

Fachgebiet Forstgenetik

DNA-Methylierung nach abiotischen und biotischen Einflüssen und Expressionsanalyse pathogeninduzierter Gene in *Picea abies* (L.) Karst.

Ruediger Baumann

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer.nat., Dr. rer.nat.habil. G. Forkmann

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. forest. G. Müller-Starck

2. Univ.-Prof. Dr. rer.nat., Dr. rer.nat.habil. G. Wenzel

Die Dissertation wurde am 23.06.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 29.09.2004 angenommen.

1	Einleitung	1
1.1	Ökologische und ökonomische Bedeutung der Fichte	1
1.2	Aufbau des Fichtengenoms	2
1.3	DNA-Methylierung	3
1.4	„Parental effects“	5
1.5	<i>Sirococcus conigenus</i> – Ökologie, forstwirtschaftliche Bedeutung und Eignung als Modellart	6
1.6	Zielsetzung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Untersuchungsmaterial	10
2.1.1	<i>Picea abies</i>	10
2.1.1.1	Herkunft	10
2.1.1.2	Anzucht von Fichtenkeimlingen	12
2.1.1.3	Kreuzungsnachkommenschaften	12
2.1.1.4	Genetische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials mit EST-Markern	13
2.1.2	Referenzversuch: <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2.2	<i>Sirococcus conigenus</i> -Infektion in vitro	14
2.2.1	Kontrollierte Infektion und Probenentnahme	14
2.3	Hitzeschockbehandlung	14
2.4	DNA-, RNA-Isolation und mRNA-Aufreinigung	15
2.5	cDNA-Macroarray-Filter	15
2.5.1	Herstellung der Filter	16
2.5.2	Filterhybridisierung	17
2.5.2.1	cDNA-Synthese, radioaktive Markierung mit [³² P]dCTP und Hybridisierung	17
2.5.2.2	Auswertung der Macroarraydaten	18
2.6	Kapillarelektrophorese	19
2.6.1	Hydrolyse der DNA	19

2.6.2	Standards	19
2.6.3	Laufbedingungen	20
2.6.4	Auswertung der Kapillarelektrophoresedaten	21
2.6.4.1	Detektion der DNA-Basen und Bestimmung der relativen Methylierung	21
2.6.4.2	Statistische Auswertung	21
2.7	Klonierung und Sequenzierung des Phytochrom-O-Gens	22
2.7.1	Sequenzierung flankierender Genbereiche	26
2.8	Quantitative PCR	26
2.8.1	<i>Sirococcus conigenus</i> -spezifische qPCR	26
2.8.2	Messung der Transkription ausgesuchter Gene	27
2.8.2.1	cDNA-Synthese, qPCR-Bedingungen und Transkriptmessung	27
2.8.3	Auswertung der qPCR-Daten	29
3	Ergebnisse	30
3.1	Der Einfluss der Umweltbedingungen auf die gesamtgenomische Cytosinmethylierung	30
3.1.1	<i>Picea abies</i>	30
3.1.1.1	Genetische Charakterisierung der Kreuzungsnachkommenschaften	30
3.1.1.1.1	Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien	30
3.1.1.1.2	Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien	32
3.1.1.2	Bestimmung des 5-Methylcytosingehaltes in Vollgeschwisterfamilien aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten und Herkünften	34
3.1.1.3	Bestimmung des 5-Methylcytosingehaltes nach Hitzeschockbehandlung	37
3.1.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.2	Die Dynamik der Cytosinmethylierung in <i>P. abies</i>	41
3.2.1	Während der Ontogenese	41
3.2.2	Während Pathogeninfektion	43
3.3	Struktur des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i>	44

3.4	Expression stressinduzierter Gene nach Infektion mit <i>Sirococcus conigenus</i>	46
3.4.1	Nachweis des Infektionsverlaufes von <i>S. conigenus</i> durch qPCR	46
3.4.2	Analyse des Expressionverlaufs stressinduzierter Gene nach Infektion mit <i>Sirococcus conigenus</i>	47
3.4.2.1	Pilotexperiment zur Macroarrayhybridisierung	47
3.4.2.2	Blotting der cDNA Inserts und Macroarrayhybridisierung	50
3.5	Messung der Transkription ausgewählter Gene in einem quantitativen PCR-Assay	55
4	Diskussion	59
4.1	Genetische Charakterisierung der Kreuzungsnachkommenschaften	59
4.2	Charakterisierung des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i>	60
4.3	Der Einfluss abiotischer Faktoren auf die Cytosinmethylierung bei <i>P. abies</i>	63
4.3.1	Der Einfluss von Kreuzungsumwelt und Herkunft auf den 5-Methylcytosin-gehalt	63
4.3.2	Die Veränderung des 5-Methylcytosin-gehaltes in der DNA von Fichtenkeimlingen nach Hitzeschockbehandlung	67
4.3.3	Dynamik der Cytosinmethylierung während der Ontogenese	70
4.4	Der Einfluss biotischer Faktoren auf die Cytosinmethylierung bei der Fichte	74
4.5	Die Auswirkung von biotischem Stress auf die Genexpression der Fichte	74
4.5.1	Potentielle Funktion von in Cluster I zusammengefassten Gene in der Pathogenabwehr	77
4.5.2	Potentielle Funktion von in Cluster II zusammengefassten Genen in der Pathogenabwehr	77
4.5.3	Potentielle Funktion von in Cluster III zusammengefassten Genen in der Pathogenabwehr	82
4.5.4	Messung der Transkription ausgesuchter Gene in einem quantitativen PCR Assay	88
4.6	Schlussfolgerungen	89
5	Zusammenfassung – Summary	91
6	Literaturverzeichnis	95
7	Anhang	114

Tab. 1: Übersicht über das vom Norsk institutt for Skogforskning (Skogforsk, Ås/Norwegen) zur Verfügung gestellte Pflanzenmaterial. EST=genetische Charakterisierung mittels EST-Marker, CE=Bestimmung 5-Methylcytosingehaltes mittels Kapillarelektrophorese, Gesamtwärmesumme und Wärmesumme während der Embryogenese in dd (day dregree). Bestimmung nach Sarvas (1968), SD=short day 12-16h Licht in der Vegetationsperiode Mai-September, LD=long day 12-24h Licht in der Vegetationsperiode Mai-September.	11
Tab. 2: Nährlösung nach Ingestad (1979). Die Lösung wird in einer 1X Endkonzentration verwendet.	12
Tab. 3: Übersicht über die für die genetische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials verwendeten EST-Marker. PA= <i>Picea abies</i> .	13
Tab. 4: Name, Sequenz, Bindungsstelle in der cDNA-Sequenz und erwartete Mindest-Fragmentlänge für die Amplifikation des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i>	23
Tab. 5: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i> .	23
Tab. 6: Name, Sequenz, Kombination, Bindungsstelle in der cDNA-Sequenz und erwartete Fragmentlänge der für die Amplifikation nicht identifizierter Regionen des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i> verwendeten Primer.	25
Tab. 7: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation nicht identifizierter Regionen des Phytochrom-O-Gens von <i>P. abies</i> .	25
Tab. 8: Temperaturprofil der <i>Sirococcus conigenus</i> -spezifischen qPCR	27
Tab. 9: Name, Sequenz und Fragmentlänge der für die zur Messung der Transkription ausgesuchter Gene mittels qPCR verwendeten Primer	28
Tab. 10: Temperaturprofil der qPCR zur Messung der Transkription ausgesuchter Gene	28
Tab. 11: Temperaturprofil der Schmelzpunktanalyse	29
Tab. 12: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s. = nicht signifikant, ***=Signifikanzniveau.	31
Tab. 13: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15044 und 15046. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant, *=Signifikanzniveau.	31
Tab. 14: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15902 und 15905. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant.	32
Tab. 15: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15909 und 15914. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant.	32
Tab. 16: Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des χ^2 -Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s.= nicht signifikant.	33

- Tab. 17: Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15046 und 15044. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des χ^2 -Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s.=nicht signifikant. n.e.=nicht ermittelbar. 33
- Tab. 18: a-d Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des χ^2 -Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s. = nicht signifikant. 34
- Tab. 19: Menge (pg) an Pathogen-DNA/mg infiziertem Pflanzenmaterial. 46
- Tab. 20: Liste der untersuchten cDNA-Klone mit zugeordneter Funktion. n.i.=nicht identifiziert (nach Schubert 2002, aktualisiert 2004) 53
- Tab. 21: Durchschnittliche 5-Methylcytosin-Gehalte verschiedener Spezies. 73

- Abb. 1: Trennung von 30µg säurehydrolysiertes Kontroll-DNA (Lachssperma-DNA). C=Cytosin, mC=5-Methylcytosin, A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, U=Uracil. 20
- Abb. 2: Trennung von Basenstandards, 0.4mM/Base. C=Cytosin, mC=5-Methylcytosin, A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, U=Uracil. 20
- Abb. 3: Prozentsatz an 5-Methylcytosin in Vollgeschwisterfamilien von *P. abies* in Abhängigkeit von Kreuzungsumwelt, Tageslänge und Erntezeitpunkt. Umweltbedingungen der Vollgeschwisterfamilien: Siehe Tabelle 1. 35
- Abb. 4: Prozentsatz an 5-Methylcytosin in Vollgeschwisterfamilien von *P. abies* in Abhängigkeit von Kreuzungsumwelt, Tageslänge und Erntezeitpunkt. 36
- Abb. 5: Prozentualer Gehalt an 5-Methylcytosin in genomischer DNA aus Nadeln und Wurzeln von *P. abies* Keimlingen nach Hitzeschockbehandlung. 37
- Abb. 6: Drei und acht Wochen alter *P. abies*-Keimling und Einteilung in die untersuchten Organe. 38
- Abb. 7: Gehalt an 5-Methylcytosin in drei und acht Wochen alten Fichten-Keimlingen aus Tieflagenherkunft nach Hitzeschockbehandlung. 39
- Abb. 8: Einfluss von Hitzeschockbehandlung auf die 5-Methylcytosinergehalte in Wurzeln Stängeln und Nadeln von acht Wochen alten Fichten-Keimlingen der Tieflagenherkunft. 40
- Abb. 9: Prozentualer Anteil von 5-Methylcytosin am Gesamtcytosin in genomischer DNA von *A. thaliana* aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten und nach Kälteschockbehandlung, KB=Kältebehandlung. 41
- Abb. 10: Dynamik der Cytosinmethylierung in der DNA von *P. abies*-Keimlingen aus Tieflagenherkunft in verschiedenen ontogenetischen Stadien. 42
- Abb. 11: Vergleich der entwicklungsabhängigen Gehalte an 5-Methylcytosin in der DNA aus Embryonen, 1.5 Wochen und 2 Monate alten Keimlingen von *P. abies* aus Hoch- bzw. Tieflagenherkunft. 43
- Abb. 12: Methylierung in Fichtenkeimlingen nach Infektion mit *S. conigenus* 5, 18 und 35 Tage nach Infektion (DAI). 44
- Abb. 13: Nachweis der Länge des Phytochrom-O-Introns durch PCR-Amplifikation. 1=1kb+Ladder (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) 2=Fragment aus cDNA, 3=entsprechendes Amplifikat aus genomischer DNA. 45
- Abb. 14: Struktur des Phytochrom-O-Gens der Fichte und Vergleich mit der bekannten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number U60264). 5'-UTR= 5'-untranslatierter Bereich, 3'-UTR = 3'-untranslatierter Bereich. 45
- Abb. 15: Menge an pathogenspezifischer DNA im Verlauf der Infektion von Fichtenkeimlingen mit *S. conigenus*. 47
- Abb. 16: Pilotexperiment zur Filterhybridisierung. Horizontal: **A**=pPA0001 (Chlorophyll A/B bindung protein), **B**=pPA0012 (ribosomal RNA-gene), **C**=pPA0075 (CAD-gene), **D**=pPA0031 (Ubiquitin-gene), **E**=Kontrolle (leeres Plasmid pSport1). Vertikal: **1**=1.5 µg/µl Plasmid-DNA, **2**=2.5 µg/µl Plasmid DNA, **3**=3.5 µg/µl Plasmid-DNA, **4**=PCR-amplifiziertes Plasmid-Insert (200ng/µl), **5**= PCR-amplifiziertes Plasmid-Insert (400ng/µl). 48

- Abb. 17: Im Griddingverfahren hergestellte Macroarray-Filter. a=Verwendung unmittelbar nach der Herstellung, b=nach sechs Wochen, c=nach acht Wochen, d=Schema der aufgebrauchten DNA-Proben. Zahlen entsprechend der Nummer der cDNA-Klone. 130=Plasmid-Kontrolle, 90= Negativ-Kontrolle H₂O. 49
- Abb. 18: Beispiel für eine Macroarray-Hybridisierung und Schema der im Blotting-Verfahren aufgebrauchten cDNA-Klone. Zahlen entsprechen den Nummern der cDNA-Klone. 131=Plasmid-Kontrolle pSport 1, 85 & 93 = Negativ Kontrolle H₂O. DAI=days after infection. 51
- Abb. 19: Auf dem *Modified Morisita's Similarity*-Koeffizienten basierend berechnetes WPGMA-Cluster der in der Macroarray-Analyse nach Pathogenstress untersuchten Gene. 52
- Abb. 20: Expressionsverlauf der Gene in den Clustern I-III zwischen dem fünften und dem 35. Tag nach Infektion. 5 DAI=5 Tage nach Infektion, 18 DAI =18 Tage nach Infektion, 35 DAI=35 Tage nach Infektion. 55
- Abb. 21: qPCR Amplifikation des Klasse IV Chitinase-Gentranskripts im Vergleich zum endogenen Referenzgen α -Tubulin. 5, 18, 35 DAI=5, 18, 35 Tage nach Infektion mit *S.conigenus*.(R)=Replikat 56
- Abb. 22: Gegenüberstellung der qPCR-Befunde (linke Bildhälfte) und der entsprechenden Macroarray-Analyse (rechte Bildhälfte). DAI=days after infection 58
- Abb. 23: Phytochrom Gene in *A. thaliana* und in ihre phylogenetischen Vorläufer in Koniferen 62
- Abb. 24: Struktur des Phytochrom A Gens von *A. thaliana* und Vergleich mit der bekannten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number X17341). 5'-UTR= 5'-untranslatierter Bereich, 3'-UTR = 3'-untranslatierter Bereich. 62
- Abb. 25: Bildung der Terminalknospe bei Pflanzen gleicher Herkunft in unterschiedlichen Umgebungen. a.) Vergleich Harz-Norwegen; b.) Vergleich Tirol-Norwegen. (Johnsen, Ås/Norwegen, pers. Mitteilung). 64
- Abb. 26: Induktion von Hitzeschockproteinen in den Nadeln und Wurzeln acht Wochen alter Fichtenkeimlinge. (Valcú, TUM, Freising/Deutschland, pers. Mitteilung). 69
- Abb. 27: Aufteilung der in Cluster II zusammengefassten Gene auf zwei Subcluster IIa und IIb. DAI=Tage nach Infektion. 81
- Abb. 28: Einordnung der nach Pathogenstress exprimierten Gene in funktionelle Gruppen. 86

Abkürzungen

μM	mikromolar
A	Adenin
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
DAI	Tage nach Infektion <i>days after infection</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EST	<i>expressed sequence tag</i>
fm	Festmeter
FoA	Forstamt
G	Guanin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie <i>high performance liquid chromatography</i>
kDA	KiloDalton
M	Mol
mC	5-Methylcytosin
mM	Millimolar
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MS-AFLP	methylation sensitive amplified fragment length polymorphism
n.e.	nicht ermittelbar
n.s.	nicht signifikant
NADH	Nicotinamid-Adenin Dinucleotid-Hydroeen
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion <i>polymerase chain reaction</i>
pm	picomolar
qPCR	quantitative PCR
RADP	<i>random amplified polymorphic DNA</i>

RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
SDS	Natriumdocecylsulfat <i>sodium dodecyl sulphate</i>
sHSP	kleines Hitzeschockprotein <i>small heat shock protein</i>
SSR	<i>simple sequence repeat</i>
STS	<i>sequence tagged site</i>
T	Thymin
U	Uracil

1 Einleitung

1.1 Ökologische und ökonomische Bedeutung der Fichte

Picea abies (L.) Karst. ist in ihrer natürlichen Ausbreitung auf die nördliche Halbkugel beschränkt und lässt sich systematisch in zwei Unterarten einteilen, die europäische (ssp. *abies*) und die sibirische (ssp. *obovata*) Varietät (Schmidt-Vogt 1977). Als Klimaxbaumart ist sie fester Bestandteil des Bergmischwaldes, zusammen mit den Koniferengattungen *Abies*, *Larix* und *Pinus* prägt sie den borealen Nadelwaldgürtel. Das natürliche Areal der europäischen Fichte dehnt sich von Mitteleuropa bis zum 69. Breitengrad in Skandinavien aus und reicht bis etwa zum 55. Längengrad in das kontinentale Nordrussland hinein. Die sibirische Fichte findet sich vom westlichen Vorland des Urals bis zur ostasiatischen Küste (Schmidt-Vogt 1977). Das natürliche Verbreitungsgebiet der europäischen Fichte (*P. abies*) unterteilt sich in das alpine, das herzyno-karpatische und das baltische Areal (Huntley und Birks 1983, Schmidt-Vogt 1986 und Lagerkrantz und Ryman 1990). Aus dem ausgedehnten Verbreitungsgebiet mit heterogenen klimatischen und standörtlichen Bedingungen wird die große ökologische Amplitude der Art deutlich (Schmidt-Vogt 1977). Morphologisch gesehen ist die Fichte eine flachwurzelnde halbschattentolerante Art mit geringer Trockentoleranz, die nur mäßige Ansprüche an die Nährstoffversorgung ihres Standortes stellt (Schütt *et al.* 1992). Sie stockt vor allem auf gut durchlüfteten, sauren bis alkalischen Böden und weist einen geringen Wärmebedarf auf. Ihr standörtliches Optimum findet die Fichte in niederschlagsreichen montanen Vegetationszonen Mittel- und Osteuropas.

Bedingt durch die hohe Massenleistung wurde die Fichte seit Beginn des 19. Jahrhunderts auch außerhalb ihres natürlichen Areals verstärkt angebaut (Schmidt-Vogt 1977). Dieser Anbau fand oft auf ungeeigneten Standorten und in der Form von Monokulturen statt, was in den letzten Jahren zu großen ökologischen und ökonomischen Problemen in Form von Sturmwürfen (Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft 2003) und großflächig auftretenden Borkenkäferkalamitäten (Feemers *et al.* 2003, Lobinger 2004) geführt hat. Fichtenbestände verfügen dennoch nach wie vor über den größten Anteil an der Waldfläche. Dieser liegt bundesweit bei 3,3 Mio. Hektar, entsprechend 33% der Gesamtwaldfläche (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft 2002). Im waldreichsten Bundesland Bayern beträgt der Anteil 1,2 Mio. Hektar, entsprechend 48% der Gesamtwaldfläche (Bayr. Staatsforstverwaltung 2002). Die ökonomi-

sche Bedeutung der Fichte wird deutlich, wenn man den Einschlag von Fichtenholz in der Bundesrepublik Deutschland im Forstwirtschaftsjahr 2002 betrachtet. Dieser lag bei 19,8 Mio. fm (Gesamtholzeinschlag: 39,3 Mio. fm). Geringe Anteile an Lärchen und Douglasienrohholz werden dem Fichtenholzeinschlag zugerechnet und nicht separat ausgewiesen. Im gleichen Jahr wurden 10,6 Mio. fm Laubholz (Eiche, Buche und sonstiges Laubholz) und 8,9 Mio. fm Kiefernholz eingeschlagen (Bundesministerium für Verbraucher-schutz, Ernährung und Landwirtschaft 2002).

1.2 Aufbau des Fichtengenoms

P. abies verfügt über eine Chromosomenanzahl von $2n=24$ und besitzt ein relativ großes Genom von $1,5\text{-}3 \times 10^{10}$ Basenpaaren (Paglia und Morgante 1998, Kirst *et al.* 2003). Der GC-Gehalt der DNA beträgt ca. 41% (Siljak-Yakovlev 2002). Die Kenntnisse um Struktur und Zusammensetzung des Kerngenoms sind allerdings im Vergleich zu anderen Arten verschwindend gering. Untersuchungen haben gezeigt, dass das Genom zu 75% aus repetitiver DNA in nichtkodierenden Bereichen besteht (Dhillon 1987). Es wurden verschiedene Klassen von repetitiver DNA nachgewiesen. *Satellite DNA repeats* mit Längen zwischen 150 und mehreren tausend Basenpaaren sind in Koniferen allerdings nur selten beschrieben (Schmidt *et al.* 2000). In diesen besteht ein großer Teil der repetitiven DNA aus hintereinander angeordneten, nur 2-5 bp langen Wiederholungssequenzen (Mikrosatelliten) von geringer Komplexität. Mikrosatelliten wurden in vielen Pflanzenarten beschrieben und sind aufgrund ihrer weiten Verbreitung, ihrer hohen Variabilität in der Anzahl der Wiederholungen und ihrer Multilokusverteilung als hoch informative Marker für die Analyse und Kartierung von Genomen geeignet (Schmidt *et al.* 2000). Das große Fichtengenom und das hohe Vorkommen repetitiver DNA-Sequenzen führt allerdings häufig dazu, dass durch Mikrosatelliten-Marker bevorzugt nichtkodierende Sequenzen detektiert werden, deren Auswertung sich schwierig gestaltet (Echt *et al.* 1996; Soranzo *et al.* 1998). Anonyme Mikrosatelliten-, RAPD- und AFLP-Marker haben generell den Nachteil, dass sie meist entfernt von exprimierten DNA-Bereichen liegen und somit von Evolutionsprozessen (z. B. Selektion) nicht betroffen sind (Scotti *et al.* 2000). Anstelle von anonymen Sequenzen bietet sich die Möglichkeit, exprimierte Gensequenzen durch die Entwicklung von EST-Markern in Genkarten einzubauen (Gilpin *et al.* 1997; Cato *et al.* 2001). Die lokusspezifischen, kodominant vererbten EST-Marker bieten unter anderem die Vorteile, dass sie oftmals mit bestimmten phänotypischen Merkmalen assoziiert sind und es möglich ist, dass das Gen selbst auf diesen Phänotyp Einfluss nimmt, außerdem können Ge-

ne, die nur unter bestimmten Umweltbedingungen exprimiert werden, gezielt kartiert werden (Cato *et al.* 2001). Unter den entsprechenden Bedingungen können Marker für die Erstellung einer genetischen Kopplungskarte verwendet werden, die sowohl Studien zur Populationsbiologie der Fichte als auch über Evolutions- bzw. Selektionsereignisse ermöglicht. Für populationsbiologische Studien werden ungekoppelte Marker, die das komplette Genom abdecken, verwendet. Für Studien zur Selektion können anhand der Kopplungskarte genomische Regionen ausgeschieden werden, an denen Selektionsereignisse stattfinden (Binelli und Bucci 1994). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten EST-Marker wurden auf der Grundlage einer elizitor-induzierten cDNA-Bank (Galliano *et al.* 1993) entwickelt (Riegel 2001, Schubert *et al.* 2001, Bozhko *et al.* 2003). Diese Marker wurden zur Charakterisierung von Vollgeschwisterfamilien die unter verschiedenen Umweltbedingungen erzeugt wurden, herangezogen. Außerdem wurde versucht umweltbedingte Segregationsdistortionen nachzuweisen.

1.3 DNA-Methylierung

Die Methylierung von DNA spielt eine essentielle Rolle in der Genregulation und der Organisation genomischer DNA (Singal und Ginder 1999, Finnegan *et al.* 2000). Generell unterdrückt Methylierung die Transkription von Genen oder Genabschnitten durch Unterbinden der Anlagerung von Transkriptionsfaktoren. In pflanzlichen Systemen treten modifizierte Cytosinnukleotide auf, die an der fünften Stelle des Cytosinrings eine Methylgruppe tragen. Diese 5-Methylcytosinbausteine finden sich vor allem in den symmetrischen Sequenzen CpG und CpNpG und in nicht symmetrischen Sequenzen wie CpApTp und CpTpT.

Es ist nachgewiesen, dass die Methylierung von DNA Entwicklungsprozesse reguliert, die in speziellen Geweben sowie während verschiedener Wachstumsphasen stattfinden. In Mais und *Arabidopsis* konnte beispielsweise der Einfluss der Methylierung auf die differentielle Expression mütterlicher und väterlicher Gene während der Samenentwicklung nachgewiesen werden (Finnegan *et al.* 2000). In *Pinus radiata* wurden Unterschiede im Methylcytosin Gehalt von Nadelteilen (Fraga *et al.* 2000) und in verschiedenen alten Pflanzen (Fraga *et al.* 2002) gemessen. Umweltbedingungen, wie zum Beispiel Kälteeinwirkung, können eine Signalwirkung für Methylierungsänderung haben. In *A. thaliana* wurde dies am Beispiel der Vernalisation, der Beeinflussung der Keimstimmung durch Kälte, gezeigt (Dennis *et al.* 1996). In Koniferen wurde eine derartige Beeinflussungen der DNA-Methylierung durch Umwelteinflüsse bisher noch nicht nachgewiesen.

Für den Nachweis der Cytosinmethylierung stehen verschiedene Analyseverfahren zur Verfügung. Es kann dabei zwischen gesamtgenomischen Ansätzen, genomabschnittsspezifischen und basengenauen Methoden unterschieden werden (Rein *et al.* 1998).

Für die gesamtgenomische Messung eignet sich vor allem die Bestimmung der Basenanteile genomischer DNA nach saurer, basischer oder enzymatischer Hydrolyse. Die Hydrolyseprodukte können durch verschiedene Methoden wie z.B. Papier- und Dünnschichtchromatographie, Massenspektrometrie, HPLC und Kapillarelektrophorese analysiert werden. Eine weitere Analyse mit sehr hoher Sensitivität ist der immunochemische Nachweis. Dieser eignet sich vor allem für kleinere Genome und basiert auf der Entwicklung von Antikörpern, wie z.B. dem Anti-(5-Methylcytidin)-Antikörper, die spezifisch für eine Basenmodifikation sind. In einem Southern-Blot-Assay können solche Antikörper die DNA identifizieren, die von Restriktionsenzymen wie *HpaII* auf Grund von Cytosinmethylierung nicht geschnitten wird und so der 5-Methylcytosingehalt quantitativ bestimmt werden (Lottspeich und Zorbas 1998). Immunofluoreszenz-Techniken sind auch geeignet, um auf Chromosomen oder in Gewebepräparaten Regionen mit erhöhtem Gehalt an 5-Methylcytosin nachzuweisen (Zluvova *et al.* 2001, Bitonti *et al.* 2002).

Genomabschnittsspezifische Methoden setzen vor allem Restriktionsenzyme für den Nachweis von Methylierung ein. Einige Restriktionsenzyme können DNA nicht schneiden wenn bestimmte Nukleotide in den Erkennungsstellen methyliert vorliegen, wohingegen für andere Enzyme diese Modifikation obligatorisch vorliegen muss um zu schneiden. Diese Restriktionsenzyme können verwendet werden, um ortsspezifische Cytosinmethylierungen zu identifizieren. Die Methode ist daher auf das Auftreten von DNA-Modifikationen innerhalb der Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen beschränkt. Die Sichtbarmachung der Spaltungsprodukte erfolgt entweder über Southern-Blot oder PCR-Methoden wie z.B. die methylierungssensitive AFLP-Methode (MS-AFLP) (Ashikawa 2001).

Den höchsten Informationsgehalt bieten hochauflösende Methoden zur Kartierung der Cytosinmethylierung in der Nukleotidsequenz der untersuchten DNA. Diese Methode besteht aus zwei Teilschritten: erstens der differentiellen chemischen Modifikation der DNA und zweitens der Sequenzierung der zu untersuchenden Genomabschnitte, um modifizierte Basen zu erkennen. Lottspeich und Zorbas (1998) und Rein *et al.* (1998) beschreiben drei Methoden zur DNA-Modifikation: Die differentielle Modifikation mit Hydrazin, Permanganat und Bisulfit. Letztgenannte ist die am häufigsten angewandte Methode (Rein *et al.* 1998). Gründe sind die relativ leichte Handhabung und die hohe Auflösung, welche die Methode bietet. Bisulfit (HSO_3^-) katalysiert in einzelsträngiger DNA die Konver-

sion von Cytosin, nicht aber von 5-Methylcytosin zu Uracil. Die zu untersuchenden Regionen werden dann mittels PCR zu spezifischer Doppelstrang-DNA amplifiziert. Da die beiden DNA-Stränge nach der Konversion nicht mehr komplementär zueinander sind, muss jeder Strang mit den jeweils passenden Primern einzeln untersucht werden. Der Amplifikationsprozess führt zu einer Transformation von Uracil, in der Ausgangs-DNA Cytosin, zu Thymin und von 5-Methylcytosin zu Cytosin. Auf dem komplementären Strang des PCR-Produktes wird Guanin (gegenüber Cytosin) zu Adenin transformiert. Die generierten PCR-Produkte können entweder direkt oder nach Klonierung sequenziert werden, um so Anteil und Lage der 5-Methylcytosinnukleotide basengenau nachzuweisen (Frommer *et al.* 1992, Fulnecek 2002). Die Methode eignet sich für den Nachweis von 5-Methylcytosin bei Vorliegen von Sequenzinformationen über den zu untersuchenden Genomabschnitt. Aufgrund der geringen Informationen über die Sequenz des Fichtengenoms, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss verschiedener Umweltbedingungen auf den Status und die Dynamik des gesamtgenomischen 5-Methylcytosingehaltes überprüft werden. Dies wird durch die kapillarelektrophoretische Trennung hydrolysierter DNA-Proben realisiert.

1.4 „Parental effects“

Zur Beschreibung der Begriffe „Parentaleffekte“ (parental effects) und „umweltinduzierte Parentaleffekte“ (environmentally induced parental effects) sollen die Definitionen von Lacy (1998) verwendet werden.

Parental effect:

„A parental effect is any parental influence on offspring phenotype that cannot be attributed solely to offspring genotype, to the direct action of the nonparental components of the offspring's environment, or to their combination“

Dieser Effekt bezeichnet das phänotypische Produkt der Weitergabe von Informationen von den Eltern an die Nachkommen, die zusätzlich zum elterlichen Anteil an der genetischen Ausstattung der Nachkommen stattfindet. Der Parentaleffekt zeigt sich in der Modifikation des Phänotyps der Nachkommen.

Environmentally induced parental effect

“An environmentally induced parental effect is one that (1) is initiated by an environmental stimulus in the parental generation and (2) cannot be exclusively attributed to parental genotypes.”

Es handelt sich hierbei um die Interaktion zwischen dem elterlichen Genotyp und seiner Umwelt und der Expression dieser Interaktion in der nächsten Generation. Der umweltbeeinflusste Parentaleffekt beginnt, sobald der elterliche Genotyp auf einen unabhängig erfahrenen Stimulus aus seiner Umwelt reagiert und die Information darüber an seine Nachkommen auf verschiedenste Weise weitergibt. Die Fähigkeit zur Reaktion auf den Stimulus und der Weitergabemodus können zwischen den Genotypen variieren. Das Ergebnis ist aber in jedem Fall eine phänotypische Modifikation von Merkmalen der Nachkommen. Die zugrundeliegende genetische Basis für die elterliche Fähigkeit auf die Umweltbedingungen zu reagieren und der Prozess der Informationsweitergabe bestimmen über die Persistenz umweltbeeinflusster Effekte.

Bei Pflanzen konnte die starke Korrelation zwischen den Umweltbedingungen denen die Eltern ausgesetzt waren und dem Phänotyp der Nachkommen nachgewiesen werden. So zeigte sich beispielsweise in *Picea abies*, dass das Verhalten der Nachkommen im jährlichen Wuchsrhythmus, der Ausbildung der Frosthärte (Johnsen 1989a, Johnsen *et al.* 1995, 1996), dem Höhenwachstum (Johnsen 1989b), der Lignifizierung und der Bildung des Johannistriebes abhängig ist von der jeweiligen Umweltbedingung während Kreuzung und Samenreife (Bjørnstad 1981, Johnsen und Østreg 1994). Auch zeigten Fichten aus Saatgut das in einer warmen Umgebung produziert wurde den Phänotyp von Individuen dieser Herkunft unabhängig von der Herkunft der Kreuzungseltern (Johnsen *et al.* 1989, Skrøppa 1994, Skrøppa *et al.* 1994). In einigen Fällen zeigte sich allerdings beim Vergleich der Nachkommen unterschiedlich behandelte Klone, die unter den gleichen Bedingungen aufgezogen wurden, dass die Effekte nicht über mehrere Jahre persistent waren, nach einigen Vegetationsphasen nur noch abgeschwächt auftraten oder sogar ganz verloren gingen (Stoehr *et al.* 1998). Bei annualen Pflanzen kam es ebenfalls zu einer durch die Eltern vermittelten Beeinflussung der Nachkommen. Untersucht wurden hier der Einfluss von Nährstoffverfügbarkeit (Durrant 1958, 1962, Hill 1967, Cullis 1977, 1981, 1999, Galloway 2001) Temperatur (Highkin 1958, 1961) und Photoperiode (Galloway 2001, Munir *et al.* 2001). Parentaleffekte konnten in *Pisum* (Highkin 1958, 1961) und *Nicotiana* (Hill 1967) über mehrere Generation nachgewiesen werden.

1.5 *Sirococcus conigenus* – Ökologie, forstwirtschaftliche Bedeutung und Eignung als Modellart

Der Erreger des Fichtentriebsterbens, *Sirococcus conigenus* (D.C.) P. Cannon & Minter (Syn.: *Sirococcus strobilinus* Preuss) ist systematisch in die Gruppe der Deuteromycetes

oder *Fungi imperfecti* einzuordnen. Das Pathogen ist über weite Teile der nördlichen Hemisphäre verbreitet, verfügt über ein breites Wirtsspektrum und befällt vor allem Fichten-, Kiefern- und Tsuga-Arten. Die bedeutensten Schäden treten an *Picea pungens*, *P.sitchensis*, *Pinus contorta* und *Tsuga heterophylla* (Bahnweg *et al.* 2000) auf. Vor allem Baumschulen und Pflanzgärten sind betroffen (Magasi *et al.* 1975, Butin 1986).

Die Krankheit zeichnet sich durch den Befall der jüngsten Triebe aus, deren Nadeln zunächst vergilben und dann in der Mitte und an der Basis abfallen. Die Triebspitzen weisen eine deutliche Krümmung auf. Im Sommer bilden sich an den toten Trieben und Nadeln kleine schwarzbraune Pyknidien, die bei entsprechender Feuchtigkeit Tropfen und Ranken mit zweizeiligen, farblosen Konidien entlassen (Butin 1989). Wenn im Zuge der fortschreitenden Infektion die Elongationszone der Triebe erreicht wird, kommt es zu Wuchsveränderungen und schlimmstenfalls zu Zuwachseinbußen (Schütt *et al.* 1992). Neben den Schäden an Sämlingen und Jungpflanzen ist *S. conigenus* verantwortlich für Verlichtungserscheinungen und das Absterben der Kronen, die in älteren Fichtenbeständen beobachtet wurden (Neumüller 1994). Der Befall dieser Baumpopulationen tritt vor allem in Beständen auf, die sich durch ungünstige Klimabedingungen, ungeeignete Standorte (Bahnweg *et al.* 2000, Anglberger und Halmschlager 2003), vorausgegangenen Insektenbefall (Austarå *et al.* 1987), Fegeschäden (Pollanschütz 1995) und durch Luftverschmutzung (Halmschlager *et al.* 1999) prädisponiert für Pathogenbefall zeigen.

Forstwirtschaftliche Bedeutung gewinnt das Pathogen zum einen durch das Auftreten in Pflanzgärten und Baumschulen und zum anderen durch den zunehmenden Befall älterer Bestände. Klein (1987) und Halmschlager *et al.* (2000) konnten in 35- bzw. 20jährigen Fichtenbeständen mit starken Befallserscheinungen signifikante Verluste im Durchmesser- und Höhenzuwachs nachweisen. Im benachbarten Bayerischen Wald (FoA Passau und Freyung) wurde *Sirococcus*-Befall in Fichtenaltbeständen auf einer Fläche von 850 Hektar nachgewiesen. Die befallenen Bestände stockten zu 70% auf Böden mit Granit als Ausgangsgestein, die sich durch eine für die Fichte ungünstige Nährstoffausstattung, vor allem mit Kalzium und Magnesium, auszeichnen. Betroffen sind weiterhin vor allem nord- und westexponierte Kuppen- und Oberhanglagen mit vergleichsweise hoher Luftfeuchtigkeit und einer Durchschnittstemperatur während der Vegetationsperiode von ca. 11-12°C. In den österreichischen Befallsgebieten wurde versucht dem Befall mit Düngemaßnahmen zu begegnen um den Magnesiummangel auszugleichen. Es konnte daraufhin ein Anstieg des Anteils nicht befallener Bäume von 54 auf 71 % (Anglberger und Halmschlager 2003) bzw. 71 auf 87 % (Jandl *et al.* 2000) festgestellt werden. Für die forstliche Praxis wird empfohlen die Düngung zur Bestandesstabilisierung durchzuführen, längerfristig

allerdings durch geeignete Maßnahmen wie z.B. Bestandesumbau und durch die Auswahl geeigneterer Baumarten an den betroffenen Standorten waldbaulich zu reagieren (Helfer *et al.* 2004).

In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen wurde das Nadelpathogen *Sirococcus conigenus* für die Infektion von Fichtenkeimlingen verwendet. Zum einen lässt sich das Infektionssystem gut handhaben, zum anderen sollte im Zuge des Experiments erstmals der Verlauf der Infektion durch einen neu entwickelten quantitativen PCR-Assay nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Berichte über das Auftreten von *Sirococcus*-Befallssituationen scheint es zudem sinnvoll, die Wechselwirkungen zwischen dem Pathogen und einer Art aus seinem Wirtsspektrum zu untersuchen.

1.6 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit dient die Fichte als Modellbaumart für die Untersuchung abiotischer und biotischer Einflüsse auf die DNA-Methylierung sowie deren epigenetische Weitergabe. Die Untersuchung der abiotischen Einflüsse bezieht sich primär auf die jahrzehntelange Vorarbeit einer norwegischen Arbeitsgruppe (Skogforsk Ås/ Norwegen), die in zahlreichen Versuchen den Einfluss der Umweltbedingungen während der Kreuzung auf den Phänotyp der Nachkommen studiert hat.

Um zu überprüfen, ob sich Selektionsereignisse während der Kreuzung und Embryogenese auf die genetische Ausstattung der Nachkommen und somit deren Phänotyp auswirken, soll zunächst eine genetische Charakterisierung der untersuchten Vollgeschwisterfamilien durchgeführt werden.

Zum Nachweis umweltabhängiger Änderungen von Methylierungsprozessen auf der Basis verifizierbarer genetischer Variation soll der Anteil an methyliertem Cytosin in der genomischen DNA der Vollgeschwisterfamilien bestimmt werden.

Um zudem den Einfluss kurzzeitig einwirkender, extremer Umweltbedingungen auf die DNA-Methylierung zu untersuchen, sollen zusätzlich Fichtenkeimlinge aus zwei unterschiedlichen Herkünften einer Hitzeschockbehandlung unterzogen und die Gehalte an methyliertem Cytosin in der DNA der Keimlinge gemessen werden.

Die Bestimmung des Methylcytosingehaltes der Fichten-DNA während verschiedener Entwicklungsstadien sowie nach Pathogeninfektion soll Aufschluss über die Dynamik der DNA-Methylierung während der Ontogenese und nach einem biotischen Stressereignis geben.

Die Arbeit verfolgt das Ziel, die Genexpression nach Pathogeninfektion mit molekularbiologischen Methoden zu untersuchen um so exemplarisch Reaktionsmechanismen darzustellen, die die Fichte als Antwort auf biotischen Stress aktiviert.

2 Material und Methoden

2.1 Untersuchungsmaterial

2.1.1 *Picea abies*

2.1.1.1 Herkunft

Für die Untersuchungen zur Genexpression und zur Änderung des 5-Methylcytosingehaltes nach Pathogeninfektion wurde aus Saatgut der Fichtenherkunft 84030 (Füssen/Allgäu) gewonnenes Pflanzenmaterial verwendet. Das Saatgut wurde vom Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP, Teisendorf/Deutschland) zur Verfügung gestellt. Für die Untersuchungen zur Änderung des 5-Methylcytosingehaltes nach Hitzeschock wurde Saatgut aus zwei Fichtenbeständen verwendet. Zum einen aus einem autochthonen Fichtenbestand mit der Herkunftsbezeichnung Westerhof. Im Samenreifejahr 1971 wurde dieser in das Wuchsgebiet 84008 eingeordnet. Diese Wuchsgebietnummer bezeichnet Bestände der kollinen Stufe (Hügelland bis 300m ü. NN). Das aus diesem Saatgut erzeugene Pflanzenmaterial wird in der Arbeit als Tieflagenherkunft bezeichnet. Zum anderen wurde Saatgut der Herkunft Füssen verwendet. Der Herkunftsbestand stockt im Wuchsgebiet 84030 (montane Stufe 1400-1800m ü. NN) und wird in der vorliegenden Arbeit als Hochlagenherkunft bezeichnet. Das Saatgut der Herkunft Westerhof wurde von der Niedersächsischen Forstlichen Versuchsanstalt (NFV, Escherode/Deutschland) das Saatgut der Herkunft Füssen vom Amt für forstliche Saat- und Pflanzenzucht (ASP, Teisendorf/Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Saatgut der beiden Herkünfte wurde auch für die Bestimmung des 5-Methylcytosingehaltes von Endosperm und Keimlingen verwendet.

Saatgut und Pflanzenmaterial für die genetische Charakterisierung ebenso wie ein Teil der für die Messung 5-Methylcytosingehaltes benötigten DNA-Proben wurden vom Norsk institutt for skogforskning (Skogforsk, Ås/Norwegen) zur Verfügung gestellt. Die Umweltbedingungen während Kreuzung und Embryogenese, das Kreuzungsjahr, die durchgeführten Untersuchungen sowie das untersuchte Stadium können für die Vollgeschwisterfamilien aus Tabelle 1 entnommen werden.

Tab. 1: Übersicht über das vom Norsk institutt for Skogforskning (Skogforsk, Ås/ Norwegen) zur Verfügung gestellte Pflanzenmaterial. EST=genetische Charakterisierung mittels EST-Marker, CE=Bestimmung 5-Methylcytosingehaltes mittels Kapillarelektrophorese, Gesamtwärmesumme und Wärmesumme während der Embryogenese in dd (day dregree). Bestimmung nach Sarvas (1968), SD=short day 12-16h Licht in der Vegetationsperiode Mai-September, LD=long day 12-24h Licht in der Vegetationsperiode Mai-September.

Voll-geschwister-familie	Eltern ♀ x ♂	Gesamt-wärme-summe	Wärme-summe Embryo-genese	Tages-länge	Kreuzungs-jahr	Unter-suchung	Untersuchtes Stadium	Bezeich-nung im Text
15887	2735x F2014	2111 dd	1611 dd		1998	EST	Saatgut	warm
15890	2735x F2014	1141 dd	641 dd		1998	EST	Saatgut	kalt
15044	2736 x 1957	1115 dd	615 dd		1993	EST,CE	Saatgut (EST) Pflanzenmaterial (CE)	kalt
15046	2736 x 1957	1874 dd	1374 dd		1993	EST,CE	Saatgut (EST) Pflanzenmaterial (CE)	warm
15902	1957 x 5994	1879 dd	1379 dd	SD	2001	EST	Pflanzenmaterial	warm/SD
15905	1957 x 5994	1879 dd	1379 dd	LD	2001	EST	Pflanzenmaterial	warm/LD
15909	1957 x 5994	909 dd	409 dd	SD	2001	EST	Pflanzenmaterial	kalt/SD
15914	1957 x 5994	909 dd	409 dd	LD	2001	EST	Pflanzenmaterial	kalt/LD
15884	2650 x 2707	1841 dd	1341 dd		1998	CE	Pflanzenmaterial	warm
15886	2650 x 2707	1141 dd	641 dd		1998	CE	Pflanzenmaterial	kalt

2.1.1.2 Anzucht von Fichtenkeimlingen

Tab. 2: Nährlösung nach Ingestad (1979). Die Lösung wird in einer 1X Endkonzentration verwendet.

Lösung 1/5 (100x Stammlösung): (Hochdruckautoklaviert)	14.3 g/l NH_4NO_3 1.3 g/l NaCl 7.1 g/l KCl 15.2 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
Lösung 2/5 (100x Stammlösung): (Hochdruckautoklaviert)	14.7 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
Lösung 3/5 (100x Stammlösung): (Hochdruckautoklaviert)	4.4 g/l KH_2PO_4
Lösung 4/5 (1000x Stammlösung): (Hochdruckautoklaviert)	980 mg/l H_3BO_3 88 mg/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 80 mg/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 520 mg/l $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 20 $\mu\text{l/l}$ H_2SO_4
Lösung 5/5 (1000x Stammlösung): (sterilfiltriert)	2.8 g/l $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3.8 g/l $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Zur Anzucht von Fichtenkeimlingen wurden die, in den entsprechenden Versuchen verwendeten Fichtensamen über Nacht in sterilem dH_2O unter Rühren inkubiert. Die Oberflächensterilisation erfolgte für 30 Minuten in 30% H_2O_2 , gefolgt von zweimaligem Waschen der Samen mit dH_2O . Ca. 600 Samen wurden in sterilen Anzuchtschalen (60x20x22cm BxHxT) ausgelegt. Als Substrat wurde hitzesterilisierter Vermikulit verwendet. Das Substrat wurde mit 900ml/Schale 1x-Nährlösung (Tab. 2) getränkt. Die Anzucht der Samen erfolgte in einem Klimaschrank bei 17°C und 70% Luftfeuchte sowie einer 16-stündigen Photoperiode.

