gesehen werden, denn nicht sie allein ist für Welkesymptome und letztlich auch für die Nekrosen verantwortlich. Begleiterscheinungen, wie erhöhte Atmung, Ethylen- und Auxinbildung, sowie die Akkumulation aromatischer Verbindungen innerhalb der Gefäße oder der Geleitzellen, sind gleichwohl von Bedeutung.

2 WIRT-PATHOGEN-INTERAKTION VON *PHYTOPHTHORA CITRICOLA* UND *FAGUS SYLVATICA*

Krankheiten, die durch verschiedene *Phytophthora*-Arten hervorgerufen werden, sind in der Literatur ausführlich beschrieben. Befallen werden unter anderem Keimlinge, Kulturpflanzen, Zierpflanzen oder Bäume. Typische Symptome dieses Befalls sind im Wurzelbereich die Wurzelfäule und Wurzelhalsfäule, sowie das Zusammenbrechen der Bestände („dumping off“). An den oberirdischen Pflanzenteilen ist das

Vorkommen von Chlorosen und Nekrosen an Blättern, als auch das Absterben einzelner Äste charakteristisch (Erwin und Ribeiro, 1996; Agrios, 2005).

Die Anfälligkeit der Rotbuche gegenüber wurzelschädigenden *Phytophthora*-Arten ist insbesondere auf wechselfeuchten Standorten seit langem bekannt (Day, 1938). In Bayern wurde erstmals 1996 über das Vorkommen von *P. cambivora*, *P. citricola* und andere *Phytophthora*-Arten an erkrankten Buchenbeständen berichtet (Jung und Blaschke, 1996).

In verschiedenen Versuchsreihen erwiesen sich sowohl das Wurzelsystem (Jung *et al.*, 2003), als auch die Stammrinde der Rotbuche (Jung und Blaschke, 1996; Brasier und Jung, 2003) im Vergleich zur Stiel- und Traubeneiche als deutlich anfälliger gegenüber *P. cambivora* und *P. citricola*.

Die lokalen und systemischen Effekte einer *P. citricola*-Infektion an Sämlingen von *Fagus sylvatica* wurden bei dieser Wirt-Pathogen-Interaktion untersucht. Dabei standen die Ursache des Auftretens von Welkesymptomen und das Absterben der Wirtspflanze während des Krankheitsverlaufes im Vordergrund.

Verschiedene Versuchsansätze mit einem künstlichen Inokulationssystem dienten als Grundlage, um beispielsweise den Einfluss von unterschiedlichen Zoosporenkonzentrationen als Inokulumquelle, sowie die Auswirkungen verschiedener Wasserstände zu untersuchen.

Außer den physiologischen Prozessen, wie CO₂ - Netto-Aufnahmerate, stomatäre Leitfähigkeit, Transpiration, blattinterne CO₂-Konzentration, Wasserpotential und Chlorophyll-Fluoreszenz wurden auch mikroskopische Untersuchungen an Wurzeln und Blättern durchgeführt.

Durch die histologischen Untersuchungen konnte die Besiedelung des Wirtsgewebes während der Interaktion analysiert werden. Die Bestimmung der Ethylen-Biosynthese und die Analyse der Genexpression von Enzymen des Primär- und Sekundärmetabolismus, sollten das Verständnis der Reaktion der Pflanzen auf ihre Schädigung ergänzen. Die gewonnenen Ergebnisse ermöglichen die Entwicklung eines „Wirkkonzeptes“ des Pathogens auf die Buchensämlinge.

2.1 Einfluss der Inokulation mit *P. citricola* auf die Physiologie und den Infektionsverlauf an Buchensämlingen

2.1.1 Einfluss des Pathogenbefalls auf die Physiologie

Die Beeinträchtigung der physiologischen Prozesse von Pflanzen infolge von *Phytophthora*-Erkrankungen ist ein bekanntes Phänomen. Bei Versuchen mit unterschiedlichen Holzpflanzensämlingen führte die Infektion der Wurzel mit *P. cinnamomi* zu Einschränkungen der CO₂-Assimilation, Transpiration und der stomatären Leitfähigkeit (Dawson und West, 1984; Ploetz und Schaffer, 1989;

Maurel *et al.*, 2001a/b; Maurel *et al.*, 2004). Ähnliche Ergebnisse konnten an mit *P. citricola* inokulierten Buchensämlingen bestätigt werden (s. III. 2.1, Abb. 2.1). Zudem zeigte sich eine Reduktion der Carboxylierung bereits 2 Tage nach Inokulation (s. III. 2.1, Abb. 2.1 C). Als Indikator für Prozesse, welche die Photosynthese beeinflussen, kann auch die Chlorophyll-Fluoreszenz dienen (Schreiber und Bilger, 1993). Bei mit *P. citricola* infizierten Buchensämlingen war bereits 3 Tage nach Inokulation eine Beeinträchtigung der Chlorophyll-Fluoreszenz zu beobachten (s. III. 2.1, Abb. 2.1 D). Untersuchungen von Luque *et al.* (1999) an mit *P. cinnamomi* infizierten einjährigen Korkeichen (*Quercus suber* L.), zeigten eine Verminderung der photochemischen Effizienz durch das Pathogen. Als mögliche Ursache kann eine Störung des Wasserhaushalts in Betracht gezogen werden. Krause und Weis (1984) zeigten ebenfalls, dass eine gestörte Funktionalität von Photosystem II zu einer Reduktion der Chlorophyll-Fluoreszenz führte. Dies könnte die Ursache dafür sein, warum trotz ausreichender Wasserversorgung und des nicht Vorhandenseins von Nekrosen oder Chlorosen an Blättern (s. III. 2.1, Tab. 2.1), bereits Störungen bei der Chlorophyll-Fluoreszenz auftraten. Crombie und Tippett (1990) stellten an natürlich mit *P. cinnamomi* infizierten Eukalyptus-Bäumen (*Eucalyptus marginata*) fest, dass die stomatare Leitfähigkeit im Vergleich zum Blatt-Wasserpotential in einem deutlich früheren Stadium der Erkrankung abnahm. Diese Ergebnisse konnten in den durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Die stomatare Leitfähigkeit nahm bereits 2 Tage nach Inokulation ab (s. III. 2.1, Abb. 2.1 B), dagegen zeigte sich das Blatt-Wasserpotential sowie die Wasseraufnahme erst nach 6 Tagen reduziert (s. III. 2.1, Abb. 2.1 E und 2.1 F). Leichte Welkeerscheinungen an den Blättern konnten ab dieser Zeit festgestellt werden (s. III. 2.1, Tab. 2.1). Durch die Schädigung der Feinwurzeln kann es für die Pflanzen zu einer ähnlichen Beeinträchtigung des Wasserhaushaltes kommen, wie sie auch bei Trockenstress vorliegt (Epron *et al.*, 1992; Epron und Dreyer 1992).

Eine Beeinträchtigung der Wurzelfunktionen wurde bei den Vorversuchen mit *P. citricola* infizierten Buchensämlingen nicht bestätigt. Jedoch zeigte sich im weiteren Untersuchungsverlauf, dass mit Zunahme des Pathogens in der Wurzel der Buchensämlinge eine negative Korrelation zwischen der Störung des Wurzelsystems und des Blattgaswechsels, sowie des Wasserpotentials einhergehen kann (z.B. s. III 2.2.4, Abb. 2.5 B). Eine Infektion der Wurzel könnte zu einem Wasserdefizit des Sprosses führen, was durch das niedrige Wasserpotential der Blätter belegt wird. Diese Annahme wird durch das Schließen der Stomata bei steigendem Wassermangel bestätigt. Ein Ungleichgewicht des Phytohormonhaushaltes könnte auch zu physiologischen Veränderungen der infizierten Pflanzen führen. Mittlerweile konnte mehrfach dokumentiert werden, dass ABA während Stresssituationen der Pflanze an der Signaltransduktion beteiligt ist (Leung und Giraudat, 1998; Grill und

Himmelbach, 1998; Kizis *et al.*, 2001). Unter ungünstigen Umweltbedingungen wie Salz-, Wasser- oder Kältestress erhöht sich die Konzentration der freien ABA im pflanzlichen Gewebe (Leung und Giraudat, 1998; Jeschke *et al.*, 1997; Zhu 2002). ABA senkt den Calciumgehalt in den Stomata und damit den Turgor, woraus eine Schließung der Stomata resultiert. Dadurch vermindert sich die Transpiration (Jansen *et al.*, 1998). Maurel *et al.* (2004) bestätigten eine Korrelation zwischen der erhöhten Konzentrationen an ABA im Xylemsaft und einer Verringerung der stomatären Leitfähigkeit von mit *P. cinnamomi* infizierten Esskastaniensämlingen (*Castanea sativa* L.). Maurel *et al.* (2001a) fanden vergleichbare Beeinträchtigungen bezüglich der erwähnten physiologischen Parameter bei Edelkastaniesämlingen (*Castanea sativa*), die einem Trockenstress ausgesetzt waren.

2.1.2 Split-root-System

Eine kompatible Interaktion zwischen Pflanzen und *Phytophthora*-Arten führt oftmals zu einem Rückgang der stomatären Leitfähigkeit und der Photosyntheserate. Dieser Zusammenhang ist aber noch nicht vollständig verstanden. In vielen Fällen ist der Rückgang des Blattgaswechsels auf eine reduzierte Wasseraufnahme zurückzuführen, verursacht durch Wurzel- oder Xylemnekrosen. Um die Auswirkungen auf die Physiologie der Pflanze, die durch den Verlust oder die Zerstörung der Wurzel verursacht werden, untersuchen zu können, wurde ein Split-root-System etabliert (s. II. 12.2.1). Des Weiteren ging es darum festzustellen, wie hoch die Infektion sein muss, um die Pflanze nachhaltig zu schädigen, bzw. ob ein systemisches Signal an der Symptomausprägung beteiligt sein könnte.

Zur Quantifizierung des Pathogens im inokulierten Wurzelsystem wurde die qPCR-Methode eingesetzt. Die Konzentration der DNA des Pathogens zeigte dabei keinen signifikanten Unterschied bei den Wurzelteilen, welche einseitig bzw. zweiseitig inokuliert wurden (s. III. 2.2.2, Abb. 2.3).

