

Lehrstuhl für Mikrobiologie  
der Technischen Universität München

**Induktion systemischer Resistenz durch  
*N*-Acyl-L-homoserinlacton-produzierende Bakterien in der Rhizosphäre  
von Tomatenpflanzen**

**Regina Margareta Schuegger**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Naturwissenschaften**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:

Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. K.-H. Schleifer  
2. Priv.-Doz. Dr. Chr. Langebartels

Die Dissertation wurde am 16.01.03 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 24.02.03 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

<b>I.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.</b>	<b>Biocontrol-Aktivität von Rhizosphärebakterien .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Mechanismen der Biocontrol-Aktivität von Rhizosphärebakterien .....	3
1.1.1	Antibiosis und Produktion fungizider Metabolite .....	3
1.1.2	Kompetition um Nährstoffe .....	4
1.2.	Stimulierung des Pflanzenwachstums .....	5
<b>2.</b>	<b>Quorum Sensing in Pflanzen-assoziierten Bakterien.....</b>	<b>8</b>
2.1.	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton-vermittelte Zell-Zell Kommunikation in gram-negativen Bakterien .....	8
2.2.	Quorum Sensing regulierte Eigenschaften in pflanzenassoziierten Bakterien.....	11
2.3.	Quorum Sensing in <i>Serratia liquefaciens</i> .....	14
2.4.	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton-vermittelte Interaktionen mit Eukaryoten.....	15
<b>3.</b>	<b>Pilze als Krankheitserreger bei Tomatenpflanzen .....</b>	<b>16</b>
<b>4.</b>	<b>Systemische Resistenz in Pflanzen .....</b>	<b>17</b>
4.1.	Systemic acquired resistance (SAR) – ein Salicylsäure-abhängiger Signalweg .....	20
4.2.	Durch Rhizosphärebakterien induzierte systemische Resistenz – ein Jasmonat- und Ethylen-abhängiger Signalweg .....	24
4.3.	Interaktionen zwischen den Signalwegen .....	28
4.4.	Bakterielle Komponenten, die eine systemische Resistenz in Pflanzen auslösen können .....	29
<b>5.</b>	<b>Themenstellung.....</b>	<b>31</b>
<b>II.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>1.</b>	<b>Geräte .....</b>	<b>32</b>
<b>2.</b>	<b>Chemikalien .....</b>	<b>32</b>
2.1.	Feinchemikalien .....	32
2.2.	Radiochemikalien.....	33
2.3.	Molekularbiologische Reagenzien .....	33
<b>3.</b>	<b>Rhizosphärebakterien .....</b>	<b>33</b>
3.1.	Art und Herkunft der Rhizosphärebakterien .....	33
3.2.	Anzucht und Stammhaltung .....	34
3.2.1	Verwendete Nährmedien und Hemmstoffe.....	34
3.2.2	Zellanzucht und Stammhaltung.....	35
<b>4.</b>	<b>Pflanzenmaterial.....</b>	<b>36</b>
4.1.	Art und Herkunft des Pflanzenmaterials .....	36
4.2.	Anzuchtbedingungen.....	36
4.2.1	Oberflächensterilisierung der Samen .....	36
4.2.2	Anzucht in Erde.....	37
4.2.3	Anzucht in Quarzsand unter keimreduzierten Bedingungen.....	37
<b>5.</b>	<b>Inokulation der Pflanzen mit Rhizosphärebakterien .....</b>	<b>39</b>
<b>6.</b>	<b>Pathogeninfektion.....</b>	<b>40</b>
<b>7.</b>	<b>Bonitur von Blattschäden .....</b>	<b>42</b>
<b>8.</b>	<b>Ernte der Blätter und Wurzeln.....</b>	<b>42</b>
<b>9.</b>	<b>Bestimmung der Lebendkeimzahl an den Wurzeln.....</b>	<b>42</b>
<b>10.</b>	<b>Applikation von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlactonen .....</b>	<b>43</b>

<b>11.</b>	<b>Interaktionen von Rhizosphärebakterien mit tomatenpathogenen Pilze .....</b>	<b>44</b>
<b>12.</b>	<b>Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese .....</b>	<b>44</b>
12.1.	Bestimmung der Ethylenemission.....	44
12.2.	Bestimmung des Gehalts an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure.....	45
<b>13.</b>	<b>Bestimmung der Salicylsäuregehalte.....</b>	<b>46</b>
<b>14.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>49</b>
14.1.	Häufig verwendete Medien, Puffer-Systeme und Lösungen .....	49
14.2.	Sterilisation und RNase-Inhibition.....	50
14.3.	Primer .....	50
14.4.	Isolierung von Nukleinsäuren .....	50
14.4.1	Isolierung der Gesamt-RNA nach der TRIZOL-Methode .....	50
14.4.2	Genomische DNA .....	51
14.4.3	Plasmid DNA (QIAprep Spin) .....	52
14.5.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	52
14.6.	Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nicht-denaturierenden Agarose-Gelen.....	52
14.7.	Northern Analyse .....	53
14.7.1	Herstellung von spezifischen, mit Digoxigenin-dUTP markierten Sonden.....	53
14.7.2	Elektrophoretische Auftrennung der RNA in denaturierenden Gelen .....	53
14.7.3	Northern Blotting .....	54
14.7.4	Hybridisierung der Transkripte .....	54
14.7.5	Detektion der Transkripte.....	55
14.8.	Macroarray-Analyse.....	55
14.8.1	Aufbau des Macroarrays .....	55
14.8.2	Verwendete Lösungen.....	57
14.8.3	Referenzhybridisierung .....	57
14.8.4	Komplexe Hybridisierung mit cDNA .....	60
14.8.5	Auswertung der radioaktiven Signale .....	61
14.8.6	Methodische und biologische Varianz der Macroarray-Analysen.....	63
14.9.	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	64
14.9.1	Design der Primer.....	64
14.9.2	PCR-Amplifikation .....	64
14.9.3	Real-Time PCR (Taqman) .....	64
14.10.	Elution von DNA aus Agarose-Gelen.....	65
14.11.	Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten.....	65
14.11.1	Ligation .....	65
14.11.2	Transformation .....	66
14.11.3	Sequenz-Analysen.....	66
<b>15.</b>	<b>Statistik.....</b>	<b>66</b>
<b>III.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>67</b>
<b>1.</b>	<b>Induktion der Resistenz von Tomatenpflanzen gegenüber <i>Alternaria alternata</i> durch das Rhizosphärebakterium <i>Serratia liquefaciens</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>2.</b>	<b>Interaktionen von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlacton-produzierenden Rhizosphärebakterien mit Tomatenpflanzen .....</b>	<b>69</b>
2.1.	Charakterisierung des Wachstums von Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom .....	69
2.2.	Kolonisierung der Tomatenwurzel durch Rhizosphärebakterien.....	71
2.3.	Einfluss von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 auf das pflanzliche Wachstum.....	75
2.4.	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton-Produktion in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen .....	76

<b>3.</b>	<b>Etablierung eines Infektionssystems mit pathogenen Pilzen und Quantifizierung der Pilz-DNA .....</b>	<b>79</b>
3.1.	Zeitverlauf der Blattschäden während einer Infektion mit <i>Alternaria alternata</i> .....	79
3.2.	Entwicklung spezifischer Primer für die Quantifizierung von Pilz-DNA aus befallenen Blättern .....	80
3.3.	Hemmung von tomatenpathogenen Pilzen durch Rhizosphärebakterien.....	87
<b>4.</b>	<b>Einfluss von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlacton produzierenden Rhizosphärebakterien auf die Krankheitsresistenz von Tomatenpflanzen.....</b>	<b>90</b>
4.1.	Abhängigkeit der Biocontrol-Aktivität von der <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton Produktion in <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 .....	90
4.1.1	Induktion der pflanzlichen Krankheitsresistenz gegen <i>Alternaria alternata</i> .....	90
4.1.2	Entwicklung der pflanzlichen Krankheitsresistenz gegen <i>Botrytis cinerea</i> und <i>Cladosporium herbarum</i> .....	93
4.2.	Biocontrol-Aktivität von Vertretern der Gattung <i>Pseudomonas</i> .....	96
<b>5.</b>	<b>Einfluss von <i>Serratia liquefaciens</i> auf die Gehalte pflanzlicher Signalstoffe ....</b>	<b>99</b>
5.1.	Verlauf der Salicylsäuregehalte nach Behandlung von Tomatenpflanzen mit <i>Serratia liquefaciens</i> und <i>Alternaria alternata</i> .....	99
5.2.	Änderungen von Parametern der Ethylenbiosynthese durch <i>Serratia liquefaciens</i> und <i>Alternaria alternata</i> .....	104
<b>6.</b>	<b>Pflanzliche Reaktionen nach Applikation von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlactonen</b>	<b>108</b>
6.1.	Induktion des Salicylsäuregehaltes durch <i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton.....	108
6.2.	Änderungen der Salicylsäuregehalte nach Zugabe von weiteren <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactonen .....	113
6.3.	Einfluss von <i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton auf den Gehalt an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure .....	114
<b>7.</b>	<b>Untersuchungen zur Genexpression nach Inokulation mit <i>Serratia liquefaciens</i> und Applikation von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlactonen.....</b>	<b>115</b>
7.1.	Änderungen der Genexpression nach Infektion der Pflanzen mit <i>Alternaria alternata</i> .....	116
7.2.	Genexpressionsänderungen nach Behandlung der Pflanzen mit <i>Serratia liquefaciens</i> .....	119
7.3.	Induktion von Abwehrgenen durch <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactone, Salicylsäure und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure.....	124
<b>8.</b>	<b>Northern-Blot Analysen induzierter Abwehrgene.....</b>	<b>128</b>
<b>IV.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>133</b>
<b>1.</b>	<b>Biocontrol-Aktivität von <i>N</i>-Acyl-L-homoserinlacton-produzierende Rhizosphärebakterien .....</b>	<b>133</b>
1.1.	Rolle von <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactonen bei der Biocontrol-Aktivität von <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 .....	134
1.2.	Einfluss der durch <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton-produzierenden Rhizosphärebakterien vermittelten systemischen Resistenz auf das pilzliche Wachstum.....	135
1.3.	Spezifität der Biocontrol-Aktivität gegen verschiedene perthotrophe Pilze.....	139
1.4.	Induktion systemischer Resistenz in Tomatenpflanzen durch <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 .....	140
<b>2.</b>	<b>Abwehrreaktionen und Signalstoffe bei induzierter systemischer Resistenz gegen <i>Alternaria alternata</i> .....</b>	<b>143</b>
2.1.	Rolle von Ethylen bei der systemischen Resistenz durch <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 .....	145

2.2.	Beteiligung von Salicylsäure bei der systemischen Resistenz induziert durch das N-Acyl-L-homoserinlacton produzierende Rhizosphärebakterium <i>Serratia liquefaciens</i> MG1 .....	147
3.	<b>Änderungen in der Genexpression durch N-Acyl-L-homoserinlactone und <i>Serratia liquefaciens</i> MG1.....</b>	<b>150</b>
4.	<b>Zusammenfassende Darstellung der an der AHL-induzierten systemischen Resistenz beteiligten Signalwege und Abwehrproteine .....</b>	<b>162</b>
5.	<b>Ausblick.....</b>	<b>167</b>
<b>V.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>169</b>
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>171</b>
<b>VII.</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>188</b>
1.	<b>Verwendete Primer .....</b>	<b>188</b>
1.1.	Primer für die Amplifikation der transkribierten Spacerregionen (ITS) der kernkodierten ribosomalen RNA-Gene (rDNA) pathogener Pilze .....	188
1.2.	Primer für die Quantifizierung tomatenpathogener Pilze mittels Real-Time PCR. ....	188
1.3.	Primer zur Amplifikation von klonierten PCR-Produkten aus dem Vector pGEM-T-Easy .....	188
2.	<b>Entwicklung von PCR-Primern für den quantitativen Nachweis von tomatenpathogenen Pilzen.....</b>	<b>189</b>
2.1.	Alignment der ITS-Regionen wichtiger tomatenpathogener Pilze .....	189
2.2.	DNA-Bank der tomatenpathogenen Pilze und Auftragsschema der PCR-Reaktionen auf die Agarosegele .....	192
3.	<b>Auftragsschema des Macroarrays für Tomaten-Abwehrgene.....</b>	<b>195</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure
ACO	ACC-Oxidase
ACS	ACS-Synthase
AHL	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton
AIR	<i>N</i> -Acyl-L-homoserinlacton induzierte Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
BHL	<i>N</i> -Butanoyl-L-homoserinlacton
bp	Basenpaare
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures
cfu	Kolonie bildende Einheiten (colony forming units)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHL	<i>N</i> -Decanoyl-L-homoserinlacton
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
EMS	Ethylmethansulfonat
f. sp.	forma specialis
FG	Frischgewicht
GA	Gentisinsäure
GACC	$\gamma$ -Glutamyl-ACC
Gfp	grün fluoreszierendes Protein
HHL	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton
HR	Hypersensitive Reaktion (hypersensitive response)
ISR	Induzierte systemische Resistenz
K	Kontrolle
konj.	konjugiert
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolysaccharide
OdDHL	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton
OHHL	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton
OHL	<i>N</i> -Octanoyl-L-homoserinlacton
PGPR	Plant growth promoting rhizobacteria
PR	Pathogenesis-related
pv.	Pathovar
Rfp	rot fluoreszierendes Protein
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SA	Salicylsäure
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SAR	Systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance)
SE	Standardfehler (standard error)
sp.	Species
ÜN	über Nacht
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen / Volumen
w/v	Masse / Volumen





# I. Einleitung

## 1. Biocontrol-Aktivität von Rhizosphärebakterien

Die Rhizosphäre einer Pflanze beinhaltet die Wurzelepidermis einschließlich der Wurzelhaare und des Cortex, eine Mucusschicht aus pflanzlichen oder bakteriellen Polysacchariden und den Boden, der die Wurzel bis zu einem Abstand von drei Millimetern umgibt (Belandreau & Knowles, 1978). Sie stellt einen Lebensraum für eine Vielzahl von Mikroorganismen dar. In ihr finden Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Pflanzen wie z. B. der Austausch von Nährstoffen statt. Die Entwicklung aktiver mikrobieller Populationen rund um die Wurzeln ist als Rhizosphären-Effekt bekannt (Whipps, 2001).

Es wurde beobachtet, dass eine Besiedelung der Wurzeln mit bestimmten Rhizosphärenbewohnern wie Bakterien oder Pilzen positive Effekte auf Pflanzen ausüben kann. Bakterien, die auf verschiedene Weise das Pflanzenwachstum stimulieren und so den Ertrag von Nutzpflanzen steigern, werden als „plant growth promoting rhizobacteria“ (PGPR) bezeichnet (Kloepper et al., 1980). Aufgrund ihrer physico-chemischen und mikrobiellen Eigenschaften können bestimmte Böden natürlicherweise Krankheiten gegen pilzliche Erreger wie z. B. *Fusarium*-, *Gaeumannomyces*-, *Pythium*- oder *Phytophthora*-Arten unterdrücken (Whipps, 2001). In diesen Böden lebende Mikroorganismen üben über verschiedene Mechanismen eine Biocontrol-Aktivität aus. Darunter versteht man die Unterdrückung von Krankheitserregern mit Hilfe natürlich vorkommender Mikroorganismen ohne den Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln. In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen zur Erforschung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen unternommen, um geeignete Organismen als Pflanzenstärkungsmittel und / oder Biocontrol-Wirkstoffe in Pflanzenbau und Landwirtschaft einzusetzen (Zehnder et al., 2001).

Die unterschiedlichen Wirkmechanismen lassen sich in drei große Gruppen unterteilen (Tabelle 1). Die Produktion von Antibiotika oder fungizider Metabolite und die Konkurrenz um Nährstoffe hemmen direkt das Wachstum von Krankheitserregern in der Rhizosphäre (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Insbesondere Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Serratia* und *Burkholderia* reduzieren so vor allem Pilzkrankheiten, hervorgerufen durch z. B. *Gaeumannomyces* spp., *Pythium* spp. oder *Verticillium* spp. in diversen Pflanzenarten wie z. B. Mais, Weizen, Raps oder Tomate (Buysens et al., 1996; Kalbe et al., 1996; Ligon et al., 2000; Picard et al., 2000; s. Einleitung 1.1.1; 1.1.2).

Tabelle 1: Zusammenstellung der wichtigsten Mechanismen der Unterdrückung von Krankheiten und Steigerung des pflanzlichen Wachstums durch Rhizosphärebakterien.

Mechanismus	Organismus	Pflanzenspezies	Pathogen	Literatur
<b>Direkte Interaktionen zwischen Rhizosphärebakterien und Pathogenen</b>				
Antagonismus durch die Produktion von Antibiotika oder Exoenzymen	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Burkholderia</i> spp.	Mais, Weizen, Baumwolle, Raps	<i>Gaeumannomyces</i> spp. <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Verticillium</i> spp.	Kalbe et al., 1996; Ligon et al., 2000; Picard et al., 2000; Raaijmakers et al., 1997
Kompetition um Nährstoffe, z. B. Fe	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Serratia</i> spp.	Tomate, Raps	<i>Pythium splendens</i> , <i>Verticillium dahliae</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Buysens et al., 1996; Kalbe et al., 1996
<b>Induktion von pflanzlichen Abwehrreaktionen</b>				
Systemisch erworbene Resistenz (SAR)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 7NSK2	Bohne, Tabak, Tomate	<i>Botrytis cinerea</i>	Audenaert et al., 2002; De Meyer et al., 1999; De Meyer & Höfte, 1997
Induzierte systemische Resistenz (ISR)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Rettich, Nelke, Tomate, Ackerschmalwand	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Peronospora parasitica</i>	Pieterse et al., 2001; Van Loon et al., 1998
<b>Stimulierung des Pflanzenwachstums</b>				
Biofertilisation	<i>Rhizobium</i> spp. <i>Bradyrhizobium</i> spp., <i>Azospirillum</i> spp.	Leguminosen	-	Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000
Produktion von Wachstumshormonen (z. B. Auxine)	<i>Pseudomonas</i> spp. <i>Serratia</i> spp. <i>Azospirillum</i> spp.	Gurke	-	Beyeler et al., 1999; Kalbe et al., 1996; Steenhoudt & Vanderleyden, 2000
Eingriff in den Ethylenstoffwechsel	<i>Pseudomonas</i> spp.		-	Glick et al., 1998

Im Gegensatz zu diesen direkten Interaktionen können manche Biocontrol-Bakterien auch eine erhöhte Resistenz in der Pflanze stimulieren, wobei die Unterdrückung der Krankheitserreger allein durch die pflanzliche Abwehr erfolgt (Van Loon et al., 1998). Dabei kann es sich zum einen um eine durch den Signalstoff Salicylsäure vermittelte Resistenz handeln (systemisch erworbene Resistenz, SAR; s. Einleitung 4.1). Der *Pseudomonas aeruginosa* Stamm 7NSK2 bewirkte in Bohnen-, Tabak- und Tomatenpflanzen eine erhöhte Resistenz gegen *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr.; Audenaert et al., 2002; De Meyer et al., 1999; De Meyer & Höfte, 1997). Ein Salicylsäure-unabhängiger Signalweg (induzierte systemische Resistenz, ISR; s. Einleitung 4.2) wurde vor allem in Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana* L.) beschrieben. Er wurde durch den Biocontrol-Stamm *Pseudomonas fluorescens* WCS417r induziert und führte zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegen pilzliche (z. B.

*Fusarium oxysporum*, *Alternaria brassicicola*) und bakterielle Erreger (*Pseudomonas syringae*; Pieterse et al., 2001; Van Loon et al., 1998).

Darüber hinaus erhöhen Rhizosphärebakterien das Wachstum und den Ertrag von Nutzpflanzen, indem sie die Verfügbarkeit von Nährstoffen, insbesondere von Stickstoff, verbessern (Biofertilisation, Bloemberg & Lugtenberg, 2001; s. Einleitung 1.2). Die Produktion von Wachstumshormonen oder die Beeinflussung des Ethylenhaushalts können ebenfalls das Wachstum anregen (Glick et al., 1998; s. Einleitung 1.2).

## **1.1. Mechanismen der Biocontrol-Aktivität von Rhizosphärebakterien**

### **1.1.1 Antibiosis und Produktion fungizider Metabolite**

Weit verbreitet sind direkte Interaktionen zwischen Bakterien untereinander oder auch Bakterien und Pilzen. Viele Rhizosphärebakterien, die Pflanzenwurzeln besiedeln, produzieren bakterizide oder fungizide Substanzen und unterdrücken so Krankheitserreger, die im gleichen Habitat leben (Whipps, 2001). Wichtige fungizide Metabolite sind Phenazin, Pyoluteorin, 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG) und Pyrrolnitrin, die vorwiegend von Vertretern der Gattungen *Pseudomonas* und *Burkholderia* produziert werden (Ligon et al., 2000). DAPG-produzierende Bakterien finden sich aber auch in der Familie der Enterobacteriaceae (*Enterobacter* oder *Pantoea*), wie Untersuchungen der Biodiversität von DAPG-produzierenden Bakterien in der Maisrhizosphäre gezeigt haben (Picard et al., 2000). Dabei machten die DAPG-Produzenten bis zu 26 % aus. Raaijmakers et al. (1997) isolierten aus der Weizenrhizosphäre diverser Böden, die natürlicherweise die Schwarzbeinigkeit von Weizen unterdrücken, DAPG-produzierende Pseudomonaden, die je nach Boden einen Anteil von 3 bis 12 % an den fluoreszierenden Pseudomonaden hatten. Phenazin-Produzenten wurden in dieser Studie in den untersuchten Böden nicht nachgewiesen.

Besondere Aufmerksamkeit erregte das Antibiotikum Pyrrolnitrin aufgrund seines breiten Wirkspektrums gegen verschiedene Pilzgruppen bei der Pharmaindustrie und den Herstellern von Pflanzenschutzmitteln. Ein Pyrrolnitrin-Derivat wird kommerziell als Fungizid in der Landwirtschaft eingesetzt (Ligon et al., 2000). Für die am häufigsten detektierten Antibiotika wurde inzwischen der Biosyntheseweg entschlüsselt (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Dies eröffnet neue Möglichkeiten, bekannte Biocontrol-Stämme durch genetische Modifikationen zu verbessern. Die Erhöhung der Pyrrolnitrinhalte in dem *Pseudomonas fluorescens* Stamm BL915 steigerte seine Biocontrol-Aktivität gegen

*Rhizoctonia solani* und *Pythium ultimum* in Feldversuchen mit Baumwollkeimlingen (Ligon et al., 2000).

Ebenfalls fungizide Eigenschaften besitzen Vertreter der Gattung *Serratia*, so gehörten 12 % der Bakterien mit Pilz-hemmenden Eigenschaften, die aus der Rapsrhizosphäre isoliert wurden, zu dieser Gattung (Kalbe et al., 1996). Diese Stämme produzierten zum einen Antibiotika wie Pyrrolnitrin oder das rote Pigment Prodigiosin, das ebenfalls fungizide Eigenschaften besitzt, und zum anderen Exoenzyme, wie  $\beta$ -1,3-Glucanasen oder Chitinasen, die pilzliche Zellwände angreifen können (Kalbe et al., 1996).

### 1.1.2 Konkurrenz um Nährstoffe

Konkurrenz um Nährstoffe und Lebensraum zwischen Bakterien und potentiell pathogenen Pilzen wurde schon lange als Biocontrol-Mechanismus erkannt, doch das größte Interesse fand die Konkurrenz um Eisen in der Rhizosphäre (Whipps, 2001). Unter Eisen-limitierenden Bedingungen produzieren viele Bakterien und Pilze eine Reihe von Substanzen mit geringem Molekulargewicht, die eine hohe Affinität für Eisen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) besitzen und als Siderophore bezeichnet werden. Zur Zeit sind etwa 200 verschiedene Siderophore bekannt, die bezüglich ihrer Struktur in verschiedene Klassen unterteilt werden können (Winkelmann, 2002). Die wichtigsten Gruppen sind Siderophore vom Catechol-, Hydroxamat- und Carboxylat-Typ. Diese Eisen-Chelatoren binden den geringen Eisenvorrat in der Rhizosphäre und entziehen ihn pathogenen Pilzen, die so in ihrem Wachstum eingeschränkt werden (Loper & Henkels, 1999).

Neuere Studien zeigten deutlich, dass der Status der Eisenversorgung in Pflanzen die Struktur der Rhizosphärengemeinschaft beeinflusst (Yang & Crowley, 2000). Darüber hinaus beeinflussen verschiedene Umweltfaktoren die Menge der produzierten Siderophore wie z. B. Mineralstoffe (Cobaltchlorid, Ammoniummolybdat) oder die Art der Kohlenstoffquelle im Verhältnis zur Nährstoffkonzentration (Duffy & Défago, 1999).

Fluoreszente Pseudomonaden sind charakterisiert durch die Produktion von gelbgrünen Pigmenten, den Pyoverdinen oder Pseudobactinen, die unter UV-Licht fluoreszieren und zu den Catechol-Siderophoren zählen. Pyoverdine stellen eine sehr heterologe Substanzklasse dar, bis heute sind etwa 50 verschiedene Moleküle bekannt (Meyer et al., 2002). Sie bestehen aus drei Domänen: einem Quinolin-Derivat, das als Chromophor dient, einer Acylseitenkette und einer hochvariablen Peptidkette (Meyer, 2000). Daneben bilden Pseudomonaden das Siderophor Pyochelin, ein Derivat von Salicylsäure; letztere wird von

vielen Autoren ebenfalls als Siderophor bezeichnet (Buysens et al., 1996). Mit Hilfe von Pyoverdin- bzw. Pyochelin-Minusmutanten konnte festgestellt werden, dass die Siderophor-Produktion von *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 zum Schutz vor Wurzelfäule durch *Pythium splendens* in Tomatenpflanzen beiträgt (Buysens et al., 1996).

Auch *Serratia* spp. produziert diverse Siderophore unter Eisen-limitierenden Bedingungen: Ethylendiamin Di-O-Hydroxyphenylelessigsäure, das Catechol Enterobactin und das Hydroxamat Aerobactin (Grimmont & Grimmont, 1992). 13 von 18 Isolaten der Gattung *Serratia* aus der Rapsrhizosphäre, die antagonistische Eigenschaften gegenüber den pathogenen Pilzen *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani* und *Sclerotinia sclerotiorum* zeigten, produzierten Siderophore (Kalbe et al., 1996). Die Autoren gehen davon aus, dass zum Antagonismus von *Serratia* spp. gegen verschiedene pathogene Pilze auch die Konkurrenz um Eisen beiträgt (Kalbe et al., 1996).

## 1.2. Stimulierung des Pflanzenwachstums

Das Wachstum von Pflanzen kann nicht nur indirekt durch die Unterdrückung von Krankheitserregern gesteigert werden, sondern auch direkt durch Erhöhung der Verfügbarkeit von Nährstoffen (Stickstoff, Phosphor, Eisen) oder die Produktion von Pflanzenhormonen (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Dazu gehört z. B. die Gruppe der Stickstoff-fixierenden Bakterien, die sowohl freilebend im Boden vorkommen als auch in engen Symbiosen, insbesondere mit Leguminosen leben. Biofertilisation, d. h. die verbesserte Versorgung von Pflanzen mit Nährstoffen durch Mikroorganismen, ist für etwa 65 % des weltweiten Stickstoffvorrates in Nutzpflanzen verantwortlich (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Besonders effektive Stickstoff-Fixierer sind Knöllchenbakterien der Gattungen *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* und *Allorhizobium*, die alle Wirts-spezifische Symbiosen mit Leguminosen bilden. Lipooligosaccharid-Signale der Bakterien leiten die Bildung von Knöllchen an den Wurzeln ein, in die die Bakterien dann eindringen. Im Inneren der Knöllchen erfolgt die Differenzierung der Bakterien zu sogenannten Bakteroiden, unbeweglichen Zellen, die den Nitrogenase-Enzymkomplex exprimieren, der unter anaeroben Bedingungen Stickstoff zu Ammoniak reduziert (Long, 2001). Aber auch freilebende Stickstoff-Fixierer, wie z. B. *Azospirillum* spp. tragen zur Versorgung der Pflanzen mit Stickstoff bei. Diese Bakterien leben in der Rhizosphäre und verwenden eine Nitrogenase, die auch noch bei geringem Sauerstoffgehalt arbeitet (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000).

Darüber hinaus sekretiert *Azospirillum* spp. auch Pflanzenhormone wie Auxine, Gibberelline und Cytokinine, die das Wachstum der Pflanzen anregen können (Steenhoudt & Vanderleyden, 2000). Die Produktion von Indolelessigsäure, einem Auxin, ist unter Pflanzen-assoziierten Bakterien, z. B. den Gattungen *Pseudomonas* oder *Serratia*, weit verbreitet (Beyeler et al., 1999; Kalbe et al., 1996). Ausgangsstoff der Synthese von Indolelessigsäure ist Tryptophan. In Bakterien erfolgt sie auf mindestens zwei verschiedenen Wegen, dem Indol-3-acetamid Weg und dem Tryptophan Seitenketten Oxidaseweg (Patten & Glick, 1996). Auxin ist ein wichtiger Wachstumsregulator in Pflanzen. In geringen nanomolaren Konzentrationen stimuliert es die Zellelongation in Wurzeln, in höheren Konzentrationen wirkt es hemmend. Gurkenpflanzen, die mit einem Indolelessigsäure-überproduzierenden Stamm von *P. fluorescens* CHA0 inokuliert wurden, hatten ein um 20 % gesteigertes Wurzelwachstum (Beyeler et al., 1999). Wurden die Pflanzen statt in unsterilem Boden in autoklavierter Erde angezogen und inokuliert, so hatten sie dickere und kürzere Wurzeln und ein vermindertes Sprosswachstum. In autoklavierter Erde war die Kolonisationsrate des modifizierten Stammes etwa 60 % höher als in unbehandelter. Damit stieg auch die Konzentration an Indolelessigsäure an den Wurzeln (Beyeler et al., 1999). Die Menge des produzierten Auxins bestimmte den Effekt auf die Pflanze, der zudem abhängt von Art und Alter der Pflanzen.

Ein weiterer wichtiger Wachstumsregulator in Pflanzen ist Ethylen, es wirkt häufig als Gegenspieler zu Auxin und hemmend auf die Zellelongation (Johnson & Ecker, 1998). Von Glick et al. (1998) wurde ein Modell vorgeschlagen, wie Rhizosphärebakterien den Ethylenhaushalt in Pflanzen beeinflussen und durch Senken der endogenen Ethylenproduktion das Pflanzenwachstum stimulieren können.

In höheren Pflanzen erfolgt die Ethylenbiosynthese ausgehend von der Aminosäure Methionin über *S*-Adenosylmethionin (SAM) und der zyklischen Aminosäure 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC, Abb. 1). Über den Yang-Zyklus werden die Vorstufen von Ethylen bereitgestellt und der Methionin-Pool wieder aufgefüllt (Johnson & Ecker, 1998; Yang & Hoffman, 1984). SAM dient nicht nur als Vorstufe für ACC und Ethylen; in erster Linie wird SAM für Methylierungsreaktionen und für die Polyaminbiosynthese benötigt (Bouchereau et al., 1999).

Drei Familien von Isoenzymen sind für die Reaktionen während der Ethylensynthese verantwortlich. Die *S*-Adenosylmethionin Synthetase katalysiert die Bildung von SAM aus ATP und Methionin, die ACC-Synthase (ACS) bildet ACC, die direkte Vorstufe von Ethylen. In einem letzten Schritt setzt dann ACC-Oxidase (ACO) Ethylen aus ACC frei. Um den

Gehalt an freiem ACC für die Ethylensynthese bei hohen Ethylenemissionen zu verringern, kann es mit Malonat zu Malonyl-ACC (MACC, Martin & Saftner, 1995), bzw. mit Glutamat zu  $\gamma$ -Glutamyl-ACC (GACC) konjugiert werden (Abb. 1, Martin et al., 1995)).

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Ethylensynthese ist vermutlich die Umwandlung von SAM zu ACC durch die hochregulierten Mitglieder der ACC-Synthase-Isoenzymfamilie (Johnson & Ecker, 1998). In Tomate sind mindestens neun verschiedene ACS-Gene vorhanden (Zarembinski & Theologis, 1994), in *Arabidopsis* wurden bisher sechs Gene beschrieben (Arteca & Arteca, 1999).

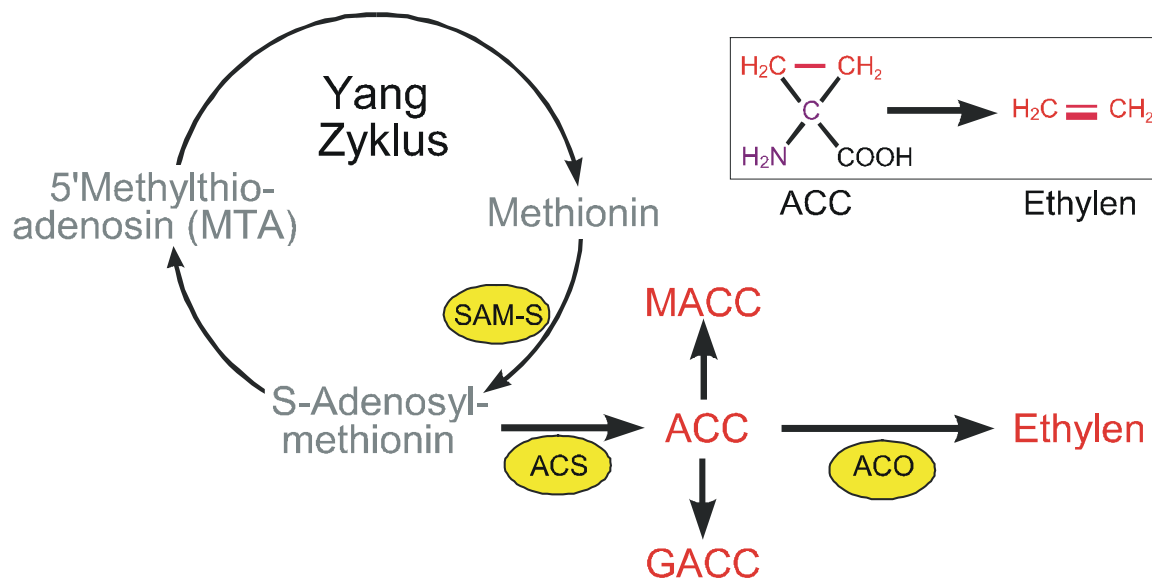


Abb. 1: Reaktionsschema der Ethylenbiosynthese. SAM-S = SAM-Synthetase, ACS = ACC-Synthase, ACO = ACC-Oxidase, ACC = 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure, MACC = Malonyl-ACC, GACC =  $\gamma$ -Glutamyl-ACC (aus Langebartels et al., 2000, verändert).

Die Transkription dieser Gene wird differentiell während Entwicklungsprozessen (Nakatsuka et al., 1998) und nach externen Reizen wie Verwundung (Lincoln et al., 1993), Pathogenbefall (Spanu & Boller, 1989) oder Elicitor-Behandlung (Oetiker et al., 1997) reguliert. In *Arabidopsis* wurde von Arteca & Arteca (1999) eine Isoform (ASC-6) identifiziert, die durch Berührung induziert wird. Ozon als abiotischer Stressfaktor bewirkt ebenfalls eine Transkriptakkumulation spezifischer ACC-Synthase-Gene in Tomaten und Kartoffeln (Moeder et al., 2002; Schlaghaufer et al., 1997; Tuomainen et al., 1997).

Zusätzlich findet eine post-transkriptionelle Regulation der Biosynthese-Enzyme durch Phosphorylierung / Dephosphorylierung statt, wie Versuche mit Proteinkinase- und Phosphatase-Inhibitoren zeigten (Spanu & Boller, 1989; Tuomainen et al., 1997).

In den letzten Jahren mehrten sich die Hinweise, dass auch ACC-Oxidase eine hochregulierte Enzymfamilie darstellt (Barry et al., 1996; Nakatsuka et al., 1998). In Tomatenblättern und -früchten wurden bisher vier Isoformen dieses Genes beschrieben, die eine differentielle Expression in Blättern und Früchten zeigen (Barry et al., 1996; Nakatsuka et al., 1998). In Tabak wurden zwei Isoformen durch Pathogenbefall, Verwundung oder externes Ethylen induziert, während eine dritte Isoform eher konstitutiv exprimiert wurde (Kim et al., 1998).

„Plant growth promoting rhizobacteria“ (PGPR), die an der Wurzeloberfläche anhaften, können Indolelessigsäure sekretieren, welches die Pflanze aufnimmt. Zusammen mit endogen gebildeter Indolelessigsäure stimuliert es die Zellteilung und -elongation und zugleich die ACC-Synthase Aktivität (Kende, 1993). Überproduziertes ACC wird über die Wurzeln ausgeschieden und kann von den Bakterien aufgenommen und verstoffwechselt werden. Viele Bodenbakterien, insbesondere *Pseudomonas* spp., bauen ACC mit Hilfe der ACC-Deaminase zu Ammonium und  $\alpha$ -Ketobutyrat ab (Campbell & Thomson, 1996). Dadurch wird die ACC-Konzentration außerhalb der Wurzeln gesenkt und die Pflanzen exudieren mehr ACC, um das Gleichgewicht zwischen internen und externen ACC-Gehalten aufrechtzuerhalten. Die Bakterien stimulieren die Pflanze, mehr ACC zu exudieren. Die ACC-Konzentration innerhalb der Pflanze geht zurück und im gleichen Maß auch die Ethylenproduktion. Hemmende Einflüsse des Ethylens auf das Pflanzenwachstum sinken ebenfalls. Manche PGPR nützen ACC als zusätzliche Stickstoff-Quelle und haben dadurch einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bodenbewohnern, die ACC nicht verwerten können (Glick et al., 1998).

## **2. Quorum Sensing in Pflanzen-assoziierten Bakterien**

### **2.1. N-Acyl-L-homoserinlacton-vermittelte Zell-Zell Kommunikation in gram-negativen Bakterien**

In den frühen 80er Jahren wurde das erste N-Acyl-L-homoserinlacton (AHL) abhängige „Quorum Sensing“ System in dem marinen Leuchtbakterium *Vibrio fischeri* beschrieben. Bei



dieser Art der Regulation messen Bakterien mit Hilfe der *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Moleküle ihre eigene Populationsdichte und exprimieren bestimmte Gene nur dann, wenn eine genügend hohe Zellkonzentration erreicht ist. Dieses Phänomen der Zelldichte-abhängigen Regulation wurde „Quorum Sensing“ genannt, wobei „Quorum“ definiert wurde als die kleinste Einheit, bei der die Transkription stattfinden kann (Fuqua et al., 1996).

In *V. fischeri* reguliert dieses System den Phänotyp der Biolumineszenz. Lebt das Bakterium frei-schwimmend im Wasser, ist es nicht-biolumineszent, wohingegen es bei einer engen Symbiose in den Leuchtorganen von Tintenfischen blau-grünes Licht emittiert (Boettcher & Ruby, 1995). Während des Wachstums von *V. fischeri* synthetisiert das LuxI Protein das AHL-Signalmolekül *N*-(3-Oxohehexanoyl)-L-homoserinlacton (OHHL, Abb. 2). Da OHHL frei durch Membranen diffundieren kann, nähert sich die Konzentration im Medium und in den Zellen an (Kaplan & Greenberg, 1985). Beim Erreichen eines kritischen Schwellenwertes bindet OHHL an sein korrespondierendes Rezeptormolekül LuxR. Dieser Komplex wiederum bindet an eine 20 bp lange Region des luxI Promotors, der lux-Box, und aktiviert damit die Transkription des lux Operons. Da das erste Gen in diesem Operon, *luxI*, für die OHHL-Synthese kodiert, wird dessen Transkription über eine positive Rückkopplungsschleife verstärkt. Dies führt zu einem starken Anstieg der Biolumineszenz. Diese Art der Autoinduktion bewirkt, dass die Bakterien nur in den Leuchtorganen bei hohen Zelldichten biolumineszent sind (Eberl, 1999; Fuqua et al., 1996; Whitehead et al., 2001).