2.1.1.3 Kreuzungsnachkommenschaften

Vier Vollgeschwisterfamilien (15887, 15980, 15044 und 15046) aus vier verschiedenen Kreuzungsumwelten wurden im Samenstadium untersucht. Informationen über die Eltern und die Umweltbedingungen während Kreuzung und Embryogenese können Tabelle 1

entnommen werden. Die Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914 wurden als Feldpopulationen untersucht.

2.1.1.4 Genetische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials mit EST-Markern

Die Identifizierung der Genotypen der Kreuzungseltern 2736, 1957, 2735, F2014 und 5994 sowie die Untersuchung von DNA-Polymorphismen im entwicklungsfähigen Saatgut und im Pflanzenmaterial aus den Feldpopulationen wurde mit Hilfe der in Riegel (2001), Schubert *et al.* (2001) und Bozhko *et al.* (2003) beschriebenen und in Tabelle 3 zusammengestellten EST-Marker durchgeführt.

Tab. 3: Übersicht über die für die genetische Charakterisierung des Untersuchungsmaterials verwendeten EST-Marker. PA= *Picea abies*

Marker	Funktion
PA0002	54% Homologie mit Typ A Cyclin aus <i>A. capillus veneris</i>
PA0005	84% Homologie mit <i>Zea mays</i> Cyclophilin-Protein
PA0034	<i>P. abies</i> mRNA für ein hypothetisches Protein
PA0038	<i>P. abies</i> mRNA für ein Halotoleranz-Protein
PA0043	86% Homologie mit dem 78 kDa Glucoseregulierten Protein aus <i>N. tabacum</i>
PA0066	78% Homologie zum 60S ribosomalen Protein L13-2 aus <i>B. napus</i>
CAD	Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase Gen Marker

2.1.2 Referenzversuch: *Arabidopsis thaliana*

Die Veränderungen im 5-Methyl-Cytosinegehalt genomischer DNA in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltbedingungen während der Kreuzung wurde in *Arabidopsis thaliana* bestimmt. Hierfür wurden *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., Ökotyp Columbia Col-O N1093 - Pflanzen (Arabidopsis Information Service (AIS)-Collection, Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC), Nottingham/Grossbritannien) unter Langtag-Bedingungen (16h Licht) bei Temperaturen von 25°C (warm) und 15°C (kalt) geselbstet. Die Pflanzen aus den so gewonnenen Samen wurden zunächst in MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) angezogen, nach drei Wochen auf Erde umgesetzt und für weitere drei Wochen in der Klimakammer bei 20°C, 8 h Licht und 60 % relativer Luftfeuchte bis zur Ausbildung von Blattrosetten gehalten. Zur Applikation von Froststress wurden die Pflanzen zunächst

über Nacht in eine mit 2°C temperierte Klimakammer überführt und danach für 2,5 h Temperaturen von -5°C ausgesetzt. Nach Frostexposition wurde die Klimakammer wieder auf 2°C erwärmt und die Pflanzen für sechs Stunden bei dieser Temperatur belassen um danach in die Ausgangsklimakammer (20°C, 8h Licht und 60% relative Luftfeuchte) zurückgeführt zu werden. Die Probenentnahme erfolgte an zwei Tagen. Es wurden mit Froststress behandelte Nachkommen aus Warm (25°C)- und Kalt (15°C)-Kreuzungen sowie die entsprechenden ungestressten Kontrollen entnommen und bis zur DNA-Isolation bei -80°C tiefgefroren. Die Kreuzungen sowie die Kältebehandlung wurden am Forstbotanischen Institut der Universität Göttingen durchgeführt.

2.2 *Sirococcus conigenus*-Infektion *in vitro*

2.2.1 Kontrollierte Infektion und Probenentnahme

Nach einer dreiwöchigen Wachstumsphase erfolgte die kontrollierte Infektion der Fichtenkeimlinge mit *Sirococcus conigenus* Sporensuspension (62,5 mM KH₂PO₄, 5,5 mM Glucose, 0,1% Tween 20 pH 6,0, 10⁵-10⁶ Sporen/ml Suspension, zur Verfügung gestellt von Dr. G. Bahnweg, GSF/Neuherberg). Die Infektion wurde mit einem handelsüblichen Pumpzerstäuber durchgeführt. Vier Anzuchtschalen mit jeweils 100ml Sporensuspension behandelt. Als Kontrolle wurden 4 weitere Schalen mit sporenfreier Suspension besprüht. Eine der Anzuchtschalen blieb völlig unbehandelt.

Am Tag nach der Infektion wurden die Proben aus der unbehandelten Schale (*unbehandelt*) entnommen. Die Entnahme der infizierten (5, 10, 18, 28, 35 und 60 DAI) und entsprechenden nicht-infizierten Pflanzenproben erfolgte 5, 10, 18, 28, 35 und 60 Tage nach der Infektion (DAI=*days after infection*). Es wurden jeweils 2000 mg Pflanzenmaterial für die verschiedenen Untersuchungen entnommen und sofort nach der Entnahme bei -80°C tiefgefroren.

2.3 Hitzeschockbehandlung

Um die Auswirkungen einer kurzzeitigen Exposition gegenüber erhöhten Temperaturen (Hitzeschock) auf den 5-Methylcytosingehalt der genomischen DNA zu untersuchen wurden Fichtenkeimlinge einer Hitzeschockbehandlung unterzogen. Für diesen Versuch wurden Fichtenkeimlinge, die aus Saatgut der Hoch- und Tieflagenherkunft angezogen wur-

den, verwendet. Die Samen wurden vor der Aussaat nach der in Kapitel 2.1.1.2 beschriebenen Methode behandelt. Nach drei- bzw. achtwöchiger Anzucht bei einer Temperatur von 20°C und 16-stündiger Photoperiode wurden die Keimlinge einer Hitzeschockbehandlung unterzogen.

Hierfür wurden die Pflanzen zunächst für 15 min einer Temperatur von 42°C ausgesetzt. Nach einer dreistündigen Erholungsphase bei 20 °C erfolgte ein erneuter Hitzeschock bei 42°C für eine Stunde. Nach neun Stunden bei 20 °C wurde das Pflanzenmaterial geerntet und nach Nadeln, Stängel und Wurzeln getrennt in flüssigem Stickstoff gefroren und bis zur weiteren Untersuchung bei –80°C gelagert.

2.4 DNA-, RNA-Isolation und mRNA-Aufreinigung

Genomische DNA für die genetische Charakterisierung mittels EST-Marker wurde unter Verwendung des DNeasy Plant Kits (Qiagen, Hilden/Deutschland) aus Saatgut und Pflanzenmaterial isoliert.

Die für die Untersuchung des 5-Methylcytosingehaltes durch Kapillarelektrophorese benötigte DNA wurde aus jeweils 100mg Probenmaterial unter Verwendung des Nucleon Phytotopure Kits (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg/ Germany) isoliert. 100mg Probenmaterial entsprachen dabei ca. 8-10 Nadelkränzen, 10-15 Stängeln und 10-15 Wurzeln von Fichtenkeimlingen. Bei der DNA-Isolation wurde nach Anweisung der Hersteller verfahren. Die isolierte DNA wurde in hochreinem H₂O (MilliQ grade) gelöst und bei –20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

GesamtRNA für die Hybridisierungsversuche und das quantitative PCR-Assay wurde unter Verwendung des Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) isoliert. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Die für die cDNA-Synthese benötigte messengerRNA (mRNA) wurde mit dem Oligotex® mRNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden/Deutschland) nach Herstellerprotokoll aufgereinigt.

2.5 cDNA-Macroarray-Filter

Im Gegensatz zur Microarray-Technologie, bei der mehrere hundert bis zehntausend Sequenzinformationen, DNA-Moleküle, Oligonukleotide etc. auf entsprechend beschichteten Glas-Objektträger (*slides*) aufgebracht und für screening-Experimente eingesetzt werden können, wurde für die im Folgenden beschriebenen Versuche die Macroarraytechnik ge-

nutzt. Die Verwendung dieser weniger aufwändigen und wesentlich kostengünstigeren Methode bot sich für die Überprüfung der 128 cDNA-Klone an.

2.5.1 Herstellung der Filter

Die Inserts von 128 komplett sequenzierten cDNA-Klonen (Nageisky 1999; Schubert *et al.* 2001) aus einer elizitor-induzierten *P. abies*-cDNA-Bank (Galliano *et al.* 1993) wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primersequenzen wurden aus der Sequenz des Klonierungsvektors pSport1 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) abgeleitet. 150 ng der aus Bakterienkulturen isolierten DNA wurde in einem 25 µl PCR Ansatz amplifiziert. Der PCR Ansatz wurde nach der Reaktion und der Kontrolle der Ergebnisse im Agarosegel im Verhältnis 1:100 verdünnt und jeweils 5 µl in einem 100 µl PCR- Ansatz eingesetzt. Der Vorgang wurde vier mal wiederholt um mindestens 400 µg/µl-PCR-Produkt zu erhalten. Nach Qualitätskontrolle im Agarosegel und Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer (Genequant, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg/Germany) wurden die PCR-Produkte durch Filterzentrifugation (Nanosep 30 K Omega Centrifugal Devices, PALL LifeSciences GmbH; Dreieich/Deutschland) aufgereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Als Trägermedium für das Blotten der PCR-Produkte wurden positiv geladene Nylonmembrane (*HybondTM-N+*, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg/ Germany) mit einer Fläche von 11.9 x 7.8 cm verwendet.

Die Membrane wurden vor dem Blotten der DNA für 10 Minuten in dH₂O inkubiert. Die Konzentration der DNA-Proben wurde mit Denaturierungslösung (0.5 M NaOH, 1.5M NaCl) auf 2ng/µl in einem Endvolumen von 200µl eingestellt.

Nach Einlegen in die Blotting-Vorrichtung (Bio-Dot Micro-filtration Apparatus, Bio-Rad Laboratories Portland/USA) erfolgte eine Equilibrierung der Membran mit 19,2 ml Denaturierungslösung (200 µl/Spot), gefolgt vom Auftragen von 200µl DNA-Lösung. Durch Anlegen eines Vakuums im unteren Teil der Blotting-Vorrichtung wurden die Proben auf die Membran aufgebracht. Jede DNA-Probe wurde an zwei verschiedene Stellen des Filters aufgetragen. Auf das Blotten folgte das Spülen der Membran mit 48 ml Denaturierungslösung (500µl/Spot). Zum Renaturieren und Equilibrieren wurde die Membran anschließend für 5 Minuten in Renaturierungslösung (0.5M Tris HCl pH 7.0, 1.5 M NaCl) und 5 Minuten in 2xSSC (0.3 M NaCl, 3 mM Na-Citrat, pH 7.0) inkubiert. Die Bindung der DNA an die Membran erfolgte nach einer kurzen Trocknungsphase durch UV-Crosslinking mit einer

Gesamtenergie von 150mJ in einem Hoefer UV Crosslinker (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg/Germany).

2.5.2 Filterhybridisierung

2.5.2.1 cDNA-Synthese, radioaktive Markierung mit [³²P]dCTP und Hybridisierung

Verwendete Puffer und Lösungen

20X SSC
3M NaCl
0.3M Na-Citrat
pH 7,0

100X Denhardt´s
20 g/l Ficoll 400
20 g/l Polyvinylpyrrolidon K30
10 g/l Rinderserumalbumin (BSA)

Hybridisierungspuffer
5x SSC
5x Denhardt´s
25mM NaH₂PO₄ pH 6,5
0,1%SDS
100 µg/ml einzelsträngige Heringssperma DNA

Für die radioaktive Markierung der Hybridisierungssonde wurde aus der in Kap. 2.5. beschriebenen mRNA in einer Reverse Transcriptase-Reaktion cDNA synthetisiert. Dafür wurde das *SuperScript™ One-Step RT-PCR System* (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) verwendet. Es wurden 1µg mRNA/Probe für die Versuche eingesetzt. Abweichend von den Angaben des Herstellers wurde die mRNA zunächst im Vakuumkonzentrator getrocknet und dann in 8 µl [³²P]dCTP rückgelöst. Die mRNA wurde dann in Anwesenheit von 1µl 50µM Oligo(dT)₂₀ -Primer und 1µl 10mM dNTP-Mix (ohne dCTP) für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe des cDNA-Synthese Mixes bestehend aus 2µl 10xRT-Puffer, 4µl 25mM MgCl₂, 2 µl 0.1M DTT, 40 Units RNaseOUT™ und 200 Units SuperScript™III Reverse Transcriptase erfolgte die cDNA-Synthese für 50 Minuten bei 50°C. Nach Beenden der Reaktion durch Inkubation der Proben bei 85°C für 5 Minuten erfolgte eine Entfernung der verbliebenen RNA durch Zugabe von 1U RNase H und einer Inkubation für 20 Minuten bei 37°C. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit Hilfe des

QIAquick Nucleotide Removal Kit® (Qiagen GmbH, Hilden/Deutschland) nach Protokoll des Herstellers entfernt. Die Einbauraten des radioaktiv markierten Phosphors wurden mit Hilfe eines Scintillations-Zählers bestimmt.

Zur Hybridisierung der DNA-Blots mit der radioaktiv markierten Sonde wurden jeweils drei Membrane (Membrane I - III) zusammen mit dem Hybridisierungspuffer in Folienbeutel eingeschweißt und für zwei Stunden bei 65 °C prähybridisiert. Nach Öffnen der Folienbeutel wurde die radioaktiv markierte Sonde zupipettiert und der Versuchsansatz, nach Wiederverschließen, über Nacht bei 65 °C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membrane zwei Mal bei 37°C für 15 Minuten in 2X SSC, 0.5% SDS sowie ein Mal bei 60°C für 30 Minuten in 0.5X SSC, 0.5% SDS gewaschen und noch feucht in Klarsichtfolie verpackt um anschließend auf Phosphorimagerplatten exponiert zu werden. Nach einer Expositionszeit von 60 Stunden wurden die Platten mit dem Phosphorimager (Fuji BASreader 1800II, Raytest GmbH, Straubenhardt/Deutschland) gescannt und die Signalintensität der Hybridisierungsreaktion zwischen cDNA-Sonde und auf dem Filter fixierter DNA für die spätere Auswertung gespeichert.

2.5.2.2 Auswertung der Macroarraydaten

Um die Intensität der Hybridisierungssignale zu quantifizieren, wurden die im Phosphorimager erhobenen Daten mit dem AIDA Array Analysis Software Package (Raytest GmbH, Straubenhardt/Deutschland) ausgewertet. Dabei wurden von den im Gerät gemessenen Intensitätswerten die Werte der Hintergrundstrahlung abgezogen und der jeweils ermittelte Wert für weitere Auswertungen gespeichert. Nach Vergleich der Datensätze wurden alle nicht-eindeutigen Werte ausgefiltert. Aus den Intensitätswerten der Wiederholungen wurde ein Mittelwert gebildet und die Werte für die infizierten Proben (5 DAI, 18 DAI und 35 DAI) zu den entsprechenden Kontrollen ins Verhältnis gesetzt.

Die Berechnung der Ähnlichkeit zwischen den Klonen wurde mit dem Multivariate Statistical Package - MVSP (Kovach 1994) durchgeführt.

Der Modified Morisita Koeffizient mit der Formel:

$$MMc_{ij} = \frac{2 \sum_{k=2}^n x_{ik} x_{jk}}{\left[\sum_{k=1}^n (x_{ik}^2 / N_i^2) + \sum_{k=1}^n (x_{jk}^2 / N_j^2) \right] N_i N_j}$$

<p>i, j = Reihe der Datenmatrix k = Spalte der Datenmatrix n = Anzahl der Variablen</p>

wurde der Berechnung zugrunde gelegt. Um eine Gruppierung der Klone ohne Verzerrungen durch den unterschiedlichen Umfang der einzelnen Klongruppen zu erreichen wurde eine WPGMA Cluster Analyse durchgeführt und die Klone gemäss ihrem Expressionsverhalten in die Cluster sortiert.

2.6 Kapillarelektrophorese

Um Aussagen über den Methylierungsstatus der untersuchten DNA-Proben machen zu können, wurde der prozentuale Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamtcytosin Gehalt basierend auf dem von Fraga *et al.* (2000) entwickelten Protokoll, mittels Kapillarelektrophorese gemessen. Es wurde hierfür ein 3D HPCE-Gerät der Firma Agilent Technologies (Agilent Capillary Electrophoresis Systems – Agilent Technologies, Palo Alto/USA) verwendet.

Verwendeter Laufpuffer

16mM NaHCO₃ pH 9.6

20mM SDS

2.6.1 Hydrolyse der DNA

Um die einzelnen Basen der DNA elektrophoretisch auftrennen zu können wurden die Proben einer saueren Hydrolyse unterzogen. Hierfür wurden 30µg DNA/Probe in 2ml 88%iger Ameisensäure (Sigma-Aldrich, München/Deutschland) für 90 Minuten bei 140°C inkubiert. Für die Inkubation wurden Hochdruck-Veraschungs-Gefässe mit PFA (Perfluoralkoxy) - Innenwandungen verwendet (Schramel *et al.* 1996). Nach Beenden der Hydrolyse wurden die abgekühlten Proben in 2 ml-Reaktionsgefässe überführt und in einem Vakuumkonzentrator (SPD 121P–SpeedVac Plus, Thermo Electron GmbH, Dreieich/Deutschland) getrocknet. Nach Abschluss der Trocknung wurden die Proben in 50 µl Laufpuffer rückgelöst und analysiert.

2.6.2 Standards

Zur Überprüfung der korrekten Hydrolyse der DNA-Proben wurden 30µg Lachssperma DNA (Sigma-Aldrich, München/Deutschland) unter den gleichen Bedingungen wie die zu untersuchenden Proben behandelt und elektrophoretisch getrennt (Abb. 1). Zur Eichung des Systems und zur Feststellung der Retentionszeiten der einzelnen Basen wurde im

Verlauf der Probenläufe ein Gemisch von DNA-Basen in bekannten Konzentrationen aufgetrennt. Die DNA-Basen Thymin, Adenin, Cytosin und Guanin sowie zusätzlich Uracil und Methyl-Cytosin (alle Standards: Sigma-Aldrich, München/Deutschland) wurden nach Herstellerangaben gelöst und auf Konzentrationen von 0,4 und 0,8 mM je Base eingestellt (Abb. 2). Uracil diente als Kontrolle auf RNA-Verunreinigungen in den Proben.

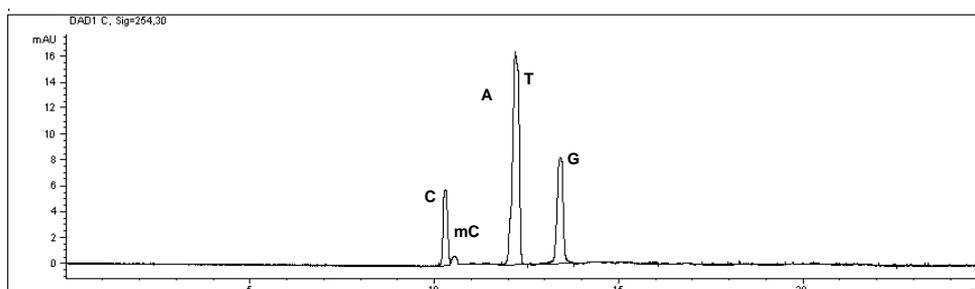


Abb. 1: Trennung von 30 µg säurehydrolysiertes Kontroll-DNA (Lachssperma-DNA). C=Cytosin, mC=5-Methylcytosin, A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, U=Uracil.

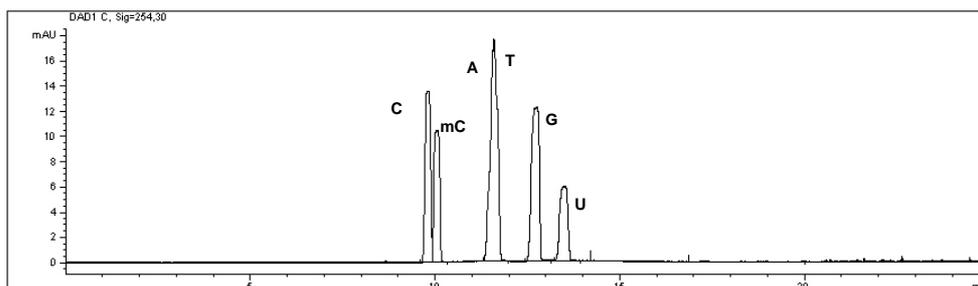


Abb. 2: Trennung von Basenstandards, 0.4mM/Base. C=Cytosin, mC=5-Methylcytosin, A=Adenin, T=Thymin, G=Guanin, U=Uracil.

2.6.3 Laufbedingungen

Die elektrophoretische Trennung der hydrolysierten DNA-Basen wurde in einer unbeschichteten Quarzkapillare (uncoated fused silica capillary G6100-1600, Agilent Technologies Palo Alto/USA) mit einem Innendurchmesser von 75 µm und einer Länge von 60 cm (effektive Länge 56 cm) durchgeführt. Zur Konditionierung wurde die Kapillare vor der ersten Trennung für 20 Minuten mit 1M NaOH, für 20 Minuten mit dH₂O und für 30 Minuten mit 16 mM NaHCO₃ pH 9.6 gespült. Vor jeder Trennung wurde die Kapillare für 15 Minuten mit Laufpuffer equilibriert. Die Proben wurden hydrodynamisch für vier Sekunden

mit 50mbar Druck injiziert. Die Trennung der Basen erfolgte nach Anlegen von 10kV für 25 Minuten. Die Stromstärke wurde automatisch angepasst. Die Temperatur der Kapillarenkassette wurde konstant auf 22°C gehalten. Nach jedem Trennvorgang wurde die Kapillare für drei Minuten mit 1M NaOH, für zwei Minuten mit 1mM NaOH und für 1 Minute mit hochreinem H₂O (MilliQ grade) gespült.

2.6.4 Auswertung der Kapillarelektrophoresedaten

2.6.4.1 Detektion der DNA-Basen und Bestimmung der relativen Methylierung

Die Detektion der Basen erfolgte über die Messung der Absorption bei 256nm. Diese wurde mit einem UV-Dioden Array Detektor (Wellenlängenbereich 190-600 nm) am herstellerseitig in der Kapillare ausgesparten Messfenster durchgeführt.

Die Peaks der Elektropherogramme wurden den entsprechenden DNA Basen zugeordnet. Dies geschah durch Vergleich der gemessenen Retentionszeiten mit denen durch Trennung der Standards festgestellten.

Die Peaks wurden mit Hilfe der Auswertungssoftware (HP ChemStation) integriert und die so erhaltenen Flächenwerte für weitere Berechnungen verwendet. Die relative Methylierung der untersuchten Proben-DNA wurde als Verhältnis der Peakflächen des methylierten Cytosins zum Gesamtcytosin bestimmt und als prozentualer Wert wiedergegeben.

2.6.4.2 Statistische Auswertung

Die Daten aus der kapillarelektrophoretischen Messung wurden einer *Analysis of Variance* (ANOVA) unterzogen. Die Analyse wurde mit dem GLM (General Linear Model) Package der Software Statistica 6.0 (StatSoft, Tulsa/USA) durchgeführt. Alle Berechnungen wurden zunächst als *full-model* unter Einbeziehung aller interagierender Faktoren durchgeführt. Nach Ausschluss aller nicht-signifikanten Interaktionen wurde das Modell neu berechnet. Die *post-hoc* Vergleiche der Mittelwerte wurde in einem Tukey-Test durchgeführt.

2.7 Klonierung und Sequenzierung des Phytochrom-O-Gens

Für die Sequenzierung des Phytochrom-O-Gens von *P. abies* wurden, basierend auf der publizierten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number U60264) Primer generiert, um die gesamte Sequenz aus genomischer DNA von *P. abies* zu amplifizieren. In Tabelle 4 werden die Primer (Thermo Electron GmbH, Ulm/Deutschland) mit Ihren entsprechenden Bindungstelle in der cDNA-Sequenz sowie der Mindestlänge der zu erwartenden PCR-Fragmente angegeben. Die 50µl PCR-Reaktionen bestanden aus 1X Reaktionspuffer, 0,2mM je dNTP, 1,5mM MgCl₂, 2,5 pmol *forward* Primer, 2,5 pmol *reverse* Primer, 100ng genomischer DNA und 1U Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland). Die Reaktionsbedingungen können Tabelle 5 entnommen werden. Die Reaktion wurde in einem Eppendorf Thermocycler durchgeführt.

Tab. 4: Name, Sequenz, Bindungsstelle in der cDNA-Sequenz und erwartete Mindest-Fragmentlänge für die Amplifikation des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*

Primer	Sequenz	Bindungsstelle (basierend auf cDNA-Sequenz)	Erwartete Fragmentlänge
PHYO 1 for	5'-atg ccg tgc att tta gca tt-3'	32 - 51	507 bp
PHYO 1 rev	5'-atg gaa cgc tgc tgc tat ct-3'	539 - 520	
PHYO 2 for	5'-cca gac acc agt aga tgc ga-3'	433-452	510bp
PHYO 2 rev	5'-agg cat cac agg ctc aaa gt-3'	943-924	
PHYO 3 for	5'-tga acc caa tat tcg tcc gt-3'	840-859	555bp
PHYO 3 rev	5'-acc aga gat gca atg gaa cc-3'	1395-1376	
PHYO 4 for	5'-gtg ccc ctc ctg tga atg ta-3'	1263 - 1282	596bp
PHYO 4 rev	5'-ctg ctt ctg caa gac tgt cg-3'	1859 - 1840	
PHYO 5 for	5'-tgg gga cca ctc cta ctg ag-3'	1755 - 1774	583bp
PHYO 5 rev	5'-ccc tgt gag ttc agc tgc tt-3'	2338 - 2319	
PHYO 6 for	5'-tga aac tgc aac tgt gcc a-3'	2254 - 2272	532bp
PHYO 6 rev	5'-caa aaa cct ctc cca caa gc-3'	2786 - 2767	
PHYO 7 for	5'-agt gga atc cag caa tgg aa-3'	2706 - 2725	499bp
PHYO 7 rev	5'-ctg ccg ttg aca taa tgc ac-3'	3205 - 3186	
PHYO 8 for	5'-atg gca gaa cag gca gct at-3'	3038 - 3057	533bp
PHYO 8 rev	5'-ggg aat ccc ttg tcc tga at-3'	3571 - 3552	
PHYO 9 for	5'-agg atg ggt tgg gaa taa gg-3'	3466 - 3485	515bp
PHYO 9 rev	5'-caa ggg aat ttt tgc ctg gt-3'	3981 - 3962	

Tab. 5: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*.

Temperaturprofil
I 94°C, 2 min Anfangsdenaturierung
II 94°C, 30 sec
III 55°C, 30 sec
IV 72°C, 2 min
30x Schritte II-IV
72°C, 2 min
4°C bis Ende

Die PCR-Fragmente wurden in Nanosep Omega 30K Säulen (Pall GmbH, Dreieich/Deutschland) aufgereinigt. Hierfür wurde das PCR-Produkt zunächst mit hochreinem H₂O (MilliQ grade) auf 100µl Volumen aufgefüllt und nach Auftragen des gesamten Ansatzes auf die Aufreinigungssäule bei 5000rpm so lange zentrifugiert bis dieser auf 20µl konzentriert war. Die PCR-Produkte wurden an einen Sequenzierservice (GATC, Freiburg/Deutschland) zur Sequenzierung abgegeben. Nach Auswertung der Sequenzen wurden in Länge und Sequenz von der cDNA-Sequenz abweichende Regionen des Phytochrom-O-Gens durch die veränderte Kombination der in Tabelle 4 angegebenen Primer und unter Verwendung weiterer, neugenerierter Primer (vgl. Tabelle 6) amplifiziert. Der entsprechende 50µl Reaktionsansatz bestand aus: 1X Reaktionspuffer, 0,2mM je dNTP, 2mM MgSO₄, 2,5pmol *forward* Primer, 2,5pmol *reverse* Primer 100ng genomischer DNA und 1U Platinum®Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland). Das verwendete Temperaturprofil kann Tabelle 7 entnommen werden. Nach erfolgreicher PCR wurden die PCR-Produkte in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und die DNA - Banden aus dem Gel eluiert (QiaEX Gel Extraction Kit®, Qiagen, Hilden/Deutschland). Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kits (Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) kloniert und zur Sequenzierung an einen Sequenzierservice (GATC, Freiburg/Deutschland) abgegeben.

Tab. 6: Name, Sequenz, Kombination, Bindungsstelle in der cDNA-Sequenz und erwartete Fragmentlänge der für die Amplifikation nicht identifizierter Regionen des Phytochrom-O-Gens von *P. abies* verwendeten Primer.

Primer	Sequenz	Bindungsstelle (basierend auf cDNA-Sequenz)	Erwartete Fragmentlänge
PHYO 3 for	5'-tga acc caa tat tcg tcc gt-3'	840-859	
PHYO 4 rev	5'-ctg ctt ctg caa gac tgt cg-3'	1859-1840	1000bp
PHYO 5 for	5'-tgg gga cca ctc cta ctg ag-3'	1755-1774	
PHYO 6 rev	5'-caa aaa cct ctc cca caa gc-3'	2786-2767	1031bp
PHYO 7 for	5'-agt gga atc cag caa tgg aa-3'	2706-2725	
PHYO 7 rev	5'-ctg ccg ttg aca taa tgc ac-3'	3205-3186	499bp
PHYO 7 for	5'-agt gga atc cag caa tgg aa-3'	2706-2725	
PHYO 8 rev	5'-ggg aat ccc ttg tcc tga at-3'	3571-3552	865bp
PHYO 8 for	5'-atg gca gaa cag gca gct at-3'	3038-3057	
PHYO 9 rev	5'-caa ggg aat ttt tgc ctg gt-3'	3981-3962	943bp
PHYO 9 for	5'-agg atg ggt tgg gaa taa gg-3'	3466-3485	
PHYO 9 rev	5'-caa ggg aat ttt tgc ctg gt-3'	3981-3962	515bp
PhyO intF4	5'-ttc ctt ggg agg atg ttg ag-3'	2076-2095	
PHYO 5 rev	5'-ccc tgt gag ttc agc tgc tt-3'	2338-2319	262bp
PhyOintF5	5'-cct ccc ata ttt gga gca ga-3'	2666-2685	
PHYO 6 rev	5'-caa aaa cct ctc cca caa gc-3'	2786-2766	120bp
PhyOintF6	5'-caa cgg cag ttg gta aag gt-3'	3197-3216	
PHYO 9 rev	5'-caa ggg aat ttt tgc ctg gt-3'	3981-3962	784bp

Tab. 7: Reaktionsbedingungen für die Amplifikation nicht identifizierter Regionen des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*.

Temperaturprofil
I 94°C, 2 min Anfangsdenaturierung
II 94°C, 30 sec Denaturierung
III 55°C, 30 sec Annealing der Primer
IV 68°C, 2 min Elongation
35x Schritte II-IV
68°C, 4 min
4°C bis Ende

2.7.1 Sequenzierung flankierender Genbereiche

Für die Sequenzierung der flankierenden Bereich des Phytochrom-O-Gens wurde die von Liu *et al.* (1995) publizierte Methode der *thermal asymmetric interlaced PCR* (TAIL-PCR) angewendet. Die Sequenzen der verwendeten degenerierten Primer AD1, AD2 und AD3, die Temperaturprofile der Reaktionen und die Protokolle für die Reaktionsansätze wurden aus der Publikation übernommen. Die genspezifischen Primer PhyOspec 1 (5'- caa tcc caa atg cta aaa tgc-3'), PhyOspec2 (5'- ctg cca aaa gtg cag aga atc -3') und PhyOspec3 (5'-tgc tct tat gct ttt tct tcc c-3') wurden aus der veröffentlichten cDNA Sequenz (EMBL Accession Number U60264) abgeleitet. Die PCR Fragmente wurden aus dem Gel eluiert (QiaEX Gel Extraction Kit®, Qiagen, Hilden/Deutschland), mittels TOPO TA Cloning Kit™(Invitrogen GmbH, Karlsruhe/Deutschland) kloniert und zur Sequenzierung an einen Sequenzierservice (GATC, Freiburg/Deutschland) abgegeben.

2.8 Quantitative PCR

Die Bestimmung der Menge an Pathogen-DNA wurde für alle infizierten Proben (5, 10, 18, 28, 35 und 60 DAI), die entsprechenden nicht-infizierten Kontrollen und die unbehandelte Probe des in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Pflanzenmaterials durchgeführt. Die Messung der Transkription ausgesuchter Gene erfolgte für die 5, 18 und 35 DAI Proben sowie für die entsprechenden Kontrollen.

2.8.1 *Sirococcus conigenus*-spezifische qPCR

Zur Verifizierung der Infektion von *P. abies* Keimlingen mit *S. conigenus* und um den Infektionsverlauf zu überprüfen, wurde die Menge an pathogenspezifischer DNA im Gesamt-DNA-Aufschluss in einem quantitativen PCR-Assay bestimmt. Hierfür wurde mit den *Sirococcus conigenus*-spezifischen Primern Siro1r (5'-gag atg cat ccc aag aag tcc-3') und Siro6 (5'-gcc gag ctg tct aca gag a-3') (10pmol je Primer) ein Fragment von ca. 100 bp Länge aus *Sirococcus* DNA generiert. Die Amplifikation erfolgte in einem 50µl Ansatz mit Absolute™ QPCR SYBR Green® ROX Mix (ABgene, Hamburg/Deutschland). Die qPCR wurde mit dem ABI-PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen werden in Tabelle 8 wiedergegeben. Vor jeder Amplifikationsreaktion wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Hierfür wurde gereinigte und vermessene *Sirococcus*-DNA auf 200ng, 20ng, 2ng, 200pg, 20pg, 2pg und 200fg

DNA verdünnt. Zum Verdünnen der Pathogen-DNA wurde eine λ -DNA-Lösung (10 ng/ μ l) verwendet, da diese in der Lage ist hoch verdünnte genomische DNA zu stabilisieren. Aus der Verdünnungsreihe wurde in jeder qPCR eine Standardkurve generiert. Die Menge an amplifiziertem doppelsträngigem DNA-Fragment wurde nach jedem Zyklus bestimmt. Die qPCR Messungen wurden am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH in Neuherberg/Deutschland durchgeführt.

Tab. 8: Temperaturprofil der *Sirococcus conigenus*-spezifischen qPCR

Temperaturprofil (qPCR)
I 50°C, 2 min Eliminierung der Uracil-DNA
II 95°C, 10 min Enzymaktivierung
III 95°C, 15 sec Denaturierung
IV 60°C, 1 min Annealing und Amplifikation
40x Schritte II-IV

2.8.2 Messung der Transkription ausgesuchter Gene

2.8.2.1 cDNA-Synthese, qPCR-Bedingungen und Transkriptmessung

Aus, wie in Kapitel 2.4 beschrieben isolierter RNA, wurde durch Verwendung des DNA-FreeTM-Kits (Ambion, Austin/USA) kontaminierende DNA entfernt. Die RNA-Menge wurde in einem VersaFluor Fluorometer (BioRad, Hercules/USA) unter Verwendung des RiboGreen[®] RNA Quantification Kits (Molecular Probes, Eugene/USA) nach Anweisung des Herstellers bestimmt. Aus 500ng Gesamt-RNA wurde unter Verwendung der Taqman[®] Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA) gemäss den Vorgaben des Herstellers mit 1.25 U Reverse Transcriptase pro Probe und 2.5 μ M Random Hexamer Primer in einer 50 μ l Reaktion cDNA synthetisiert.

Für den qPCR Assay wurden, basierend auf der Sequenz der in Kap. 2.5.1 beschriebenen cDNA-Klone pPA0047, pPA0073, pPA0075, pPA0123 und pPA0128 mit Hilfe der Primer Express[®] Software 1.5a (Applied Biosystems, Foster City/USA) Primer entwickelt. Die Primer sind mit ihrer Sequenz und der Länge (bp) des PCR-Fragmentes in Tabelle 9 wiedergegeben.

Tab. 9: Name, Sequenz und Fragmentlänge der für die zur Messung der Transkription ausgesuchter Gene mittels qPCR verwendeten Primer

cDNA-Klon	Primer	Sequenz	Fragmentlänge
pPA0047	PPR for	5'-ggg ata tca ccc gct ttc atc-3'	83bp
	PPR rev	5'-tat att gct tat ctg ctt atg atc acc aa-3'	
pPA0073	Antifre for	5'-ctc ccg ggt tga atg tga ag-3'	88bp
	Antifre rev	5'-tgc cgc aaa aac tac atc ga-3'	
pPA0075	CAD for	5'-ggc atg aca gag cct gga aa-3'	74bp
	CAD rev	5'-ggc aat ctt gac acc cat gtg-3'	
pPA0123	Prot for	5'-tgc tgt gat gac acg tga taa gg-3'	73bp
	Prot rev	5'-caa cct cag cta caa tag cct caa-3'	
pPA0128	PaChi4 for	5'-gcg agg gca agg gat tct ac-3'	73bp
	PaChi4 rev	5'-ggg ggt gcc aaa tcc aga aa-3'	
α Tubulin GenBank- Acc.No.: X57980	α T for	5'-ggc ata ccg gca gct ctt c-3'	65bp
	α T rev	5'-aag ttg ttg gcg gcg tct t-3'	

Das α -Tubulin Gene der Fichte (GenBank accession number X57980) wurde als endogene Referenz verwendet. Alle Primer wurden von Thermo Electron GmbH (Ulm/Deutschland) bezogen. Die qPCR - Messungen wurden am Norsk institutt for skogforskning (Skogforsk, Ås/Norwegen) durchgeführt.

Die qPCR wurde in einem 25 μ l Reaktionsansatz in SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Foster City/USA) durchgeführt. Die Primer-Konzentration wurde auf 50nM für alle untersuchten Gene eingestellt. 150ng der in Kapitel 2.8.2.1 beschriebenen cDNA wurden in jeder Reaktion eingesetzt. Jede Reaktion wurde zweimal wiederholt. Das Temperaturprofil der qPCR kann Tabelle 10 entnommen werden

Tab. 10: Temperaturprofil der qPCR zur Messung der Transkription ausgesuchter Gene

Temperaturprofil (qPCR)
I 95°C, 10 min Enzymaktivierung
II 95°C, 15 sec Denaturierung
III 60°C, 1 min Annealing und Amplifikation
40x Schritte II-III

Zur Bestimmung der Spezifität jedes Primerpaares wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt. Diese Analyse wurde nach Abschluss des obengenannten qPCR-Laufes durchgeführt. Das entsprechende Temperaturprofil ist aus Tabelle 11 ersichtlich.

Tab. 11: Temperaturprofil der Schmelzpunktanalyse

Temperaturprofil
I 95°C, 15 sec Denaturierung
II 60°C, 20 sec
III Linearer Anstieg der Temperatur von 60°C auf 95°C über einen Zeitraum von 19 Min 59 sec

2.8.3 Auswertung der qPCR-Daten

Die Datenaufnahme und Auswertung der qPCR-Daten wurde mit dem Sequence Detection System, Version 1.7a, Software Package (Applied Biosystems, Foster City/USA) durchgeführt. Die Quantifizierung des Anteils pathogenspezifischer DNA im Gesamt-DNA-Aufschluss fand anhand der Zykluszahlbestimmung (Ct-Wert) statt, wobei ein Vergleich mit den Ct-Werten einer Standardprobe bekannter DNA-Konzentration erfolgte. Der Ct-Wert ist abhängig von der DNA-Menge und repräsentiert den Schritt im PCR-Zyklus, bei dem erstmalig ein Fluoreszenzsignal gemessen werden konnte.

Zur Transkriptmessung wurde der Zyklus-Schwellenwert (dCt) jeder Messung des pathogeninduzierten PCR-Produktes vom entsprechenden dCt-Wert des α -Tubulin-Gens (endogene Referenz) subtrahiert. Man erhielt so den relativen ddCt Wert. Dieser Wert stellt die relative Menge an pathogeninduziertem Transkript verglichen mit der Menge des α -Tubulin-Gen-Transkriptes in der Probe dar. Für jeden der untersuchten Zeitpunkte (5 DAI, 18 DAI und 35 DAI) wurde der ddCT Wert der nichtinfizierten Probe vom ddCT Wert der infizierten Probe abgezogen. Die Basislinie des aus den Werten berechneten Graphen wurde auf Null gesetzt.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss der Umweltbedingungen auf die gesamtgenomische Cytosinmethylierung

3.1.1 *Picea abies*

3.1.1.1 Genetische Charakterisierung der Kreuzungsnachkommenschaften

Um zu testen, ob Segregationsdistortionen für die differentielle phänotypische Ausprägung der beobachteten Merkmale verantwortlich sind, wurde zunächst eine genetische Charakterisierung der Kreuzungsnachkommenschaften mit EST-Markern (vgl. Kap. 2.1.1.4) durchgeführt.

3.1.1.1.1 Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien

Die Untersuchung der Kreuzungseltern zeigte, dass alle sieben der untersuchten kodominanten EST-Marker mindestens in einem der beiden Eltern im heterozygotem Zustand vorhanden waren. Für jeden Locus konnte somit die Spaltung in der Kreuzungsnachkommenschaft statistisch überprüft werden.

In den Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890 wurde aufgrund der elterlichen Allelkombination für die Marker Pa0002, Pa0005, Pa0043 und CAD eine 1:1 Aufspaltung der einzelnen Genotypen in der F1-Nachkommenschaft gemäß den Mendelschen Gesetzen erwartet. Für die beiden Marker Pa0038 und Pa0066, bei denen bei beiden Eltern die untersuchten Allele heterozygot vorlagen, wurde eine 1:2:1 Spaltung erwartet. In Tabelle 12 werden die elterlichen Genotypen und deren Aufspaltung wiedergegeben. Für die Vollgeschwisterfamilien werden die Anzahl der untersuchten Individuen, die beobachtete Allelhäufigkeit sowie die Werte des χ^2 -Tests angegeben. Die χ^2 -Werte zeigen, dass in der Vollgeschwisterfamilie 15890 eine signifikante Abweichungen zwischen den nach Mendel erwarteten und den in der F1-Nachkommenschaft beobachteten Genotyphäufigkeiten am Markergenort Pa0038 vorliegt. Für diesen liegt somit eine gestörte Segregation vor.

Tab. 12: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s. = nicht signifikant, ***=Signifikanzniveau.

Marker	Elterliche Genotypen			Vollgeschwisterfamilie 15887 warm			Vollgeschwisterfamilie 15890 kalt		
	2736	1957	Aufspaltung	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²
Pa0002	AB	AA	AA : AB	76	35 : 41	0,474 n.s.	64	27 : 37	1,563 n.s.
Pa0005	CD	CC	CC : CD	76	30 : 46	3,368 n.s.	64	32 : 32	0 n.s.
Pa0038	BC	BC	BB : BC : CC	76	14 : 39 : 23	2,184 n.s.	64	5 : 53 : 6	27,594 ***
Pa0043	BC	CC	BC : CC	76	34 : 42	0,605 n.s.	64	30 : 34	0,25 n.s.
Pa0066	BD	BD	BB : BD : DD	76	13 : 47 : 16	4,5 n.s.	64	13 : 38 : 13	2,25 n.s.
CAD	AD	AA	AA : AD	76	41 : 35	0,474 n.s.	64	36 : 28	1,0 n.s.

In den Vollgeschwisterfamilien 15044 und 15046 wurden ausgehend von den elterlichen Allelkombinationen die EST-Marker Pa0002, Pa0005, Pa0034, Pa0038, Pa0043 und CAD untersucht. Für die Marker Pa0002, Pa0005, Pa0034 und CAD wurde eine 1:1 Aufspaltung der einzelnen Genotypen, für die beiden Marker Pa0038 und Pa0043 aufgrund der Allelausstattung der Eltern eine 1:1:1:1 Spaltung in der F1-Nachkommenschaft erwartet. Die elterlichen Genotypen und deren Aufspaltung, die Anzahl der untersuchten Individuen je Vollgeschwisterfamilie, die beobachtete Allel-Häufigkeit sowie die Werte des Chi² – Tests können Tabelle 13 entnommen werden. Nach Berechnung der Chi² – Werte zeigte sich, dass in der Vollgeschwisterfamilie 15046 eine signifikante Abweichungen zwischen erwarteten und in der F1-Nachkommenschaft beobachteten Genotyphäufigkeiten und somit eine Segregationsdistortion am Markergenort Pa0038 vorliegt.

Tab. 13: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15044 und 15046. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant, *=Signifikanzniveau.

Marker	Elterliche Genotypen			Vollgeschwisterfamilie 15044 kalt			Vollgeschwisterfamilie 15046 warm		
	2735	F2014	Aufspaltung	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²
Pa0002	AA	AB	AA : AB	41	17 : 24	1,195 n.s.	69	32 : 37	0,362 n.s.
Pa0005	CD	CC	CC : CD	41	23 : 18	0,609 n.s.	69	36 : 33	0,130 n.s.
Pa0034	CC	BC	BC : CC	41	20 : 21	0,024 n.s.	69	33 : 36	0,130 n.s.
Pa0038	BC	FC	BC : CC : BF : CF	41	4 : 11 : 16 : 10	7,098 n.s.	69	11 : 14 : 15 : 29	11,174 *
Pa0043	AC	BC	AB : AC : BC : CC	41	12 : 12 : 10 : 7	1,634 n.s.	69	11 : 18 : 19 : 21	3,290 n.s.
CAD	AM	AA	AA : AM	41	26 : 15	2,951 n.s.	69	33 : 36	0,130 n.s.