Pflanzen, bei denen nur 50 % des Wurzelsystems infiziert wurden, zeigten, wie auch die nicht inokulierten Kontroll-Pflanzen, keinen Rückgang der physiologischen Parameter. Jedoch konnte festgestellt werden, dass einseitig inokulierte Pflanzen höhere Werte für die Netto-CO₂-Aufnahmerate, die stomatäre Leitfähigkeit und Transpiration im Vergleich zu zweiseitig inokulierten Pflanzen aufwiesen. Die Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die Aufrechterhaltung von 50 % des Wurzelsystems ausreichte, um Einbußen im Gaswechsel vorzubeugen (s. III. 2.2.1, Abb. 2.2). Einfach und zweifach infizierte Pflanzen zeigten Wurzelnekrosen, die eine Beeinträchtigung der Funktionalität des Wurzelsystems verursachen könnten (s. III. 2.2.3, Abb. 2.4). Es zeigte sich, dass die Photosynthese negativ mit der Konzentration von *P. citricola* in den Wurzeln korreliert war. Ein Schwellenwert von

ca. 50 ng *P. citricola*-DNA mg⁻¹ Trockengewicht reichte aus, um die Photosynthese signifikant zu hemmen (s. III. 2.2.4, Abb. 2.5). Maurel *et al.* (2001b) zeigten bei Esskastaniensämlingen (*Castanea sativa*), welche zuvor mit *P. cinnamomi* inokuliert wurden, eine negative Korrelation zwischen Wurzelnekrosen und die Reduktion der Transpirationsrate und stomatären Leitfähigkeit.

Um die möglichen Auswirkungen einer *P. citricola* Infektion des Wurzelsystems auf den Kohlehydrathaushalt untersuchen zu können, wurden die Konzentrationen für Saccharose, Glucose und Fructose in der Wurzel bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass *P. citricola* einen systemischen Effekt auf die Verteilung an löslichen Zuckern in der Wurzel induzierte (s. III. 2.2.5, Abb. 2.6). Es zeigte sich, dass bei einseitiger und zweiseitiger Infektion die Konzentration an Saccharose in beiden Wurzelteilen im Verhältnis zur Kontrolle abnahm. Bei der zweiseitigen Inokulation war jedoch die Reduktion von Saccharose stärker im Vergleich zur einseitig inokulierten Wurzeln ausgeprägt (s. III. 2.2.5, Abb. 2.6 A). Auffällig war die ähnliche Verteilung an Glucose und Fructose nicht infizierter Teile einseitig inokulierter Wurzeln, wie sie auch bei infizierten Wurzelteilen gemessen wurde, was wiederum auf einen systemischen Effekt hindeutet (s. III. 2.2.5, Abb. 2.6 B und C). Das Pathogen zeigte dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Summe der löslichen Zucker (s. III. 2.2.5, Abb. 2.6 D). Es konnte zudem gezeigt werden, dass die Zunahme des Pathogens in den Wurzeln mit der Abnahme aller löslichen Zucker korrelierte (s. III. 2.2.6, Abb. 2.7 und 2.8). Ndoumou *et al.* (1996) beschrieben ebenfalls eine Spaltung von Kohlenhydraten in Töpfen mit drei Klonen von *Theobroma cacao* nach einer Infektion mit *P. megakarya*. Vor kürzlich berichteten García-Rodríguez *et al.* (2005) von der systemischen Expression eines Zuckertransporters (LeST3) in Tomatenblättern nach der Wurzelinfektion mit *P. parasitica*. Sie schlossen aus ihren Daten, dass LeST3 beim Transport von Zuckern in die Wurzeln, der Senke, eine Rolle spielt, um das Pathogen mit Kohlenhydraten, die wichtig für dessen Wachstum sind, zu versorgen. Sheard und Farrar (1987) beschrieben einen Hexose-Carrier für *P. palmivora*. Sie folgerten, dass Saccharose in vermutlich hydrolysiertes extrazellulärer Form vorliegt, bevor das Pathogen durch diesen Carrier Glucose aufnimmt. Hinweise zeigen darauf, dass Pflanzen-Invertasen lokal und systemisch involviert sein könnten bei der Umwandlung von Saccharose zu Glucose und Fructose während des Wachstums von *P. citricola* in Buchenwurzeln. Der Split-root-Versuch zeigte deutlich, dass gleichzeitig mit der Spaltung von Saccharose beide Hexosen akkumuliert wurden, sowohl in den infizierten wie auch in den nicht infizierten Wurzeln von infizierten Split-root-Sämlingen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (s. III. 2.2.5, Abb. 2.6).

Pflanzen besitzen drei Typen von Invertase-Isoenzymen die, als Schlüsselenzyme für die apoplastische Phloembeladung, essentiell sind für die Versorgung der

Senken mit Kohlehydraten (Roitsch *et al.* 2003; Roitsch und González, 2004). Berger *et al.* (2004) berichteten von der spezifischen Induktion einer Zellwand-Invertase in Tomatenblättern, die entweder von *Pseudomonas syringae* oder *Botrytis cinerea* befallen waren. Darüber hinaus maßen Chou *et al.* (2001) eine gleichzeitige Zunahme der Aktivität von apoplastischen und löslichen Invertasen des Wirts und des Pilzes. Von beiden Enzymen wurde vermutet, dass sie zur Akkumulation von löslichen Zuckern in Blattregionen von *Arabidopsis thaliana*, die von *Albugo candida* befallen waren, beitragen.

Kürzlich berichteten auch Sutton *et al.* (2007) von einer Zunahme von Zellwand-Invertasen in Weizenblättern, welche mit *Blumeria graminis* infiziert waren. Genexpressionsstudien zeigten, dass entsprechende Gene schon 3 Tage nach der Infektion signifikant hochreguliert waren. Detaillierte Informationen zu der Induktion von Wirt- und Pilz-Invertasen im Verlaufe einer Infektion liefern Voegelé *et al.* (2006). Deren Expressionsanalysen zeigten, dass die Transkription einer Pilz-Invertase bereits kurz nach dem Eindringen von *Uromyces fabae* in Blätter von *Vicia fabae* begann, und dass das höchste Expressionsniveau in den Haustorien festgestellt wurde. Gleichzeitig zeigte eine zellwandgebundene Invertase verstärkte Expression, während eine vakuoläre Invertase herunter reguliert war. Vermutet wird, dass lösliche Zuckerarten durchaus in der Lage sind weitere biochemische Mechanismen die während der Wirt-Pathogen-Interaktion ablaufen, zu aktivieren (Rolland *et al.*, 2002). Diese biochemischen Mechanismen könnten ihrerseits die Aktivierung von Invertasen induzieren (s. IV. 2.1.4).

2.1.3 Einfluss des Wasserstandes und Inokulumdichte

Die Feuchtigkeit und Inokulumdichte im Boden sind wichtige Faktoren, die das Vorkommen und die Stärke des Befalls vieler Krankheiten, welche durch *Phytophthora*-Arten im Wurzelsystem hervorgerufen werden, beeinflussen (Utkhede und Smith, 1996).

Auf Grund von Freilandversuchen wurde angenommen, dass *P. citricola* bevorzugt Feinwurzeln adulter Bäume infiziert. Im Laborversuch, bei dem ein Sämlings-Testansatz verwendet wurde, zeigte sich jedoch, dass ein massiver Befall der oberen Hauptwurzel erfolgte, sogar ein Einwachsen in das Hypokotyl konnte mittels qPCR nachgewiesen werden. Seitenwurzeln wiesen dagegen nur eine geringe Infektion auf (Martin, 2005).

Um die Frage zu beantworten, in wieweit der Wasserstand und die Inokulumdichte im Modelansatz den Infektionsverlauf beeinflussen können, wurde der Einfluss dieser beiden Faktoren untersucht.

Zunächst wurde der Einfluss des Wasserstandes, in Zusammenhang mit der Inokulation von *P. citricola*, auf die Physiologie der Buchesämlinge untersucht, sowie der Gehalt an *P. citricola* in den unterschiedlichen Pflanzensegmenten quantifiziert. Als Behandlung wurden zwei unterschiedliche Wasserstände - exakt unterhalb des Hypokotyls, sowie 2,5 cm darunter - verwendet (s. II. 10.2.2).

Es wurde gezeigt, dass Zoosporen aufgrund natürlicher Signale der Pflanzenoberfläche potentielle Infektionsorte lokalisieren und dort in die Wurzel eindringen können (Hickman, 1970; Van West *et al.*, 2003).

Eine mögliche Ursache für das Vorhandensein größerer Mengen an *P. citricola* in den Segmenten 1 und 2 der Wurzelsegmente (s. III. 2.3.1, Abb. 2.9) ist, dass sich Zoosporen an Orte mit höheren Sauerstoffpartialdrücken konzentrieren. Dies bedeutet, dass die Höhe des Wasserstandes für den Ort der Infektion und deren Verlauf ausschlaggebend sein könnte. Curtis und Zentmyer (1949) führten mit *P. cinnamomi* inokulierten Pflanzen in Kulturmedium Experimente durch, die zudem einer Sauerstoffbehandlung ausgesetzt waren. Dabei stellten sie fest, dass die Wurzelschäden an den Pflanzen am größten waren, welche der höchsten Sauerstoffdosis ausgesetzt waren.

Auch eine Limitierung von löslichen Zuckern und von Nährstoffen könnte ein ungleichmäßiges Wachstum von *P. citricola* in den unterschiedlichen Segmenten erklären. Demzufolge müsste der Wasserstand nicht unbedingt die einzige Ursache für eine erhöhte Infektion sein.

Auf physiologischer Ebene konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Inokulation und den Wasserständen festgestellt werden; die Wurzelinfektion war jedoch im Vergleich zu Kontrollpflanzen signifikant nachweisbar (s. III. 2.3.2, Abb. 2.10).