Viele Autoren hielten diesen Prozess anfangs nur für ein interessantes Beispiel der Genregulation in einem exotischen Leuchtbakterium (Hastings & Greenberg, 1999). Sie mussten ihre Meinung aber ändern, als immer mehr Regulationssysteme in gram-negativen Bakterien gefunden wurden, die homolog zu dem LuxRI System von *V. fischeri* waren (Whitehead et al., 2001). Neben der Biolumineszenz sind „Quorum Sensing“ gesteuerte Prozesse z. B. die Produktion von Antibiotika, Exoenzymen, Virulenzfaktoren, die Biofilmbildung, der konjugative Transfer von Plasmiden, die Knöllchenbildung oder das Schwärmen über feste Oberflächen (Eberl, 1999; Whitehead et al., 2001).

Die AHL-Signalmoleküle, die von den verschiedenen LuxI Homologen synthetisiert werden, unterscheiden sich in der Länge und Substitution ihrer *N*-Acyl-Seitenketten (Eberl, 1999). Bisher wurden *N*-Acyl-Seitenketten mit 4-14 Kohlenstoffatomen und Oxo-, Hydroxygruppen oder keiner Substitution an der C<sub>3</sub>-Position beschrieben (Abb. 2). Das in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchte Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1 produzierte *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) und *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL).

Die Mitglieder der *luxI* Genfamilie codieren für AHL-Synthasen, die für die Biosynthese der AHL-Moleküle zuständig sind. Studien mit aufgereinigten AHL-Synthasen aus *Agrobacterium tumefaciens*, *Vibrio fischeri* und *Pseudomonas aeruginosa* zeigten klar, dass diese Enzyme Acyl-Acyl-Carrier-Proteine (Acyl-ACP) und *S*-Adenosylmethionin (SAM) als Substrate verwenden (Eberl, 1999; Parsek et al., 1999; Schaefer et al., 1996). Die Synthese erfolgt dabei schrittweise. SAM bindet an das aktive Zentrum der AHL-Synthase, dann wird die entsprechende Acylgruppe von einem geladenen Acyl-ACP-Molekül zu diesem Komplex transferiert. Die Acylgruppe bildet eine Aminobindung mit der Aminogruppe des SAM. Durch Schließung des Lactonrings wird das AHL-Molekül fertiggestellt, und 5'-Methylthioadenosin als Beiprodukt freigesetzt (Hanzelka et al., 1999).

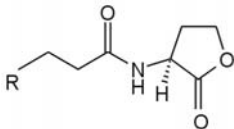
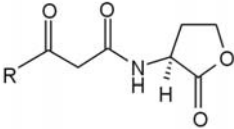
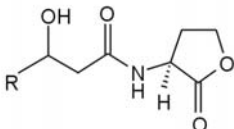
R	Name	Abkürzung	
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -Butanoyl-L-homoserinlacton	BHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -Hexanoyl-L-homoserinlacton	HHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -Octanoyl-L-homoserinlacton	OHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -Decanoyl-L-homoserinlacton	DHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(Tetradecanoyl)-L-homoserinlacton	7,8- <i>cis</i> -tDHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub>	<i>N</i> -(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton	OHHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub>	<i>N</i> -(3-Oxoctanoyl)-L-homoserinlacton	OOHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub>	<i>N</i> -(3-Oxodecanoyl)-L-homoserinlacton	ODHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub>	<i>N</i> -(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton	OdDHL
	CH <sub>3</sub>	<i>N</i> -(3-Hydroxybutanoyl)-L-homoserinlacton	HBHL
	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> CHCH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub>	7,8- <i>cis</i> - <i>N</i> -(3-Hydroxytetradecanoyl)-L-homoserinlacton	7,8- <i>cis</i> -HtDHL

Abb. 2: Ausgewählte chemische Strukturen von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen (AHL, Eberl, 1999).

Neben den am häufigsten vorkommenden AHL-Synthasen des LuxI-Types wurden noch zwei weitere Familien von AHL Biosynthese-Enzymen gefunden (Fray, 2002). Mitglieder des LuxM-Typen zeigen keine signifikante Homologie zum LuxI-Typ; sie scheinen aber die gleichen Substrate zu benutzen. Eine dritte Klasse von AHL-Synthasen, HdtS, wurde in dem Biocontrol-Stamm *Pseudomonas fluorescens* F113 gefunden. Dieses Enzym zeigt weder Homologien zu LuxI noch zu LuxM (Laue et al., 2000). Viele Bakterien verwenden mehrere

AHL-Synthasen zur Produktion von AHL-Molekülen unterschiedlicher *N*-Acyl-Seitenkettenlänge und in einigen Fällen gehören sie zu verschiedenen Familien von AHL-Synthasen (Hanzelka et al., 1999).

Die Regulation der Transkription „Quorum Sensing“-abhängiger Gene erfolgt über transkriptionelle Regulatoren des LuxR-Typen. Diese Proteine bestehen aus zwei Modulen, einer AHL-bindenden Domäne am N-Terminus und einer DNA-bindenden Domäne am C-Terminus (Eberl, 1999). Durch eine Konformationsänderung nach Bindung des AHL-Moleküles wird die DNA-bindende Domäne aktiv und LuxR lagert sich an Zielpromotorregionen an. Eine spezielle Erkennungssequenz stellt dabei die lux Box dar, eine 20 bp lange palindromische Sequenz, die meist mit der -35 Region von  $\sigma^{70}$ -Typ Promotoren überlappt. Die Transkription der Zielgene kann durch Mitglieder der LuxR-Familie sowohl aktiviert als auch reprimiert werden und die DNA-Bindung kann sowohl bei gebundenem AHL-Molekül als auch ohne stattfinden (Whitehead et al., 2001). Dies führte zur Definition von Untergruppen der LuxR-Typ Familie von transkriptionellen Regulatoren.

## 2.2. Quorum Sensing regulierte Eigenschaften in pflanzenassoziierten Bakterien

Die Produktion von AHL ist unter pflanzenassoziierten gram-negativen Bakterien weit verbreitet. Cha et al. (1998) untersuchten 106 Isolate aus 7 Gattungen von Bakterien, die mit Pflanzen assoziiert sind. In Gegenwart der meisten der *Agrobacterium*-, *Rhizobium*- und *Pantoea*-Isolate und etwa der Hälfte der *Erwinia*- und *Pseudomonas*-Stämme reagierten AHL-Sensorstämme mit der Expression ihres Reportergens und zeigten damit eine AHL-Synthese an. Eine andere Studie ergab, dass *Pseudomonas*-Isolate aus der Rhizosphäre von Pflanzen häufiger AHL produzieren als Bewohner des Bodens (Elasri et al., 2001).

AHL-vermittelte Genregulation wurde sowohl in pflanzenpathogenen Bakterien als auch in Biocontrol-Stämmen beschrieben. Gene, die Zelldichte-abhängig reguliert werden, kodieren für Antibiotika, Virulenzfaktoren, Harpine und Exoenzyme wie z. B. Proteasen, Cellulasen oder Pectinasen (Pierson III et al., 1998). Harpine, extrazelluläre Proteine, die von pflanzenpathogenen Bakterien wie z. B. *Pseudomonas syringae* oder *Erwinia amylovora* im Zuge der Infektion über ein Typ III Sekretionssystem ausgeschieden werden, können pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen (Charkowski et al., 1998; Desikan et al., 1998, 1999; He et al., 1993). Auch Exoenzyme, die von bakteriellen Krankheitserregern produziert werden, können Bestandteile von pflanzlichen Zellwänden freisetzen, die ihrerseits die pflanzliche Abwehr stimulieren (Mäe et al., 2001).

Pathogene Stämme von *Agrobacterium tumefaciens*, dem Erreger von Pflanzentumoren, enthalten ein 100 bp großes Ti (tumor-inducing) -Plasmid. Als Ergebnis eines komplexen Signalaustausches zwischen Erreger und Pflanze werden bestimmte Virulenzgene (*vir*) auf dem Plasmid induziert. Dies führt zum Transfer eines kleinen Teiles des Ti-Plasmides (T-DNA) in die Pflanzenzelle und zur anschließenden Integration ins Pflanzengenom. Die T-DNA enthält mehrere Gene, die im Pflanzennukleus exprimiert werden und u. a. für die Synthese pflanzlicher Hormone und Opine, ungewöhnliche Aminosäurederivate, verantwortlich sind. Die Opine dienen als Energiequelle für die Bakterien im Tumor. Manche Ti-Plasmide kontrollieren die Produktion verschiedener Klassen von Opinen, den Octopinen oder Nopalinen (Zupan et al., 2000). Allen gemeinsam ist, dass für den konjugativen Transfer der Ti-Plasmide zwischen verschiedenen *Agrobacterium*-Stämmen der jeweilige Opin-Typ anwesend sein muss. Der Regulationsfaktor, der für die Expression der Transfergene (*tra*) in Ti-Plasmiden vom Octopintyp hauptsächlich verantwortlich ist, ist OccR, ein LuxR-Homolog. OccR aktiviert in Gegenwart der Octopine die Expression von *traR*. TraR kontrolliert direkt die Transkription der *tra* Gene, benötigt dazu aber die Anwesenheit von *N*-(3-Oxaoctanoyl)-L-homoserinlacton (OOHL, Abb. 2), das von TraI synthetisiert wird. TraR und TraI sind beide homolog zu LuxR und LuxI (Fuqua & Winans, 1994). Durch Autoinduktion wird die Transkription von *traI* mit zunehmender OOHL-Konzentration verstärkt, da *traI* das erste Gen im *tra*-Operon ist. Durch diese Art der Zelldichte-abhängigen Regulation stellt *A. tumefaciens* sicher, dass die gesamte *Agrobacterium*-Population das Ti-Plasmids enthält (Whitehead et al., 2001).

Ein drittes Protein, TraM fungiert als Repressor der *tra* Gene. TraM inhibiert die Transkription von *traI* und *traA* (einem der *tra* Strukturgene) aber nicht von *traR*. TraM scheint direkt mit TraR zu interagieren und unterdrückt vermutlich die TraR/OOHL-vermittelte Genexpression bis eine genügend hohe Konzentration von OOHL vorhanden ist. Ein ähnliches System wurde auch in *Vibrio harveyi* beschrieben, wo LuxO die Aktivierung der *lux* Gene durch LuxR reprimiert (Pierson III et al., 1998; Whitehead et al., 2001).

Viele pathogene Organismen exprimieren ihre Virulenzfaktoren erst ab einer genügend hohen Zelldichte, um die Abwehrmechanismen des Wirtes nicht vorzeitig zu aktivieren, sondern ihn dann mit einer hohen Erregerzahl regelrecht zu überschwemmen. Ein Beispiel dafür ist die „Quorum Sensing“ -abhängige Produktion von Exoenzymen durch *Erwinia carotovora* (Whitehead et al., 2001). Vertreter der Gattung *Erwinia* sind wichtige Pflanzenpathogene, die Weichfäule in verschiedenen Pflanzenarten, darunter auch kommerziell wichtigen Gemüsearten wie Karotte, Kartoffel oder Zwiebel hervorrufen

können. *E. carotovora*-Stämme produzieren eine hohe Anzahl an Exoenzymen wie Pectinmethylesterasen, Pectatlyasen, Pectinlyasen, Polygalacturonasen, Cellulasen und Proteasen, die zur Maceration des Pflanzengewebes beitragen (Thomson et al., 1999).

Die Regulation der Exoenzyme in *Erwinia carotovora* erfolgt durch *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (OHHL, Abb. 2). Dieses AHL-Molekül wird durch die AHL-Synthasen ExpI, CarI und HsII (AhII) produziert, die je nach Stamm unterschiedliche Namen tragen (Pierson III et al., 1998). Das korrespondierende Regulatorprotein ist ExpR; es scheint die Transkription der Exoenzymgene negativ zu regulieren. Zusätzlich produzieren viele *E. carotovora*-Stämme  $\beta$ -Lactam-Antibiotika, z. B. Carbapenem. Mit Hilfe dieses Antibiotikums hemmt *E. carotovora* andere Bakterien, die das zerstörte Pflanzengewebe als Nahrungsquelle nutzen wollen. Auch die Produktion von Carbapenem ist OHHL-abhängig. Die Transkription der verantwortlichen Gene wird durch ein weiteres LuxR-Homolog CarR reguliert. *E. carotovora* besitzt zwar nur eine OHHL-Synthase, aber mindestens zwei Regulatorproteine vom LuxR-Typ (Whitehead et al., 2001).

Als Beispiel für die Beteiligung von AHL-vermittelter Genregulation in einem Biocontrol-Stamm sei die Produktion von Phenazinantibiotika in *Pseudomonas aureofaciens* genannt. Insbesondere der Erreger der Schwarzbeinigkeit von Weizen, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, wird durch Phenazine gehemmt. Analog zu anderen „Quorum Sensing“ Systemen ist die Regulation der Phenazinproduktion von den LuxRI Homologen PhzRI abhängig (Wood et al., 1997). PhzI ist dabei verantwortlich für die Synthese von *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL, Abb. 2), dem korrespondierenden AHL-Molekül für PhzR. Der Komplex aus PhzR/HHL stimuliert die Transkription der *phz*-Gene, die für die Synthese des Antibiotikums verantwortlich sind (Wood et al., 1997). Die Transkription der AHL-Synthase *phzI* wird durch das Zwei-Komponenten System GacA/GacS reguliert (Chancey et al., 1999). Solch eine übergeordnete Regulation von „Quorum Sensing“ Systemen durch globale Regulatoren wie dem Zwei-Komponentensystem GacA/GacS ist auch in anderen Pseudomonaden beschrieben, wie z. B. in der humanpathogenen Spezies *Pseudomonas aeruginosa* (Whitehead et al., 2001). Pierson III & Pierson (1996) vermuten, dass eine Infektion der Wurzeln mit dem Pilz einen Stimulus für die Phenazinproduktion darstellen könnte, hervorgerufen durch während der Infektion freigesetzte Wurzelexudate. Da fluoreszente Pseudomonaden an den Wurzeln von z. B. Tomatenpflanzen Mikrokolonien mit hohen Zelldichten bilden, wurde die Hypothese aufgestellt, dass dabei genügend hohe Populationsdichten aufgebaut werden

können und somit ein „Quorum“ ausreichend für die Phenazinproduktion erreicht wird (Chin-A-Woeng et al., 1997; Wood et al., 1997).

### 2.3. Quorum Sensing in *Serratia liquefaciens*

Das in dieser Arbeit untersuchte Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae und kann aus vielen verschiedenen Habitaten wie z. B. aus dem Boden, aus Wasser oder aus dem Intestinaltrakt von Tieren isoliert werden. Manche Stämme sind opportunistisch pathogen für den Menschen (Grimmont & Grimmont, 1992). Wie andere Spezies der Gattung *Serratia* produziert auch *S. liquefaciens* verschiedene Virulenzfaktoren wie Nukleasen, Lipasen, Phospholipasen oder Chitinasen (Givskov et al., 1988, 1997). *S. liquefaciens* ist beweglich und ein Stamm (MG1) hat die Fähigkeit, über feste Oberflächen, z. B. Agar, zu schwärmen. Die Bakterien differenzieren sich dabei in spezialisierte Schwärmerzellen am Rand der Bakterienkolonie. Schwärmerzellen sind lang, hyper-flagelliert und kolonisieren aufgrund ihrer starken Beweglichkeit große Flächen (Eberl et al., 1999).

*S. liquefaciens* MG1 produziert zwei *N*-Acyl-L-homoserinlactone, *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL, Abb. 2) und *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL, Abb. 2), in einem molaren Verhältnis von 10:1 mit Hilfe der AHL-Synthase SwrI (Eberl et al., 1996). Außerdem wurde ein LuxR-homologer Transkriptionsregulator gefunden, SwrR (Givskov et al., 1997). Eine Knock-out Mutation des *swrI* Genes (in dem Stamm *S. liquefaciens* MG44) führte zu einer fünffachen Reduktion der extrazellulären Proteaseaktivität und einer fast völlig reduzierten Fähigkeit zu schwärmen. Die Fähigkeit zu Schwimmen oder zur Differenzierung in Schwärmerzellen war nicht beeinträchtigt (Eberl et al., 1996). Durch exogene Applikation von BHL konnte der Defekt komplementiert werden. Über Transposonmutagenese wurde das Gen *swrA* isoliert, das durch BHL und HHL reguliert wird. Es codiert für eine die Oberflächenspannung herabsetzende Substanz, Serrawettin W2, und ist essentiell für das Schwärmen über feste Oberflächen (Eberl et al., 1999).

Eine 2D-Gelanalyse zeigte, dass mindestens 28 Gene über SwrRI reguliert werden (Givskov et al., 1998). Die Analyse weiterer Insertionsmutanten, die keine AHL mehr synthetisieren und auch nicht durch eine externe Zugabe von BHL wiederhergestellt werden können, führte zur Identifizierung eines weiteren Genes, das „Quorum Sensing“ reguliert ist. LipB ist Bestandteil des Lip Transporters, einem Typ I Proteinsekretionssystems, das für den

Export einer Lipase, Metalloprotease und eines S-Layer Proteins zuständig ist (Riedel et al., 2001).

#### 2.4. *N*-Acyl-L-homoserinlacton-vermittelte Interaktionen mit Eukaryoten

Viele Bakterienspezies verwenden gleichartige AHL-Moleküle zur Regulation „Quorum Sensing“-abhängiger Gene. Ein Informationsaustausch zwischen Bakterien unterschiedlicher Spezies ist daher sehr wahrscheinlich in Habitaten wie der Rhizosphäre, wo verschiedene AHL-produzierende Bakterien auf engem Raum miteinander leben (Whitehead et al., 2001). Es wurde gezeigt, dass etliche LuxR Homologe auch mit nicht-korrespondierenden AHL interagieren können (Cha et al., 1998). Wood et al. (1997) konnten *in vivo* eine Zell-Zell Kommunikation zwischen verschiedenen *P. aureofaciens* –Populationen in der Rhizosphäre nachweisen. Die Phenazinbiosynthese in einem AHL-negativen Stamm wurde durch AHL, produziert von einem anderen Stamm, stimuliert.

Da viele AHL-produzierende Bakterien mit höheren Organismen assoziiert sind (z. B. in Symbiosen oder pathogenen Beziehungen), ist es nicht überraschend, dass einige Eukaryoten Systeme entwickelt haben, mit den bakteriellen Systemen zu interagieren (Eberl, 1999). Die marine Rotalge *Delisea pulchra* produziert halogenierte Furanone, die eine stark inhibitorische Wirkung auf Mikroorganismen und Herbivore haben. Diese Substanzen ähneln in ihrer Struktur kurzkettigen AHL und sie können mit AHL-regulierten Funktionen interagieren. Sie hemmen z. B. das Schwärmen von *S. liquefaciens* MG1, die Lumineszenz von *V. fischeri* oder die Carbapenem-Synthese und Exoenzymproduktion in *E. carotovora* (Givskov et al., 1996; Manefield et al., 2001). Furanone scheinen dabei als AHL-Analoga, die AHL-Bindestelle der LuxR-Proteine zu besetzen (Manefield et al., 2001). Zudem initiieren sie einen beschleunigten Abbau von LuxR.

Manche AHL scheinen auch direkt als Virulenzfaktoren zu fungieren. Das langkettige AHL *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton (OdDHL), das von dem humanpathogenen Keim *P. aeruginosa* produziert wird, kann als immunmodulierendes Agens im Immunsystem von Säugern wirken (Telford et al., 1998). Es konnte die Proliferation von Lymphozyten und die Produktion des Tumornekrose Faktors durch Macrophagen hemmen. Außerdem stimuliert es die Produktion von Interleukin-8 (IL-8) in menschlichen Fibroblasten und Epithelzellen (Smith et al., 2001). Die erhöhte IL-8-Produktion in einem frühen Stadium der Infektion der Lunge mit *P. aeruginosa* löst durch angelockte Neutrophile Entzündungsreaktionen aus. Neueste Studien dieser Gruppe fanden heraus, dass noch weitere entzündungsfördernde

Reaktionen (Induktion von Cyclooxygenase-2, Prostaglandin E2) durch OdDHL ausgelöst werden können (Smith et al., 2002).

### 3. Pilze als Krankheitserreger bei Tomatenpflanzen

Die Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), ein Vertreter der Solanaceae, stellt heute eine der wichtigsten Gemüsepflanzen dar. Sie ist eine alte Kulturpflanze Südamerikas und gelangte nach der Entdeckung Amerikas als Zierpflanze nach Europa. Erst nach dem ersten Weltkrieg rückte sie zur Weltwirtschaftspflanze auf. Heute wird sie in den meisten Ländern der tropischen und gemäßigten Zonen kommerziell im Freiland oder Gewächshaus angebaut. Im Jahr 2000 wurden 98 Millionen Tonnen Tomatenfrüchte produziert (<http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.html>). Als Tropenpflanze benötigt sie viel Licht und Wärme und ist in unseren Breiten bei kühlem regnerischen Wetter oft anfällig gegenüber einer Reihe von bakteriellen und pilzlichen Krankheitserregern. Im intensiven Tomatenanbau können besonders Pilzkrankheiten zu hohen Ernteeinbußen führen und zu ihrer Kontrolle ist ein hoher Verbrauch an chemischen Pflanzenschutzmitteln nötig.

Die wichtigsten pathogenen Pilze bei Tomatenpflanzen wie z. B. *Alternaria* spp., *Botrytis* spp. oder *Cladosporium* spp. haben eine perthotrophe Lebensweise, d. h. sie befallen lebendes Gewebe, töten es ab und ernähren sich von den freigesetzten Nährstoffen (Prell & Day, 2001). Die meisten Pilze weisen ein enges Wirtsspektrum auf, das von Pathogenitätsgenen und -faktoren, meist Toxinen oder Exoenzymen, bestimmt wird. Eine Ausnahme stellen z. B. Vertreter der Gattungen *Botrytis* oder *Alternaria* dar, die ein sehr weites Wirtsspektrum besitzen (Prell & Day, 2001). Als opportunistische Krankheitserreger kolonisieren sie lebende Pflanzen, die bereits gestresst oder senescent sind. Sie dringen über Verwundungen der Blätter oder des Sprosses ein, manchmal nützen Hyphen auch Stomata als Eintrittspforten in den interzellulären Raum. Manche Pilze bilden spezielle Penetrationsstrukturen (Appressoria) aus und dringen damit aktiv durch die Epidermis ins Blatt ein (Prell & Day, 2001).

Im kommerziellen Tomatenanbau ist vor allem die Dürffleckenkrankheit gefürchtet, die von *Alternaria solani* Sorauer hervorgerufen wird (Agrios, 1997). Der weltweit verbreitete Pilz wird durch regnerisches Wetter begünstigt. Zu Beginn der Infektion treten kleine braune Flecken bevorzugt auf den älteren Blättern auf, die sich vergrößern und eine schwarze Farbe annehmen. Das Blatt wird gelb, welkt und fällt schließlich ab. Der Blattfall



beginnt an der Stängelbasis, die Infektion kann so weit gehen, dass stark befallene Pflanzen keine Blätter mehr besitzen und dadurch die Qualität und Menge der Früchte stark leidet. Die Bekämpfung dieser Krankheit erfolgt mit Fungiziden, es werden dafür jährlich ca. 32 Millionen Dollar ausgegeben (<http://www.bba.de/english/database/psmengl/pilz.html>). Weitere *Alternaria*-Spezies wie z. B. *A. alternata* (Fr.:Fr.) Keissler verursachen Fruchtfäulen oder Stängelkrebs (Agrios, 1997).

Ein weiterer Pilz, der bevorzugt Früchte befällt, ist *Cladosporium herbarum*. Er verursacht besonders an grünen Früchten kleine oliv-grüne Flecken, die sich vergrößern und gelb-oliv werden. Ein weiterer Vertreter dieser Gattung, *C. fulvum*, der Erreger der Samtfleckenkrankheit, stellt in Gewächshäusern ein großes Problem dar (Agrios, 1997).

Die Grauschimmelkrankheit, deren Verursacher *Botrytis cinerea* einen sehr großen Wirtsbereich besitzt und nicht nur im Gemüseanbau, sondern vor allem im Weinbau zu großen Ertragsausfällen führt, wird wie die meisten Pilzkrankheiten durch feuchte und kalte Witterung begünstigt (Blancard, 1997).

Große Schäden kann *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary als Erreger von Krautfäulen bei Solanaceen anrichten. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Krankheitserregern ist die Lebensweise von *P. infestans* nicht ausschließlich perthotroph, sondern, vor allem während des asexuellen Wachstums, in hohem Maße biotroph, d. h. der Organismus ernährt sich von lebendem Gewebe (Judelson, 1997). Die Gattung *Phytophthora* gehört zu der Gruppe der Oomyceten, die sich in Metabolismus, Zusammensetzung der Zellwand und rRNA Sequenz von den höheren Pilzen unterscheidet. Sie wird daher von Taxonomen mit den Braun- und Kieselalgen in eine eigene Gruppe eingeordnet (Judelson, 1997). Bei niedrigen Temperaturen und hoher Luftfeuchtigkeit breitet sich der Erreger rasch aus und kann innerhalb einer Woche befallene Pflanzen zerstören. Als Infektionsquellen dienen infizierte Samenvorräte, Früchte oder vom Wind verbreitete Sporen.

#### **4. Systemische Resistenz in Pflanzen**

Pflanzen haben eine Reihe von Abwehrstrategien entwickelt, um sich gegen den Angriff von Pathogenen zur Wehr zu setzen. Manche dieser Abwehrmechanismen sind konstitutiv, d. h. sie sind in der Pflanze schon vor dem Pathogenbefall vorhanden, andere werden erst nach einem Kontakt mit den Eindringlingen aktiviert. Diese Reaktionen werden unter dem Begriff induzierte oder erworbene Resistenz zusammengefasst (Sticher et al., 1997).

In inkompatiblen Interaktionen reagieren pflanzliche Resistenzgene (R-Gene) mit korrespondierenden Avirulenzgenen (*avr*) der Pathogene (Bonas & Van den Ackerveken, 1997). Es wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die zu Zelltod an den befallenen Stellen führt und den Krankheitserreger so an seiner weiteren Verbreitung innerhalb des Blattes oder der Pflanze hindert. Fehlen Resistenzgene, so führt eine Infektion mit virulenten Pathogenen häufig zu einer Ausbreitung des Pathogens über die ganze Pflanze und zur Schädigung ganzer Blätter bis zum Tod der Pflanze. Die Bildung von scharf abgegrenzten Läsionen durch kontrollierten Zelltod ist Teil der hypersensitiven Antwort (hypersensitive response, HR), die noch weitere Reaktionen wie z. B. Verstärkung der Zellwand durch Lignifizierung oder Ablagerung von Callose sowie eine Produktion von antimikrobiell wirksamen Substanzen wie Phytoalexinen und Proteinen (Chitinasen,  $\beta$ -1,3-Glucanasen) beinhaltet (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Lam et al., 2001). HR kann nicht nur durch die Interaktion von Resistenzgenen mit Avirulenzgenprodukten ausgelöst werden, auch andere Elicitoren wie z. B. Bestandteile von Pilz- und Pflanzenzellwänden können als Auslöser wirken (Ebel, 1999; Ebel & Mithöfer, 1998). Wichtige Signale bei der Auslösung des Zelltods sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxidradikale ( $O_2^{\cdot-}$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), die bereits wenige Minuten nach der Infektion als Teil des „Oxidativen Burst“ akkumulieren (Beers & McDowell, 2001; Jabs, 1999; Lamb & Dixon, 1997). Hohe Mengen an ROS können nicht nur direkt Pathogene hemmen, sondern spielen bei HR eine bestimmende Rolle in Kombination mit weiteren Signalen bei der Läsionenbildung (Chamnongpol et al., 1998; Jabs, 1999). Eines dieser Signale, Stickstoffmonoxid (NO), kann selbst zwar keinen Zelltod auslösen, trägt aber zusammen mit ROS, vor allem  $H_2O_2$ , zur Induktion des Zelltodes und zur Induktion von ROS-vermittelten Abwehrgenen bei (Delledonne et al., 2001; Durner & Klessig, 1999). Eine Infektion mit einem HR-auslösenden Pathogen kann zu einer lokalen Resistenz (local acquired resistance, LAR) führen, dabei zeigten Tabakpflanzen bei einer erneuten Infektion in einer Zone von ca. 5 mm rund um die Läsionen eine erhöhte Resistenz gegen das Tabak Mosaik Virus (TMV, Costet et al., 1999).

Neben diesen lokalen Reaktionen verfügen Pflanzen über eine Reihe von Mechanismen und Signalwegen, um in einen Zustand der erhöhten Krankheitsresistenz bei nachfolgenden Infektionen zu gelangen (Abb. 3). Infektionen mit nekrotisierenden Pathogenen, nicht-pathogenen Rhizosphärebakterien oder Verwundung durch z. B. Insektenfraß können diese systemischen Reaktionen auslösen (Pieterse & Van Loon, 1999).

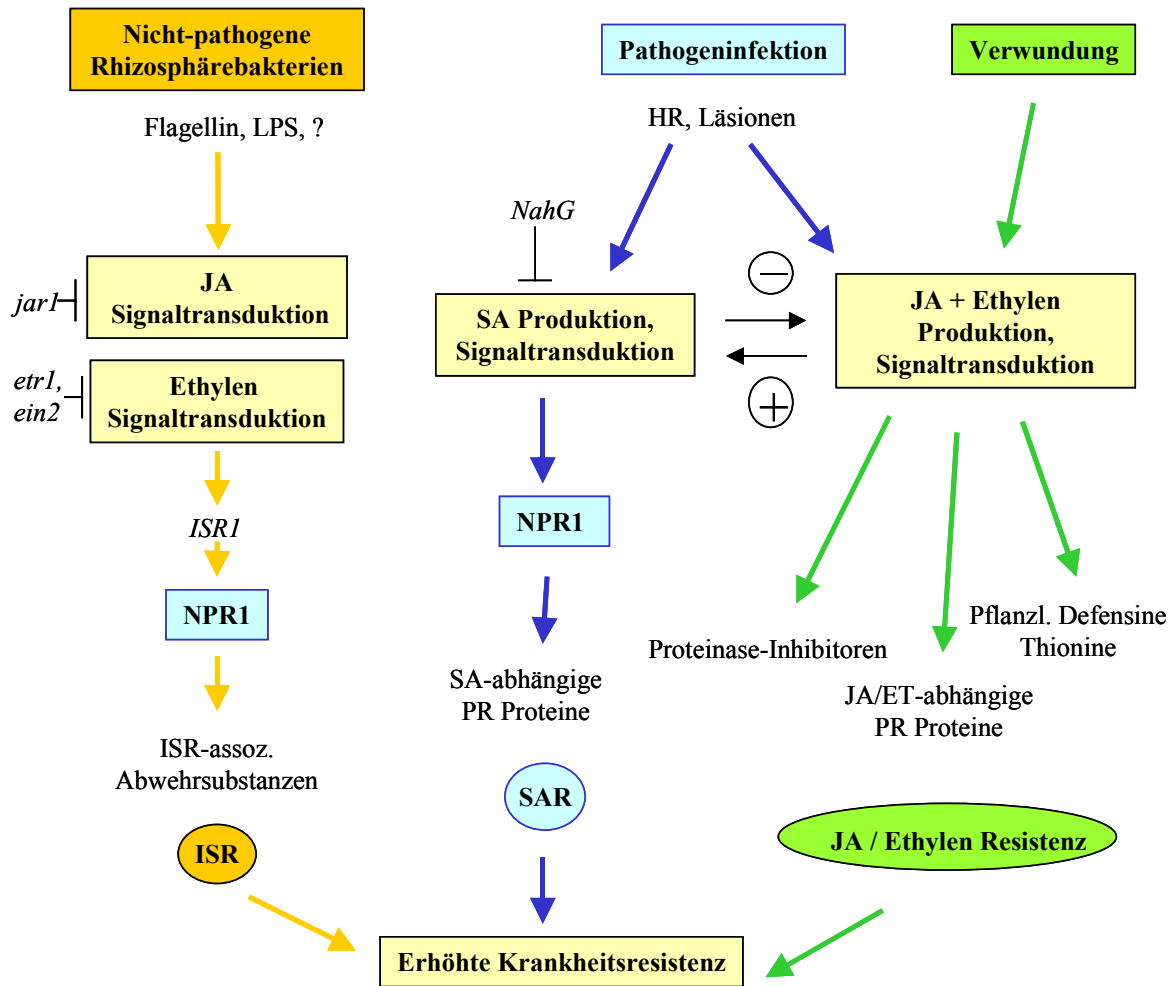


Abb. 3: Übersicht über Signalwege in Pflanzen, die zu einer systemisch erhöhten Krankheitsresistenz führen können. Als Auslöser können Pathogeninfektionen, nicht-pathogene Rhizosphärebakterien oder Verwundung durch z. B. Insektenfraß fungieren. Jeder dieser Signalwege führt zu einem typischen Spektrum an Abwehrproteinen (u. a. „pathogenesis-related proteins“, PR-Proteine) und niedermolekularen Substanzen, die z. T. noch nicht charakterisiert sind. Das regulatorische Protein NPR1 wird sowohl für SAR als auch für ISR benötigt. *Arabidopsis*-Mutanten, deren Signaltransduktion für Jasmonat (*jar1*) oder Ethylen (*etr1*, *ein2*) gestört ist, können keine ISR entwickeln. Transgene *nahG*-Pflanzen, die keine Salicylsäure akkumulieren können, bilden keine SAR aus. SA: Salicylsäure, JA: Jasmonat. Die Abbildung wurde modifiziert nach Pieterse & Van Loon (1999).

Eine Infektion mit Pathogenen aktiviert in den meisten Fällen einen Salicylsäure-abhängigen Signalweg, der zur systemisch erworbenen Resistenz (SAR) führt (Abb. 3, Mitte). Der Salicylsäure nachgeordnet ist das regulatorische Protein NPR1; es bewirkt die Transkription Salicylsäure-abhängiger Abwehrgene, die zu den PR(pathogenesis related)-Proteinen gehören (Kinkema et al., 2000; Van Loon, 1999). Bei Pathogenbefall können aber auch die Pflanzenhormone Ethylen und Jasmonat beteiligt sein (Durner et al., 1997; Pieterse & Van

Loon, 1999), die außerdem eine wichtige Rolle bei Verwundungsreaktionen und bei einer durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien ausgelösten Form der erhöhten Resistenz in *Arabidopsis thaliana* (induzierte systemische Resistenz, ISR) spielen (Abb. 3, links; Pieterse & Van Loon, 1999).

Verwundungen, z. B. nach Insektenfraß, induzieren in Pflanzen erhöhte Gehalte an Ethylen und Jasmonat (Abb. 3, rechts). Diese beiden Signalstoffe wiederum führen zu einer erhöhten Produktion von Proteinase-Inhibitoren, pflanzlichen Defensinen, Thioninen und PR-Proteinen (León et al., 2001). Defensine und Thionine sind relativ kleine, basische Cysteinreiche Polypeptide, die toxisch auf phytopathogene Bakterien wirken und denen daher eine Rolle bei der pflanzlichen Abwehr zugesprochen wird (Vignutelli et al., 1998).

Eine intakte Ethylen- und Jasmonat-Signaltransduktion wird auch für den ISR-Signalweg benötigt (Abb. 3, links). Den beiden Pflanzenhormonen nachgeordnet ist *ISR1*, ein noch nicht näher charakterisiertes Gen, dessen Locus aber im Genom von *A. thaliana* beschrieben wurde und das regulatorische Protein NPR1, das auch bei SAR benötigt wird (Pieterse et al., 2001; Ton et al., 1999; vgl. Einleitung 4.2). *Arabidopsis*-Mutanten, deren Signaltransduktion für Ethylen (*etr1*, *ein2*) und Jasmonat (*jar1*) gestört ist, können keine ISR entwickeln (Pieterse et al., 2001). Der SAR-Signalweg kann in *nahG* unterbrochen werden, da diese Linie ein bakterielles Gen (*nahG*) besitzt, das Salicylsäure abbaut, so dass keine Salicylsäure akkumulieren kann (Durner et al., 1997).

#### **4.1. Systemic acquired resistance (SAR) – ein Salicylsäure-abhängiger Signalweg**

Eine lokale Resistenz kann sich systemisch innerhalb weniger Stunden bis Tage nach Auftreten von HR über die ganze Pflanze ausbreiten (Durner et al., 1997). Bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen oder auch mit anderen Pathogenen aktiviert die Pflanze schneller und effektiver ihre Abwehrreaktionen und zeigt weniger starke Krankheitssymptome (Conrath et al., 2002; Sticher et al., 1997).

Ein unbedingt notwendiges Signalmolekül bei der systemisch erworbenen Resistenz (systemic acquired resistance, SAR) ist Salicylsäure (Abb. 3, 4). Sie wird sowohl in infiziertem Gewebe bei HR als auch in weiter entfernten gesunden Teilen der Pflanze gebildet und ist in vielen dikotylen Pflanzenarten (Gurke, Tabak, Tomate, Kartoffel, Ackerschmalwand) mit dem Auftreten der SAR assoziiert (Alvarez, 2000). Eine exogene Applikation von Salicylsäure oder Acetyl-Salicylsäure (Aspirin) an Tabakpflanzen erhöht die

Resistenz gegenüber verschiedenen Pathogenen, z. B. TMV, und induziert die gleichen Abwehrgene, die auch bei SAR auftreten (Durner et al., 1997).