In den Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914 wurden ausgehend von den elterlichen Allelkombinationen die EST-Marker Pa0038, Pa0066 und CAD untersucht. Für die Marker Pa0066 und CAD wurde eine 1:1 Aufspaltung der einzelnen Genotypen in der F1-Nachkommenschaft erwartet. Am Genort Pa0038 lagen bei beiden Eltern die untersuchten Allele heterozygot vor. Es wurde deshalb eine 1:2:1 Spaltung in den Nach-

kommen erwartet. In Tabelle 14 und 15 werden wiederum die elterlichen Genotypen und deren Aufspaltung gezeigt. Daneben finden sich Anzahl der untersuchten Individuen aus den Vollgeschwisterfamilien, die beobachtete Allel-Häufigkeit und die Werte des χ^2 – Tests. Wie aus Tabelle 14 und 15 ersichtlich, zeigen die χ^2 – Werte, dass es in keiner der untersuchten Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914 an den untersuchten Genorten zu signifikanten Abweichungen von den erwarteten Allelverteilungen kommt.

Tab. 14: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15902 und 15905. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant.

Marker	Elterliche Genotypen		Aufspaltung	Vollgeschwisterfamilie 15902 warm/SD			Vollgeschwisterfamilie 15905 warm/LD		
	5994	1957		N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²
Pa0038	BC	BC	BB : BC : CC	80	20 : 41 : 19	0,075 n.s.	70	23 : 34 : 13	2,914 n.s.
Pa0066	BB	BC	BB : BC	80	39 : 41	0,05 n.s.	70	32 : 38	0,514 n.s.
CAD	BC	AA	AB : AC	80	43 : 37	0,45 n.s.	70	48 : 22	9,657 n.s.

Tab. 15: Genotypisierung der Eltern und Vollgeschwisterfamilien 15909 und 15914. N=Anzahl der untersuchten Nachkommen; n.s.=nicht signifikant.

Marker	Elterliche Genotypen		Aufspaltung	Vollgeschwisterfamilie 15909 kalt/SD			Vollgeschwisterfamilie 15914 kalt/LD		
	5994	1957		N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²	N	beobachtete Häufigkeit	Chi ²
Pa0038	BC	BC	BB : BC : CC	50	15 : 22 : 13	0,845 n.s.	46	8 : 20 : 18	5,13 n.s.
Pa0066	BB	BC	BB : BC	50	27 : 23	0,32 n.s.	46	20 : 26	0,783 n.s.
CAD	BC	AA	AB : AC	50	30 : 20	2 n.s.	46	21 : 25	0,348 n.s.

3.1.1.1.2 Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien

In den Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890 wurden von 16 möglichen 2-Locus-Kombinationen (sechs Loci) innerhalb von sechs Kombinationen die Verteilung der Genotypen überprüft. Aus Vollgeschwisterfamilie 15887 wurden 76, aus Vollgeschwisterfamilie 15890 64 Nachkommen geprüft. Aus Tabelle 16 wird ersichtlich, dass in Vollgeschwisterfamilie 15887 die Markerkombination Pa0066/Pa0002 Genotyphäufigkeiten zeigte, die signifikant von der Gleichverteilung abweichen (χ^2 -Test).

Tab. 16: Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15887 und 15890. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des Chi²-Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s.=nicht signifikant.

15887 warm					15890 kalt				
EST - Marker	Pa0002	Pa0043	pA0066	CAD	EST - Marker	Pa0002	Pa0043	pA0066	CAD
Pa0002	-	76	76	76	Pa0002	-	64	64	64
Pa0043	1,05 n.s.	-	76	76	Pa0043	2,63 n.s.	-	64	64
Pa0066	16,42 *	9,68 n.s.	-	76	Pa0066	3,44 n.s.	0,44 n.s.	-	64
CAD	1,68 n.s.	0,21 n.s.	8,84 n.s.	-	CAD	3,13 n.s.	1,13 n.s.	1,69 n.s.	-

In den Vollgeschwisterfamilien 15046 und 15044 wurden von sechs möglichen 2-Locus-Kombinationen (vier Loci) innerhalb von drei Kombinationen die Verteilung der Genotypen überprüft. Aus Vollgeschwisterfamilie 15044 wurden 41, aus Vollgeschwisterfamilie 15046 69 Nachkommen geprüft. Es zeigte sich in keiner der getesteten Marker-Kombinationen eine signifikante Abweichung der Genotyphäufigkeiten von der Gleichverteilung (Chi²-Test) (vgl. Tabelle 17).

Tab. 17: Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15046 und 15044. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des Chi²-Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s.=nicht signifikant. n.e.=nicht ermittelbar.

15046 warm					15044 kalt				
EST - Marker	Pa0002	Pa0034	pA0043	CAD	EST - Marker	Pa0002	Pa0034	pA0043	CAD
Pa0002	-	69	69	69	Pa0002	-	41	41	41
Pa0034	5,55 n.s.	-	69	69	Pa0034	5,24 n.s.	-	41	41
Pa0043	n.e.	6,48 n.s.	-	-	Pa0043	n.e.	3,68 n.s.	-	-
CAD	n.e.	n.e.	10,88 n.s.	-	CAD	n.e.	n.e.	11,49 n.s.	-

In den Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914 wurden alle der drei möglichen 2-Locus-Kombinationen (3 Loci) der Genotypen getestet. Aus Vollgeschwisterfamilie 15902 und 15914 wurden 79, aus Vollgeschwisterfamilie 15905 70 und aus Vollgeschwisterfamilien 15909 50 Nachkommen untersucht. Nur in Vollgeschwisterfamilie 15905 zeigten die Markerkombinationen CAD/Pa00038 und CAD/Pa0066 Genotyphäufigkeiten die signifikant von der Gleichverteilung abwichen (Chi²-Test) (vgl. Tab. 18 a-d.)

Tab. 18: a-d Überprüfung auf Gleichverteilung der 2-Locus Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien 15902, 15905, 15909 und 15914. Unter der Diagonale ist das Ergebnis des Chi²-Test auf Gleichverteilung der 2-Locus-Genotypen dargestellt, oberhalb der Diagonale die Anzahl der untersuchten Nachkommen. n.s. = nicht signifikant.

a.) 15902 warm/SD				b.) 15905 warm/LD			
EST - Marker	Pa0038	Pa0066	CAD	EST - Marker	Pa0038	Pa0066	CAD
Pa0038	-	79	79	Pa0038	-	70	70
Pa0066	1,0 n.s.	-	79	Pa0066	4,06 n.s.	-	70
CAD	3,73 n.s.	3,89 n.s.	-	CAD	13,09 *	12,97 *	-

c.) 15909 kalt/SD				d.) 15914 kalt/LD			
EST - Marker	Pa0038	Pa0066	CAD	EST - Marker	Pa0038	Pa0066	CAD
Pa0038	-	50	50	Pa0038	-	79	79
Pa0066	2,96 n.s.	-	50	Pa0066	11,74 n.s.	-	79
CAD	3,6 n.s.	3,6 n.s.	-	CAD	8,43 n.s.	1,48 n.s.	-

3.1.1.2 Bestimmung des 5-Methylcytosingehaltes in Vollgeschwisterfamilien aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten und Herkünften

Der Einfluss der Umweltbedingungen während Kreuzung auf die Cytosinmethylierung wurde in Pflanzenmaterial aus vier Vollgeschwisterfamilien mit zwei verschiedenen genetischen Hintergründen genetischen bestimmt. Verwendet wurde das in Tabelle 1 beschriebene Pflanzenmaterial. Im Pilotversuch wurden zunächst die Vollgeschwisterfamilien 15044 (kalt) und 15046 (warm) untersucht. Das aus Saatgut aufgezogene Pflanzenmaterial wurde im Zuge des Experimentes unter verschiedenen Tageslängen (24h bzw. 12h) gehalten. Untersucht wurden nach sechs und zwanzig Tagen geerntete Pflanzen. Aus den für die Untersuchung verwendeten 100mg Nadelmaterial (Frischgewicht) wurden nach der in Kapitel 2.4 beschriebenen Methode 30µg DNA isoliert und für die Messung aufbereitet. Jede Isolation wurde im Replikat durchgeführt und der Gehalt an 5-Methylcytosin vierfach kapillarelektrophoretisch bestimmt.

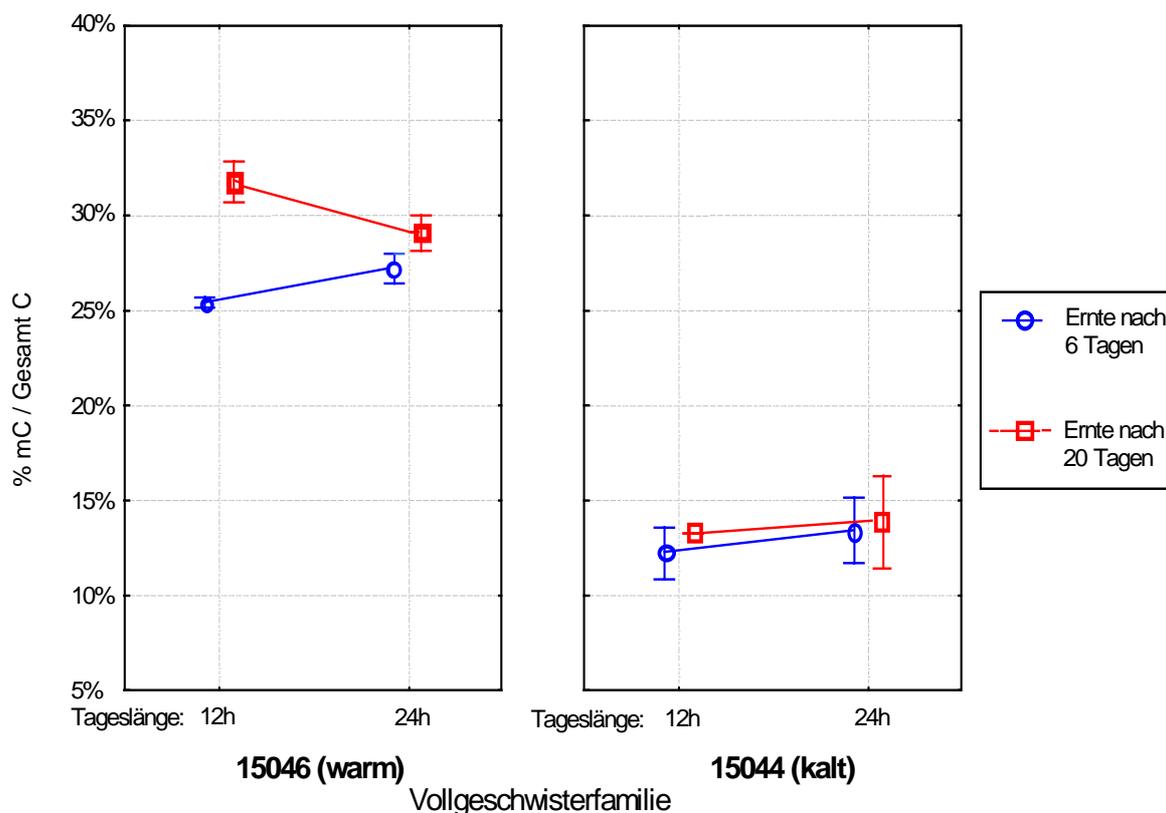


Abb. 3: Prozentsatz an 5-Methylcytosin in Vollgeschwisterfamilien von *P. abies* in Abhängigkeit von Kreuzungsumwelt, Tageslänge und Erntezeitpunkt. Umweltbedingungen der Vollgeschwisterfamilien: Siehe Tabelle 1.

Es bestand eine signifikante ($p=0.00232$) Interaktion der untersuchten Faktoren Kreuzungsumwelt, Tageslänge und Erntezeitpunkt.

Unabhängig vom Erntezeitpunkt und der Tageslänge ließen sich allerdings in der Nachkommenschaft 15046 (warme Kreuzungsumwelt) mit durchschnittlich $28 \pm 1,5\%$ signifikant ($p < 0.001$) höhere Prozentsätze an methyliertem Cytosin nachweisen als in der Nachkommenschaft 15044 (kalte Kreuzungsumwelt), in der Durchschnittswerte von $13 \pm 1\%$ 5-Methylcytosin gemessen wurden. Betrachtet man die untersuchten Nachkommenschaften getrennt voneinander, so zeigte sich, dass es bei den Nachkommen aus kalter Kreuzungsumwelt zu keiner signifikanten Beeinflussung ($p > 0.5$) der Cytosinmethylierung durch Erntezeitpunkt und Tageslänge kam. Die Durchschnittswerte lagen in nach sechs Tagen geernteten Pflanzen bei $12 \pm 1,5\%$ gegenüber $14 \pm 1\%$ in den nach zwanzig Tagen geernteten. Die Nachkommen aus warmer Kreuzungsumwelt zeigen zwischen dem sechsten und dem zwanzigsten Tag nach Behandlungsbeginn signifikante ($p < 0.001$) Änderungen der Cytosinmethylierung, wenn sie unter Kurztagsbedingungen (12h Licht) gehalten wurden.

Pflanzen die nach sechs Tagen geerntet wurden, wiesen einen Prozentsatz von $25\pm 1\%$ auf. Im Vergleich dazu wurden in den nach 20 Tagen geernteten Pflanzen Gehalte von $31\pm 0,5\%$ 5-Methylcytosin nachgewiesen. Die Pflanzen die unter Langtag-Bedingungen gehalten wurden, zeigen keine signifikanten ($p > 0.01$) Änderungen (Abb. 3).

Zur Bestätigung der Befunde wurde in einem Wiederholungsversuch die Cytosinmethylierung in den Vollgeschwisterfamilien 15884 (warme Kreuzungsumwelt) und 15886 (kalte Kreuzungsumwelt) an zwei Erntezeitpunkten (drei und zwanzig Tage) gemessen. Hierfür wurden ebenfalls aus jeweils 100mg Pflanzenmaterial für jeden der untersuchten Zeitpunkte vier DNA Proben im Replikat isoliert und die Messung der Proben dreimal wiederholt.

Die Ergebnisse des ersten Versuches ließen sich bestätigen. Die Nachkommenschaften zeigten signifikante Unterschiede in der Cytosinmethylierung (Abb. 4). Die Prozentsätze in der Nachkommenschaft 15886 (kalte Kreuzungsumwelt) lagen mit durchschnittlich $37\pm 2,5\%$ signifikant ($p < 0.001$) niedriger als in der Nachkommenschaft 15884 (warme Kreuzungsumwelt) in der Durchschnittswerte von $49\pm 1\%$ gemessen wurden. In der Nachkommenschaft 15886 nahm der Anteil an methyliertem Cytosin zwischen dem dritten ($42\pm 2,5\%$) und dem zwanzigsten Erntetag ($33\pm 1\%$) signifikant ($p < 0.001$) ab, während es in Nachkommenschaft 15884 zu keiner signifikanten Änderung kam.

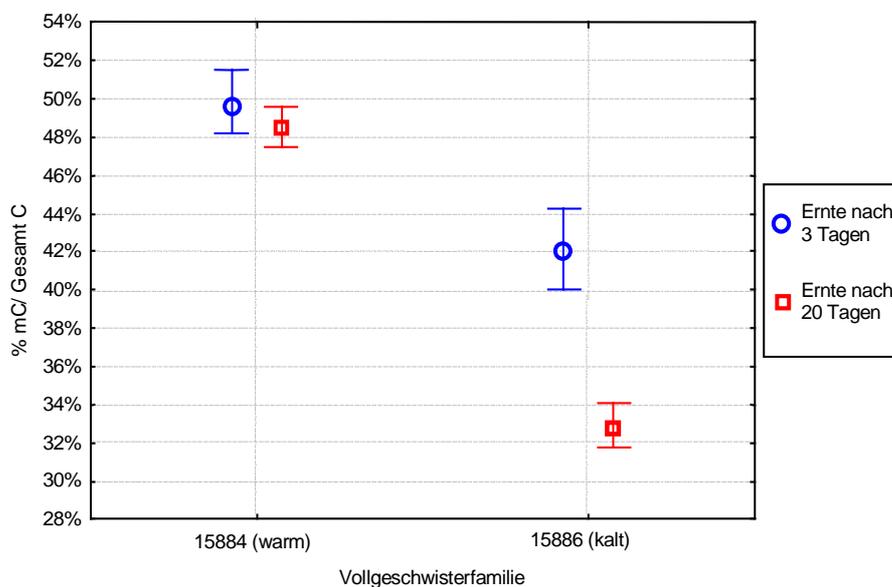


Abb. 4: Prozentsatz an 5-Methylcytosin in Vollgeschwisterfamilien von *P. abies* in Abhängigkeit von Kreuzungsumwelt, Tageslänge und Erntezeitpunkt.

3.1.1.3 Bestimmung des 5-Methylcytosingehaltes nach Hitzeschockbehandlung

In den oben beschriebenen Versuchen konnten Informationen über die Auswirkung der Umweltbedingungen während der Kreuzung auf den 5-Methylcytosin-Gehalt genomischer DNA aus der Fichte gewonnen werden. Um zu überprüfen, ob sich kurzzeitig einwirkende extreme Umweltbedingungen ebenfalls in einer Änderung des 5-Methylcytosin-Gehaltes des Genoms niederschlagen können, wurden Fichtenkeimlinge einer Hitzeschockbehandlung unterzogen um anschließend die Prozentsätze an methyliertem Cytosin in der genomischen DNA zu bestimmen. Getestet wurden Fichtenkeimlinge aus einer Hoch- und einer Tieflagenherkunft. Keimlinge im Alter von drei und acht Wochen wurden einer, in Kapitel 2.3 beschriebenen, Hitzeschockbehandlung unterzogen. In drei unabhängigen Präparationen wurde aus jeweils 100mg Pflanzenmaterial wie in Kapitel 2.4 beschrieben genomische DNA isoliert. Jeweils 30µg der DNA wurde für die kapillarelektrophoretische Messung aufbereitet und in jeder Probe der Prozentsatz an methyliertem Cytosin in dreifacher Messung bestimmt.

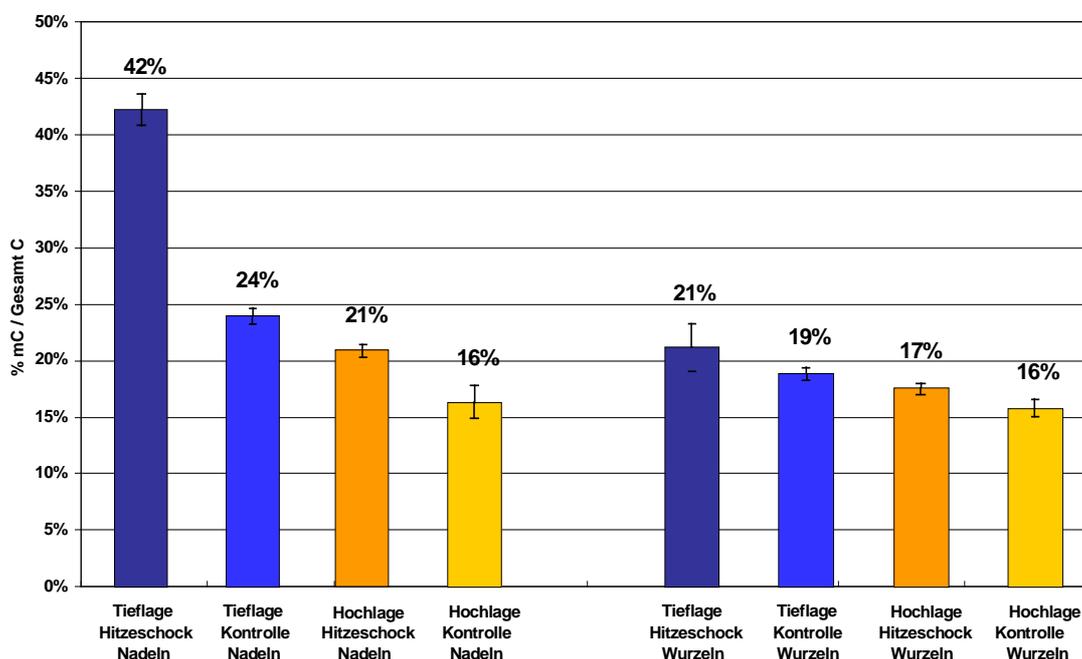


Abb. 5: Prozentualer Gehalt an 5-Methylcytosin in genomischer DNA aus Nadeln und Wurzeln von *P. abies* Keimlingen nach Hitzeschockbehandlung.

Die Ergebnisse der Messungen zeigten signifikante ($p < 0.001$) Unterschiede zwischen hitzeschockbehandelten Nadeln und den entsprechenden Kontrollen in beiden Herkunft-

ten. Wie aus Abbildung 5 ersichtlich wird, betrug der Gehalt an methyliertem Cytosin in den Nadeln aus der Tieflagenpopulation nach Hitzeschock $42\pm 1\%$ in den Kontrollen $24\pm 0,5\%$. In der Hochlagenpopulation konnten für die entsprechenden Proben $21\pm 0,5\%$ beziehungsweise $16\pm 0,5\%$ 5-Methylcytosin nachgewiesen werden. Ein signifikanter ($p < 0.001$) Unterschied in der Reaktion der untersuchten Provenienzen auf die Hitzeschockbehandlung konnte ebenfalls festgestellt werden.

Die 5-Methylcytosinwerte in den Wurzeln aus der Tieflagen-Herkunft unterschieden sich mit $21\pm 0,5\%$ 5-Methylcytosin-Gehalt nach Hitzeschock nicht signifikant ($p > 0.05$) von den Kontrollen ($19\pm 0,5\%$). Entsprechend verhielten sich die 5-Methylcytosin-Gehalte der Wurzeln aus der Hochlagenherkunft. Hier wurden 5-Methylcytosin-Gehalte von $17\pm 0,5\%$ 5-Methylcytosin-Gehalt nach Hitzeschockbehandlung, beziehungsweise $16\pm 0,5\%$ in den Kontrollen gemessen ($p > 0.05$).

Um den aufzuklären ab welchem Alter die mit Methylierungsänderungen auf eine Hitzeschockbehandlung reagiert, wurden die 5-Methylcytosin-Gehalte von drei Wochen alten Keimlingen mit denen in acht Wochen alten Keimlingen (Abb. 6) nach Hitzeschockbehandlung verglichen.

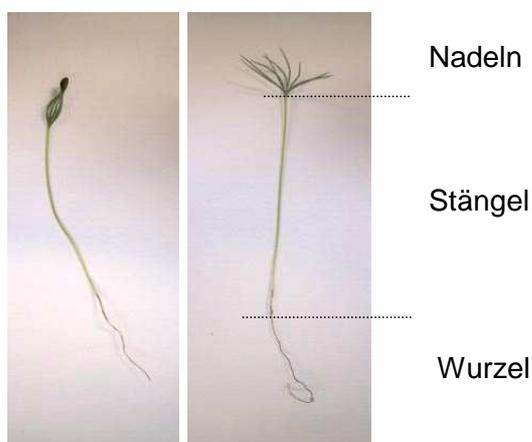


Abb. 6: Drei und acht Wochen alter *P. abies*-Keimling und Einteilung in die untersuchten Organe.

Es ließen sich signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) in der Reaktion der untersuchten Wachstumsstadien auf die Hitzeschockbehandlung feststellen. In den drei Wochen alten Pflanzen fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit Hitzeschock behandelten Pflanzen und den Kontrollen ($22\pm 1\%$ zu $20\pm 1\%$). In den acht Wochen alten Pflanzen konnten signifikante ($p < 0.001$) Unterschiede in den 5-Methylcytosin-Gehalte ($42\pm 1\%$ nach Hitzeschock, $24\pm 0,5\%$ in den Kontrollen) festgestellt werden (Abb. 7).

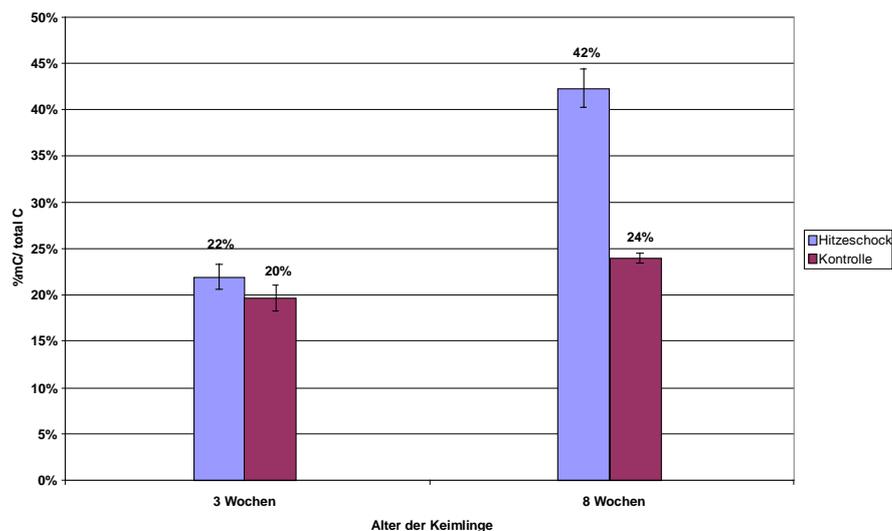


Abb. 7: Gehalt an 5-Methylcytosin in drei und acht Wochen alten Fichten-Keimlingen aus Tieflagenherkunft nach Hitzeschockbehandlung.

Um die Veränderung der 5-Methylcytosingehalte nach Hitzeschockbehandlung in den Organen der Fichtenkeimlinge zu untersuchen, wurden die entsprechenden Werte für DNA aus Wurzeln, Stängeln und Nadeln ermittelt. Hierfür wurde genomische DNA aus den jeweiligen Pflanzenteilen der acht Wochen alten Keimlinge aus der Tieflagenherkunft verwendet. Es wurden mindestens drei unabhängige DNA-Präparationen aus je 100 mg Pflanzenmaterial durchgeführt und jeweils 30 µg DNA nach entsprechender Aufbereitung kapillarelektrophoretisch vermessen.

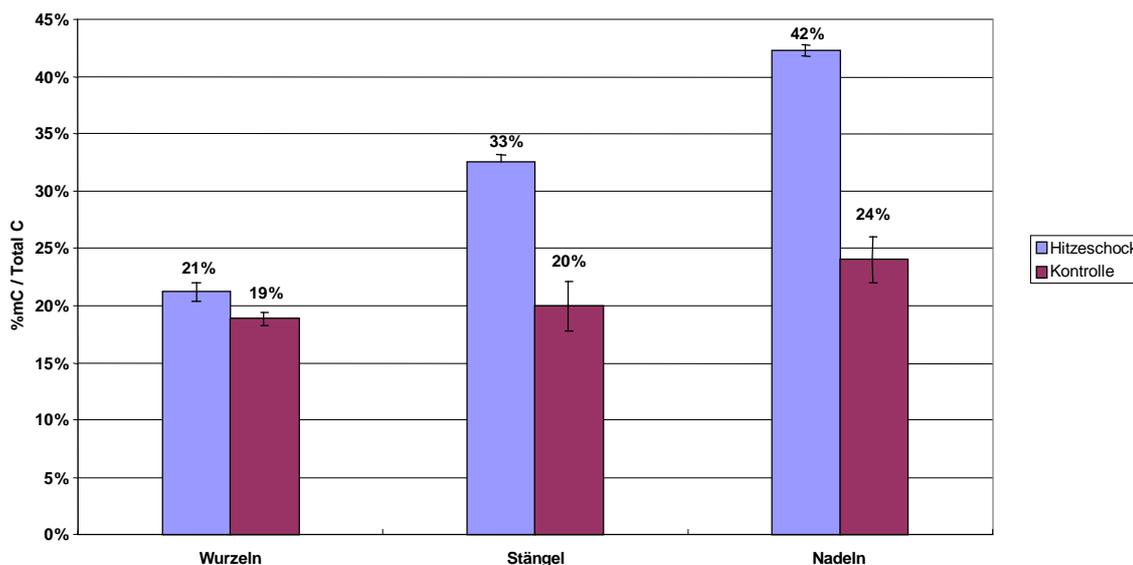


Abb. 8: Einfluss von Hitzeschockbehandlung auf die 5-Methylcytosingehalte in Wurzeln, Stängeln und Nadeln von acht Wochen alten Fichten-Keimlingen der Tieflagenherkunft.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten zeigte, dass es in den Wurzeln zu keiner signifikanten Änderung ($p > 0.05$) der 5-Methylcytosingehalte nach Hitzeschockbehandlung kam. Die Werte lagen im Durchschnitt bei $21 \pm 1\%$ 5-Methylcytosin in den hitzeschockbehandelten und bei durchschnittlichen $19 \pm 1\%$ in den unbehandelten Kontrollproben (Abb. 8). Die Stängel und die Nadeln zeigten nach Hitzeschock eine signifikante Zunahme ($p < 0.001$) des 5-Methylcytosingehaltes. In den Stängeln stieg der 5-Methylcytosin-Gehalt von im Durchschnitt $20 \pm 1\%$ in den Kontroll- auf $33 \pm 2\%$ in den hitzeschockbehandelten Proben an. In den Nadeln betrug der Durchschnittsgehalt an 5-Methylcytosin $24 \pm 1\%$ in den Kontrollproben und stieg nach Hitzeschock auf $42 \pm 1\%$ 5-Methylcytosin an. Beim Vergleich der unbehandelten Kontrollproben zeigten sich keine signifikanten ($p > 0.5$) Änderungen der 5-Methylcytosingehalte zwischen Wurzeln und Stängel. Zwischen Stängel- und Nadel-Kontrollproben bestand jedoch ein signifikanter Unterschied ($p > 0.01$).

3.1.2 *Arabidopsis thaliana*

Um die Einflüsse der Kreuzungsumwelt auf die Cytosinmethylierung der DNA annueller Angiosperme zu untersuchen, wurde *Arabidopsis thaliana* als Referenzart zu *P. abies* verwendet. Aus den wie in Kap. 2.1.2 beschriebenen behandelten Pflanzen wurde in drei unabhängigen Präparationen genomische DNA isoliert, 30 μg DNA nach entsprechender

Aufbereitung kapillarelektrophoretisch getrennt und der prozentuale Anteil von methyliertem Cytosin am Gesamtcytosin bestimmt.

Es zeigten sich keine signifikanten ($p > 0.1$) Unterschiede sowohl zwischen den untersuchten Pflanzen mit unterschiedlicher Kreuzungsumwelt als auch nach Kältebehandlung. Die Gehalte an methyliertem Cytosin lagen in allen Proben bei durchschnittlich 4.5% Anteil 5-Methylcytosin am Gesamtcytosin (Abb. 9).

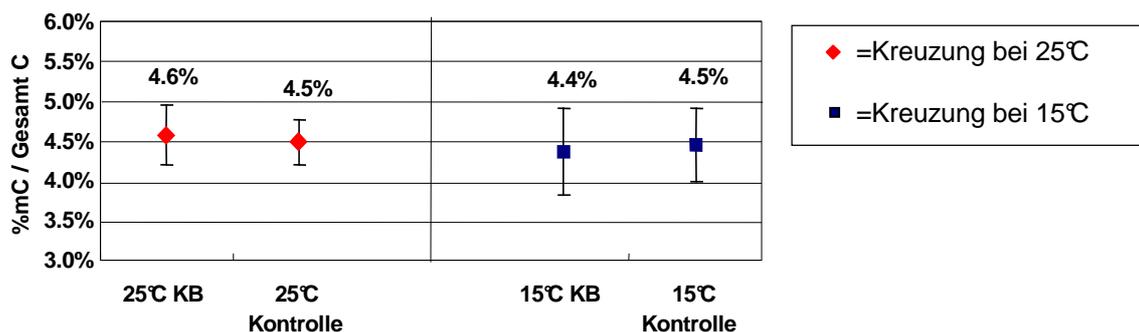


Abb. 9: Prozentualer Anteil von 5-Methylcytosin am Gesamtcytosin in genomischer DNA von *A. thaliana* aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten und nach Kälteschockbehandlung, KB=Kältebehandlung.

3.2 Die Dynamik der Cytosinmethylierung in *P. abies*

3.2.1 Während der Ontogenese

Die Dynamik der Cytosinmethylierung in Fichtenkeimlingen wurde während verschiedener ontogenetischer Stadien erfasst. Hierfür wurde der Anteil an 5-Methylcytosin in genomischer DNA aus Embryonen (0 Wochen), eineinhalb, drei und acht Wochen alten Fichtenkeimlingen verglichen. Pro Stadium wurde der 5-Methylcytosin-Gehalt in drei, aus 100mg Pflanzenmaterial, unabhängig isolierten DNA Proben in dreifacher Messung bestimmt. Für jede Messung wurden 30µg DNA nach entsprechender Aufbereitung eingesetzt.

Der Anteil an methyliertem Cytosin nimmt im Verlauf der Ontogenese zwischen dem Embryonalstadium und den drei Wochen alten Keimlingen ab. Eine signifikante ($p < 0.05$) Änderung der Werte konnte allerdings nur zwischen den eineinhalb und drei Wochen alten Keimlingen festgestellt werden. Nach drei Wochen nimmt der Anteil an 5-Methylcytosin signifikant zu ($p = 0.05$). Die durchschnittlichen Anteile in den Embryonen lagen bei $31 \pm 1\%$,

in den eineinhalb Wochen alten Keimen bei $27\pm 1\%$ und in den drei und acht Wochen alten Keimlingen bei $20\pm 1\%$ beziehungsweise $24\pm 1\%$ (Abb. 10).

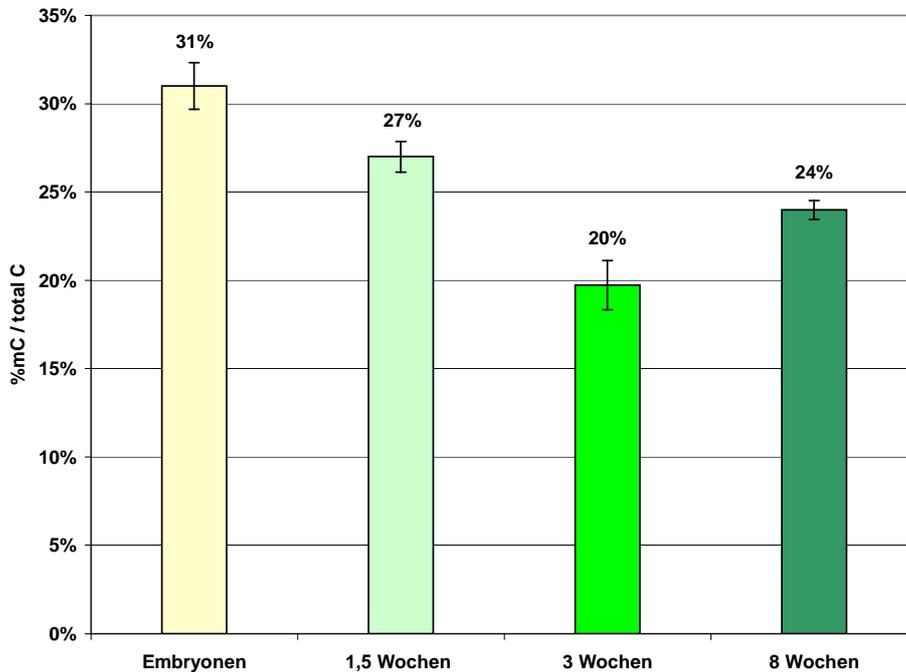


Abb. 10: Dynamik der Cytosinmethylierung in der DNA von *P. abies*-Keimlingen aus Tief-lagenherkunft in verschiedenen ontogenetischen Stadien.

Beim Vergleich der 5-Methylcytosin-Gehalte in den untersuchten Entwicklungsstadien zeigten sich signifikante ($p < 0.001$) Unterschiede zwischen den Hoch- und Tieflagenherkünften (Abb. 11). In den Embryonen aus beiden Populationen konnten keine signifikanten Unterschiede in den durchschnittlichen 5-Methylcytosin-Gehalten (Hochlage: $32\pm 1\%$; Tieflage: $31\pm 1\%$) nachgewiesen werden. Beim Vergleich der eineinhalb Wochen alten Keime (Hochlage: $20\pm 1\%$; Tieflage: $27\pm 1\%$; $p = 0.002$) und der acht Wochen alten Keimlingen (Hochlage: $16\pm 1\%$; Tieflage: $24\pm 1\%$; $p < 0.001$) zeigten beide Fälle signifikante Unterschiede in den 5-Methylcytosin-Gehalten.

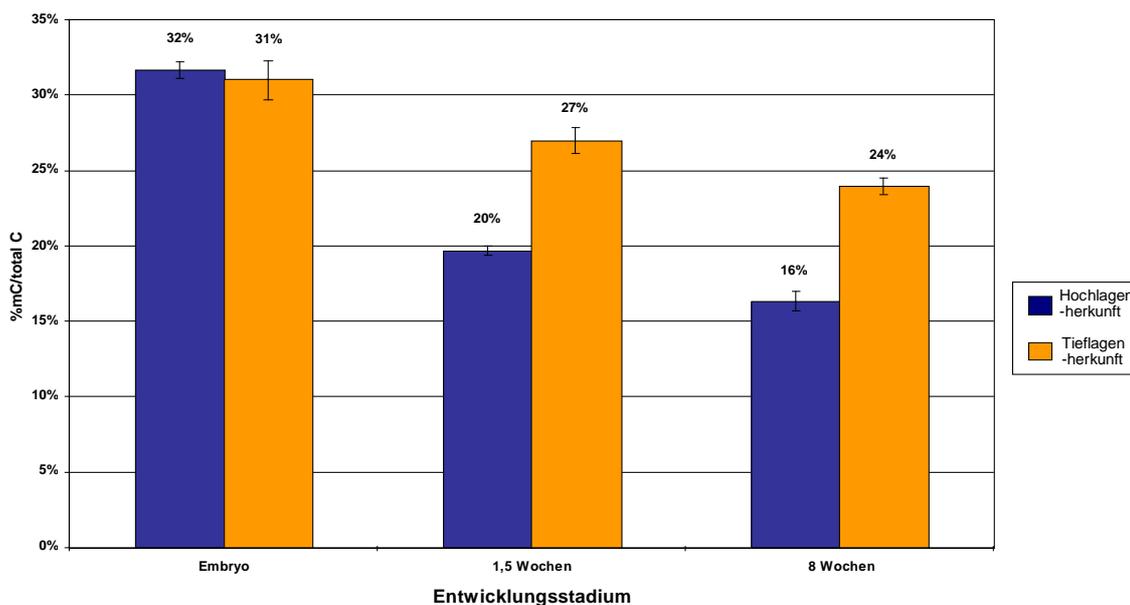


Abb. 11: Vergleich der entwicklungsabhängigen Gehalte an 5-Methylcytosin in der DNA aus Embryonen, 1.5 Wochen und 2 Monate alten Keimlingen von *P. abies* aus Hoch- bzw. Tieflagenherkunft.

3.2.2 Während Pathogeninfektion

Zur Untersuchung des Einflusses von biotischem Stress, ausgelöst durch eine Infektion von Fichtenkeimlingen mit *S. conigenus*, auf den 5-Methylcytosin-Gehalt, wurde aus je 100mg Pflanzenmaterial der 5, 18 und 35 DAI-Proben (vgl. Kap 2.2) sowie den zugehörigen Kontrollen in drei unabhängigen Präparationen DNA isoliert. In 30µg DNA/Präparation wurde nach entsprechender Aufbereitung mittels Kapillarelektrophorese der Gehalt an 5-Methylcytosin gemessen. Die Messungen wurden im Replikat durchgeführt.

Die in den 5-Methylcytosin-Gehalten infizierter und nicht-infizierter Fichtenkeimlingen nachweisbaren Unterschiede waren statistisch nicht signifikant ($p > 0.01$). In der Zusammenfassung der zwei untersuchten Faktoren (Behandlung, DAI) ließen sich keine konsistenten Reaktionsmuster der Cytosinmethylierung nach Pathogenbefall erkennen. Wie aus Abbildung 12 ersichtlich, lagen die durchschnittlichen 5-Methylcytosin-Gehalte in den fünf Tage nach Infektion (5 DAI) entnommenen Proben bei $12 \pm 1\%$ (Kontrolle $14 \pm 1\%$), 18 DAI bei $15 \pm 1\%$ ($15 \pm 1\%$) und 35 DAI bei $13 \pm 1\%$ ($15 \pm 1\%$).

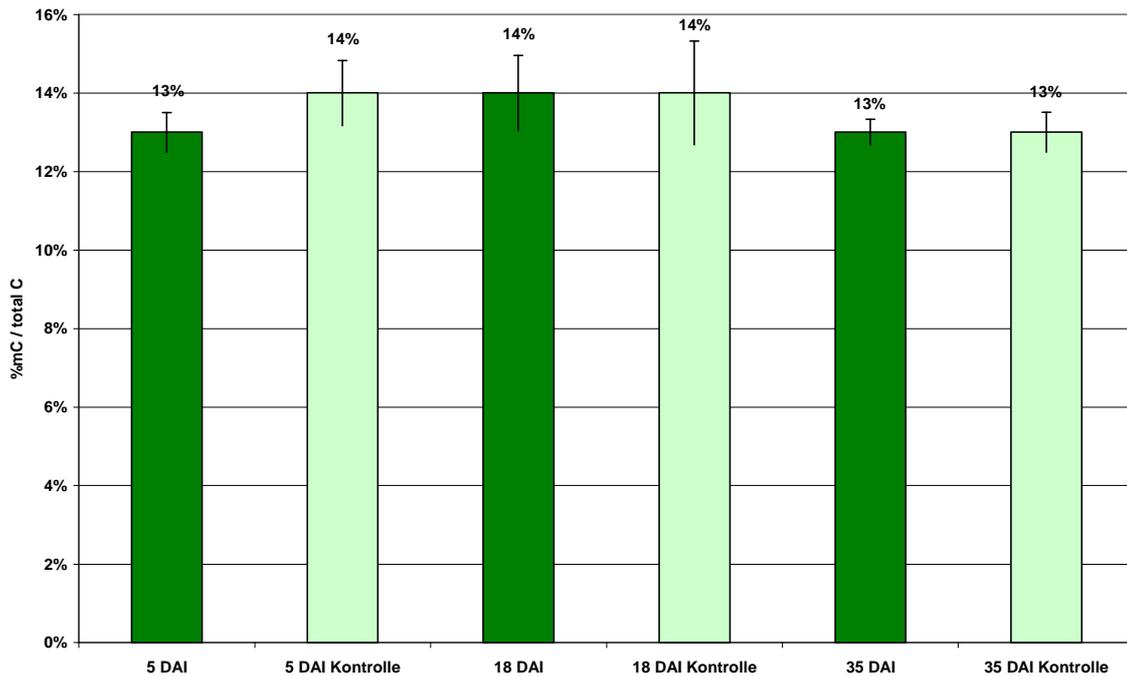


Abb. 12: Methylierung in Fichtenkeimlingen nach Infektion mit *S.conigenus* 5, 18 und 35 Tage nach Infektion (DAI).

3.3 Struktur des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*

Zur Detektion potentiell methylierter Bereich und zur Aufklärung der Struktur des Phytochrom-O-Gens der Fichte basierend auf der bekannten cDNA-Sequenz, wurde dieses aus genomischer DNA sequenziert. Es konnten 3265 bp der bekannten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number U60264) im Genom verifiziert werden. Außerdem konnten 520 bp der vor der 5'-UTR liegenden Promotor-Region des Gens sequenziert werden. Durch PCR konnten Lage und Größe eines Introns bestimmt werden (Abb. 13). Dieses Intron liegt hinter dem Stopcodon des einzigen vorhandenen Exons. Aus dem Vergleich mit einer anhand des Größenmarker (1kb+Ladder-Invitrogen GmbH Karlsruhe/Deutschland) abgeleiteten Standardkurve wurde die Größe des Introns mit 1909 bp bestimmt.

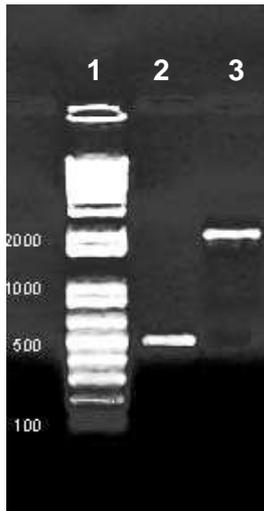


Abb. 13: Nachweis der Länge des Phytochrom-O-Introns durch PCR-Amplifikation. 1=1kb+Ladder (Invitrogen GmbH. Karlsruhe/Deutschland) 2=Fragment aus cDNA, 3=entsprechendes Amplifikat aus genomischer DNA.

Die Gesamtlänge des genomischen Phytochrom-O-Gens der Fichte beträgt somit 5890 bp gegenüber 3981 bp kodierender Sequenz. Abbildung 14 zeigt die genomische Struktur des Phytochrom O-Gens. Im Vergleich dazu ist die cDNA dargestellt.

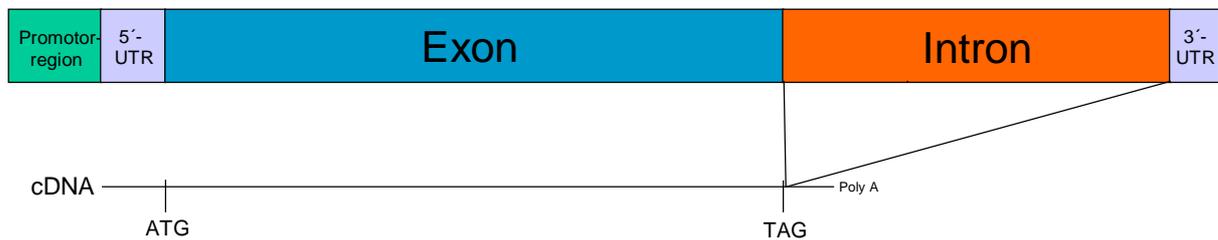


Abb. 14: Struktur des Phytochrom-O-Gens der Fichte und Vergleich mit der bekannten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number U60264). 5'-UTR= 5'-untranslatierter Bereich, 3'-UTR = 3'-untranslatierter Bereich.