Die Inokulation der Buchesämlinge mit unterschiedlichen Zoosporenkonzentrationen von *P. citricola* ergab, dass Buchesämlinge, die mit $12,5 \cdot 10^4$ Zoosporen mL^{-1} inokuliert wurden, den höchsten Rückgang der Wasseraufnahme aufwiesen (s. III. 2.4.1, Abb. 2.11). Es wurde zugleich gezeigt, dass eine Korrelation zwischen Infektionsstärke und Hemmung der Wasseraufnahme besteht (s. III. 2.4.1, Abb. 2.12). Auffallend war die starke Streuung der Hemmung der Wasseraufnahme innerhalb der mittleren Konzentration ($12,5 \cdot 10^3$). Dementsprechend erwies sich eine Schwellenkonzentration von 43,6 ng *P. citricola*-DNA pro Milligramm Wurzeltrockenmasse als ausreichend, den Xylemwasserfluss zu 100 % zu blockieren und erste Welkesymptome an den Blättern auszulösen. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch bei dem Split-root-System beobachtet (s. IV. 2.1.2).

Ebenso zeigte sich hier eine Reduktion aller gemessenen löslichen Zucker in den Wurzeln, die mit $12,5 \cdot 10^4$ Zoosporen mL^{-1} inokuliert wurden (s. III. 2.4.2, Abb. 2.13 A), sowie eine tendentielle Abnahme der Zuckergehalte mit steigender

Inokulumdichte (s. III. 2.4.2, Abb. 2.14). In Blättern inokulierter Pflanzen konnte jedoch kein signifikanter Unterschied für die Gehalte löslicher Zucker im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (s. III. 2.4.2, Abb. 2.13 B). Goicoechea *et al.* (2000) zeigten an Paprikapflanzen, die mit *Verticillium dahliae* inokuliert wurden, dass nur im fortgeschrittenen Stadium der Krankheit erhöhte Werte löslicher Zucker in den Blättern zu finden waren.

2.1.4 Induktion der Ethylenbiosynthese

Ethylen ist ein gasförmiges Hormon, das als Reifungshormon bekannt ist. Daneben wird es von vielen Pflanzen u. a. als Stressantwort synthetisiert (Grossmann und Hansen, 2003; Pierik *et al.*, 2006). Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte Ethylenbildung durch das Pilzwachstum in der Wirtspflanze, beispielsweise beim Pathosystem *Uromyces phaseoli* (Bohnenrost)-Bohne (*Phaseolus vulgaris*), oder auch durch Einwirkung von Elicitoren ausgelöst werden kann (Elstner *et al.*, 1996).

In der Literatur werden viele Störungen der Ethylenbildung in Pflanzen, die durch Pathogenbefall hervorgerufen werden, diskutiert. Die Rolle von Ethylen bei der Interaktion zwischen *P. citricola* und *Fagus sylvatica* ist noch weitgehend unbekannt. Ziel war es deshalb, das zeitliche Muster der Ethylenbildung und das Ausmaß der Phytohormonsynthese während dieser Wirt-Pathogen-Interaktion zu charakterisieren. Infolgedessen wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen die Menge des gebildeten Ethylens im Verhältnis zur Wasseraufnahme und zur beobachteten Symptomausbildung analysiert wurde. Im geschlossenen System zeigten die mit *P. citricola* infizierten Buchensämlinge bereits nach 2 Tagen einen signifikanten Anstieg an Ethylen, im Vergleich zur Kontrolle (s. III. 2.5, Abb. 2.15 A). Nunn *et al.* (2005) zeigten ähnliche Ergebnisse an mit ozonbegasteten Buchen. Dabei führte eine Exposition mit doppelt ambienter Ozonkonzentration zu einem Anstieg der 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC)-Konzentration.

Als erste Symptome zeigten sich bereits 6 Tage nach Inokulation leichte Verbräunungen in den Blattadern. Gleichzeitig konnte ein signifikanter Rückgang der Wasseraufnahme bestätigt werden (s. III. 2.5, Abb. 2.15 B und 2.15 C). 13 Tage nach Inokulation wurde ein leichter Rückgang der Ethylenbildung beobachtet. Dennoch waren die Werte in Vergleich zur nicht inokulierten Probe auch zu Versuchsende signifikant erhöht (s. III. 2.5, Abb. 2.15 A). Der Rückgang der Ethylenbildung könnte somit in diesem Fall direkt im Zusammenhang mit dem hohen Anteil an nekrotisiertem Blattgewebe stehen (s. III. 2.5, Abb. 2.15 C). Nunn *et al.* (2005) zeigten ebenfalls, dass die Ethylen-Emissionen deutlich zurückging, wenn etwa 25 % der Blattfläche abgestorben waren. Es wurde davon ausgegangen, dass die Ethylenbildung zu diesem Zeitpunkt entscheidend gehemmt war. Die Autoren

zeigten auch, dass der prozentuale Anteil abgestorbener Blattzellen im Zusammenhang mit der akkumulierten Menge an Ethylen bis zur Probenahme stand. Als Erklärung für die reduzierte Ethylenbildung könnte im geschlossenen System auch der sinkende Sauerstoffgehalt diskutiert werden, da die Oxidation von ACC zu Ethylen durch die ACC-Oxidase sauerstoffabhängig verläuft (Jansen *et al.*, 1998).

Zum Beweis dieser Hypothese, wurde ein weiterer Versuch in einem „belüfteten System“ durchgeführt. Zudem war es möglich, die Menge des täglich neu produzierten Ethylens zu messen. Dem geschlossenen System entsprechend, konnte 2Tage nach Inokulation ein Anstieg an Ethylen gemessen werden. Jedoch zeigte sich bei diesem Ansatz eine biphasische Produktion des Hormons (s. III. 2.5, Abb. 2.16). Berichte in der Literatur bestätigen die Aktivierung der Enzyme ACC-Synthase und ACC-Oxidase, welche als wichtige Enzyme der Ethylenbiosynthese bekannt sind (Nunn *et al.*, 2005).

Ethylen kann neben der Carboxylierungseffizienz auch die Photosynthese negativ beeinflussen, in dem es das atmosphärische CO₂ hindert, in die Interzellulärräume einzudringen. Untersuchungen an *Brassica juncea* zeigten, dass die stomatäre Leitfähigkeit zunahm, sobald die Photosynthese durch Ethylen angeregt wurde. Zu hohe Ethylenkonzentrationen wiederum führten zu einer Reduktion der stomatären Leitfähigkeit bei dieser Art (Khan, 2004). An *Glycine max* führten höheren Ethylenkonzentrationen zu einer Reduktion der Photosyntheserate (Gunderson und Taylor, 1991). Daraus lässt sich ableiten, dass auch Ethylen zur Beeinträchtigung der gemessenen physiologischen Prozesse an mit *P. citricola* infizierten Buchesämlingen beitragen könnte.

2.2 Veränderungen in der Histologie

Viele Autoren beschreiben, dass *Phytophthora*-Pathogene in der Lage sind, in kurzer Zeit (Tage bzw. Wochen) unterschiedliche Organe der Pflanze zu befallen, was häufig zu irreversiblen Schäden führt. So beobachteten Cahill *et al.* (1989) an mehreren anfälligen Pflanzenarten, dass *Phytophthora*-Pathogene die Wurzeln infizierten und später Chlorosen an den Blättern hervorriefen.

Um die Interaktion zwischen *P. citricola* und *F. sylvatica* auf histologischer Ebene besser charakterisieren zu können, wurden unterschiedliche Bereiche von infizierten und nicht infizierten Pflanzen mit Hilfe der Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht (s. III. 2.6, Abb. 2.17). Aufnahmen vom Hypokotyl und der Hauptwurzel zeigten im Xylembereich ein Ablösen der Sekundär- von der Primärzellwand (s. III. 2.6, Abb. 2.18 C und Abb. 2.19). Dies könnte erklären, weshalb der Blattgaswechsel einbrach und später Welkesymptome auftraten (s. IV. 2.1.1).

Cahill *et al.* (1989) beobachteten ebenfalls an anfälligen, wie auch resistenten Pflanzenarten, die mit *P. cinnamomi* infiziert waren, stark geschrumpfte Protoplasten. Oft konnte das Auftreten von amorphem Material in Parenchymzellen festgestellt werden, was mit einer Reduktion der Stärkegehalte (z.B. III. 2.6, Abb. 2.18 D). Deutlich zu erkennen war, dass kein Zusammenhang zwischen Plasmolyse und einer Penetration der Zellen durch Hyphen bestehen muss (s. III. 2.6, Abb. 2.21). Benhamou und Côté (1992) stellten an mit *P. parasitica* var. *nicotianae* infizierten Tabakwurzeln fest, dass der Zusammenbruch des Cytoplasmas nicht auf penetrierte Zellen beschränkt war. Brummer (2001) dokumentierte mittels lichtmikroskopischen Untersuchungen von mit *P. quercina* infizierten Eichensämlingen ebenfalls das Auftreten von Plasmolyse als Reaktion auf den Befall mit *Phytophthora* unabhängig vom Hyphenbefall.

Im Rindenparenchym und Zentralzylinder von Sekundärwurzeln war sowohl inter- als auch intrazelluläres Wachstum von *P. citricola* zu erkennen. Die dickwandigen Zellen des Xylems schienen kein Hindernis für das Vordringen des Pathogens darzustellen. Es wurden keine strukturellen Abwehrreaktionen auf den Befall mit *P. citricola* hin gefunden (s. III. 2.6, Abb. 2.21).

2.3 Veränderungen in der Genexpression

Pflanzen reagieren auf biotischen oder abiotischen Stress mit der Expression von Genen, deren Produkte auf vielfältige Weise den Abwehrstatus der Pflanze erhöhen können (Wasternack und Hause, 2000).

Während des frühen Stadiums der Abwehrantwort aktiviert der Wirt vielfältige Abwehrmechanismen. Diese Aktivierung ist ein Versuch der Pflanze, die Infektion und die Verbreitung des Pathogens einzuschränken. Zu diesen Abwehrmechanismen gehören die Induktion der Genexpression und die Produktion von PR-Proteinen, die Verstärkung von Zellwänden, sowie die Akkumulation von phenolischen Substanzen (oft Phytoalexine), die eine toxische Wirkung auf das Pathogen haben (Dixon and Lamb, 1990; van Kan *et al.*, 1992; Alexander *et al.*, 1994; Smith, 1996).