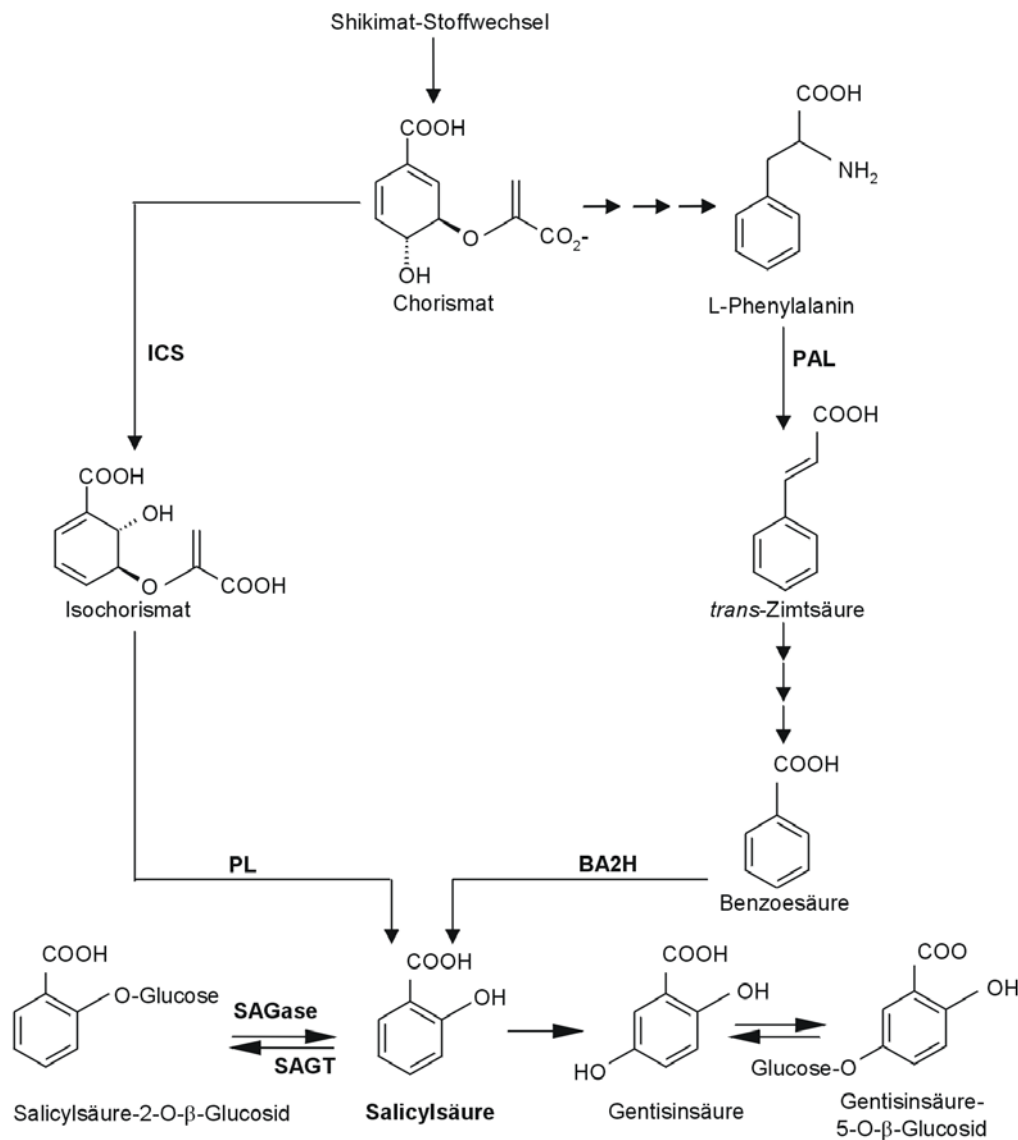


Abb. 4: Mögliche Biosynthesewege der Salicylsäure. PAL = Phenylalanin-Ammoniak-Lyase, BA2H = Benzoessäure-2-Hydroxylase, SAGase = Salicylsäure-β-Glucosidase, SAGT = UDP-Glucose:Salicylsäure Glucosyltransferase, ICS = Isochorismat-Synthase, PL = Pyruvat-Lyase, zusammengestellt aus Hock & Elstner (1995) und Wildermuth et al. (2001).

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen in der Lage, Salicylsäure zu synthetisieren und Salicylsäure-abhängige physiologische Programme zu aktivieren (Alvarez, 2000). Salicylsäure wird über den Shikimat-Stoffwechselweg aus Chorismat gebildet, woraus in mehreren Schritten zunächst Phenylalanin und schließlich Salicylsäure gebildet wird (Abb. 4, rechts). Das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) katalysiert den ersten Schritt der

Synthese, die Umsetzung von Phenylalanin zu *trans*-Zimtsäure (Ribnicky et al., 1998). PAL ist ein hochreguliertes Enzym, dessen Transkription durch Pathogene, mechanische Schäden oder abiotischen Stress induziert werden kann (Alvarez, 2000).

Nach mehreren Zwischenschritten wird aus *trans*-Zimtsäure Benzoessäure gebildet, welche durch Benzoessäure-2-Hydroxylase zu Salicylsäure umgesetzt wird (Abb. 4, Ribnicky et al., 1998). Neueste Erkenntnisse zeigten, dass es möglicherweise noch einen zweiten Syntheseweg in Pflanzen gibt. Manche Bakterien, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa*, verwenden zur Synthese von Salicylsäure Isochorismat-Synthase (ICS) und Pyruvat-Lyase (PL, Abb. 4, links). In *Arabidopsis* wurden kürzlich Isoformen der Isochorismat-Synthase kloniert, deren Expression durch Pathogenbehandlung induziert werden konnte (Wildermuth et al., 2001). Die Autoren vermuten, dass dieser Syntheseweg auch in anderen Pflanzenarten vorhanden sein könnte, da sie über Sequenzvergleiche in Datenbanken zur ICS homologe Sequenzen auch in Soja und Tomate fanden.

Ein großer Anteil der Salicylsäure liegt in Pflanzen in konjugierter Form, meist glycosyliert, vor (Abb. 4). Das wichtigste Konjugat in Tabak ist Salicylsäure-2-O- $\beta$ -glucosid. Es akkumuliert bevorzugt in der Nähe von HR-Läsionen durch die Aktivität von Salicylsäure-Glycosyltransferasen, die durch hohe Salicylsäure-Konzentrationen induziert werden können (Enyedi & Raskin, 1993; Lee & Raskin, 1999). Daneben kann Salicylsäure zu Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoessäure) umgesetzt werden (Abb. 4). In Tomate scheint Gentisinsäure auch an Abwehrreaktionen beteiligt zu sein, da nach einer Behandlung mit Gentisinsäure erhöhte Mengen an PR-Proteinen beobachtet wurden (Bellés et al., 1999). Diese PR-Proteine (Isoformen von basischen Chitinasen und Thaumatin-ähnliches Protein) wurden nicht durch Salicylsäure induziert. Es ist daher anzunehmen, dass sich Gentisinsäure und Salicylsäure in der Abwehr von Tomatenpflanzen gegenseitig ergänzen (Bellés et al., 1999). Methylsalicylat, ein gasförmiges flüchtiges Derivat von Salicylsäure, könnte als Botenstoff innerhalb des Gasraumes der Blätter oder zwischen benachbarten Pflanzen fungieren (Heiden et al., 1999; Ribnicky et al., 1998).

Systemic acquired resistance (SAR) geht mit der Bildung eines charakteristischen Spektrums an Abwehrproteinen einher, die zu den PR (pathogenesis-related) –Proteinen gehören (Abb. 3). PR-Proteine sind pflanzliche Proteine, die während der Pathogenese oder verwandten Situationen in infiziertem Gewebe akkumulieren (Van Loon, 1997, 1999). Aufgrund ihrer Eigenschaften und Homologien wurden sie in 14 Klassen aufgeteilt (Van Loon & van Strien, 1999). PR-Proteine wurden bisher in neun Pflanzenfamilien identifiziert; am besten charakterisiert sind sie in Tabak und Tomate (Alvarez, 2000). In Tomatenpflanzen

wurden zwei Familien von Chitinasen (PR3, -4), eine von  $\beta$ -1,3-Glucanasen (PR2), eine von Proteinase-Inhibitoren (PR6) und eine von spezifischen Peroxidasen (PR9) beschrieben. Daneben gibt es noch eine Familie, deren Funktion bisher unbekannt ist (PR1) und die Thaumatin-ähnlichen PR-Proteine (PR5; Alvarez, 2000; Van Loon & van Strien, 1999).

In Tabak werden bei der SAR ausschließlich saure PR-Proteine gebildet, die im intrazellulären Raum akkumulieren (Van Loon, 1997). Als Marker für SAR wurde PR1a definiert, ein saures PR-Protein, das durch Applikation von Salicylsäure induziert werden kann und dessen Funktion unbekannt ist (Durner et al., 1997).

Die Bedeutung der Salicylsäure bei SAR konnte mit Hilfe von transgenen Pflanzen demonstriert werden, die ein bakterielles Gen (*nahG*) für eine Salicylsäure Hydroxylase besitzen (Abb. 3). In diesen Pflanzen wird Salicylsäure zu Catechol abgebaut und kann nicht mehr akkumuliert werden (Durner et al., 1997; You et al., 1991). Eine Konsequenz davon ist, dass *nahG*-Pflanzen eine reduzierte PR-Proteingenexpression zeigen, keine SAR ausprägen können und ihre Fähigkeit verlieren, das Wachstum und die Ausbreitung von Pathogenen zu begrenzen (Durner et al., 1997). Obwohl bekannt ist, dass Salicylsäure im Phloem über weite Strecken transportiert werden kann, scheint Salicylsäure nicht das alleinige mobile Signal zu sein, welches SAR auch in distalen Blättern auslöst (Durner et al., 1997; Shulaev et al., 1995).

Der Mechanismus, durch den Salicylsäure eine erhöhte Resistenz vermittelt und ihr Zusammenspiel mit reaktiven Sauerstoffspezies, wird kontrovers diskutiert. Salicylsäure kann in Tabak die  $H_2O_2$ -abbauenden Enzyme Catalase und Ascorbatperoxidase inhibieren und den Gehalt an  $H_2O_2$  erhöhen (Chen et al., 1993; Durner & Klessig, 1995). Außerdem konnte Salicylsäure in Tabak-Zellkulturen die Bildung von Superoxid induzieren (Kawano & Muto, 2000). Diese Befunde sprechen für eine Rolle von Salicylsäure in der Signalkette oberhalb von ROS. Andere Modelle vermuten Salicylsäure den ROS nachgeordnet, da die Salicylsäurebiosynthese durch  $H_2O_2$  induziert werden kann (Bi et al., 1995; Neuenschwander et al., 1995). Bei einer Infektion von Tabakpflanzen mit einem avirulentem Stamm von *P. syringae* konnte ein biphasischer Anstieg der Salicylsäuregehalte nachgewiesen werden (Draper, 1997). Jede Phase der ROS-Akkumulation war von einem Anstieg der Salicylsäurekonzentration gefolgt. Van Breusegem et al. (2001) schlagen vor, dass Salicylsäure und ROS bei der Pathogenabwehr als selbst-amplifizierendes System wirken:  $H_2O_2$  induziert Salicylsäure, Salicylsäure verstärkt die  $H_2O_2$ -Akkumulation. Beide Signalstoffe fördern den Zelltod.

Im Signalweg der Salicylsäure nachgeordnet ist das regulatorische Protein NPR1 bei der Aktivierung der PR1 Expression (Abb. 3, Glazebrook, 2001). Salicylsäure bewirkt einen

Anstieg in der Konzentration von NPR1 im Nukleus. Dieses Protein wird dort für die Aktivierung der Expression von PR-1 benötigt (Kinkema et al., 2000). Es scheint also direkt an der transkriptionellen Kontrolle der Expression von Abwehrgenen beteiligt zu sein. Zudem zeigt es Homologien zu einem Protein, das Bestandteil des ROS-regulierten NFκB Signalweges in Säugern ist (Ryals et al., 1997). Wie dieses Protein besitzt es Ankyrin-reiche Wiederholungen, die bei Protein-Protein Interaktionen eine Rolle spielen. Zudem wurde eine Interaktion mit bZIP Transkriptionsfaktoren aus *Arabidopsis* gezeigt (Zhang et al., 1999).

#### **4.2. Durch Rhizosphärebakterien induzierte systemische Resistenz – ein Jasmonat- und Ethylen-abhängiger Signalweg**

Nicht-pathogene Rhizosphärebakterien können die pflanzliche Abwehr stimulieren und Pflanzen so gegen verschiedene Pathogene resistenter machen (vgl. Tabelle 1). Die ersten Berichte, dass Abwehrreaktionen durch Rhizosphärebakterien ausgelöst werden können, wurden unabhängig voneinander 1991 für drei Pflanze-Pathogen Systeme beschrieben: Gurke und Anthracnose (Wei et al., 1991), Nelke und Fusarienwelke (Van Peer et al., 1991), sowie Bohne und Fettfleckenkrankheit (Alström, 1991). Obwohl das phänotypische Erscheinungsbild der systemischen Resistenz, ausgelöst durch die Kolonisierung der Wurzeln mit bestimmten Rhizosphärebakterien, abiotischen Faktoren oder nekrotisierenden Mikroorganismen sehr ähnlich ist, unterscheiden sich die biochemischen Änderungen in der Pflanze (Whipps, 2001). Daher wurde der Begriff „durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien induzierte systemische Resistenz“ (ISR) für bakterielle Auslöser eingeführt und „systemisch erworbene Resistenz“ (SAR) für andere Formen beibehalten (Pieterse et al., 1996). In den letzten Jahren wurden von der Gruppe um C. Pieterse und L. Van Loon große Anstrengungen unternommen, um anhand eines Modellsystems aus *Arabidopsis* und dem Rhizosphärebakterium *Pseudomonas fluorescens* WCS417r die involvierten Signalstoffe und -wege zu charakterisieren (Pieterse et al., 2001). Im Moment stellt dieses System das am besten charakterisierte Beispiel für ISR dar, daher wird der Begriff ISR in dieser Arbeit ausschließlich in Bezug auf *P. fluorescens* WCS417r vermittelte Resistenz verwendet.

Eine Beteiligung von Salicylsäure an ISR von *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis* konnte ausgeschlossen werden, da dieser Stamm sowohl in Wildtyp-*Arabidopsis*- als auch in *nahG*-Pflanzen eine ISR gegenüber *P. syringae* pv. *tomato* auslösen konnte (Van Wees et al., 1997). Die Symptome der *P. syringae*-Infektion, Chlorosen, die sich zu Nekrosen entwickeln,



konnten dabei auf die Hälfte der Blätter beschränkt werden, im Vergleich zu nicht-induzierten Pflanzen. Eine Akkumulation der mRNAs oder Proteine für PR1, 2 und 5 wurde in ISR-ausbildenden Pflanzen nicht beobachtet, somit scheint ISR unabhängig von Salicylsäure und typischen PR-Proteinen zu sein (Pieterse et al., 1996).

Studien mit *Arabidopsis*-Mutanten zeigten, dass eine intakte Jasmonat- und Ethylenperzeption und Signaltransduktion für ISR-Ausprägung nötig ist (Pieterse et al., 1998). Die *Arabidopsis*-Mutanten *etr1* und *ein2-ein7*, deren Ethylensignalweg defekt ist, wie auch *jar1*, die eine verminderte Sensitivität für Jasmonat besitzt, sind in ihrer Fähigkeit, eine ISR zu entwickeln, gestört (Abb. 3). Im Gegensatz dazu können sie eine Pathogen-induzierte SAR unverändert exprimieren (Knoester et al., 1999; Pieterse et al., 1998).

Das pflanzliche Hormon Ethylen reguliert eine Vielzahl von Wachstums- und Entwicklungs-abhängigen Prozessen wie z. B. Samenkeimung, Zellelongation, Fruchtreife, Seneszenz und Abzission, während Jasmonat als Stresssignal primär bei Verwundungsreaktionen eine Rolle spielt (Johnson & Ecker, 1998; Reymond & Farmer, 1998). Erhöhte Ethylenemissionen werden bei Pathogenbefall oder Verwundung gemessen, treten aber auch bei abiotischem Stress wie Ozonbehandlung oder Überflutung auf (Abeles et al., 1992; Chang & Shockey, 1999; Sandermann et al., 1998). Pflanzen, deren Ethylensignalweg nicht mehr intakt ist, zeigen entweder eine erhöhte Anfälligkeit oder eine erhöhte Resistenz bei Pathogenbefall abhängig von der Pflanzenart und dem jeweiligen Erreger (Reymond & Farmer, 1998).

Die Steuerung Ethylen-abhängiger Prozesse in Pflanzen wird durch die Fähigkeit der Zellen bestimmt, das Phytohormon wahrzunehmen, das Signal von der Membran zum Zellkern weiterzuleiten und die Expression der spezifischen Effektorgene zu aktivieren. Die Untersuchung der Ethylenperzeption und weiteren Signaltransduktion begann mit *Arabidopsis*-Mutanten, die einen Defekt in der Ethylenantwort besitzen. Mutanten, die Ethylen nicht wahrnehmen können, wurden als nicht sensitiv für Ethylen (ethylene insensitive, *ein*) beschrieben. Daneben gibt es noch eine Reihe Ethylen überproduzierende oder konstitutive Signalmutanten (Stepanova & Ecker, 2000). Der Signaltransduktionsweg von der Erkennung bis zur Expression Ethylen-abhängiger Gene besteht bisher aus über einem Dutzend Proteinen (Johnson & Ecker, 1998; Stepanova & Ecker, 2000). Auch in Tomatenpflanzen wurden Ethylenmutanten identifiziert (Barry et al., 2001; Tieman et al., 2000).

Die Erkennung von Ethylen erfolgt durch eine Familie integraler Membranrezeptoren, die Ähnlichkeiten zu bakteriellen Zwei-Komponentensystemen besitzen (Chang & Shockey,

1999). In *Arabidopsis* und Tomate wurden bisher fünf bzw. sechs Mitglieder beschrieben, die differentielle Expressionsmuster zeigen (Ciardi et al., 2000; Stepanova & Ecker, 2000; Tieman & Klee, 1999; Wang et al., 2002). In Abwesenheit von Ethylen wird die Signalweiterleitung durch die Rezeptoren reprimiert, vermutlich aktivieren sie ein negatives Regulatorprotein (CTR1). CTR1 scheint Bestandteil einer Kaskade aus Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) zu sein, die aber noch nicht näher identifiziert ist (Chang & Shockey, 1999). Bindet Ethylen an den Rezeptor, bleibt die Aktivierung von CTR1 aus und eine Kaskade aus weiteren positiven regulatorischen Elementen (z. B. EIN2) führt über spezifische Transkriptionsfaktoren (z. B. ERF1) zur Expression Ethylen-abhängiger Gene (Stepanova & Ecker, 2000).

Jasmonsäure und sein Methylester Methyljasmonat sind Metabolite von polyungesättigten Fettsäuren, die als Oxylipine zusammengefasst werden (Langebartels & Kangasjärvi, 2003). Jasmonsäure ist ein Fettsäurederivat aus zwölf Kohlenstoffatomen und wird über den Octadecanoid-Stoffwechselweg via Linolensäure synthetisiert (Mueller, 1997). Linolensäure wird aus pflanzlichen Membranen nach Verwundung durch Phospholipasen freigesetzt. Lipoxygenasen katalysieren den Einbau von molekularem Sauerstoff in Linolensäure, es entsteht Hydroperoxylinolensäure, woraus nach Cyclisierung und Oxidation Jasmonsäure entsteht. Von der Hydroperoxy-Verbindung können mindestens sieben weitere Stoffwechselwege ausgehen, die alle zu Signalsubstanzen führen, die an diversen Entwicklungsprozessen oder Antworten auf Umwelteinflüsse beteiligt sein könnten (Berger, 2002). Jasmonsäure kann noch weiter modifiziert werden, z. B. durch die Addition von Methyl- oder Hydroxylgruppen oder durch Konjugation von Aminosäuren (Berger, 2002). All diese Derivate kommen in veränderlichen Anteilen in Pflanzen vor und spielen als Signalsubstanzen eine Rolle.

Der Gehalt an Jasmonaten ist in jungen wachsenden Geweben am höchsten und steigt in Zellkulturen nach Behandlung mit Elicitoren, UV-Licht, Pathogenen oder Ozon an (Conconi et al., 1996; Creelman & Mullet, 1995; Rao et al., 2000). Eine Applikation von exogenen Jasmonaten induziert eine Reihe von Genen, die auch auf andere Stressoren wie Verwundung oder Pathogeninfektion ansprechen (Berger, 2002). Über die Perzeption von Jasmonat und Weiterleitung des Signals ist noch nicht viel bekannt, obwohl inzwischen eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten beschrieben wurden, die Defekte im Jasmonatsignalweg besitzen (Berger, 2002).

Überraschenderweise blieb während der ISR der Gehalt an Jasmonat und die Ethylenproduktion sowohl in den Wurzeln wie auch in den Blättern unverändert, d. h.

während der ISR werden nicht die Gehalte der Signalstoffe erhöht, sondern die pflanzliche Sensitivität gegenüber diesen beiden Hormonen (Pieterse et al., 2000). Es konnte auch keine erhöhte Expression typischer Ethylen- und / oder Jasmonat-induzierbarer Gene wie *HEL* (Hevein-Typ Chitinase), *ChiB* (ChitinaseB), *PDF1.2* (pflanzliches Defensin), *AtVSP* (vegetative storage protein), *LOX1* (Lipoxygenase1), *LOX2*, *PAL1*, *PIN2* (Proteinase-Inhibitor II) festgestellt werden (Van Wees et al., 1999). Nach einer Infektion mit *P. syringae* pv. *tomato* zeigten induzierte Pflanzen erhöhte Transkriptmengen von *AtVSP*; scheinbar werden bei der ISR ganz spezifische Jasmonat-abhängige Gene erst nach der Pathogeninfektion in ihrer Expression verstärkt. Diese Art der schnelleren und stärkeren Aktivierung der Abwehr, auch „Priming“ oder Sensibilisierung genannt, findet man als erhöhte Transkriptakkumulation von PR-Genen auch während der Expression einer pathogen-induzierten SAR (Conrath et al., 2002; Durner et al., 1997).

Die meisten *Arabidopsis thaliana*-Ökotypen entwickeln nach Behandlung mit *P. fluorescens* WCS417r oder *P. putida* WCS358 ISR, nur die Ökotypen RLD und WS-0 besitzen nicht diese Fähigkeit (Ton et al., 1999; Van Wees et al., 1997). Außerdem sind diese beiden Ökotypen wesentlich anfälliger gegenüber *P. syringae* pv. *tomato*, die Symptome entwickeln sich schneller und stärker als z. B. im Ökotyp Col. Kreuzungen zwischen RLD und WS-0 auf der einen Seite und RLD und WS-0 mit den ISR-ausbildenden Ökotypen Col und Landsberg *erecta* (*Ler*) auf der anderen Seite ergaben, dass RLD und WS-0 ein rezessives Allel eines Genes besitzen, das für eine natürlich vorhandene Resistenz gegen *P. syringae* pv. *tomato* und für die Fähigkeit ISR auszuprägen, verantwortlich ist. Der entsprechende Locus wurde *Isr1* genannt (Ton et al., 1999). RLD und WS-0 zeigten sich weniger sensitiv gegenüber einer Ethylen-induzierten Hemmung des primären Wurzelwachstums. Außerdem war nach Applikation der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) die Expression der Ethylen-induzierbaren Gene *HEL* (Hevein-Typ Chitinase) und *PDF1.2* (pflanzliches Defensin) reduziert (Ton et al., 2001). In weiteren Kreuzungsexperimenten kosegregierte die reduzierte Ethylensensitivität mit den rezessiven Allelen des *Isr1* Locus, also mit der Unfähigkeit, ISR zu entwickeln. Damit lag der Schluss nahe, dass der *Isr1* Locus für eine Komponente der Ethylenantwort codiert, die für eine Expression der Rhizosphärebakterien-vermittelten ISR notwendig ist (Ton et al., 2001).

Auch die *Arabidopsis*-Mutante *npr1*, deren Salicylsäure-Signalweg unterbrochen ist, und die weder SAR entwickeln noch PR-Proteine exprimieren kann, wurde in diesen Studien verwendet. Überraschenderweise konnten weder *P. fluorescens* WSC417r noch *P. putida* WCS358 ISR in diesen Pflanzen auslösen, was darauf hindeutet, dass ein funktionsfähiges

NPR1-Protein für eine durch Rhizosphärebakterien induzierte ISR genau wie für SAR notwendig ist (Abb. 3, Pieterse et al., 1996). Außerdem konnte ISR in der *npr1*-Mutante weder durch Zugabe von Ethylen noch durch Jasmonat ausgelöst werden.

Eine Ausbildung der ISR in *Arabidopsis* hängt von dem verwendeten Bakterienstamm ab, denn andere *Pseudomonas* spp. (z. B. *P. fluorescens* WCS374) konnten in Rettich eine Resistenz induzieren, in *Arabidopsis* aber nicht. Umgekehrt war der Stamm *P. putida* WCS358 in der Lage, in *Arabidopsis* sowohl in Wildtyp- als auch in transgenen *nahG*-Pflanzen ISR auszulösen, in Rettich war er aber unwirksam (Leeman et al., 1995; Van Wees et al., 1997). Alle diese Stämme kolonisierten die Wurzeln mit ähnlich hohen Zellzahlen, so dass ausgeschlossen werden konnte, dass die Nicht-Induktion der ISR durch den Stamm WCS347 an mangelnder Besiedelung der Wurzeln lag (Pieterse et al., 1996).

### 4.3. Interaktionen zwischen den Signalwegen

Die pflanzliche Abwehr wird hauptsächlich durch drei Signalstoffe reguliert: Salicylsäure, Jasmonat und Ethylen. Jeder dieser Regulatoren ist Teil eines Signaltransduktionsweges, der zur Induktion spezifischer Abwehrsubstanzen und -proteine führt, je nachdem welcher Stimulus (Pathogene, Verwundung, Insektenfraß, nicht-pathogene Rhizosphärebakterien, abiotischer Stress) auf die Pflanze einwirkt (Abb. 3). Die einzelnen Abwehrwege kontrollieren oder verstärken sich gegenseitig; damit wird sichergestellt, dass die Pflanze immer die geeignetste Kombination von Abwehrkomponenten, angepasst an die spezifische Stresssituation, produziert (Reymond & Farmer, 1998).

Sowohl bei Verwundungsreaktionen als auch bei Pathogenangriff werden Jasmonat und Ethylen produziert. Dennoch gibt es Hinweise, dass verschiedene Abwehrprogramme ablaufen, so werden durch Verwundung in Tabak vorwiegend basische PR-Proteine induziert, während bei Pathogenbefall die Expression saurer PR-Proteine zunimmt (Pieterse & Van Loon, 1999). Ein Grund dafür könnte sein, dass Pathogene zusätzlich zu Jasmonat und Ethylen häufig Salicylsäure induzieren. Salicylsäure und ihre funktionellen Analoga scheinen hemmend auf Jasmonsäure-induzierte Genexpression zu wirken (Pieterse & Van Loon, 1999). In *Arabidopsis* wurde eine erhöhte Expression des Jasmonat-abhängigen *PDF1.2* Gens in transgenen *nahG*-Pflanzen beobachtet, die keine Salicylsäure akkumulieren können (Penninckx et al., 1996). Aber auch synergistische Effekte können auftreten, so führte eine gleichzeitige Behandlung von Tabakpflanzen mit Methyljasmonat und Salicylsäure zu einer höheren PR1 Genexpression als eine Salicylsäurebehandlung alleine (Xu et al., 1994). Auch

Ethylen scheint die Pflanzen sensitiver für Salicylsäure zu machen, in *Arabidopsis* war eine erhöhte PR1 mRNA-Akkumulation nach Ethylenbehandlung nachzuweisen (Reymond & Farmer, 1998).

Diese verstärkenden Effekte von Signalstoffen auf die Genexpression in Kombination mit hemmenden Interaktionen scheinen eine Feinabstimmung der Genexpression gegen spezifische Pathogene zu ermöglichen. Ein Ergebnis davon ist, dass nicht alle Erreger die gleichen Abwehrgene induzieren (Reymond & Farmer, 1998).

#### **4.4. Bakterielle Komponenten, die eine systemische Resistenz in Pflanzen auslösen können**

Um möglichst effektiv auf einen Angriff von Krankheitserregern mit der Aktivierung geeigneter Abwehrmechanismen reagieren zu können, müssen Pflanzen die Anwesenheit von Fremdorganismen frühzeitig wahrnehmen können. Substanzen, die bei einer Pathogeninfektion freigesetzt werden, können, als Elicitoren über Rezeptoren in der Pflanze erkannt, eine Kaskade an Signalen auslösen, die zu typischen Abwehrreaktionen wie z. B. HR, „oxidativer Burst“ oder Verstärkung der Zellwand, führen (Ebel & Mithöfer, 1998). Generelle oder allgemeine Elicitoren werden dabei von vielen Pflanzengattungen erkannt, im Gegensatz zu spezifischen Elicitoren (Avirulenzgenprodukten), die nur mit Pflanzenlinien interagieren können, in denen ein entsprechendes Resistenzgen vorhanden ist (Nürnberger & Brunner, 2002). Generelle Elicitoren werden meist von Zellwänden pathogener Pilze oder Bakterien oder von pflanzlichen Zellwänden freigesetzt wie z. B. Glucane, Chitin, Chitosan oder Oligogalacturonide, die alle Oligosaccharide darstellen (Ebel & Mithöfer, 1998). Auch (Glyco)peptide und Proteine können als Elicitoren wirken, wie z. B. Elicitine, kleine extrazelluläre Proteine, die von *Phytophthora* spp. sekretiert werden oder Harpine, die von bakteriellen Pathogenen wie z. B. *Erwinia carotovora* oder *Pseudomonas syringae* stammen (Ebel & Mithöfer, 1998).

Über welche Komponenten nicht-pathogene Rhizosphärebakterien von Pflanzenwurzeln erkannt werden, ist in vielen Fällen noch unklar. Bei dem Stamm *P. fluorescens* WCS417r wurden als Auslöser der induzierten systemischen Resistenz in Rettich und *Arabidopsis thaliana* bisher Lipopolysaccharide (LPS) und ein Eisen-regulierter Faktor identifiziert (Leeman et al., 1995, 1996; Van Wees et al., 1997). Lipopolysaccharide sind der äußere Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien und stellen eine komplexe Familie amphipatischer Moleküle dar, welche eine wichtige Rolle bei der Interaktion von

Bakterien mit ihrer Umwelt, z. B. ihrem eukaryotischen Wirt, spielen (Newman et al., 2001). Der äußerste Teil des LPS wird O(outer)-Antigen genannt und besteht aus einer Kette von Oligosaccharid-Einheiten. Diese Komponente des LPS wird vom Immunsystem in Säugern erkannt und viele Klassifikationssysteme pathogener Bakterien basieren auf Variationen in der O-Antigenstruktur. Daran schließt sich der innere und äußere Oligosaccharid Core-Komplex an, wobei der innere Core-Komplex den ungewöhnlichen Zucker 3-Deoxy-D-manno-2-octulosonat (KDO) enthält. Damit verbunden ist die dritte Domäne des LPS, das Lipid A. Es besteht hauptsächlich aus Glucosamin-Dimeren, die N- und O-substituiert mit mittellangen Hydroxyfettsäuren, sind. Die Fettsäuren bilden die äußere Schicht der äußeren Membran gram-negativer Bakterien (Lerouge & Vanderleyden, 2001).

Eine Infiltration von aufgereinigtem LPS von pflanzenpathogenen Bakterien, wie z. B. *Xanthomonas campestris*, in Blätter kann zu einem lokalen Zustand der erhöhten Sensitivität und bei einer erneuten bakteriellen Infektion zu rascheren und intensiveren Abwehrreaktionen führen (Newman et al., 2001). In Rettich- und Ackerschmalwandpflanzen konnte aufgereinigtes LPS von *P. fluorescens* WCS417r eine systemische Resistenz gegen pilzliche und bakterielle Erreger induzieren (Leeman et al., 1995; Van Wees et al., 1997). Dabei scheint insbesondere das O-Antigen an der Signalweiterleitung beteiligt zu sein, da Zellwandpräparationen einer Mutante von *P. fluorescens* WCS417r, die keine O-Antigen Seitenkette mehr besitzt, die pflanzliche Abwehr nicht mehr stimulierten (Leeman et al., 1995; Van Wees et al., 1997). Lebende Inokulate dieser Mutante konnten zwar in *Arabidopsis*-Pflanzen die Krankheitsresistenz in vergleichbarem Umfang erhöhen wie Inokulate mit dem Wildtyp, in Rettich dagegen nicht (Van Wees et al., 1997). Daraus kann man schließen, dass bakterielles LPS nur zum Teil als Elicitor der induzierten systemischen Resistenz in *Arabidopsis thaliana* in Frage kommt. In Rettich scheinen zusätzliche Auslöser der induzierten systemischen Resistenz (ISR) Eisen-regulierte Komponenten zu sein, da unter Eisen-limitierenden Bedingungen auch die LPS-Mutante des Stammes WCS417r ISR auslöste (Leeman et al., 1996).

Von Felix et al. (1999) wurde erkannt, dass das Strukturprotein bakterieller Geißeln, Flagellin, als Elicitor Reaktionen in Tomatenzellkulturen auslösen kann. Pflanzen erkennen eine spezielle Domäne des Flagellins mit Hilfe eines Rezeptorproteins (Meindl et al., 2000). Aufgereinigte Flagellen des Biocontrol-Stammes *P. putida* WCS358r konnten in *Arabidopsis* systemische Resistenz auslösen (Pieterse et al., 2001). Eine Mutante dieses Stammes, die keine Flagellen besitzt, war allerdings genauso effektiv. Dies zeigt deutlich, dass mehrere bakterielle Faktoren existieren, die als Auslöser systemischer Resistenzen fungieren.

## 5. Themenstellung

Unter Pflanzen-assoziierten Bakterien ist die Produktion von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen (AHL) zur Zelldichte-abhängigen Regulation verschiedener Gene, die z. B. für die Synthese von Virulenzfaktoren oder Antibiotika kodieren, weit verbreitet. Dennoch ist nur wenig über die Beteiligung dieser Substanzen an der Erhöhung der pflanzlichen Resistenz durch Rhizosphärebakterien und ihren Interaktionen mit der Pflanze bekannt.

In dieser Arbeit sollte nun mit Hilfe eines Modellsystems aus Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom und Rhizosphärebakterien der Gattungen *Serratia* und *Pseudomonas* der Einfluss der AHL-Produktion auf die Biocontrol-Aktivität hin untersucht werden. Zu Beginn der Arbeit sollten mögliche wachstumsstimulierende Eigenschaften der Bakterien auf die Pflanze und das Kolonisierungsverhalten an der Wurzel untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollte die Biocontrol-Aktivität des AHL-produzierenden Wildtyp-Stammes *S. liquefaciens* MG1 anhand der pflanzlichen Resistenz gegenüber sprosspathogenen Pilzen beurteilt und mit der korrespondierenden AHL-negativen Mutante MG44 verglichen werden. Neben der visuellen Bonitur der Blattschäden sollte dazu auch eine Quantifizierung der DNA-Gehalte der Pilze in den befallenen Blättern mittels Real-Time PCR Auskunft über die Befallsrate in inokulierten Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen geben.

In weiterführenden Studien zum Mechanismus dieser durch Rhizosphärebakterien vermittelten Resistenz sollten die Gehalte wichtiger Signalstoffe bei der pflanzlichen Resistenz und die Expressionsmuster Abwehr-assoziiierter Gene untersucht werden. Es wurden zudem mögliche lokale und systemische Reaktionen der Signalstoffe Salicylsäure und Ethylen nach Zugabe von AHL-Molekülen als Reinsubstanzen ermittelt. Untersuchungen zur Genexpression bekannter Abwehrgene sollten mit Hilfe der Makroarray-Technik und Northern-Blot Analysen durchgeführt werden. Der dabei verwendete Makroarray ermöglichte die gleichzeitige Analyse von 80 Genen, die an Signaltransduktion, Abwehr sowie Entwicklungsprozessen in der Tomate beteiligt sind.

## II. Material und Methoden

### 1. Geräte

Analysenwaage	Sartorius, Göttingen
Gaschromatograph AutoSystem XL	Perkin-Elmer, Überlingen
Heizblock	Liebisch, Bielefeld
Heizschrank	Memmert, Schwabach
Horizontalgel-Elektrophorese-Apparaturen	Easy-Cast, Erlangen
HPLC	Merck, Darmstadt
Hybridisierungsöfen	H. Saur, Reutlingen
Image-Master VDS mit Software Imagemaster 1D Elite, Version 2.0	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Milli-Q Water System	Millipore, Eschborn
PCR-Maschinen PTC-200 PCR-Express UNO-Thermoblock ABI Prism 7700	MJ Research (Biozym Diagnostik), Oldendorf Thermo Hybaid, Frankfurt Biometra, Göttingen Applied Biosystems, Weiterstadt
pH-Meter 743	Knick, Berlin
Photometer Ultrospec 3100 <i>pro</i>	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Rotationsverdampfer	Büchi, Flawil, CH
Scanner FLA-3000	Fuji, Nakanuma, Japan
Szintillationszähler LS 1801	Beckmann, München
UV-Crosslinker Stratalinker 1800	Stratagene, La Jolla, USA
Wasserbad	Bachofer, Reutlingen
Zentrifugen Kühlzentrifuge 3K12 Kühlzentrifuge J2-21 Tischzentrifuge MiniSpin	Sigma Laborzentrifugen, Osterode (Harz) Beckman Coulter, Unterschleißheim Eppendorf, Hamburg

### 2. Chemikalien

#### 2.1. Feinchemikalien

ACC (1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Agarose	Biozym Diagnostik, Oldendorf
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
<i>N</i> -Butanoyl-L-Homoserinlacton (BHL)	Fluka, Seelze
Cyclohexan	Riedel-de Haen, Seelze
Ethylacetat	Riedel-de Haen, Seelze



Ethylen	Linde, Unterschleißheim
<i>N</i> -Hexanoyl-L-Homoserinlacton (HHL)	Fluka, Seelze
Kanamycin	Sigma, Deisenhofen
Metaphosphorsäure	Sigma, Deisenhofen
Natriumhypochlorit	Sigma, Deisenhofen
Quecksilber(II)chlorid	Merck, Darmstadt
Rifampicin	Sigma, Deisenhofen
Salicylsäure	Sigma, Deisenhofen

## 2.2. Radiochemikalien

$\alpha$ -[ <sup>33</sup> P]-dATP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
$\gamma$ -[ <sup>33</sup> P]-ATP	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

## 2.3. Molekularbiologische Reagenzien

Agarose Gel DNA Extraction Kit	Roche Diagnostic, Mannheim
GoldStar DNA Polymerase	Eurogenetec, Seraing, Belgien
Northern Blot Reagenzien	Roche Diagnostic, Mannheim
Nucleon PytoPure Resin	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
pGEM-T Vector System	Promega, Heidelberg
Polynukleotid Kinase	MBI Fermentas, St- Léon-Rot
QIAprep Spin, Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Marker, High Range, ready-to-use	MBI Fermentas, St. Léon-Rot
StripAble™ cDNA Probe Synthesis and Removal Kit	Ambion, Austin, Texas, USA
SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems, Weiterstadt
Trizol	Invitrogen, Heidelberg

## 3. Rhizosphärebakterien

### 3.1. Art und Herkunft der Rhizosphärebakterien

In der folgenden Tabelle sind die in dieser Arbeit verwendeten Organismen mit ihren genotypischen Merkmalen und ihrer Herkunft aufgelistet. Die Bakterienstämme wurden freundlicherweise von L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München bzw. C. Baron, Institut für Mikrobiologie, LMU München zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2: Verwendete Organismen

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft / Referenz
<i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG 10929	Typstamm, Genomovar V	Vandamme et al., 1997
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF:: <i>gfp</i>	Wildtyp; Isolat aus der Tomatenrhizosphäre mit mini Tn5-Km- $P_{AI/04/03}$ RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	Steidle et al., 2001
<i>Pseudomonas putida</i> F117:: <i>rfp</i>	N-Acyl-L-homoserinlacton-negative Mutante von IsoF, <i>PutI</i> mit $P_{lac}$ :: <i>dsred</i> -T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	Steidle et al., 2001
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Wildtyp; Isolat aus der Weizenrhizosphäre mit Biocontroleigenschaften	Pieterse et al., 1996
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1:: <i>gfp</i>	Wildtyp; Amp <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , mit mini Tn5-Km- $P_{AI/04/03}$ RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München, unveröffentlicht
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44:: <i>gfp</i>	N-Acyl-L-homoserinlacton-negative Mutante von MG1, <i>SwrI</i> ; Amp <sup>R</sup> , Tc <sup>R</sup> , mit mini Tn5-Km- $P_{AI/04/03}$ RBSII- <i>gfp</i> mut3*-T <sub>0</sub> -T <sub>1</sub>	L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München, unveröffentlicht

### 3.2. Anzucht und Stammhaltung

#### 3.2.1 Verwendete Nährmedien und Hemmstoffe

Alle verwendeten Nährmedien wurden zur Sterilisation in einem Wasserdampf-hochdruckautoklaven für 20 min bei 121 °C und 1,2 bar autoklaviert. Temperaturempfindliche Zusätze wurden sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm, Millipore, Eschborn) und später zugegeben. Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 16 g Agar (Merck, Darmstadt) pro Liter zugesetzt.