Die bekannte Sequenz des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*, inklusive Promotorregion, wurde mit der genomischen Sequenz des Phytochrom A - Gens von *A. thaliana* verglichen (komplettes Alignment: Kap. 7.2). Der Vergleich zeigte eine Sequenzhomologie von 51%, was 2478 übereinstimmenden Basen entspricht.

3.4 Expression stressinduzierter Gene nach Infektion mit *Sirococcus conigenus*

3.4.1 Nachweis des Infektionsverlaufes von *S. conigenus* durch qPCR

Der Infektionsverlauf in den mit *S. conigenus* infizierten Proben wurde durch die Messung der pathogenspezifischen DNA-Menge/mg Pflanzenmaterial in einem qPCR-Assay überprüft. Aus den Zykluszeit-Werten der Eichkurve wurden die in Tabelle 19 wiedergegebenen pathogenspezifischen DNA Mengen/mg Pflanzenmaterial errechnet.

Tab. 19: Menge (pg) an Pathogen-DNA/mg infiziertem Pflanzenmaterial.

	Mittelwert (pg/mg Pflanzenmaterial)	Standard- fehler
unbehandelt	0,72	0,4
Kontrolle 5 DAI	1,50	-
5 DAI	299,00	19,0
10 DAI	146,67	36,7
18 DAI	111,67	34,7
28 DAI	149,67	15,0
35 DAI	29,47	8,9
60 DAI	21,67	4,1
Kontrolle 60 DAI	2,03	0,4

Die höchste Menge (299 pg) an pathogenspezifischer DNA konnte in der fünf Tage nach Infektion entnommenen Probe nachgewiesen werden. An den zwei folgenden Beprobungszeitpunkten zeigte sich eine Abnahme der pilzlichen DNA-Menge (10 DAI: 146,67pg, 18 DAI: 111,67pg). Nachdem die Menge an *S. conigenus*-DNA am dritten Beprobungszeitpunkt zunahm (28 DAI: 149,67 pg), ließen sich 35 Tage nach der Infektion der Fichtenkeimlinge 29,67pg und 60 Tage nach der Infektion noch 21,67 pg Pathogen-DNA nachweisen (Abb. 15). In den Kontrollen wurden, innerhalb der Messtoleranz liegende, vernachlässigbare Mengen an Pathogen-DNA gemessen.

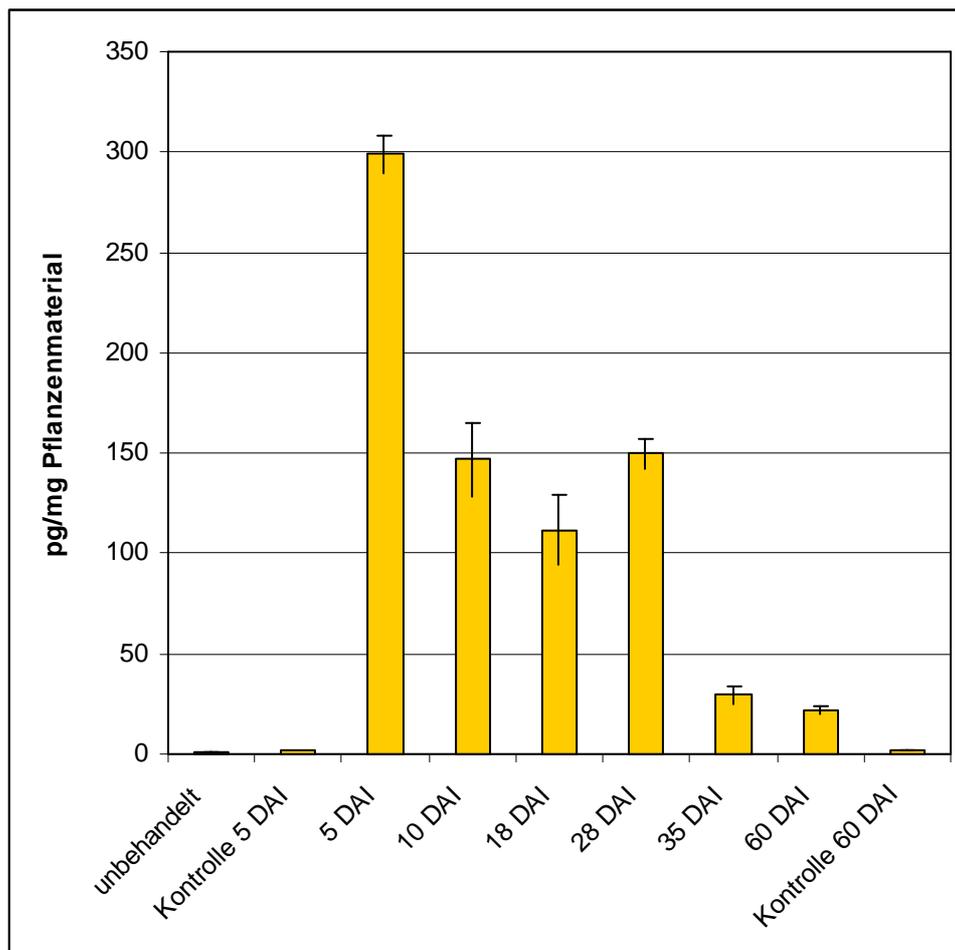


Abb. 15: Menge an pathogenspezifischer DNA im Verlauf der Infektion von Fichtenkeimlingen mit *S. conigenus*.

3.4.2 Analyse des Expressionsverlaufs stressinduzierter Gene nach Infektion mit *Sirococcus conigenus*

Die Expression von Genen nach *S. conigenus*-Infektion wurde durch Hybridisierung von cDNA-Macroarrayfilter mit den in Kapitel 2.5.2.1 beschriebenen, radioaktiv markierten cDNA-Sonden bestimmt. Für die cDNA-Macroarrayfilter wurden 128 Klone aus einer stressinduzierten cDNA-Bank auf Nylonmembrane aufgebracht.

3.4.2.1 Pilotexperiment zur Macroarrayhybridisierung

In einem Pilotversuch wurden zunächst vier DNA-Proben und als Kontrolle das für die Klonierung verwendete Plasmid mit Hilfe eines Laborroboters (*bioGrid robotic system*, BioRobotics Ltd. Haslingfield/U.K.) auf Nylonmembrane in der Griddingtechnik aufgetra-

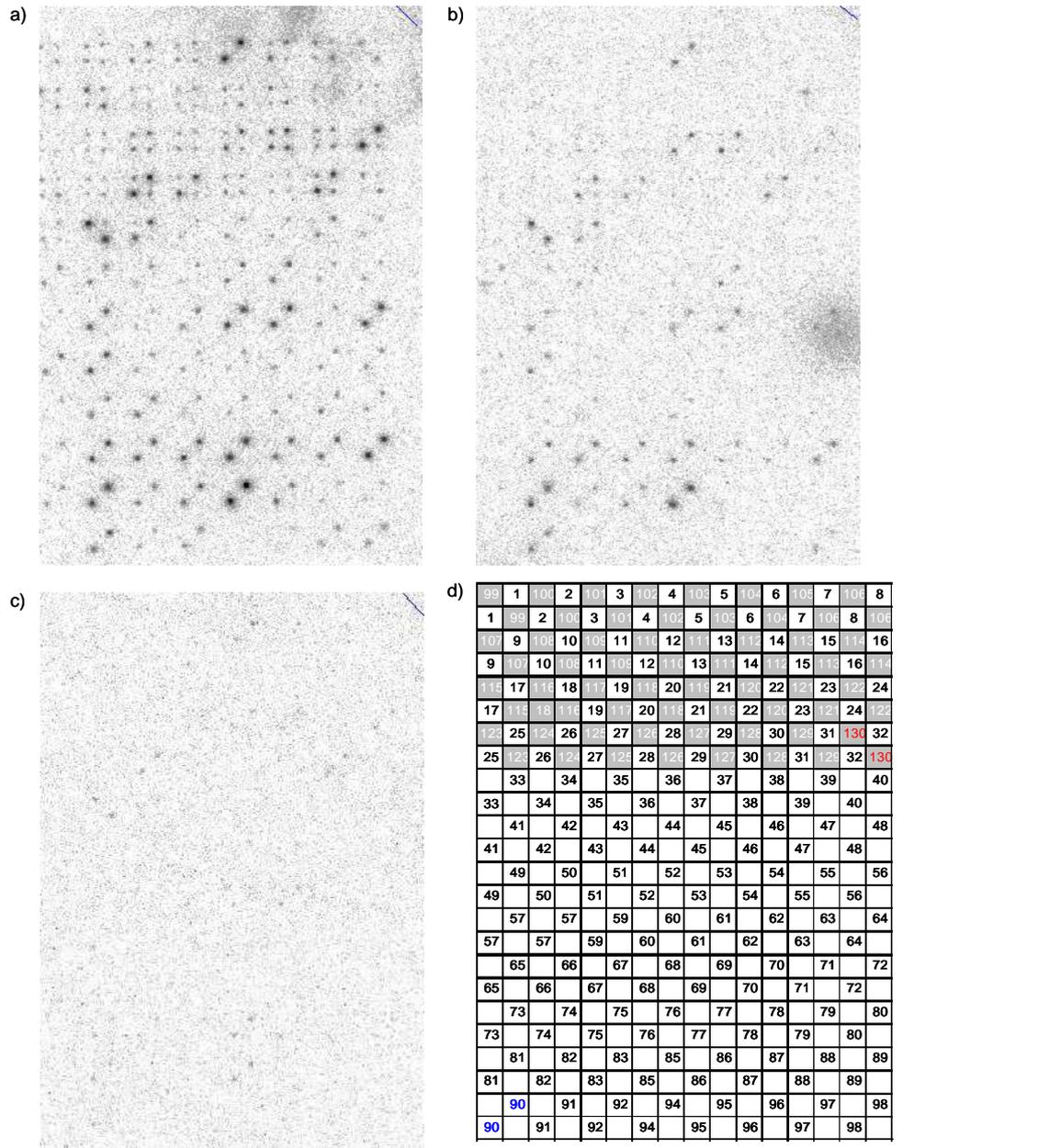


Abb. 17: Im Griddingverfahren hergestellte Macroarray-Filter. a=Verwendung unmittelbar nach der Herstellung, b=nach sechs Wochen, c=nach acht Wochen, d=Schema der aufgetragenen DNA-Proben. Zahlen entsprechend der Nummer der cDNA-Klone. 130=Plasmid-Kontrolle, 90= Negativ-Kontrolle H₂O.

3.4.2.2 Blotting der cDNA Inserts und Macroarrayhybridisierung

Im Blottingverfahren wurden auf jedem Filter jeweils bis zu 48 PCR-amplifizierte Inserts im Replikat aufgetragen (Abb. 18). Daraus ergab sich eine Verteilung der 128 PCR-Produkte auf insgesamt 3 Membrane (Membran 1: Klone 1-48, Membran 2: Klone 49-96 und Membran 3: Klone 97-130, Abb. 18). Zusätzlich zu den PCR-Produkten wurden auf den Filtern Kontrollen aufgebracht, auf Membran zwei wurden nicht rekombinante Klone (Nr. 85 und 93) durch H₂O Kontrollen ersetzt und auf Membran drei befand sich die Vektorkontrolle (Nr. 131: leeres Plasmid pSport1). Abbildung 18 zeigt ein Beispiel für eine erfolgreiche Macroarray-Hybridisierung. Hierfür wurden die mRNA Proben der 35 DAI-Probe wie in Kapitel 2.5.2.1 radioaktiv markiert und eine Hybridisierung durchgeführt.

Es zeigte sich im Zuge der Hybridisierungen, dass für 64 der 128 auf den Membranen aufbrachten Klone eine Änderung der Genexpression nach Pathogeninfektion reproduzierbar festgestellt werden konnte. Für diese 64 Klone zeigten die Ergebnisse der Macroarray-Analyse fünf Tage nach der Infektion mit *S. conigenus* (5 DAI) einen Anstieg der Expression der auf dem Filter aufbrachten stressrelevanten Gene. 18 Tage nach Infektion (18 DAI) war die Expression aller Gene stark reduziert. Die meisten Gene zeigten 35 Tage nach der Infektion (35 DAI) keine oder nur marginale Veränderung der Expression gegenüber den Kontrollen und im Vergleich zu 18 DAI-Hybridisierungen. 11 Klone zeigten einen Anstieg der Expression der jedoch nicht die Werte der 5 DAI-Probe erreichte. In den infizierten Proben zeigte sich ein fünf bis 20-facher Anstieg der Expression gegenüber den nicht-infizierten Proben. Davon abweichend verhielten sich die Gene pPA0077 (*Hordeum vulgare* C-Hordein), pPA0038 (*P. abies* Halotoleranz-Protein), pPA0061 (*A. thaliana* Brix-domain containing protein), pPA0074 (*Pinus sylvestris* Dehydrin), pPA0007 (*A. thaliana* plastid inner envelope membrane protein) und pPA0016 (*A. thaliana* Auxin-responsive family protein) mit einer maximal vierfachen Erhöhung der Expression. Ebenfalls abweichend verhielt sich Gen pPA0049 (*B. licheniformis* mRNA für Subtilisin) mit einer 42-fachen Expressionssteigerung. Basierend auf der Reaktion auf den Pathogenangriff, ließen sich die auf dem Filter aufbrachten Gene in drei Gruppen (Cluster I-III) zusammenfassen (Abb. 19). Es kann eine hohe Ähnlichkeit in der Expression der Gene als Reaktion auf den Pathogenangriff festgestellt werden, die drei Cluster zeigen aber dennoch spezielle Charakteristika im Expressionsverlauf der zusammengefassten Gene (Abb. 20). In Tabelle 20 wurden den in den Clustern geordneten Genen, aufgrund von Homologien zu beschriebenen Genen aus anderen Organismen, Funktionen zugeordnet.

Gene ohne Homologie wurden als nicht identifiziert (n.i) markiert. Die Verhältniswerte auf denen die Berechnungen basieren sind im Anhang (Kap. 7.2) wiedergegeben.

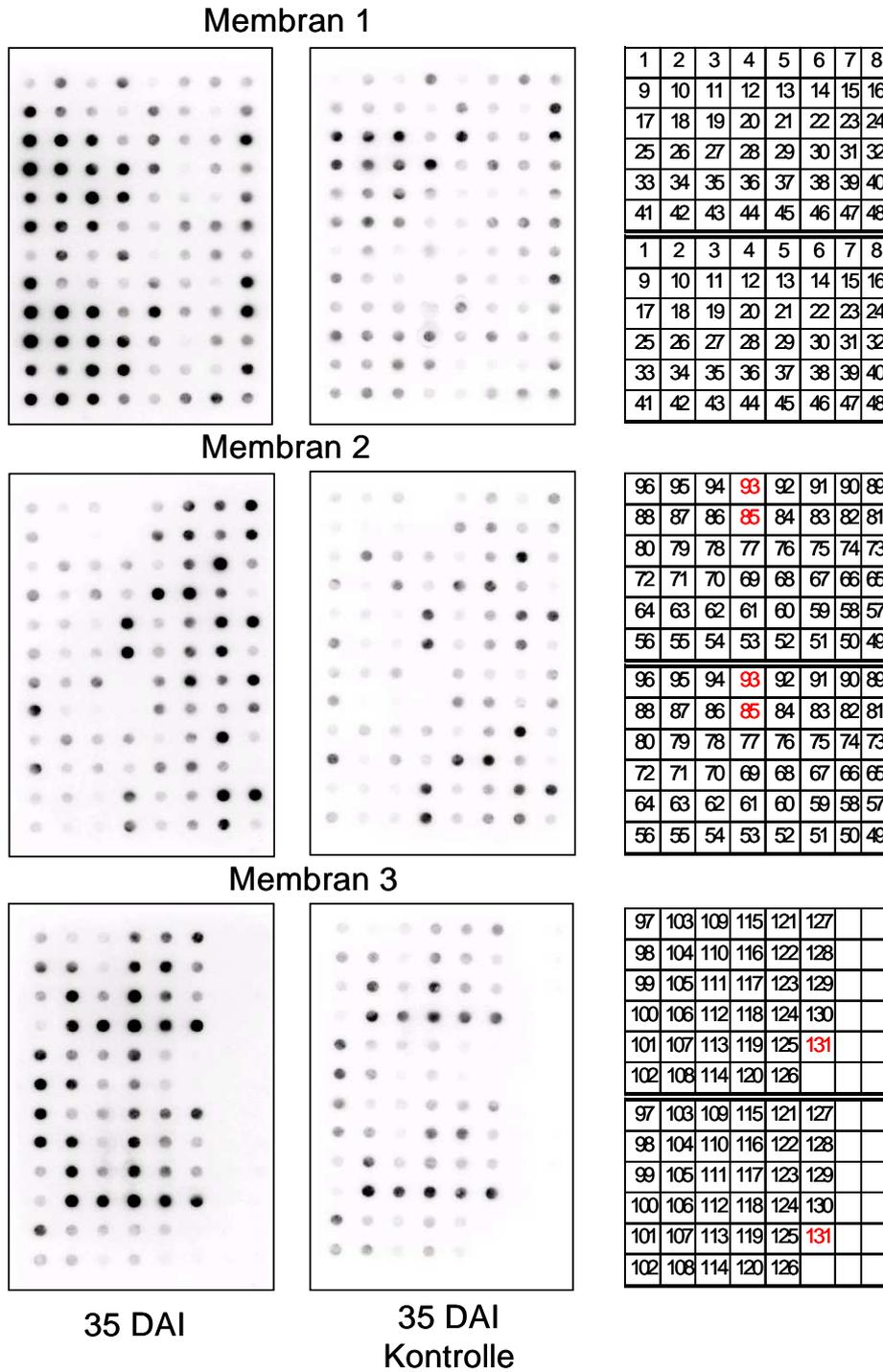


Abb. 18: Beispiel für eine Macroarray-Hybridisierung und Schema der im Blotting-Verfahren aufgebrachtten cDNA-Klone. Zahlen entsprechen den Nummern der cDNA-Klone. 131=Plasmid-Kontrolle pSport 1, 85 & 93 = Negativ Kontrolle H₂O. DAI=days after infection.

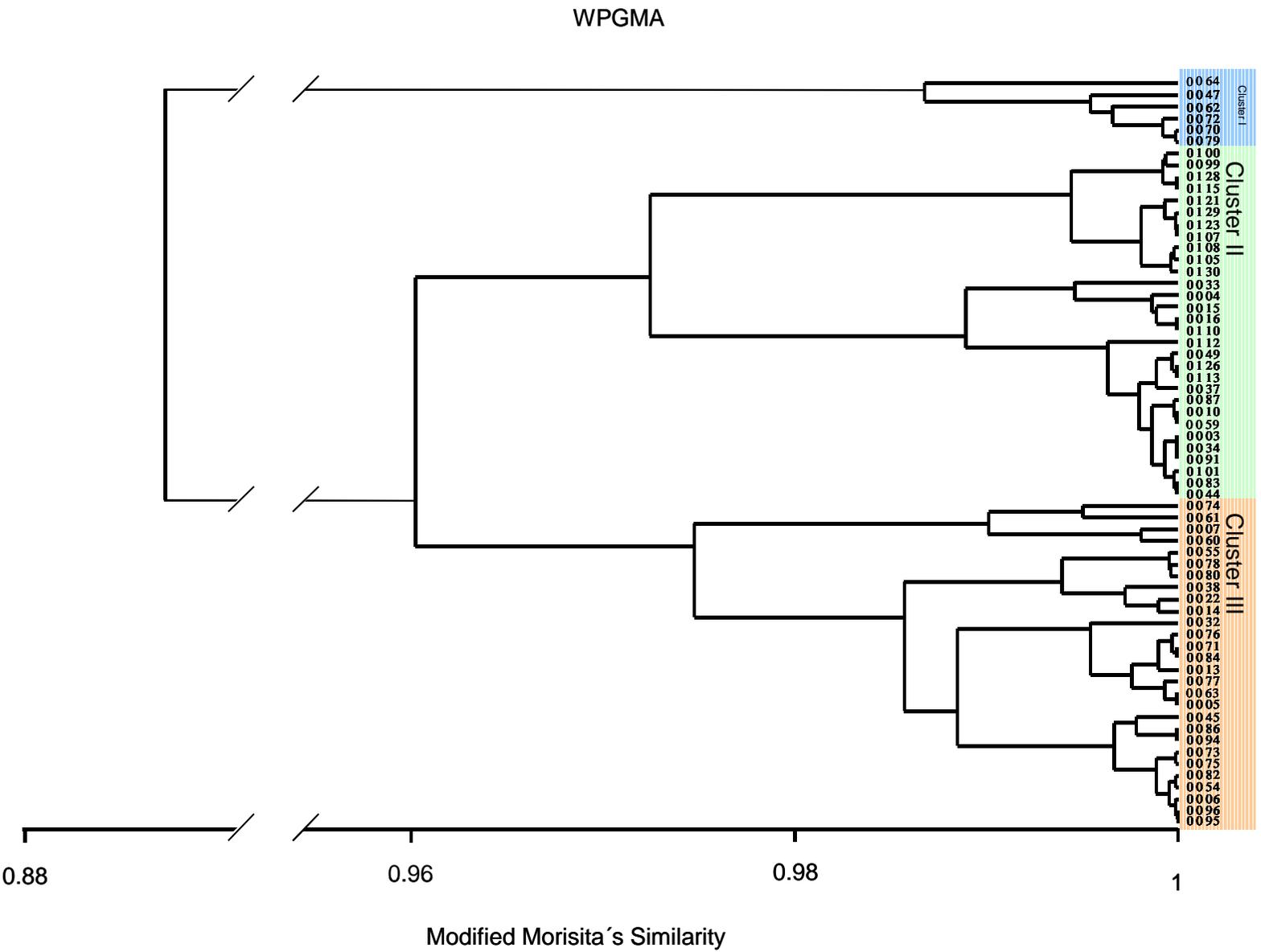
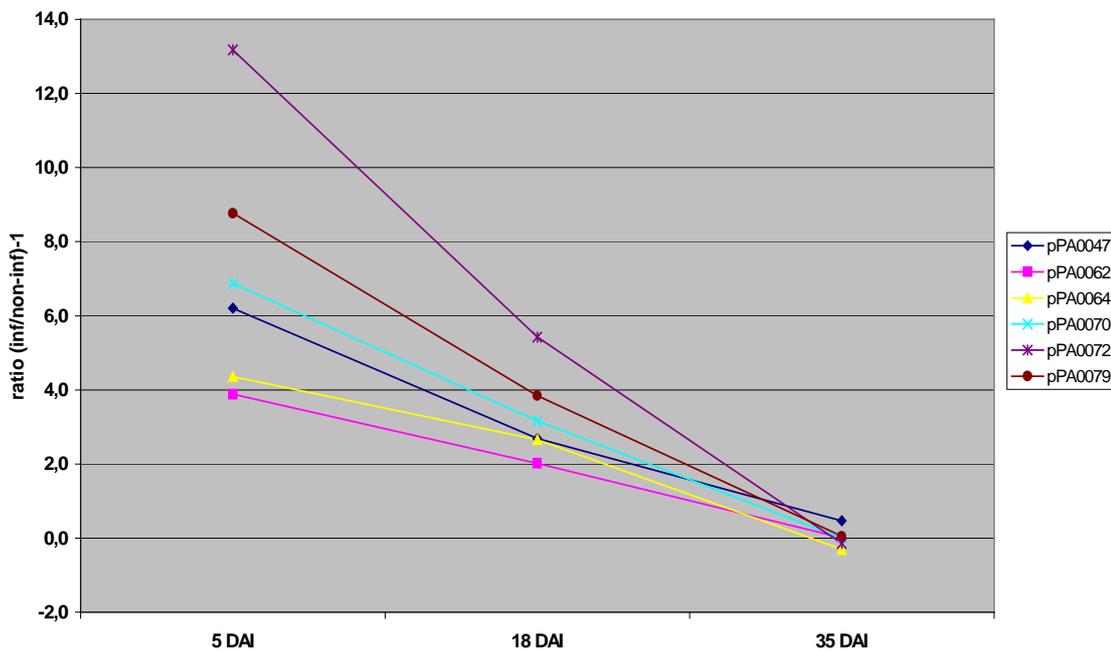


Abb. 19: Auf dem *Modified Morisita's Similarity*-Koeffizienten basierend berechnetes WPGMA-Cluster der in der Macroarray-Analyse nach Pathogenstress untersuchten Gene.

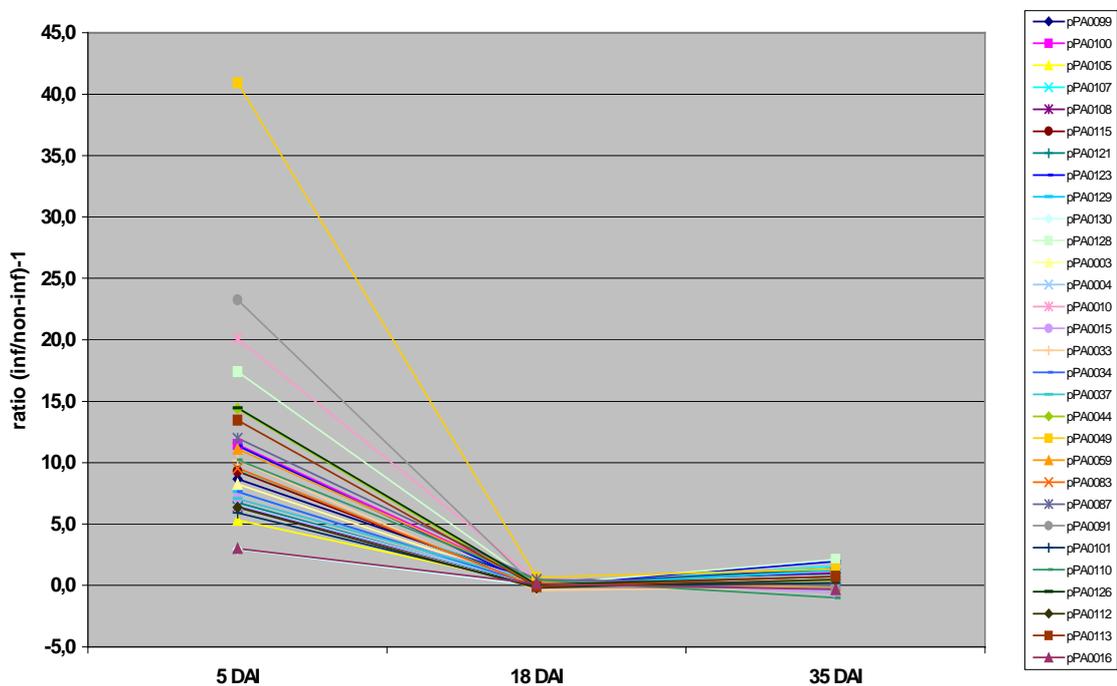
Tab. 20: Liste der untersuchten cDNA-Klone mit zugeordneter Funktion. n.i.=nicht identifiziert (nach Schubert 2002, aktualisiert 2004)

cDNA Klon	Funktion	Cluster
pPA0047 pPA0062 pPA0064 pPA0070 pPA0072 pPA0079	<i>Arabidopsis thaliana</i> pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein <i>Spirodela polyrhiza</i> mRNA für D-myo-Inositol-3-Phosphate synthase n.i. n.i. <i>Oryza sativa</i> tRNA synthase <i>A. thaliana</i> 40S ribosomal protein S24	Cluster I
pPA0099 pPA0100 pPA0105 pPA0107 pPA0108 pPA0115 pPA0121 pPA0123 pPA0129 pPA0130 pPA0128 pPA0003 pPA0004 pPA0010 pPA0015 pPA0033 pPA0034 pPA0037 pPA0044 pPA0049 pPA0059 pPA0083 pPA0087 pPA0091 pPA0101 pPA0110 pPA0126 pPA0112 pPA0113 pPA0016	<i>A. thaliana</i> pectinesterase family protein n.i. <i>A. thaliana</i> serine-threonine kinase <i>O. sativa</i> 60S ribosomal protein n.i. <i>Eustoma grandiflorum</i> flavonoid-hydroxylase <i>O. sativa</i> putative transposase-like protein <i>Cicer arietinum</i> 20S proteasome alpha subunit D n.i. n.i. <i>Picea abies</i> class IV chitinase Chia4-Pa1.3 <i>A. thaliana</i> COP9 signalosome complex subunit 1 <i>A. thaliana</i> expressed protein <i>P. abies</i> mRNA for small heat shock protein, cyt. class II n.i. n.i. <i>P. abies</i> mRNA for hypothetic protein <i>P. abies</i> small heat shock protein n.i. <i>Bacillus licheniformis</i> mRNA for subtilisin n.i. n.i. <i>Pisum sativum</i> putative senescence-associated protein <i>P. sativum</i> ribosomal protein S26 n.i. <i>A. thaliana</i> 60S ribosomal protein <i>A. thaliana</i> expressed protein n.i. <i>A. thaliana</i> ABC transporter family protein <i>A. thaliana</i> Auxin-responsive family protein	Cluster II
pPA0060 pPA0074 pPA0007 pPA0061 pPA0038 pPA0014 pPA0022 pPA0055 pPA0078 pPA0080 pPA0013 pPA0063 pPA0071 pPA0076 pPA0077 pPA0084 pPA0005 pPA0032 pPA0073 pPA0095 pPA0096 pPA0006 pPA0045 pPA0054 pPA0075 pPA0082 pPA0086 pPA0094	<i>Phaseolus vulgaris</i> tRNA <i>Pinus sylvestris</i> dehydrin <i>A. thaliana</i> plastid inner envelope membrane protein <i>A. thaliana</i> brix domain-containing protein <i>P. abies</i> mRNA for halotolerance protein n.i. <i>A. thaliana</i> NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit <i>P. abies</i> mRNA or ATP-synthase, Beta-UE <i>P. abies</i> mRNA for glutamatcysteine ligase <i>O. sativa</i> putative adenosine deaminase n.i. <i>A. thaliana</i> abscisic acid-responsive protein <i>O. sativa</i> small GTP-binding protein <i>P. abies</i> mRNA for hypothetic protein <i>Hordeum vulgare</i> mRNA for C-hordein <i>Persea americana</i> fructose-bisphosphate aldolase <i>Zea mays</i> cyclophilin mRNA <i>A. thaliana</i> short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) protein <i>P. abies</i> mRNA for antifreeze-like protein n.i. <i>O. sativa</i> Nonclathrin coat protein gamma - protein <i>P. abies</i> mRNA for 40S ribosomal protein S2 <i>Pinus banksiana</i> root specific S-adenosylmethionine synthase mRNA <i>A. thaliana</i> C3HC4-type RING finger family protein (zinc finger) <i>P. abies</i> cinnamyl-alcohol-dehydrogenase (CAD) gene <i>P. abies</i> 70kDa heat shock protein n.i. n.i.	Cluster III

Cluster I



Cluster II



(Legende siehe S.55)

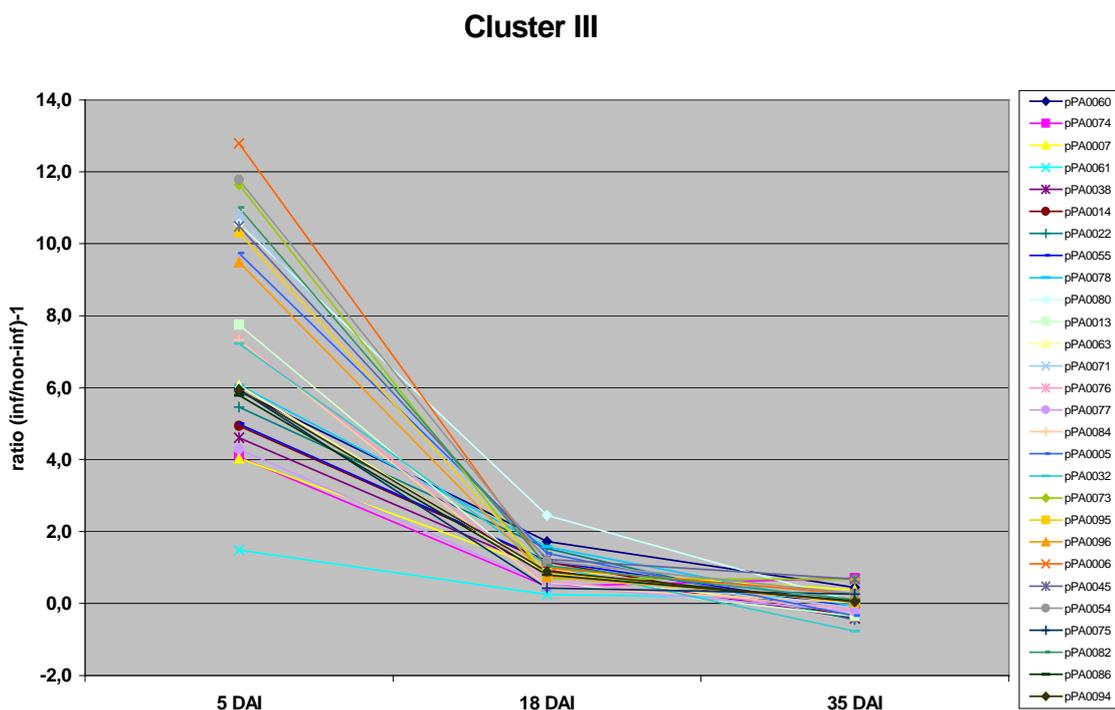


Abb. 20: Expressionsverlauf der Gene in den Clustern I-III zwischen dem fünften und dem 35. Tag nach Infektion. 5 DAI=5 Tage nach Infektion, 18 DAI =18 Tage nach Infektion, 35 DAI=35 Tage nach Infektion.

3.5 Messung der Transkription ausgewählter Gene in einem quantitativen PCR-Assay

Die Menge an genspezifischem Transkript in den untersuchten Proben (5 DAI, 18 DAI und 35 DAI) wurde für fünf ausgewählte Gene (pPA0047: *A. thaliana* pentatricopeptide repeat - containing protein (PPR), pPA0073: *P. abies* antifreeze-like protein, pPA0075: *P. abies* Cinnamyl-Alcohol-Dehydrogenase Gen (CAD), pPA0123: *C. arietinum* 20S proteasome alpha subunit D, pPA0128: *P. abies* Klasse IV Chitinase) in einem quantitativen Real-Time RT-PCR-Assay bestimmt. Exemplarisch wird in Abbildung 21 die Transkriptmessung des Klasse IV Chitinase-Gens in Form eines qPCR-Amplifikationsplots dargestellt. Die relative Zunahme an Transkript des Chitinasegens, verglichen mit dem Referenzgen α -Tubulin, lässt sich fünf Tage nach der Infektion ebenso nachvollziehen wie der Rückgang nach 18 Tagen und der erneute Anstieg nach 35 Tagen. Auf der X-Achse wird die Anzahl der Zyklen dargestellt, auf der Y-Achse in logarithmischer Darstellung die Zunahme der

Transkriptmenge. Bei den Datenmesspunkten zwischen den Zyklen 0 und 10 handelt es sich um unspezifische Signale die nicht in die Auswertung einfließen.

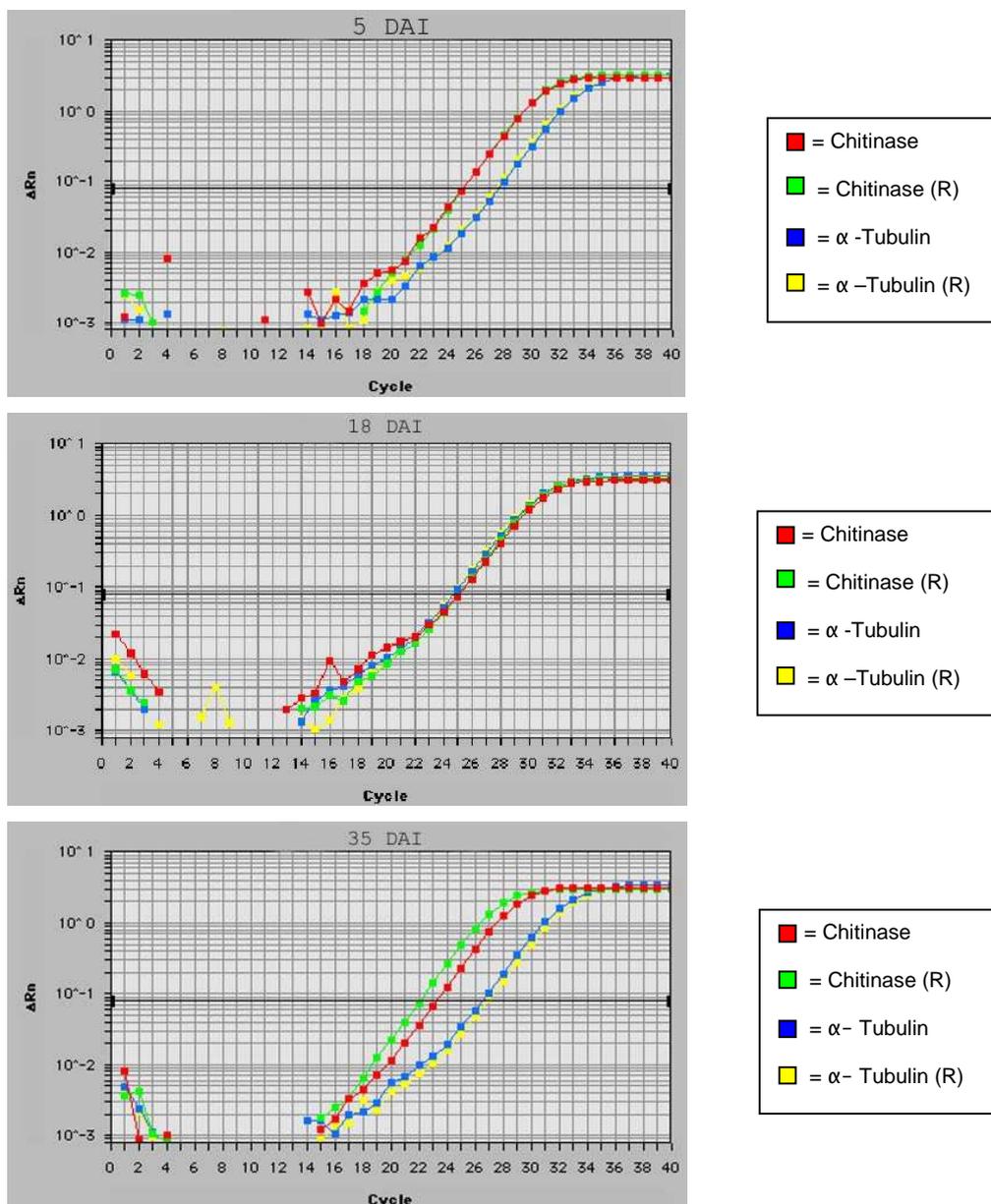


Abb. 21: qPCR Amplifikation des Klasse IV Chitinase-Gentranskripts im Vergleich zum endogenen Referenzgen α -Tubulin. 5, 18, 35 DAI=5, 18, 35 Tage nach Infektion mit *S.conigenus*.(R)=Replikat

In Abbildung 22 werden die Ergebnisse der beiden Methoden gegenübergestellt. Am ersten Probenentnahme-Zeitpunkt, fünf Tage nach Infektion, zeigten alle untersuchten Gene eine deutlich erhöhte Transkription. In den 18 DAI Proben konnte eine Abnahme der Transkription gemessen werden. pPA0123 (*C. arietinum* 20S proteasome) und pPA0128 (*P. abies* Klasse IV Chitinase) zeigen sowohl in der qPCR-Untersuchung wie

gen. In diesem Experiment sollte geklärt werden, ob das gesamte rekombinante Plasmid inklusive Insert oder die durch PCR amplifizierte Insertsequenz auf die Membran aufgebracht werden sollte. Außerdem war es nötig, die geeignete DNA-Menge festzustellen. Abbildung 16 zeigt das Ergebnis eines Pilotexperimentes.

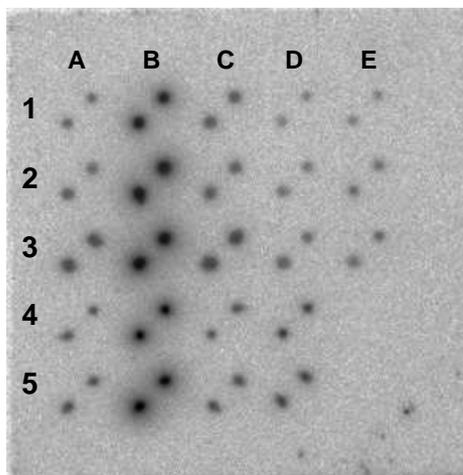
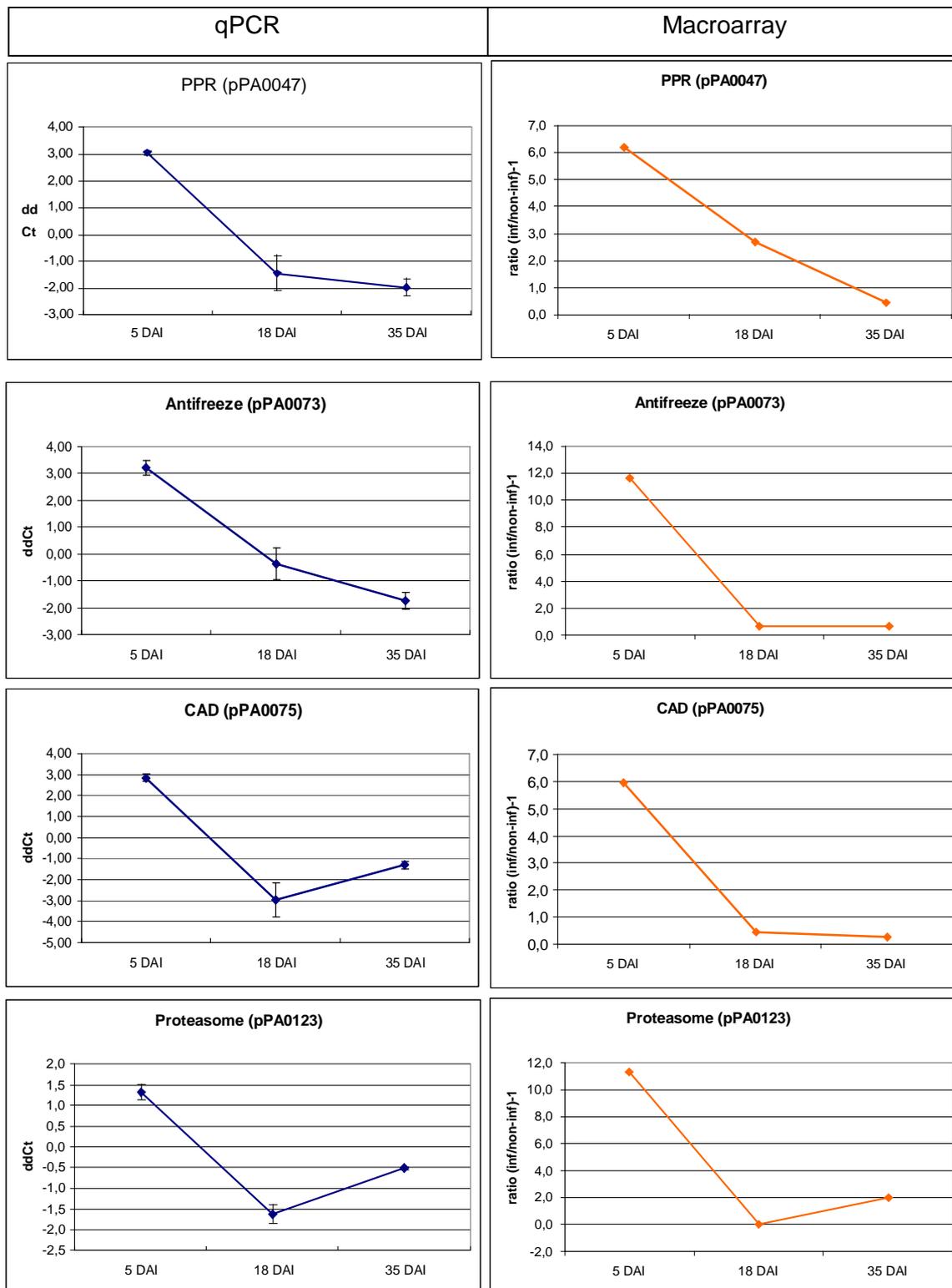


Abb. 16: Pilotexperiment zur Filterhybridisierung. Horizontal: **A**=pPA0001 (Chlorophyll A/B bindung protein), **B**=pPA0012 (ribosomal RNA-gene), **C**=pPA0075 (CAD-gene), **D**=pPA0031 (Ubiquitin-gene), **E**=Kontrolle (leeres Plasmid pSport1). Vertikal: **1**=1.5 µg/µl Plasmid-DNA, **2**=2.5 µg/µl Plasmid DNA, **3**=3.5 µg/µl Plasmid-DNA, **4**=PCR-amplifiziertes Plasmid-Insert (200ng/µl), **5**= PCR-amplifiziertes Plasmid-Insert (400ng/µl).

Eine DNA-Konzentration der 128 durch PCR-amplifizierten Inserts der cDNA Klone von 400ng/µl wurde als optimal für die Durchführung der Filterhybridisierungen bestimmt (Abb. 16). Die Proben wurden wie in Abbildung 17d schematisch dargestellt auf die Membran aufgetragen.