Ziel war es im Pathosystem Buche und *P. citricola* eine Korrelation zwischen physiologischen Parametern infizierter Sämlinge und der Expression wichtiger Gene des Primär- und Sekundärmetabolismus während der Interaktion darzustellen. Auch die Frage nach dem zeitlichen Verlauf dieser Genexpression in Wurzeln und Blättern sollte geklärt werden.

Die inokulierten Buchesämlinge zeigten, wie bei zuvor durchgeführten Versuchen, eine signifikante Reduktion der gemessenen physiologischen Prozesse (s. III. 2.7.1, Abb. 2.22) und eine schwächer ausgeprägte Reaktion auf das WUE (s. III. 2.7.1,

Abb. 2.24). Auffällig ist jedoch, dass der Pathogengehalt während des gesamten untersuchten Zeitraumes unter 25 ng DNA pro Wurzel-Trockengewicht blieb (s. III. 2.7.1, Abb. 2.23). Die Zoosporen von *P. citricola* beginnen das Auskeimen wenige Stunden nach Sporulation (Hickman, 1970). Beobachtungen an Zoosporensuspensionen in Petrischalen zeigten, dass die Keimung dieser bis zu 2Tage nach Sporulation andauern kann. Deswegen sind die hohen Mengen des Pathogens, die in der Wurzel bis zu 48 Stunden gemessen wurden, nicht allein auf Phytophthorabefall in der Wurzel zurückzuführen, da zu diesem Zeitpunkt eine Ausbreitung des Pathogens in das Wurzelgewebe noch nicht erfolgt sein kann. 78 Stunden nach Inokulation war ein tendenzieller Rückgang der Pathogenmenge in der Wurzel zu beobachten. Eine Erklärung dafür wäre, dass nicht alle Zoosporen gekeimt bzw. in das Wirtsgewebe eingedrungen waren.

Hinsichtlich der relativen Expression von Genen des Primär- und Sekundärmetabolismus, konnten deutliche Reaktionen der Pflanze auf den Phytophthorabefall festgestellt werden. Um die Reduktion der CO₂-Assimilation von Buchensämlingen während der Wirt-Pathogen-Interaktion verstehen zu können, wurde die Genexpression für die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) untersucht. Der Calvin-Zyklus ist der am weitesten verbreitete und bedeutendste Weg der CO₂-Assimilation und wird sowohl bei *Eukaryota* wie Pflanzen und Algen, als auch bei autotrophen *Prokaryota* vorgefunden (Shively *et al.*, 1998). Dabei ist die Assimilation von CO₂ abhängig von enzymatischen Reaktionen, wobei die RubisCO das Schlüsselenzym darstellt. RubisCO tritt in der Natur in multiplen Formen auf, die sich in ihrer Struktur, ihrer katalytischen Eigenschaft und in ihrer Substratspezifität unterscheiden (Tabita, 1988). Die vorherrschende Form I besteht aus je acht 55 kDa und 15 kDa großen Proteinen, der „großen“ und „kleinen“ Untereinheit (Kusian und Bowien, 1997). Die Expression für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcL), die in Blättern gemessen wurde, zeigte während des Krankheitsprozesses keinen Repressionsverlauf (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 A). Für die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RbcS) wurde dagegen eine Reduktion ihrer Expression 48 Stunden und 144 Stunden nach Inokulation (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 B), was tendenziell mit dem Photosyntheseeinbruch einherging, gemessen (s. III. 2.7.1, Abb. 2.22 A).

Aquaporine sind intrinsische Membranproteine, die den Wassertransport über biologische Membranen erleichtern; dabei folgt das Wasser dem osmotischen Gradienten. Aquaporine sind sowohl in pflanzlichen und tierischen Organismen als auch in Bakterien nachgewiesen (Preston *et al.*, 1992; Maurel *et al.*, 1993). Die Familie der Aquaporine lässt sich weiter in vier Unterfamilien gliedern. Die „plasma membrane intrinsic proteins“ (PIPs) bilden die größte Unterfamilie mit zwei

Untergruppen, PIP1 und PIP2, die sich in der Länge ihrer N- und C-Termini und ihrer Wasserpermeabilität unterscheiden (Luu und Maurel, 2005). Die relative Expression für das Aquaporin-Gen in Blättern infizierter Buchen war über weite Teile der Wirt-Pathogen-Interaktion induziert (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 C). Dies könnte eine Reaktion der Pflanze auf den im Blattbereich vorherrschenden Wassermangel sein, der - wie oben beschrieben - während des Infektionsverlaufes auftritt. Aroca *et al.* (2006) zeigten ähnliche Ergebnisse an Bohnenblättern, die Trockenstress ausgesetzt wurden. Dabei bestätigten die Autoren eine Korrelation zwischen Induktion der PvPIP2;1-Expression sowie der Menge an PIP1-Protein mit der Reduktion der Transpirationsrate. Im Wurzelbereich wurde eine solche Induktion der Aquaporingenexpression interessanterweise nur nach 144 Stunden beobachtet (s. III. 2.7.2, Abb. 2.26 A). Es ist bekannt, dass in Wurzeln unter Trockenstress die Repression von PIP-Genen häufig beobachtet wird (Smart *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2004; Porcel *et al.*, 2006).

Die hemmende Wirkung des Wachstums von Oomyceten sowie die Beseitigung des osmotischen Stresses in Pflanzen werden der Funktion der Osmotine zugesprochen (Elstner *et al.*, 1996). Für das Osmotin-Gen der Blätter infizierter Buchen war tendentiell eine Expression über weite Teile der Interaktion zu beobachten (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 D). In Wurzeln wurde im Gegensatz zur Induktion des Osmotin-Gens in Blättern, eine Downregulation nachgewiesen (s. III. 2.7.2, Abb. 2.26 B).

Die Kaffeesäure-O-methyltransferase (COMT) ist als Vorstufe in der Bildung von Lignin Monomeren beteiligt (Guo *et al.*, 2001). Die Lignifizierung kann auf verschiedene Weise an der Resistenzausbildung beteiligt sein (Elstner *et al.* 1996). Von Cahill *et al.* (1989) wurde bei der resistenten Grasart *Themeda australis* als Reaktion auf die Infektion mit *P. cinnamomi* eine Lignifizierung der Zellwände festgestellt. Cahill und McComb (1992) konnten ebenfalls nachweisen, dass bei einer gegenüber *P. cinnamomi* resistenten Eukalyptusart (*Eucalyptus calophylla*) die Phenylalaninammoniumlyase (PAL)-Aktivität, die Ligninkonzentration und die Konzentration an Phenolen in den Wurzeln stark erhöht war, während die anfällige Art (*E. marginata*) keine derartigen Veränderungen aufwies. Das COMT-Gen in Buchenblättern zeigte eine signifikante Downregulation 6 und 144 Stunden nach Inokulation sowie eine tendenzielle Upregulation zwischen diesen Zeitpunkten (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 E). In Wurzeln zeigte dieses Gen weder signifikante Induktions- noch Repressionsverläufe zu den untersuchten Zeitpunkten (s. III. 2.7.2, Abb. 2.26 C). Die histologischen Untersuchungen belegten die Annahme, dass keine Einlagerung von Lignin bzw. die Bildung von Strukturen, die das Einwachsen von *P. citricola* in das Gewebe des Wirtes verhindern könnten, nachgewiesen wurden (s. IV. 2.2).

Nach Elstner *et al.* (1996) gibt es grundsätzlich zwei Ethylenantworten auf das Eindringen von *U. phaseoli* in Bohnenblättern: eine sehr frühe in der Infektionsphase, welche in Zusammenhang mit der Ausbildung von Resistenz gesehen werden kann, und eine späte Phase, welche die massive Nekrotisierung von Blattgewebe begleitet. Für die Gene der Ethylenbiosynthese konnte, wie erwartet, eine Induktion hauptsächlich zu Beginn der Wurzelinfektion von Buchensämlingen durch *P. citricola*, im Blatt gezeigt werden. Die Upregulation des 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Oxidase (ACO)-Gens wurde 48 Stunden nach Inokulation beobachtet (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 F). Diese Befunde stimmen mit den Messungen der Ethylenbiosynthese in soweit überein, dass auch das gasförmige Phytohormon Ethylen zu diesem Zeitpunkt gebildet wird (s. III. 2.5, Abb. 2.16 A). Für den Verlauf der 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Synthase 1 (ACS1)-Genexpression in den Blättern wurde eine konstante Induktion von 48 bis 144 Stunden nach Inokulation beobachtet (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 G). Daraus könnte z.B. die biphasische Bildung von Ethylen resultieren (s. III. 2.5, Abb. 2.16). Der Verlauf der 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure Synthase 2 (ACS2)-Genexpression in Blättern unterschied sich dagegen nicht signifikant von den Kontrollpflanzen (s. III. 2.7.2, Abb. 2.25 H). Die Genexpression für die ACO, ACS1 und ACS2 in infizierten Wurzeln wurde im Vergleich zur Kontrolle weder reprimiert noch induziert (s. III. 2.7.2, Abb. 2.26 D, E und F). Fiebelkorn (2006) zeigte an Buchen mit der Symptomatik „Buchenkomplexkrankheit“, dass in der Rinde nicht viele Veränderungen im Transkriptionslevel mittels Microarray Technik zu beobachten waren. Der Autor erwähnt, dass primär Veränderungen auf der Transkriptionsebene in Blättern zu erwarten wären, was auch Olbrich *et al.* (2005) an Blättern von *Fagus sylvatica* im Zusammenhang mit Ozonstress bestätigten.

2.4 Erklärungsmodell

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ökophysiologischen und phytopathologischen Untersuchungen lassen auf eine Abfolge von Mechanismen auf verschiedenen pflanzeinternen Skalenebenen schließen, die in Zusammenhang mit dem Absterben von *P. citricola* infizierten Buchensämlinge stehen könnten.