Zur Anzucht von *Serratia liquefaciens* und *Pseudomonas putida* wurde kommerziell erhältliches Vollmedium nach Luria-Bertani (LB) der Firma Fluka, Seelze, verwendet. *Pseudomonas fluorescens* WCS417r wurde in King's Medium B (King et al., 1954) kultiviert (Zusammensetzung s. u.).

King's Medium B zum Nachweis fluoreszierender Pseudomonaden (King et al., 1954)

Pepton	20 g
Glycerin	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O*	1,5 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	ad. 1 l
	pH 7,2

\*als 10 %ige (w/v) Stammlösung getrennt  
autoklavieren und anschließend zugeben

Hemmstoffe (Tabelle 3) wurden sterilfiltriert und nach Abkühlung der Medien auf 50 °C (Festmedien) bzw. vor der Inokulation (Flüssigmedien) zugesetzt.

Tabelle 3: Hemmstoffe

Hemmstoff	Stammlösung	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	100 mg l <sup>-1</sup>
Chloramphenicol (Cm)	10 mg ml <sup>-1</sup> in 96 % Ethanol	10 mg l <sup>-1</sup>
Kanamycin (Kan)	50 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 mg l <sup>-1</sup>
Tetracyclin (Tc)	10 mg ml <sup>-1</sup> in 96 % Ethanol	10 mg l <sup>-1</sup>
Rifampicin (Rif)	50 mg ml <sup>-1</sup> in 96 % Ethanol	100 mg l <sup>-1</sup>
Streptomycin	50 mg ml <sup>-1</sup> in H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 mg l <sup>-1</sup>

### 3.2.2 Zellanzucht und Stammhaltung

Das Überimpfen von Bakterienstämmen auf Festmedien und die Inokulation von 5-10 ml Flüssigkulturen (Reagenzgläser) wurde mit einer Impföse bzw. sterilen Zahnstochern, ausgehend von einer Einzelkolonie auf Platte, durchgeführt. Flüssigkulturen mit größerem Volumen wurden mit über Nacht gewachsenen Vorkulturen 1:1000 beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C in Brutschränken bzw. lufttemperierten Rundschüttlern bei 200 rpm.

Ausgehend von Einzelkolonieausstrichen auf Agarplatten wurden zur langfristigen Lagerung Glycerinkulturen angelegt. Dabei wurden Einzelkolonien mit einem sterilen Zahnstocher

gepickt und in 5 ml selektivem LB-Medium über Nacht bei entsprechenden Temperaturen inkubiert. Diesen Kulturen wurde 1 ml entnommen und mit 0,5 ml 50 %igem (v/v) Glycerin in Kryoröhrchen (Nunc A/S, Dänemark) pipettiert. Daraufhin konnte die Kultur bei  $-80\text{ °C}$  gelagert werden. Das Glycerin bewirkt eine Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber der Lagerung bei tiefen Temperaturen.

## 4. Pflanzenmaterial

### 4.1. Art und Herkunft des Pflanzenmaterials

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden ausschließlich mit der Tomatensorte MicroTom (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. MicroTom) durchgeführt. Diese kommerziell erhältliche Sorte wird nicht größer als 20 cm und trägt kleine feste Früchte. Aufgrund ihres Zwergwuchses eignet sie sich besonderes gut für Forschungszwecke, da sie auch bei wenig Platz in hoher Anzahl kultivierbar ist. Die Samen wurden von Bruno Nebelung (Kiepenkerl-Pflanzenzüchtung, Everswinkel) bezogen.

### 4.2. Anzuchtbedingungen

Die Pflanzen wurden in einer mit Reinluft versorgten Klimakammer (HPZ 90/50, Vötsch, Balingen) mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 14/10 h bei einer Lufttemperatur von  $25/20 \pm 2\text{ °C}$  und einer konstanten relativen Luftfeuchte von  $70 \pm 5\%$  angezogen. Die Lichtphase begann um 6:00 Uhr MEZ, die Lichtintensität betrug auf Pflanzenhöhe ca.  $120\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$  (Leuchtstoffröhren F69T12/CW/VHO/SS 195 W, cool white, Sylvania).

#### 4.2.1 Oberflächensterilisierung der Samen

Zur Gewährleistung gleicher Ausgangsbedingungen für die in den Inokulationsexperimenten mit Rhizosphärebakterien verwendeten Tomatenpflanzen wurden die Samen oberflächensterilisiert. Zunächst wurden sie 2-3 min in deionisiertem Wasser mit 0,1 % (v/v) Tween 20 gewaschen, mit sterilem Wasser nachgespült und in 70 % (v/v) Ethanol (absolut) 2-3 min

geschüttelt. Im Anschluß daran wurden die Samen 20 min mit 5 % (v/v) NaOCl oberflächensterilisiert und fünfmal mit sterilem Wasser gewaschen.

### 4.2.2 Anzucht in Erde

Die oberflächensterilisierten Samen wurden auf Frühstorfer Einheitserde ausgesät. Nach zwei Wochen konnten die Keimlinge in Einzeltöpfe (5 x 5 cm, ca. 80 ml Volumen) pikiert und in Pflanzschalen gestellt werden (bis zu 24 Einzeltöpfe pro Schale). Die Pflanzen wurden alle zwei Tage mit deionisiertem Wasser von unten gegossen, sowie zweimal pro Woche mit Mineraldünger (30 µl Substral, Thompson, Düsseldorf, pro Topf, gelöst in 1 l Wasser pro Schale) versorgt.

Vier bis fünf Wochen nach Aussaat wurden die Pflanzen bei einer Höhe von ca. 6 cm und einer Blattzahl von 5-6 für Versuche eingesetzt (Abb. 5).



Abb. 5: Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom kultiviert in handelsüblicher Anzuchterde. Im Alter von vier bis fünf Wochen wurden die Pflanzen für Experimente eingesetzt.

### 4.2.3 Anzucht in Quarzsand unter keimreduzierten Bedingungen

Die Anzucht der Tomatenpflanzen für Versuche zum Einfluß von *N*-Acyl-Homoserinlactonen auf pflanzliche Abwehrmechnismen wurde unter keimreduzierten Bedingungen in kleinen

Plastikgefäßen mit einem Volumen von ca. 350 cm<sup>3</sup> (PhytaTray, Sigma, Taufkirchen) durchgeführt.

Aus Kristallquarzsand (Dorsilit, Hirschau) wurde eine homogene 1:1 - Mischung von Nr. 3 (2-3,5 mm) und Nr. 7 (0,6-1,2 mm) hergestellt. Diese beiden Korngrößen haben sich bewährt, da sie einen guten Halt der Tomatensetzlinge im Boden gewährleisteten. Zugleich ermöglichen sie, die Tomaten ohne größere Verletzungen der Wurzel aus dem Sand zu entfernen. Das Sandgemisch wurde zweimal bei 134 °C autoklaviert, um sicherzustellen, daß eventuell enthaltene Pilzsporen unschädlich gemacht wurden. In jedes PhytaTray wurden 250 g Kristallquarzsand und 45 ml sterile Nährlösung (Simons et al., 1996; Tabelle 4) gegeben.

Unter sterilen Bedingungen wurden je zehn oberflächensterilisierte (s. o.) Samen etwa vier mm unter den Sand in ein PhytaTray gelegt. Die Anzuchtgefäße wurden offen in eine große, mit Isopropanol oberflächensterilisierte Schale gegeben und, mit einer Haube verschlossen, in die Klimakammer gestellt. Der Feuchtigkeitsverlust wurde alle drei bis vier Tage mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> ausgeglichen.



Abb. 6: Vier Wochen alte, in Quarzsand kultivierte Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom

Nach 14 Tagen wurden alle Pflänzchen aus dem PhytaTray genommen und außer fünf etwa gleich großen verworfen. Diese Pflanzen konnten vier Wochen nach Aussaat mit einer durchschnittlichen Höhe von 5–6 cm und einer durchschnittlichen Primärblattlänge von 2,3 cm für die Versuche eingesetzt werden (Abb. 6). Entscheidend hierfür war die Biomasse, die für die Experimente in größeren Mengen erforderlich war.

Tabelle 4: Zusammensetzung der Nährlösung für die Kultivierung von Tomatenpflanzen in Quarzsand (modifiziert nach Simons et al., 1996)

<b>Makroelemente</b>	Konzentration	Stammlösung
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	5 mM	} 100fach
KNO <sub>3</sub>	5 mM	
MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	2 mM	100fach
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 mM	100fach
<b>Mikroelemente</b>		
FeEDTA	0,013 mM	1000fach
MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,099 mM	} 1000fach
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,100 mM	
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,037 mM	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,001 mM	
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,001 mM	
CoCl x 6 H <sub>2</sub> O	0,001 mM	

## 5. Inokulation der Pflanzen mit Rhizosphärebakterien

Fünf Wochen alte Tomatenpflanzen cv. MicroTom wurden in Inokulationsexperimenten mit Suspensionen verschiedener Rhizosphärebakterien behandelt. Zur Herstellung der Bakteriensuspension wurden Flüssigkulturen (1 l) mit Selektivmedium in 2 l Erlenmeyerkolben angesetzt und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln bei 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden bei 6000 rpm abzentrifugiert und in 1/10 10 mM MgSO<sub>4</sub> resuspendiert. Diese 10fach aufkonzentrierten Suspensionen enthielten eine Lebendkeimzahl von bis zu 10<sup>10</sup> koloniebildenden Einheiten (colony forming units, cfu) ml<sup>-1</sup> (Tabelle 5)

Zur Bestimmung der Lebendkeimzahl nach Miles & Misra (1938) wurde eine Verdünnungsreihe in 1 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> hergestellt (Verdünnungsfaktor jeweils 1:10). Von verschiedenen Verdünnungsstufen wurden 5 x 10 µl Tropfen auf Agarplatten pipettiert (Verdünnungsfaktor 1:100). Die Lebendkeimzahl berechnet sich aus der Anzahl der gewachsenen Kolonien multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor.

Pro Pflanze wurden dann 2 x 5 ml der Bakteriensuspension im Abstand von einer Stunde rund um den Sprossansatz pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blätter nicht mit der Bakteriensuspension in Kontakt kamen. Kontrollpflanzen wurden mit 2 x 5 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub> behandelt.

Tabelle 5: Lebendkeimzahlbestimmung (LKZ) von verschiedenen Rhizosphärebakterien in colony forming units (cfu) ml<sup>-1</sup> aus drei unabhängigen Ansätzen In dieser Arbeit wurden *Serratia liquefaciens* MG1 (Wildtyp) bzw. MG44 (*N*-Acyl-L-homoserinlacton – Nullmutante), *Pseudomonas putida* IsoF (Wildtyp) bzw. F117 (*N*-Acyl-L-homoserinlacton–Nullmutante) sowie *Pseudomonas fluorescens* WCS417r verwendet.

	ÜN-Kultur (1)	10 x konz. ÜN-Kultur (2)
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	1,6 ± 0,2 x 10 <sup>9</sup>	1,7 ± 0,3 x 10 <sup>10</sup>
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44	1,8 ± 0,7 x 10 <sup>9</sup>	1,9 ± 0,6 x 10 <sup>10</sup>
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF	1,9 ± 0,5 x 10 <sup>7</sup>	2,1 ± 0,4 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas putida</i> F117	1,6 ± 0,6 x 10 <sup>7</sup>	1,7 ± 0,2 x 10 <sup>8</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	3,0 ± 0,2 x 10 <sup>8</sup>	2,8 ± 0,3 x 10 <sup>9</sup>

(1) LKZ einer Über-Nacht (ÜN)-Kultur in LB-Medium mit 50 mg Kanamycin ml<sup>-1</sup>

(2) LKZ einer 10fach aufkonzentrierten ÜN-Kultur. Ein Liter ÜN-Kultur in LB-Medium mit 50 mg Kanamycin ml<sup>-1</sup> bzw. ohne Antibiotika für WCS417r wurde abzentrifugiert und in 100 ml 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend für Inokulationsexperimente verwendet.

## 6. Pathogeninfektion

Zur Untersuchung der Biocontrol-Aktivität verschiedener Rhizosphärebakterien wurden Tomatenpflanzen drei Tage nach Zugabe der Bakterien mit verschiedenen sprosspathogenen Pilzen infiziert. Von *Alternaria alternata* wurden zwei verschiedene Stämme verwendet, ein Isolat von Tomatenpflanzen (G. Bahnweg, persönliche Mitteilung) und *A. alternata* 2177/00, der freundlicherweise von H.-P. Seidl, Institut für Mikrobiologie, TU München, zur Verfügung gestellt wurde. Bei *Botrytis cinerea* handelte es sich um ein Isolat von Weinpflanzen (*Vitis vinifera* B1.4, Rostock) und *Cladosporium herbarum* DSM 63422 stammte aus der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) aus Braunschweig.

Die Pflanzen wurden dazu mit 5 ml einer Sporensuspension (ca. 4 x 10<sup>4</sup> Sporen ml<sup>-1</sup> bei *Alternaria alternata* bzw. 1 x 10<sup>6</sup> Sporen ml<sup>-1</sup> bei *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum*) des jeweiligen Pilzes mit einem handelsüblichen Pumpzerstäuber besprüht, so dass alle Blätter gleichmäßig benetzt waren. Sie wurden mit Plexiglashauben, die innen mit Wasser ausgesprüht wurden, abgedeckt und bei 100 % Luftfeuchte und 23/20 °C Tag/Nacht-Rhythmus in einer Klimakammer inkubiert. Nach ca. 48 h traten die ersten Schäden in Form von dunklen Flecken bevorzugt entlang der Blattadern auf.

Zur Herstellung der Sporensuspension wurden Pilzhyphen aus einer Dauerkultur auf Agarblöcken (in dest. Wasser) zunächst auf Malzagar (2 % w/v Malzextrakt, 1,5 % w/v Agar)



in Petrischalen zum Wachsen gebracht. Nach zwei Wochen konnten die bewachsenen Agarplatten in einem Mixer (Waring Blendor, Schrader, Göttingen) in sterilem deionisiertem Wasser püriert werden. 5 ml dieser Suspension wurde dann auf Hafer-Agar (2 % w/v Haferflocken und 1,5 % w/v Agar) oder auf Tomatensaft-Agar (10 % v/v Tomatensaft, 0,2 % w/v  $\text{CaCO}_3$ , 0,8 % w/v Agar, modifiziert nach Stevens (1974) ausplattiert. Nach etwa 2-4 Wochen Wachstum im Licht (Fensterbank, Nordseite) bildeten die Pilze Sporen. Durch Aufbringen von 10 ml Sporensuspensionslösung (5,5 mM  $\text{KHPO}_4$ , 62,5 mM Glucose, 0,1 % Tween, pH 6,0, modifiziert nach Leone & Tonneijk (1990) und vorsichtigem Schaben mit einem Spatel konnten die Sporen von den Agarplatten geerntet werden.

Eine Schädigung der Blätter durch die Sporensuspensionslösung allein konnte vermieden werden, wenn der pH-Wert mit 6,0 im schwach sauren Bereich lag (Abb. 7). Verwendet man die Sporensuspensionslösung wie in der Literatur beschrieben (Leone & Tonneijk, 1990), so betrug der pH-Wert 4,6. Diese schon saure Lösung führte auch ohne Pilzsporen zu starken Schäden vor allem an den alten Blättern unserer Tomatenpflanzen (bis zu 80 % der Blattfläche), während eine Erhöhung des pH-Wertes auf 6,0 die Schäden auf ein Minimum reduzierte.

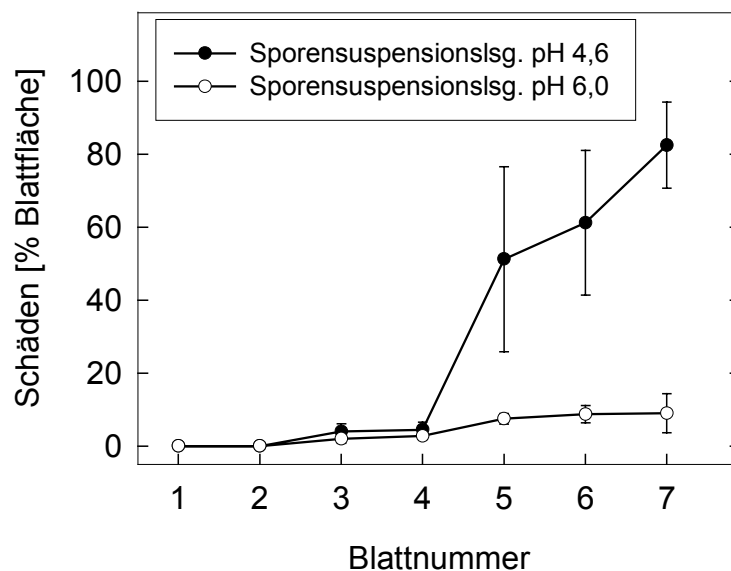


Abb. 7: Blattschäden in Abhängigkeit vom Blattalter nach Besprühen von Tomatenblättern mit Sporensuspensionslösung (5,5 mM  $\text{KHPO}_4$ , 62,5 mM Glucose, 0,1 % Tween) pH 4,6 und pH 6,0. Als Blatt 1 wurde das erste Blatt von oben bezeichnet, das  $\geq 3,5$  cm ist. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 4).

## 7. Bonitur von Blattschäden

Die Blattschäden wurden frühestens nach 48-stündiger Pilzinfektion visuell als prozentualer Anteil der geschädigten Fläche an der Gesamtblattfläche abgeschätzt. Die Bonitur erfolgte meist durch zwei voneinander unabhängigen Wissenschaftler/-innen. Die Blätter wurden, ausgehend vom Vegetationspunkt, von oben nach unten durchnummeriert. Da Blatt eins sehr variabel erschien, wurde Blatt zwei durch eine Blattlänge von  $\geq 3,5$  cm definiert.

## 8. Ernte der Blätter und Wurzeln

Die Fiederblättchen der Tomatenblätter wurden am Stielansatz abgeschnitten. Die Fiederblättchen der Blätter 3-5 wurden vereinigt, in Aluminiumtüten verpackt und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis zur weiteren Analyse wurden sie bei  $-80$  °C aufbewahrt. Bei den in Quarzsand kultivierten Pflanzen wurden nur die Fiederblättchen der Blätter 3-4 geerntet. Zusätzlich wurden auch die Wurzeln eingefroren, sie wurden dazu am Sprossansatz abgetrennt und kurz in deionisiertem Wasser gewaschen.

## 9. Bestimmung der Lebendkeimzahl an den Wurzeln

Zu jedem Erntezeitpunkt der Blätter wurde auch die Lebendkeimzahl der zugegebenen Bakterien an den Wurzeln bestimmt. Zunächst mußte die Erde von den Wurzeln in 1 x PBS-Puffer (10 x PBS: 100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 100 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,3 M NaCl, pH 7,2) abgewaschen werden. Anschließend wurden ca. 100 mg der Wurzeln in 1 ml 4 % Saccharose-Lösung (steril) in einem abgeflamten Mörser homogenisiert. Von dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und die Lebendkeimzahl der Suspension nach Miles & Misra (1938) bestimmt (vgl. Abschnitt 5). Alle Bakteriensuspensionen wurden auf Selektivmedium (LB-Medium) mit 50 mg  $\text{l}^{-1}$  Kanamycin aufgebracht, außer *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. Letzterer wurde mit King's B Medium mit Ampicillin (50 mg  $\text{l}^{-1}$ ), Chloramphenicol (10 mg  $\text{l}^{-1}$ ) und Rifampicin (150 mg  $\text{l}^{-1}$ ) selektiv angezogen (Pieterse et al., 1998).

## 10. Applikation von *N*-Acyl-*L*-homoserinlactonen

### Unbewurzelte Kopfstecklinge:

Fünf Wochen alte Tomatenpflanzen in Erds substrat wurden unter Wasser am Sprossansatz abgeschnitten und der Spross in Lösungen mit 10  $\mu\text{M}$  *N*-Hexanoyl-*L*-homoserinlacton (HHL, Fluka, Seelze), 5 mM Salicylsäure und 0,1 mM 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) gestellt. Je 10 ml der Lösung befanden sich in einem kleinen Plastikgefäß (Scintillationsgefäß). Die Inkubation erfolgte weiter in den Klimakammern, nach fünf und zehn Stunden wurden die mittelalten Blätter geerntet.

### Kultur in Quarzsand:

In Quarzsand kultivierte Tomatenpflanzen cv. MicroTom wurden vier Wochen nach Aussaat mit *N*-Acyl-*L*-homoserinlactonen (AHL) unterschiedlicher Seitenkettenlänge behandelt. Die Substanzen wurden von Fluka, Seelze, bezogen. Von den Verbindungen wurde eine 100-fache Stammlösung der gewünschten Konzentration mit 100 %igem Methanol hergestellt und sterilfiltriert (Porengröße 0,2  $\mu\text{m}$ , Millipore, Eschborn). 50  $\mu\text{l}$  der Stammlösung wurden mit 4,95 ml deionisiertem Wasser gemischt und im Anzuchtgefäß gleichmäßig verteilt. Vor der Applikation enthielten die Anzuchtgefäße 45 ml Nährlösung (vgl. Abschnitt 4.2.3). Sollte also eine Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  erreicht werden, so wurde eine 10 mM Stammlösung zunächst 1:100 verdünnt (50  $\mu\text{l}$  auf 5 ml) und durch Zugabe dieser 5 ml zu den 45 ml Lösung in den Gefäßen nochmals 1:10. In gleicher Art und Weise wurden auch Pflanzen mit 0,5 mM Salicylsäure behandelt.

## **11. Interaktionen von Rhizosphärebakterien mit tomatenpathogenen Pilze**

Zur Untersuchung des Einflusses von *N*-Acyl-L-homoserinlacton produzierenden Rhizosphärebakterien auf das Wachstum von tomatenpathogenen Pilzen wurde ein Hemmassay auf Agarplatten durchgeführt.

Dazu wurden in 5 ml aufgeschmolzenes 10 %iges Malzmedium mit 0,5 % Agar je 1 ml einer Pilzsporensuspension (ca. 700 Sporen/ml) gegeben, gut vermischt und ein 2 % (w/v) Malzagar in einer Petrischale damit überschichtet. Nachdem die Platten mindestens ½ Stunde unter der Sterilbank trockneten, wurden je 5 µl einer Über-Nacht-Kultur der Rhizosphärebakterien in die Mitte aufgetropft. Kontrollplatten enthielten keine Bakterien. Pro Ansatz wurden 3 Parallelplatten angesetzt. Die Auswertung erfolgte nach einer Woche Inkubation bei 20 °C.

## **12. Messung von Parametern der Ethylenbiosynthese**

### **12.1. Bestimmung der Ethylenemission**

Je eine Seitenfieder der Blätter 3-5 pro Tomatenpflanze wurden zusammen in mit Wasser angefeuchtete Filterpapiere mit der Unterseite nach oben eingerollt, in Glasröhrchen (Volumen  $V = 6,5$  ml) gesteckt und diese mit Silikonsepten verschlossen. Nach einer Stunde Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde 1 ml Gas mit einer Insulineinwegspritze (Becton Dickinson, Dublin, Irland) aus dem Röhrchen entnommen und in einen Gaschromatographen (AutoSystem XL, Perkin Elmer, Überlingen) mit einer Porapack Q-Säule (Durchmesser 1/8“, Länge 60 cm) und einem Flammen-Ionisations-Detektor (FID) eingespritzt. Die Injektor-, Säulen- und Detektortemperaturen betragen 150, 40 und 200 °C. Als Trägergas wurde Stickstoff (5.0, Linde, Unterschleißheim) mit einer Flussrate von 30 ml min<sup>-1</sup> verwendet. Die Flussraten der für den Detektor benötigten Gase betragen 450 ml min<sup>-1</sup> für synthetische Luft und 45 ml min<sup>-1</sup> für Wasserstoff. Unter diesen Bedingungen betrug die Retentionszeit für Ethylen 0,75, für Ethan 1,1 Minuten. Zur Umrechnung der gemessenen Ethylenflächeneinheiten in nmol g FG<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> wurde eine Eichung mit Ethylenstandardgas (1056, Messer, Griesheim) durchgeführt. 1 ml dieses Standardgases,

welches 0,0641 nmol Ethylen entsprach, wurde dreimal in den Gaschromatographen eingespritzt und der Mittelwert der erhaltenen Flächeneinheiten gebildet. Die Umrechnung der Probenkonzentrationen erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Ethylen [nmol g FG}^{-1}\text{]} = 0,0641 \text{ nmol ml}^{-1} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW (Flächen des Eichpeaks)}} * \frac{6,5 \text{ ml}}{\text{Einwaage [g]}}$$

0,0641 nmol Ethylen in 1 ml Standardgas

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

6,5 ml entspricht dem Gesamtvolumen der Glasröhrchen.

## 12.2. Bestimmung des Gehalts an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Das geerntete Pflanzenmaterial wurde sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zum Zeitpunkt der Analyse bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Bestimmung von 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und Konjugaten (Gesamt-ACC minus freies ACC) erfolgte in Abwandlung nach Tuomainen et al. (1997). 200 mg in Stickstoff gemörstertes Pflanzenmaterial wurde in Eppendorf-Reagenzgefäßen mit 1,2 ml einer 2 %igen (v/v) Metaphosphorsäure und einer Spatelspitze Polyvinylpyrrolidonphosphat (PVPP) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 20000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 15 Minuten wurden 1000  $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen, erneut zentrifugiert und ca. 900  $\mu\text{l}$  Überstand bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Für die Bestimmung von freiem ACC und Gesamt-ACC wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  des Extraktes eingesetzt.

Für die ACC-Bestimmung wurde dem auf Eis gehaltenen Extrakt 500  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  und 100  $\mu\text{l}$  einer 10 mM  $\text{HgCl}_2$ -Lösung zugefügt und das Röhrchen gasdicht verschlossen. Die Umsetzung von ACC zu Ethylen erfolgte durch Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Oxidationslösung (gesättigte NaOH-Lösung und NaClO-Lösung, Sigma, Deisenhofen im Verhältnis 1:3 v/v). Die Messung erfolgte nach 13minütiger Inkubation unter kräftigem Schütteln mit dem Gaschromatographen wie für Ethylen (Material und Methoden, Abschnitt 12.1) beschrieben.

Gesamt-ACC, bestehend aus freiem ACC und ACC-Konjugaten, wurde zunächst einer sauren Hydrolyse unterzogen (Zugabe von 40  $\mu\text{l}$  12 N HCl, 3 h bei  $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Diese wurde mit 240  $\mu\text{l}$  2 N NaOH nach dem Abkühlen gestoppt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt

und 220 µl H<sub>2</sub>O und 100 µl HgCl<sub>2</sub> zugegeben. Die Umsetzung zu Ethylen erfolgte wie bei ACC mit Hilfe der Oxidationslösung, die Messung wurde in Abschnitt 12.1 beschrieben.

Der ACC-Gehalt berechnet sich wie folgt:

$$\text{ACC [nmol g FG}^{-1}\text{]} =$$

$$\frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{Fläche des Eichpeaks}} * \text{ACC Standard [nmol]} * \frac{\text{Endvol. [ml]} * \text{Gasraum Glasröhrchen [ml]}}{\text{Testvol. [ml]} * \text{Testvol. Gas [ml]} * \text{Einwaage [g]}}$$

Die Menge an konjugiertem ACC wurde durch Subtraktion des Gehalts an freiem ACC von der Gesamt-ACC-Menge berechnet.

### 13. Bestimmung der Salicylsäuregehalte

Die Extraktion erfolgte nach einer modifizierten Methode von Meuwly & Métraux (1993).

0,1 g unter flüssigem Stickstoff homogenisiertes Blatt- bzw. Wurzelmaterial wurde mit 5 ml 100 %igem Methanol für 60 Sekunden unter Schütteln extrahiert. Nach Zentrifugation bei 30000 g (10 Minuten, 4 °C) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet nochmals mit 4 ml 100 %igem Methanol für 30 Sekunden extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die beiden Überstände vereinigt und das Methanol bei 38 °C im Vakuum mit Hilfe eines Rotationsverdampfers (RE 111, Büchi, Flawil, CH) abgezogen.

Nach Aufnahme in 2 ml 20 %iger (v/v) Ameisensäure und Ansäuerung mit 50 µl 32 %iger (v/v) Salzsäure auf einen pH-Wert < 1,5 wurden die Proben zweimal mit Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt (5 und 3 ml) und die vereinigte organische Phase im Vakuum einrotiert.

Die wässrige Phase, die die konjugierte Salicylsäure enthielt, wurde mit 1,3 ml 32 %iger Salzsäure auf 4 N HCl eingestellt und dann in verschlossenen Pyrexgläsern für eine Stunde im Heizofen bei 80 °C hydrolysiert. Die freigesetzten Verbindungen wurden wie oben beschrieben zweimal mit Ethylacetat:Cyclohexan (1:1, v/v) ausgeschüttelt und anschließend einrotiert.

Die Proben wurden dann in 500 µl Laufmittel A, 20 % (v/v) Methanol, aufgenommen und nach Zentrifugation bei 20000 g, 10 Minuten und 4 °C mittels HPLC aufgetrennt.

Die Quantifizierung wurde mit folgender HPLC – Anlage durchgeführt:

Intelligent Pump 1 6200A	Merck/Hitachi, Darmstadt
Autosampler Basic Marathon	Spark, Holland
Fluoreszenz – Detektor RF-535	Shimadzu, München
Chromato Integrator D 2500	Merck/Hitachi, Darmstadt
RP-C-18 Nucleosil-Säule	Bischoff, Leonberg

Gradientenprogramm:

Laufmittel A:	27 mM Natriumacetat, 30 mM Zitronensäure, pH 5,0	
Laufmittel B:	27 mM Natriumacetat, 30 mM Zitronensäure in 95 % (v/v) Methanol	
Bedingungen:	0 – 20 min	100 % A
	20 – 25 min	auf 100 % B
	25 – 35 min	100 % B
	35 – 40 min	auf 100 % A
	40 – 45 min	100 % A

Aliquots von 20 µl wurden mittels einer Pumpe auf eine RP-C-18 Nucleosil-Säule (150 x 4,6 mm, 5 µm, 120 Å, Bischoff, Leonberg) aufgetragen, wobei der Fluß konstant 1,5 ml min<sup>-1</sup> betrug. Die Proben wurden in einem automatischen Probengeber auf 4 °C temperiert. Salicylsäure wurde mit dem Fluoreszenzdetektor bei Anregungs- und Emissionswellenlängen von 305 und 407 nm detektiert.

Die Retentionszeit für Salicylsäure betrug ca. 11 Minuten. In Abb. 8 ist links ein Chromatogramm der Referenzsubstanzen gezeigt. Neben Salicylsäure konnte parallel 2,5-Dihydroxy-Benzoessäure (Gentisinsäure) quantifiziert werden, die bei einer Retentionszeit von ca. 5 Minuten eluierte. Die Messung von Salicylsäure war über einen großen Konzentrationsbereich linear (Abb. 8). Proben, die oberhalb dieser Konzentration lagen, wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer verdünnt.

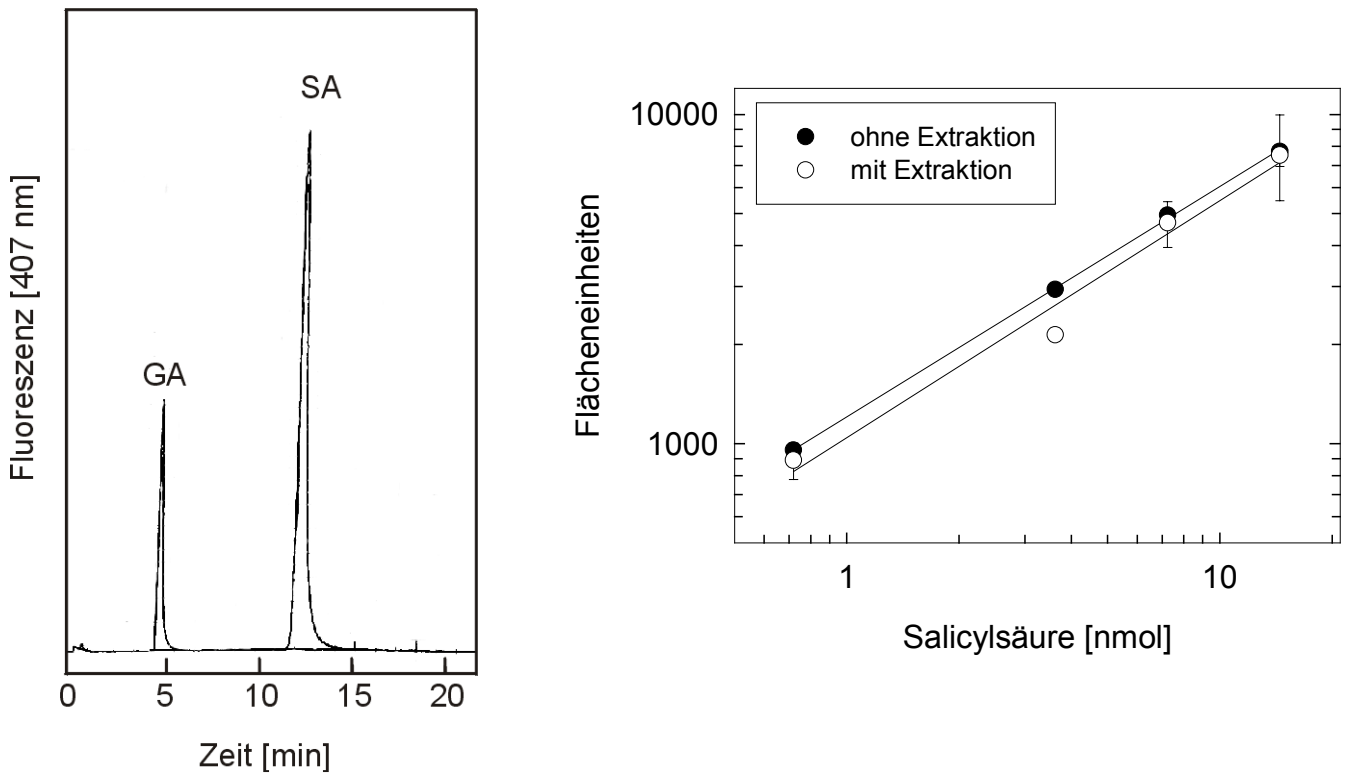


Abb. 8: Links ist ein HPLC-Chromatogramm mit den Referenzsubstanzen Gentisinsäure (5 min) und Salicylsäure (11 min) gezeigt, rechts eine Eichgerade für Salicylsäure. Dabei wurde die Referenzsubstanz in verschiedenen Konzentrationen eingespritzt bzw. dem Protokoll zur Extraktion der Salicylsäure unterworfen. Die gemessenen Flächeneinheiten sind gegen die Salicylsäuremenge in nmol aufgetragen und Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3) sind angegeben.

Aus den Flächeneinheiten der Chromatogramme wurde mit Hilfe folgender Formeln die Gehalte an Salicylsäure (SA) berechnet. Die Salicyl- und Gentisinsäuregehalte wurden in  $\text{nmol g FG}^{-1}$  angegeben.

Freie Salicylsäure:

$$\text{Freie SA [nmol g FG}^{-1}] = 25 * 1,3 * 0,0724 * \frac{1}{\text{Einwaage [g]}} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW der Flächen der Standardpeaks}}$$

↑
↑
↑
↑

Von in 500  $\mu\text{l}$  in Laufmittel A  
aufgenommener Probe wurden  
20  $\mu\text{l}$  eingesetzt

SA-Standard-Stoffmenge  
in eingespritzten 20  $\mu\text{l}$

Mittelwert aus 3-5 Wieder-  
holungen pro Lauf

Wiederfindungsrate 75 %



Konjugierte Salicylsäure:

$$\text{Konj. SA [nmol g FG}^{-1}] = 25 * 1,43 * 0,0724 * \frac{1}{\text{Einwaage [g]}} * \frac{\text{Fläche des Probenpeaks}}{\text{MW der Flächen der Standardpeaks}}$$

↑  
Wiederfindungsrate 70 %

## 14. Molekularbiologische Methoden

### 14.1. Häufig verwendete Medien, Puffer-Systeme und Lösungen

Die Lösungen wurden nach Sambrook & Russel (2001) hergestellt.

<b>SOC-Medium:</b>	2 % (w/v) Bacto-Trypton, pH 7,0 0,5 % Bacto-Hefeextrakt 0,05 % (w/v) NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O 10 mM MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 20 mM Glucose
<b>20 x SSC:</b>	0,3 M Na-Citrat, pH 7,0 3 M NaCl
<b>TBE-Puffer:</b>	45 mM Tris-HCl, pH 8,3 45 mM Borsäure 1 mM EDTA
<b>TE-Puffer:</b>	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA

## **14.2. Sterilisation und RNase-Inhibition**

Alle verwendeten Lösungen, Puffer, deionisiertes Wasser und Kunststoff-Utensilien wurden vor Gebrauch für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Glaswaren wurden über Nacht bei 200 °C im Heizofen gebacken. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Membranfilter sterilfiltriert. Lösungen für RNA-Analysen wurden mit 0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert.

## **14.3. Primer**

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von U. Linzner (Institut für Pathologie, GSF Neuherberg) nach der Di-phosphoramidit-Methode unter Verwendung eines ABI Synthesizer 394 hergestellt. Die Sequenzen sind im Anhang angegeben.

## **14.4. Isolierung von Nukleinsäuren**

### **14.4.1 Isolierung der Gesamt-RNA nach der TRIZOL-Methode**

100-150 mg unter flüssigem Stickstoff gemörstertes Pflanzenmaterial wurde mit 1 ml TRIZOL (Invitrogen, Karlsruhe) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur (RT) auf einem Schüttler inkubiert. Es wurden 200 µl eiskaltes Chloroform (Merck, Darmstadt) hinzugegeben, gemischt und wieder 3 min inkubiert. Nach Zentrifugation (12000 g, 15 min, 4 °C) wurde die wässrige obere Phase abgenommen, erneut mit Chloroform versetzt und zentrifugiert. Auf die wässrige Phase wurden 500 µl Isopropanol pipettiert und die Mischung für mindestens 10 min auf Eis gestellt. Eine anschließende Zentrifugation (15000 g, 10 min, 4 °C) pelletierte die RNA. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde die RNA in 0,1 % (w/v) Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem Wasser aufgenommen und die Konzentration photometrisch bestimmt.

### 14.4.2 Genomische DNA

Genomische DNA aus tomatenpathogenen Pilzen und Tomatenblättern wurde nach Bahnweg et al. (1998) isoliert.