Nach mehreren Hybridisierungsversuchen erwies sich das Verfahren allerdings als nicht zufriedenstellend, da es bereits nach sechswöchiger Lagerung der Filter zu einer Abschwächung der Signalintensität kam. Acht Wochen nach der Herstellung erwiesen sich die Filter als nicht mehr verwendbar (Abb. 17c). Das Griddingverfahren wurde deshalb verworfen und man ging zu dem in Kapitel 2.6.1 beschriebenen Blottingverfahren über.

auch im Macroarray-Versuch eine erneute Zunahme der Expression nach 35 Tagen (35 DAI). Klon pPA0075 (CAD) weist, abweichend von den Ergebnissen der Macroarray-Untersuchung, eine Zunahme der Transkripte 35 Tage nach Infektion (35 DAI) auf.



(Legende siehe S. 58)

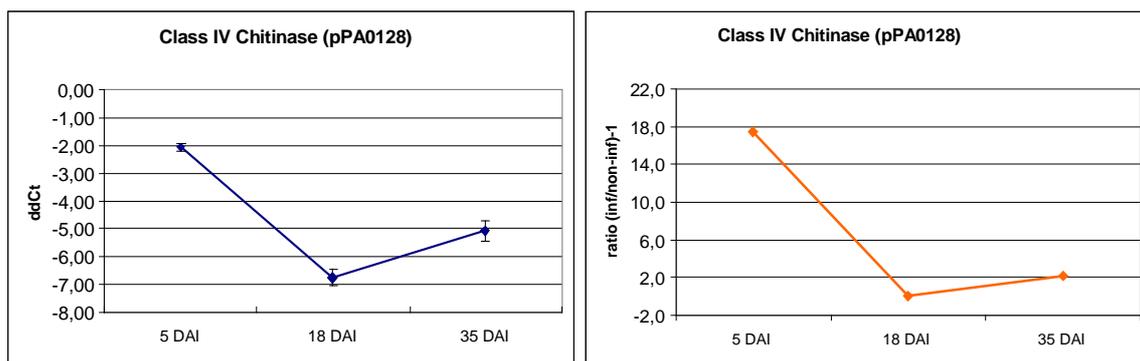


Abb. 22: Gegenüberstellung der qPCR-Befunde (linke Bildhälfte) und der entsprechenden Macroarray-Analyse (rechte Bildhälfte). DAI=days after infection

4 Diskussion

4.1 Genetische Charakterisierung der Kreuzungsnachkommenschaften

Betrachtet man die Ergebnisse der Untersuchungen der Vollgeschwisterfamilien im Samenstadium mit EST-Markern, so kann das Auftreten von Distortionen in der allelischen Segregation wie im Falle des Genlocus Pa0038 in den Vollgeschwisterfamilien 15890 und 15046 (vgl. Kap. 3.1.1.1) bedeuten, dass während des Reproduktionprozesses Selektionsereignisse an diesem Locus aufgetreten sind. Diese Beobachtung lässt verschiedene Schlussfolgerungen zu.

Zum einen könnten die Umweltbedingungen während der weiblichen und männlichen Gametenbildung zu unterschiedlichen Viabilität der Gameten führen (Nikkanen *et al.* 2000; Owens *et al.* 2001; Aronen *et al.* 2002). Der in den Kreuzungen verwendete Pollen stammte allerdings von ein und demselben Baum und Einflüsse von Segregationsdistortionen des väterlichen Elter in beiden Kreuzungsumwelten konnten nicht festgestellt werden (Besnard, Nancy/Frankreich, pers. Mitteilung). Somit wären Unterschiede in der Viabilität der Gameten nur auf den mütterlichen Elter zurückzuführen.

Zum anderen könnte es direkt während der Befruchtung zu Selektionsereignissen gekommen sein. Es darf ferner nicht außer acht gelassen werden, dass es während der frühen Embryogenese zu Abortionen gekommen sein kann, die zu Distortionen in den Nachkommen führen. Hierzu lassen sich mangels Informationen über den Hohlkornanteil bzw. den Anteil nicht-keimungsfähiger Samen keine Aussagen machen.

Favre *et al.* (pers. Mitteilung) konnten bei der Untersuchung des gleichen Materials mit weiteren polymorphen Markern (SSR, STS und AFLP-Marker) feststellen, dass die Kreuzungsumwelt die Vererbung einiger genomischer Blöcke beeinflusst. Diese Effekte sind unter Gewächshausbedingungen, also in einer warmen Umgebung, stärker ausgeprägt als im Freiland. In den Vollgeschwisterfamilien aus Gewächshauskreuzungen konnten acht, in den Vollgeschwisterfamilien aus Kreuzungen außerhalb des Gewächshauses nur sechs gestörte Genombereiche festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit den Untersuchungen mittels EST-Markern überein, da es hier in der Verteilung der 2-Locus-Genotypen in den Vollgeschwisterfamilien aus warmer Kreuzungsumgebung (15887 und 15905) in zwei Fällen zu signifikanten Verschiebungen kam. Diese Befunde lassen den Schluss zu, dass es unter bestimmten Umweltbedingungen zu einer selektiven Beeinflussung des genetischen Beitrages der Kreuzungspartner an den Nachkommen kommen

kann. Die beschriebenen Unterschiede im Phänotyp der Nachkommen aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten (Johnsen *et al.* 1995, Johnsen und Skrøppa 1997, Skrøppa und Johnsen 1999) lassen sich möglicherweise auf diese Beeinflussung zurückführen. Dem steht allerdings die Beobachtung entgegen, dass im Falle der Vollgeschwisterfamilien 15887 (kalte Kreuzungsumwelt) und 15046 (warme Kreuzungsumwelt) unabhängig von den Umweltbedingungen Selektionsereignisse am gleichen Locus pPA0038 (*P. abies* mRNA für ein Halotoleranz-Protein) (Tabelle 12 und 13) auftraten. Es kann somit nicht eindeutig bewiesen werden, dass die Unterschiede im Phänotyp der Nachkommen ausschließlich durch Selektionsereignisse bedingt sind. Außerdem lassen die Ergebnisse keine Rückschlüsse zu, ob spezielle Entwicklungsstadien für eine selektive Beeinflussung besonders sensitiv sind. Es ist davon auszugehen, dass die phänotypische Ausprägung der Nachkommen unter dem Einfluss multipler Faktoren steht. Diese Faktoren, wie zum Beispiel der komplexe Einfluss von Multilocus-Interaktionen, bedürfen umfangreichere Studien als bisher durchgeführt.

Schlussfolgernd kann zudem festgehalten werden, dass die obengenannten Selektionsereignisse nur extrem geringe Auswirkungen auf den Gesamtmethylcytosingehalt haben können, da nur an einem einzigen Locus eine Segregationsdistortion nachweisbar war. Wie in Kapitel 4.3 diskutiert, stellen die Unterschiede in der Gesamtmethylierung vielmehr einen umweltbeeinflussten Parentaleffekt dar der sich im Phänotyp der Nachkommen zeigt (vgl. Kap. 1.4).

4.2 Charakterisierung des Phytochrom-O-Gens von *P. abies*

Licht ist ein wichtiger, das Pflanzenwachstum (Photomorphogenese) entscheidend beeinflussender Faktor. Die Pflanze verfügt über wirkungsvolle Mechanismen zur Wahrnehmung von Licht und zur und Weiterleitung der dadurch ausgelösten Signale.

Die Wahrnehmung des photomorphogenetischen Lichtes erfolgt über den Photorezeptor Phytochrom, der Lichtsignale über den gesamten sichtbaren Spektralbereich absorbiert aber besonders auf rotes Licht anspricht (Schopfer und Brennicke 1999, Quail 2002). In der Pflanze kommen verschiedene, von einer Genfamilie kodierte, Formen des Phytochroms vor, die sich in ihrer Funktion unterscheiden. In Gymnospermen besteht die Phytochrom-Genfamilie aus vier Phytochromen: Phytochrom N, O, P und Y (Schmidt und Schneider-Poetsch 2002), in *Arabidopsis* wurden fünf Phytochrome (Phytochrom A, B, C, D und E) nachgewiesen (Sharrock und Quail 1989). Phytochrome liefern der Pflanze Informationen über Tageslänge, sowie Lichtintensität und -qualität am jeweiligen Standort.

Das Licht induziert ein Signal, das von den Phytochromen an die Pflanze weitergegeben und von, für das entsprechende Signal, kompetenten Zellfunktionen, z.B. die Promotorregionen spezifischer Gene, empfangen wird (Kuhlemeier *et al.* 1987). Es kommt daraufhin zur spezifischen An- bzw. Abschaltung von Genen. In *Picea* (D'Aoust und Hubac 1986) und *Populus* (Howe *et al.* 1996) konnte nachgewiesen werden, dass Phytochrome in die von der Photoperiode abhängige Regulation der Knospenbildung eingebunden sind. In der Fichte wird außerdem ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Phytochrome und den dadurch vermittelten Reaktionen wie Einstellung des Wachstums und Ausbildung von Frosthärte in Keimlingen gesehen (Johnsen, Ås/Norwegen, pers. Mitteilung).

Erste Bestimmungen von Transkriptionswerten des Phytochrom-O-Gens in einem qPCR-Assay wiesen eine signifikant erhöhte Expression des Phytochrom-O-Gens in den Nachkommen aus kalter Kreuzungsumwelt im Vergleich zu den Nachkommen aus warmer Kreuzungsumwelt nach (Mølmann, Tromsø/Norwegen, pers. Mitteilung). Aufgrund der engen Zusammenhänge mit den Messergebnissen der 5-Methylcytosin-Gehalte (Kap. 3.1.1.2) wurde die Sequenzierung des Phytochrom-O-Gens der Fichte durchgeführt. Ziel war hierbei die Gewinnung von Informationen über den Zusammenhang zwischen den potentiell methylierten Regionen im Gen und/oder der Promotorregion und den damit einhergehenden Regulationsvorgängen. Im Verlauf der Experimente führten allerdings Befunde aus weiteren qPCR-Untersuchungen nach einem modifizierten Protokoll (Fossdal, Ås/Norwegen, pers. Mitteilung) und Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen zu dem Ergebnis, dass sich die Transkription des Phytochrom-O-Gens in Nachkommenschaften aus verschiedenen Kreuzungsumwelten nicht signifikant unterscheidet. Außerdem weist die Expression keine konsistenten Muster in den Nachkommenschaften auf. Bei der Untersuchung der Phytochrom O und P-Loci im Genom der Kiefer und dem Vergleich mit Befunden aus QTL-Marker Analysen wurde zudem deutlich, dass die phänotypische Ausprägung der Merkmale Zeitpunkt der Knospenbildung und Induktion der Frosthärte von verschiedenen Faktoren determiniert wird. Die Phytochrome als Signaltransduktoren spielen eine wichtige Rolle, sind allerdings nicht alleinige Auslöser und Regulatoren dieser Vorgänge (García-Gil *et al.* 2003).

Da das Phytochrom-O-Gen der Fichte phylogenetisch als Vorläufer des Gens gesehen werden kann, aus dem die Phytochrom A und C Gene aus *A. thaliana* entstanden (Abbildung 23) sind (Clapham *et al.* 1999), wurde ein Sequenzvergleich sowie ein Vergleich der Intronstrukturen durchgeführt.

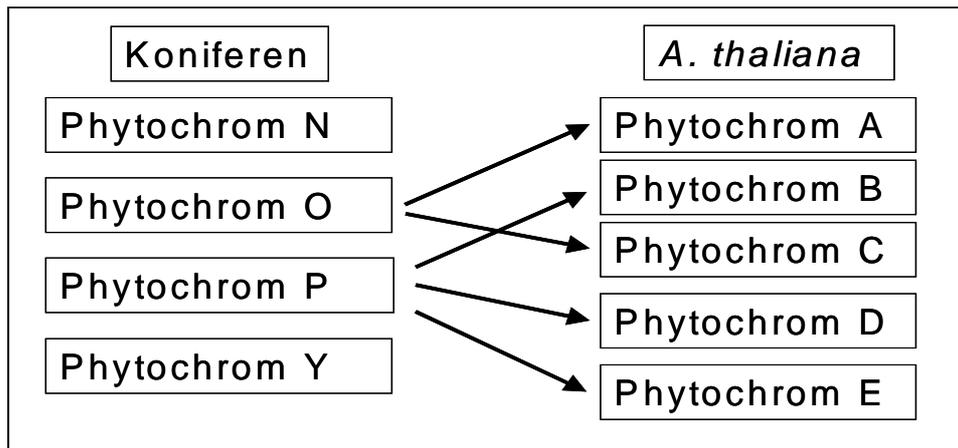


Abb. 23: Phytochrom Gene in *A. thaliana* und in ihre phylogenetischen Vorläufer in Koniferen

Das Phytochrom A-Gen verfügt über drei Intronsequenzen (cDNA-Position 2246 bp, 3062bp und 3325 bp) von 194bp, 69 bp und 81bp Länge und die kodierende Sequenz hat eine Länge von 3771bp (Abb. 24).

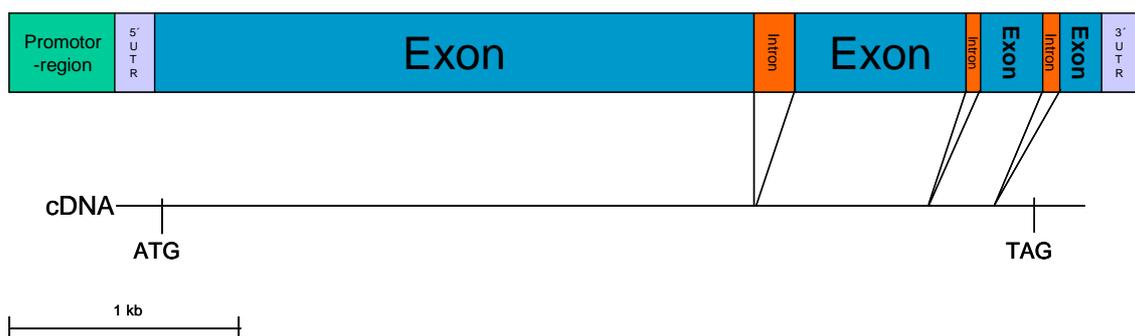


Abb. 24: Struktur des Phytochrom A Gens von *A. thaliana* und Vergleich mit der bekannten cDNA-Sequenz (EMBL Accession Number X17341). 5'-UTR= 5'-untranslatierter Bereich, 3'-UTR = 3'-untranslatierter Bereich.

Die genomische Sequenz des Phytochrom-O-Gens der Fichte ist um 1775 bp länger als das Phytochrom A Gen. Auch unterscheiden sich in beiden Phytochromen Lage und Länge der Introns. Das Phytochrom O verfügt über ein einziges, nach dem Stopcodon des Exons liegendes Intron. Die Lage der Introns im Phytochrom A Gen lässt auf eine Entstehung der Introns nach der phylogenetischen Trennung der Linien schließen.

Beim Vergleich der regulatorischen Bereiche fällt auf, dass die in 5'-Richtung vor dem untranslatierten Bereich liegende Promotorregion eine Sequenzidentität von 38% aufweist. Dieser Befund lässt annehmen, dass die beiden Phytochrome über eine ähnliche Transkriptionsregulation verfügen.

4.3 Der Einfluss abiotischer Faktoren auf die Cytosinmethylierung bei *P.abies*

4.3.1 Der Einfluss von Kreuzungsumwelt und Herkunft auf den 5-Methylcytosin-gehalt

Es wurde bisher die Meinung vertreten, dass die Anpassung der Fichte an sich ändernde, unter Umständen extremer werdende Umweltbedingungen, in einem langsamen, mehrere Generationen umfassenden Prozess geschieht (Skrøppa *et al.* 1995). Als Antriebskraft für die Anpassung wurden verschiedenste evolutionäre Prozesse, als Hauptfaktor jedoch die Selektion auf bestimmte Genotypen gesehen (Müller-Starck 1994, Müller-Starck und Schubert 2000, Ziehe *et al.* 2000, Müller-Starck und Schubert 2001).

Eine Vielzahl von Untersuchungen zu sogenannten *after-, maternal* oder *parental effects* (vgl. Kap. 1.4) konnten jedoch zeigen, dass die Anpassung an veränderte klimatische Bedingungen bereits innerhalb einer Generation auftreten kann (Donohue und Schmitt 1998). Auslöser für das von dem der Eltern abweichenden Verhalten der Nachkommenschaft scheinen die Umweltbedingungen zu sein, denen die Eltern, speziell der weibliche Teil, während der sexuellen Reproduktion ausgesetzt sind (Johnsen und Skrøppa 1996). Den größten Einfluss haben hierbei die während der Meiose, der Anlage der Keimzellen und der Befruchtung herrschende Temperatur in Verbindung mit der Photoperiode (Johnsen *et al.* 1996). Da allerdings gezeigt werden konnte, dass Selektionsereignisse während diesen frühesten ontogenetischen Stadien nur bedingt zu signifikanten Verschiebungen in den Genotyphäufigkeiten der Nachkommen führen, wurde ein größeres Augenmerk auf postzygotale Mechanismen der Genomorganisation bzw. Genregulation gelegt.

Untersuchungen an eukaryotischen Organismen belegen, dass die Methylierung von Cytosinbasen einen solchen wichtigen Mechanismus zur Genomorganisation und Genregulation darstellt. Die Erhaltung von Methylierungsmustern und die Etablierung von *de novo* Methylierung geschieht durch die Aktivität von Methyltransferasen (Bernacchia *et al.* 1998, Jacobsen 1999). Diese Enzyme, von denen in Pflanzen drei verschiedene Familien beschrieben sind (Finnegan *et al.* 2000) katalysieren neben der *de novo* Methylierung auch die Demethylierung von Genomabschnitten und regulieren somit die Genexpression (Finnegan und Kovac 2000). Methyltransferaseaktivität garantiert auch die Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern in den Zellen sowie die *de novo* - Methylierung der Tochterzellen nach Mitose und Meiose. Die Weitergabe und Etablierung bestimmter Methylier-

rungsmuster an die Nachkommen wird ebenfalls durch die Aktivität von Methyltransferasen gewährleistet (Jacobsen 1999).

In Pflanzenzellen findet vor allem eine Modifikation der Cytosine statt. Im Zuge der Methylierung werden dabei Methylgruppen von S-adenosyl-Methionin auf das Cytosin übertragen. 5-Methylcytosin findet sich in symmetrischen Sequenzen wie CpG und CpNpG, aber auch in nicht-symmetrischen Sequenzen wie z.B. CpApTp und CpTpT. Allerdings sind Methyltransferasen auch in der Lage Methylgruppen unspezifisch auf Cytosine zu übertragen und können somit neben regulatorischen Sequenzen auch größere kodierende und nicht-kodierende Genomabschnitte beeinflussen (Adams *et al.* 1993).

In Pflanzen wurde bereits durch Arbeiten von Cullis (1983, 1987) bewiesen, dass es durch die Umwelt zu einer Beeinflussung des Phänotyps kommen kann, die jedoch ohne Auswirkungen auf den Genotyp bleibt. Es wurde auch beobachtet, dass diese Modifikationen an die Nachkommen weitergegeben werden (Jablonka und Lamb 1989). Gleiches zeigt sich in *P. abies*. Unveröffentlichte Befunde des Norsk institutt for Skogforskning (Skogforsk, Ås/Norwegen) zeigen, dass Nachkommen von Eltern, die genetisch klar einer Herkunft aus dem Harz/Deutschland zugeordnet werden konnten, in Zentral-Norwegen (63° nördliche Breite) ein Verhalten aufwiesen, das dem lokaler Herkünfte stärker ähnelte als dem der Pflanzen am Originalstandort (Abb. 25, links). Die gleichen Ergebnisse wurden für Pflanzen aus Saatgut von Pflanzen österreichischer Herkunft, die in Norwegen (60° nördliche Breite) gekreuzt wurden, nachgewiesen (Abb. 25, rechts) (Johnsen, Ås/Norwegen, pers. Mitteilung). Die Bildung der Terminalknospe wurde als Indikator für eine standörtliche Anpassung der Nachkommen gewertet.

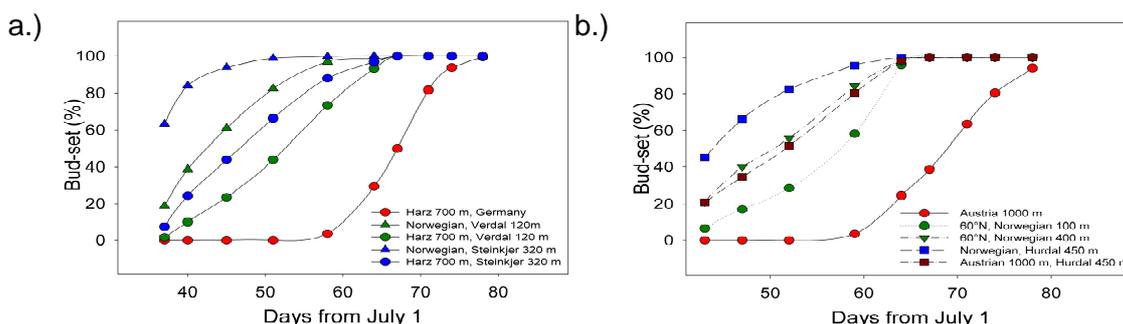


Abb. 25: Bildung der Terminalknospe bei Pflanzen gleicher Herkunft in unterschiedlichen Umgebungen. a.) Vergleich Harz-Norwegen; b.) Vergleich Tirol-Norwegen. (Johnsen, Ås/Norwegen, pers. Mitteilung).

Holliday (1993) verweist auf die Rolle der DNA Methylierung bei der epigenetischen Weitergabe von durch Umwelteinflüsse modifizierten Merkmalen.

Die Beeinflussung der DNA-Methylierung durch Umwelteinflüsse wurde in *A. thaliana* mehrfach gezeigt. Hier kam es nach einem Kältereiz zur Demethylierung bestimmter Loci und damit zur Induktion der Blütenbildung (Burn *et al.* 1993, Finnegan *et al.* 1998, Sheldon *et al.* 2000). Gleiches wurde auch in *Brassica napus* nachgewiesen (Osborn *et al.* 1997).

In *P. abies* wurde bereits mehrfach berichtet, dass der Phänotyp der Nachkommen, neben dem genetischen Beitrag der Eltern, stark von den Umweltbedingungen während der Kreuzung beeinflusst zu sein scheint. Johnson *et al.* (1996) zeigen, dass die Ausprägung der Frosthärte abhängig ist von der Umgebungstemperatur der weiblichen Reproduktionsorgane bei der Kreuzung. Skrøppa (1994) und Skrøppa *et al.* (1994) beschreiben signifikante Unterschiede in der Frosthärte von *P. abies* -Vollgeschwisterfamilien aus Kreuzungen in unterschiedlichen Höhenlagen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen den signifikanten Zusammenhang zwischen den Umweltbedingungen während der Kreuzung und der Cytosinmethylierung im Genom der Nachkommen aus diesen Kreuzungen (vgl. Kap. 3.1.1.2)

Die untersuchten Vollgeschwisterfamilien zeigen, dass Nachkommen aus warmer Kreuzungsumgebung über einen höheren Prozentsatz an methyliertem Cytosin verfügen als ihre aus Kreuzungen unter kalten Umweltbedingungen hervorgegangenen Vollgeschwisterfamilien (vgl. Abb. 3 u. 4). Der Einfluss der Photoperiode auf die 5-Methylcytosin-gehalte konnte mangels Untersuchungsmaterial nur in zwei der vier untersuchten Vollgeschwisterfamilien überprüft werden. Es konnte hierbei festgestellt werden, dass nur die Nachkommen aus warmer Kreuzungsumwelt mit einer signifikanten Änderung der 5-Methylcytosin-gehalte auf die Tageslänge reagierten. Ein Einfluss der Keimungsumgebung kann indes ausgeschlossen werden, weil die Anzucht der für die Untersuchung verwendeten Fichtenkeimlinge unter identischen Bedingungen erfolgte. Gleiches gilt für die im Hitzeschockexperiment verwendeten Keimlinge.

Die später am Beispiel der durchgeführten Hitzeschockbehandlung diskutierte Reaktion der Pflanzen auf extreme Umwelteinflüsse gibt Anlass zu der Hypothese, dass über die Änderung der 5-Methylcytosin-gehalte schneller als vermutet auf abrupte Änderungen der Umweltbedingungen reagiert werden kann. Die beschriebenen Befunde geben auch Anlass zu der Annahme, dass Pflanzen über diesen Mechanismus in der Lage sind, Informationen über die Umweltbedingungen am aktuellen Standort an die Nachkommen weiterzugeben. Die so ausgestatteten Nachkommen weisen eine bessere Anpassung an die

Umweltbedingungen am Standort der Eltern auf und garantieren damit den Folgebestand auch unter geänderten Umweltbedingungen.

Wenn es auch als sicher anzusehen ist, dass die beiden in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchten Herkünfte Füssen und Westhof große genotypische Unterschiede aufweisen, fällt jedoch beim Vergleich mit den unter kontrollierten Bedingungen gekreuzten Vollgeschwisterfamilien auf, dass sich die Unterschiede im 5-Methylcytosingehalt der unbehandelten Kontrollpflanzen (vgl. Abb. 5) auf die gleichen Umwelteffekte zurückführen lassen. Aufgrund von Klimabeobachtungen kann angenommen werden, dass die Eltern der Hochlagenherkunft im Laufe eines Jahres niedriger Temperatursummen akkumulieren als die der Tieflagenherkunft (Haider, Escherode/Deutschland, pers. Mitteilung). Es kommen somit wahrscheinlich die gleichen Effekte zum Tragen wie schon bei den unter kontrollierten Bedingungen gekreuzten Vollgeschwisterfamilien beschrieben.

Dass die Fichte in der Lage zu sein scheint, zusätzlich zu Selektionereignissen, Informationen über aktuell erfahrene Umweltbedingungen an ihre Nachkommen weiterzugeben, kann als bewiesen angesehen werden. In Untersuchungen an *Arabidopsis*-Pflanzen ließ sich ähnliches Verhalten nicht nachweisen. Als Ursache hierfür kann das mit nur $1,2 \times 10^8$ bp (The Arabidopsis Genome Initiative 2000), relativ kleine Genom von *A. thaliana* gesehen werden. Im Genom werden neben Teilen der kodierenden Sequenzen auch nicht-kodierende Genomabschnitte methyliert (Adams *et al.* 1993). Grosse Genome wie die von Koniferen (vgl. Kap. 1.2) verfügen über einen Anteil von bis zu 75% an nicht-kodierenden Regionen (Dhillon 1987). Es kann somit ein wesentlich höherer Anteil dieser Genombe-reiche methyliert vorliegen als im ca. 200 Mal kleineren Genom von *A. thaliana* das nur zu ca. 32% aus nicht-kodierenden Regionen besteht (The Arabidopsis Genome Initiative 2000). In zahlreichen Arbeiten (Finnegan *et al.* 1996, 1998, 2000, Scheldon *et al.* 2000, Meza *et al.* 2001) wurde belegt, dass es in *A. thaliana* bedingt durch Umweltreize zu Änderungen in der DNA-Methylierung kommt. Es ist daher möglich, dass es auch in *Arabidopsis* durch die Umweltbedingungen während der Kreuzung zur Beeinflussung der 5-Methylcytosingehalte kommt und dass Änderungen an die Nachkommen weitergegeben werden. Es muss jedoch angenommen werden, dass sich diese Änderungen in einem minimalen Rahmen abspielen und daher von einer gesamtgenomisch ansetzenden Methode nicht erfasst werden.

Nachdem offensichtlich Grund zu der Annahme besteht, dass Anpassungsprozesse an geänderte Umweltbedingungen schneller stattfinden als vermutet, bleibt die Frage zu diskutieren ob und wie Baumpopulationen in der Lage sind auf einen zu erwartenden rapiden Anstieg der globalen Durchschnittstemperatur zu reagieren. Saxe *et al.* (2001) sehen ein

hohes Anpassungspotential von Gymnospermen, können aber keine Aussagen zur Entwicklung bei Angiospermen machen. Die Fähigkeit von Koniferen relativ schnell Landrassen auszubilden wird als Vorteil gewertet. Eine erschöpfende Beantwortung der Frage muss allerdings unterbleiben, da zu viel Faktoren mit nur schwer vorhersehbarer gegenseitiger Beeinflussung in die Betrachtung aufgenommen werden müssten. Davis und Shaw (2001) sehen eine Kombination von Migration, Anpassung und ungehindertem Genfluss zwischen Populationen verantwortlich für die Erschließung von Lebensräumen und der damit verbundenen Reaktion auf geänderte Umweltbedingungen. Der zu erwartende massive Klimawandel in evolutionsbiologisch gesehen kürzester Zeit in Verbindung mit einer immer weiter fortschreitenden Unterbindung des Genflusses wird als größtes Hindernis für eine weitere Anpassung an geänderte Umweltbedingungen gesehen.

4.3.2 Die Veränderung des 5-Methylcytosingehaltes in der DNA von Fichtenkeimlingen nach Hitzeschockbehandlung

Nachdem gezeigt wurde, dass Unterschiede in den Umweltbedingungen während der Kreuzung zu einer geänderten DNA-Methylierung im Genom der Nachkommen führen, sollte geklärt werden, ob das kurzfristige Auftreten extremer Umweltbedingungen einen Niederschlag im Methylierungszustand genomischer DNA der aktuellen Population findet. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass abiotische Stressfaktoren zu Änderungen des Methylcytosingehaltes in der DNA des gestressten Organismen führen können. So führt beispielsweise in *Arabidopsis* die durch Kälte ausgelöste Methylierung bzw. Demethylierung verschiedener Loci zur Induktion der Blütenbildung (Burn *et al.* 1993, Finnegan *et al.* 2000, Sheldon *et al.* 2000), gleiches wurde in Winterweizen festgestellt (Sherman und Talbert 2002). In *Brassica napus* führte die Gabe von Kaliumdichromat zu einer erhöhten DNA-Methylierung in den Wurzeln (Labra *et al.* 2004). Kovalchuk *et al.* (2003) konnten DNA-Hypermethylierung in *Pinus sylvestris* nach Exposition gegenüber intensiver radioaktiver Strahlung nachweisen. Zu einer *de novo*-Methylierung in transgenen Pflanzen nach Exposition gegenüber erhöhten Temperaturen kam es in *Zea mays* (Meyer *et al.* 1992), *Arabidopsis thaliana* (Meza *et al.* 2001), *Medicago sativa* (Walter *et al.* 1992), *Nicotiana tabacum* (Palauqui und Vaucheret, 1995, Neumann *et al.* 1997, Conner *et al.* 1998 und Köhne *et al.* 1998) sowie in *Oryza sativa* (Morino *et al.* 1999). Wassermangel führte bei der Erbse zu einer Erhöhung des Gesamtgehaltes an Methylcytosin in der genomischen DNA (Labra *et al.* 2002).

Im beschriebenen Versuch wurden die Prozentsätze an methyliertem Cytosin in der DNA von Fichtenkeimlingen nach Hitzeschockbehandlung untersucht. Eine Erhöhung der Temperatur um ca. 10-15°C über die optimale Wachstumstemperatur führt nicht zum Absterben der gestressten Organismen, sondern zur Expression von Hitzeschockgenen und zur Bildung verschiedener Klassen von Hitzeschockproteinen, die als endogener Schutzmechanismus der Pflanze funktionieren (Vierling 1991). Abhängig von der Dauer des Einwirkens kommt es zur unterschiedlich starken Akkumulation der gebildeten Hitzeschockproteine (Sun *et al.* 2002). Nach dem Ende Behandlung haben Hitzeschockproteine eine Halbwertszeit von 37-52 Stunden (Chen *et al.* 1990).

Um bei den Versuchen die Herkunft der Pflanzen, also die unterschiedlichen Umweltbedingungen an den Standorten der Eltern zu berücksichtigen, wurde sowohl die Tieflagen- als auch die Hochlagenherkunft (vgl. Kap. 2.1.1.1) getestet. Weil sich bei der Proteinuntersuchung mit 2D-SDS-PAGE in acht Wochen alten Keimlingen eine stärkere Akkumulation von Hitzeschockproteinen nachweisen ließ als in drei Wochen alten Keimlingen (Valcú, TUM, Freising/Deutschland, pers. Mitteilung) wurden in der Tieflagenherkunft in beiden Entwicklungsstufen der Gehalt an methyliertem Cytosin in der DNA überprüft. Analog zu den Ergebnissen der Proteinuntersuchungen konnte in den drei Wochen alten Keimlingen nur eine geringe, nicht signifikante, quantitative Änderung des genomischen Methylcytosingehaltes gemessen werden (Abb. 7). Dieses Ergebnis unterstützt nur teilweise die Befunde von Gifford und Taleisnik (1994), die bereits in zwei Tage alten Sämlingen verschiedener Koniferenarten nach Hitzeschock die massive Akkumulation von Hitzeschockproteinen nachweisen konnten.

Aufgrund der in *A. thaliana* (Wehmeyer *et al.* 1996, Sun *et al.* 2001) und *Pseudotsuga menziesii* (Tranbarger und Misra 1996) während der Keimung beschriebenen Aktivität verschiedener Klassen von Hitzeschockproteinen kann angenommen werden, dass Hitzeschockproteinen in niedriger Abundanz den Keimling bereits ausreichend schützen und es deshalb nur zu geringer zusätzlicher Proteinsynthese kommt .

Bei den acht Wochen alten Keimlingen führt die Applikation des Hitzeschocks in beiden Herkunftstypen zu einer signifikanten Erhöhung des 5-Methylcytosin-Gehaltes (Abb. 5). Diese Erhöhung verdeutlicht die zentrale Rolle der Methylierung bei der Regulation der Genexpression nach abiotischen Stressereignissen. Im Zuge einer Hitzeschockbehandlung kommt es zur Unterdrückung der Synthese der meisten Proteine sowie der mRNA (Vierling 1991). Dieser Prozess wird augenscheinlich durch eine *de novo* Methylierung von DNA-Regionen und Regulationsbereichen realisiert. Da dieser Regulationsprozess in allen Teilen der Pflanzen, die erhöhten Temperaturen ausgesetzt sind, stattfindet, führt dies

zu einer messbaren Änderung der 5-Methylcytosin-Gehalte. Eine Kompensation durch die Demethylierung der entsprechenden Regulationsbereiche der Hitzeschockproteine scheint nicht zum Tragen zu kommen.

Während in den Nadeln der nach Hitzeschockbehandlung untersuchten Pflanzen eine signifikante Änderung des 5-Methylcytosingehaltes stattfindet, bleibt die Änderung in den behandelten Wurzeln gegenüber den Kontrollen vergleichsweise gering (Abb. 5). Als Ursache für die unterschiedliche Reaktion der Pflanzenteile kann die Tatsache gewertet werden, dass nur die oberirdischen Pflanzenteile der direkten Temperaturerhöhung ausgesetzt sind. Die Wurzeln der Versuchspflanzen scheinen, bedingt durch die Isolatorwirkung des Pflanzsubstrates (Vermikulit), von einer Beeinflussung durch die Temperatur ausgenommen. Hier liegt ein Unterschied zu den Befunden der Proteinuntersuchungen. Die untersuchten Hitzeschock-Proteine konnten in allen Teilen der untersuchten Pflanzen nachgewiesen werden (Abb. 26). Man kann daher schließen, dass die Änderung des 5-Methylcytosingehaltes durch einen direkten Umweltreizes in seiner Wirkung lokal begrenzt bleibt und zu keiner systemischen *de novo* Methylierung führt.

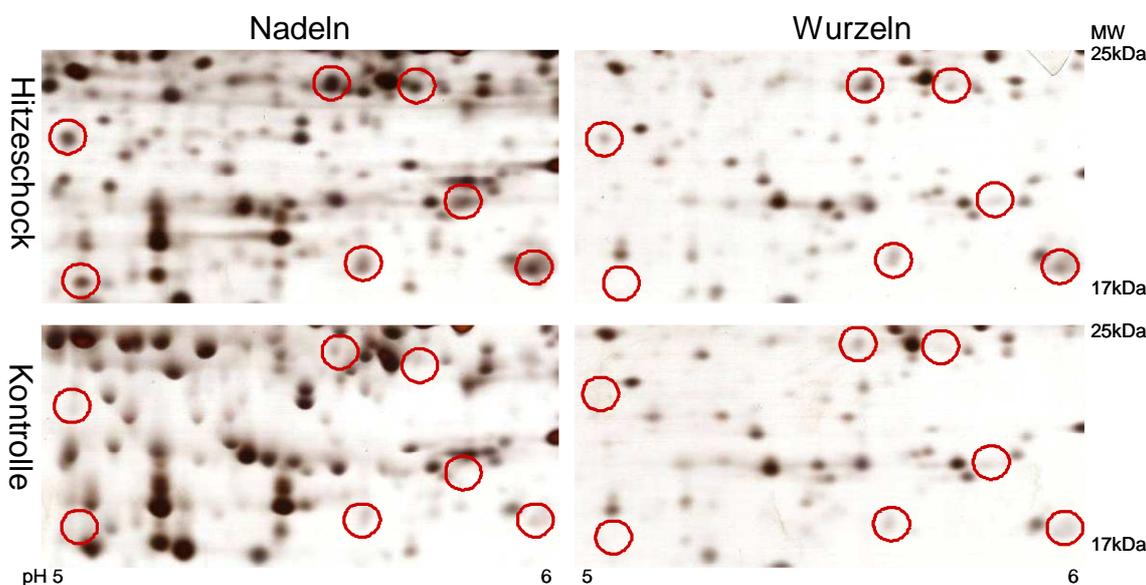


Abb. 26: Induktion von Hitzeschockproteinen in den Nadeln und Wurzeln acht Wochen alter Fichtenkeimlinge. (Valcú, TUM, Freising/Deutschland, pers. Mitteilung).

In der Tieflagenherkunft liegt ein hoher Ausgangsgehalt an 5-Methylcytosin in den Kontrollpflanzen vor und es lässt sich eine stärkere Zunahme des 5-Methylcytosin-Gehaltes nachweisen. Man kann vermuten, dass die DNA aus der Tieflagenherkunft ein hemimethyliertes Substrat darstellt, das nach Adams *et al.* (1993) zu einer exzessiveren Kom-

plettierung der Methylierung beiträgt. Dies äußert sich in einem stärkeren Anstieg der Gesamtmethylierung nach Hitzeschockbehandlung.

4.3.3 Dynamik der Cytosinmethylierung während der Ontogenese

Neben den Untersuchungen zu Methylierungsänderungen aufgrund exogener Einflüsse wurde auch die Genom-Methylierung während ontogentischer Stadien der Fichtenkeimlinge beobachtet. Hier fällt auf, dass die Cytosinmethylierung in den ersten drei Entwicklungswochen der Keimlinge um ca. 11% abnimmt und es dann wieder zu *de novo* Methylierungsereignissen kommt (vgl. Kap. 3.2.1).

Die Untersuchungen an Samen von Arabidopsispflanzen mit gestörter Methyltransferaseaktivität haben die elementare Bedeutung der Methylierung während der Samenentwicklung gezeigt. Die Prägung durch die Eltern wird durch Methylaseaktivität aufrecht erhalten bzw. weitergegeben (Adams *et al.* 2000). Es wurde auch berichtet, dass reduzierte Methylierung zu einer abnormen Entwicklung der Pflanzen führt (Finnegan *et al.* 1996).

Aussagen über die Veränderungen der gesamtgenomischen DNA-Methylierung während Keimung und durchlaufener Keimlingsstadien in sich normal entwickelnden Pflanzen wurden für *P. abies* bisher nicht publiziert. In *Silene latifolia* wurde der Verlauf der DNA-Methylierung während Keimung und Keimlingsentwicklung mit immunohistochemischen Methoden untersucht. Vergleichbare Ergebnisse werden in *Prunus persica*, *Pinus radiata* und *Lycopersicon esculentum* berichtet. In *P. persica* zeigte sich, dass adulte Meristemzellen über einen höheren Gehalt an 5-Methylcytosin verfügen als juvenile (Bitonti *et al.* 2002). Im Zuge von Untersuchungen zur Gewebekulturfähigkeit von *P. radiata* wurden ebenfalls signifikante Unterschiede in den 5-Methylcytosin-Gehalten zwischen juvenilen und adulten Geweben festgestellt. Während in adulten Bäumen mehr als 60 % der Cytosinbasen methyliert vorlagen, waren es in der Jugendphase nur 35% (Fraga *et al.* 2002). Die Autoren führen die eingeschränkte morphogenetischen Fähigkeiten bei der Pfropfung älterer Pflanzenteile auf die erhöhte Methylierung und die damit verbundene eingeschränkte Genexpression zurück. In *L. esculentum* wurde ein niedrigerer 5-Methylcytosin-Gehalt in unreifem Gewebe und Kallusgewebe (20% mC) als in reifem Gewebe (25% mC) festgestellt. Vergleicht man die für *Lycopersicon* angegebenen Gehalte an methyliertem Cytosin in Samen, unreifen und reifen Blättern, so zeigt sich ein Abfall des 5-Methylcytosin-Gehaltes zwischen Samen (27.4% mC) und unreifem Blatt (20.3% mC). Im Zuge der Blattreifung tritt eine Zunahme des Gehaltes an methyliertem Cytosin auf 25%

auf (Messeguer *et al.* 1991). Abweichendes Verhalten in der Änderung des 5-Methylcytosin-Gehalt zwischen Kallus und reifen Blättern wurden für das Elefantengras *Pennisetum purpureum* Schum. nachgewiesen. Hier kommt es zu keiner Änderungen der Prozentsätze an methyliertem Cytosin (38%) während der Pflanzenentwicklung (Morrish und Vasil 1989).

Die Befunde verdeutlichen, dass die Ontogenese bei Pflanzen nicht grundsätzlich mit Änderungen des Methylcytosingehaltes einhergehen muss. Es wurde deshalb eine Untersuchung der Cytosinmethylierung in den frühen ontogenetischen Stadien (0-8 Wochen) von *P. abies* durchgeführt. Im Verlauf der Studie konnte gezeigt werden, dass die Dynamik der DNA-Methylierung von *P. abies* mit der in der von *L. esculentum* und *S. latifolia* vergleichbar ist. In *P. abies* finden sich in der aus den Embryonen ruhender Samen isolierten DNA ein 5-Methylcytosingehalt von durchschnittlich 30%. Nach eineinhalb Wochen erfolgt eine Reduzierung des 5-Methylcytosin-Gehalts auf 27% (vgl. Abb. 10). Die Ursache hierfür kann in einem Umweltreiz, im Falle der Samen Feuchtigkeit und Temperatur, gesehen werden, der zu einer Demethylierung und nachfolgend zur Induktion der Genexpression führt. In den eineinhalb Wochen alten Keimen hat der sich entwickelnde Embryo den Embryosack durchstoßen und die Ausbildung des Hypocotyls sowie von Haupt- und Nebenwurzeln ist in vollem Gange. Noch betreibt die Pflanze, mangels ausgebildeter Kotyledonen, keine Photosynthese. Die Versorgung des wachsenden Embryos wird durch den Abbau des Endosperms gewährleistet (Strassburger 1991). In den drei Wochen alten Pflanzen hat sich bereits eine vollfunktionsfähige Wurzel ausgebildet. Ein Längenwachstum des Stammes hat eingesetzt und die Entfaltung des primären Nadelkranzes befindet sich in der Abschlussphase. Zusätzlich zu den bereits aktiven Genen wird eine Vielzahl entwicklungspezifischer Gene aktiviert was durch fortschreitende Demethylierung realisiert wird. Beurteilt man die Intensität der Entwicklungsvorgänge nach dem 5-Methylcytosingehalt, so scheint nach dreiwöchiger Keimlingsentwicklung das aktivste der vier untersuchten Stadien erreicht zu sein. Dieses Stadium ist physiologisch durch die höchste Anzahl an Zellteilungen gekennzeichnet (Messeguer 1991, Zluvova *et al.* 2001). Nach acht wöchiger Entwicklung kommt es wieder zu einem signifikanten ($p=0.05$) Anstieg des Methylcytosingehaltes. Der Fichtenkeimling ist voll ausgebildet, die Bildung eines zweiten Nadelkranzes hat bei einigen Pflanzen eingesetzt. Bei der Untersuchung der Methylierungsmuster in *S. latifolia* konnte gezeigt werden, dass im Zuge einer fortschreitenden Keimlingsentwicklung die teilungsaktiven Zellen des Apikalmeristems wenig bis keine DNA-Methylierung aufwiesen, wohingegen die sich vergleichsweise langsam teilenden Zellen des Zentralmeristems höhere Gehalte an 5-Methylcytosin aufwiesen. Dies führte,

verglichen mit früheren ontogenetischen Stadien, zu einem Anstieg des Gesamtgehaltes an methyliertem Cytosin (Zluvova *et al.* 2001). Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Befunde kann angenommen werden, dass die Cytosinmethylierung in *P. abies* einem ähnlichen Muster folgt wie in *S. latifolia* beschrieben.

Vergleicht man die entwicklungsabhängigen 5-Methylcytosingehalte in den Hoch- und Tieflagenpopulationen, so lässt sich in beiden Stichproben gleiches Verhalten nachweisen. In der Hochlagenherkunft kommt es allerdings, ausgehend vom gleichen Niveau, in den Embryonen der ruhenden Samen zu einer stärkeren Demethylierung nach eineinhalb- bzw. achtwöchiger Entwicklung (vgl. Abb. 11). Dieser Befund lässt zwei Hypothesen über die Etablierung vererbter Methylierungsmuster zu. Zum einen kann angenommen werden, dass in den beiden Herkünften verschiedene Bereiche der untersuchten DNA methyliert sind. Diese Unterschiede in der DNA-Methylierung könnten eine transkriptionelle oder posttranskriptionelle Regulation der Methyltransferasen zur Folge haben. Da diese Enzyme in der Lage sind, Demethylierung bzw. *de novo*-Methylierung zu regulieren (Bernacchia *et al.* 1998, Finnegan und Kovacs 2000), führt die unterschiedliche Enzymaktivität dann zu einer geänderte Gesamtmethylierung.