Folgende Kausalkette des Krankheitsablaufes könnte aufgrund der Untersuchungsergebnisse abgeleitet werden, wonach lokale und systemische Effekte nach *P. citricola*-Infektion unterschieden werden können (s. Abb. 3.1). Die vielschichtigen Effekte einer *P. citricola*-Infektion auf histologischer-, physiologischer- und molekularbiologischer Ebene des Wirtes ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

Systemische Effekte:

Physiologische Prozesse

1. Ethylenbiosynthese ↑
2. Wasseraufnahme ↓
3. Transpiration ↓
4. Spaltöffnung ↓
5. Wasserpotential ↓
6. Photosynthesehemmung ↓
7. Assimilatversorgung der Wurzeln ↓
8. Assimilatgehalt der Blätter ↓

Genexpression

1. ACC Synthase und Oxidase ↑
2. Aquaporine ↑
3. Rubisco ↓

Symptome:

Makroskopische

1. Nekrose und Welke der Blätter
2. Nekrose an Wurzeln
3. Absterben des Sämlings

Mikroskopische

- ① Plasmolyse in Zellen des Blatt- und Wurzelgewebes
- ② Abbau der Zellwand
- ③ Verstopfung von Plasmodesmen

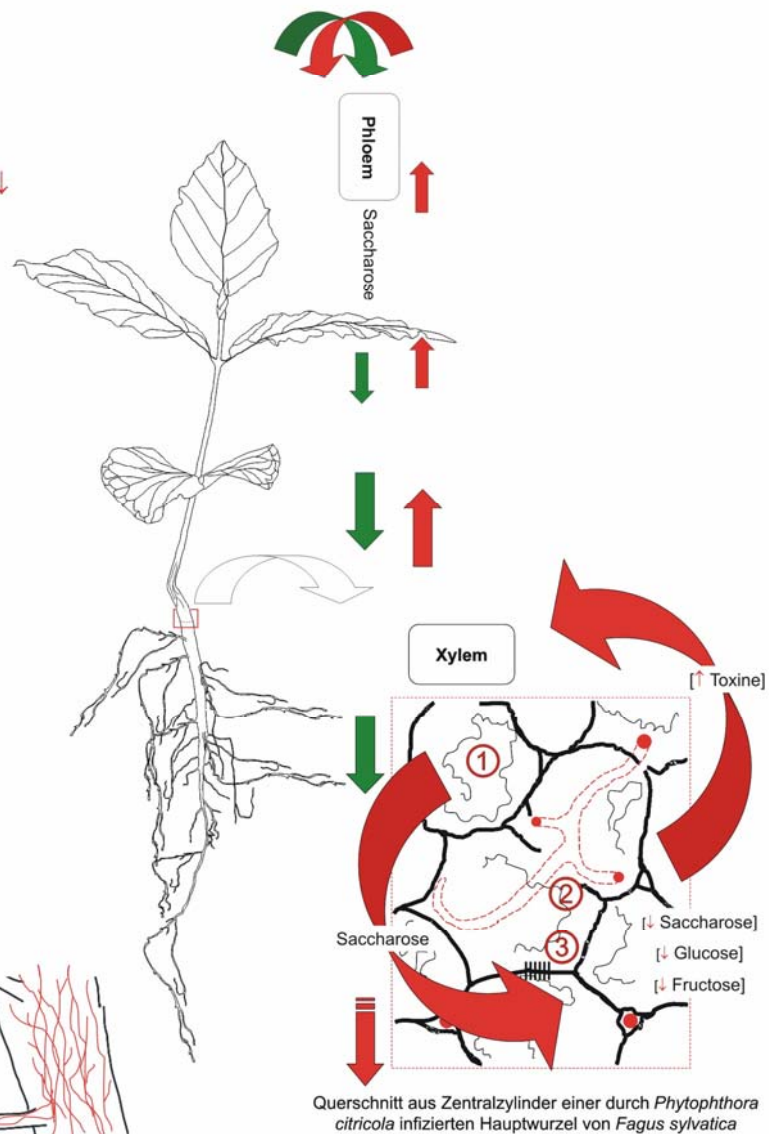
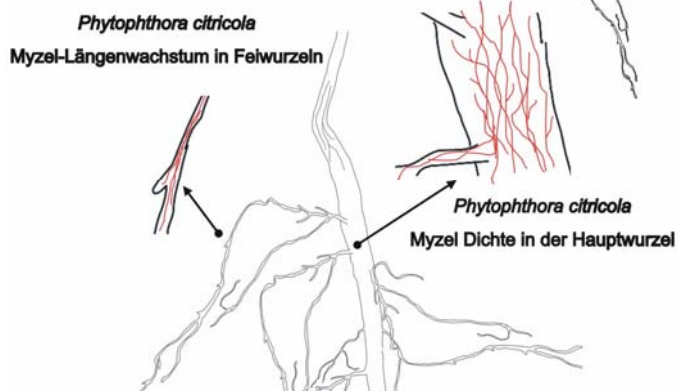


Abbildung 3.1: Effekte einer *P. citricola*-Infektion auf histologischer, physiologischer und molekularbiologischer Ebene von *Fagus sylvatica*. Rote Pfeile zeigen den Ablauf der *P. citricola*-Schädigung der Pflanze, grüne Pfeile den normale Ablauf ohne Einfluss des Pathogens.

V LITERATURVERZEICHNIS

- Agrios GN (2005) Plant Pathology. 5th Edition, Elsevier Academic Press
- Alexander D, Lawton K, Uknes K, Ward E, Ryals J (1994) Defense related gene induction in plants. In: Setlow JK (ed) Genetic Engineering. Vol. 16, New York: Plenum Press, pp. 195-212
- Alfenas AC, Brune W (1998) Eletroforese em gel de poliacrilamida. In: Alfenas AC (ed) Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: Ed. UFV, pp. 151-182
- Aroca R, Ferrante A, Vernieri P, Maarten J, Chrispeels MJ (2006) Drought, Abscisic Acid and Transpiration Rate Effects on the Regulation of PIP Aquaporin Gene Expression and Abundance in *Phaseolus vulgaris*. *Plants Annals of Botany* 98: 1301-1310
- Bailey JA (1983) Biological perspectives of host-pathogen interactions. In: Bailey JA, Deverall BJ (eds) The Dynamics of Host Defence. Sydney: Academic Press, pp. 1-32
- Benhamou N, Côté F (1992) Ultrastructure and Cytochemistry of Pectin and Cellulose Degradation in Tobacco Roots Infected by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 82: 468-478
- Berger S, Papadopoulos M, Schreiber U, Kaiser W, Roitsch T. (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum* 122: 419-428
- 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
- Blum, H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99
- Blumenröther MC, Löw M, Matyssek, R, Oßwald W (2007) Flux-based response of sucrose and starch in leaves of adult beech trees (*Fagus sylvatica* L.) under chronic ozon free-air fumigation. *Plant Biology* 9: 207-214
- Böhm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlmann R, Oßwald W (1999) Real-time Quantitative PCR: DNA Determination in Isolated Spores of the Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae* and Monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their Respective Host Plants. *Journal of Phytopathology* 147: 409-416
- 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

Börner H (1997) Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 7. Auflage. Verlag Eugen Ulmer Stuttgart

Bourque S, Ponchet M, Binet MN, Ricci P, Pugin A, Lebrun-Garcia A (1998) Comparison of Binding Properties and Early Biological Effects of Elicitins in Tobacco Cells. *Plant Physiology* 118: 1317-1326

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-54

Brasier CM, Jung T (2003) Progress in understanding *Phytophthora* disease of trees in Europe. In: McComb JA, Hardy GESTJ, Tommerup I (eds) *Phytophthora* in forests and natural ecosystems. Proceedings of the second international meeting of IUFRO Working Party 07.02.09, Albany, Western Australia, 2001. Perth, Australia: Murdoch University, pp. 4-10

Brasier CM, Strouts RG (1976) New records of *Phytophthora* on trees in Britain. *Phytophthora* root rot and bleeding canker of Horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.). *European Journal of Forest Pathology* 6: 129-136

Brenner ML, Cheikh N (1995) The role of phytohormones in photosynthate partitioning and seed filling. In: Davies P.J. (ed) *Plant Hormones*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Press, pp. 649-670

Bruce R G, Ebert D, Gayler K R (1996) Elicitins: proteins in search of a role? *Australasian Plant Pathology* 25: 148-157

Brummer M, Arend M, Fromm J, Schlenzig A, Oßwald WF (2002) Ultrastructural changes in immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61: 109-120

Brummer M (2001) Untersuchungen zu physiologischen, morphologischen und biochemischen Veränderungen an mit *Phytophthora quercina* infizierten jungen Eichen. Dissertation am Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.

Brunner J (2000) Diplomarbeit am Lehrstuhl für Obstbau, Institut für landwirtschaftlichen und gärtnerischen Obstbau der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.

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: 417-424

Cahill DM, McComb JA (1992) A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase 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(5): 315-332

Cahill D, Weste G, Grant B (1985) Leakage from Seedling Roots Inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathologische Zeitschrift* 114: 348-364

Capasso R, Evidente A, Visca C, Cristinzio G (1997) Phytophosphorin and its phytotoxic aggregates from *Phytophthora nicotianae*. *Phytopathol. mediterr.* 36: 67-73

Cavalier-Smith T (1998) A revised six-kingdom system of life. *Biological Reviews* 73: 203-266

Chou HM, Bundock N, Rolfe SA, Scholes JD (2001) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Molecular Plant Pathology* 1(2): 99-113

Colas V, Conrod S, Venard P, Keller H, Ricci P, Panabieres F (2001) Elicitor 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

Courty PE, Pritsch K, Schloter M, Hartmann A, Garbaye J (2005) Activity profiling of ectomycorrhiza communities in two forest soils using multiple enzymatic tests. *New Phytologist* 167: 309-319

Crombie S, Tippet JT, (1990) A comparison of water relations, visual symptoms and changes in stem girth for evaluating impact of *Phytophthora cinnamomi* dieback on *Eucalyptus marginata*. *Canadian Journal of Forest Research* 20: 233-240

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

Curtis DS, Zentmyer GA (1949) Effect of oxygen supply on *Phytophthora* root rot of avocado in nutrient solution. *American Journal of Botany* 36: 471-474

Daly JM (1987) Toxins as determinants in plant diseases. In: Nishimura S, Vance P, Doke N (eds) *Molecular Determinants of Plant Diseases*. Tokyo/Berlin: Japan Scientific Society Press/Springer Verlag, pp. 119-124