100-200 mg unter flüssigem Stickstoff gemörsertes Pilzmaterial wurde zunächst mit 1 ml 50 % Methanol und 50 µl 20 %  $\text{CaCl}_2$  + 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) auf einem Rüttler 10 min bei 4 °C extrahiert. Nach Zentrifugation (17530 g, 10 min, 4 °C) und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet erneut mit 50 % Methanol, 10 min bei 4 °C unter Rütteln extrahiert. Nach dem Zentrifugieren (17530 g, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand wieder verworfen. Der dritte Extraktionsschritt bestand aus 500 µl CTAB-Puffer (100mM Tris, 20 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 2 % v/v CTAB) mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP, Merck, Darmstadt) sowie aus 400 µl Benzylchlorid (10 min rütteln, 4 °C). Zu dieser Mischung wurden dann 300 µl Chloroform und 100 µl Kunstharz (PhytoPure Resin, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) pipettiert und weitere 5 min bei 4 °C gerüttelt. Daran schloß sich eine Zentrifugation an (10 min, 4 °C, 1500 g). Dieser Schritt mit Chloroform und Kunstharz wurde mit dem wässrigen Überstand einmal wiederholt.

Für die Isolierung der genomischen DNA aus Tomatenblättern genügte es, in flüssigem Stickstoff gemörsertes Material einmal mit 500 µl Chloroform und 500 µl CTAB-Puffer mit 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol zu extrahieren. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand zu 500 µl Chloroform mit 100 µl Kunstharz gegeben und 5 min bei 4 °C unter Rütteln inkubiert.

Zur Trennung der organischen von der wässrigen Phase wurde die Mischung bei 7245 g, 5 min bei 4 °C zentrifugiert. 400 µl Überstand wurden anschließend zu 200 µl eiskaltem Isopropanol gegeben und 10 min auf Eis gestellt. Durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 17530 g und 4 °C wurden die Nukleinsäuren pelletiert. Das Pellet wurde anschließend mit 1 ml 0,1 M Natriumacetat/70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 100 % Ethanol jeweils für 5 min gewaschen. Bei Pilzmaterial schloß sich daran noch ein Waschschrift mit 100 % Chloroform an. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 100-200 µl TE-Puffer gelöst (20 min rütteln, 4 °C) und bei 4 °C aufbewahrt.

#### **14.4.3 Plasmid DNA (QIAprep Spin)**

In 5 ml selektivem LB-Flüssigmedium wurden erfolgreich transformierte Zellen (Material und Methoden Abschnitt 14.11) bei 37 °C unter Schütteln bei 250 rpm über Nacht vermehrt. 2 ml dieser Bakterienkultur wurden anschließend zur Isolierung der Plasmid DNA eingesetzt, welche nach der Qiagen Anleitung (QIAprep Spin, Miniprep Kit, Qiagen, Hilden) durchgeführt wurde. Die Plasmid DNA wurde zum Schluß mit 50 µl Wasser eluiert und nach Bestimmung der Konzentration bei –20 °C aufbewahrt oder direkt zum Sequenzieren gegeben.

#### **14.5. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Konzentration und Reinheit der Nukleinsäuren wurden spektrophotometrisch (Ultrospec 3100 Pro, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durch Messung der Adsorption bei  $\lambda = 260$  nm (Nukleinsäuren),  $\lambda = 280$  nm (Proteine) und  $\lambda = 320$  nm (kurze Nukleinsäurefragmente) bestimmt. Eine Überprüfung der Ergebnisse für RNA erfolgte durch das Auftragen von 1 µg RNA auf ein Agarose-Gel.

#### **14.6. Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren in nicht-denaturierenden Agarose-Gelen**

RNA und DNA wurden in Horizontalgelapparaturen (Easy-Cast, Erlangen) in 0,8-1 %igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Sollten sehr kleine Fragmente (ca. 100 bp) aufgetrennt werden, so wurden 2 %ige Gele aus MetaPhor™-Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) verwendet. Als Puffersystem diente TBE-Puffer (89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, pH 8,3). Für RNA-Elektrophorese wurde die Gelapparatur vor Gebrauch gut mit RNase ZAP (Biohit, Helsinki) gereinigt, um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen. Zur Anfärbung der Nukleinsäuren wurde der Gellösung Ethidiumbromid ( $0,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) zugefügt, so dass sie im UV-Durchlicht ( $\lambda = 302$  nm) sichtbar waren. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 10 % (v/v) Probenpuffer (50 % TE pH 8,0, 50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt. Als Längenstandard wurde der DNA-Standard 1000 bp Gene Ruler™ von MBI Fermentas, St. Leon-Rot eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 5-9 V  $\text{cm}^{-1}$  für 1-2 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Gele mit

einem Transilluminator (ImageMaster VDS, Amersham Pharmacia Biotech) photographisch dokumentiert.

### 14.7. Northern Analyse

Alle während der Northern Analyse verwendeten Geräte mußten zum Schutz gegen RNasen zuvor gründlich mit RNase ZAP gereinigt werden.

#### 14.7.1 Herstellung von spezifischen, mit Digoxigenin-dUTP markierten Sonden

Die Sonden wurden mit Hilfe des PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers aus 20-40 ng Plasmid DNA hergestellt. Folgendes Programm wurde verwendet, wobei sich die Annealing-Temperatur nach den spezifischen Primern der betreffenden Gene richtete:

Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
95	2	1
95	0,75	40
spezif. Temp.	0,75	
72	1	
72	10	1

Während der Amplifikation wurden in die Sonden DIG-dUTP eingebaut, die bei der späteren Detektion (Material und Methoden, Abschnitt 14.7.5) durch die Anti-DIG-Antikörper erkannt wurden. Es wurden Sonden für die Detektion von Tomaten-Abwehrgenen verwendet, die von Dr. G. Vogg zur Verfügung gestellt wurden. Die in den Vector pGEM T-Easy (Promega, Madiso, USA) klonierten Sonden wurden mit den Primern T7 und Sp6 amplifiziert (s. Anhang 1.3). Die Aufbewahrung der Sonden erfolgte bei  $-20\text{ °C}$ .

#### 14.7.2 Elektrophoretische Auftrennung der RNA in denaturierenden Gelen

Die RNA wurde unter denaturierenden Bedingungen in einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt. Der hierzu verwendete Gelpuffer enthielt 20 mM MOPS (pH 7,0), 3 % (v/v) Formaldehyd, 5 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA. Die RNA-Proben (5 µg Gesamt-RNA) wurden vor dem Auftragen mit 0,8 Volumen Probenpuffer (20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Na-

Acetat, 1 mM EDTA, 1,5 % (v/v) Formaldehyd, 25 % (v/v) Formamid deionisiert, eine Spatelspitze Bromphenolblau) versetzt, für 10 min bei 65 °C hitzedenaturiert, auf Eis gekühlt und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelapparaturen (Easy Cast) bei einer Spannung von 3-6 V cm<sup>-1</sup> für 3-4 Stunden. Als Laufpuffer diente eine Lösung aus 20 mM MOPS pH 7,0, 5 mM Na-Acetat und 1 mM EDTA. Ein gleichmäßiges Auftragen der Proben wurde mit einem Transilluminator überprüft.

### 14.7.3 Northern Blotting

Nach der denaturierenden Gelelektrophorese wurde das Gel kurz mit 20 x SSC gewaschen und die aufgetrennte RNA mittels Kapillarblot (Sambrook & Russel, 2001) über Nacht auf eine Nylonmembran (Nylon membranes, positivly charged; Roche, Mannheim) transferiert. Als Transferpuffer diente ebenfalls 20 x SSC. Am nächsten Tag wurden die Membranen und das Gel auf einen möglichst vollständigen Transfer überprüft und zur Dokumentation unter UV-Licht photographiert. Zur Fixierung der RNA wurde die Membran mit 254 nm UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker 1800, Stratagene, La Jolla, USA) und zusätzlich eine Stunde bei 80 °C im Heizofen gebacken. Bis zur Hybridisierung wurde sie in Folie eingeschweißt im Kühlschrank aufbewahrt.

### 14.7.4 Hybridisierung der Transkripte

Zur Prähybridisierung wurden 5 ml Hybridisierungslösung (DIG Easy Hyb, Granules, Roche, Mannheim) mit der Membran in Hybridisierungsröhrchen gegeben und bei 50 °C mindestens 30 min in einem Hybridisierungs-ofen (Hybrid 2000, H. Saur, Reutlingen) inkubiert. In der Zwischenzeit wurde ein Aliquot der hergestellten DIG-Sonden für 10 min bei 95 °C denaturiert und sofort auf Eis gelagert. Die Hybridisierung erfolgte nach Zugabe von 1 µl Sonde in 5 ml Hybridisierungslösung bei 50 °C über Nacht. Nach der Hybridisierung wurde die Membran für 2 x 5 min mit 2 x SSC und 0,1 % SDS bei Raumtemperatur, dann 2 x 15 min mit 0,1 x SSC und 0,1 % SDS bei 50 °C gewaschen. Zur Vermeidung unspezifischer Hintergrundfärbung musste bei allen Schritten das Antrocknen der Membran sorgfältig verhindert werden.

#### **14.7.5 Detektion der Transkripte**

Alle zur Detektion der Transkripte benötigten Reagenzien, Waschpuffer und Antikörper wurden von Roche, Mannheim bezogen und nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Zunächst wurde die Membran noch einmal für 20 min mit 1 x Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde sie für 30 min in einer 1 %igen Blockierlösung inkubiert. Die Antikörperbindung erfolgte während einer 30minütigen Inkubation der Membran mit dem in Blockierlösung 1:10000 verdünnten Antikörper (Anti-DIG-AP). Danach wurde die Membran wieder 2 x für je 15 min mit Waschpuffer gewaschen. Für die anschließende Äquilibrierung wurde die Membran für 2 min in 3 ml Detektionspuffer gegeben. Während der 5minütigen Inkubation der Membran im Lumineszenz-Reagenz CSPD, katalysierte das an den Antikörper gekoppelte Enzym alkalische Phosphatase die Umsetzung des Lumineszenz-Reagenz zu Lichtenergie. Vor der Exposition wurde die feuchte Membran in eine Plastikhülle eingeschweißt und für 10 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend wurde der Film in einer Röntgenkassette für 15-120 min der Membran exponiert. Die Entwicklung des Films erfolgte mit Hilfe einer Filmentwicklungsmaschine Curtix 60 (Agfa-Gevaert, Leverkusen).

#### **14.8. Macroarray-Analyse**

Die Macroarray-Analyse ermöglicht die parallele Analyse zahlreicher Gene auf Transkriptebene in einem einzigen Versuch. Die eingesetzten genspezifischen Sonden wurden mittels Polymerasekettenreaktion amplifiziert und auf Membranen fixiert. Durch die Hybridisierung mit einer komplexen Sonde, die durch reverse Transkription von mRNA bei der Umschreibung in cDNA radioaktiv markiert wurde und der anschließenden Messung der radioaktiven Signale nach der Hybridisierung, können Aussagen über die relativen Transkriptaktivitäten der ausgewählten Gene gemacht werden.

##### **14.8.1 Aufbau des Macroarrays**

Die in dieser Arbeit verwendeten Filter wurden im Rahmen des EU-Projektes TOMSTRESS entwickelt und von D. Inzé und F. van Breusegem, Gent, Belgien hergestellt. Die genspezifischen Sonden und EST-Klone wurden von D. Grierson, Nottingham, D. Inzé, Gent, J. Kangasjärvi, Helsinki, W. Schuch, Berkshire, P. Vera, Valencia und G. Vogg, München zur Verfügung gestellt und richteten sich gegen Abwehr- (pathogenesis-related, PR-Proteine),

Signaltransduktions-, Stoffwechsel- und Entwicklungsgene, gegen Gene der Ethylenbiosynthese und -perzeption, sowie Gene für Antioxidantien.

Das Auftragsschema ist in Abb. 9 gezeigt, wobei Spalte I Spalte II und III entspricht, d. h. jede Gensonde ist dreimal auf dem Filter fixiert. Zur Verechnung des lokalen Hintergrundes wurden je zwei Positionen pro 4 x 3 Einheit nicht beladen (grau unterlegt). Eine Liste mit den aufgetragenen Gensonden, ihrer Accession und Herkunft ist im Anhang wiedergegeben.

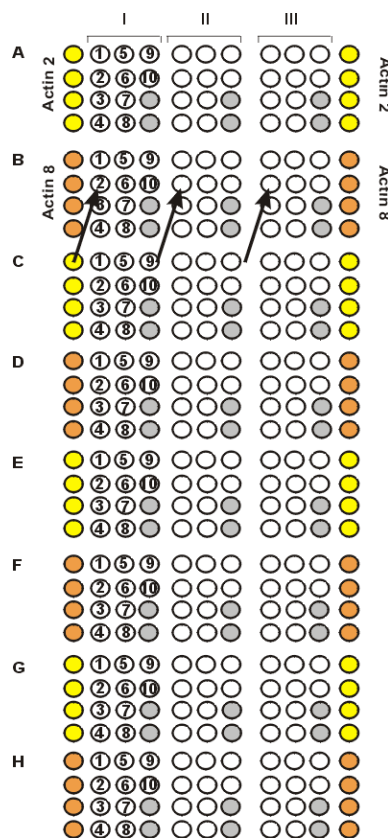


Abb. 9: Schematische Darstellung des Macroarrays für 80 Abwehrgene der Tomate. Jede der Gensonden wurde dreimal aufgetragen (Spalte I entspricht II und III). So befindet sich z. B. das Gen PR1a (P4) auf Position B2 (Pfeil). Eine vollständige Liste der Gensonden befindet sich im Anhang. Seitlich sind Gensonden für Actin 2 und 8 als Kontrollgene (gelb bzw. orange) aufgetragen, grau unterlegte Spots enthalten keine Sonden, sie dienen zum Abziehen des Hintergrundes. Der Array wurde im Rahmen des EU-Projektes TOMSTRESS entwickelt.





Nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurde der Reaktionsansatz auf 50 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> aufgefüllt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mit den MicroSpin Columns (G-25, Amersham Pharmacia) nach Angaben des Herstellers abgetrennt. Von dem Zentrifugat wurde 1 µl im Szintillationszähler gemessen. Dabei ergab sich bei erfolgreicher Markierung eine Gesamtaktivität des Zentrifugats von 10–15 Mio cpm. Das restliche Zentrifugat wurde zu der Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung mit dem radioaktiv markiertem Oligonukleotid erfolgte ca 20 h über Nacht bei 38 °C.

Anschließend wurden die Filter wie folgt gewaschen:

- 1 x kurz in 2 x SSC/0,1 % SDS, RT
- 1 x 20 min in 2 x SSC/0,1 % SDS, 38 °C
- 1 x 20 min in 0,2 x SSC/0,1 % SDS, 38 °C

Zum Schluß wurden die Filter auf einen feuchten Whatmanfilter gelegt und luftblasenfrei in Folie eingeschlagen. Die Membranen durften auf keinen Fall antrocknen, da dies ein späteres Entfernen der Oligonukleotide verhinderte. Die eingeschweißten Filter wurden für ca. 15–20 Stunden über Nacht auf Imaging Platten (Fuji, Nakanuma, Japan) exponiert. Am folgenden Tag wurden die gespeicherten Signale auf den Platten mit dem Scanner FLA-3000 (Fuji, Nakanuma, Japan) eingelesen.

Die weitere Auswertung erfolgte wie unter Abschnitt 14.8.5 beschrieben. Um die radioaktiv markierten Oligonukleotide von der Membran zu entfernen, wurden diese 2 x 30 min in 0,4 M NaOH bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln gewaschen und anschließend mit 2 x SSC neutralisiert. Um sicher zu stellen, dass die radioaktive Markierung vollständig entfernt wurde, wurden die Membranen erneut in Folie eingeschlagen, über Nacht exponiert und die Signale am nächsten Tag gemessen. Die Membranen wurden nur dann erneut für eine weitere komplexe Hybridisierung eingesetzt, wenn keine Signale mehr detektierbar waren.

In dieser Arbeit wurden Filter aus drei unterschiedlichen Chargen verwendet, d. h. sie wurden zu verschiedenen Zeiten mit Sonden hergestellt, die in neuen PCR-Reaktionen amplifiziert wurden. Abb. 10 und Abb. 11 zeigen den Vergleich dieser drei Filterchargen anhand der Signalintensitäten (Auswertung vgl. Abschnitt 14.8.5).

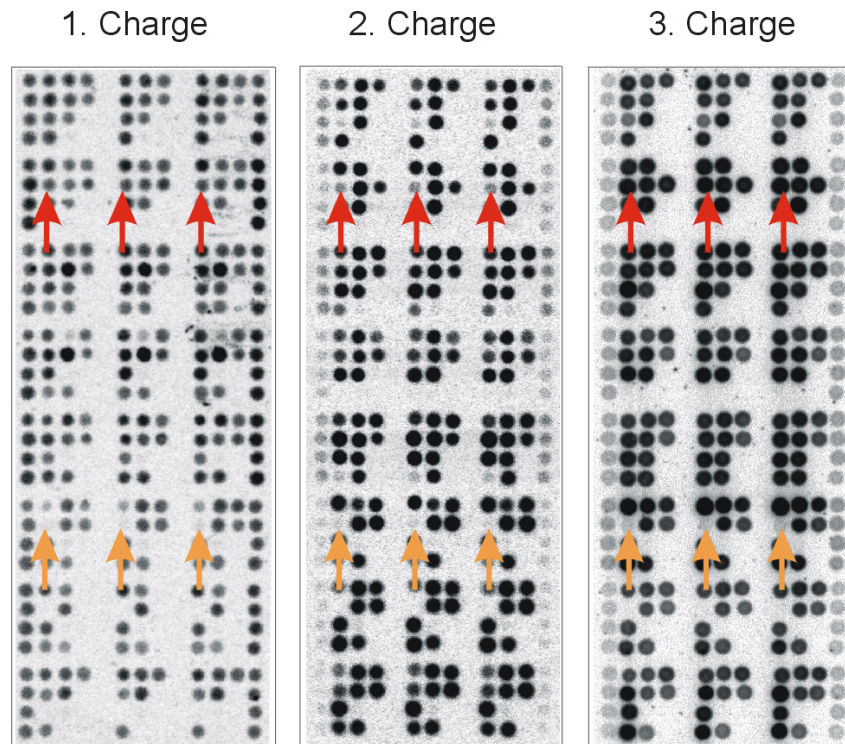


Abb. 10: Qualitätsvergleich der Macroarrays. Filter, zu unterschiedlichen Zeiten hergestellt, (Charge 1-3) wurden vor Verwendung der komplexen Sonden mit  $^{33}\text{P}$ -T7-Oligonukleotid hybridisiert, um ein gleichmäßiges Auftragen der Sonden zu überprüfen. Die Sonde für das Gen PR1a (P4) auf Position B2 ist als Beispiel für unterschiedlich hohe Auftragsmengen angegeben (rote Pfeile). Einige Sonden konnten nicht mit T7 detektiert werden, da sie in Vektoren kloniert wurden, die keine Sequenz für das T7-Oligonukleotid enthielten (Beispiel: ACS-1b, Position F2, orange Pfeile).

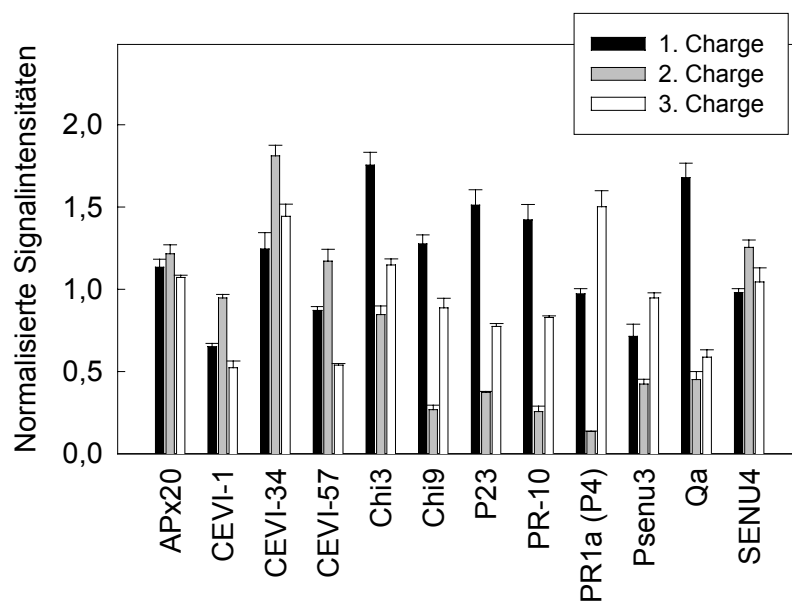


Abb. 11: Vergleich der normalisierten Signalintensitäten der Sonden auf den verschiedenen Filterchargen anhand ausgewählter Gene. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Einige der Gensonden konnten nicht über die Referenzhybridisierung detektiert werden, da sie in Vektoren kloniert wurden, die keine Sequenz für das T7-Oligonukleotid enthielten (z. B. ACS-1b, Position F2, orange Pfeile in Abb. 10). Innerhalb einer Filtercharge waren die Sonden relativ gleichmäßig aufgetragen; die Signalintensitäten wiesen einen durchschnittlichen Standardfehler von 2-5 % auf. Zwischen den einzelnen Chargen konnte es aber auch zu deutlichen Schwankungen kommen, wie am Beispiel des Genes PR1a (P4) auf Position B2 gezeigt wird (rote Pfeile in Abb. 10). Auf Filtern der ersten Charge war die Sonde für dieses Gen in 7fach höherer Menge aufgetragen als auf der zweiten Charge, die dritte Charge wies sogar 11fach höhere Signalintensitäten auf. Sollen hybridisierte Filter verschiedener Chargen verglichen werden, müssen diese Unterschiede berücksichtigt und in die Auswertung miteinbezogen werden.

### 14.8.4 Komplexe Hybridisierung mit cDNA

Für die komplexe Hybridisierung wird die in der Gesamt-RNA enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben, wobei während des Umschreibens radioaktiv markierte Desoxyadenosintriphosphate ( $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP) eingebaut werden. Die so markierte cDNA wird in der Hybridisierung eingesetzt.

Das Umschreiben in cDNA erfolgte mit dem Strip-EZ™ RT Kit von Ambion (Austin, Texas). Die Technologie dieses Herstellers erlaubt ein sicheres Entfernen der radioaktiv markierten cDNA nach der Hybridisierung, so dass die Membranen bis zu fünfmal ohne Verlust an aufgetragenen PCR-Produkten wiederverwendet werden können. Während des Umschreibens in cDNA wird ein modifiziertes Desoxycytidin eingebaut, welches durch einen speziellen Degradationspuffer wieder abgebaut werden kann.

Vor der Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA wurden die Filter in 3 ml Prähybridisierungslösung mindestens vier Stunden im Drehofen prähybridisiert.

Bei der Herstellung der radioaktiv markierten cDNA wurde dem Protokoll des Herstellers weitgehend gefolgt. Es wurden 4 µg Gesamt-RNA und 40 µCi  $\alpha$ -[<sup>33</sup>P]-dATP in die Reaktion eingesetzt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, 1 µl 0,5 M EDTA zugegeben und die nicht eingebauten Nukleotide über Säulchen (MicroSpin Columns, Amersham Pharmacia) abgetrennt. 1 µl des Zentrifugats wurden im Szintillationszähler gemessen, die Gesamtaktivitäten betragen ca. 5-10 Millionen cpm pro Ansatz. Das restliche Zentrifugat wurde zum Denaturieren der Sekundärstrukturen für 2 min

auf 100 °C erhitzt und anschließend auf Eis möglichst schnell abgekühlt. Die jetzt radioaktiv markierte cDNA wurde nun zu den Filtern in die Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 60 °C über Nacht im Drehofen.

Am nächsten Morgen wurden die Filter gewaschen:

- 1 x kurz in 2 x SSC/0,1 % SDS, RT
- 1 x 20 min in 2 x SSC/0,1 % SDS, 68 °C
- 1 x 20 min in 0,2 x SSC/0,1 % SDS, 68 °C

Das Exponieren und Entwickeln der Filter wurde wie bei der Referenzhybridisierung beschrieben durchgeführt. Waren die Signale sehr schwach, so wurde die Image-Platte bis zu zwei Wochen exponiert.

Das Entfernen der radioaktiv markierten cDNA erfolgte nach dem Protokoll von Ambion. Die Filter wurden zunächst 5-10 min bei RT in Degradationspuffer und anschließend 20 min bei 68 °C im „Reconstitution Buffer“ inkubiert. Wurden nach einer erneuten 24-stündigen Exposition der Filter keine Signale mehr detektiert, so konnten die Membranen wieder hybridisiert werden.

### **14.8.5 Auswertung der radioaktiven Signale**

Die Quantifizierung der radioaktiven Signale erfolgte mit dem von der Firma Interfocus erworbenen Programm ArrayVision. Die bei einer Auflösung von 25 µm eingelesenen Daten (FLA-3000, Fuji, Nakanuma, Japan), konnten mit diesem Programm geöffnet und die Intensitäten der einzelnen Punkte vermessen werden. Auch die ersten Schritte zur Auswertung wurden mit Hilfe dieses Programmes durchgeführt. Zunächst wurde von den Signalintensitäten die Intensität der Hintergrundpositionen, gemittelt über den ganzen Filter, subtrahiert. Anschließend erfolgte die Normalisierung über die Gesamtheit aller Signalintensitäten, um Unterschiede in der Markierungseffizienz und bei der Hybridisierung abzugleichen. Dazu wurde die Signalintensität jeder Position durch die Gesamtheit aller Signalintensitäten dividiert. Die so normalisierten Werte konnten dann als Excel-Arbeitsblatt abgespeichert werden. Nun wurden die dreifach aufgetragenen PCR-Produkte den entsprechenden Gennamen zugeordnet, und der Mittelwert aus den normalisierten Signalintensitäten gebildet. Signalintensitäten, die geringer als der Hintergrund waren, wurden durch den für den jeweiligen Filter geringste gemessene Genaktivität ersetzt und

gekennzeichnet. Diese Werte sind dann zwar artifiziell, aber der Wahrheit angenähert. Zum Schluß konnten die Induktionsfaktoren der einzelnen Gene berechnet werden, dazu wurde das Verhältnis der Behandlung zur jeweiligen Kontrolle bestimmt.

Eine alternative Möglichkeit zur Normalisierung ist die Verwendung von Stoffwechselgenen, die unter den jeweiligen Versuchsbedingungen in ihrer Genexpression unverändert bleiben. Auf dem Array sind Gensonden für Actin2 und 8 seitlich aufgetragen, die zur Normalisierung herangezogen werden können. In der folgenden Tabelle sind die Induktionsfaktoren ausgewählter Gene nach Normalisierung über die Gesamtheit der Signalintensitäten und nach einer Normalisierung über Actin-Sonden gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, dass die Induktionsfaktoren bei beiden Normalisierungsstrategien in einem ähnlichen Bereich lagen; bei einer Normalisierung über Actin-Sonden waren sie im allgemeinen etwas höher.

Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde eine Normalisierung der Filter über die Gesamtheit der Signale durchgeführt. Diese Strategie schien zuverlässiger, da in manchen Experimenten auch Unterschiede bei der Genexpression des Actins festgestellt wurden.

Tabelle 6: Vergleich der Induktionsfaktoren nach Anwendung verschiedener Normalisierungsstrategien. Die Proben für diese komplexe Hybridisierung stammen aus einem Infektionsversuch mit *Alternaria alternata*, es wurden nach 1-tägiger Infektion die mittelalten Blätter geerntet.

	<b>Induktionsfaktoren nach Normalisierung über</b>	
	<b>die Gesamtheit der Signalintensitäten</b>	<b>Actin-Sonden</b>
Cab-1b	0,1	0,1
Chi9	55,7	73,0
Fe-SOD	1,5	1,8
InvLp11	117,1	145,6
Le-ETR1	19,4	24,7
P23	112,7	156,3
P4	46,4	62,5
Qb	10,7	12,9
SAM-1	0,8	0,6
Ubi	1,9	1,5

### 14.8.6 Methodische und biologische Varianz der Macroarray-Analysen

Mit Hilfe der Macroarray-Analysen sollte in dieser Arbeit ein erstes Screening der Genexpression verschiedener Abwehrgene durchgeführt werden. Da die Anzahl der zur Verfügung stehenden Filter limitiert war, konnte nicht jede einzelne Probe mehrmals hybridisiert werden. Um dennoch die methodische und auch biologische Varianz der Analysen abschätzen zu können, wurde diese anhand eines Experimentes beispielhaft bestimmt. Für die methodische Varianz wurden drei unabhängige Pflanzenproben gemischt, daraus dreimal die Gesamt-RNA extrahiert und die markierte cDNA hergestellt. Die biologische Varianz wurde anhand desselben Pflanzenmaterials beurteilt, nur dass nun aus jeder unabhängigen Probe die Gesamt-RNA extrahiert und für die Hybridisierung verwendet wurde (Tabelle 7). Die einzelnen Hybridisierungen schwanken bei Verwendung des gleichen Ausgangsmaterials mit einem Standardfehler zwischen 1 und 9 %. Der biologische Fehler ist wie zu erwarten deutlich höher, hier beträgt der Standardfehler zwischen 4 und 27 %.

Tabelle 7: Darstellung der methodischen und biologischen Varianz der Macroarray-Experimente anhand repräsentativ ausgewählter Gensonden. Zur Bestimmung der methodischen Varianz wurden drei unabhängige Pflanzenproben (Tomatenblätter der Sorte MicroTom nach 1-tägiger Infektion mit *A. alternata*) gemischt, und daraus für die Hybridisierung der Filter dreimal die Gesamt-RNA extrahiert. Die biologische Varianz wurde anhand derselben Pflanzenproben beurteilt; aus jeder unabhängigen Probe wurde die Gesamt-RNA extrahiert und für die Hybridisierung verwendet. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE % ( $n = 3$ ).

	Normalisierte Signalintensität $\pm$ SE %	
	Methodische Varianz	Biologische Varianz
SAM-1	0,288 $\pm$ 6	0,289 $\pm$ 17
Qb	0,459 $\pm$ 9	0,557 $\pm$ 23
Fe-SOD	0,485 $\pm$ 7	0,487 $\pm$ 27
Ubi	1,269 $\pm$ 4	0,802 $\pm$ 15
Le-ETR1	1,739 $\pm$ 2	1,213 $\pm$ 15
P4	2,819 $\pm$ 2	1,508 $\pm$ 8
InvLp11	2,876 $\pm$ 1	1,965 $\pm$ 6
Cab-1b	4,702 $\pm$ 1	6,578 $\pm$ 25
Chi9	7,313 $\pm$ 2	6,005 $\pm$ 9
P23	7,729 $\pm$ 6	10,722 $\pm$ 4

## 14.9. Polymerase Kettenreaktion (PCR)

### 14.9.1 Design der Primer

Alle Primer besaßen eine Länge von 20-26 Basen.

Spezifische Primer für die tomatenpathogenen Pilze *Alternaria alternata* und *Cladosporium herbarum* wurden in die ITS (internal transcribed spacer)-Regionen gelegt. Für *Botrytis cinerea* wurde mit Hilfe des Zufallsprimers OPA-13 (Qiagen Operon) eine SCAR (*sequence characterised amplified region*)-Region amplifiziert. In die Sequenz dieser Region konnten dann spezifische Primer gelegt werden.

### 14.9.2 PCR-Amplifikation

Alle Reaktionen wurden in einem Volumen von 25 µl durchgeführt, welches sich aus 1 x Reaktionspuffer, 0,1 mM dNTPs, 1 U DNA-Polymerase, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol Primer (forward und reverse), 20-40 ng DNA und sterilem Wasser zusammensetzte.

Folgendes Cycler-Programm wurde verwendet. Annealingtemperatur und –dauer wurde den Primern, der Größe und der Expression des betreffenden Genes entsprechend angepaßt.

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	94	3	1
Denaturierung	94	0,5	30
Annealing	spezifisch für Primer	1	
Extension	72	2	
Extension	72	5	1

### 14.9.3 Real-Time PCR (Taqman)

Mit Hilfe der Real-Time PCR mit dem AbiPrism 7700 (Applied Biosystems, Weiterstadt) konnte Pilz-DNA aus Blättern infizierter Tomatenpflanzen quantitativ nachgewiesen werden. Dabei wird die Menge des PCR-Produktes nach jedem PCR-Zyklus anhand der Zunahme der Fluoreszenz verfolgt, die bei der Bindung des Farbstoffes SybrGreen an doppelsträngige DNA gemessen wird. Am Ende des Laufes wird die Menge des DNA-Templates anhand der C<sub>T</sub> (cycle-threshold)-Werte ermittelt. Der C<sub>T</sub>-Wert ist die Nummer des Zyklus, bei der die Fluoreszenz den Hintergrundwert übersteigt.



Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 50  $\mu\text{l}$  durchgeführt und enthielten 50 % (v/v) SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems, Weiterstadt), der aus Reaktionspuffer, Fluoreszenzfarbstoff und DNA-Polymerase bestand. Dazu mußten noch die jeweiligen Primer (forward und reverse) in einer Konzentration von 10 pmol, 1  $\mu\text{l}$  genomische DNA und steriles Wasser gegeben werden.

Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

Bezeichnung	Temperatur [ $^{\circ}\text{C}$ ]	Dauer [min]	Anzahl der Zyklen
Eliminierung von Uracil-DNA	50	2	1
Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	15 sec	40
Annealing	60	1	

Um aus den  $C_T$ -Werten DNA-Gehalte in  $\text{ng mg FG}^{-1}$  berechnen zu können, wurden bei jedem Lauf Reaktionen mit definierten Pilz-DNA-Gehalten durchgeführt, um eine Eichkurve ( $C_T$ -Werte gegen eingesetzte DNA-Mengen) erstellen zu können.

### 14.10. Elution von DNA aus Agarose-Gelen

Zur Elution von DNA aus Agarose-Gelen wurde der Agarose Gel DNA Extraction Kit von Roche, Mannheim gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde abschließend in 20  $\mu\text{l}$  Wasser eluiert.

### 14.11. Klonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten

#### 14.11.1 Ligation

Die Ligation in einen Vektor erfolgte mit Hilfe des pGEM-T Vector Systems (Promega, Madison, USA) nach dem Protokoll des Herstellers.

Ligationsansatz

5  $\mu\text{l}$  2 x Rapid Ligation Buffer

1  $\mu\text{l}$  pGEM-T Vector

- 2 µl PCR-Produkt
- 1 µl T4 DNA-Ligase
- 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Die Ligation wurde eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt.

### 14.11.2 Transformation

Bei der Transformation nach dem Protokoll von Promega wurden 2 µl des Ligationsansatzes zu den kompetenten Zellen (JM109 High Efficiency Competent Cells) gegeben, und der Vector durch Hitzeschock bei 42 °C in die Zellen eingeschleust. 100 und 200 µl des Transformationsansatzes wurden anschließend auf einer LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal Platte (Ampicillin 100 µg ml<sup>-1</sup>, 20 µl 0,1 M IPTG, 50 µl X-Gal 20 mg ml<sup>-1</sup> in N,N-dimethylformamid ausplattiert. Von den wachsenden Kolonien wurden stets mehrere gepickt und das Vorhandensein des Inserts mit einer PCR-Analyse bestätigt.

### 14.11.3 Sequenz-Analysen

Jede Klonierung wurde durch Sequenzieren auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Die Klone wurden zum Sequenzieren entweder zur Firma Toplab, München, oder MWG Biotech, Ebersberg, gegeben. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit den Software Programmen DiAlign von Genomatix (<http://www.geomatix.gsf.de/cgi-bin/dialign.pl>), Blast vom National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Vector NTI (InforMax Inc.).

## 15. Statistik

Ergebnisse dieser Arbeit, die mit Fehlerbalken angegeben wurden, stammen aus Experimenten mit n = mindestens 3 Parallelen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte ± Standardfehler (SE). Vergleiche von Datengruppen auf signifikante Unterschiede, sowie lineare Regressionen wurden mit dem Programm StatGraphics Version 2.6 nach dem „Least Significant Difference“ (LSD)-Test durchgeführt.

### III. Ergebnisse

#### 1. Induktion der Resistenz von Tomatenpflanzen gegenüber *Alternaria alternata* durch das Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens*

In der Rhizosphäre lebende Bakterien sind in der Lage, die pflanzliche Abwehr zu stärken und bei einem Pathogenbefall eine systemische Resistenz in der Pflanze zu induzieren (Van Loon et al., 1998). Dies führt zu einer erhöhten Krankheitsresistenz, das Pathogen wird in seinem Wachstum gehindert, die Pflanzen zeigen weniger starke Schäden. Ein gut charakterisiertes System stellt die Interaktion von *Arabidopsis thaliana* mit dem nicht-pathogenen Rhizosphärebakterium *Pseudomonas fluorescens* WCS417r dar (Pieterse et al., 1996, 1998; Van Wees et al., 1997). Mit diesem Bakterium vorbehandelte Pflanzen hatten um 40-60 % weniger Schäden bei einer Infektion mit dem pflanzenpathogenen Bakterium *P. syringae* pv. *tomato* oder dem wurzelpathogenen Pilz *Fusarium oxysporum* pv. *raphani*.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom durchgeführt. Diese Sorte zeichnet sich durch ihre Kleinwüchsigkeit aus und wurde ursprünglich als Sorte für Kleingärtner mit eingeschränktem Platz z. B. zur Kultivierung in Balkonkästen gezüchtet (Scott & Harbough, 1989). Aufgrund ihres geringen Platzbedarfs und ihres schnellen Lebenszyklusses (Fruchtreife 70-90 Tage nach der Aussaat) eignet sich diese Sorte in hervorragender Weise für Forschungszwecke (Meissner et al., 1997).

In dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss des Rhizosphärebakteriums *Serratia liquefaciens* MG1 auf die pflanzliche Krankheitsresistenz von Tomatenpflanzen untersucht. Dieses ubiquitär vorhandene Rhizosphärebakterium produziert zwei *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) mit einer *N*-Acylseitenkette aus 4 bzw. 6 Kohlenstoffatomen (Abb. 2). Mit Hilfe dieser Pheromon-ähnlichen Substanzen regulieren die Bakterien Zelldichte-abhängig die Produktion einer die Oberflächenspannung herabsetzende Substanz, die es spezialisierten Zellen ermöglicht, über feste Oberflächen zu schwärmen (Eberl et al., 1999). Um die Bakterien anschließend leichter an den Wurzeln nachweisen zu können, wurde in den Versuchen ein transgener Bakterienstamm verwendet, der mit dem grün fluoreszierenden Protein (Gfp) markiert war (vgl. Material und Methoden, Tabelle 2; Givskov et al., 1988).