Um Aussagen über die Entwicklung des 5-Methylcytosingehalte über die untersuchten Stadien hinaus treffen zu können, muss auf die eingangs diskutierten Ergebnisse der Untersuchung der Vollgeschwisterfamilien aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten verwiesen werden (vgl. Kap. 3.1.1.2) In diesem Experiment wurden ältere (> 1 Jahr) Pflanzen untersucht. Die Prozentsätze in den Vollgeschwisterfamilien aus Gewächshauskreuzung lagen bei durchschnittlich 28%, in denen von außerhalb des Gewächshauses bei 13% Anteil 5-Methylcytosin am Gesamt-Cytosin. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das von den Umweltbedingungen zu Zeiten der Kreuzung geprägte Methylierungsniveau spätestens nach einer achtwöchigen Entwicklungsphase erreicht ist.

Mit durchschnittlich ca. 27% methyliertem Cytosin verfügt die Fichte über einen wesentlich höheren Anteil an methyliertem Cytosin als *Arabidopsis thaliana*. Der Wert liegt aber innerhalb des Bereichs der in anderen Pflanzenspezies nachgewiesen wurde. In Tabelle 21 werden die aus der Literatur entnommenen durchschnittlichen 5-Methylcytosin-Gehalte verschiedener Spezies wiedergegeben. Die Tabelle erfasst nicht die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Dynamik der Methylierungsprozesse, deren Auftreten auch in anderen Spezies vermutet werden kann.

Tab. 21: Durchschnittliche 5-Methylcytosin-Gehalte verschiedener Spezies.

Species	% 5-mC/Total C	publiziert in
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4.5 %	eigene Ergebnisse
<i>Picea abies</i>	27%	eigene Ergebnisse
<i>Pinus radiata</i>	48 %	Fraga <i>et al.</i> 2002
<i>Lycopersicon esculentum</i>	23%	Messeguer <i>et al.</i> 1989
<i>Nicotiana tabacum</i>	27.8 %	Messeguer <i>et al.</i> 1989
<i>Solanum tuberosum</i>	24.6 %	Messeguer <i>et al.</i> 1989
<i>Pennisetum purpureum</i>	38.4 %	Morrish und Vasil 1989
<i>Pisum sativum</i>	23.2%	Wagner und Capesius 1981
<i>Sinapis alba</i>	12.2%	Wagner und Capesius 1981
<i>Vicia faba</i>	30.5%	Wagner und Capesius 1981
<i>Triticum aestivum</i>	22.4%	Wagner und Capesius 1981
<i>Prunus persica</i>	39.6 %	Bitonti <i>et al.</i> 2002

Abschließend kann festgehalten werden, dass *P. abies* in der Lage, ist über Änderungen in der gesamtgenomischen Cytosinmethylierung auf geänderte oder sich ändernde Umweltbedingungen zu reagieren und Informationen über die erfahrenen Änderungen an ihre Nachkommen epigenetisch innerhalb einer Generation weiterzugeben.

Ab einem gewissen Alter der Keimlinge, im vorliegenden Fall acht Wochen, kommt es nach einem extremen abiotischen Stimulus (Hitzeschock) innerhalb weniger Stunden zu einer messbaren *de novo* Methylierung die allerdings auf die DNA aus direkt hitzeexponierten Pflanzenteile beschränkt bleibt. Es ist demnach möglich, dass der mit einem Hitzeschock verbundene Abbruch der Synthese der meisten normalen Proteine und mRNAs (Vierling 1991) zumindest teilweise durch die Methylierung regulatorischer DNA-Bereiche realisiert wird.

Gezeigt werden konnte außerdem, dass sich der genomische 5-Methylcytosingehalt im Laufe früher Entwicklungsstadien verändert und die von den Eltern geprägten 5-Methylcytosingehalte vermutlich in den acht Wochen alten Fichtenkeimlingen etabliert sind.

4.4 Der Einfluss biotischer Faktoren auf die Cytosinmethylierung bei der Fichte

Im Zuge der Untersuchung des Einflusses biotischer Faktoren auf die Cytosinmethylierung im Genom der Fichte wurde die DNA von mit *S. conigenus* infizierten Fichtenkeimlingen untersucht. Anders als nach abiotischen, kam es nach biotischen Stressereignissen zu keiner signifikanten Änderung des 5-Methylcytosingehaltes in den untersuchten Pflanzen. Wie in Kapitel 3.4.2.2 gezeigt, konnte nach der Infektion ein massiver Anstieg der Expression von im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr stehenden Genen, nachgewiesen werden. In Kapitel 3.1.1.3 wurde bereits gezeigt, dass abiotische Stressereignisse eine signifikante Änderung der Anteile an 5-Methylcytosin am Gesamtcytosingehalt bewirken. Eine ähnliche Änderung der Cytosinmethylierung nach Pathogenstress konnte in *P. abies* nicht gefunden werden. Als Grund hierfür kann die unterschiedliche Wirkung von abiotischen und biotischen Stressereignissen gesehen werden. Abiotischer Stress wirkt gleichzeitig auf große Teile der Pflanze ein, wohingegen biotischer Stress in seinem Einfluss zunächst lokal beschränkt bleibt. Daraus folgt, dass Abwehrmechanismen in frühen Stadien einer Pathogeninfektion nur in einem begrenzten Bereich aktiviert werden. Sofern die Induktion von Abwehrgenen durch Demethylierungs- bzw. *de novo* Methylierungsereignisse reguliert wird, ist diese in ihrer Ausprägung so gering, dass sie mit gesamtgenomisch ansetzenden Methoden wie der kapillarelektrophoretischen Messung des 5-Methylcytosin-Gehaltes nicht erfassbar sind. Wie im folgenden Kapitel an Beispielen diskutiert wird, kommt es in *P. abies* im Zuge der Pathogenabwehr zudem zur Expression von Genen, die Proteine und Enzyme mit regulatorischer Funktion für Gentranskription und Translation kodieren. Es zeigt sich, dass die Methylierung von DNA, im Gegensatz zu anderen Regulationsmechanismen, im Falle des Pathogenstresses keine bedeutende Rolle spielt.

4.5 Die Auswirkung von biotischem Stress auf die Genexpression der Fichte

Pathogenangriffe induzieren in Pflanzen verschiedenste Reaktionen, so zum Beispiel zur Ausbildung einer hypersensitiven Reaktion, die mit dem Tod der Pflanzenzellen einhergeht. Das Absterben verhindert mehr oder weniger erfolgreich eine Ausbreitung des Pathogens über die Stelle des ersten Eindringens hinaus (Glazebrook 1999). Zudem kann es im Zuge einer Infektion zu einer systemischen erworbenen Resistenz (systemic acquired resistance) kommen, die die gesamte Pflanze gegenüber einer weiteren Pilzinfektion

immunisiert (Sandermann *et al.* 1998). So können Pflanzen nach der Infektion mit Mikroorganismen (Rhizobakterien, avirulente Pathogene etc.) eine induzierten Resistenz gegenüber weiteren Pathogenen aufweisen (Jayaraj *et al.* 2004).

Neben diesen Reaktionen verfügt die Pflanze über weitere Mechanismen um Pathogenangriffe abzuwehren. Dazu gehören neben dem Aufbau und der Verstärkung struktureller Hindernisse die Bildung toxischer Substanzen. Eine Zusammenstellung dieser Mechanismen findet sich in Karban und Baldwin (1997). Die Anreicherung sekundärer Metabolite wie z.B. phenolische Flavonoidverbindungen und Lignin in der Zelle ist einer der wichtigsten Abwehrmechanismen der Pflanze (Nagy *et al.* 2004). Die Induktion dieser Abwehrmechanismen folgt einer Signalkette, die mit der Erkennung des Pathogenangriffes an speziellen Rezeptoren beginnt und mit dem Zelltod oder der erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens endet.

Zur Untersuchung der Auswirkungen von biotischem Stress auf *P. abies*-Keimlinge wurde die nach der Infektion mit *S. conigenus* induzierte Genexpression in einem Macroarrayexperiment gemessen. Die im Array zusammengestellten cDNA-Klone stammten aus einer mit Elicitor aus *Rhizosphaera kalkhoffii* behandelten Fichtenzellkultur (Galliano *et al.* 1993).

Im Experiment wurden Fichtenkeimlinge nicht mit einem Elicitor, sondern mit einer Sporensuspension behandelt. Es sollte so die Reaktion der Keimlinge auf einen *in vivo* Pathogenangriff beurteilt werden.

Die Menge an Pathogen wurde im Verlauf des Experiments durch qPCR-Messung bestimmt (vgl. Kap.3.4.1). Betrachtet man die Pathogenentwicklung, so kann zunächst (5 DAI) von einer erfolgreichen Infektion ausgegangen werden. Aus Messungen an *L. esculentum*-Pflanzen ist bekannt, dass die Menge an Pilz-DNA unmittelbar nach der Inokulation mit dem beschriebene Verfahren, verschwindend gering ist, in den ersten Stadien der Infektion allerdings massiv zunimmt (Bahnweg, GSF-Neuherberg/Deutschland, pers. Mitteilung). Probenentnahmen einen, zwei und drei Tage nach der Infektion hätten genauere Informationen über die Infektion der Fichtenkeimlinge ermöglicht. Die Messungen der Pathogenmenge 10 und 18 Tage nach der Infektion weisen darauf hin, dass die Infektion von den Pflanzen abgewehrt werden konnte. Eine Zunahme nach 28 Tagen liegt eher an einem Fehler in der Quantifizierung als an einem tatsächlich neu einsetzenden Pilzwachstum (Bahnweg, GSF-Neuherberg/Deutschland, pers. Mitteilung). Dafür sprechen auch die geringen Werte in den 35 und 60 DAI-Proben. Die Pflanzen zeigten zu keinem Zeitpunkt Verbraunungen oder ähnliche, für einen für einen letalen Verlauf der Infektion charakteristische Merkmale.

Die Microarrayanalyse zeigte sich geeignet, um die Expression einer begrenzten Anzahl von Genen im Verlauf der Pathogeninfektion zu verfolgen. Im Rahmen des Experimentes konnte für 50% der auf im Macroarray zusammengestellten 128 cDNA-Klone („Gene“), Veränderungen in der Expression reproduzierbar nachgewiesen werden. Die Auswertung der Ergebnisse wurde auf diese 64 Gene beschränkt. Beim Vergleich der Ergebnisse der infizierten mit den nicht-infizierten Proben konnte für alle Gene eine Zunahme der Expressionsintensität nach Pathogenbefall nachgewiesen werden. Alle 64 Gene zeigten hohe Expressionswerte am ersten Probenentnahmepunkt, fünf Tage nach der Infektion. In *Arabidopsis* konnte die Expressionssteigerung einer großen Anzahl von Genen bereits in den ersten 24-48 Stunden nach Inokulation mit *Alternaria brassiciola* nachgewiesen werden (Narusaka *et al.* 2003). Man kann deshalb schließen, dass die Induktion der Expression der stressinduzierten Gene auch in *P. abies* bereits ein bis zwei Tage nach der Infektion mit *S. conigenus* stattfand und fünf Tage nach der Infektion (5 DAI) ihren Höhepunkt erreicht bzw. bereits überschritten hat. An den folgenden beiden Probenentnahmepunkten (18 und 35 DAI) zeigten die untersuchten Gene Unterschiede im Expressionsverlauf was die Einordnung in drei Cluster ermöglichte.

In Cluster I zusammengefasste Gene zeigten eine Reduktion der Expression 18 Tage und einen nahezu vollständigen Rückgang auf mit der nicht-infizierten Probe vergleichbare Werte 35 Tage nach der Infektion. Ins zweiten Cluster (II) wurden Gene eingeordnet, deren Expression 18 Tage nach der Infektion nahezu vollständig abbrach, um 35 Tage nach Infektion nochmals mehr oder weniger stark anzusteigen. Der erneute Anstieg der Expression lässt sich mit der Wirkung des degradierenden Pathogens als Elizitor erklären auf den die Pflanze mit der Expressionssteigerung einer Anzahl von Genen reagiert.

Die in Cluster III zusammengefassten Gene zeigten einen ähnlichen Expressionsverlauf wie die Gene im Cluster I, jedoch mit einer stärkeren Abnahme der Expression 18 Tage nach Infektion.

Für einen großen Teil der durch cDNA-Klone repräsentierten Gen-Sequenzen, beziehungsweise Teilsequenzen von Genen, konnte nach Datenbankabgleich Homologie zu bekannten Genen in anderen Organismen gefunden werden. Im folgenden sollen daher die Funktionen der exprimierten Gene und ihre Rolle in der Pathogenabwehr dargestellt werden. Es werden die entsprechenden Bezeichnungen der cDNA-Klone aus Tabelle 20 bzw. den Abbildungen 19 und 20 (Kap. 3.4.2.2) angegeben.

4.5.1 Potentielle Funktion von in Cluster I zusammengefassten Gene in der Pathogenabwehr

Im ersten Cluster (Cluster I) befindet sich ein Gen (cDNA-Klon pPA0047), das ein zu einem *pentatricopeptide repeat (PPR)-containing protein* homologes Protein kodiert. Das PPR-Motiv steht im Zusammenhang mit dem weitverbreiteten 34 Aminosäuren TPR (*tetratricopeptide repeat*) Protein-Bindungs-Motiv und es kann deshalb angenommen werden, dass es sich beim PPR-Motiv ebenfalls um ein Makromoleküle bindendes Motiv handelt. Verschiedene PPR-Proteine sind als sequenzspezifisch RNA oder DNA Bindungsproteine nachgewiesen (Ikeda und Gray 1999, Lahmy *et al.* 2000). Die entsprechende Proteinfamilie bildet eine Gruppe von Sequenz-spezifischen Adaptoren für bestimmte Proteine (z.B. Enzyme für die Prozessierung von RNA) und ist so in der Lage die Expression bestimmter Gene zu steuern (Meierhoff *et al.* 2003, Nakamura *et al.* 2003). Der Befund, dass diese Proteine auch im Zuge der Pathogenabwehr exprimiert werden, sowie die Art und Weise der Expression, lassen darauf schließen, dass PPR-Proteine auch an der Regulation pathogeninduzierter Gene während der gesamten Pathogeninfektion beteiligt sind.

Das gleiche Expressionsprofil zeigt ein Gen, das ein mRNA-Molekül kodiert, das Homologie zur entsprechenden mRNA für D-myo-Inositol-3-Phosphatase aus *Spirodela polyrrhiza* zeigt (pPA0062). Myo-inositol ist ein Vorläufer pflanzlicher Substanzen, die sowohl in der Signaltransduktion und der Stressabwehr als auch im Zellwandaufbau nachgewiesen wurden (Hegeman *et al.* 2001). Die Synthese des Myo-inositols erfolgt über die Umwandlung von D-Glucose-6-Phosphat in D-myo-inositol-3-Phosphat durch die Isomerase D-myo-inositol-3-Phosphat-Synthase (Loewus und Murthy 2000). Die lange Aufrechterhaltung einer erhöhten Expression nach Pathogeninfektion lässt vermuten, dass zunächst die Funktion des Myo-Inositols in der Signaltransduktion im Vordergrund steht, während im weiteren Infektionsverlauf die Funktion in der Synthese von Zellwandbestandteile zur Pathogenabwehr stärker zum Tragen kommt.

4.5.2 Potentielle Funktion von in Cluster II zusammengefassten Genen in der Pathogenabwehr

Einem Teil der in Cluster II zusammengefassten Gene kann aufgrund der Homologie zu beschriebenen Genen eine Rolle in der Signalweiterleitung zugeordnet werden. Andere

Gene weisen Homologien zu Genen auf, die Proteine kodieren, die unter Stresseinfluss sehr rasch und sehr stark exprimiert werden können.

Zu letzteren gehören vor allem die beiden Gene, die für zwei kleine Hitzeschockproteine (sHSP) kodieren (pPA0010 und pPA0037). In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass *P. abies* auch als Reaktion auf biotischen Stress Hitzeschock-Proteine synthetisiert. In der Literatur wurden sHSP in *P. abies* bisher nur im Zusammenhang mit abiotischen Stressereignissen erwähnt (Schubert 2002).

Die Sequenz des Gens pPA0115 weist Homologien zu einem Flavonoid-Hydroxylase kodierenden Gen aus *Eustoma grandifolium* auf. Flavonoid-Hydroxylase ist ein Bestandteil des Flavonoid-Biosyntheseweges. Flavonoide haben zahlreiche Funktionen in der Zelle. Neben der fungiziden Wirkung der Isoflavone (Phytoalexin) werden auch zum Schutz der Zelle vor UV-B-Strahlung Anthocyane gebildet, die als Pigmente in der Zelle eingelagert werden (Schopfer und Brennicke 1999, Hock und Elstner 1995). Die Akkumulation von β -Caroten-Hydroxylase führt in *Arabidopsis* zu größerer Toleranz gegenüber biotischem Stress (Davison *et al.* 2002).

Ebenfalls aufgrund des Expressionsprofils ins Cluster II eingeordnet wurde ein Klasse IV Chitinase kodierendes Gen aus *P. abies*. Chitinasen gehören zu den PR (*Pathogenesis related*)-Proteinen, die von Pflanzen als rasche Antwort auf Pathogenangriffe synthetisiert werden. Chitinasen hydrolysieren die β -1,4 glykosidischen Bindungen der N-Acetylglucosamin-Reste des Chitins. Chitinasen spielen somit eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr, da sie durch den Abbau des Chitins eine Ausbreitung des Pathogens unterbinden. Isolierte Chitinasen zeigen eine inhibitorische Wirkung auf des Pathogenwachstums durch die Lyse der Hyphenspitzen penetrierender Pilzsporen (Schlumbaum 1986). Überexpression von Chitinasen in transgenen Pflanzen führt *in vivo* zu erhöhter Pathogenresistenz. (Broglie *et al.* 1991). Einige Chitinasen werden allerdings auch in nicht-infizierten Pflanzen organ- bzw. entwicklungspezifisch exprimiert. Dies führt zu der Vermutung, dass diese Enzyme neben der Schutzfunktion auch eine Rolle während der Pflanzenentwicklung spielen (Collinge *et al.* 1993). Chitinasen der Klassen I, II und IV treten nur in Pflanzen auf. In *P. abies* konnte nach Infektion mit *Heterobasidion annosum* ein pathogenabhängiger Anstieg der Expression von Klasse IV und Klasse II Chitinasen festgestellt werden (Hietala, pers Mitteilung). Hier erreichte die Expression die höchsten Werte 14 Tage nach Infektion. Im Experiment wurde ein erneuter leichter Anstieg der Expression des Chitinase kodierenden Gens 35 Tage nach Infektion gemessen. Dies scheint eine Reaktion auf die bereits erwähnte Elizitorwirkung des degradierenden Pathogens zu sein.

Ein ähnliches Expressionsprofil zeigte ein Gen mit Homologie zu einem Pektinesterase-Protein kodierendem Gen aus *A. thaliana*. Pektinesterase ist ein wichtiger Baustein für den Aufbau der Mittellamelle pflanzlicher Zellwände. Eine Expressionssteigerung der Esterase in *Arabidopsis* wurde nach Trocken- und Kältestress berichtet (Oono *et al.* 2003, Zhu und Provart 2003). Komplexe Kohlenhydrate, wie beispielsweise Oligogalacturone, die durch die Aktivität pektischer Enzyme freigesetzt werden, können als Elizitoren wirken und zur Akkumulation von Abwehrstoffen wie z.B. Phytoalexinen anregen (Hock und Elstner 1995). Die erneute Zunahme der Expression im späten Verlauf der Infektion lässt auf eine derartige Funktion in der unmittelbaren Pilzabwehr schließen.

Eine weitere Reaktion der Pflanze auf Pathogenangriffe stellt der bereits erwähnte programmierte Zelltod (PCD) dar. Im Laufe des Absterbens der Zelle kommt es sowohl zu einer Signalwirkung für benachbarte Zellen durch die Abgabe von Sekundärmetaboliten, aber auch zur Eindämmung der Ausbreitung des Pilzes durch Entzug der Lebensgrundlage. Zwar kam es im beschriebenen Experiment nie zum Absterben von Pflanzen bzw. Pflanzenteilen, es wurde jedoch die Expressionsteigerung von Genen induziert die als am programmierten Zelltod beteiligt eingestuft werden können. Hierzu gehört ein Gen mit einer Homologie zu einem potentiell seneszenz-assoziierten Protein aus *Pisum sativum* (pPA0087). Das Einsetzen des Zelltodes geht mit Seneszenzerscheinungen in der Zelle einher. Außerdem findet sich ein Gen mit Homologie zu einer mRNA für Subtilisin aus *Bacillus licheniformis* (pPA049). Subtilisin katalysiert Auflösungsvorgängen der Zellmembran. Die Auflösung der Zellwand ist ein Charakteristikum des PCD.

Zwei weitere induzierte Gene weisen Homologien zu pathogeninduzierten Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten auf. Gen pPA0003 weist Homologie zur COP9 Signalosome-komplex-Untereinheit 1 in *A. thaliana* auf. Diese Untereinheit des COP9 Signalosomes zeigt ähnliche Funktion wie das Ubiquitin, das zum Abbau bestimmte Proteine markiert (Wei und Deng 2003). Die markierten Proteine werden dann an den Proteasomen abgebaut. Die Expression eines Gens mit Homologie zu einem Gen aus *Cicer arietinum* für die alpha-Untereinheit B des 20S Proteasoms wurde ebenfalls gesteigert (pPA0123). Diese Untereinheit der Proteasomen wird durch Elizitine und Salicylsäure, die als Reaktion auf den Pathogenangriff gebildet werden induziert und dient der Proteolyse (Schopfer und Brennecke 1999).

Die Induktion der Expression eines auxin-gesteuerten Protein-Homologs (pPA0016) lässt auf die gesteigerte Anwesenheit des Wachstumshormons Auxin (IAA) schließen. Im Zuge der Pathogenabwehr induziert Auxin die Gentranskription und mRNA-Synthese für die Bereitstellung von Zellwandkomponenten, die der Verhinderung der Pathogenausbreitung

durch strukturelle Veränderungen der Zellwände dienen. Auxin übernimmt daneben allerdings auch Funktionen in der Signaltransduktion und Transkriptionsregulation (Dharmasiri und Estelle 2004)

Neben den bereits genannten Genen kommt es zur verstärkten Expression eines Serin-Threonine-Kinase kodierenden Gens (pPA0105: *A. thaliana* serine-threonine kinase protein). Die Serin-Threonin-Proteinkinase ist an der durch Jasmonsäure induzierten Signalkette beteiligt, die zur Induktion der Bildung der Signalsubstanz Ethylen führt (Schopfer und Brenniker 1999).

Bei der Gesamtbetrachtung des Clusters II fällt auf, dass sich die darin zusammengefassten Gene auf zwei Subcluster (IIa und IIb) verteilen. Zum einen in Gene mit einer zweiten deutlichen Induktion (Abb. 27, oben) als Reaktion auf die Elizitorwirkung des degradierenden Pathogens nach erfolgreicher Abwehr der Infektion durch die Pflanzen, zum anderen in Genen deren starke Expression am Beginn der Infektion komplett auf das Niveau in den nichtinfizierten Pflanzen zurückfällt und 35 DAI nur noch minimal wieder ansteigt (Abb. 27, unten). Es kann somit, auch unter Berücksichtigung der hypothetisch zugeordneten Funktion, geschlossen werden, dass die im ersten Subcluster (IIa) zusammengefaßten Gene Proteine beziehungsweise Enzyme kodieren, die zum einen eine schnelle erste Reaktion auf den Angriff durch ein Pathogen bewirken, zum anderen am Beginn von Signalketten stehen die weiterer Abwehrmechanismen induzieren. Die Transkripte der restlichen Gene des Clusters (in Subcluster IIb zusammengefasst), scheinen auch in diese Reaktionen involviert zu sein, jedoch liegt die Induktionsschwelle für die Genexpression höher als bei den erstgenannten und es kommt somit zu keiner neuerlichen Expression im weiteren Verlauf der Infektion.

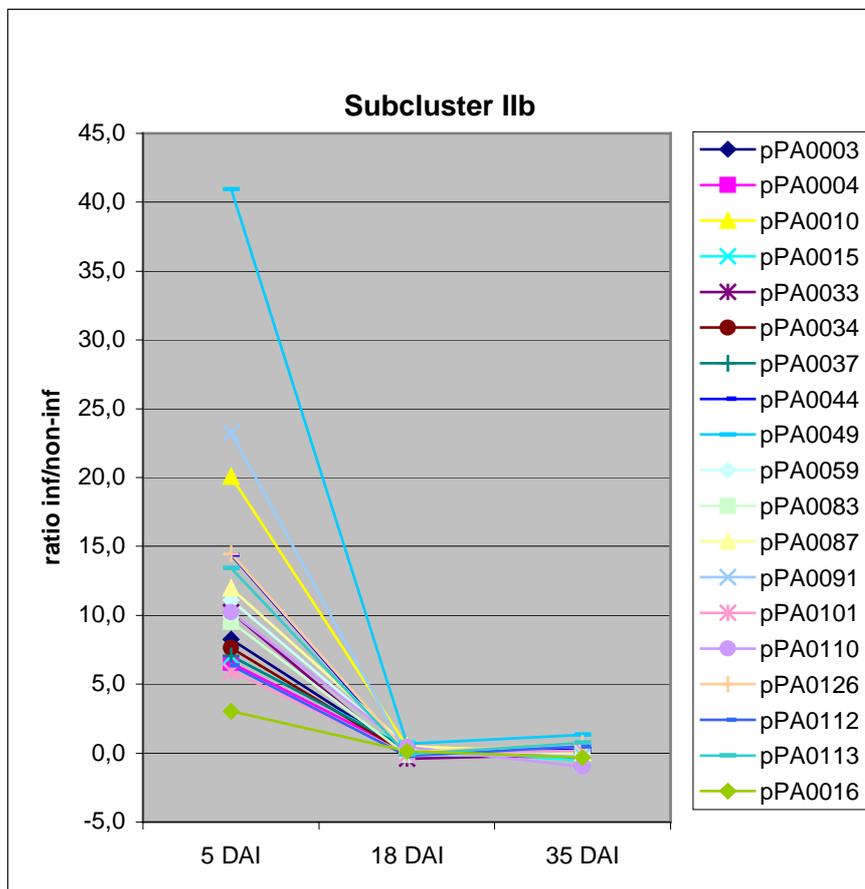
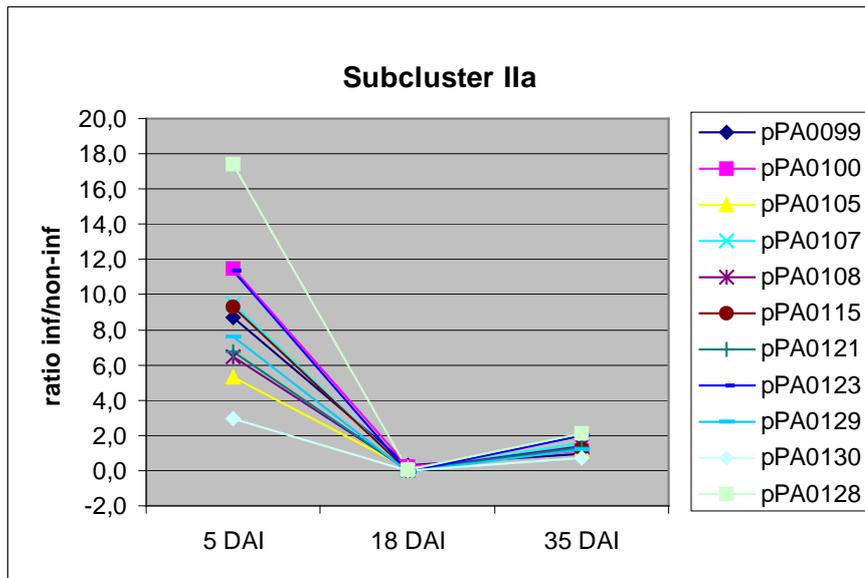


Abb. 27: Aufteilung der in Cluster II zusammengefassten Gene auf zwei Subcluster IIa und IIb. DAI=Tage nach Infektion.

4.5.3 Potentielle Funktion von in Cluster III zusammengefassten Genen in der Pathogenabwehr

In Cluster III sind alle Gene zusammengefasst, die nach einem starken Anstieg der Expression langsamer auf das Niveau der nicht-infizierten Proben zurückkehren und die verstärkte Expression somit über einen längeren Zeitraum aufrecht erhalten wird.

Während des Pathogenangriffes werden verschiedene Gene aktiviert, die Homologien zu Genen aufweisen die nachweislich als Antwort auf abiotische Stressereignissen induziert werden. Hierzu gehört ein Gen (pPA0074) mit Homologie zu einem Dehydrin aus *Pinus sylvestris*. Dehydrine sind Trockenstressproteine, denen im Falle einer Austrocknung eine Funktion bei der Vermeidung von Schäden an den dehydratisierten Zellen zugeschrieben wird (Brady 1997). Gen pPA0038 kodiert ein Halotoleranz-Protein aus *P. abies*. Hohe Salzkonzentrationen im Boden vermindern das Wasserpotential im Wurzelraum und bewirken dadurch in der Pflanzen trockenstressähnliche Symptome. Aufgenommenes NaCl kann in toxischen Mengen im Cytoplasma angereichert werden und führt dort zu einer Störung des photosynthetischen Elektronentransport. Tolerante Fichten wiesen höhere Chloridgehalte in den Vakuolen auf als sensitive. Halotoleranzproteine sind Tonoplasten-Transporter wie z.B. Na⁺/H⁺-Antiporter oder Cl⁻-Kanäle (Mimura 2003).

pPA0073 kodiert das Gen für ein *Anti-freeze-like protein* aus *P. abies*. Der Stress, dem die Pflanze bei Frost ausgesetzt ist ähnelt in seiner Wirkung ebenfalls dem Trockenstress und entsprechend sind auch die Mechanismen die Pflanzen einsetzen, um diesem Stress zu begegnen.

Gen pPA0082 kodiert ein 70kDa Hitzeschockprotein. Die Gruppe der 70kDa Hitzeschockproteine wird der Literatur im Zusammenhang mit abiotischem Stress beschrieben (Vierling 1991). Wie schon die kleinen HSP (sHSP) scheint auch dieses Protein bzw. die Transkription dieser Genfamilie im Zuge einer Pathogeninfektion induziert zu werden. Anders als die sHSP deren Expression 18 Tage nach Infektion fast vollständig auf das Ausgangsniveau zurückkommt, nimmt die Expression des 70kDa HSP langsamer ab und kommt erst 35 Tage nach Infektion auf das Niveau der nicht-infizierten Pflanzen zurück.

Die Steigerung der Transkription eines Gens mit Homologie zu einem Gen für ein durch Abscisinsäure gesteuertes Protein aus *A. thaliana* (pPA0063) lässt auf die Erhöhung der Abscisinsäurekonzentration in den Pflanzenzellen schließen. In Pflanzen kann Abscisinsäure als Reaktion auf Trockenstresssymptome gebildet werden und führt zu einer Steigerung der Resistenz gegen abiotische Stressereignisse (Maschuka *et al.* 1999).

Ein weiteres Gen, das im Zuge der Pathogeninfektion eine erhöhte Expression aufweist ist im Zusammenhang mit der Zellatmung zu sehen. Das von Gen pPA0022 kodierte Protein zeigt Homologie zur 75 kDa Untereinheit der NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase aus *A. thaliana*. Dieser Multiproteinkomplex ist am Elektronentransport durch die innere Mitochondrienmembran beteiligt. In Cluster III befindet sich außerdem ein Gen für die Synthese einer mRNA zur Transkription der β -Untereinheit der ATP-Synthase. Die ATP-Synthase ist ein Enzym der Atmungskette, das zur Synthese von ATP und somit ebenfalls zur Energiegewinnung benötigt wird (Schopfer und Brennicke 1999). Weitere, in diesem Kontext zu sehende Proteine werden von den Genen pPA0078 und pPA0080 kodiert. Es handelt sich hierbei um Glutamatcystein-Ligase (pPA0078) und Adenosin-Desaminase (pPA0080), zwei Enzyme der Atmungskette.

Eine Rolle bei der Signaltransduktion spielen GTP-bindenden Proteine. Gen pPA0071 kodiert ein zu einem GTP-bindenden Protein aus *Oryza sativa* homologes Protein in *P. abies*. Dieses Protein ist in der Lage, GTP zu binden das dann, aufgrund der GTPase-Aktivität einiger Proteine, zu GDP hydrolysiert werden kann (Lehninger *et al.* 2001). Es wird angenommen, dass das Molekül aufgrund dieser GTP/GDP-Umwandlung als *molecular switch* funktioniert und daher fundamentale Signalketten, auch in der Pathogenabwehr, reguliert (Sani und Ohashi 1995).

Nur in geringem Umfang wird die Expression eines Gens gesteigert, das ein zum Speicherprotein C-Hordein der Gerste, *Hordeum vulgare*, homologes Protein kodiert (pPA0077). Die Bildung von Speicherproteinen wird unter anderem, durch Jasmonate induziert (Hock und Elstner 1995). Es kann vermutete werden, dass es im vorliegenden Fall aufgrund der Pathogeninfektion zu einer Bildung von Jasmonaten kommt die als Nebeneffekt die Synthese des C-Hordein-Homologs induzieren.

Gen pPA0084 kodiert ein Protein mit Homologie zu Fructose-bisphosphate Aldolase aus *Persea americana*. In Pflanzen tritt sowohl eine cytosolische als auch eine plastidäre Isoform des Enzyms auf. Das plastidäre Enzym ist sowohl in den Calvinzyklus als auch in die Glycolyse involviert. In beiden Metabolismen katalysiert Aldolase die Bildung von Fructose 1,6-bisphosphat aus Dihydroxyaceton-3-Phosphat und Glyceraldehyd-3-phosphat (Schopfer und Brennicke 1999). Michelis und Gepstein (2000) konnten nachweisen, dass das Enzym Aldolase auch nach Hitzestress auftritt und schließen auf eine Rolle der Aldolasen bei der Ausbildung der Hitzetoleranz gegen hohe Temperaturen. Aus der Expressionssteigerung nach Pathogeninfektion kann geschlossen werden, dass dem Aldolasehomolog aus *P. abies* eine generelle Funktion in der Stressabwehr zukommt.

Cyclophiline sind ubiquitäre Proteine die in allen Zellkompartimenten auftreten und an zahlreichen zellulären Regelungsprozesse beteiligt sind (Galat 1999). Ihnen kommt eine fundamentale Rolle bei der mRNA-Prozessierung, Proteindegradierung und Signaltransduktion zu und sie haben deshalb sowohl während der Pflanzenentwicklung als auch in der Stressantwort elementare Bedeutung (Pliyev und Gurvits 1999, Maruyama und Furutani 2000, Romano *et al.* 2004). Die Akkumulation von Cyclophilin-kodierender mRNAs wurde außerdem als Antwort auf verschiedene Stressszenarien, denen die Pflanze ausgesetzt sein kann, beschrieben. Hierzu gehören Hitzeschockbehandlung (Luan *et al.* 1994), Schwermetallbelastung (Sturzenbaum *et al.* 1999), Salz-, Kälte- und Trockenstress (Marivet *et al.* 1994; Kullertz *et al.* 1999) aber auch die Reaktion auf Verwundung und Pilzinfektion (Godoy *et al.* 2000; Ye & Ng 2000). Die Expressionssteigerung eines Gens mit Homologie zu Cyclophilin aus *Zea mays* (pPA0005) als Antwort auf die Pathogeninfektion belegt die Rolle des Cyclophilins in der Stressantwort in *P. abies*.

Die Signalübertragung vom endoplasmatischen Retikulum (ER) zur Plasmamembran wird durch Peptidtransporter vermittelt (Harter *et al.* 1996). pPA0096 ist ein Gen, das ein zum *Nonclathrin-coat-protein* aus *O. sativa* homologes Protein kodiert. Diesem Gen kann demnach eine Funktion in der Signaltransduktion zugeordnet werden.

Ebenfalls eine Funktion in der Signaltransduktion kommt dem Gen mit einer Homologie zu einem SDR-Protein (*short dehydrogenase/reductase protein*) aus *A. thaliana* zu. SDR-Proteine funktionieren dort als Signalmoleküle für die Abscisinsäure-Synthese in den Chloroplasten (Cheng *et al.* 2002).

Gen pPA0007 kodiert ein Protein mit Homologie zu einem *plastid inner envelope membrane protein* in *A. thaliana*. Diese Proteine sind sowohl am Molekültransport aus und in die Plastiden, als auch am Metabolismus der plastidär gebildeter Substanzen beteiligt (Flügge 1999, Koo und Ohlrogge 2002). Die intrazelluläre Lokalisierung der Proteine ist dabei ein wichtiger Faktor in der Regulation von Biosynthesewegen, die im Zuge der Pathogeninfektion induziert werden.

Erhöhte Expression zeigt ein Gen mit Homologie zu einem ein *Brix-domain-containing protein* kodierendes Gen aus *A. thaliana*. Diese Proteine bilden eine Protein-Superfamilie. Nur wenigen Mitgliedern dieser Superfamilie konnte bisher eine Funktion zugeordnet werden. Dazu gehören das PETER PAN-Protein aus *Drosophila melanogaster*, ein *stage-specific protein* sowie Ssf1/2 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Alle diese Beispiele zeigen, dass *brix-domain containing proteins* in Prozesse eingebunden sind, die mit einer massiven Neusynthese von Proteinen einhergehen wie z.B. Zellwachstum, Zellteilung und genetisch programmierte ontogenetisch Transformationen (Imago-Bildung, Metacyclogene-

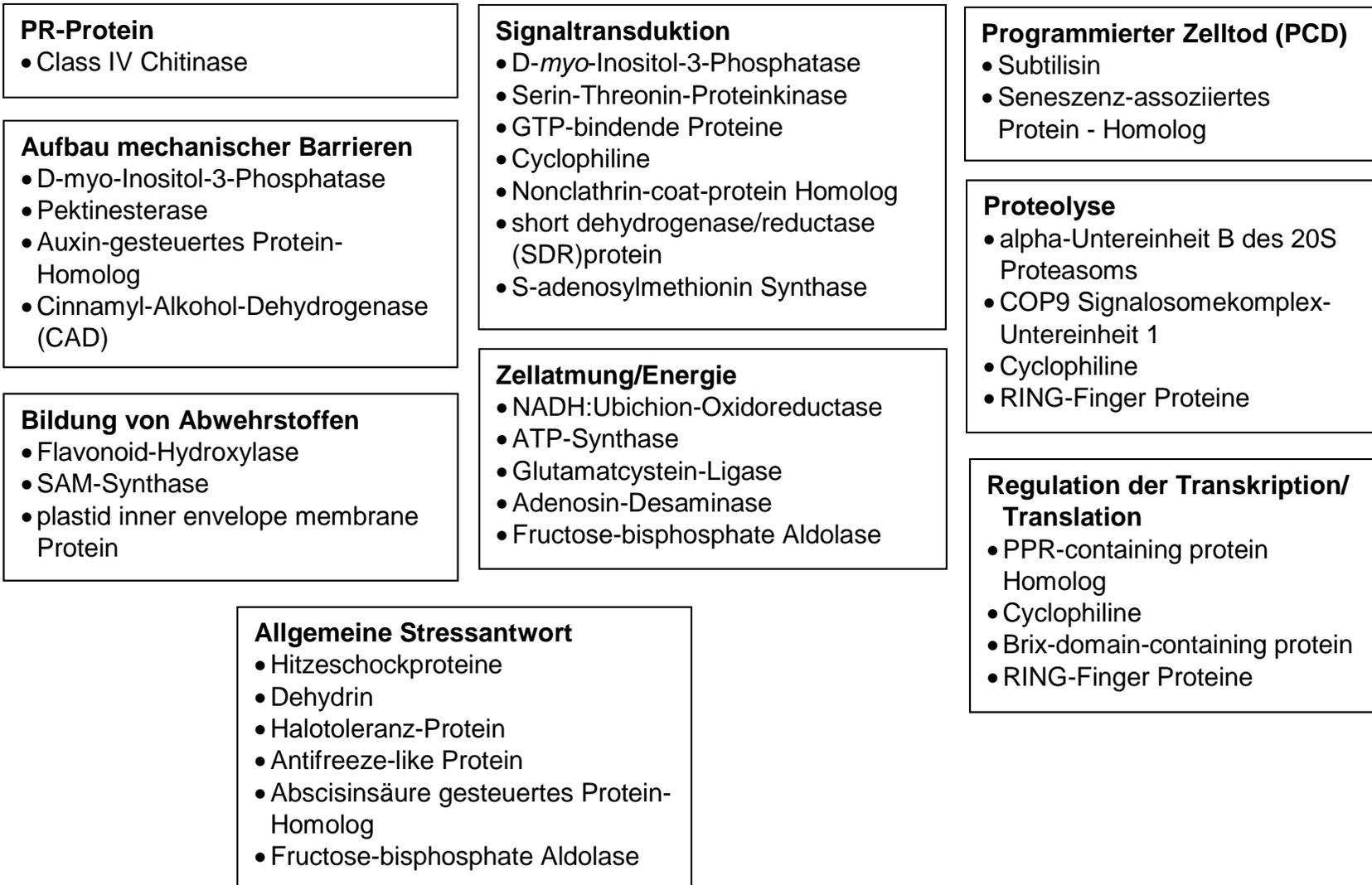
se) (Eisenhaber *et al.* 2001). Der Befund aus der Macroarray-Analyse zeigt, dass *P. abies* über ähnliche Strukturen wie *A. thaliana* verfügt, die zudem auch in die Pathogenabwehr eingebunden zu sein scheinen.

Eine weitere Gruppe von Proteinen bilden die RING-Finger-Proteine aus *A. thaliana*. Diese Proteine funktionieren wie die in eukaryotischen Systemen beschriebenen Zink-Finger-Proteine, die u.a. in der Lage sind mRNA zu binden und so als Repressoren der Translation zu wirken (Lehninger *et al.* 2001, Lodish *et al.* 1995). RING-Finger Proteine besitzen ebenfalls diese Funktion, hinzu kommt allerdings, dass sie zur Proteolyse fähig sind (Kosarev *et al.* 2002). Die Transkription von RING-Finger Proteinhomologen in *P. abies* (pPA0054) ist im Falle der Pathogeninfektion auf die zahlreichen, während der Abwehrreaktion stattfindenden Translationsprozesse zurückzuführen.

In den infizierten Proben konnte eine erhöhte Transkription von Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase mRNAs (pPA0075) nachgewiesen werden. Das Enzym Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase (CAD) katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese monomerer Lignin-Vorläufersubstanzen und übernimmt damit eine fundamentale Rolle beim Aufbau einer erhöhten Resistenz gegen Pathogenangriffe durch Zellwandverstärkung. Diese Lignifizierung stellt aber nicht nur eine Reaktion auf biotische Stressereignisse dar. Zinser *et al.* (1998) konnten die Induktion von Cinnamyl-Alkohol-Dehydrogenase und Stilbene Synthase mRNAs nach Ozonbehandlung in *P. sylvestris*-Keimlingen nachweisen.

Ein weiteres Gen mit erhöhter Expressionsrate kodiert eine mRNA mit Homologie zu wurzelspezifischer S-adenosylmethionin Synthase (SAM Synthase) mRNA aus *Pinus banksiana* (pPA0045). SAM wird in die Aminosäure 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC) durch ACC-Synthase umgewandelt und von ACC-Oxidase zu Ethylen oxidiert (Kende 1993). Die ACC-Synthase und in der Folge die Bildung von Ethylen wird durch verschiedenen Arten von Stress wie Verwundung, Trockenheit, Frost und Sauerstoffmangel induziert (Yang 1989, Kende 1993, He *et al.* 1996). Das Pflanzenhormon Ethylen zeigt vielfältige physiologische Wirkungen in der Pflanze. Zum einen fördert es die Fruchtreife und andere Seneszenzprozesse, zum anderen, wie im vorliegenden Fall der Pathogeninfektion, löst Ethylen Stressreaktionen aus. Das so gebildete, gasförmige „Stressethylen“ wirkt als Signalsubstanz und führt zur Synthese von Abwehrenzymen gegen pathogene Pilze (Schopfer und Brennicke 1999).

Abb. 28: Einordnung der nach Pathogenstress exprimierten Gene in funktionelle Gruppen.



Im Macroarray-Versuch konnte exemplarisch gezeigt werden, dass *P. abies* auf eine Infektion mit dem Pathogen *S. conigenus* mit der Zunahme der Expression von Genen aus verschiedenen Reaktionswegen reagiert. Die Gene, denen aufgrund von Homologievergleichen Funktionen zugeordnet werden konnten, lassen sich in neun funktionelle Gruppen einteilen (Abb. 28). Daraus wird ersichtlich, dass die aktive Pathogenabwehr über die Steigerung der Expression von PR-Proteinen, den Aufbau mechanischer und biochemischer Barrieren sowie die Akkumulation von Proteinen und Enzymen zur Signaltransduktion realisiert wird. Verschiedene Mechanismen zur Regulation von Transkription und Translation werden aktiviert beziehungsweise verstärkt. Die Pathogeninfektion führt zudem zur vermehrten Bildung von am programmierten Zelltod (PCD) beteiligten Substanzen. Dem mit der Pathogenabwehr einhergehenden, erhöhten Energiebedarf der Zelle wird über die Steigerung des Zellstoffwechsels Rechnung getragen. Außerdem reagiert die Fichte mit der Expressionssteigerung von Genen die Proteine und Enzyme mit einer protektiven Wirkung kodieren. Diese Proteine bzw. Enzyme stellen eine allgemeine, auf verschiedene Arten von abiotischem und biotischem Stress unspezifisch formierte, Antwort dar. Erst im Verlauf der Pathogeninfektion werden die Aktivierung und Stilllegung von spezifischeren Abwehrmechanismen über ein komplexes genetisches Netzwerk reguliert (Ayers 1976, Sandermann 1998). Bemerkenswert ist, dass ein großer Teil der in der Fichte exprimierten Gene Homologien zu Stressreaktions-Genen in krautigen Pflanzen aufweisen. Man kann daher annehmen, dass sich die Mechanismen die im Zuge einer Pathogeninfektion aktiviert werden, trotz der großen Unterschiede in der Physiologie, in beiden Systemen ähneln.