Dangl JL, Jones JD (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833

Dawson P, Weste G (1984) Impact of root infection by *Phytophthora cinnamomi* on the water relations of two *Eucalyptus* species that differ in susceptibility. *Phytopathology* 74(4): 486-490

Day WR (1938) Root-rot of sweet chestnut and beech caused by species of *Phytophthora*. Cause and symptoms of disease: Its relation to soil conditions. Forestry 12: 101-116

Dixon RA, Lamb CJ (1990) Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 41: 339-367

Dubery I A, Meyer D, Bothma C (1994) Purification and characterization of catorein, a phytotoxin secreted by *Phytophthora cactorum*. Phytochemistry 35(2): 307-312

Duniway JM (1977) Changes in resistance to water transport in safflower during the development of *Phytophthora* root rot. Phytopathology 67: 331-337

Durbin RD (1983) The biochemistry of fungal and bacterial toxins and their modes of action. In: Callow JA (ed) Biochemical plant pathology. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, pp. 137-162

Ebel J, Scheel D (1992) Elicitor recognition and signal transduction. In: Troller T, Meins F (eds) Genes Involved in Plant Defense. Wien: Springer Verlag, pp. 183-205

Elstner EF, Oßwald W, Schneider I (1996) Phytopathologie: Allgemeine und biochemische Grundlagen. Heidelberg: Spektrum, Akademieverlag, 328 pp

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 CO₂-assimilation and photochemical efficiency of photosystem II. Plant Cell and Environment 15: 809-820

Erwin DC, Ribeiro OK (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. St. Paul, Minnesota: APS Press, 562 pp

Eshel D, Miyara I, Ailing T, Dinoor A, Prusky D (2002) pH regulates endoglucanase expression and virulence of *Alternaria alternata* in persimmon fruit. Molecular Plant-Microbe Interactions 15: 774-779

Fibelkorn G (2006) Untersuchungen zum anatomischen, physiologischen und molekularbiologischen Abwehrverhalten an gesunden und geschädigten Buchen (*Fagus sylvatica* L.) mit der Symptomatik „Buchenkomplexkrankheit“. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Georg-August-Universität zu Göttingen

Fleischmann F, Göttlein A, Rodenkirchen H, Lütz C, Oßwald W (2004) Biomass, nutrient and pigment content of beech (*Fagus sylvatica*) saplings infected with *Phytophthora citricola*, *P. cambivora*, *P. pseudosyringae* and *P. undulata*. Forest Pathology 34: 79-92

Fleischmann F, Koehl J, Portz R, Beltrame AB, Oßwald W (2005) Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor "Citricolin" to pathogenesis. Plant Biology 7: 650-658

Fleischmann F, Schneider D, Matyssek R, Oßwald WF (2002) Investigations on net CO₂ Assimilation, transpiration and root growth of *Fagus sylvatica* infested with four different *Phytophthora species*. Plant Biology 4: 144-152

Frank SA (1992) Models of plant-pathogen coevolution. Trends in Gen 8: 213-9

Gabriel DW, Rolfe BG (1990) Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. Annual Review of Phytopathology 28: 365-91

García-Rodríguez S, Pozo MJ, Azcón-Aguilar C, Ferrol N (2005) Expression of a tomato sugar transporter is increased in leaves of mycorrhizal or *Phytophthora parasitica*-infected plants. Mycorrhiza 15(7): 489-496

Giefing M (1997) Untersuchung von *Phytophthora*-Toxinen (Elicitinen) im Zusammenhang mit dem Eichensterben. Diplomarbeit am Lehrstuhl für Phytopathologie der Fakultät für Landwirtschaft und Gartenbau der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.

Goicoechea N, Aguirreolea J, Cenoz S, Garcia-Mina JM (2000) *Verticillium dahliae* modifies the concentrations of proline, soluble sugars, starch, soluble protein and abscisic acid in pepper plants. European Journal of Plant Pathology 106: 19-25

Graniti A (1991) Phytotoxins and their involvement in plant diseases. Introduction. Experientia 47: 751-755

Grill E, Himmelbach A (1998) ABA signal transduction. Current Opinion in Plant Biology 1(5): 412-418

Gunderson C, Taylor J (1991) Ethylene directly inhibits foliar gas exchange in *Glycine max*. Plant Physiology 95: 337-339

Guo D, Chen F, Inoue K, Blount JW, Dixon RA (2001) Downregulation of Caffeic Acid 3-O-Methyltransferase and Caffeoyl CoA 3-O-Methyltransferase in Transgenic Alfalfa: Impacts on Lignin Structure and Implications for the Biosynthesis of G and S Lignin. The Plant Cell 13: 73-88

Hartmann G, Blank R (1998) Buchensterben auf zeitweise nassen Standorten unter Beteiligung von *Phytophthora*-Wurzelfäule. Forst und Holz 53(7): 187-193

Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN (1995) Ainsworth and Bisby's dictionary of the fungi, 8th ed. Wallingford: CAB International

Heiser I, Fromm J, Giefing M, Koehl J, Jung T, Oßwald 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

Heldt HW (1996) Pflanzenbiochemie. Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, pp. 393-462

Heyne C (2002) Die Ökophysiologie des Krankheitsbildes *Phytophthora*-infizierter Stieleichen an einem Altauen-Standort. Dissertation am Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.

Hickman CJ (1970) Biology of *Phytophthora* Zoospores. Phytopathology 60: 1128-1135

Huet JC, Le Caer JP, Nepoulous C, Pernollet JC (1995) The relationships between the toxicity and the primary and secondary structures of elicitinlike protein elicitors secreted by the phytopathogenic fungus *Pythium vexans*. Molecular Plant-Micobe Interactions 8(2): 302-310

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

Jang JK, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang HS (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology 54: 713-725

Jansen H, Bachthaler E, Folster E, Scharpf HC (1998) Gärtnerischer Pflanzenbau. 3. Auflage. Eugen Ulmer GmbH & Co.

Jeschke WD, Holobrada M, Hartung W (1997) Growth of *Zea mays* L. plants with their seminal roots only Effects on plant development, xylem transport, mineral nutrition, and the flow and distribution of abscisic acid (ABA) as a possible shoot to root signal. Journal of Experimental Botany 48: 1229-1239

Jung T, Blaschke H (1996) *Phytophthora* root rot in declining forest trees. Phytion 36(3): 95-102

Jung T, Blaschke H, Neumann P (1996) Isolation, identification and pathogenicity of *Phytophthora* species from declining oak stands. European Journal of Forest Pathology 26: 253-272

Jung T, Hudler GW, Jensen-Tracy SL, Griffiths HM, Fleischmann F, Osswald W (2005) Involvement of *Phytophthora* species in the decline of European beech in Europe and the USA. *Mycologist* 19(4): 159-166

Jung T, Nechwatal J, Cooke DEL, Hartmann G, Blaschke M, Oßwald WF, Duncan M und Delatour C (2003) *Phytophthora pseudosyringae* sp. nov., a new species causing root and collar rot of deciduous tree species in Europe. *Mycological Research* 107: 772-789

Kamoun S (2005) A Catalogue of the effector secretome of plant pathogenic *Oomycetes*. *Annual Review of Phytopathology* 44: 2.1-2.20

Kamoun S, Young M, Förster H, Coffey MD, Tyler BM (1994) Potential role of elicitors in the interaction between *Phytophthora* species and tobacco. *Applied and Environmental Microbiology* 60(5): 1593-1598

Keller H, Blein JP, Bonnet P, Ricci P (1996) Physiological and molecular characteristics of elicitor-induced systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Physiology* 110: 365-376

Kessler A, Baldwin IT (2002) Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annual Review in Plant Biology* 53: 299-328

Khan N (2004) An evaluation of the effects of exogenous ethephon, an ethylene releasing compound, on photosynthesis of mustard *Brassica juncea* cultivars that differ in photosynthetic capacity. *BMC Plant Biology* 4, 21

Kirk P M, Cannon P F, David J C, Stalpers J A (eds.) (2001) *Dictionary of the fungi*, 9th edition. Wallingford: CAB International

Kizis D, Lumvveras V, Pagès M 2001 Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters* 498: 187-189

Koch K (2004) Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 235-246

Koehl J (2002) *Aufreinigung und Charakterisierung der Elicitorine von Phytophthora quercina*. München: Herbert Utz Verlag GmbH, 172 pp

Koehl J, Oßwald W, Kohn H, Elstner EF, Heiser I (2003) Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercinin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 261-269

Kogel KH, Beissmann B (1992) Isolation and characterization of elicitors. In: Linskens HF, Jackson JF (eds) *Plant Toxin Analysis*. Heidelberg: Springer Verlag, pp. 239-257

- Krause H, Weis E (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. *Photosynthesis Research* 5: 139-157
- Kuiper D (1993) Sink strength: Established and regulated by plant growth regulators. *Plant, Cell and Environment* 16: 1025-1026
- Kumar S, Rzhetsky A (1996) Evolutionary relationships of eukaryotic kingdoms. *Journal of Molecular Evolution* 42(2): 183-193
- Kusian B, Bowien B (1997) Organization and regulation of cbb CO₂ assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* 21: 135-155
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Latijnhouwers M, de Wit PJGM, Govers F (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* 11(10): 462-469
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49: 199-222
- 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
- Luu DT, Maurel C (2005) Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant, Cell and Environment* 28: 85-96
- Manter DK, Kelsey RG, Karchesy JJ (2007) Photosynthetic declines in *Phytophthora ramorum*-infected plants develop prior to water stress and in response to exogenous application of elicitors. *Phytopathology* 97(7): 850-856
- Martin VS (2005) Histologische, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Infektion von *Fagus sylvatica* mit *Phytophthora citricola*. Diplomarbeit am Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder J, Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*. *The EMBO Journal* 12: 2241-2247
- Maurel M, Robin C, Capron G, Deprez-Lousteau ML (2001a) Effects of root damage associated with *Phytophthora cinnamomi* on water relations, biomass, mineral nutrition and vulnerability to water deficit of five oak and chestnut species. *Forest Pathology* 31: 353-369
- Maurel M, Robin C, Capdevielle X, Lousteau D, Deprez-Lousteau ML (2001b): Effects of variable root damage caused by *Phytophthora cinnamomi* on water relations of chestnut saplings. *Annals of Forest Science* 58: 639-651