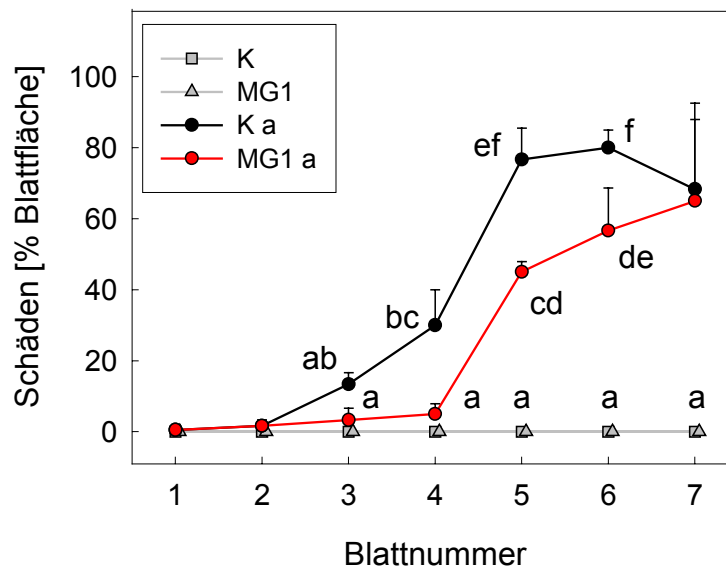


Abb. 12: Abhängigkeit der Blattschäden vom Blattalter nach Inokulation von Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom mit *Serratia liquefaciens* MG1 und anschließender Infektion mit *Alternaria alternata*. K steht für Kontrollpflanzen, die nicht mit dem Bakterienstamm inokuliert wurden, MG1 für inokulierte Pflanzen. Der Zusatz „a“ kennzeichnet Pflanzen, die drei Tage später mit einer Suspension aus *A. alternata* Sporen besprüht wurden, die restlichen Pflanzen wurden mit der Resuspensionslösung ohne Sporen behandelt. Als Blatt 1 wurde das erste Blatt von oben bezeichnet, das  $\geq 3,5$  cm ist. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Unterschiedliche Buchstaben geben im LSD Multiple Range Test signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten an.

Die Pflanzen wurden mit einer Bakteriensuspension aus *S. liquefaciens* MG1 beimpft, dann drei Tage später mit dem sprosspathogenen Pilz *Alternaria alternata*, einem Isolat von Tomatenpflanzen, infiziert (G. Bahnweg, persönliche Mitteilung, vgl. Material und Methoden; Abschnitte 5, 6). Zwei Tage später zeigten die Blätter schwarze punktförmige Nekrosen, die sich rasch ausbreiteten. Der Anteil an nekrotischer Blattfläche war um so höher, je älter die Blätter waren (Abb. 12). Alte Blätter (Blatt 5, 6) waren im Mittel zu 80 % geschädigt. Vor allem in den mittelalten und alten Blättern waren die Schäden signifikant um 30-40 % bei den mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Pflanzen reduziert, bei Blatt 4 sogar um 80 %. Abb. 13 zeigt repräsentativ eine mit MG1 vorbehandelte Pflanze und eine Kontrollpflanze. Nach vier Tagen waren vorwiegend die alten Blätter (Blatt 5, 6; Pfeil) bei den Kontrollpflanzen vollständig von Nekrosen überzogen.



Abb. 13: Einfluss von *Serratia liquefaciens* MG1 auf die pflanzliche Krankheitsresistenz von Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom nach 4-tägiger Infektion mit dem sprosspathogenen Pilz *Alternaria alternata*. Links ist eine Pflanze gezeigt, die mit den Bakterien vorbehandelt wurde, rechts eine Kontrollpflanze. Unterschiede in den Blattschäden zwischen den inokulierten Pflanzen und Kontrollen sind besonders deutlich bei den mittelalten Blättern (Blattnummer 5 und 6) zu sehen (Pfeile).

## 2. Interaktionen von *N*-Acyl-L-homoserinlacton-produzierenden Rhizosphärebakterien mit Tomatenpflanzen

Nachdem das Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1 in der Lage war, die pflanzliche Krankheitsresistenz gegen den pathogenen Pilz *Alternaria alternata* zu stärken, wurde das verwendete Modellsystem aus Tomatenpflanzen und dem Rhizosphärebakterium *S. liquefaciens* MG1 genauer hinsichtlich des Wachstums der Pflanze und dem Kolonisierungsverhalten der Bakterien charakterisiert.

### 2.1. Charakterisierung des Wachstums von Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Pflanzen je nach Entwicklungsstadium unterschiedlich in der Empfindlichkeit gegenüber Pathogenen oder der Ausbildung der induzierten Resistenz reagieren, wurde das Entwicklungsstadium der Pflanzen anhand von Höhe und Blattzahl charakterisiert. Damit wurde sichergestellt, dass alle Experimente unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden.

Die Anzucht der Tomatenpflanzen erfolgte in handelsüblicher Erde in Töpfen mit 80 ml Volumen. Unter diesen Bedingungen wurden die Pflanzen 10-15 cm hoch, besaßen etwa 14 Blätter und begannen ca. 35 Tage nach Aussaat zu blühen (Abb. 14). Für die Experimente wurden Pflanzen im Alter von fünf Wochen mit 6-7 Blättern und einer Höhe von ca. 8 cm eingesetzt. Zu diesem Zeitpunkt nahmen Höhe und Blattzahl noch stetig zu; die Pflanzen befanden sich in einem linearen Wachstumsstadium. Die ersten Knospen erschienen etwa 14 Tage nach dem Pikieren, im Durchschnitt besaßen die Pflanzen eine Anzahl von über 50 Knospen während des Untersuchungszeitraumes von 70 Tagen. Nach etwa 42 Tagen stagnierte das Wachstum eine Woche nach dem Einsetzen der Blüte. Die Knospenbildung erreichte ihr Maximum etwa acht Tage später.

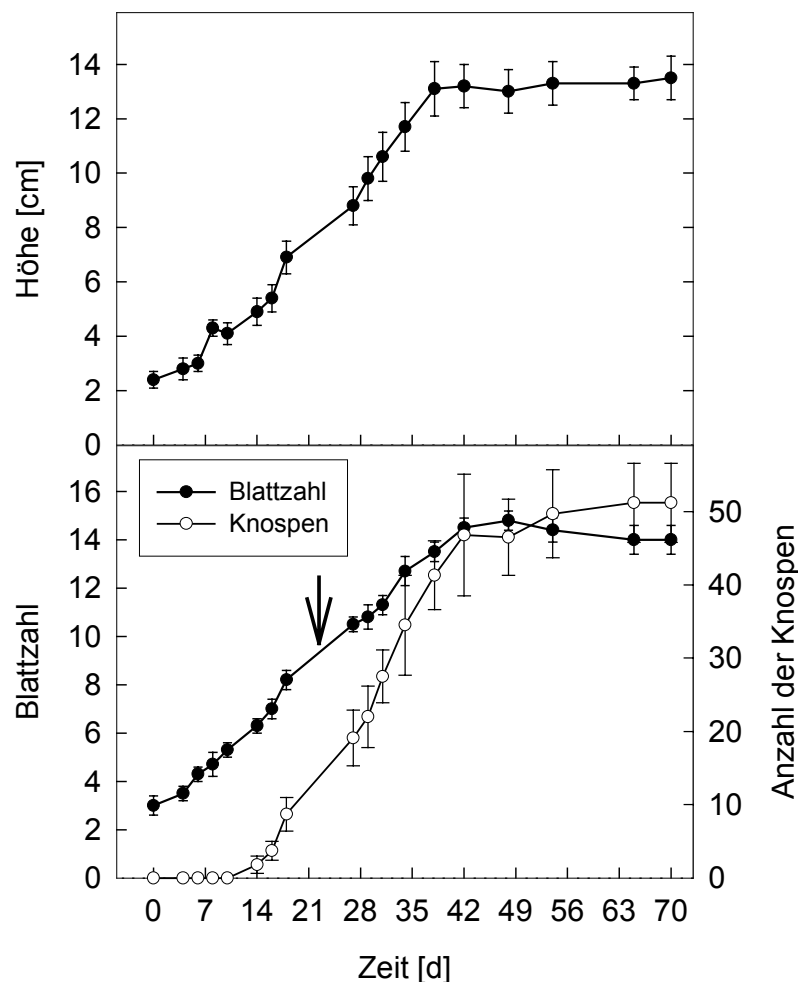


Abb. 14: Zeitverlauf des Wachstums von Tomatenpflanzen der Sorte MicroTom. Die Pflanzen wurden im Alter von zwei Wochen pikiert (Zeitpunkt 0). Für die Versuche wurden Pflanzen im Alter von fünf Wochen (Pfeil, ca. 21-28 Tage nach dem Pikieren) noch vor Beginn der Blüte eingesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 6$ ).

## 2.2. Kolonisierung der Tomatenwurzel durch Rhizosphärebakterien

Voraussetzung für eine Erhöhung der Widerstandskraft von Pflanzen gegenüber Pathogenen durch Rhizosphärebakterien ist eine erfolgreiche Besiedelung der Wurzel. Die zugegebenen Bakterien müssen in ausreichender Zahl und über einen längeren Zeitraum hinweg an der Wurzel nachzuweisen sein. Um die Bakterien leichter an der Wurzel detektieren zu können, wurden Stämme verwendet, die eine Insertion des *gfp* Gens, das für das grün fluoreszierende Protein kodiert, im Chromosom aufweisen (Chalfie et al., 1994).

Die meisten der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden mit dem Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1 durchgeführt. Aus der Literatur ist bekannt, dass Vertreter der Gattung *Serratia* Tomatenwurzeln kolonisieren können (Raupach et al., 1996) und auch Biocontrol-Aktivität besitzen (Kalbe et al., 1996).

Zur Inokulation der Pflanzen wurden 10fach aufkonzentrierte Über-Nacht-Kulturen von *S. liquefaciens* MG1 verwendet, die anschließend auf die gewünschte Zelldichte verdünnt wurden ( $10^6$ ,  $10^8$  und  $10^{10}$  colony forming units, cfu ml<sup>-1</sup>). Die Inokulation mit den Bakterien und die Bestimmung der Lebendkeimzahl erfolgte wie in Material und Methoden, Abschnitt 9, beschrieben.

Die Lebendkeimzahlen an den Wurzeln waren abhängig von der Menge an zugegebenen Bakterien (Abb. 15). Nach Zugabe von  $10^{11}$  Zellen pro Pflanze betrug die Lebendkeimzahl zwischen  $1 \times 10^8$  und  $5 \times 10^6$  cfu g FG<sup>-1</sup>. Bei einer Inokulationsdichte von  $10^9$  Zellen wurden zwischen  $2 \times 10^5$  und  $4 \times 10^4$  cfu g FG<sup>-1</sup> wiedergefunden. Die Lebendkeimzahl an den Wurzeln sank zwar leicht innerhalb von neun Tagen, die Bakterien waren aber noch sehr gut zu detektieren. Bei geringeren Inokulationsdichten konnten bereits nach sechs Tagen keine Bakterien mehr an den Wurzeln nachgewiesen werden.

Für die nachfolgend beschriebenen Experimente mit *S. liquefaciens* MG1 wurden ausschließlich Inokulationsdichten von  $10^{11}$  Zellen pro Pflanze verwendet, um eine ausreichende Besiedelung der Wurzeln zu gewährleisten. Eine Kolonisierung mit  $10^5$  cfu g FG<sup>-1</sup> wurde als Schwellenwert zur Induktion einer induzierten systemischen Resistenz (ISR) in Rettich und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) beschrieben (Raaijmakers et al., 1995; Van Wees et al., 1997).

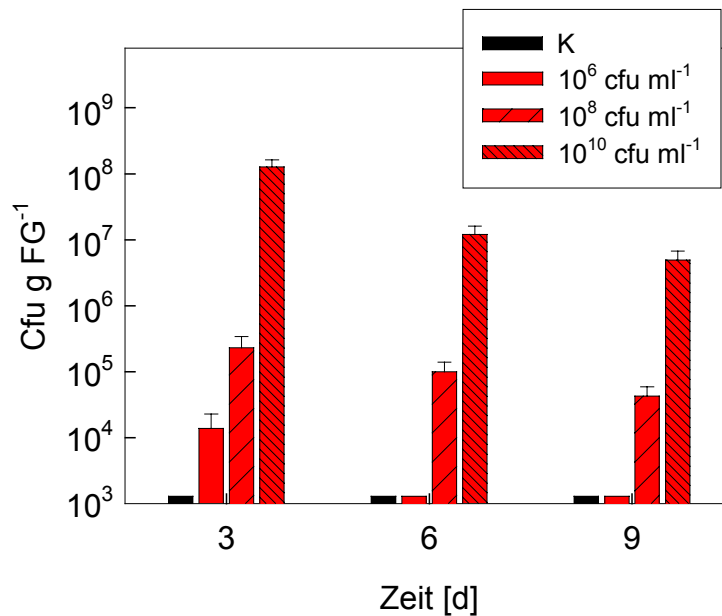


Abb. 15: Abhängigkeit der Lebendkeimzahlen von *S. liquefaciens* MG1 an Tomatenwurzeln von der Inokulationsdichte. Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit 10 ml unterschiedlich konzentrierten Bakteriensuspensionen beimpft. Kontrollpflanzen wurden mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte ± SE (n = 3).

In Tabelle 8 wird die Entwicklung der Lebendkeimzahlen an Tomatenwurzeln, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, in einem Zeitraum von fünf Stunden bis zu neun Tagen nach Zugabe der Bakterien zusammengefasst. Dieser Zeitraum umfasst die Dauer der nachfolgend beschriebenen Experimente von der Inokulation bis zum letzten Erntezeitpunkt. Auffällig war dabei der exponentielle (mehr als 1000fache) Anstieg der Zellzahl zwischen fünf Stunden und einem Tag, anschließend nahmen die Zahlen wieder ab, um sich ab fünf Tagen bei einem Wert von 10<sup>6</sup> cfu g FG<sup>-1</sup> einzupendeln. Zusätzlich wurden auch Pflanzen mit der *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante von *S. liquefaciens* MG1, MG44, inokuliert (vgl. Ergebnisse, Abschnitt 2.4). Dieser Stamm war ebenfalls mit dem grün fluoreszierenden Protein Gfp markiert (vgl. Material und Methoden, Tabelle 2). Der Wildtyp-Stamm MG1 und die AHL-Nullmutante MG44 zeigten ein vergleichbares Kolonisierungsverhalten, das sich in ähnlichen Lebendkeimzahlen der Wurzeln niederschlug (Tabelle 8).

Da direkte Interaktionen zwischen *S. liquefaciens* -Stämmen und pflanzenpathogenen Pilzen in der Literatur bereits beschrieben sind (Kalbe et al., 1996), wurde untersucht, ob *S. liquefaciens* MG1 in der Lage ist, sich von den Wurzeln durch die Sprossachse in die Blätter auszubreiten. Nach dem Ausplattieren der homogenisierten Blätter auf Selektivmedium konnten drei, sechs und neun Tage nach Inokulation der Wurzeln keine



Kolonien von *S. liquefaciens* MG1 gezählt werden (Tabelle 8). Daher können direkte Interaktionen zwischen den Rhizosphärebakterien und sprosspathogenen Pilzen in den nachfolgend beschriebenen Experimenten ausgeschlossen werden.

Tabelle 8: Zeitverlauf der Lebendkeimzahlen an den Wurzeln [cfu g FG<sup>-1</sup> x 10<sup>5</sup>] nach Inokulation von Tomatenpflanzen mit *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 in einer Konzentration von 10<sup>11</sup> Zellen pro Pflanze. Gezeigt sind Mittelwerte ± SE (n = 3). Zusätzlich wurde untersucht, ob auch in den Blättern *S. liquefaciens* MG1 nachzuweisen ist. (n.n. = nicht nachweisbar, – nicht untersucht)

	Wurzel							Blatt		
	5 h	10 h	1 d	3 d	5 d	7 d	9 d	3 d	6 d	9 d
MG1	0,9 ± 0,1	17,6 ± 2,5	637,9 ± 152,0	251,4 ± 126,0	6,9 ± 2,5	7,2 ± 1,3	11,0 ± 2,3	n. n.	n. n.	n. n.
MG44	1,1 ± 0,4	6,4 ± 1,2	1030,3 ± 240,0	293,8 ± 126,0	10,4 ± 4,1	9,3 ± 2,3	11,1 ± 2,0	–	–	–

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit Rhizosphärebakterien der Gattung *Pseudomonas* untersucht. *Pseudomonas putida* IsoF ist ein Isolat aus der Tomatenrhizosphäre, das von A. Steidle, Institut für Mikrobiologie, TU München charakterisiert wurde (Steidle et al., 2002). Neben dem Wildtyp-Stamm wurde auch die *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante in den Studien zur Biocontrol-Aktivität verwendet. Zu Vergleichszwecken wurde der Stamm *Pseudomonas fluorescens* WCS417r eingesetzt, der eines der am besten charakterisierten Biocontrol-Bakterien darstellt und bereits in Studien mit Ackerschmalwand (*A. thaliana*), Nelke und Tomate untersucht wurde (Duijff et al., 1997; Pieterse et al., 1996; Van Peer et al., 1991).

10fach aufkonzentrierte Über-Nacht Kulturen der beiden *P. putida* –Stämme IsoF und F117 erreichten maximale Lebendkeimzahlen von 10<sup>8</sup> colony forming units (cfu) ml<sup>-1</sup>, der Stamm *P. fluorescens* WCS417r 10<sup>9</sup> cfu ml<sup>-1</sup> (vgl. Material und Methoden, Tabelle 5). Tomatenpflanzen, die mit einem der drei *Pseudomonas*-Stämme inokuliert wurden, wiesen an den Wurzeln Lebendkeimzahlen von 10<sup>5</sup> bis 10<sup>6</sup> cfu g FG<sup>-1</sup> während eines Zeitraumes von neun Tagen auf (Tabelle 9). Die Lebendkeimzahlen waren damit zu späteren Zeitpunkten vergleichbar zu *S. liquefaciens*, obwohl die Inokulate 100 bzw. 10fach geringere Zelldichten besaßen.

Tabelle 9: Lebendkeimzahlen an den Wurzeln [cfu g FG<sup>-1</sup> x 10<sup>5</sup>] nach Inokulation von Tomatenpflanzen mit den Rhizosphärebakterien *Pseudomonas putida* IsoF (Wildtyp), F117 (*N*-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante) und *Pseudomonas fluorescens* WCS417r in einer Konzentration von 10<sup>8</sup> (IsoF und F117) bzw. 10<sup>9</sup> (WSC417r) cfu pro Pflanze.

	5 d	7 d	9 d
<i>P. putida</i> IsoF	5,1 ± 1,1	3,5 ± 0,8	5,8 ± 1,9
<i>P. putida</i> F117	10,6 ± 5,7	5,2 ± 2,5	4,2 ± 1,4
<i>P. fluorescens</i> WCS417r	11,5 ± 3,1	11,8 ± 2,5	2,6 ± 0,9

*S. liquefaciens* MG1 besiedelte die Wurzeln von Tomatenpflanzen bevorzugt in der Wurzelhaarzone (Abb. 16). Die Bakterien befanden sich in lockeren Verbänden aus Einzelzellen auf der Oberfläche der Wurzelepidermis und einzelne Zellen besiedelten auch die Wurzelhaare. Ein endophytisches Wachstum konnte nicht nachgewiesen werden (S. Gantner, A. Hartmann, GSF-Institut für Bodenökologie, persönliche Mitteilung).

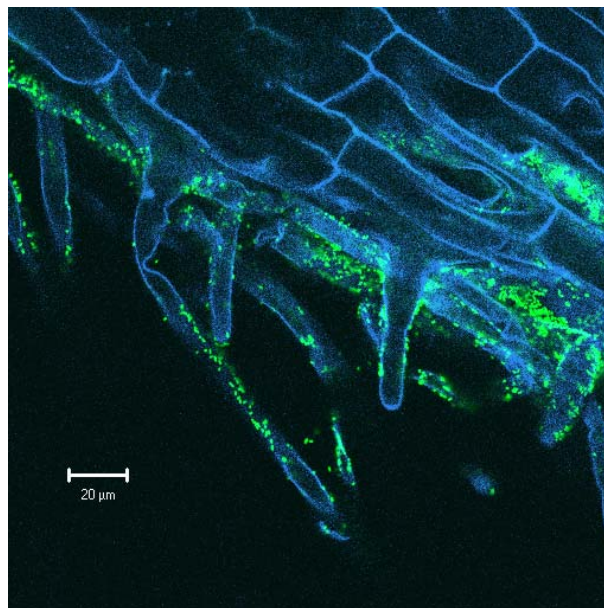


Abb. 16: Kolonisierung der Wurzelhaarzone von Tomatenpflanzen mit dem *gfp*-markierten *Serratia liquefaciens* Wildtyp-Stamm MG1. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie-Aufnahme wurde freundlicherweise von S. Gantner, GSF-Institut für Bodenökologie, zur Verfügung gestellt.

### 2.3. Einfluss von *Serratia liquefaciens* MG1 auf das pflanzliche Wachstum

Aus der Literatur ist bekannt, dass eine Kolonisierung der Wurzeln mit bestimmten Rhizosphärebakterien das pflanzliche Wachstum stimulieren kann (Barka et al., 2000; Raupach et al., 1996). Ob auch *Serratia liquefaciens* MG1 dazu in der Lage ist, wurde anhand der Höhe der Pflanzen, der Blattzahl und der Biomasse von Spross und Wurzeln beurteilt.

Zu Beginn des Experimentes waren die Pflanzen vier Wochen alt. Während des Untersuchungszeitraumes von neun Tagen nahmen die gemessenen Wachstumsparameter sowohl in den behandelten wie auch in den unbehandelten Pflanzen stetig zu (Abb. 17). Die Pflanzen wuchsen dabei um ca. 3,5 cm. Pflanzen, die mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, waren bereits nach drei Tagen geringfügig höher als die Kontrollpflanzen. Diese Tendenz setzte sich bis ans Ende des Untersuchungszeitraumes von neun Tagen fort (Abb. 17A). Parallel dazu nahm die Zahl der Blätter um drei bei den inokulierten Pflanzen und um 2,5 bei den unbehandelten zu (Abb. 17B). Das Gewicht der oberirdischen Teile der Pflanzen, Blätter und Spross, stieg bei den Kontrollpflanzen 1,6 bzw. 1,7fach zwischen dem dritten und sechsten bzw. dem sechsten und neunten Tag von 1,5 auf 4,0 g FG an (Abb. 17C). Die Biomasse von Blättern und Spross der inokulierten Pflanzen nahm zunächst ebenfalls um den Faktor 1,6 zu (zwischen Tag 3 und 6), dann verlangsamte sich aber die Steigerung der Biomasse im Vergleich zu den Kontrollen, sie betrug nur noch Faktor 1,3. Am neunten Tag war die Biomasse von Blättern und Spross bei den vorbehandelten Pflanzen um 17 % geringer als bei den Kontrollen. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Biomasse der Wurzeln. Nachdem zwischen dem dritten und sechsten Tag die Gewichtszunahme der Wurzeln in beiden Behandlungsvarianten noch vergleichbar war (Faktor 1,4 und 1,5), so stieg die Wurzelbiomasse der Kontrollpflanzen innerhalb der nächsten drei Tage 2,4fach an, die der inokulierten Pflanzen dagegen nur um den Faktor 1,8 (Abb. 17D). Neun Tage nach Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 hatten die Pflanzen ein um 22 % reduziertes Wurzelgewicht im Vergleich zu den Kontrollen.

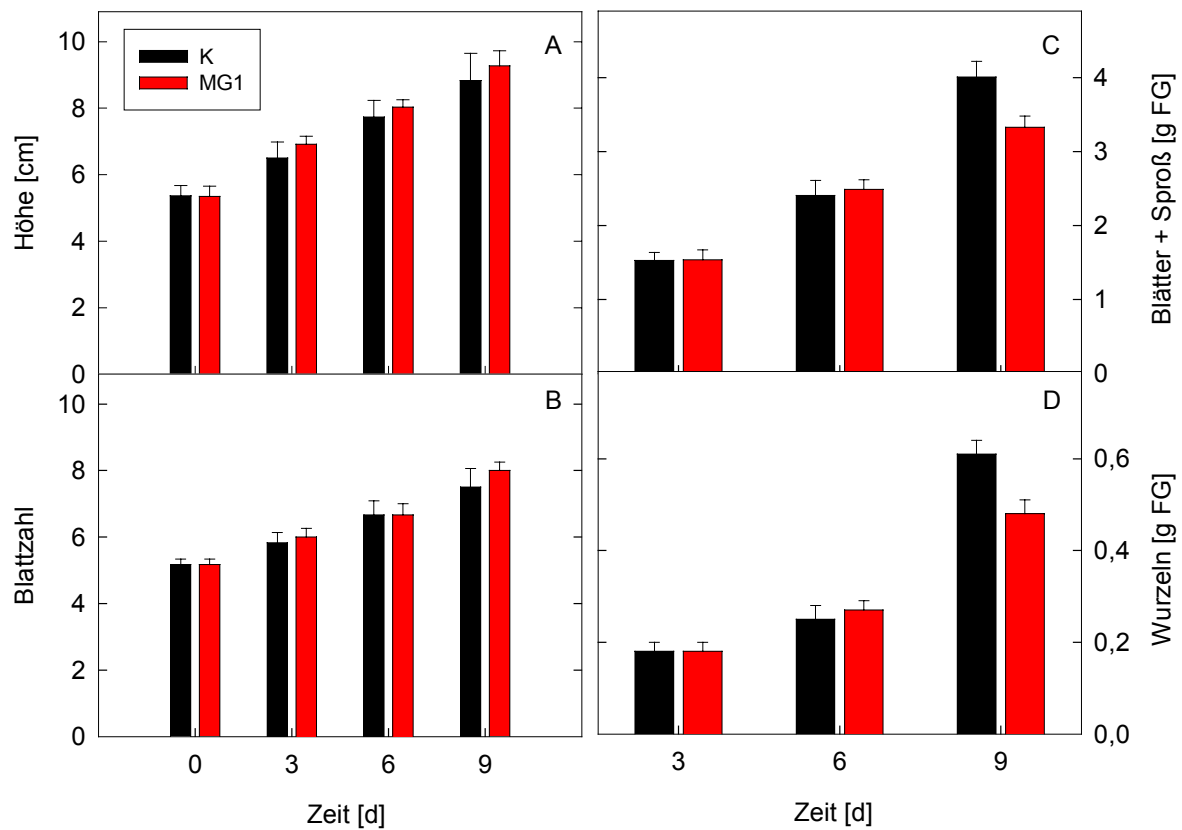


Abb. 17: Einfluss einer Inokulation von *S. liquefaciens* MG1 auf Höhe, Blattzahl (A, B) und Biomasse von Tomatenpflanzen (C, D). Kontrollpflanzen (K) wurden mit 10 mM  $MgSO_4$  behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE mit (n = 6).

#### 2.4. *N*-Acyl-L-homoserinlacton-Produktion in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen

Viele Pflanzen-assoziierte Bakterien produzieren *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL), frei durch Zellmembranen diffundierende, Pheromon-ähnliche Substanzen, die Zelldichte-abhängig die Produktion von Antibiotika, Virulenzfaktoren oder Exoenzymen steuern (Pierson III et al., 1998; Wood et al., 1997). Auch *Serratia liquefaciens* MG1 produziert diese Substanzen und steuert über dieses als „Quorum Sensing“ bezeichnete Phänomen, z. B. die Fähigkeit über feste Oberflächen zu schwärmen und die Expression eines Exoenzym-Transporters (Eberl et al., 1999; Riedel et al., 2001).

Im Rahmen dieses Projektes sollte untersucht werden, ob *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen detektierbar sind. Dazu wurden am Institut für Mikrobiologie, TU München, Weihenstephan, von A. Steidle, K. Sigl und L. Eberl AHL-

Sensorstämme konstruiert, die einen Nachweis von AHL in ihrer Umgebung ermöglichen. Verwendet wurden dazu AHL-negative Mutanten von *S. liquefaciens* MG1 (*S. liquefaciens* MG44) und von *Pseudomonas putida* IsoF (*P. putida* F117), in die über konjugativen Transfer AHL-Reporterkonstrukte bestehend aus dem Gen für das grün fluoreszierende Protein, *gfp*, und einem AHL-induzierbaren Promotor eingeführt wurden (Steidle et al., 2001). Inokuliert man nun die Wurzeln mit einem dieser Biosensoren und fügt gleichzeitig ein AHL-produzierendes Rhizosphärebakterium hinzu, so beginnt die Expression des *gfp*-Gens und der Sensorstamm kann aufgrund der grünen Fluoreszenz nachgewiesen werden. Eine gnotobiotische Anzucht der Pflanzen, d. h. eine Anzucht unter sterilen Bedingungen bei der alle Parameter des Systems bekannt sind, ist Voraussetzung für Experimente dieser Art. Die verwendeten Sensorstrukture besitzen eine unterschiedliche Sensitivität für AHL verschiedener Kettenlänge, sind aber nie völlig spezifisch für einen Typ von AHL, so dass Interferenzen mit anderen sich an den Wurzeln befindlichen AHL-produzierenden Bakterien nicht ausgeschlossen werden können (Steidle et al., 2001). Die gnotobiotische Anzucht der Tomatenpflanzen erfolgte in festverschließbaren sterilen Kunststoffgefäßen in autoklaviertem Quarzsand für etwa zwei Wochen (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 4.2.3).

In Abb. 18, links, ist beispielhaft die Interaktion eines AHL-Produzenten mit einem Sensorstamm im gnotobiotischen System gezeigt. Der AHL-Produzent (*Rhanella aquatilis* T13) ist ein Isolat aus der Tomatenrhizosphäre, das überwiegend AHL-Moleküle mit einer Seitenkettenlänge von sechs Kohlenstoffatomen (*N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton, HHL) produziert. Als Biosensor wurde *S. liquefaciens* MG44 verwendet, der Stamm trägt das auf *gfp* basierende Sensorplasmid pJBA132, das eine besonders hohe Sensitivität für *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (OHHL) und HHL aufweist (Anderson et al., 2001; Steidle et al., 2001). Etwa 28 Stunden nach Inokulation mit den beiden Bakterienstämmen konnten im Laser Scanning Mikroskop auf der Wurzelepidermis grün fluoreszierende Zellen beobachtet werden, d.h. der Sensorstamm reagierte auf die von *Rhanella aquatilis* T13 in die Umgebung abgegebenen HHL-Moleküle mit der Expression des Reportergenes *gfp*.

Außerdem wurden in Erdkultur gewachsene Tomatenpflanzen mit dem konstitutiv rot-markierten (trägt das Gen für das rot fluoreszierende Protein, *rfp*) Sensorstamm KS35 (F117::Tn5 Las) beimpft, einem Derivat von *P. putida* F117, dessen Sensorkonstrukt durch Transposonmutagenese ins Chromosom integriert wurde. Dieser ebenfalls auf *gfp* basierende Sensorstamm spricht auf drei verschiedene AHL-Moleküle an, auf *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton (OdDHL), *N*-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserinlacton (ODHL) und *N*-Dodecanoyl-L-homoserinlacton (dDHL).

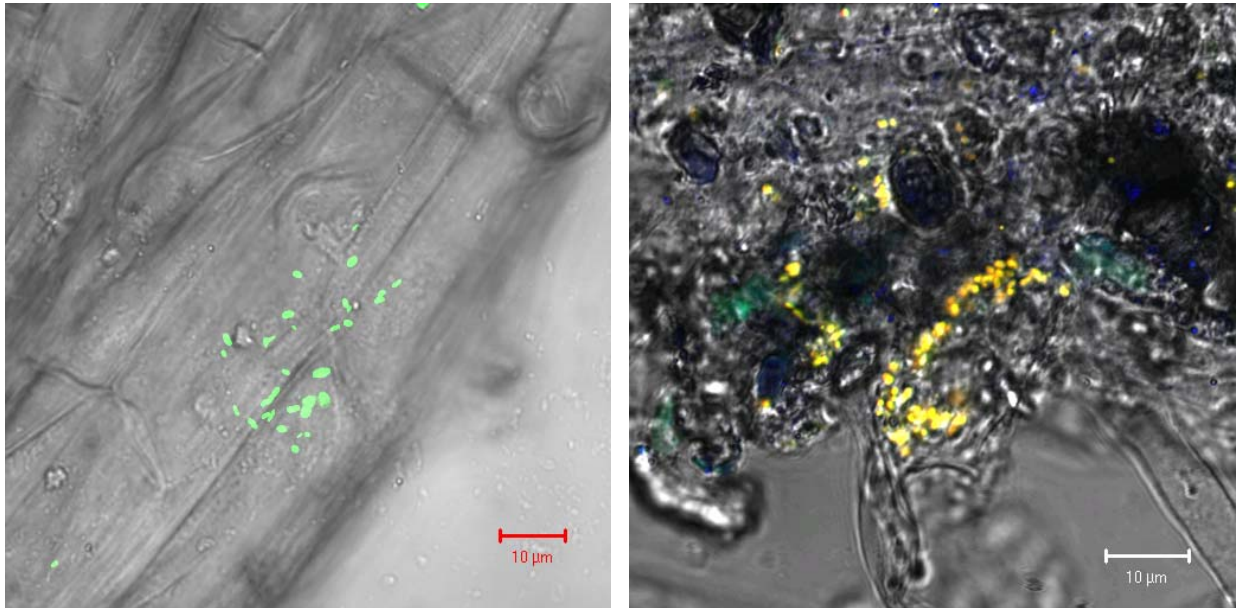


Abb. 18: AHL-vermittelte Zell-Zellkommunikation in der Tomatenrhizosphäre. Axenisch kultivierte Tomatenpflanzen wurden mit einer Mischung eines auf *gfp* basierenden AHL-Monitorstammes (*S. liquefaciens* MG44, pJBA132) und eines AHL-produzierenden Isolats (*Rhanella aquatilis* T13) inokuliert (links). Zudem wurde der *rfp*-markierte Monitorstamm *Pseudomonas putida* KS35 (F117::Tn5-LAS) in die Rhizosphäre von Tomatenpflanzen eingebracht, die in unsteriler Erde wuchsen (rechts). Durch die Überlagerung der roten und der grünen Fluoreszenz erscheinen die Zellen rechts gelb. Die Aufnahmen mit dem konfokalen Laser Scanning Mikroskop wurden freundlicherweise von A. Steidle und Dr. L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München, Weihenstephan zur Verfügung gestellt (Steidle et al., 2001).

In Abb. 18, rechts, ist die Induktion des Sensorstammes durch die an den Wurzeln natürlich vorkommende Rhizosphärengemeinschaft gezeigt (Steidle et al., 2001). Eine Überlagerung der roten Fluoreszenz mit der grünen resultiert in gelb erscheinenden Zellen. Die grün bzw. blau erscheinenden Partikel sind auf die hohe Autofluoreszenz von Erdbestandteilen zurückzuführen. Es konnte damit eine Produktion von AHL-Molekülen durch die natürlich vorkommende Bakterienpopulation in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen nachgewiesen werden.

### 3. Etablierung eines Infektionssystems mit pathogenen Pilzen und Quantifizierung der Pilz-DNA

#### 3.1. Zeitverlauf der Blattschäden während einer Infektion mit *Alternaria alternata*

Die Untersuchung des Einflusses der Rhizosphärebakterien auf die pflanzliche Krankheitsresistenz setzt als ersten Schritt die Etablierung eines Infektionssystems mit pathogenen Pilzen voraus. Die meisten der Versuche wurden mit dem perthotropen Pilz *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissler durchgeführt, anhand dieses Pilzes wurde auch das Infektionssystem optimiert. Perthotrophe Pilze befallen lebendes Gewebe, töten es ab und ernähren sich von den freigesetzten Nährstoffen (Hoffmann et al., 1994; Prell & Day, 2001).

Für die Infektion mit *A. alternata* wurden die Pflanzen mit der Pilzsporensuspension gut eingesprüht und bei 100 % Luftfeuchte in einer Klimakammer inkubiert (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 6), um für den Pilz optimale Bedingungen zur Keimung zu schaffen. Nach 24 Stunden konnten bereits erste Reaktionen der Pflanzen beobachtet werden. Die jungen und mittelalten Blätter zeigten eine deutlich ausgeprägte Epinastie, d. h. die Blattstiele, insbesondere die der Endfieder, rollten sich nach innen ein. Dies ist ein typisches Zeichen für Stressethylen (Abeles et al., 1992).



Abb. 19: Typische Schäden hervorgerufen durch den sprosspathogenen Pilz *Alternaria alternata* auf einem Primärblatt von Tomatenpflanzen, vier Tage nach Besprühen der Pflanzen mit einer Sporensuspension.

Sichtbare Schäden traten ab 48 Stunden in Form von schwarzen punktförmigen Flecken entlang der Blattadern auf, die sich in den nächsten Tagen im Zuge der fortschreitenden

Infektion ausbreiteten (Abb. 19), bis einzelne Blätter zu 100 % nekrotische Blattschäden aufwiesen und abfielen.

Mit zunehmendem Blattalter nahmen die Schäden zu. Abb. 20 zeigt die Entwicklung der Schäden über einen Zeitraum von einer Woche. Nach vier Tagen ist der Höhepunkt der Schäden mit ca. 30 % gemittelt über alle Blätter, erreicht. In den nächsten Tagen ist ein leichter Rückgang der Schäden zu beobachten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die nachwachsenden jungen Blätter nicht mehr oder nur sehr schwach befallen werden.

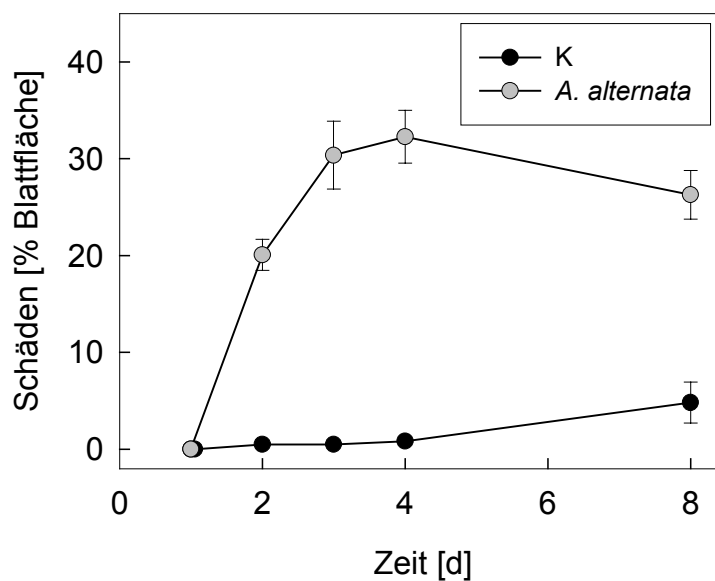


Abb. 20: Zeitverlauf der Blattschäden, gemittelt über alle Blätter pro Pflanze, nach Besprühen von Tomatenpflanzen mit einer Suspension von *Alternaria alternata*-Sporen. Kontrollpflanzen wurden mit Sporensuspensionslösung pH 6,0 behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 6).

### 3.2. Entwicklung spezifischer Primer für die Quantifizierung von Pilz-DNA aus befallenen Blättern

Eine visuelle Bonitur der Blattschäden gibt zwar die Menge und Ausbreitung der Nekrosen wieder, trifft aber keine Aussagen über das Wachstum der Pilzhyphen im Blatt. So könnte eine einzige gekeimte Spore mit weniger Hyphen bei sehr aggressiven Pilzarten genauso starke Blattschäden verursachen wie ein umfangreiches Hypengeflecht bei nicht so aggressiven. Um das Wachstum der Pilze im Blatt abschätzen zu können, wurden, für die in dieser Arbeit verwendeten Pilze, spezifische Primer zur Quantifizierung der Pilz-DNA mittels



Real-Time PCR entwickelt. Neben *Alternaria alternata* waren dies *Cladosporium herbarum* Pers., der Erreger der Samtfleckenkrankheit und *Botrytis cinerea* (Pers.: Fr.), der Verursacher von Grauschimmel. Diese drei Pilze zählen zu den wichtigsten Krankheitserregern im kommerziellen Tomatenanbau (Agrios, 1997; Hoffmann et al., 1994).