4.5.4 Messung der Transkription ausgesuchter Gene in einem quantitativen PCR-Assay

Um die Befunde der Macroarray-Analysen zu verifizieren und um die Transkription ausgesuchter Gene beurteilen zu können, wurde diese in einem qPCR-Assay gemessen. Die Northern Blot-Methode zum Nachweis der Transkription wird zunehmend von der quantitativen oder Real-Time RT-PCR abgelöst, da sie eine sensitive und äußerst genaue Bestimmung des Expressionsprofils der untersuchten Genen erlaubt, auch wenn diese nur gering exprimiert werden (Dilger *et al.* 2003). Der qPCR-Versuch wurde auch durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Unterschiede in den im Macroarray-Versuch detektierten Hybridisierungssignalen innerhalb des linearen Bereichs der Intensitätsmessung liegen. Wie bei allen indirekten Detektionssystemen entspricht die Zu- bzw. Abnahme der Intensität radioaktiver Hybridisierungssignale nur in einem bestimmten Bereich direkt der Zu- bzw. Abnahme der nachgewiesenen Menge an Nukleinsäure. Die stark durch den dynamischen Bereich des verwendeten Scanners determinierte Detektionskapazität ist nur in einem bestimmten Bereich zuverlässig.

Für die qPCR-Analyse wurden deshalb fünf Gen ausgewählt, für deren Hybridisierungssintensität im Macroarray-Versuch Werte nahe der oberen bzw. unteren als zuverlässig angenommenen Detektionsgrenze nachgewiesen wurden. Es zeigte sich, dass der Verlauf der Expression der untersuchten Gene in fast allen Fällen sowohl im Macroarray-Versuch als auch im qPCR-Assay die gleichen Muster zeigte. Eine Ausnahme bildete das CAD-kodierende Gen pPA0075. Hier wurde im Macroarray-Versuch eine weitere Abnahme der Expression am letzten Probenentnahmepunkt nachgewiesen, wohingegen im qPCR-Assay eine Zunahme der Transkriptmenge gemessen werden konnte. Für dieses spezielle Gen kann allerdings aufgrund der bereits oben beschriebenen Funktion in der Pathogenabwehr angenommen werden, dass die qPCR-Analyse den Expressionsverlauf genauer wiedergibt als die Macroarray-Befunde und tatsächlich eine erneute Expressionssteigerung am letzten Probenentnahmepunkt, 35 Tage nach der Infektion, stattfindet.

4.6 Schlussfolgerungen

Die beschriebenen und diskutierten Ergebnisse geben Anlass zu der Schlussfolgerung, dass die Anpassungsprozesse, denen die Baumart Fichte unterliegt, von einer Vielzahl von Faktoren beeinflusst werden. Aufgrund der Befunde der vorliegenden Arbeit, muss die Hypothese, dass allein evolutionäre Selektionsvorgänge den Motor für Anpassungsprozesse darstellen, überdacht werden. Die Fichte scheint in der Lage zu sein, schnell und effektiv auf gewandelte, sich wandelnde Umweltbedingungen oder auch extreme klimatische Einflüsse zu reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von genomischer DNA eine wichtige Rolle in der Regulation dieser vergleichsweise schnellen Anpassung einnimmt. Auch ist die Fichte über diesen Regulationsmechanismus in der Lage, neue Methylierungsmuster im eigenen Genom zu etablieren und diese Muster an die Nachkommen weiterzugeben. Die Fichte kann auf diesem Wege, zusätzlich zur Rekombination, besser an den jeweiligen Standort angepasste Individuen hervorbringen. Es kann festgehalten werden, dass die hohe Anpassungsfähigkeit der Fichte an ihre heterogene Umwelt durch das Zusammenspiel verschiedenster Regulationsmechanismen gesteuert wird. Um diese Regulationsmechanismen zu verstehen, bedarf es weiterer Arbeiten auf diesem Gebiet.

Fasst man jedoch die Ergebnisse aus der vorliegenden Studie mit denen der norwegischen Arbeitsgruppe um Skrøppa (Skogforsk, Ås/Norwegen) zusammen, so lassen sich verschiedene Implikationen für die forstliche Praxis ableiten:

Die Umwelt während Kreuzung und Embryogenese ist ausschlaggebend für den Phänotyp der Nachkommen. Die als Reaktion auf die Kreuzungsumwelt auftretenden Änderung bzw. die Anpassung der Nachkommenschaften sollte stets berücksichtigt werden. Dies gilt für die Anlage von Samenplantagen, bei allen Maßnahmen zur Konservierung genetischer Ressourcen *ex situ* aber auch in der Forstpflanzenzüchtung. Hier führt die Praxis des Aufbaus von Samenplantagen mit einer hohen Anzahl von Klonen verschiedener Herkünfte an herkunftsfernen Orten innerhalb einer Generation zur Produktion von Nachkommenschaften, die an die Umweltbedingungen der Samenplantage angepasst sind. Diese Nachkommen entsprechen in ihren Merkmalen dann allerdings nicht mehr denen der Ausgangsbestände und zeigen höchstwahrscheinlich nicht den für den jeweiligen Standort züchterisch gewünschten bzw. geforderten Phänotyp. Das Ausbringen des entsprechenden Pflanzenmaterials kann, im schlimmsten Fall, zu empfindlichen wirtschaftlichen Einbußen führen. In der Beratung der forstlichen und forstpflanzenzüchterischen

Praxis ebenso wie in die Beurteilung der Wuchsgebietseinteilung sollten die gewonnenen Erkenntnisse deshalb zukünftig verstärkt einfließen.

Neben abiotischen Einflüssen, denen Fichtenpopulationen ausgesetzt sein können, wurden auch biotische Schadereignisse und die entsprechenden Reaktion der Fichte untersucht. Die hierfür gewählten Methoden, Macroarray-Analyse und quantitative PCR, zeigten sich für die Bearbeitung der gewählten Fragestellung geeignet und ergänzten sich gegenseitig. Die Macroarray-Analyse erlaubte es, die Expression einer größeren Anzahl von Genen gleichzeitig zu untersuchen, blieb dabei jedoch in ihrer Sensitivität begrenzt. Die hochsensitive Methode der quantitativen PCR wurde verwendet, um die Befunde aus den Macroarray-Untersuchungen zu bestätigen bzw. um Unklarheiten zu beseitigen. Schon die Untersuchung weniger Gene zeigte eindrücklich, dass Fichtensämlinge nach einer Pathogeninfektion mit der Expressionssteigerung von Genen aus verschiedenen Synthesewege reagieren.

5 Zusammenfassung – Summary

Der größte Teil der Untersuchungen basiert auf Beobachtungen über Änderungen im Phänotyp von Vollgeschwisterfamilien der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst.) aus unterschiedlichen Kreuzungsumwelten, die unter den gleichen Umweltbedingungen aufgezogen wurden. Bei der genetischen Untersuchung der Vollgeschwisterfamilien mit EST-Markern ließ sich zwar eine Segregationsdistortion an einem der untersuchten Loci nachweisen, es fand sich jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine umweltbedingte Selektion während der Kreuzung. Nach kapillarelektrophoretischer Untersuchung der hydrolysierten DNA wurde festgestellt, dass sich die untersuchten Vollgeschwisterfamilien signifikant im gesamtgenomischen Methylcytosingehalt unterscheiden. So wiesen die Vollgeschwisterfamilien mit den höchsten Temperatursummen während Kreuzung und Embryogenese signifikant höhere Gehalte an 5-Methylcytosin auf als Vollgeschwisterfamilien mit niedrigeren Temperatursummen.

Parallel zu den Untersuchungen der Vollgeschwisterfamilien wurden Messungen der 5-Methylcytosingehalte nach Hitzeschock durchgeführt. Hierfür wurden Pflanzen aus einer Hoch- und einer Tieflagenherkunft verwendet. Beide Herkünfte zeigten, dass nach extremen abiotischen Einflüssen innerhalb kurzer Zeit eine signifikante Erhöhung der 5-Methylcytosingehalte in den gestressten Pflanzen stattfand. Die Tieflagenherkünfte reagierten ausgehend von höheren Gehalten in den Kontrollen, mit einer signifikant stärkeren Erhöhung der 5-Methylcytosingehalte als die Hochlagenherkunft. Die Befunde lassen den Schluss zu, dass die Methylierung der DNA stark von Umweltbedingungen beeinflusst wird. Desweiteren deuten die Messungen in den Vollgeschwisterfamilien darauf hin, dass Informationen über die Umweltbedingungen am jeweiligen Standort über die DNA-Methylierung an die Nachkommen weitergegeben werden.

Untersuchungen zur Dynamik der 5-Methylcytosingehalte der DNA zeigten für *P. abies* erstmals, dass es während früher ontogenetischer Stadien zu signifikanten Änderungen der 5-Methylcytosingehalte kommt. Die Messung der Gehalte im Verlauf einer Pathogenerkrankung machten deutlich, dass ein biotisches Stressereignis keine signifikanten Änderungen der gesamtgenomischen DNA-Methylierung bewirkt.

Nach der Infektion von *P. abies* - Keimlingen mit dem Nadelpathogen *Sirococcus conigenus* konnte die Änderung der Genexpression an drei auf die Inokulation mit einer Sporensuspension bezogenen Probenentnahmezeitpunkten erfasst werden. Die Untersuchung erfolgte zum einen mittels Macroarrayhybridisierung und zum anderen in einem quantitativen PCR-Assay. Im Macroarrayversuch wurden cDNA-Klone auf Nylonmembrane aufge-

bracht und diese mit radioaktiv markierter cDNA hybridisiert. Es konnte so der Expressionsverlauf pathogeninduzierter Gene verfolgt werden. Die untersuchten Gene konnten aufgrund ihres Expressionsverlaufs in drei Cluster eingeordnet werden. Die Gene mit Homologien zu charakterisierten Genen aus anderen Organismen wurden ihrer Funktion nach in neun Gruppen eingeteilt. Diese umfassen neben mechanischen und chemischen Abwehrreaktionen auch Signaltransduktion, Genregulation, Energiemetabolismus sowie nicht-pathogenspezifische Abwehrmechanismen. Es konnte gezeigt werden, dass die Fichte im Zuge einer Pathogeninfektion Gene aus unterschiedlichen Synthesewegen aktiviert.

Im quantitativen PCR-Assay wurde die Menge an genspezifischem Transkript von fünf ausgewählten Genen untersucht und die Ergebnisse mit den Befunden der Macroarrayexperimente verglichen. Für vier der fünf untersuchten Gene konnten die Ergebnisse der Macroarrayuntersuchungen bestätigt werden.

Unter Bezugnahme auf die Befunde aus den Messungen der Methylcytosingehalte und unter Einbeziehung von Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe wurden Implikationen für die forstliche und forstpflanzenzüchterische Praxis abgeleitet werden. Im Vordergrund stand hierbei, dass die während der Kreuzung herrschenden Umweltbedingungen einen größeren Einfluss auf den Phänotyp der Nachkommen haben als bisher angenommen. Es wurde daraus geschlossen, dass den Umweltbedingungen zukünftig in der Praxis eine deutlich größere Bedeutung zugemessen werden muss.

Summary

The presented analyses are based on observations of changes in phenotypic performance of Norway spruce, *P. abies* (L.) Karst. full sib families produced under different climatic conditions. Analysis of the full sib families using EST-Markers showed a distorted segregation at one of the analysed loci but gave no clear indication for environmentally induced selection during crossing.

Following the analysis of hydrolysed DNA by capillary electrophoresis, it turned out that the studied full sib families varied significantly in the whole genome methylcytosine content. Full sib families having experienced higher temperature sums during crossing and embryogenesis, had significantly higher levels of methylated cytosine than full sib families with lower overall temperature sums.

In parallel the 5-methylcytosine content of genomic DNA after heat shock treatment was quantified in plants from high and low elevation provenances. Both provenances indicate that extreme environmental conditions result in a fast and significant increase of 5-methylcytosine content in the stressed plants. Starting from a significantly higher level in the controls, the plants of lowland reacted with a significantly stronger increase than those from highland provenance.

These findings lead to the conclusion that DNA methylation is influenced strongly by environmental conditions. Furthermore, quantification of the full sib family's methylcytosine content indicate that information about prevailing environmental conditions is transmitted to the offspring by means of DNA methylation.

For the first time in Norway spruce, studies on the dynamics of DNA-methylation showed that 5-methylcytosine content is subject to significant changes during early ontogenetic stages. Measurement of 5-methylcytosine content clearly pointed out that during biotic stress no significant changes in whole genome DNA methylation are evident.

Following the infection of *P. abies* seedlings with the pathogenic fungus *Sirococcus conigenus*, changes in gene expression could be monitored at three points of time after inoculation using the macroarray hybridisation technique and a quantitative PCR-assay. For the macroarray experiment, cDNA-clones were blotted onto nylon membranes and hybridized with radioactively labelled cDNA samples. Thus the expression of pathogen-induced genes could be profiled. According to their expression profile, the studied genes could be grouped into three distinct clusters. Genes with homologies to characterized genes in other organisms were filed into nine functional groups such as mechanical and chemical defence mechanisms, signal transduction, gene regulation, energy metabolism and non-

pathogen specific defence mechanisms. It was shown that in the course of pathogen infection Norway spruce activates genes from various pathways.

Using a quantitative PCR-assay, the amount of gene specific transcript of five selected genes was determined. The results were compared to the findings of the macroarray experiments. The results of the macroarray experiments were confirmed for four out of five of the studied genes.

Taking into consideration the synopsis of the presented results and the findings of another research group, implications for forestal practice as well as for breeders of forest trees were deduced. The central conclusion is that the environment during crossing influences the offspring phenotype stronger than suggested before. Consequently more attention needs to be attributed to this phenomenon in the future.

6 Literaturverzeichnis

- Adams R.L.P., Lindsay H., Reale A., Seivwright C., Kass S., Cummings M und Houlston C. (1993):** Regulation of de novo methylation. In: Saluz und Jost (Hrsg.): DNA methylation: molecular biology and biological significance. Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, S. 120-145.
- Adams S., Vinkenoog R., Spielman M., Dickinson H.G. und Scot R.J. (2000):** Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana* require DNA methylation. *Development* 127, 2493-2502.
- Anglberger H. und Halmschlager E. (2003):** The severity of Sirococcus shoot blight in mature Norway spruce stands with regard to tree nutrition, topography and stand age. *Forest Ecology and Management* 177, 221-230.
- Aronen T., Nikkanen T., Harju A., Tiimonen H. und Häggman H. (2002):** Pollen competition and seed-siring success in *Picea abies*. *Theor. Appl. Genet.* 104, 638-642
- Ashikawa I. (2001):** Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. *Plant Mol Biol.* 45(1), 31-39.
- Austarå Ø., Orlund A., Svendsrud A. und Veidahl A. (1987):** Growth loss and economic consequences following two years defoliation of *Pinus sylvestris* by the pine sawfly *Neodiprion sertifer* in West-Norway. *Scand J. For. Res.* 2, 111-119.
- Ayers A.R., Ebel J., Finelli F., Berger N. und Albersheim P. (1976):** Host-Pathogen Interactions. *Plant Physiol.* 57, 751-759.
- Bahnweg G., Schubert R., Kehr R.D., Müller-Starck G., Heller W., Langebartels C. und Sandermann H. (2000):** Controlled Inoculation of Norway spruce (*Picea abies*) with *Sirococcus conigenus*: PCR-based quantification of the pathogen in host tissue and infection-related increase of phenolic metabolites. *Trees* 14, 435-441.
- Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft (2003):** Klimawandel und Nachhaltigkeit aus forstlicher Sicht. LWF aktuell 37, 1-42.

- Bayerische Staatsforstverwaltung (2002):** Zahlen und Fakten - Wald und Holz
3.Auflage.
- Bernacchia G., Primo A., Giorgetti L., Pitto L. und Cella R. (1998):** Carrot DNA-methyltransferase is encoded by two classes of genes with different patterns of expression. *The Plant Journal* 13, 317-329.
- Binelli G. und Bucci G. (1994):** A genetic linkage map of *Picea abies* Karst., based on RAPD markers, as a tool in population genetics. *Theor. Appl. Genet.* 88: 283-288.
- Bitonti M.B., Cozza R., Chiappetta A., Giannino D., Castiglione M.R., Dewitte W., Mariotti D., Van Onckelen H. und Innocenti A.M. (2002):** Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Journal of Experimental Botany* 53(371), 1047-1054.
- Bjørnstad Å. (1981):** Photoperiodical after-effect of parent plant environment in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) seedlings. *Medd. Nor. Inst. skogforsk.* 36, 1 - 30.
- Bozhko M., Riegel R., Schubert R. und Müller-Starck G. (2003):** A cyclophilin gene marker confirming geographical differentiation of Norway spruce populations and indicating viability response on excess soil-born salinity. *Molecular Ecology* 12, 3147-3155.
- Brady E.A. (1997):** Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci* 2, 48-54
- Brogliè K., Chet I., Holliday M., Cressman R., Biddle P, Knowlton S., Mauvais C.J. und Brogliè R. (1991):** Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254, 1194-1197.
- Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft (2002):** Statistisches Jahrbuch über Ernährung, Landwirtschaft und Forsten 2002. Landwirtschaftsverlag, Münster.
- Burn J.E., Bagnall D.J., Metzger J.D., Dennis E.S. und Peacock W.J. (1993):** DNA methylation, vernalization and the initiation of flowering. *Proc. Natl.Acad. Sci USA* 90, 287-291.

- Butin H. (1986):** Endophytische Pilze in grünen Nadeln der Fichte (*Picea abies*). Z. Mykol 52, 335-346.
- Butin H. (1989):** Krankheiten der Wald- und Parkbäume. 2.Aufl.. Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Cato S., Gardner R., Kent J. und Richardson T. (2001):** A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs. Theor. Appl. Genet. 102, 296-306.
- Chen Q, Lauzon L, DeRocher A. und Vierling E. (1990):** Accumulation, stability, and localization of a major chloroplast heat shock protein. J.Cell.Biol. 110, 1873-1883.
- Cheng W.-H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H.-C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T. und Sheen J. (2002):** A Unique Short-Chain Dehydrogenase/Reductase in *Arabidopsis* Glucose Signaling and Abscisic Acid Biosynthesis and Functions. The Plant Cell 14, 2723-2743.
- Clapham D.H., Kolukisaoglu H.Ü., Larsson C.-T., Qamaruddin M., Ekberg I., Wiegmann-Eirund C., Schneider-Poetsch H.A.W. und von Arnold S. (1999):** Phytochrome types in *Picea* and *Pinus*. Expression patterns of PHYA-related types. Plant Molecular Biology 40, 669-678.
- Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Nielsen K.K., Rasmussen U. und Vad K. (1993):** Plant chitinases. Plant J. 3, 31-40.
- Conner A.J., Mlynarova L., Stiekema W.J. und Nap J.P. (1998):** Meiotic stability of transgene expression is unaffected by flanking matrix-associated regions. Mol Breed 4, 47-58.
- Cullis C.A. (1977):** Molecular aspects of the environmental induction of heritable changes in flax. Heredity 38,129-154.
- Cullis C.A. (1981):** Environmental induction of heritable changes in flax: defined environments inducing changes in DNA and peroxidase isozyme band pattern. Heredity 47, 87-94.
- Cullis C.A. (1983):** Environmentally induced DNA changes in plants. CRC Crit. Rev. Plant Sci. 1, 117-129.

- Cullis C.A. (1987):** The generation of somatic and heritable variation in response to stress. *Am.Nat.* 130 suppl., S62-S73.
- Cullis C.A. (1999):** The environment as an active generator of adaptive genetic variation. In: Lerner (Hrsg.): *Plant responses to environmental stresses*. Marcel Dekker Inc., New York.
- D'Aoust A.L. und Hubac C. (1986):** Phytochrome action and frost hardening in black spruce seedlings. *Physiologia Plantarum* 67, 141-144.
- Davis M.B. und Shaw R.G. (2001):** Range Shifts and Adaptive Responses to Quaternary Climate Change. *Science* 292, 673-679.
- Davison P.A., Hunter C.N. und Horton P. (2002):** Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* 418, 203-206.
- Dennis E.S., Finnegan E.J., Bilodeau P., Chaudhury A., Genger R., Helliwell C.A. Sheldon C.C., Bagnall D.J. und Peacock W.J. (1996):** Vernalization and the initiation of flowering. *Semin. Cell Devel. Biol.* 7, 441-448.
- Dharmasiri N. und Estelle M. (2004):** Auxin signaling and regulated protein degradation. *Trends in Plant Science* 9(6), 302-308.
- Dhillon S.S. (1987):** DNA in tree species. In: Bonga und Durzan (Hrsg.): *Cell and tissue culture in forestry*. Vol.1. Marinus Nijhof Publ., Dordrecht.
- Dilger M., Felsenstein F.G. und Schwarz G. (2003):** Identification and quantitative expression analysis of genes that are differentially expressed during conidial germination in *Pyrenophora teres*. *Mol. Gen. Genomics* 270, 147-155.
- Donohue K. und Schmitt J. (1998):** Maternal Environmental Effects in Plants. Adaptive Plasticity? In: Mousseau und Fox (Hrsg.): *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Durrant A. (1958):** Environmental conditioning of fax. *Nature* 181, 928-929.
- Durrant A. (1962):** The environmental conditioning of heritable changes in *Linum*. *Heredity* 17, 27-61.

- Echt C., May-Marquardt P., Hseih H. und Zahorchak R. (1996):** Characterization of microsatellite markers in eastern white pine. *Genome* 39, 1102-1108.
- Eisenhaber F., Wechselberger C. und Kreil G. (2001):** The Brix domain protein family - a key to the ribosomal biogenesis pathway? *Trends in Biochemical Sciences* 26, 345-347.
- Feemers M., Blaschke M., Skatulla U. und Gulder H.-J. (2003):** Klimaveränderungen und Biotische Schäden im Wald. *LWF aktuell* 37, 19-22.
- Finnegan E.J., Genger R.G., Kovac K., Peacock W.J. und Dennis E.S (1998):** Methylation controls the low-temperature induction of flowering in *Arabidopsis*. *Proc. Natl.Acad. Sci USA* 95, 5824-5829.
- Finnegan E.J., Peacock W.J. und Dennis E.S. (1996):** Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proc. Natl.Acad. Sci USA* 93, 2383-2388.
- Finnegan E.J., Peacock W.J. und Dennis E.S. (2000):** DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. *Current Opinion in Genetics and Development* 10, 217-223.
- Finnegan, E.J. und Kovac K.A: (2000):** Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology* 43, 189-200.
- Flügge U.I. (1999):** Phosphate Translocators in Plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol* 50, 27-45.
- Fraga M.F., Rodriguez R. und Canal M.J. (2000):** Rapid quantification of DNA methylation by high performance capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 21, 2990-2994.
- Fraga M.F., Rodriguez R. und Canal M.J. (2002):** Genomic DNA methylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree Physiology* 22, 813-816.
- Frommer M., McDonald L.E., Millar D.S., Collis C.M., Watt F., Grigg G.W., Molloy P.L. und Paul C.L. (1992):** A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 1827-1831.

- Fulnecek J., Matyasek R. und Kovarik A. (2002):** Distribution of 5-methylcytosine residues in 5S rRNA genes in *Arabidopsis thaliana* and *Secale cereale*. Mol. Genet. Genomics 268, 510-517.
- Galat A. (1999):** Variations of sequences and amino acid compositions of proteins that sustain their biological functions: An analysis of the cyclophilin family of proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics 137, 149-162.
- Galliano H., Cabané M., Eckerskorn C., Lottspeich F., Sandermann H. und Ernst D. (1993):** Molecular cloning, sequence analysis and elicitor-/ozone - induced accumulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase from Norway spruce (*Picea abies* L.). Plant Mol. Biol. 23: 145-156.
- Galloway L.F. (2001):** Parental environmental effects on life history in the herbaceous plant *Campanula americana*. Ecology 82(10), 2781-2789.
- García-Gil M.R., Mikkonen M. und Savolainen O. (2003):** Nucleotide diversity at two phytochrome loci along a latitudinal cline in *Pinus sylvestris*. Molecular Ecology 12, 1195-1206.
- Gifford D.J. und Taleisnik E. (1994):** Heat-shock response of *Pinus* and *Picea* seedlings. Tree Physiology 14, 103-110.
- Gilpin B., McCallum J., Frew T. und Timmerman-Vaughan G. (1997):** A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). Theor. Appl. Genet. 95: 1289-1299.
- Glazebrook J. (1999):** Genes controlling expression of defense response in *Arabidopsis*. Current Opinion in Plant Biology 2, 280-286.
- Godoy AV, Lazzaro AS, Casalongué CA und San Segundo B. (2000):** Expression of a *Solanum tuberosum* cyclophilin gene is regulated by fungal infection and abiotic stress conditions. Plant Science, 152, 123-134.
- Halmschlager E., Anglberger H. und Neumüller A. (1999):** Die Bedeutung des *Sirococcus*-Triebsterbens in sekundären Fichtenwäldern. FVBA-Berichte 111, 95-100.

- Halmschlager E., Gabler A. und Andrae F. (2000):** The impact of *Sirococcus* shoot blight on radial and height growth of Norway spruce (*Picea abies*) in young plantations. For. Path. 20, 127-133.
- Harter C., Pavel J., Coccia F., Draken E., Wegehangel S., Tschochner H. und Wieland F. (1996):** Nonclathrin coat protein γ , a subunit of coatamer, binds to the cytoplasmic dilysine motif of membrane proteins of the early secretory pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1902-1906.
- He C.-J., Morgan P.W. und Drew M.C. (1996):** Transduction of an ethylene signal is required for cell death and lysis in the root cortex of maize during aerenchyma formation induced by hypoxia. Plant Physiol. 112, 463-472.
- Hegeman C.E., Good L.L und Grabau E.A. (2001):** Expression of D-myo-Inositol-3-Phosphate Synthase in Soybean. Implications for Phytic Acid Biosynthesis. Plant Physiology 125, 1941-1948.
- Helfer W., Stetter U. und Blaschke M. (2004):** *Sirococcus*-Triebsterben der Fichte im Bayerischen Wald. In: Zentrum Wald-Forst-Holz (Hrsg.): Waldforschung aktuell. Tagungsband zum 8.Statusseminar des Kuratoriums für Forstliche Forschung 6.Mai 2004.
- Highkin H.R. (1958):** Temperature-induced variability in peas. Am. J. Botany 45, 626-631.
- Highkin H.R. (1961):** The effect of constant temperature environment and continuous light on the growth and development of pea plants. In: Biological clocks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 25:231-237.
- Hill J. (1967):** The environmental induction of heritable changes in *Nicotiana rustica*. Parental and selection lines. Genetics 55:735-754.
- Hock B. und Elstner E.F. (1995):** Schadwirkungen auf Pflanzen: Lehrbuch der Pflanzentoxikologie, 3.Aufl.. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Holliday R. (1993):** Epigenetic inheritance based on DNA methylation. In: Saluz und Jost (Hrsg.): DNA methylation: molecular biology and biological significance. Birkhäuser, Basel, Boston, Berlin, S. 452-469.

- Howe G.T., Gardner G., Hackett W.P. und Furnier G.R. (1996):** Phytochromes control of short-day-induced bud set in black cottonwood. *Physiologia Plantarum* 97, 95-103.
- Huntley B. und Birks H.J.B. (1983):** An atlas of past and present pollen maps of Europe: 0-13000 years ago. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ikeda T.M. und Gray M.W. (1999):** Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol.*19(12), 8113-8122.
- Ingestad T. (1979):** Mineral nutrient requirement of *Pinus sylvestris* and *Picea abies* seedlings. *Physiologia Plantarum* 45, 373-380.
- Jablonka E. und Lamb M.J. (1989):** The inheritance of acquired epigenetic variations. *J. Theor. Biol.* 139, 69-83.
- Jacobsen S.E. (1999):** Maintaining methylation patterns. *Current Biology* 9(16), R617-R619.
- Jandl R., Halmschlager H., Reh M. und Halmschlager E. (2000):** Effect of fertilization of a secondary spruce stand in the Kobernausserwald with shoot blight symptoms. *Die Bodenkultur* 51, 247-258.
- Jayaraj J., Yi H., Liang G.H., Muthukrishnan S. und Velazhahan R. (2004):** Foliar application of *Bacillus subtilis* AUBS1 reduces sheath blight and triggers defense mechanisms in rice. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* 111(2), 115-125.
- Johnsen Ø. (1989a):** Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. I. Frost hardiness in a phytotron experiment. *Scan. J. For. Res.* 4, 317-330.
- Johnsen Ø. (1989b):** Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. II. Seasonal growth rhythm and height in field trials. *Scan. J. For. Res.* 4, 331-341.
- Johnsen Ø. und Skrøppa T. (1996):** Adaptive properties of *Picea abies* progenies are influenced by environmental signals during sexual reproduction. *Euphytica* 92, 67-71.

- Johnsen Ø. und Skrøppa T. (1997):** Parents of Norway spruce adjust the performance of their progeny according to changes in climate and weather during female flowering. In: Mohren et al. (Hrsg.): Impact of global change on tree physiology and forest ecosystems. Kluwer Verlag, Dordrecht. S.159-163.
- Johnsen Ø., Dietrichson J. und Skaret G. (1989):** Phenotypic changes in progenies of northern clones of *Picea abies* (L.) Karst. grown in a southern seed orchard. III. Climatic damage in a progeny trial. Scan. J. For. Res. 4, 343 - 350.
- Johnsen Ø., Skrøppa T., Haug G., Apeland I. und Østreg G. (1995):** Sexual reproduction in a greenhouse and reduced autumn frost hardiness of *Picea abies* progenies. Tree Physiol. 15, 551-555.
- Johnsen Ø., Skrøppa T., Junttila O. und Dæhlen O.G. (1996):** Influence of the female flowering environment on autumn frost-hardiness of *Picea abies* progenies. Theor. Appl. Genet 92, 797-802.
- Johnsen, Ø. und Østreg G. (1994):** Effects of plus tree selection and seed orchard environment on progenies of *Picea abies*. Can J. For. Res. 24, 32-38.
- Karban R. und Baldwin I. (1997):** Induced response to herbivory. The University of Chicago Press, Chicago, 319 Seiten.
- Kende H. (1993):** Ethylene biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 283-307.
- Kirst M., Johnson A.F., Baucom C., Ulrich E., Hubbard K., Staggs R., Paule C, Retzel E., Whetten R. und Sederoff R. (2003):** Apparent homology of expressed genes from wood-forming tissues of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) with *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 7383-7388.
- Klein E. (1987):** Breiten sich Rindenpilzschäden bei Hochlagenfichten aus? Allg. Forstzeitung 42, 762-763.
- Köhne S., Neumann K., Pühler A. und Broer I. (1998):** The heat-treatment induced reduction of the pat gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. J Plant Physiol 153, 631-642.

- Koo A.J.K und Ohlrogge J.B. (2002):** The Predicted Candidates of *Arabidopsis* Plastid Inner Envelope Membrane Proteins and Their Expression Profiles. *Plant Physiology* 130, 823-836.
- Kosarev P., Mayer K.F.X. und Hardtke C.S. (2002):** Evaluation and classification of RING-finger domains encoded by the *Arabidopsis* genome. *Genome Biology* 3(4), research0016.1-0016.12.
- Kovach W. (1994):** MVSP - Multivariate Statistical Package for Windows, Version 3.11. Kovach Computing Services. <http://www.kovcomp.com>.
- Kovalchuk O., Paula Burke P., Arkhipov A., Kuchmab N., James S.J., Kovalchuk I., und Pogribny I. (2003):** Genome hypermethylation in *Pinus sylvestris* of Chernobyl— a mechanism for radiation adaptation?. *Mutation Research* 529, 13-20.
- Kuhlemeier C., Green P.J. und Chua N.-H. (1987):** Regulation of Gene Expression in Higher Plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38,221-257.
- Kullertz G., Liebau A. und Rucknagel P., Schierhorn A., Diettrich B., Fischer G. und Luckner M. (1999):** Stress-induced expression of cyclophilins in proembryonic masses of *Digitalis lanata* does not protect against freezing/thawing stress. *Planta* 208, 599-605.
- Labra M., Ghiani A., Citterio S, Sgorbati S., Sala F., Vannini C., Ruffini-Castiglione M. und Bracale M. (2002):** Analysis of Cytosine Methylation Pattern in Response to Water Deficit in Pea Root Tips. *Plant Biology* 6, 694-699.
- Labra M., Grassi F., Imazio S., Di Fbio T., Cittero S., Sgorbati S. und Agradi E. (2004):** Genetic and DNA-methylation changes induced by potassium dichromate in *Brassica napus* L.. *Chemosphere* 54, 1049-1058.
- Lacy E. P. (1998):** What is an Adaptive Environmentally Induced Parental Effect? In: Mousseau und Fox (Hrsg.): *Maternal Effects as Adaptations*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Lagerkrantz U. und Ryman N. (1990):** Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44, 38-53.

- Lahmy S., Barneche F., Derancourt J., Filipowicz W., Delseny M. und Echeverria M. (2000):** A chloroplastic RNA-binding protein is a new member of the PPR family. FEBS Lett. 480(2-3), 255-260.
- Lehninger A.L., Nelson D. und Cox M. (2001):** Lehninger Biochemie. 3.Aufl.. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York.
- Liu Y.-G., Mitsukawa N., Oosumi T. und Whittier R.F. (1995):** Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. The Plant Journal 8(3), 457-463.
- Lobinger G. (2004):** Der "Käfersommer" 2003. LWF aktuell 43, 26-28.
- Lodish H., Baltimore D., Berk A., Zipursky L.S., Matsudeira P. und Darnell J. (1995):** Molecular Cell Biology. Third Edition. W.H. Freeman & Company New York, Basingstoke.
- Loewus F.A. und Murthy P.P.N. (2000):** Myo-Inositol metabolism in plants. Plant Science 150, 1-19
- Lottspeich F. und Zorbas H. (1998):** Bioanalytik. Spektrum Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Luan S., Lane W.S. und Schreiber S.L. (1994):** pCyP B: a chloroplast localised, heat-shock-responsive cyclophilin from faba bean. Plant Cell 6, 885-892.
- Magasi L.P., Manley S.A. und Wall R.E. (1975):** *Sirococcus strobilinus*, a new disease of spruce seedlings in Maritime nurseries. Plant Dis. Rep. 59, 664
- Marivet J., Margis-Pinheiro M., Frendo P. und Burkard G. (1994):** Bean cyclophilin gene expression during plant development and stress conditions. Plant Mol Biol. 26(4),1181-1189.
- Maruyama T. und Furutani M. (2000):** Archaeal peptidyl prolyl cis-trans isomerases (PPIases). Frontiers in Bioscience 5, 821-836.
- Maschuka J., Bashiardes S., Ruben E., Spooner K., Cuming A., Knight C. und Cove D. (1999):** Sequence analysis of Expressed Sequence Tags from an ABA-treated cDNA Library Identifies Stress Response Genes in the Moss *Physcomitrella patens*. Plant Cell Physiol. 40(4), 378-387.

- Meierhoff K., Felder S., Nakamura T., Bechtold N. und Schuster G. (2003):** HCF152, an *Arabidopsis* RNA binding pentatricopeptide repeat protein involved in the processing of chloroplast psbB-psbT-psbH-petB-petD RNAs. *Plant Cell*. 15(6), 1480-1495.
- Messegueur R., Ganai M.W., Steffens J.C. und Tanksley S.D. (1991):** Characterization of the level, target sites and inheritance of cytosine methylation in tomato nuclear DNA. *Plant Molecular Biology* 16, 753-770.
- Meyer P., Linn F, Heidmann I, Meyer H., Niedenhof I und Saedler H. (1992):** Endogenous and environmental factors influence 35S promotor methylation of a maize A1 gene construct in transgenic *petunia* and its colour phenotype. *Mol Gen Genet* 231, 345-352.
- Meza T.J., Kamfjord D., Håkelién A-M., Evans I., Godager L.H., Mandal A., Jakobsen K.S. und Aalen R.B. (2001):** The frequency of silencing in *Arabidopsis thaliana* varies highly between progeny of siblings and can be influenced by environmental factors. *Transgenic Research* 10, 53-67.
- Michelis R. und Gepstein S. (2000):** Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast. *Plant Molecular Biology* 44, 487-498.
- Mimura T., Kura-Hotta M., Tsujimura T., Ohnishi M., Miura M., Okazaki Y., Mimura M., Maeshima M. und Washitani-Nemoto S. (2003):** Rapid increase of vacuolar volume in response to salt stress. *Planta* 216, 397-402.
- Morino K., Olsen O.-A. und Shimamoto K. (1999):** Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *Plant Journal* 17, 275-285
- Morish F.M. und Vasil I.K. (1989):** DNA methylation and Embryogenic Competence in Leaves and Callus of Napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schum.). *Plant Physiol.* 90, 37-40.
- Müller-Starck G. (1994):** Die Bedeutung der genetischen Variation für die Anpassung gegenüber Umweltstress. *Schweiz. Z. Forstwes.* 145(12), 977-997.
- Müller-Starck G. und Schubert R. (2000):** Genetic markers as a tool for bioindication in forest ecosystems. In: Young, Boshier und Boyle (Hrsg.): *Forest Conservation Ge-*

netics: Principles and Practice. CSIRO Publishing, Collingwood, Australia and CABI Publishing, Wallingford, UK, S. 227-237.

Müller-Starck G. und Schubert R. (2001): Genetic Response of Forest Systems to Changing Environmental Conditions. Vol. 70, 363 S. Kluwer Academic Publishers Dordrecht, Boston, London. pp. 363

Munir J., Dorn L.A., Donohue K., und Schmitt J. (2001): The effect of maternal photoperiod on seasonal dormancy in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). Am. J. Botany 88(7), 1240-1249.

Murashige T. und Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15, 473-497.

Nageisky B. (1999): Identifizierung von Genen aus einer elicitor-induzierten cDNS Bibliothek der Gemeinen Fichte [*Picea abies* (L.) Karst.]. Diplomarbeit, Technische Universität München.

Nagy N.E., Fossdall C.G., Krokene P., Krekeling T, Lönneborg A. und Solheim H. (2004): Induced response to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. Tree Physiology 24, 505-515.

Nakamura T., Meierhoff K., Westhoff P. und Schuster G. (2003): RNA-binding properties of HCF152, an *Arabidopsis* PPR protein involved in the processing of chloroplast RNA. Eur J Biochem. 270(20), 4070-4081.

Narusaka Y., Narusaka M., Seki M., Ishida J., Nakashima M., Kamiya A., Enju A., Sakurai T., Satoh M., Kobayashi M., Tosa Y., Park P. und Shinozaki K: (2003): The cDNA Microarray Analysis Using an *Arabidopsis pad3* Mutant Reveals the Expression Profiles and Classification of Genes Induced by *Alternaria brassiciola* Attack. Plant Cell Physiol. 44(4), 377-387.

Neumann K., Dröge-Laser W., Köhne S. und Broer I. (1997): Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. Plant Physiology 115, 939-947.

- Neumüller A. (1994):** Beteiligung von Pilzen am Zweig- und Aststerben der Fichte im Revier Sonnenwald (Böhmerwald). Forstl. Schriftenr. Univ. Bodenkultur Wien 7, 171-190.
- Nikkanen T., Aronen T., Häggman H. und Venäläinen M. (2000):** Variation in pollen viability among *Picea abies* genotypes - potential for unequal paternal success. Theor. Appl. Genet. 101, 511-518.
- Oono Y., Seki M., Nanjo T., Narusaka M., Fujita M., Satoh R., Satou M., Sakurai T., Ishida J., Akiyama K., Iida K., Maruyama K., Satoh S., Yamaguchi-Shinozaki K. und Shinozaki K. (2003):** Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. The Plant Journal 34, 868-887.
- Osborn T.C., Kole C., Parkin I.A.P., Sharpe A.G. und Kuiper M (1997):** Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B.napa* and *Arabidopsis thaliana*. Genetics 146, 1123-1129.
- Owens J.N., Johnsen Ø., Dæhlen O.G. und Skrøppa T. (2001):** Potential effects of temperature on early reproductive development and progeny performance in *Picea abies* (L.) Karst. Scan. J. For. Res. 16, 221-237
- Paglia G. und Morgante M. (1998):** PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes. Molecular breeding 4, 173-177.
- Palauqui J.C. und Vaucheret H. (1995):** Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression: a comparative study of 38 combinations of transgenic loci. Plant Mol Biol 29, 149-159.
- Pliyev B.K. und Gurvits B.Y. (1999):** Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases: structure and functions. Biochemistry 64, 738-751.
- Pollanschütz J. (1995):** Bewertung von Verbiss und Fegeschäden. Hilfsmittel und Materialien. Mitt. FVBA Wien 169, 1-146.
- Quail P.H. (2002):** Phytochrome photosensory signalling networks. Nature Reviews Molecular Cell Biology 3, 85-93.

- Rein T., DePamphilis M.L. und Zorbas H. (1998):** Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes. *Nucleic Acids Research* 26 (10), 2255-2264.
- Riegel R. (2001):** Entwicklung molekulargenetischer Marker bei der Fichte (*Picea abies* (L.) Karst) und deren Anwendung für genetische Erhebungen in umweltbelasteten Populationen. Dissertation, Technische Universität München.
- Romano P.G.N., Horton P. und Gray J.E. (2004):** The *Arabidopsis* Cyclophilin Gene Family. *Plant Physiology* 134, 1268-1282.
- Sandermann H., Ernst D., Heller W. und Langebartels C.(1998):** Ozone: an abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends in Plant Science* 3(2), 47-50
- Sani H. und Ohashi Y. (1995):** Involvement of small GTP-binding proteins in defense signal-transduction pathways of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4138-4144.
- Saxe H., Cannell M.G.R., Johnsen Ø., Ryan M.G. und Vourlitis G. (2001):** Tree and forest functioning in response to global warming. *New Phytologist* 149, 369-400.
- Schlumbaum A., Mauch F., Vögeli U. und Boller T. (1986):** Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. *Nature* 324, 365-367.
- Schmidt A., Doudrick R.L., Heslop-Harrison J.S. und Schmidt T. (2000):**The contribution of short repeats of low sequence complexity to the large conifer genomes. *Theor. Appl. Genet.* 101, 7-14.
- Schmidt M. und Schneider-Poetsch H.A.W. (2002):** The evolution of gymnosperms redrawn by phytochrome genes: the gnetatae appear at the base of the gymnosperms. *Journal of Molecular Evolution* 54, 715-724.
- Schmidt-Vogt H. (1977):** Die Fichte. Band I. Taxonomie-Verbreitung-Morphologie-Ökologie-Waldgesellschaften. Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- Schmidt-Vogt H. (1986):** Die Fichte. Band II/I. Wachstum-Züchtung-Boden-Umwelt-Holz. Paul Parey, Hamburg, Berlin.
- Schopfer P. und Brennicke A. (1999):** Pflanzenphysiologie, 5.Aufl.. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York.

- Schramel P., Wendler I. und Knapp G. (1996):** Total digestion of silicate containing matrices (plants, soil, sludges) using a pressure ashing device with PFA-vessels. *Fresenius J. Anal. Chem* 356, 512-514.
- Schubert R. (2002):** Genomanalyse und DNA-Markerentwicklung als molekulare Werkzeuge zur Züchtung stresstoleranter Kulturpflanzen und Waldbäume inklusive Pathogendiagnostik. Kumulative Habilitationsschrift Technische Universität München.
- Schubert R., Manteuffel R., Eich J. und Häger K.-P. (2002):** Molecular characterization and evolution of cytosolic class II 17.0 kDA small heat-shock protein gene family from *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Science* 163, 1-12.
- Schubert R., Müller-Starck G. und Riegel R. (2001):** Development of EST-PCR markers and monitoring their intrapopulational genetic variation in *Picea abies* (L.) Karst. *Theoretical and Applied Genetics* 103, 1223-1231.
- Schütt P., Schuck H.J. und Stimm B. (1992):** Lexikon der Forstbotanik: Baum- und Straucharten, Waldpflanzen, Mikroorganismen, Ökosysteme. 1.Aufl.. ecomed, Landsberg/Lech.
- Scotti I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G. und Hedley P. (2000):** Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome* 43: 41-46.
- Servas R. (1968):** Investigations on the flowering and seed crop of *Picea abies*. *Commun. Inst. For. Fenn.* 67, 1-84.
- Sharrock R.A. und Quail P.H. (1989):** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes and Development* 3, 1745-1757.
- Sheldon C.C., Finnegan E.J., Rouse D.T., Tadege M., Bagnall D.J., Helliwell C.A., Peacock W.J. und Dennis E.S. (2000):** The control of flowering by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology* 3, 48-422.
- Sherman J.D. und Talbert L.E. (2002):** Vernalization-induced changes of DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome* 45(2), 253-260.