- Maurel M, Robin C, Simonneau T, Loustau D, Dreyer E, Desprez-Lousteau ML (2004) Stomatal conductance and root-to-shoot signalling in chestnut saplings exposed to *Phytophthora cinnamomi* or partial soil drying. *Functional Plant Biology* 31: 41-51
- Maxwell K, Johnson G (2000) Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of experimental botany* 51: 659-668
- Mcintyre JL, Hankin L (1978) An examination of enzyme production by *Phytophthora spp.* on solid and liquid media. *Canadian Journal of Microbiology* 24: 75-78
- Milat M, Ducruet J, Ricci P, Marty F, Blein J (1991): Physiological and structural changes in tobacco leaves treated with cryptogein, a proteinaceous elicitor from *Phytophthora cryptogea*. *Phytopathology* 81(11): 1364-1368
- Ndoumou DO, Tsalanzomo G, Djocgoue PF (1996) Changes in Carbohydrate, Amino Acid and Phenol Contents in Cocoa Pods from Three Clones after Infection with *Phytophthora megakarya* Bra. and Grif. *Annals of botany* 77(2): 153-158
- Nechwatal J, Oßwald W (2001) Comparative studies on the fine root status of healthy and declining spruce and beech trees in the Bavarian Alps and occurrence of *Phytophthora* and *Pythium* species. *Forest Pathology* 31: 257-273
- Nespoulous C, Huet JC, Pernollet JC (1992) Structure-function relationship of α and β elicitins, signal proteins involved in the plant-*Phytophthora* interaction. *Planta* 186: 551-557
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* (6): 255-262
- Nunn AJ, Anegg S, Betz G, Simons S, Kalisch G, Seidlitz HK, Grams TEE, Häberle KH, Matyssek R, Bahnweg G, Sandermann H, Langebartels C (2005) Role of ethylene in the regulation of cell death and leaf loss in ozone-exposed European beech. *Plant, Cell and Environment* 28: 886-897
- Olbrich M, Betz G, Gerstner E, Langebartels C, Sandermann H, Ernst D (2005) Transcriptome Analysis of Ozone-Responsive Genes in Leaves of European Beech (*Fagus sylvatica* L.). *Plant Biology* 7: 670-676
- Oßwald WF (2000) Biochemical defence reactions of woody plants infested with *Phytophthora* or *Pythium* fungi. In: Wilhelm E, Diamandis S (eds) *Proceedings of the Cost Action G4. Multidisciplinary Chestnut Research*, Thessaloniki, Greece, May 2000, pp. 1-15

- Oßwald W, Koehl J, Heiser I, Nechwatal J, Fleischmann F (2004) New insights in the genus *Phytophthora* and current diseases these pathogens cause in their ecosystem. *Progress in Botany* 65: 436-465
- Panabières F, Ponchet M, Allasia V, Cardin L, Ricci P (1997) Characterisation of border species among *Phythiaceae*: several *Pythium* isolates produce elicitors, typical from *Phytophthora* ssp. *Mycological Research* 101: 1459-1468
- Panopoulos NJ, Walton JD, Willis DK (1984) Genetic and biochemical basis of virulence in plant pathogens. In: Verma DPS, Hohn T (eds) *Genes Involved in Microbe-Plant Interactions*. Wien: Springer Verlag, pp. 339-374
- Parlevliet JE (1979) The co-evolution of host-parasite systems. *Symb Bot Upsal* 22(4): 39-45
- Paxton JD (1972) Toxin production by *Phytophthora megasperma* Drechsl. var. *sojae* Hild. In: Wood RKS, Ballio A, Graniti (eds.), *Phytotoxins in Plant Disease*. Academic Press, Inc., London and New York
- Pennazio S (1995) The hypersensitive reaction of higher plants to viruses: a molecular approach. *Microbiologica* 18: 229-240.
- Perrin, R (1984) Les activités pectinasiques de *Nectria ditissima* Tul., agent du chancre du hêtre. *European Journal of Forest Pathology* 14: 219-225
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30(9): 1-10
- Pierik R, Tholen D, Poorter H, Visser EJW, Voesenek LACJ (2006) The Janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. *Trends in Plant Science* 11(4): 176-183
- Plich M, Rudnicki RM (1979) Studies of the toxins of *Phytophthora cactorum* pathogenic to apple trees. 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, Pababières F, Milat ML, Mikes V, Montillet JL, Suty L, Trinantaphylides C, Tirilly Y, Blein JP (1999) Are elicitors cryptogams in plant-Oomycete communications? *Cellular and Molecular Life Sciences* 56: 1020-1047
- Porcel R, Aroca R, Azcón R, Ruiz-Lozano JM (2006) PIP aquaporin gene expression in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants in relation to drought stress tolerance. *Plant Molecular Biology* 60: 389-404

Preston G, Carroll T, Guggino W, Agre P (1992) Appearance of water channels in *Xenopus oocytes* expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385-387

Pritsch K, Marksteiner E, Blaschke H, Agerer R, Raidl S, Schloter M, Hartmann A (2004) A rapid and highly sensitive method for measuring enzyme activities in single mycorrhizal tips using 4-methylumbelliferone-labelled fluorogenic substrates in a microplate system. *Journal of Microbiological Methods* 58: 233-241

Przybył K, Dahm H, Ciesielska A, Moliński K (2006) Cellulolytic activity and virulence of *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi* isolates. *Forest Pathology* 36: 58-67

Qutob D, Kamoun S, Gijzen M (2002) Expression of a *Phytophthora sojae* necrosis-inducing protein occurs during transition from biotrophy to necrotrophy. *Plant Journal* 32: 361-373.

Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Brunetaeau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC (1989) Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance to tobacco. *European Journal of Biochemistry* 183: 555-563

Ricci P, Trentin F, Bonnet P, Venard P (1992) Differential production of parasiticein, an elicitor of necrosis and resistance in tobacco, by isolates of *Phytophthora parasitica*. *Plant Pathology* 41: 298-307

Ritter W (2005) Physiologische und histologische Untersuchungen an *Fagus sylvatica* nach Behandlung mit Welkefaktoren und Infektion mit *Phytophthora citricola*. Masterarbeit am Lehrbereich Krankheiten der Waldbäume der TUM - Technische Universität München; Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt; Center of Life and Food Science.

Roitsch T, Balibrea ME, Hofmann M, Proels R, Sinha AK (2003) Extracellular invertase: Key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany* 54: 513-524

Roitsch T, González MC (2004) Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in Plant Science* 9: 606-613

Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signaling in plants. *The Plant Cell* pp. 185-205

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

Ruppel EG (1966) Histology of resistant and susceptible seedlings of *Tephrosia vogelii* inoculated with *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. *Phytopathology* 56: 489-492

Rudolph K (1976) Non-specific toxins. In: Heitefuss R, Williams PH (eds) Physiological Plant Pathology. Berlin: Springer Verlag, pp. 270-315

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819

Schägger H, von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166(2): 368-379

Scheffer RP, Livingston RS (1984) Host-selective toxins and their role in plant diseases. *Science* 223: 17-21

Schramm RJ, Wolf FT (1954) The transpiration of black shank-infected tobacco. *Journal of the Mitchell Society* pp. 255-261

Schlösser E (1997) Allgemeine Phytopathologie. 2. überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Thieme Verlag

Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet DE, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346

Schreiber U (1997) Chlorophyll-Fluoreszenz und photosynthetische Energieumwandlung: Einfache einführende Experimente mit dem Teaching-PAM Chlorophyll Fluorometer. 2.120/01.97, 1. Ausgabe, Heinz Walz GmbH, Effeltrich

Schreiber U, Bilger W (1993) Progress in Chlorophyll Fluorescence Research: Major developments during the past years in retrospect. *Progress in Botany* 54: 151-173

Schubert R, Bahnweg G, Nechwatal J, Jung T, Cooke DEL., Duncan JM, Müller-Starck G, Langebartels C, Sandermann JRH, Oßwald W (1999) Detection and quantification of *Phytophthora* species which are associated with root-rot diseases in European deciduous forests by species-specific polymerase chain reaction. *European Journal of Forest Pathology* 29: 169-188

Sharma P, Børja D, Strougaard P, Lonnegorg A (1993) PR-proteins accumulating in spruce roots infected with a pathogenic *Pythium sp.* isolate include chitinases, chitosanases and β -1,3-glucanases. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 57-67

Sheard J, Farrar JF (1987) Transport of Sugar in *Phytophthora palmivora* (Butl.) Butl. *New Phytologist* 105(2): 265-272

Shively JM, van Keulen G, Meijer WG (1998) Something from almost nothing: carbon dioxide fixation in chemoautotrophs. *Annual Review of Microbiology* 52: 191-230

Shohet S, Strange RN (1989) Properties of a high molecular weight toxin produced by *Phytophthora drecksleri sp. cajani* in culture. In: Graniti A, Durbin

RD, Ballio A (eds) Phytotoxins and plant pathogenesis. Berlin: Springer-Verlag, pp. 393-394

Smart LB, Moskai WA, Cameron KD, Bennet AB (2001) MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. *Plant and Cell Physiology* 42: 686-693

Smith CJ (1996) Tansley review no. 86: Accumulation of phytoalexins: Defense mechanism and stimulus response system. *New Phytologist* 132: 1-45

Sutton PN, Gilbert MJ, Williams LE, Hall JL (2007) Powdery mildew infection of wheat leaves changes host solute transport and invertase activity. *Physiologia Plantarum* 129(4): 787-795

Tabita FR (1988) Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon fixation in microorganisms. *Microbiological Reviews* 52: 155-189

Taiz L, Zeiger E (2000) *Physiologie der Pflanzen*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag

Tanner W (1980) On the possible role of ABA on phloem unloading. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 93: 349-351

Tippett JT, O'Brien TP, Holland AA (1977) Ultrastructural changes in eucalypt roots caused by *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological Plant Pathology* 11: 279-286

Utkhede RS, Smith EM (1996) The effect of three irrigation practices on *Phytophthora* crown and root rot of apple trees under field conditions. *European Journal of Plant Pathology* 102: 507-510