Für *A. alternata* und *C. herbarum* wurden spezifische Primer in die ITS (internal transcribed spacer)-Region ribosomaler Gene gelegt. Die Anordnung dieser hoch variablen Bereiche zwischen den konservierten rRNA-Genen ist in Abb. 21 veranschaulicht. Zunächst wurden die ITS-Regionen 1 und 2 mit dem Primerpaar ITS1/ITS4 in PCR-Reaktionen amplifiziert, dann kloniert und sequenziert. Dieses Primerpaar ist universell bei allen Pilzen einsetzbar, da es bereits in den hochkonservierten rRNA-Genbereichen liegt (White et al., 1990).

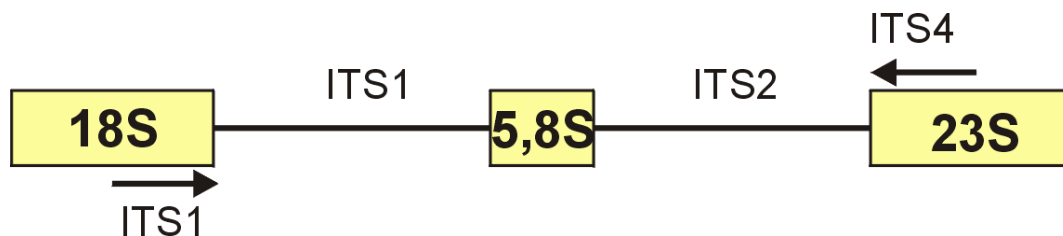


Abb. 21: Schema der ITS (internal transcribed spacer)-Region ribosomaler Gene. Zwischen den hoch konservierten rRNA-Genen liegen die variablen Bereiche ITS1 und 2, die durch das Primerpaar ITS1/ITS4 amplifiziert werden können (White et al., 1990).

Durch Vergleiche der ITS-Sequenzen von *A. alternata*, *C. herbarum* mit weiteren ITS-Sequenzen wichtiger tomatenpathogener Pilze wie *B. cinerea* und Vertretern der Gattungen *Fusarium* und *Pyrenochaeta* konnten spezifische Bereiche für Primer ausgewählt werden. *Fusarium* spp. verursacht die sogenannte Fusarienwelke bei Tomaten, es werden aber auch andere Gemüsepflanzen, wie z. B. Kartoffel, Karotte oder Gurke befallen. *Pyrenochaeta* spp. ist der Erreger der Korkwurzelkrankheit (Hoffmann et al., 1994). Das Alignment der ITS-Sequenzen ist im Anhang 2.1 wiedergegeben. Die Primerpaare für *A. alternata* und *C. herbarum* sind darin eingezeichnet. Anschließend wurde die Spezifität der Primer gegen eine DNA-Bank aus 86 tomatenpathogenen Pilzen sowie gegen Tomaten-DNA (Spur 2 in Abb. 22) in PCR-Reaktionen getestet. Im Folgenden soll das Vorgehen anhand der Primerentwicklung für *A. alternata* im Detail erklärt werden.

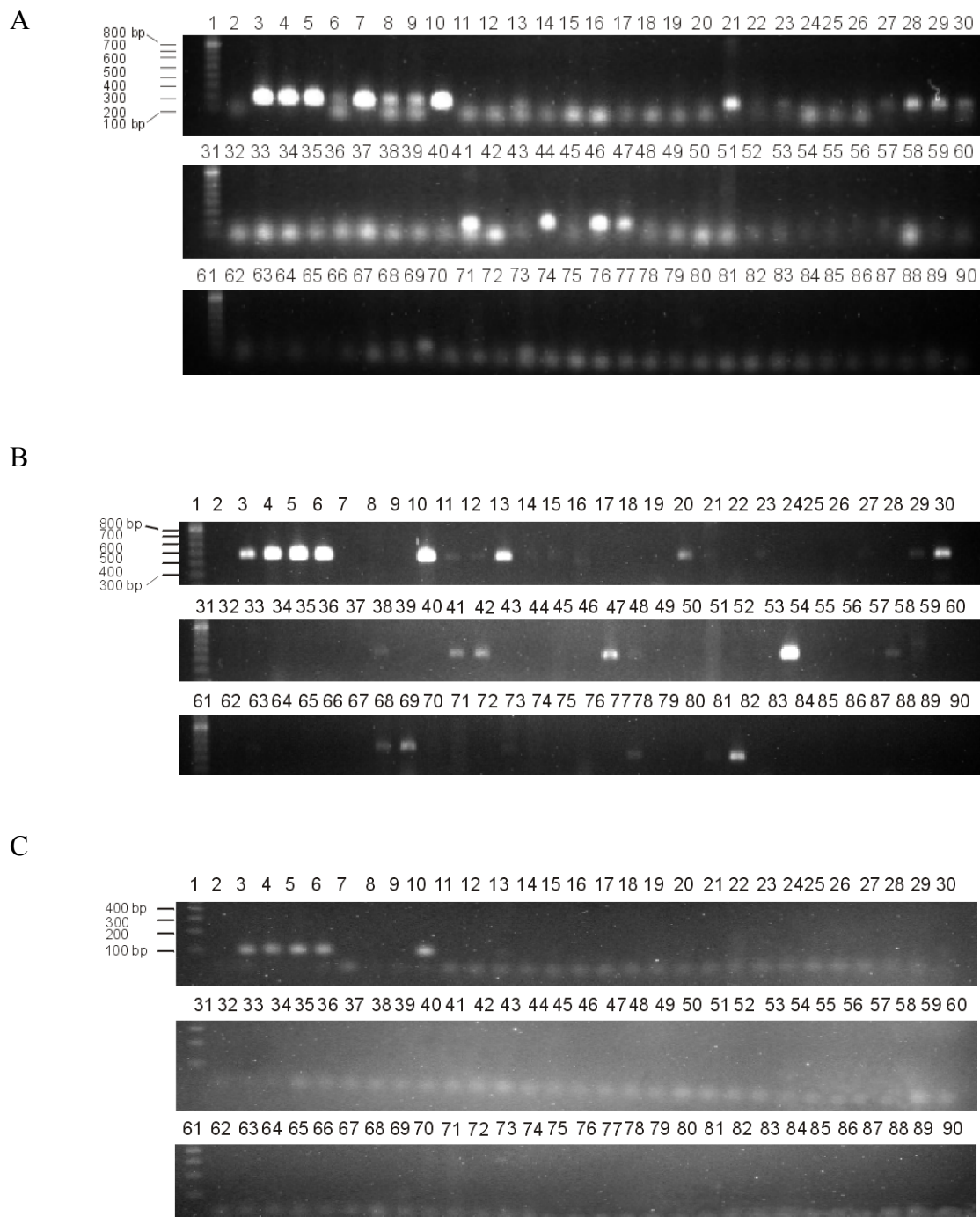


Abb. 22: Test der Primerspezifität für *A. alternata* gegen eine DNA-Bank bestehend aus 86 tomatenpathogenen Pilzen und Tomaten-DNA (Spur 2) in PCR-Reaktionen. Der Vorwärtsprimer A.alt F3 (A) und der Rückwärtsprimer A.alt R1.1 (B) wurden zunächst mit den universellen ITS Primern ITS1 bzw. 4 kombiniert und anschließend zusammen in PCR-Reaktionen eingesetzt (C). Die PCR-Produkte wurden mit Gelen aus 1,5 % Agarose (A, B) bzw. 2 % MetaPhor-Agarose aufgetrennt (C). Eine vollständige Liste der verwendeten DNAs als Templates in den PCR-Reaktionen findet sich im Anhang.

Zunächst wurden der Vorwärtsprimer, A.alt F3 und der Rückwärtsprimer A.alt R1.1 jeweils getrennt auf ihre Spezifität hin gegen die DNA-Bank getestet (Abb. 22A, B). Dazu wurden sie mit den entsprechenden ITS-Primern 1 und 4 kombiniert. Alle getesteten DNAs von *A. alternata* (Spuren 3-6) ergaben Amplifikate von ca. 200 bp (A.alt F3/ITS4) bzw. 500 bp (A.alt R1.1/ITS1). In beiden Fällen wurden aber auch bei weiteren Pilz-DNAs Amplifikate gefunden, z. B. im Falle des Vorwärtsprimers (Abb. 22A) bei weiteren *Alternaria*-Arten (Spur 7, *A. solani*; Spur 10, *A. tenuissima*) und Vertretern der Gattungen *Colletotrichum*, *Geotrichum* und *Phoma* (Spuren 21, 41, 46). Wurden die beiden Primer zusammen in den PCR-Reaktionen eingesetzt, so konnte eine fast 100 %ige Spezifität erreicht werden, nur *A. tenuissima* (Spur 10) ergab noch ein Signal (Abb. 22C). Dieses Primerpaar wurde für die weiteren Real-Time PCR-Reaktionen verwendet.

Nachdem die Primer für *Alternaria alternata* eine fast 100 %ige Spezifität bewiesen hatten, wurde mit Hilfe des Primerpaares A.alt F3/A.alt R1.1 *A. alternata* DNA aus infizierten Tomatenblättern in Real-Time PCR Reaktionen quantifiziert (Material und Methoden, Abschnitt 14.9.3).

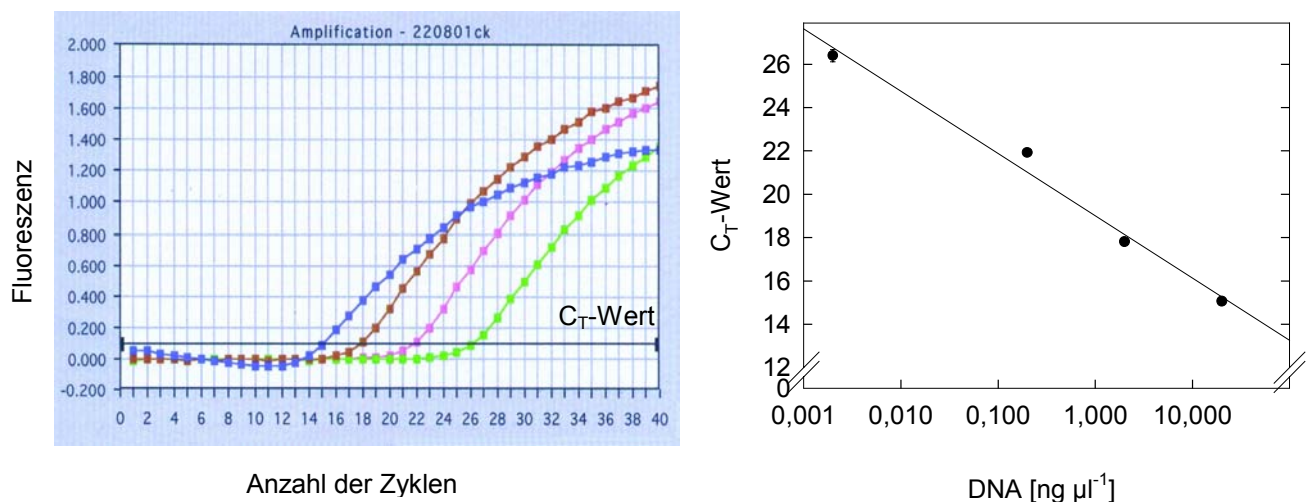


Abb. 23: Amplifikation definierter Mengen an *Alternaria alternata* DNA in Real-Time PCR-Reaktionen (links). Eingesetzt wurden jeweils 20 ng (blaue Kurve), 2 ng (braun), 200 pg (rosa), 20 pg (grün) genomischer *A. alternata* DNA. Aus den so erhaltenen C<sub>T</sub>-Werten konnte bei jedem PCR-Lauf eine Eichkurve (Mittelwerte ± SE, n = 3) erstellt werden (rechts).

Bei der Real-Time PCR mit dem TaqMan (AbiPrism 7700, Applied Biosystems, Weiterstadt) wird die Fluoreszenzerhöhung gemessen, die bei der Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes SybrGreen (Applied Biosystems) an doppelsträngige DNA entsteht. Der C<sub>T</sub>-Wert gibt dabei

die Nummer des Zyklus an, bei dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert übersteigt.

Bei jedem PCR-Lauf wurden Reaktionen mit definierten Mengen an Pilz-DNA durchgeführt, um aus den  $C_T$ -Werten eine Eichkurve erstellen zu können. Für *A. alternata* ist dies beispielhaft in Abb. 23 gezeigt. Die Nachweisgrenze liegt dabei im Bereich von  $\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$  eingesetzter DNA. Eine Quantifizierung der *A. alternata* DNA aus Tomatenblättern ergab mit fortschreitender Infektion einen 6fachen Anstieg der DNA-Gehalte von ca. 1 auf 6  $\text{ng mg FG}^{-1}$  in einem Zeitraum von vier Tagen, wobei die Zunahme der Pilz-DNA in den ersten drei Tagen am größten ist (Abb. 24, oben).

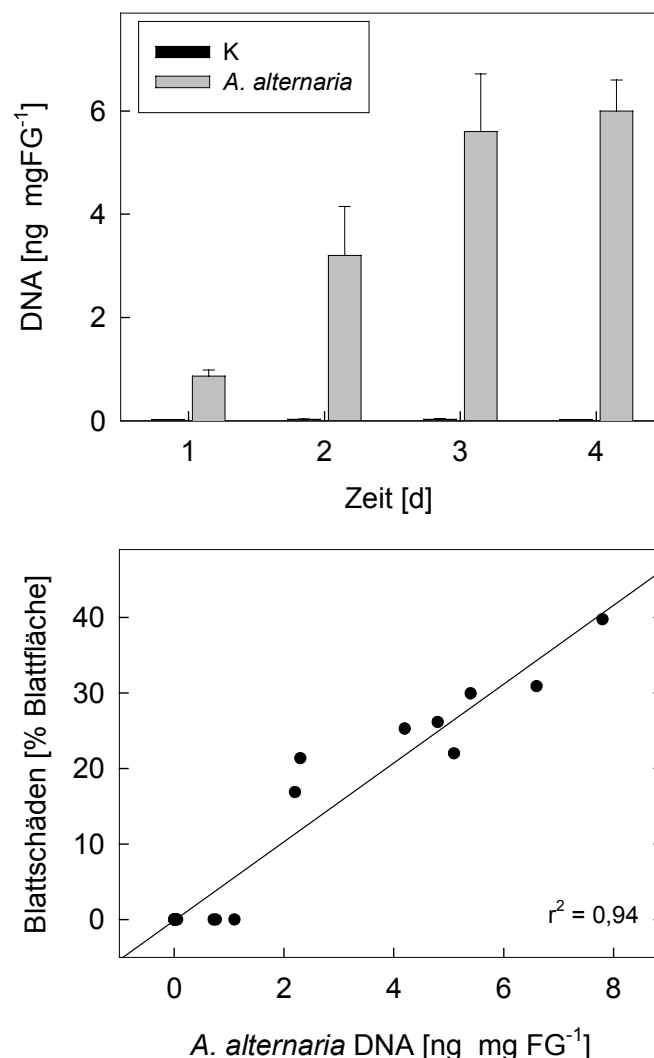


Abb. 24: Quantifizierung von *Alternaria alternata* DNA aus mittelalten Tomatenblättern mittels Real-Time PCR (oben) und Korrelation der visuell bonitierten Blattschäden mit der Menge an *Alternaria alternata* DNA (unten). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

Ein Vergleich zwischen der Menge an visuell bonitierten Blattschäden (Abb. 20) mit den Gehalten an *A. alternata* DNA (Abb. 24, oben) führt zu einer sehr guten Korrelation der beiden Datensätze. Der Korrelationskoeffizient beträgt dabei 0,94 (Abb. 24, unten), d.h. eine Zunahme der Blattschäden geht mit steigenden Mengen an *A. alternata* DNA einher.

Das Entwickeln und Testen der spezifischen Primer für *Cladosporium herbarum* erfolgte in gleicher Art und Weise wie für *A. alternata* beschrieben. Aus dem Alignment der ITS-Regionen (vgl. Anhang 2.1) wurden geeignete Primersequenzen gesucht und diese Oligonukleotide gegen die oben beschriebene DNA-Bank in PCR-Reaktionen getestet (Abb. 25). Nur die DNA von *C. herbarum* ergab in den PCR-Reaktionen mit dem Primerpaar Clad F1 und Clad R2 ein Amplifikat von ca. 100 bp (Spur 19). Mit diesem Primerpaar wurde aus infizierten Tomatenblättern die DNA von *C. herbarum* in Real-Time PCR-Reaktionen amplifiziert.

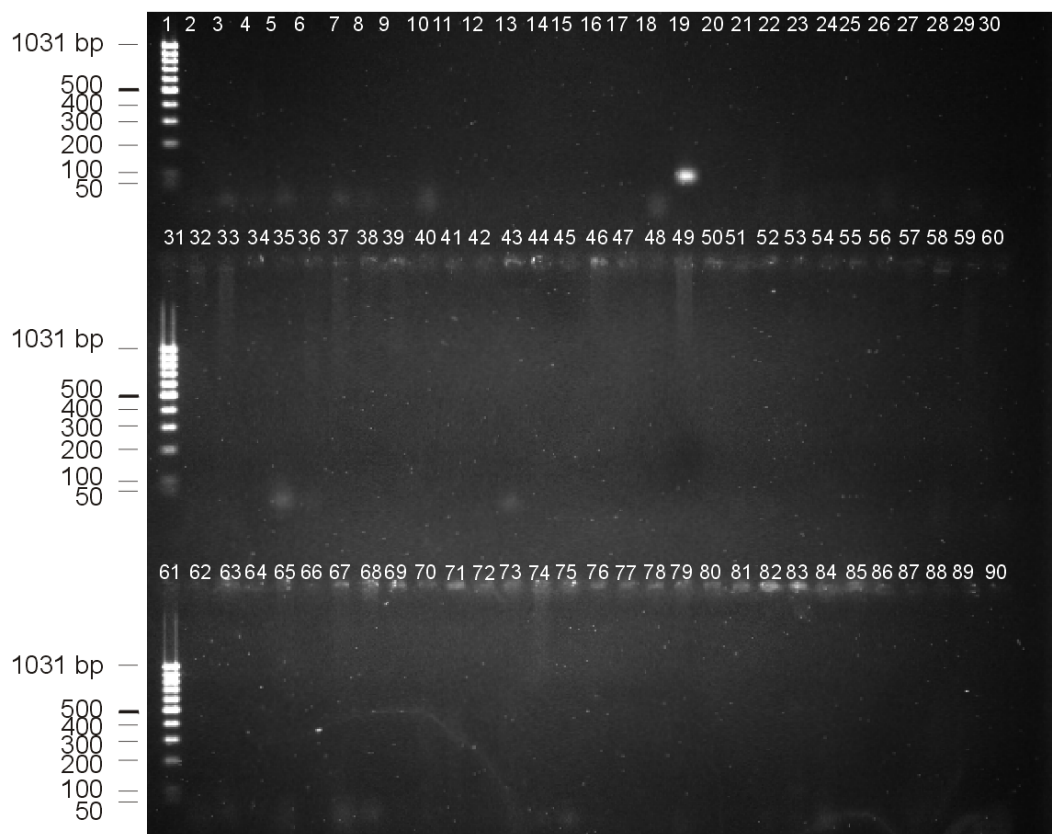


Abb. 25: PCR-Reaktionen zum Test der Spezifität der Primer Clad F1 und Clad R2 für *Cladosporium herbarum*. In Spur 19 ist eine PCR-Reaktion mit DNA von *C. herbarum* aufgetragen. Eine vollständige Liste der verwendeten DNAs als Templates in den PCR-Reaktionen findet sich im Anhang.

Zur Entwicklung spezifischer Primer für *Botrytis cinerea* musste ein anderer Ansatz verfolgt werden, da es nicht möglich war, spezifische Primer in den ITS-Regionen zu finden.

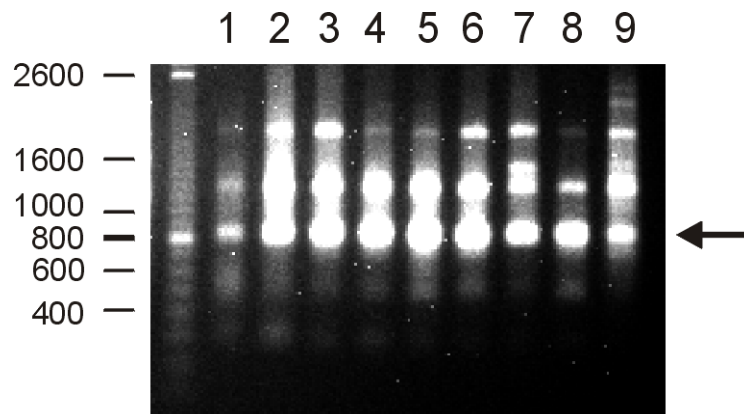


Abb. 26: Amplifikation von SCAR-Regionen mit dem Zufallsprimer OPA-13 (Qiagen Operon) aus genomischer DNA verschiedener *Botrytis cinerea* Isolate (Spur 1: *B. cinerea* CBS6676.89, 2-9: *B. cinerea*-Isolate von A. von Tiedemann, Rostock). Das Amplifikat bei 800 bp (Pfeil) wurde kloniert und sequenziert. In diese Sequenz wurden dann spezifische Primer für *B. cinerea* gelegt.

Zunächst wurden mit Hilfe des Zufallsprimers OPA-13 (Qiagen Operon) in PCR-Reaktionen aus genomischer DNA von *B. cinerea* zufällige Regionen amplifiziert. Eine Bande (ca. 800 bp, Abb. 26, Pfeil), die bei allen getesteten *B. cinerea* Isolaten auftrat, wurde kloniert und sequenziert. Aus diesen Sequenzen der SCAR-Regionen (sequence characterised amplified region) wurden nun Primer ausgewählt (O-13 f3/O-13 r1), deren Spezifität ebenfalls mit der oben beschriebenen DNA-Bank getestet wurde (Abb. 27). Nur wenn DNA von *B. cinerea* als Template eingesetzt wurde, konnten Amplifikate von ca. 100 bp nachgewiesen werden (Spur 14-16). Andere Pilz-DNAs sprachen nicht auf dieses Primerpaar an.

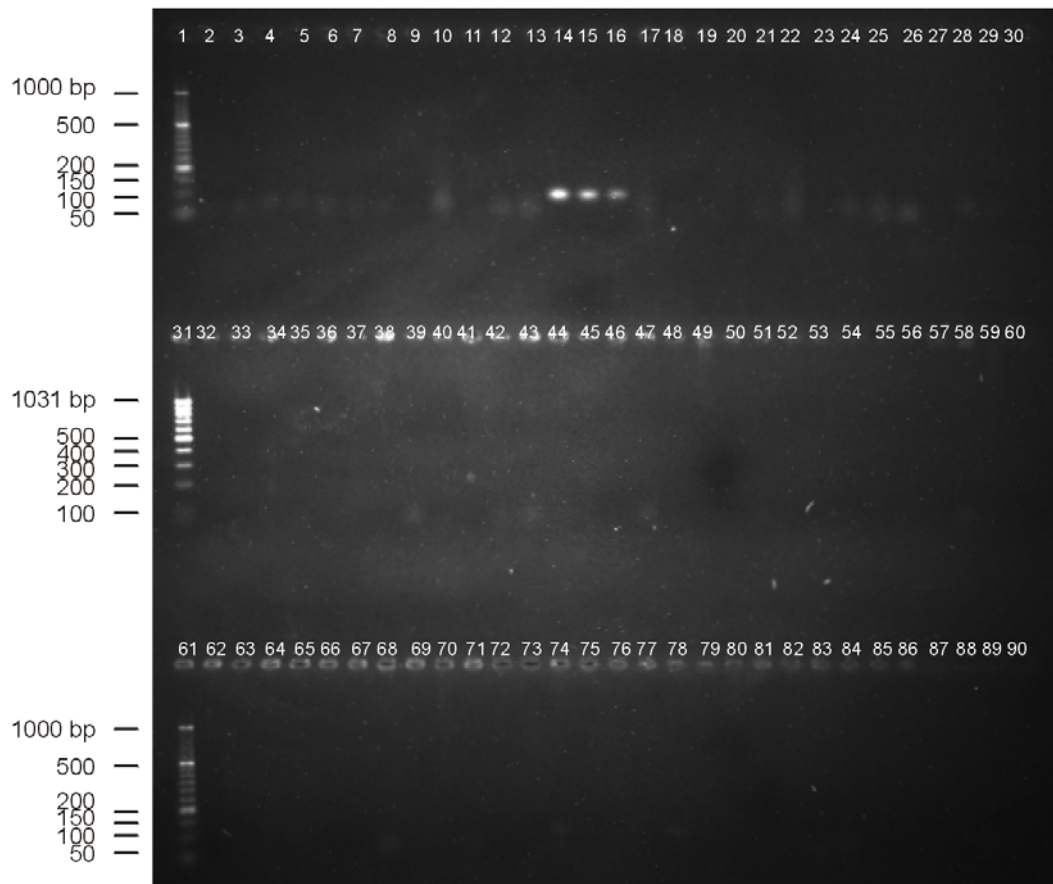


Abb. 27: Test der Primerspezifität von O-13 f3 und O-13 r1 zur Amplifikation der DNA von *B. cinerea* in PCR-Reaktionen. Aufgetragen auf den Spuren 14 – 16 sind PCR-Reaktionen mit *B. cinerea*-DNA als Templates. Eine vollständige Liste der verwendeten DNAs als Templates in den PCR-Reaktionen findet sich im Anhang.

### 3.3. Hemmung von tomatenpathogenen Pilzen durch Rhizosphärebakterien

In der Rhizosphäre lebende Bakterien können durch die Produktion von antimikrobiell wirksamen Substanzen wie z. B. Antibiotika oder Exoenzymen andere, für die Pflanze pathogene Mikroorganismen hemmen und durch diese direkte Interaktion pflanzliche Krankheiten unterdrücken (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Insbesondere Vertreter der Gattungen *Pseudomonas* (Duijff et al., 1999; Wood et al., 1997) und *Serratia* sind in der Lage, pflanzenpathogene Pilze in ihrem Wachstum zu reduzieren. *Serratia* spp. produziert z. B. lytische Enzyme wie Chitinasen oder  $\beta$ -1,3-Glucanasen, die pilzliche Zellwände angreifen können (Givskov et al., 1997; Kalbe et al., 1996).

Auf ihre pilzhemmenden Eigenschaften gegen wichtige tomatenpathogene Pilze wurden drei der in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme getestet. Die meisten der

Inokulationsversuche wurden mit *Serratia liquefaciens* MG1 und der dazu korrespondierenden *N*-Acyl-L-homoserinlacton (AHL)-Nullmutante MG44 durchgeführt, aber auch ein Vertreter der Gattung *Pseudomonas* (*P. putida* IsoF) kam zum Einsatz. Zum Vergleich dazu wurde im Hemmassay auch *Burkholderia vietnamiensis* LMG10929 verwendet. Die Gattung *Burkholderia* zeichnet sich durch eine außergewöhnlich vielfältige Produktion von Exoenzymen und antimikrobiell wirksamen Substanzen aus (Govan et al., 1996). Getestet wurde der Einfluss der Bakterien auf das Wachstum verschiedener tomatenpathogener Pilze. Mit *A. alternata* und *B. cinerea* wurden in dieser Arbeit Infektionsversuche durchgeführt, während die beiden folgenden *Fusarien*-Stämme, das Sprosspathogen *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* und das Wurzelpathogen *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, als Vergleich dienten. Die *Fusarien*welke stellt eine der größten Bedrohungen für Tomatenkulturen dar.

Für den Hemmassay wurde eine Sporensuspension auf Agarplatten gleichmäßig verteilt und ein Tropfen einer Über-Nacht-Kultur der Bakterien in die Mitte pipettiert. Nach acht Tagen Inkubation wurden das Wachstum der Pilze ausgewertet. Alle vier verwendeten Pilzarten überzogen die Agarplatten mit einem dichten Mycel. Auf den Kontrollplatten ohne Bakterien konnten keine Einschränkungen des Pilzwachstums beobachtet werden (Tabelle 10).

Bei dem Stamm *S. liquefaciens* MG1 (Wildtyp) und der dazu korrespondierenden *N*-Acyl-L-homoserinlacton (AHL)-Nullmutante MG44 konnten bei dem sprosspathogenen Pilz *A. alternata* zwei bis fünf mm breite Zonen verminderten Pilzwachstums beobachtet werden (Tabelle 10). Die anderen in dieser Arbeit verwendeten Pilze zeigten entweder kein Wachstum auf der Bakterienkolonie (*B. cinerea*) oder konnten die Bakterien sogar überwuchern (*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*). Auffällig war der Unterschied zwischen dem Wildtyp-Stamm *S. liquefaciens* MG1 und der AHL-Nullmutante MG44 in Gegenwart des Wurzelpathogens *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Der Pilz konnte auf dem Wildtyp-Stamm nicht wachsen, wohingegen die AHL-Nullmutante von dem Pilz überwachsen wurde (Tabelle 10).

Die beiden *Fusarien*-Stämme zeigten in Kombination mit *P. putida* IsoF, einem Isolat aus der Tomatenrhizosphäre (Steidle et al., 2001) kein eingeschränktes Wachstum auf der Bakterienkolonie, wohingegen *A. alternata* und *B. cinerea* nicht direkt auf der Kolonie wachsen konnten (Tabelle 10). Am stärksten war ein hemmender Effekt von *B. vietnamiensis* LMG10929 auf *B. cinerea*. Es bildete sich ein 2 mm großer Hemmhof rund um die Bakterienkolonie (Tabelle 10).



Tabelle 10: Beeinflussung des Wachstums von tomatenpathogenen Pilzen durch Rhizosphärenbakterien

	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>
<b>Kontrolle (ohne Bakterien)</b>	+	+	+	+
<b><i>Serratia liquefaciens</i> MG1 (Wildtyp)</b>	– 2 mm Zone mit vermindertem Pilz-Wachstum um Bakterienkolonie	–	+	–
<b><i>Serratia liquefaciens</i> MG44 (N-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante)</b>	– 5 mm Zone mit vermindertem Pilz-Wachstum um Bakterienkolonie	–	+	+
<b><i>Pseudomonas putida</i> IsoF</b>	–	–	+	+
<b><i>Burkholderia vietnamiensis</i> LMG10929</b>	–/+	– (2mm Hemmhof)	+	–

+ : Wachstum der Pilze auch auf den Bakterien

– : kein Pilz-Wachstum auf den Bakterien

–/+ : z.T. Pilz-Wachstum auf den Bakterien

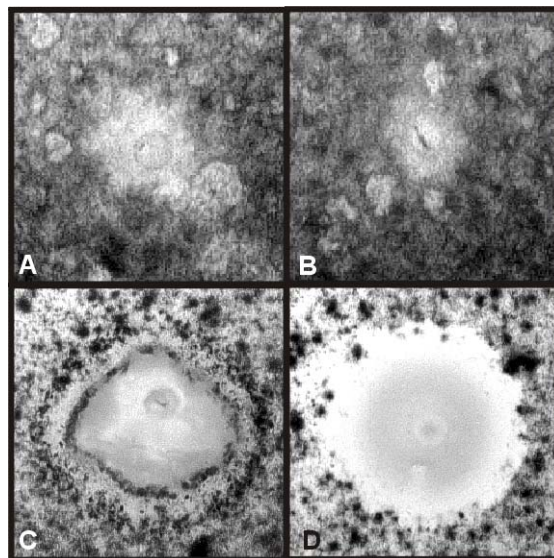


Abb. 28: Einfluss von Rhizosphärenbakterien auf das Wachstum von tomatenpathogenen Pilzen. Malzagarplatten wurden mit einer Sporensuspension aus *Alternaria alternata* (A, B) und *Botrytis cinerea* (B, C) überzogen. In die Mitte der Platten wurden anschließend Über-Nacht-Kulturen von *Serratia liquefaciens* MG1, Wildtyp (A), MG44, N-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante (B), *Pseudomonas putida* IsoF (C) und *Burkholderia vietnamiensis* LMG 10929 (D) aufgetropft. Gezeigt sind repräsentative fotografische Aufnahmen aus drei Parallelansätzen nach acht Tagen Inkubation.

Als Beispiele für den Einfluss der Rhizosphärebakterien auf das Wachstum verschiedener Pilze sind in Abb. 28 repräsentative photographische Aufnahmen des Assays gezeigt. In der Mitte der Bilder befindet sich die Bakterienkolonie als heller runder Bereich, abhängig von der Art bilden die Bakterien unterschiedlich große Kolonien. Umrandet wird die Kolonie vom Mycel des Pilzes, auf den Bildern als dunkle strukturierte Bereiche sichtbar. Gut erkennbar ist die Zone mit einem verminderten Wachstum von *A. alternata* in Gegenwart von *S. liquefaciens* MG1 und MG44 als heller Bereich rund um die Bakterienkolonie, der aber auch Pilzstrukturen aufweist (Abb. 28A, B). *Pseudomonas putida* IsoF wuchs in Gegenwart von *B. cinerea* zu einer relativ großen Kolonie heran, die vom Pilz nicht überwuchert werden konnte (Abb. 28C). Auffällig sind hier die ringförmigen Strukturen des Pilzes rund um die Bakterienkolonie mit einer vermehrten Sporangienbildung. Die Ausbildung eines klassischen Hemmhofes, wo kein Pilzwachstum mehr stattfinden konnte, wurde nur durch *B. vietnamiensis* bei *B. cinerea* verursacht (Abb. 28D). Auf dem Bild erkennbar ist er als weiße Zone rund um die hellgrau erscheinende Bakterienkolonie.

#### **4. Einfluss von *N*-Acyl-L-homoserinlacton produzierenden Rhizosphärebakterien auf die Krankheitsresistenz von Tomatenpflanzen**

##### **4.1. Abhängigkeit der Biocontrol-Aktivität von der *N*-Acyl-L-homoserinlacton Produktion in *Serratia liquefaciens* MG1**

###### **4.1.1 Induktion der pflanzlichen Krankheitsresistenz gegen *Alternaria alternata***

Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1 die Resistenz von Tomatenpflanzen gegen den sprosspathogenen Pilz *Alternaria alternata* induziert. Diese Befunde sollten nun genauer hinsichtlich des Zeitverlaufs der Blattschäden und des Gehaltes an Pilz DNA untersucht werden. Außerdem wurde der Wildtyp-Stamm von *S. liquefaciens* MG1 mit der *N*-Acyl-L-homoserinlacton (AHL) negativen Mutante MG44 bezüglich seiner Fähigkeit zur Biocontrol-Aktivität verglichen.

Die Tomatenpflanzen wurden zunächst mit den beiden Bakterienstämmen mit einer Lebendzelldichte von  $10^{11}$  Zellen pro Pflanze inokuliert und drei Tage später mit einer

Suspension aus *A. alternata*-Sporen besprüht. Nach zwei Tagen konnten die ersten Blattschäden beobachtet werden, die sich innerhalb von weiteren zwei Tage so stark ausbreiteten, dass Unterschiede in der Ausprägung der Krankheitssymptome zwischen den verschiedenen Vorbehandlungen sichtbar wurden. Pflanzen, die mit dem Wildtyp-Stamm MG1 inokuliert wurden, zeigten nach vier Tagen wesentlich weniger Schäden als die Kontrollpflanzen oder Pflanzen, die mit der AHL-negativen Mutante MG44 beimpft wurden. Besonders deutlich waren die Unterschiede in den Nekrosen der alten Blätter zu sehen (Abb. 29).

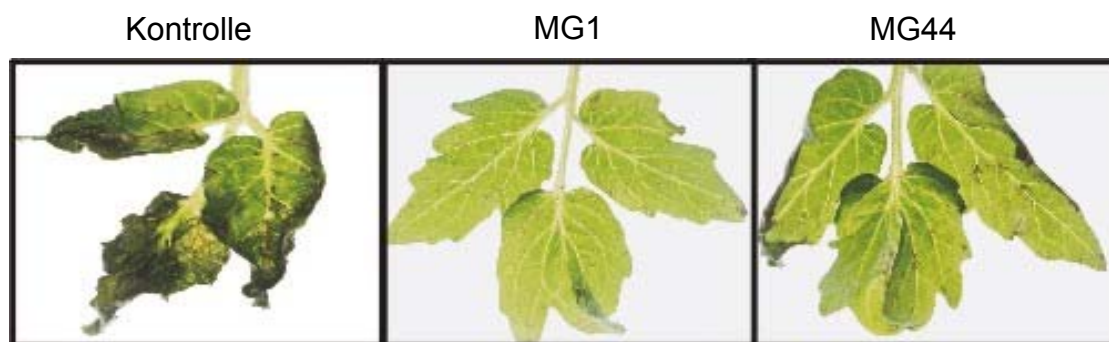


Abb. 29: Einfluss einer Vorbehandlung von Tomatenpflanzen mit *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 auf die Ausbildung von Blattschäden nach 4-tägiger Infektion mit *Alternaria alternata*. Gezeigt sind Primärblätter.

Bei Betrachtung der geschädigten Blattflächen in Abhängigkeit der Vorbehandlungen, stellt man fest, dass nach zwei Tagen die ersten Schäden sichtbar wurden und bereits erste tendenzielle Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten beobachtet werden konnten. Signifikant verschieden ist die geschädigte Blattfläche erst nach 4-tägiger Pilz-Infektion (Abb. 30A). Nekrotische Schäden waren bei Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, signifikant um 70 % reduziert, bei MG44 um 20 %.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Quantifizierung der *A. alternata*-DNA in den Blättern (Abb. 30B). Während nach zwei Tagen noch keine signifikanten Unterschiede gemessen werden konnten, zeigten die Kontrollpflanzen ohne Vorbehandlung nach vier Tagen 79 % höhere *A. alternata* DNA-Gehalte als die mit dem Stamm MG1 inokulierten Pflanzen. Mit dem Stamm MG44 inokulierte Pflanzen waren nicht signifikant verschieden zu den Kontrollpflanzen. Die Blattschäden korrelierten dabei sehr gut mit den Mengen an *A. alternata* DNA ( $r^2 = 0,85$ ; Abb. 30C).