- Siljak-Yakovlev S., Cerbah M., Coulaud J., Stoian V., Brown S.C., Zoldos V., Jelenic S. und Papes D. (2002):** Nuclear DNA content, base composition, heterochromatin and rDNA in *Picea omorika* and *Picea abies*. Theor. Appl. Genet. 104, 505-512.
- Singal R. und Ginder G.D. (1999):** DNA Methylation. Blood 93(12), 4059-4070.
- Skrøppa T, Johnsen Ø. und Dietrichson J. (1995):** Effects of natural and artificial selection in Norway spruce. In: Baradat, Adams und Müller-Starck (Hrsg.): Population genetics and genetic conservation of forest trees. SPB Academic Publishing, Amsterdam, S. 453-458.
- Skrøppa T. (1994):** Growth Rhythm and Hardiness of *Picea abies* Progenies of High Altitude Parents from Seed Produced at Low Elevations. Silvae Genetica 43, 95-100.
- Skrøppa T., Nikkanen T., Routsalainen S. und Johnsen Ø. (1994):** Effects of sexual reproduction at different latitudes on performance of the progeny of *Picea abies*. Silvae Genet. 43, 297-303.
- Skrøppa, T. und Johnsen Ø. (1999):** Patterns of adaptive genetic variation in forest tree species; the reproductive environment as an evolutionary force in *Picea abies*. In: Mátyás (Hrsg.): Forest Genetics and Sustainability. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Soranzo N., Provan J. und Powell W. (1998):** Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. Mol. Ecol. 7, 1260-1261.
- Stoehr M., L'Hirondelle S. J., Binder W. und Webber J. O. (1998):** Parental environment aftereffects on germination, growth, and adaptive traits in selected white spruce families. Can. J. For. Res. 28, 418-426.
- Strassburger (1991):** Lehrbuch der Botanik für Hochschulen, 33.Aufl.. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York.
- Sturzenbaum S.R., Morgan A.J. und Kille P. (1999):** Characterisation and quantification of earthworm cyclophilins: identification of invariant and heavy metal responsive isoformes. Biochimica et Biophysica Acta 1489, 467-473.

- Sun W., Bernard C., van de Cotte B., van Montagu M. und Verbruggen N. (2001):** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27(5), 407-415.
- Sun W., van Montagu M. und Verbruggen, N. (2002):** Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1557, 1-9.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000):** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815.
- Tranbarger T.J. und Misra S. (1996):** Structure and expression of a developmentally regulated cDNA encoding a cysteine protease (pseudotzain) from Douglas fir. *Gene* 172(2), 221-226.
- Vierling E. (1991):** The Role of Heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiology Plant Mol Biology* 42, 579-620.
- Wagner I. und Capesius I. (1981):** Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochim. Biophys Acta* 654, 52-56.
- Walter C., Broer I., Hillemann D. und Pühler A. (1992):** High frequency, heat treatment-induced inactivation of the phosphinothricin resistance gene in transgenic single cell suspension cultures of *Medicago sativa*. *Mol Gen Genet* 235, 189-196.
- Wehmeyer N., Hernandez L.D., Finkelstein R.R. und Vierling E. (1996):** Synthesis of Small Heat-Shock Proteins Is Part of the Developmental Program of Late Seed Maturation. *Plant Physiology* 112(2), 747-757.
- Wei N. und Deng X.W. (2002):** The COP9 Signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 261-286.
- Yang S.F. (1989):** Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in relation to ethylene biosynthesis. In: Poulton, Romeo und Conn (Hrsg.): *Plant Nitrogen Metabolism. Rec. Adv. Phytochem.* Vol. 23. Plenum Press, New York, S. 263-287.
- Ye X.Y. und Ng T.B. (2000):** Mungin, a novel cyclophilin-like antifungal protein from the mung bean. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 273, 1111-1115.

- Zhu T. und Provart N.J. (2003):** Transcriptional responses to low temperature and their regulation in *Arabidopsis*. *Can. J. Bot.* 81(12), 1168-1174.
- Ziehe M., Hattemer H.H., Müller-Starck R. und Müller-Starck G. (2000):** Genetic Structures as indicators for adaptation and adaptational potentials. In: Mátyás (Hrsg.): *Forest Genetics and Sustainability*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. S.75-89.
- Zinser C., Ernst D. und Sandermann H. (1998):** Induction of stilbene synthase and cinnamyl alcohol dehydrogenase mRNAs in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. *Planta* 204, 169-176.
- Zluvova J., Janousek B. und Vyskot B. (2001):** Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. *Journal of Experimental Botany* 52(365), 2265-2273.

7 Anhang

Sequenzalignements

Alignment der Promotorregionen des Phytochrom-O-Gens von *P. abies* und des Phytochrom A Gens von *A. thaliana*. Die Promotorregion weist eine 38%ige Identität der Sequenzen auf.

```

ARA_PHYA_G : TCTTTTTTAACTATATATATTGAAGCTTGCTTCGATTGATTTCTGCTGGAGCTTACCA : 2100
PHYOALIGNE : -----GGTCGACCTGCAGCGCGCCGC : 21
PHYOSEQUEN : -----
                                     t   ctg   gc   c

ARA_PHYA_G : GCTAGCTACTGGTCTCACTCTTCTTACTGAAATTGATTCCTAACTTGAAGTTAATTTCTT : 2160
PHYOALIGNE : ACTAGTGATTAAGTCTAGTAGCAGAGACGTAAAGTTCATATCATTATTTT-CCAACCTGTTA : 80
PHYOSEQUEN : -----
          ctag  a t  gt  t           ac  aaa  t   t  t  a  t  t           aa  t  t

ARA_PHYA_G : AAAGCTATCCCTCTGTTGTCAATCAATACCCCTCTTGTCTTCTGCGATAATAAGGTTTGTAG : 2220
PHYOALIGNE : CATATCAGAGTTTGTGGCGTTTGATCAAGTGGCAATTAGAGGGACTTGGTCTTCTATCC : 140
PHYOSEQUEN : -----
          a   a   t  tgt  g   t  at   t   ttt  g  ga  t   g  tt  t  t

ARA_PHYA_G : GTCTCTTTCGATC---TGGCTTGATGTGTGTTTGTCTTACTCAACTTTTATAAGTGTGTG : 2277
PHYOALIGNE : ATGGTTCCTGACCTCATGGAAAATAAATCTAAAAATCACTGTACCTCGTGGAAAATAA : 200
PHYOSEQUEN : -----
          t   t   ga  c   tgg   at   t  t   tt  act  ac  t   t   a

ARA_PHYA_G : ATCATTATGAGAAGAAACATCCAATTAATTAATCCTATCCTTTTATCGCTTTTAACTCC : 2337
PHYOALIGNE : TTCTAAATGAAAAAAACCGGGTTTGTGTTTATCCATACAATGCTGGTCTGCGAAAGAA : 260
PHYOSEQUEN : -----
          tc   tga  aa  aa  c           tt  tt  atc   c  t           ct   aa

ARA_PHYA_G : TACGATTGCTTCCCTGTGGGACTTATGTTCTCTTTGAAAGGTATAGCTAGCTATAAA : 2397
PHYOALIGNE : AATCCTCCAAATCCCGATCATCTATATGATACCTCATCCGCATTTAGAGATCCACCCA : 320
PHYOSEQUEN : -----
          a   t           ttccc  t   ct  tat  t  cct  t           t  ag  a  c  a   a

ARA_PHYA_G : GACTCTTAAAGACTTTATTAT--TGAGTCTACTTTATAGTATCTAGCTGTCTTTGAATCTTG : 2455
PHYOALIGNE : AGTATGGTGAGATAAATTGCTCTGAAGCTGGTCACGACGCGATGGTGCCTAGCGTTTTTA : 380
PHYOSEQUEN : -----
          t   gag  t  att           tga  ct  t           g  g  tg  gt   t  tt

ARA_PHYA_G : AGAGGCTGATATTAGCTCAGATCCTCGTTTTGTTAGTATTTGTGTAGTGATTTACCTTG : 2515
PHYOALIGNE : ATCAGTGTGTCGGGGGTGGGTGCCACCTATTCCTCTTGGAAGGGCAGAGAGGACATC : 440
PHYOSEQUEN : -----
          a   g   t   g   g   c   t  tt           ttg  g  ga   c  t

ARA_PHYA_G : TTAACATCAACTATTATT-TGTCGACTTGTTCATAGTCAAGATGTTGTTGATTTTGG : 2574
PHYOALIGNE : TGAAGGGGAGGTGACAGTGGCGGTCAGTTGGTTGTATTTAT-ACGAAAACAACATCTGA : 499
PHYOSEQUEN : -----
          t  aa           a   t   g  g  a  ttggTtgTAtTtAt  AcGaaaacaAcaTctGA
    
```

Vollständiges Alignment der Phytochrom Sequenzen aus *P. abies* (PHYO) und *A. thaliana* (PHYA), Start und Stop-Codon sind jeweils markiert. Die Sequenzen weisen 51% identische Basen auf.

```

                2520                                *
ARA_PHYA_GEN : AGTGGATTTACCCTGTTAACTATCAACTATTATTGTTGCGACTTGTTCAT : 2550
PHYOSEQUENCE : -----TCTTGTATTTATACGA : 16
                TGT  A  TT  T  C

                2560                                *                                2600
ARA_PHYA_GEN : AGTCAAGATGTTGTTGATTT--TGGATTGTAGGATGACTTAGAAAGGAAG : 2598
PHYOSEQUENCE : AAACAACAT-CTGATGATGCCGTGCATTTTAGCAT---TTGGGATTGTGT : 62
                A  CAA  AT  TG  TGAT  TG  ATT  TAG  AT  TT  G  A  G

                *                                2640
ARA_PHYA_GEN : TGTTCATGGAATCTAGCTGTTTTCAGTTACTTTGAAAATGATAAATCAT-T : 2647
PHYOSEQUENCE : CGTTTTT----TCTGACCTGGCCAGGTGGT---GGTGCCTAGATTCTCT : 105
                GTT  T  TCT  C  G  CAG  T  T  G  TA  AT  T  T

                *                                2680                                *
ARA_PHYA_GEN : GAACCTTGGAAATATGACACGATGATTCTTGCATCTGTTGCGTCTGTTTCT : 2697
PHYOSEQUENCE : GCACTTTTGGGAGTAATAAG--CATTGGTCCA-CTGAGAGGCCGATCAGG : 152
                G  AC  TT  G  T  A  A  G  ATT  T  CA  CTG  G  C  T

                2720                                *
ARA_PHYA_GEN : GG--GTTTAGCTATGTATTCTCGATGGAGTTAGTCAAGTTCATAACTCTT : 2745
PHYOSEQUENCE : GGAAGAAAAAGCATAAGAGCAAGAAGAGCAGAGCAGGCTTGCAAATAT : 202
                GG  G  A  AT  C  GA  GAG  CA  G  T  AA  T  T

                2760                                *                                2800
ARA_PHYA_GEN : TTTACTGTGTGTTTGAATTCGAAATGGTTCTTAGTGTTCCTCAAGTTTAT : 2795
PHYOSEQUENCE : TATTACTTGTATCTTAAATTC AATCC TGTTCTGCAGATTATCATTACCTGT : 252
                T  T  TGT  T  T  AAATTC  TG  TT  T  T  T  T  T  T

                *                                2840
ARA_PHYA_GEN : GCTTATGCATTCGCTTGTATGACTGGGTGATGAATGTTTTTGTGTTCAATAT : 2845
PHYOSEQUENCE : ATCT-TAAATTCATTCCTGAGAGTGCCATGAATGAAAAAGAAAATCTAT : 301
                T  T  ATTC  T  T  GA  TG  ATGAATG  G  TAT

                *                                2880                                *
ARA_PHYA_GEN : GATTATGGCATGAATGTTTATTTCCCTCTTTTATCAGAGTTTGCACCTTA : 2895
PHYOSEQUENCE : AATTA-AGCAAAGGGGTTAAGTGTGT-----AGGTTTGCAGCAATAA : 342
                ATTA  GCA  GTT  T  T  AG  TT  GCA  T  A

                2920                                *
ARA_PHYA_GEN : TTTTTTGTGTCTTGTCTCTGTGTCAGGAAAAAATGTCAGGCCTCTAGGC : 2945
PHYOSEQUENCE : -----GATGCTACTACTCGTCCAAGAGCGGCAAGC---ATTCTGCTT : 383
                G  TGTCT  T  GT  AG  AA  G  TCT

                2960                                *                                3000
ARA_PHYA_GEN : CGACTCAGTCCCTCTGAGGGCTCAAGCGCATCAAGGCACAGCGCTAGGATC : 2995
PHYOSEQUENCE : CCAGCGGGTCT---TGTGAGC---AGATCATCGAAAACACAGTGCAAGGGTA : 427
                C  A  GTC  TG  G  GC  AG  ATC  A  CACAG  GC  AGG  T

                *                                3040
ARA_PHYA_GEN : ATTGCGCAGACCACTGTAGATGCGAAACTCCATGCTGATTTTGAGGAGTC : 3045
PHYOSEQUENCE : ATTACCAGACACCAGTAGATGCGAAGCTCCAGGCAAGAGTTTGAGGGGTC : 477
                ATT  C  CAGAC  C  GTAGATGCGAA  CTCCA  GC  GA  TTTGAGG  GTC

                *                                3080                                *
ARA_PHYA_GEN : AGGCAGCTCCTTTGATTACTCAACCTCAGTCCGTGTCACTGGCCCCGGTTG : 3095
PHYOSEQUENCE : TGTGCATTCGTTTACTACACAAAATCGATCGATATATCGGG-----A : 520
                G  TC  TTTGA  TAC  CAA  TC  T  T  T  C  GG

```

ARA_PHYA_GEN : TGGAGAATCAGCCACCAAGGTCTTGACAAAGTTACCACGACTTATCTTCAT : 3145
 PHYSEQUENCE : GATAGCAGCAGCGTTCCA--TCTGAGACAGTGAA---GGCATACCTGCAA : 565
 AG A CAGC C A TCTGA A AGT A G C TA CT CA

ARA_PHYA_GEN : CATAATACAGAAGGGAAAGCTGATTACGCCCTTCGGTTGTTTACTTGCCTT : 3195
 PHYSEQUENCE : CGGCTGCAGAAGGAGATGCTGATTACGCCATTTGGGTGTGTGCTTGCCTT : 615
 C T CAGAAGG A GCTGATTACGCC TT GG TGT T CTTGC T

ARA_PHYA_GEN : GGATGAGAAGACCTTCAAAGTTATTGCATACAGCGAGAATGCATCTGAGC : 3245
 PHYSEQUENCE : GGAGGAGGGGAGCTGTGCAGTGGTGGGGTACAGTGAGAATGCCCTGAGA : 665
 GGA GAG GA CT AGT T G TACAG GAGAATGC CTGAG

ARA_PHYA_GEN : TGTTCACAATGGCCAG-----CCATGCAGTTCCTAGTGTGGCGAACAC : 3289
 PHYSEQUENCE : TGCTGGATGTTGTTGGTGGTGCCTATGCGGTGCCGAGCATCGGGGGGAG : 715
 TG TG T G G CCATGC GT CC AG T GG G CA

ARA_PHYA_GEN : CC-----TGTTCAGGCAATTGGGACAGA : 3312
 PHYSEQUENCE : CAACAGGAAGGGGTGGCGGTGGCGGGGCCCTTCTGAGCAATTGGTATGGA : 765
 C TTCT G ATTGG A GA

ARA_PHYA_GEN : TATAAGGAGTCTTTTCACTGCTCCTAGTGCCCTCTGCATGTCAGAAAGCCC : 3362
 PHYSEQUENCE : TGCTCGGACACTTTTCAAGCCTGCAAGTGCCCGCTGCCCTGCAGAAAGCTG : 815
 T GGA CTTTTCA CT C AGTGCC CTGC TGCAGAAAGC

ARA_PHYA_GEN : TTGGATTTGGAGATGTCTCTCTTTTGAATCCCATTCCTTGTGCACCTGCAGG : 3412
 PHYSEQUENCE : CCACCTTCGCGGACATGCACCTTGTGAACCCAATATTCGTCCGTTGCAAT : 865
 TT G GA T CTT TGAA CC AT T GT C TGCA

ARA_PHYA_GEN : ACTTCTGCAAAGCCCTTTTATGCGATTATCCACAGGGTTACAGGGAGCAT : 3462
 PHYSEQUENCE : CGCTCTGTTAAGCCCTTCTATGCAATTTCTAACAGAAATAGATGCAGGGTT : 915
 TCTG AAGCCCTT TATGC ATT T ACAG T G G T

ARA_PHYA_GEN : CATCATCGACTTTGAACCCTGTGAAGCCTTATGAAGTCCCATGACAGCTG : 3512
 PHYSEQUENCE : GGTTCATAGACTTTGAGCCTGTGATGCCTTCCGATGTGCCGGTATCTGCCG : 965
 TCAT GACTTTGA CC GTGA GCCTT GA GT CC T C GC G

ARA_PHYA_GEN : CTGGTGCCTTACAATCATAACAAGCTCGCTGCCAAAGCAATCACTAGGCTG : 3562
 PHYSEQUENCE : CTGGTGCACCTGCAGTCATAACAAGCTGCTGCCAAAGCAATTTCTCGCTTG : 1015
 CTGGTGC T CA TCATAACAAGCT GCTGCCAA GCAAT CT G TG

ARA_PHYA_GEN : CAATCTTTACCCAGCGGGAGTATGGAAGGCTTTGTGATACAATGGTTCA : 3612
 PHYSEQUENCE : CAGTCTCTGCCCGGTGGAGATATTCGGTTGTTGTGTGACACTGTGGTCA : 1065
 CA TCT T CCC G GG TAT G T TGTGA AC TGGT CA

ARA_PHYA_GEN : AGAGGTTTTTGAAGTACAGGGGTATGACAGGGTGATGGCTTATAAGTTTC : 3662
 PHYSEQUENCE : GGAGGTGCGGGAGCTTACTGGGTATGACCCTGTGATGGCATATCGATTTC : 1115
 GAGGT GA CT AC GGGTATGAC G GTGATGGC TAT TTTC

```

                                3720                                *
ARA_PHYA_GEN : ATGAAGATGATCACGGTGAGGTTGTCTCCGAGGTTACAAAACCTGGGCTG : 3712
PHYOSEQUENCE : ACGAAGATGAACACGGTGAGGTTAGTTGCAGAGATGAGAAGACCTGATCTG : 1165
                A GAAGATGA CACGGTGAGGT GT C GAG T A AA ACCTG CTG

                                3760                                *                                3800
ARA_PHYA_GEN : GAGCCTTATCTTGGGCTGCATTATCCTGCCACCGACATCCCTCAAGCAGC : 3762
PHYOSEQUENCE : GAGCCTTATTTGGGCTGCATTATCCTGCCACTGATATCCCCAGGCTTC : 1215
                GAGCCTTAT T GG CTGCATTATCCTGCCAC GA AT CC CA GC C

                                *                                3840
ARA_PHYA_GEN : CCGTTTTCTGTTTATGAAGAACAAGGTCGGATGATAGTTGATTGCAATG : 3812
PHYOSEQUENCE : CAGTTTTTTATTATCATGAAGAACAAGAGTGAGAATGATTTGCGATTGTTGTG : 1265
                C G TTT T TT ATGAAGAACA GT G ATGAT GATTG TG

                                *                                3880                                *
ARA_PHYA_GEN : CAAAACATGCTAGGGTGCTTCAAGATGAAAAGCTTTCCTTTGACCTTACC : 3862
PHYOSEQUENCE : CCCCTCCTGTGAATGTAATCCAAGACAAACGGTTGCGCCAGCCTTTGAGC : 1315
                C C TG A GT T CAAGA AA G T C T A C

                                3920                                *
ARA_PHYA_GEN : TTGTGTGGCTCCACCCTTAGAGCACCGCACAGCTGCCATTTGCAGTACAT : 3912
PHYOSEQUENCE : TTGTGTGGCTCCACACTGCGGGCACCTCATGGCTGCCATGGCAGTACAT : 1365
                TTGTGTGGCTCCAC CT G GCACC CA GCTGCCAT GCAGTACAT

                                3960                                *                                4000
ARA_PHYA_GEN : GGCCAACATGGATTCAATTGCATCTCTGGTTATGCGGGTGTAGTTAAGC : 3962
PHYOSEQUENCE : GGCCAACATGGGTTCCATTGCATCTCTGGTGATGTCAGTGACGACAAATG : 1415
                GGCCAACATGG TTC ATTGCATCTCTGGT ATG C GT AA G

                                *                                4040
ARA_PHYA_GEN : AGGAAGATGGAGAAGGGGATGCTCCTGATGCTACTACAAGCCTCAAAAG : 4012
PHYOSEQUENCE : AGAATGGCGATGACAGTGAAGGAGGTG--GGCAGCA-GCAGCCGAGAAC : 1462
                AG A G G GA G GA G TG G A A CAGCC CA AA

                                *                                4080                                *
ARA_PHYA_GEN : AGAAAGAGACTATGGGGTTTGTAGTGGTTTGTCAACAATACGACTCCGAGGTT : 4062
PHYOSEQUENCE : AGAAGGAAGCTTTGGGGTCTCGTGGTTTGCATCACACAAGTCCACGGGT : 1512
                AGAA GA CT TGGGGT T GTGGTTTGT CA A AC A TCC GG T

                                4120                                *
ARA_PHYA_GEN : TGTTCATTTCCTCTCAGGTATGCCTGTGAGTTTCTAGCTCAAGTCTTTTG : 4112
PHYOSEQUENCE : TATCCCCTTCCTTTGAGGTATGCCTGTGAAATTTCTGATGCAAGTCTTTTG : 1562
                T T CC TT CCT T AGGTATGCCTGTGA TTTCT CAAGT TTTG

                                4160                                *                                4200
ARA_PHYA_GEN : CCATACACGTCATAAAGGAGGTGAACTCGATAACAGATGTTGGAGAAG : 4162
PHYOSEQUENCE : GAATTCAGCTAAACAAGGAGGTTGAATTAGCCGCTCAGTTGAGGAGAAA : 1612
                AT CA T AA AAGGAGGT GAA T G CAG TG GGAGAA

                                *                                4240
ARA_PHYA_GEN : AACATTTTGGGCACGCAGACACTCTGTGTCGATATGCTGATGCGTGATGC : 4212
PHYOSEQUENCE : CATATCTTACGCGTGAACCTGTGCTCTGCGATATGCTTCTTCGTGATGC : 1662
                A AT TT CGC GCA C T T TGCGATATGCT T CGTGATGC

                                *                                4280                                *
ARA_PHYA_GEN : TCCACTGGGTATTGTGTGCGAAAGCCCAACATAATGGACCTTGTCAAAT : 4262
PHYOSEQUENCE : ACCTGTGGGATCGTGTCTCAGACTCCCAACATATGGACCTTGTCAAAT : 1712
                CC T GG AT GTGTC CA A CCCAACAT ATGGACCTTGT AAAT

```

```

                                4320                                *
ARA_PHYA_GEN : GTGATGGAGCAGCTCTCTTGTATAAAGACAAGATATGGAAAC TGGGAACA : 4312
PHYOSEQUENCE : GTGACGGGGCTGCCTTATTATATGGGAAACGCCTTTGGCTCTTGGGGACC : 1762
                GTGA GG GC GC T TT TAT A T TGG TGGG AC

                                4360                                *                                4400
ARA_PHYA_GEN : ACTCCAAGTGAGTTCACCTGCAGGAGATAGCTTCA TGGT TGTGTGAATA : 4362
PHYOSEQUENCE : ACTCCTACTGAGGCTCAGATACTGGACATTGCAGATTGGCTCCTCAGCA : 1812
                ACTCC A TGAG CA T C GGA AT GC TGG T GA A

                                *                                4440
ARA_PHYA_GEN : CCACATGGATTCAACGGGTTTGAGCACTGATAGTTTGCATGACGCCGGGT : 4412
PHYOSEQUENCE : CCACAGAGATTCCACTGGTTTGAGTACCGACAGTCTTGCAGAAGCAGGCT : 1862
                CCACA GATTC AC GGTTTGAG AC GA AGT T GA GC GG T

                                *                                4480                                *
ARA_PHYA_GEN : TTCCTAGGGCTCTATCTCTCGGGGATTTCGGTATGTGGGATGGCAGCTGTG : 4462
PHYOSEQUENCE : ATCCAGGAGCTGCATCACTAGGTGATGCCAGTTTGTGGAATAGCTGCTGCC : 1912
                TCC G GCT ATC CT GG GAT C GT TGTGG AT GC GCTG

                                4520                                *
ARA_PHYA_GEN : AGGATATCATCGAAAGACATGATTTCCTGGTTCCTTCTCATACCGCTGG : 4512
PHYOSEQUENCE : AGAATTACTTCCAAAGACTTCTTATTTTGGTTCAGTCTCACAACAGCGAA : 1962
                AG AT C TC AAAGAC T T TT TGGTTC G TCTCA AC GC

                                4560                                *                                4600
ARA_PHYA_GEN : TGAAGTGAGATGGGGAGGTGCGAAGCATGATCCAGATGATAGGGATGATG : 4562
PHYOSEQUENCE : AGAAATAAATATGGGGAGGTGCTAAAACATGATCCCAATGATAAAGATGATG : 2012
                GAA T A ATGGGGAGGTGC AA CATGATCC ATGATA GATGATG

                                *                                4640
ARA_PHYA_GEN : CAAGGAGAATGCACCCAAAGTTCATCGTTCAAGGCTTTCCTTGAAGTGGTC : 4612
PHYOSEQUENCE : GCAGGAGAATGCACCCTCGGTTCATCATTCAAAGCATTCCTTGAAGTGGTC : 2062
                AGGAGAATGCACCC GGTTCATC TTCAA GC TTCCT GAAGTGGTC

                                *                                4680                                *
ARA_PHYA_GEN : AAGACAAGGAGTTTACCTTGGAAAGGACTATGAGATGGATGCCATACACTC : 4662
PHYOSEQUENCE : AAAAGGCCAAGTCTTTCCTTGGGAGGATGTTGAGATGGATGCCATCCATTC : 2112
                AA A G AGT T CTTGG AGGA TGAGATGGATGCCAT CA TC

                                4720                                *
ARA_PHYA_GEN : CTTGCAACTTATTTTGGAGGAATGCTTTCAAGGATACTGAAACTACTGATG : 4712
PHYOSEQUENCE : GTTGCAGCTGATTCTCAGGATTTCCTTTCATGATATGATGACAGTGAC- : 2161
                TTGCA CT ATT T AGG AT C TT A GATA TGA A TGA

                                4760                                *                                4800
ARA_PHYA_GEN : TGAATACAAAGGTCATTTACTCGAAGCTAAATGATCTCAAAATTGATGGT : 4762
PHYOSEQUENCE : --AGCAAAACCATGATACATGCACGGCTAAATGACTTGAGGCTTCAAGGA : 2209
                A A AA T AT A C GCTAAATGA T A TT A GG

                                *                                4840
ARA_PHYA_GEN : ATACAAGAACTAGAAGCTGTGACCAGTGAGATGGTTCGTTTAATTGAGAC : 4812
PHYOSEQUENCE : ATAGATGAAC TAAGTGCAGTGACAAAATGAGATGGTACCGTTTAATTGAAAC : 2259
                ATA A GAACTA GC GTGAC A TGAGATGGT CG TTAATTGA AC

                                *                                4880                                *
ARA_PHYA_GEN : TGCTACGGTGCCAATATTGGCGGTTGATTCTGATGGACTGGTTAATGGTT : 4862
PHYOSEQUENCE : TGCAACTGTGCCAATTTTGGCAATCGATTCTAATGGACTGGTTAATGGAT : 2309
                TGC AC GTGCCAAT TTGC T GATTCT ATGGACTGGT AATGG T

```

```

                                4920                                *
ARA_PHYA_GEN : GGAACACGAAAATTGCTGAGCTGACTGGTCTTTCGGTTGATGAAGCAATC : 4912
PHYOSEQUENCE : GGAATACTAAAGCAGCTGAACTCACAGGGTTGTTGGCTGATGAAGTTATA : 2359
                GGAA AC AAA      GCTGA CT AC GG  T T GG TGATGAAG  AT

                                4960                                *                                5000
ARA_PHYA_GEN : GGAAGCATTTCCTCACACTTGTTGAAGATCTTCAGTGGAAATCGTTAA : 4962
PHYOSEQUENCE : GGGAGGCCCTTTAATTGATCTTGTTGAGCATGACTCGGTTGAAATCGTGAA : 2409
                GGA GC TTT  T      CTTGTT A  AT      TC GT GAAATCGT AA

                                *                                5040
ARA_PHYA_GEN : AAGGATGCTAGAGAACGCATTAGAAGGTAAACTCTCTTCCTAAGTTATGC : 5012
PHYOSEQUENCE : AAAGATGCT----- : 2418
                AA GATGCT

                                *                                5080                                *
ARA_PHYA_GEN : TGAGTTTGCTAAGAATCTTCACTAGATTTCACTATTCAAGTCCAATT : 5062
PHYOSEQUENCE : -----CTACTTGGCTTTGCAA----- : 2434
                                C ACT G  TT  C A

                                5120                                *
ARA_PHYA_GEN : GAGTATCGTGGTCAAGAAACTTGATGCAATGTGTTGTTTTGGTTCTTA : 5112
PHYOSEQUENCE : -----GGGAA GAAGAA-----CAA-----A : 2450
                G GG  GAAGAA      CAA      A

                                5160                                *                                5200
ARA_PHYA_GEN : ATGATGGAATTTTGTGTTTCCAATTTTATCAAACACTGAAGCCGAGTCTAT : 5162
PHYOSEQUENCE : ATGTTGAAAT-----CAAAC TCAAAA----- : 2471
                ATG TG AAT      CAAAC C  AA

                                *                                5240
ARA_PHYA_GEN : AACTTCACTTGCTTATCTATGCAGGAAGTGAAGGAGCAGAATGTCCAGTTT : 5212
PHYOSEQUENCE : -----CATTTG-----CATA CAGGA-----GGAGAAG----- : 2494
                CA TTG      AT CAGGA      GGAG AG

                                *                                5280                                *
ARA_PHYA_GEN : GAGATCAAGACACATCTGTCCAGGGCTGATGCTGGGCCAATAAGTTTACT : 5262
PHYOSEQUENCE : -----GGACCAGTTGTTTTAAT : 2511
                                GG CCA T  TTTA T

                                5320                                *
ARA_PHYA_GEN : TGTAAATGCATGCGCAAGTAGAGATCTCCATGAAAACGTGGTTGGGGTGT : 5312
PHYOSEQUENCE : TGTAAATGCATGCTCAAGCAGGGACTGGAGGAAAATGTGGTGGGAGTGT : 2561
                TGT AATGCATGC CAAG AG GA CT  A GAAA GTGGT GG GTGT

                                5360                                *                                5400
ARA_PHYA_GEN : GTTTTGTAGCCCATGATCTTACTGGCCAGAAAGACTGTGATGGACAAGTTT : 5362
PHYOSEQUENCE : GTTTTGTTGCTCAAGATGTGACGTGGCAAAGGATAGCGATGGATAAGTTC : 2611
                GTTTTGT GC CA GAT T AC  G CA A GA  G GATGGA AAGTT

                                *                                5440
ARA_PHYA_GEN : ACGCGGATTGAAGGTGATTACAAGGCAATCATCCAAAATCCAAACCCGCT : 5412
PHYOSEQUENCE : ACTCATCTTCAAGGCGATTACAGGGCCATAGTTTCAAGAAATCCCAATCCTTT : 2661
                AC C  TT AAGG GATTACA GGC AT  T CA AATCC AA CC  T

                                *                                5480                                *
ARA_PHYA_GEN : GATCCCGCCAATATTTGGTACCGATGAGTTTGGATGGTGCACAGAGTGGA : 5462
PHYOSEQUENCE : AATACCTCCCATATTTGGAGCAGATGAATACGGATACTGCTCCGAGTGGA : 2711
                AT CC CC ATATTTGG  C GATGA T  GGAT  TGC C GAGTGGA

```

```

                                5520                                *
ARA_PHYA_GEN : ATCCAGCAATGTCAAAGTTAACCGGTTTGAAGCGAGAGGAAGTGATTGAC : 5512
PHYOSEQUENCE : ATCCAGCAATGGAAAAGTTGACAGGATGGAAAAGGAGGAGGTAATTGGT : 2761
ATCCAGCAATG AAAGTT AC GG T GAA G GAGGA GT ATTG

                                5560                                *                                5600
ARA_PHYA_GEN : AAAATGCTCTTAGGAGAAGTATTTTGGGACCGAGAAGTCATGTTGTCGTCT : 5562
PHYOSEQUENCE : AAAATGCTTGTGGGAGAGGTTTTTGGTATTTCATCGAATGAGTTGCCAACT : 2811
AAAATGCT T GGAGA GT TTTGG A CA GTTG C CT

                                *                                5640
ARA_PHYA_GEN : AAAGAATCAAGAAGCCTTTGTAAACCTTGGATTGTGCTGAACAATGCTG : 5612
PHYOSEQUENCE : CAAAGGTCAGGATGGATTAACAAGCTCAGGATACTACTGAATAATGCAA : 2861
AA TCA GA G TT AAA CT GGAT GT CTGAA AATGC

                                *                                5680                                *
ARA_PHYA_GEN : TGACCAGTCAAGATCCAGAGAAAGTATCGTTTGCTTTCTTTACAAGAGGT : 5662
PHYOSEQUENCE : TGGCAGGGAAAGAGACAGAAAAATTTCTTTTCTTTTATTTGATCGCCAT : 2911
TG C G AAGA CAGA AAA T C TTT C TT TTT G T

                                5720                                *
ARA_PHYA_GEN : GGCAAGTATGTGGAGTGTCTGTTGTGTTGTGAGTAAGAACTGGACAGGGA : 5712
PHYOSEQUENCE : GGTAAGAATACAGAAGCGTTGTTATCTGCAAAACAAAAGAACAGATGCAGA : 2961
GG AAG AT GA TGTT T TG A AA A A GA GA

                                5760                                *                                5800
ARA_PHYA_GEN : AGGTGTAGTGACAGGTGTCTTCTGTTTTCTTGCAACTTGCCAGCCATGAGC : 5762
PHYOSEQUENCE : GGAATAATCACTGGAGTATTCTGTTTTTTGCACTTACTAGTACAGAGC : 3011
GG TA T AC GG GT TTCTGTTT TGCA TT C AG GAGC

                                *                                5840
ARA_PHYA_GEN : TGCAGCAAGCGCTCCATGTTCAACGTTTAGCTGAGCGAACCGCAGTGAAG : 5812
PHYOSEQUENCE : TTCAACAAGCATTGCAGGTTCAACGCATGGCAGAACAGGCAGCTATGGAT : 3061
T CA CAAGC T CA GTTCAACG T GC GA C C GC TG A

                                *                                5880                                *
ARA_PHYA_GEN : AGACTAAAGGCTCTAGCATAACATAAAAAGACAGATCAGCAATCCGCTATC : 5862
PHYOSEQUENCE : AGACTTAAGGAATTAGCATAACATTCGGCAGGAAATAAGAAATCCACTATA : 3111
AGACT AAGG TAGCATAACAT A AT AG AATCC CTAT

                                5920                                *
ARA_PHYA_GEN : TGGGATCATGTTTACAAGGAAAATGATAGAGGGTACTGAAATTAGGACCAG : 5912
PHYOSEQUENCE : TGAATCATATTCACTCGAAAATGATGGAAGTACTGATTTGAGTGAAG : 3161
TGG ATCAT TT AC G AAA TGAT GA GTACTGA TT G AG

                                5960                                *                                6000
ARA_PHYA_GEN : AGCAAAGACGGATTTTGCAAACCTAGCGGTTATGTCAGAAGCAACTAAGC : 5962
PHYOSEQUENCE : AACAGAAGCAAATTGTGCAAACGAGTGCATTATGTCACCGCAGTTGGTA : 3211
A CA A C ATT TGCAAAC AG GC TTATGTCA GCA T

                                *                                6040
ARA_PHYA_GEN : AAGATCCTCGATGATTCGGATCTTGAAAGCATCATTGAAGGGTATGCTAG : 6012
PHYOSEQUENCE : AAGGTTCTTGATGATGCAGACCTAGAAAGCAT-----AGAGGATG----- : 3251
AAG T CT GATGAT C GA CT GAAAGCAT AG G ATG

                                *                                6080                                *
ARA_PHYA_GEN : AATGAAAGTCCATTTAAAATATGGTTTATCTGTGTTCTTATGTTGGAATT : 6062
PHYOSEQUENCE : ----- : -

```

```

                                6120                                *
ARA_PHYA_GEN : TGACTGTGCAGATGCTTGGATTGGGAAATGAAAGAAATTCACCTTAAATGA : 6112
PHYOSEQUENCE : -----GATATTTGGAACCTGGACACGATAGACTTTACTTTGGGGAC : 3291
                                GAT TTGGA TGG A GA AGA TT AC TT

                                6160                                *                                6200
ARA_PHYA_GEN : AGTGTTGACTGCTTCCACAAGTCAAGTAATGATGAAGAGTAACGGAAAGA : 6162
PHYOSEQUENCE : AGTACTTGATGTCAGTTGTAAGTCAGGGAATGATCTAAGCAGGGAGAAGG : 3341
                                AGT T TGC AAGTCA G AATGAT AG A G AAG

                                *                                6240
ARA_PHYA_GEN : GTGTTCCGATAACAATGAGACCGGA GAAGAAATAATGCTGACACTTTG : 6212
PHYOSEQUENCE : GTTTGCAGCTGATACGTGATTACCTGAAGAAATTAACAATGTGCCTC : 3391
                                GT T C G T A A TGA C GAAGAA T A C T

                                *                                6280                                *
ARA_PHYA_GEN : TATGGAGACAGTATTAGGCTTCAA CAAGTCTTGCCAGATTTCATGCTGAT : 6262
PHYOSEQUENCE : TATGGTGAATCAGTTGAGGCTTCA CAAATTTTGTCAAATTTTGTGATAAA : 3441
                                TATGG GA T AGGCTTCA CAA T TTG CA ATTT TG T A

                                6320                                *
ARA_PHYA_GEN : GGCTGTAAACTTTACACCATCCGGAGGTCAGCTAACTGTTTCAGCTTCCC : 6312
PHYOSEQUENCE : TGCATTGAGGTTCTCTACATC----- : 3462
                                GC T A TT C CATC

                                6360                                *                                6400
ARA_PHYA_GEN : TGAGGAAGGATCAGCTCGGGCGTTCTGTGCATCTTGCTAATCTAGAGATC : 6362
PHYOSEQUENCE : ---AGAAGGATGGGTTGGG----- : 3478
                                GAAGGAT G T GG

                                *                                6440
ARA_PHYA_GEN : AGGTAA AATAGATATATTTCA TAATCAGAAATGCATAATATGATGT TAAAAA : 6412
PHYOSEQUENCE : -----AATAAGGTTGTTCTA-CTAAAAGGCAT-----CTAGGAA : 3512
                                AATA T TTC TA A AA GCAT TA AA

                                *                                6480                                *
ARA_PHYA_GEN : CAGTGCATTGAGGATATTGGGATATATGAAAA-CAGCTTAACGCATACCGG : 6461
PHYOSEQUENCE : ---GTGGTGTGAATGTTATGCATATGGAATT CAGGATTACTCATT CAGG : 3558
                                G TG G AT TT G TATG AA CAGG T AC CAT C GG

                                6520                                *
ARA_PHYA_GEN : AGCTGGGATACCTGAGTTT TAC TAAACC AAAATGTTTGGGACTGAGGAAG : 6511
PHYOSEQUENCE : ACAAGGGATTCCCGAAGAAATTGATAAAGGAAAATGTTGTTTCATAACCAAG : 3608
                                A GGGAT CC GA TT TAAA AAATGTTT G T A AAG

                                6560                                *                                6600
ARA_PHYA_GEN : ATGTGT CAGAAGAAGGATTGAGCTTAATGTTAGCCGGAAACTGGTGAAG : 6561
PHYOSEQUENCE : ATATGTTTCAGGAGGGTTTGGGACTGTATATGTGTCAGCAGCTAGTCAAA : 3658
                                AT TGT A GA GG TTG G T T G C G A CT GT AA

                                *                                6640
ARA_PHYA_GEN : CTGATGAATGGAGATGTT CAG TACTTGAGACAAGCTGGGAAATCAAGTTT : 6611
PHYOSEQUENCE : ATTATGAATGGAGATGTGCAATACCTCAGGGAAGCGGCAGGTCGTCTTT : 3708
                                T ATGAATGGAGATGT CA TAC T AG AAGC GG A TC TTT

                                *                                6680                                *
ARA_PHYA_GEN : CATTATCACTGCCGAACTCGCTGCAGCAAAA CAAGTAGTCCC CAAAAGAAA : 6661
PHYOSEQUENCE : TATCATTAAATGTTGAGTTTCTTTAGCGCA-AACTGACAAGCAATAGAAG : 3757
                                AT AT A TG GA T CT AGC A AA T CAA AGAA

```

```

                                6720                                *
ARA_PHYA_GEN : AGGGGTCTGGCTTGATATAAAATAGTCACTGGTTGTTCTTTG--CTTGTA : 6709
PHYOSEQUENCE : CATTTCCTTCTGCTACATAAAGAAACGTGCGATTTCCTTTTGGCCTTGTC : 3807
                   CT      A ATAAA  A      G TT      TTTG  CTTGT

                                6760                                *                                6800
ARA_PHYA_GEN : A--CTTTCCTTATCGCTTTTGT TTTTCGTTTT--CAAATTT CAGTAACGA : 6754
PHYOSEQUENCE : AACACTAAAGCCAGCATCTTGC TTTCTATTTTGT TTAATTTTACAAT-- : 3855
                   A   CT      A C   TT   TTT   TTTT   AATTT   AA

                                *                                6840
ARA_PHYA_GEN : TGAATATCCATCCATTTACATCTTCTGTTGAACCTC--TTTTC TGAAGCT : 6802
PHYOSEQUENCE : TTAAAGGTTGAGTAGTCCCGGTATCTTAGAAGAGTTAATTTACTTGAATCT : 3905
                   T AAA  T  A   T      T T   T      A T   TT   TGAA CT

                                *                                6880                                *
ARA_PHYA_GEN : GTAAA--TATGGATGCA--TATCTAATCTCCTCCTGAGTGT TTTTGGTTTCA : 6849
PHYOSEQUENCE : GTAGAGTTAAAGCAGCAATTT CAGGTGTGATCTTTGTAAATTTTATGAATC : 3955
                   GTA  A   TA  G   GCA  T  TC   T T   TC  T      TTTT

                                6920                                *
ARA_PHYA_GEN : TGATGTATCATTCAAAATAAGTAATATAGGAGAAATGAGCTAATGTTTAC : 6899
PHYOSEQUENCE : TAAATTACCAGGC AAAAATTCCTTTGTAAAAAA----- : 3989
                   T  A   TA  CA   CAAAA      T TA   A  AA

                                6960                                *                                7000
ARA_PHYA_GEN : GGTCCATGGTTTATCATAATGGCAGAAACTCAAACAAATATTCTATCTAG : 6949
PHYOSEQUENCE : ----- : -

```

Genexpression nach Pathogeninfektion

Expressionswerte induzierter Gene nach Infektion mit *S.conigenus*. Wiedergegeben wird das Verhältnis zwischen den Signalintensitäten der mit radioaktiv markierten cDNA-Proben aus infizierten und nicht-infizierten Fichtenkeimlingen hybridisierten Macroarray-Filter.

cDNA Klon	Ratio (inf/non-inf)-1		
	5 DAI	18 DAI	35 DAI
pPA0047	6,2	2,7	0,5
pPA0062	3,9	2,0	0,0
pPA0064	4,4	2,7	-0,3
pPA0070	6,9	3,2	0,0
pPA0072	13,2	5,4	-0,1
pPA0079	8,8	3,8	0,0
pPA0099	8,7	0,3	1,0
pPA0100	11,5	0,2	1,1
pPA0105	5,3	0,1	1,2
pPA0107	9,5	0,0	1,6
pPA0108	6,5	0,1	1,4
pPA0115	9,3	0,0	1,2
pPA0121	6,7	0,0	1,3
pPA0123	11,3	0,0	2,0
pPA0128	17,4	0,0	2,1
pPA0129	7,6	0,0	1,2
pPA0130	3,0	0,0	0,7
pPA0003	8,3	0,0	0,0
pPA0004	6,5	0,1	-0,4
pPA0010	20,1	0,5	0,0
pPA0015	7,1	0,4	-0,6
pPA0016	3,0	0,2	-0,3
pPA0033	10,2	-0,4	-0,1
pPA0034	7,6	0,0	0,0
pPA0037	7,1	0,3	0,2
pPA0044	14,4	-0,1	0,3
pPA0049	40,9	0,7	1,3
pPA0059	11,1	0,3	-0,1
pPA0083	9,5	-0,1	0,2
pPA0087	12,0	0,5	0,0
pPA0091	23,2	-0,1	-0,2

pPA0101	5,9	0,0	0,2
pPA0110	10,2	0,4	-1,0
pPA0112	6,4	-0,2	0,5
pPA0113	13,4	-0,1	0,8
pPA0126	14,5	0,1	0,7
pPA0005	9,7	1,4	-0,3
pPA0006	12,8	1,0	0,3
pPA0007	4,0	0,9	0,4
pPA0013	7,8	0,6	-0,3
pPA0014	4,9	1,2	-0,4
pPA0022	5,5	1,5	-0,5
pPA0032	7,2	1,1	-0,8
pPA0038	4,6	0,9	-0,4
pPA0045	10,5	1,2	0,7
pPA0054	11,8	1,2	0,3
pPA0055	5,0	1,2	-0,1
pPA0060	5,9	1,7	0,4
pPA0061	1,5	0,3	0,1
pPA0063	6,1	0,8	-0,2
pPA0071	10,8	0,8	-0,1
pPA0073	11,6	0,7	0,7
pPA0074	4,1	0,5	0,7
pPA0075	6,0	0,4	0,3
pPA0076	7,3	0,6	-0,2
pPA0077	4,3	0,5	-0,2
pPA0078	6,1	1,6	-0,1
pPA0080	10,6	2,5	0,1
pPA0082	11,0	1,0	0,1
pPA0084	7,3	0,5	0,0
pPA0086	5,8	0,8	0,1
pPA0094	5,9	0,9	0,0
pPA0095	10,3	0,8	0,0
pPA0096	9,5	0,7	0,1