Van Alfen NK (1989) Reassessment of plant wilt diseases. *Annual Review of Phytopathology* 27: 533-550

Van Kan JCL, Joosten MHCJ, Wagemakers CCM, Vanden Berg-Velthuis GCM, de Wit PJGM (1992) Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Molecular Biology* 20: 513-527

Van West P, Appiah AA, Gow NAR (2003) Advances in research on oomycete root pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 62: 99-113

Vleeshouwers VGAA, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT (2000) Does basal PR gene expression in *Solanum* species contribute to non-specific resistance to *Phytophthora infestans*? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 35-42

Voegele RT, Wirsel S, Möll U, Lechner M, Mendgen K (2006) Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae*

and Analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 625-634

Wang ZY (2003) The influence of *Phytophthora citricola* on rhizosphere soil solution chemistry and the nutritional status of european beech seedling. *Journal of Phytopathology* 151: 365-368

Wasternack C, Hause B (2000) Stressabwehr und Entwicklung: Jasmonate - chemische Signale in Pflanzen. *Biologie in unserer Zeit* 30(6): 312-320

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* pp. 244-255

Wood RKS (1967) *Physiological Plant Pathology*. Oxford: Blackwell Sci Publ, 570 pp

Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen NT, Dinoor A, Pines O, Prusky D (2001) *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 988-995

Yoshikawa M (1983) Macromolecules, recognition, and the triggering of resistance. In: Callow JA (ed) *Biochemical Plant Pathology*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd, pp. 267-97

Yoshikawa M, Yamaoka N, Takeuchi Y (1993) Elicitors: their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant Cell Physiology* 34: 1163-73

Yu LM (1995) Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4088-4094

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247-73

DANKSAGUNG

„Ein jegliches hat seine Zeit, und alles Vornehmen unter dem Himmel hat seine Stunde: Geboren werden und sterben, pflanzen und ausrotten, was gepflanzt ist, würgen und heilen, brechen und bauen, weinen und lachen, klagen und tanzen, Steine zerstreuen und Steine sammeln, Herzen und ferne sein von Herzen, suchen und verlieren, behalten und wegwerfen, zerreißen und zunähen, schweigen und reden, lieben und hassen, Streit und Friede hat seine Zeit. Man arbeite, wie man will, so hat man doch keinen Gewinn davon“ (Prediger 3: 1,9)

Jetzt ist Zeit zu Danken...

An erster Stelle möchte ich mit all meiner Liebe meinen Eltern, Juliana und João Selviro Portz danken, die während all dieser Jahre meines langen Vorhabens liebevoll zu mir gestanden haben. Mein Dank gilt auch meinen Geschwistern Gilberto Pedro, Lenir Terezinha und Márcio Alexandre, meinem Schwager Wolmar Haroldo Risse, meinen Schwägerinnen Solange Portz und Tatiana Martinazzo Portz, meinen Nichten Gabriela Portz und Sara Daniela Risse, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfgang Oßwald für die interessante Themenstellung und die Betreuung der Arbeit. Für die freundliche Aufnahme eines Brasilianers, für das Vertrauen, das mir für die Durchführung der Arbeit entgegengebracht wurde, möchte ich ihm herzlich danken.

Bei Prof. Dr. Rainer Matyssek möchte ich mich herzlich für wertvolle Gespräche und seine Bereitschaft zur Begutachtung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Frank Fleischmann für Anleitung und Durchführung unzähliger Arbeiten im Labor sowie für Korrekturlesungen und die nicht nur fachlichen Bereicherungen.

Ein herzliches Dankeschön an Dr. Julia Koehl für die geduldige und liebevolle Unterstützung während der gesamten Arbeit. Für ihr großes Engagement während der Zusammenschrift in Form vieler Anregungen, Hilfestellungen und Korrekturen der Texte.

Tina Schmidt und Johanna Lebherz danke ich herzlichst für die unersetzliche Unterstützung im Labor.

Prof. Dr. Jörg Fromm und Mitarbeitern, Institut für Holzforschung - Technische Universität München (TUM) danke ich für die transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Dr. Karin Pritsch, Institut für Bodenökologie - Helmholtz Zentrum München (GSF), danke ich für die Durchführung von Enzymaktivität-Messungen.

Bei den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Phytopathologie bedanke ich mich für die Hilfe bei den gaschromatographischen Messungen.

Den Diplomanden Angela Siemonsmeier und Alexander Haverkamp danke ich für deren Interesse an der *Phytophthora*-Welt und das freundliche Zusammenarbeiten.

PD Dr. Thorsten Grams danke ich für die stets ermunternden Worte.

Dr. Helmut Blaschke, Dr. Hans-Joachim Schuck, Dr. Karl-Heinz Häberle und Dr. Klaus Lang danke ich für die freundliche Aufnahme und die wertvollen Diskussionsrunden.

Allen weiteren Kollegen am Lehrstuhl für Ökophysiologie der Pflanzen und im Fachgebiet Krankheiten der Waldbäume Annett Gröger, Christian Clemenz, Daniel Kuptz, Dominik Farnady, Gustavo Luedemann, Hans Lohner, Ilse Süß, Josef Skrebsky, Manuela Blumenröther, Markus Löw, Mitsutoshi Kitao, Nina Koch, Peter Kuba, Thomas Feuerbach, Timo Gebhardt, Ursula Metzger sowie den Sekretärinnen Birgit Hoffmann, Helga Brunner, Karin Beerbaum und Martina Harnisch möchte ich für die Freundschaft und die schöne Zeit mit viel Kaffee und Tee am Institut danken.

Für die unzähligen Ablenkungen und fachlichen Reflexionen im „*Nirvana*“ danke ich Rosemarie Weigt und Wilma Ritter.

Vera Martin und Markus Wiltafsky, Michael Pfiz, Georg Kreis und Markus Steffens danke ich herzlichst für die Freundschaft und Ablenkung bei Wanderungen, Spiele- und Essen-Abenden.

Mein besonderer Dank gilt Frank Pfeiffer und Andrea Varga, die mir stets zur Seite standen.

Ein herzliches Dankeschön an alle meine Wohngemeinschaftsfreunde, für die freundliche Aufnahme.

Allen brasilianischen Freunden, besonders Ana Olsen, Alessandra Fidelis, Gustavo und Tatiana Luedemann, Guilherme und Cinthia Lepski, Carla und „Cleozinho“ Fernandes, André Messias, Éder Soares, Sabrina Pancera, Odair José kuhn und allen meinen auf dieser Welt verstreuten Freunden die ich hier nicht genannt habe, möchte ich ganz herzlich für ihre Liebe und ihr Vertrauen danken.

Bei Professor Dr. José Renato Stangarlin bedanke ich mich für dessen Freundschaft und das Erwecken meines Forschungsinteresses.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst danke ich für die Finanzierung des Stipendiums, besonders Frau Maria Salgado Martinez für die unermüdliche Bemühung bei der Bearbeitung vieler Fragen.

Herzlichst danke ich Roberta de Oliveira Verneck für ihr liebes da sein...

dem Herrn Jesus Christus

*„Denn von Ihm und durch Ihn
und für Ihn sind alle
Dinge“ (Römer 11,36)*

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Name: Roberto Luis Portz
 Geburtsdatum und -ort: 28.04.1977 Entre Rios do Oeste, Brasilien
 Adresse: Saída para Vista Alegre s/n, 85988-000 Entre Rios do Oeste, Brasilien
 E-Mail: portz_r@hotmail.com

Ausbildung:

2004 - 2007 Doktorarbeit (PhD) am Fachgebiet Pathologie der Waldbäume an der Technischen Universität München - Deutschland
 2001 - 2003 Masterstudium der Agrarwissenschaften (M.Sc.) an der Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasilien
 1996 - 2000 Studium der Agrarwissenschaften (Ing. Agr.) an der Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Brasilien
 1993 - 1995 Regulärer Sekundarunterricht - Colégio Estadual de Entre Rios, Entre Rios do Oeste, Brasilien

Stipendien:

2004 - 2007 DAAD - Deutschen Akademischen Austauschdienst, Deutschland
 2001 - 2003 CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brasilien
 1999 - 2000 CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC), Brasilien

Publikationen:

Kuhn OJ, Pascholati SF, Cardoso Filho JA, Portz RL, Osswald W (2006) Indução de resistência sistêmica em plantas: aspectos gerais, efeitos na produção e sobre microrganismos não-alvo. In: da Luz WC, José Maurício Cunha Fernandes JMC, Prestes AP, Picinini EC (Org.). Revisão Anual de Patologia de Plantas. 14: 249-300

- Kuhn OJ, Portz RL, Stangarlin JR, Montalván R, Schwan-Estrada KRF, Franzener G (2006) Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Semina. Ciências agrárias. 27(1): 13-20
- Portz RL, Stangarlin JR, Franzner G, Peña MIB, Furlanetto C (2006) *Meloidogyne* spp. associadas à cafeicultura em municípios do oeste do Paraná. Nematologia Brasileira. 30(1): 23-27
- Schultz SCV, Stangarlin JR, Franzener G, Portz RL, Kuhn OJ, Schwan-Estrada KRF (2006) Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. Semina. Ciências agrárias. 27(4): 515-524
- Portz RL, Kuhn OJ, Franzener G, Stangarlin JR (2006) Caracterização de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. Acta Scientiarum Agronomy. 28(3): 413-419
- Fleischmann F, Koehl J, Portz R, Beltrame AB, Oßwald W (2005) Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor "Citricolin" to pathogenesis. Plant Biology 7: 650-658
- Roese AD, Romani RD, Furlanetto C, Stangarlin JR, Portz RL (2001) Levantamento de doenças na cultura da soja, *Glycine max* (L.) Merrill, em municípios da região Oeste do Estado do Paraná. Acta Scientiarum. 23(5): 1293-1297
- Franzener G, Cassol LP, Stangarlin JR, Portz RL, Kuhn OJ, Faccioni R, Furlanetto C, Schwan-Estrada KRF, Cruz MS (2001) Ocorrência de doenças na cultura da mandioca em Marechal Cândido Rondon/PR e controle de *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* em manivas através de termoterapia e tratamento com extrato de *Artemisia camphorata*. Scientia Agraria Paranaensis. 1(2): 87-98