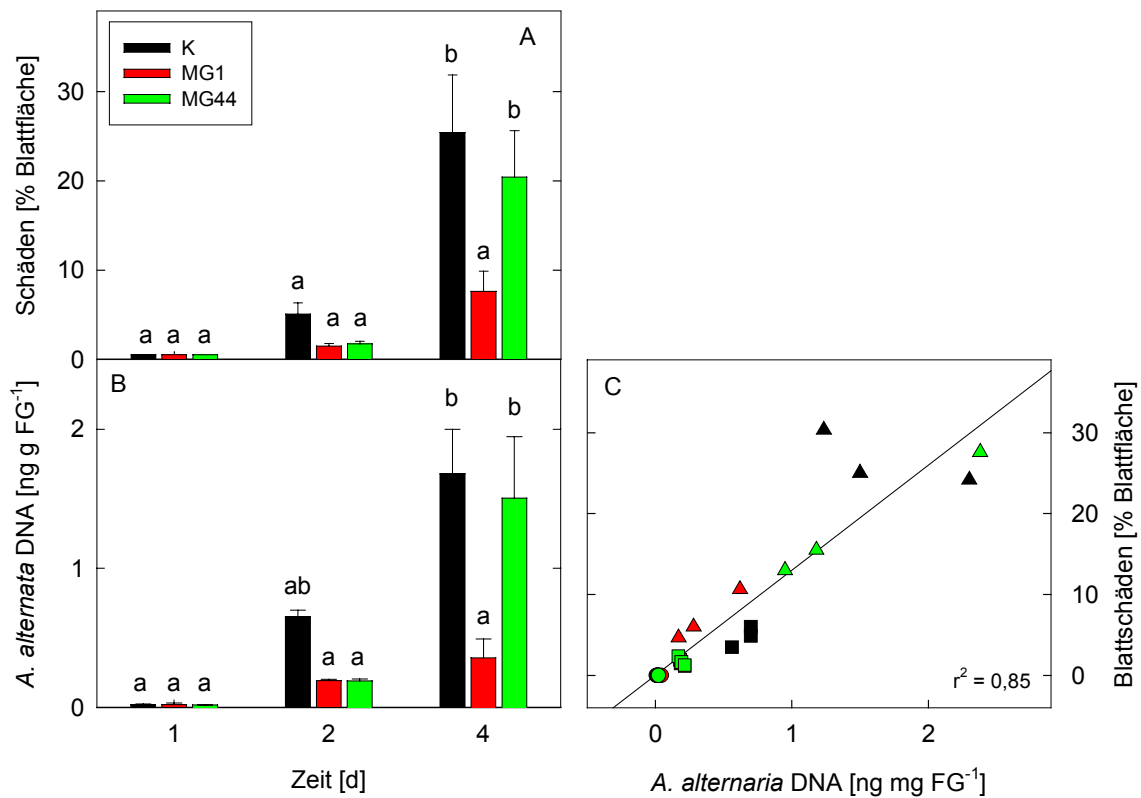


Abb. 30: Visuelle Bonitur von Blattschäden (A) und Quantifizierung der Pilz-DNA (B) bei Tomatenpflanzen, die drei Tage nach einer Inokulation mit *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 mit dem Sprosspathogen *Alternaria alternata* infiziert wurden. Für eine Korrelationsanalyse wurden die Blattschäden gegen die *A. alternata* DNA-Mengen aufgetragen (C), dabei wurden die Werte nach 1-, 2-, und 4-tägiger Pilzinfektion mit Kreisen, Quadraten, und Dreiecken dargestellt. Gezeigt sind Daten mit Mittelwerten  $\pm$  SE ( $n = 6$  bei A und  $n = 3$  bei B) bzw. die Korrelation der Einzeldaten (C). Unterschiedliche Buchstaben geben im LSD Multiple Range Test signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten an.

Diese Befunde konnten in unabhängigen Experimenten weitgehend bestätigt werden (Abb. 31). Wieder zeigten Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert wurden weniger Blattschäden als Kontrollpflanzen nach einer 4-tägigen Infektion mit *A. alternata*. Die Vorbehandlung der Pflanzen mit dem Wildtyp-Stamm MG1 führte zu einer Reduktion der nekrotischen Schäden um 33 % und der *A. alternata* DNA-Gehalte sogar um 43 % (Abb. 31A, B). Der AHL-negative Stamm MG44 hatte ähnlich hohe Blattschäden wie die Kontrollpflanzen, die DNA-Gehalten waren allerdings um 52 % vermindert im Vergleich zu den Kontrollen. Schäden und DNA-Mengen korrelierten auch hier; der Korrelationskoeffizient betrug 0,81 (Abb. 31C).

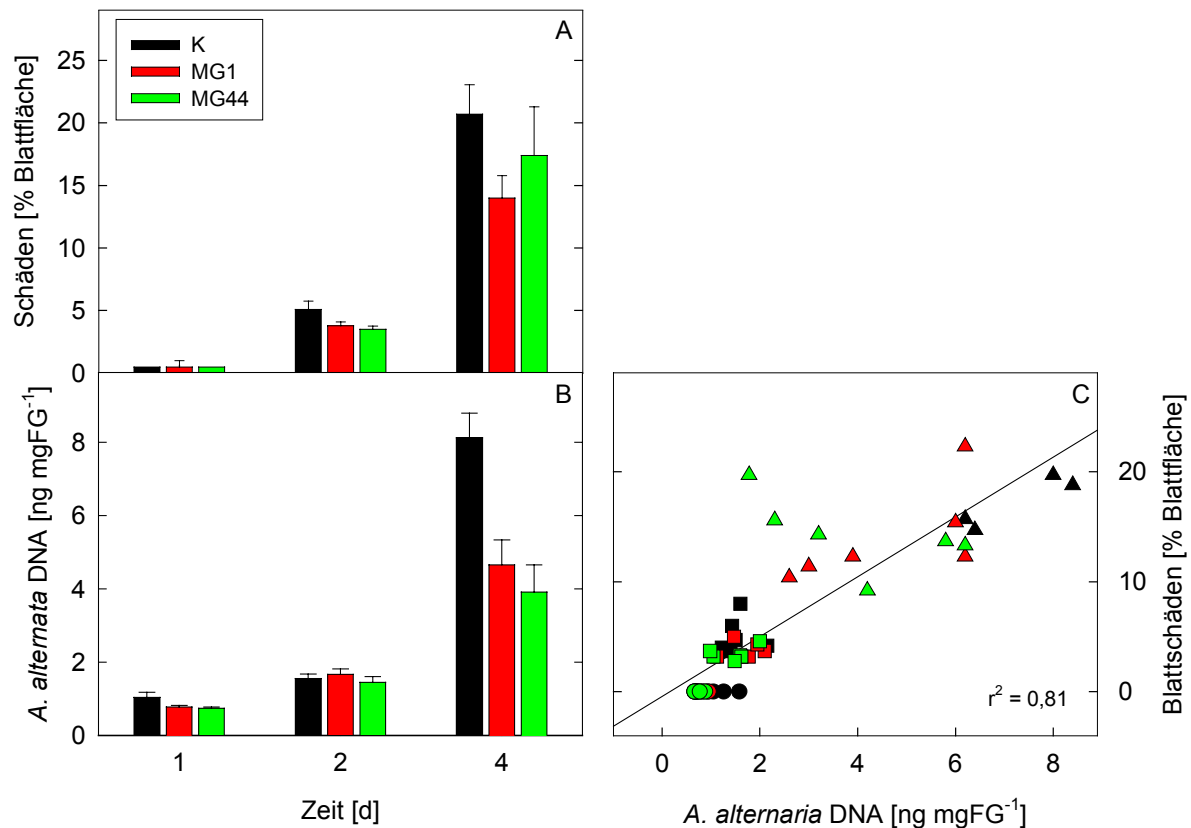


Abb. 31: Schäden (A) und *A. alternata* DNA-Gehalte (B) von Tomatenblättern nach Vorbehandlung der Pflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 und anschließender Infektion mit *A. alternata*. In C wurden die Blattschäden mit den DNA-Mengen korreliert, wobei die Werte nach 1-, 2-, und 4-tägiger Pilzinfektion mit Kreisen, Quadraten, und Dreiecken dargestellt wurden. Gezeigt sind Daten mit Mittelwerten  $\pm$  SE ( $n = 6$  bei A und B) bzw. die Korrelation der Einzeldaten (C).

#### 4.1.2 Entwicklung der pflanzlichen Krankheitsresistenz gegen *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum*

Wie aus der Literatur bekannt, ist die Fähigkeit zur Erhöhung der pflanzlichen Krankheitsresistenz bei Bakterien mit Biocontrol-Aktivität häufig nicht nur auf ein Pathogen beschränkt, sondern erstreckt sich auf ein breites Spektrum an Pathogenen, das z. B. verschiedene Pilzarten oder auch bakterielle bzw. virale Krankheitserreger umfassen kann (Van Wees et al., 1997). Daher wurden Untersuchungen durchgeführt, inwieweit dies auch auf die Biocontrol-Aktivität von *Serratia liquefaciens* MG1 zutrifft. Als weitere Pathogene wurden die perthotrophen sprosspathogenen Pilze *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum* ausgewählt.

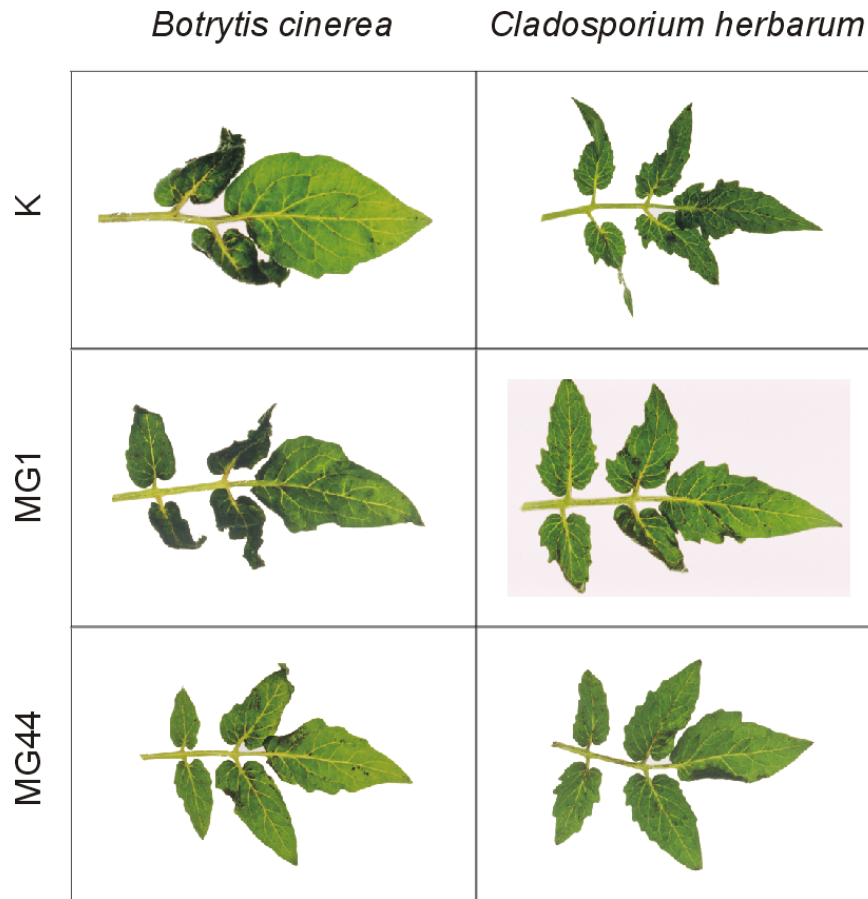


Abb. 32: Schäden auf mittelalten Tomatenblättern nach Inokulation der Pflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 und nach 4-tägiger Infektion mit den sprosspathogenen Pilzen *Cladosporium herbarum* und *Botrytis cinerea*.

Eine Inokulation der Pflanzen mit dem Wildtyp-Stamm *S. liquefaciens* MG1 oder mit seiner AHL-negativen Mutante MG44 führte zu ähnlich hohen Schäden nach einer 4-tägigen Infektion mit *Botrytis cinerea* im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 32, 33A). Auch die mit *Cladosporium herbarum* infizierten Pflanzen unterschieden sich kaum in der Ausprägung der Blattschäden bei den verschiedenen Behandlungsvarianten. Von Blättern, die nach 4-tägiger Pilzinfektion geerntet wurden, erfolgte eine Quantifizierung der Pilz-DNA (Abb. 33B). Dabei waren die Gehalte an *Botrytis cinerea* DNA bei den mit dem Wildtyp-Stamm MG1 inokulierten Pflanzen doppelt so hoch wie bei den Kontrollpflanzen, während die Pflanzen, die mit MG44 vorbehandelt wurden, einen 1,7fach niedrigeren DNA-Gehalt aufwiesen. Bei den mit *C. herbarum* infizierten Pflanzen unterschieden sich die DNA-Gehalte kaum zwischen den Behandlungsvarianten, nur die mit dem Stamm MG44 vorbehandelten Pflanzen wiesen einen 1,4fach geringeren DNA-Gehalt auf (Abb. 33B).

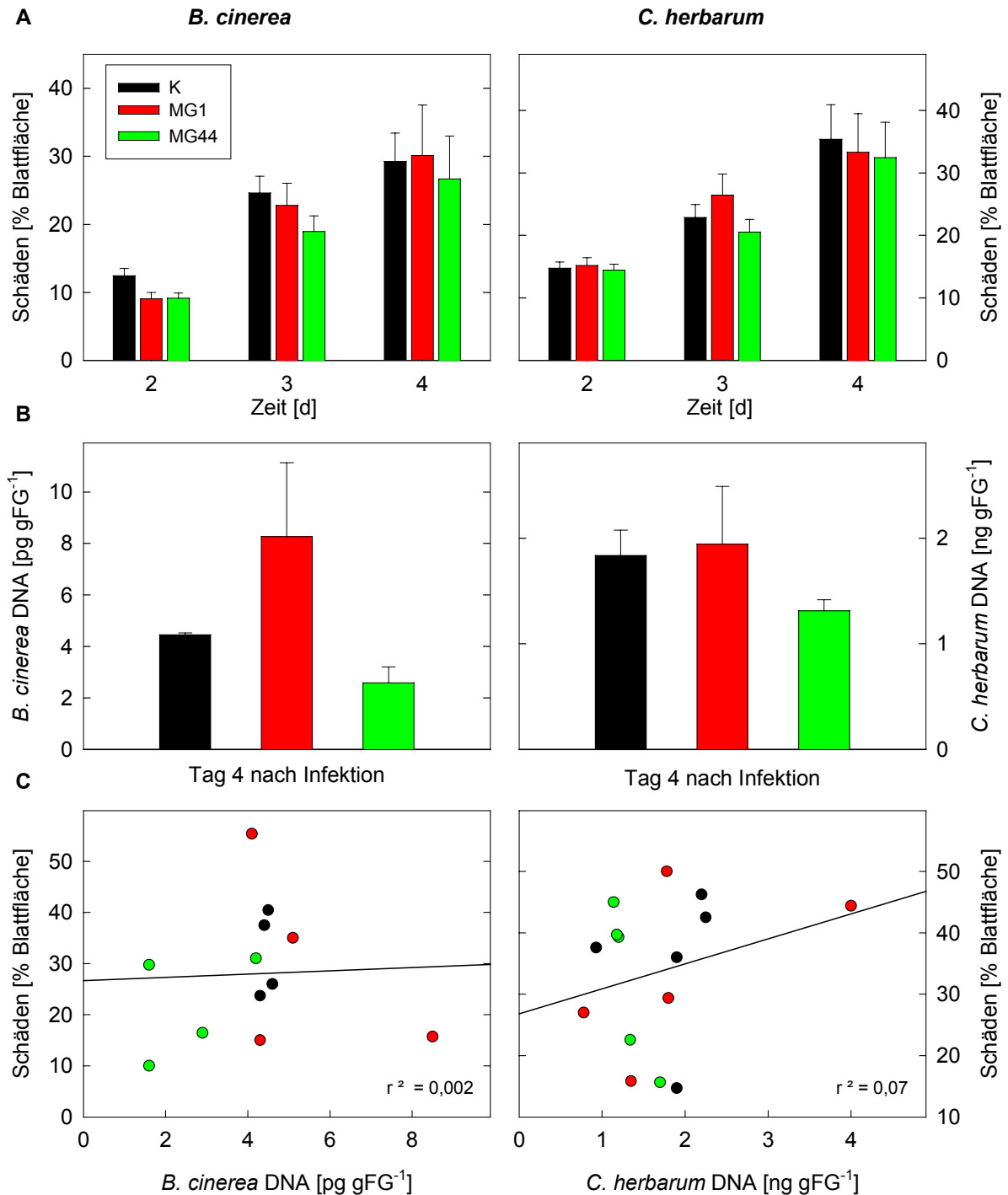


Abb. 33: Visuelle Bonitur von Blattschäden (A) und Quantifizierung der Pilz-DNA aus mittelalten Blättern (B) bei Tomatenpflanzen, die drei Tage nach einer Inokulation mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 mit den sprosspathogenen Pilzen *B. cinerea* und *C. herbarum* infiziert wurden. Für eine Korrelationsanalyse wurden die Blattschäden gegen die DNA-Mengen aufgetragen (C). Gezeigt sind Daten mit Mittelwerten  $\pm$  SE ( $n = 5$  bei A und  $n = 4-5$  bei B) bzw. die Korrelation der Einzeldaten (C).

#### 4.2. Biocontrol-Aktivität von Vertretern der Gattung *Pseudomonas*

Verschiedene nicht pflanzenpathogene Vertreter der Gattung *Pseudomonas* können die Widerstandskraft in Pflanzen erhöhen und sie weniger anfällig gegenüber Krankheiten machen (Barka et al., 2000; Duijff et al., 1999; Ligon et al., 2000). Insbesondere der Stamm *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, ein Isolat aus der Weizenrhizosphäre (Van Peer et al., 1991) löst sowohl in Tomatenpflanzen als auch bei *Arabidopsis thaliana* eine induzierte systemische Resistenz gegen Pathogene wie *Pseudomonas syringae* und *Fusarium* sp. aus (Duijff et al., 1997; Pieterse et al., 1996). Das Modellsystem aus *Arabidopsis thaliana* und *P. fluorescens* WCS417r stellt im Moment wohl das am besten untersuchte Beispiel für eine durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien induzierte systemische Resistenz dar (Pieterse et al., 1998; Ton et al., 2001).

In dieser Arbeit wurde daher dieser Stamm zur Inokulation von Tomatenpflanzen eingesetzt und Änderungen in der Anfälligkeit gegen die drei sprosspathogenen Pilze *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum* untersucht. Daneben wurde noch ein weiterer Vertreter der Gattung *Pseudomonas* getestet, ein Isolat aus der Tomatenrhizosphäre, das von Steidle et al. (2001) im Rahmen dieses Projektes charakterisiert wurde. *Pseudomonas putida* IsoF ist wie *Serratia liquefaciens* in der Lage, *N*-Acyl-L-homoserinlactone zu produzieren. Nachdem die AHL-Synthase aus diesem Stamm kloniert wurde, konnte durch Transposon-Mutagenese ein AHL-negatives Derivat *P. putida* F117 hergestellt werden (Steidle et al., 2002).

Gegenüber *A. alternata* konnten sowohl *P. fluorescens* WCS417r als auch *P. putida* IsoF eine Resistenz induzieren, die sich nach 4-tägiger Pilzinfektion in 80 % bzw. 70 % verminderten Blattschäden niederschlug (Abb. 34, 35A). Auch eine Vorbehandlung der Tomatenpflanzen mit der AHL-negativen Mutante von IsoF, F117, führte zu einer Reduktion der Schäden um 50 %. Die Unterschiede zwischen dem Wildtyp-Stamm und der AHL-negativen Mutante waren allerdings nicht signifikant. Betrachtet man die DNA-Gehalte von *A. alternata* der mittelalten Blätter vier Tage nach der Pilzzugabe, so stellt man eine 1,5fache Zunahme bei den mit *P. putida* IsoF vorbehandelten Pflanzen fest, während eine Inokulation mit F117 und mit *P. fluorescens* WCS417r zu einer Abnahme der Menge an Pilz-DNA um Faktor 2,2 bzw. 3,0 führte (Abb. 35B). Die bonitierten Schäden korrelierten dabei mit den DNA-Mengen der mit *P. putida* F117 und *P. fluorescens* WCS417r inokulierten Pflanzen, aber nicht mit den DNA-Gehalten der mit *P. putida* IsoF vorbehandelten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.



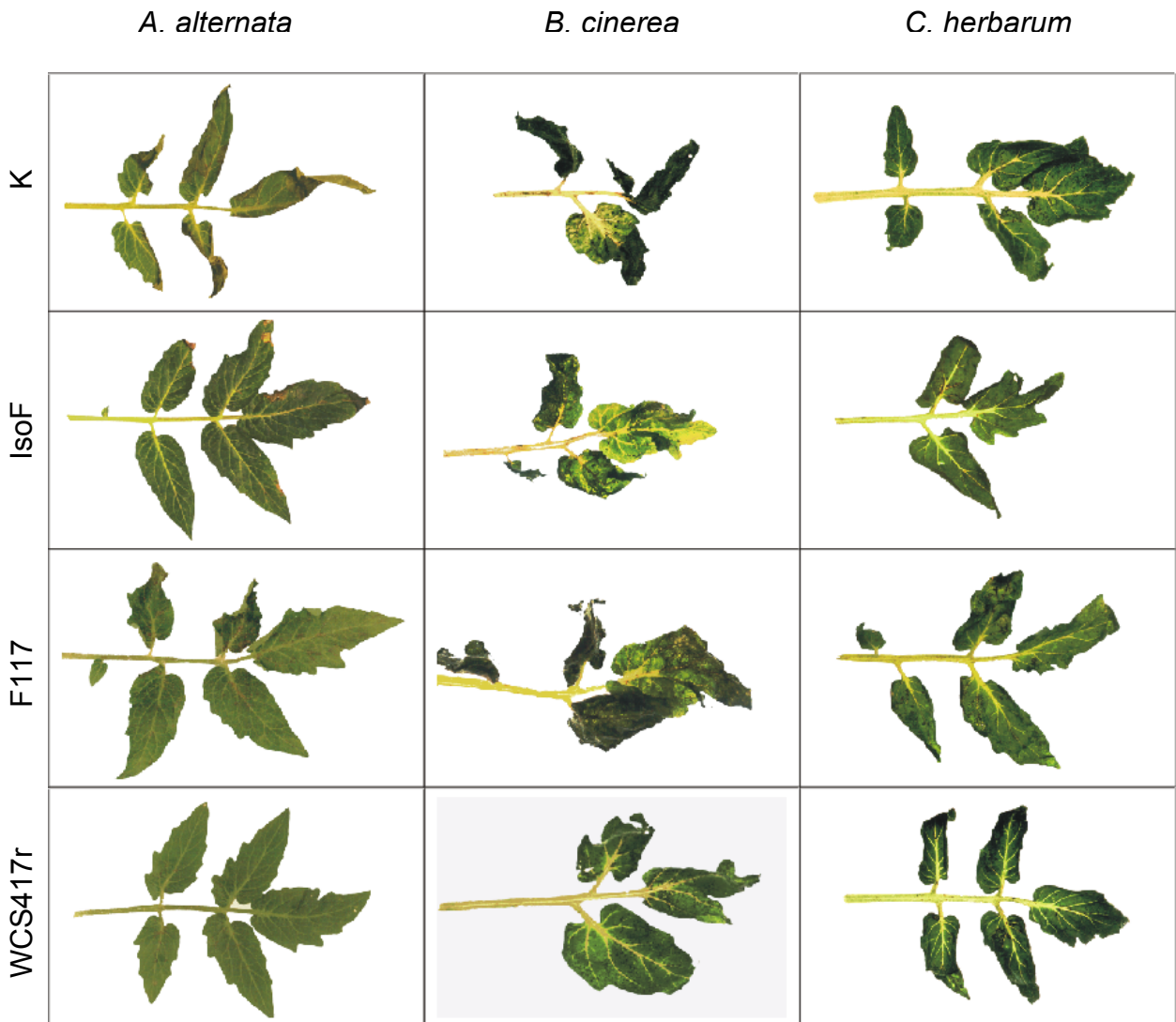


Abb. 34: Einfluss einer Vorbehandlung von Tomatenpflanzen mit *Pseudomonas putida* IsoF, F117 und *Pseudomonas fluorescens* WCS417r auf die Bildung von Blattschäden nach 4-tägiger Infektion mit *A. alternata*, *B. cinerea* und *C. herbarum*. Gezeigt sind mittelalte Blätter.

Bei einer Infektion der Tomatenpflanzen mit *Botrytis cinerea* fiel zunächst der deutlich stärkere Krankheitsverlauf auf (Abb. 34). Die Pflanzen zeigten schon nach zwei Tagen mehr als doppelt so viele Blattschäden als bei einer Infektion mit *Alternaria alternata* und nach vier Tagen waren die Schäden bei den Kontrollpflanzen ebenfalls um Faktor 1,7 höher als nach der *A. alternata* Infektion (Abb. 35A). Eine Vorbehandlung der Pflanzen mit den drei *Pseudomonas*-Stämmen ließ eine Tendenz zur Reduktion der Schäden hervorgerufen durch *B. cinerea* nach vier Tagen erkennen, sie war aber nicht signifikant. Interessant war der Rückgang der Mengen an *B. cinerea* DNA unabhängig von den Behandlungsvarianten innerhalb des Untersuchungszeitraumes, obwohl die Blattschäden zunahmen (Abb. 35B). Bei

den Kontrollpflanzen und den mit *P. putida* IsoF inokulierten Pflanzen waren nur noch 1/10 der *B. cinerea* DNA am vierten Tag nachzuweisen im Vergleich zum zweiten Tag, bei den anderen beiden Behandlungsvarianten war der Rückgang nicht so stark (Faktor 2,3).

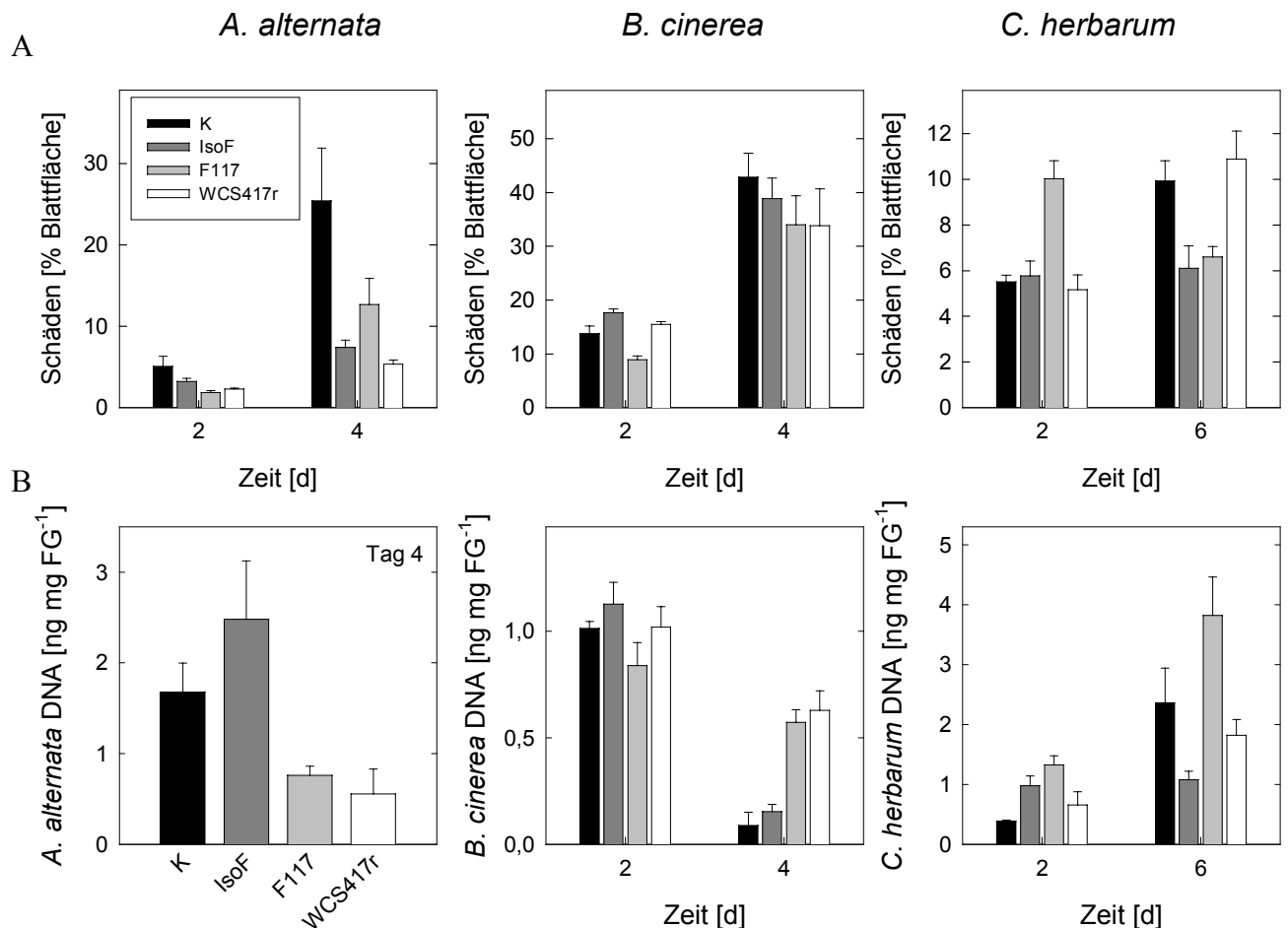


Abb. 35: Einfluss einer Inokulation von Tomatenpflanzen mit *P. putida* IsoF, F117 und *P. fluorescens* WCS417r auf die Krankheitsresistenz während einer Infektion mit verschiedenen tomatenpathogenen Pilzen (*A. alternata*, *B. cinerea* und *C. herbarum*). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE mit  $n = 5-6$ .

Die schwächste Symptomentwicklung wiesen die mit *Cladosporium herbarum* infizierten Tomatenpflanzen in diesem Experiment auf (Abb. 34, 35A). Selbst nach 6-tägiger Infektion stiegen die Blattschäden kaum über 10 % der Gesamtblattfläche an. Mit *P. fluorescens* WCS417r inokulierte Pflanzen hatten nach sechs Tagen ähnlich hohe Blattschäden wie die Kontrollpflanzen, die Gehalte an *C. herbarum* DNA waren allerdings leicht erniedrigt (Abb. 35B). Im Gegensatz dazu reduzierte eine Vorbehandlung mit *P. putida* IsoF die Blattschäden signifikant um 64 % und auch die mit der AHL-negativen Mutante F117 inokulierten

Pflanzen hatten um 61 % weniger Blattschäden. Die Mengen an *C. herbarum* DNA waren bei den Kontrollpflanzen ungefähr doppelt so hoch wie bei den mit *P. putida* IsoF vorbehandelten, aber 1,6fach niedriger als bei der Behandlungsvariante mit *P. putida* F117. Die *C. herbarum* DNA-Gehalte konnten nicht mit den Blattschäden korreliert werden (Abb. 35B).

## **5. Einfluss von *Serratia liquefaciens* auf die Gehalte pflanzlicher Signalstoffe**

### **5.1. Verlauf der Salicylsäuregehalte nach Behandlung von Tomatenpflanzen mit *Serratia liquefaciens* und *Alternaria alternata***

Bei vielen pflanzlichen Stressreaktionen kommt es zu einer Induktion von Salicylsäure, die als Signalsubstanz an der Ausbildung der hypersensitiven Reaktion (HR) sowie an der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) beteiligt ist (Durner et al., 1997). Über die Beteiligung von Salicylsäure bei der durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien induzierten systemischen Resistenz (ISR) ist aus der Literatur noch nicht viel bekannt. In *Arabidopsis thaliana* scheint Salicylsäure bei der ISR gegen *Pseudomonas syringae* keine Rolle zu spielen, da transgene Pflanzen (*nahG*), die eine bakterielle Salicylat-Hydroxylase exprimieren und somit keine Salicylsäure akkumulieren können, vergleichbare Reaktionen zeigen wie Wildtyp-Pflanzen (Pieterse et al., 1996). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Gehalte an Salicylsäure in Tomatenpflanzen von einer Kolonisierung der Wurzeln mit *Serratia liquefaciens* MG1 beeinflusst werden.

Fünf Wochen alte Pflanzen wurden mit *S. liquefaciens* MG1 in einer Zelldichte von  $10^{11}$  cfu pro Pflanze inokuliert. Dann wurde der Gehalt an freier und konjugierter Salicylsäure in mittelalten Blättern untersucht. Zusätzlich wurden noch die Gehalte an Gentsinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) bestimmt, die in Tomatenpflanzen durch verschiedene Pathogene induziert werden und aus exogen zugegebener Salicylsäure gebildet werden kann (Bellés et al., 1999). Nach der Aufreinigung der Salicylsäure aus den Blättern nach einer modifizierten Methode von Meuwly & Métraux (1993) wurde der Extrakt mittels HPLC aufgetrennt und mit einem Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungs- und Emissionswellenlänge von 305 und 407 nm detektiert (Abb. 36). Salicylsäure eluierte bei ca. 10,5 min. In Chromatogrammen von Proben, die nicht hydrolysiert wurden, trat noch ein zusätzlicher Peak bei ca. 9 min auf, er

konnte aber keiner Substanz zugeordnet werden. Freie Gentisinsäure konnte in Tomatenblättern nicht nachgewiesen werden. Konjugate von Salicyl- und Gentisinsäure wurden durch saure Hydrolyse in freie Säuren umgewandelt, welche dann mit der gleichen Methode detektiert wurden. Konjugierte Gentisinsäure wurde in den Proben in hoher Menge nachgewiesen; sie besaß eine Retentionszeit von ca. 5,0 min (Abb. 36, unten).

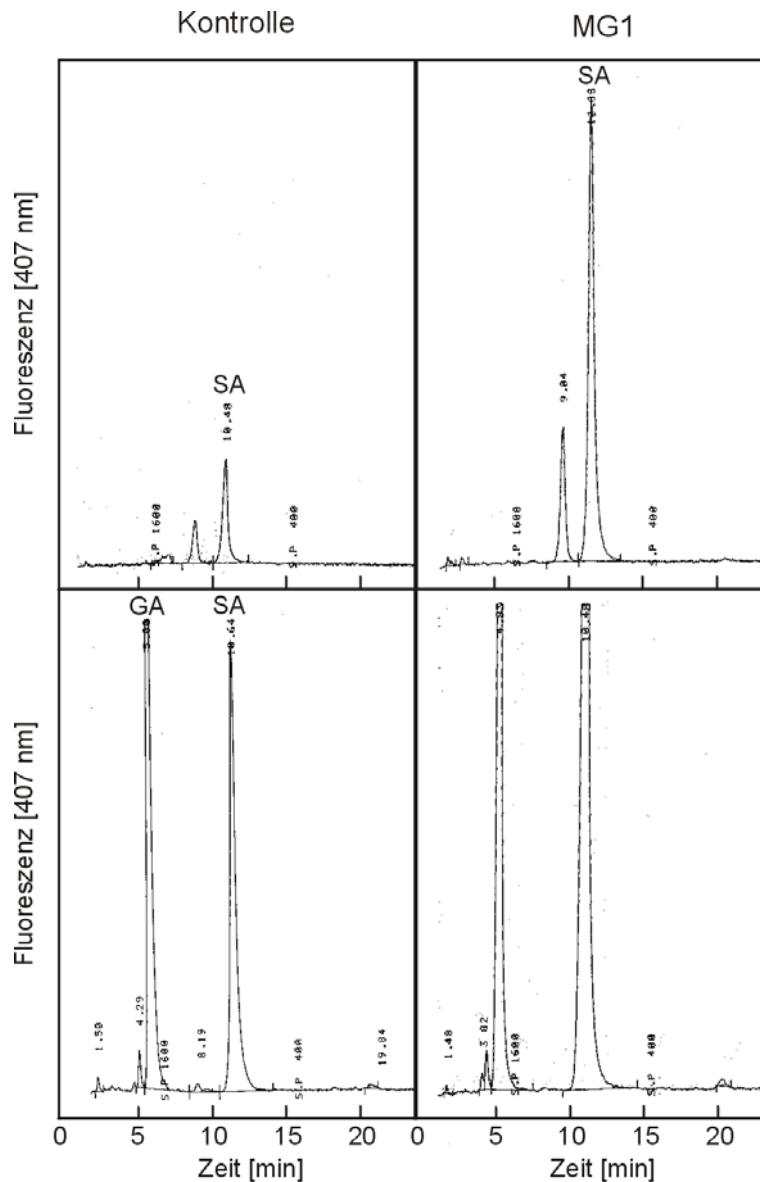


Abb. 36: Typische HPLC-Chromatogramme mit (oben) und ohne Hydrolyse (unten) während der Salicylsäureextraktion von Tomatenblättern. Salicylsäure (SA) besitzt eine Retentionszeit von ca. 10,5 min, Gentisinsäure (GA) konnte nur in hydrolysierten Proben nachgewiesen werden, sie wurde nach ca. 5,0 min detektiert. Links sind Chromatogramme von Kontrollpflanzen gezeigt, rechts von Pflanzen, die drei Tage vorher mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert wurden.

In mittelalten Tomatenblättern von Pflanzen, die mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, konnte bereits nach drei Tagen eine deutliche Induktion des Gehaltes an freier Salicylsäure von 0,9 auf 3,7 nmol g FG<sup>-1</sup> festgestellt werden (Abb. 37, oben). Auch die konjugierte Salicylsäure war um den Faktor 3,6 erhöht. Die konjugierte Gentisinsäure war sogar über einen Zeitraum von neun Tagen 1,5fach höher in den mit *S. liquefaciens* MG1 kolonisierten Pflanzen als in den Kontrollen (Abb. 37, unten).

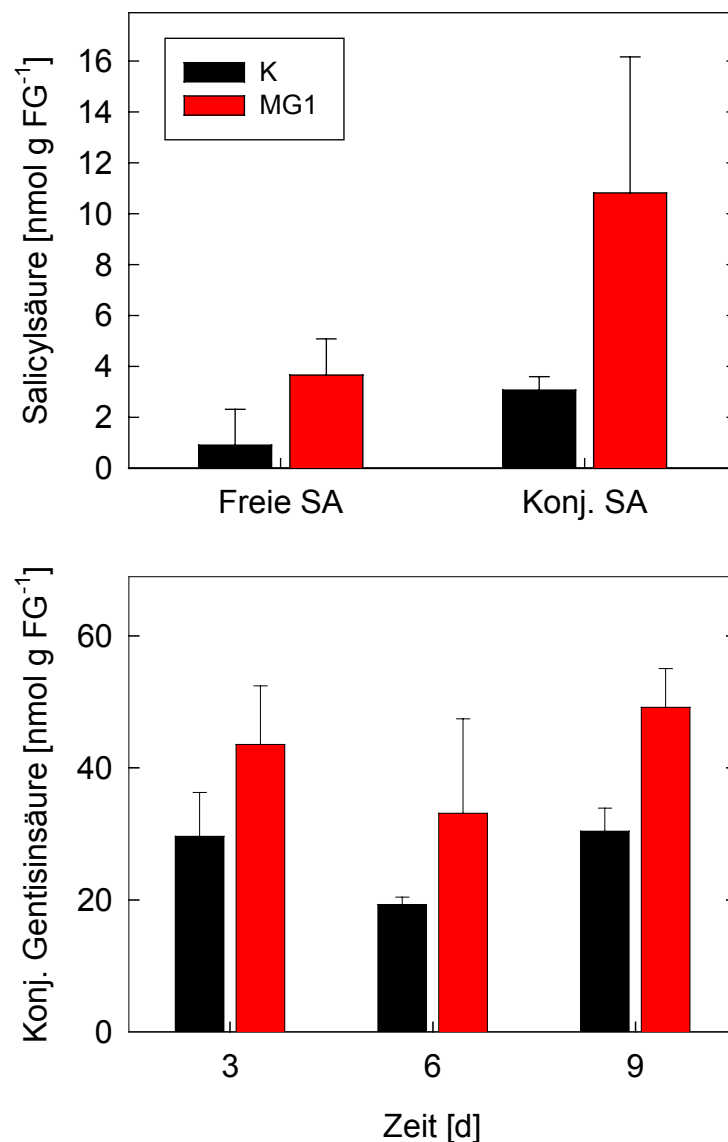


Abb. 37: Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure in mittelalten Blättern drei Tage nach Inokulation von Tomatenpflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 (oben) und Gehalte an Gentisinsäure-Konjugaten nach drei bis neun Tagen (unten). Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Verschiedene Nekrosen-auslösende Pathogene können Salicylsäure induzieren (Cameron et al., 1999; Enyedi et al., 1992). In Tomatenpflanzen führte eine Infektion mit *Alternaria alternata* zu keiner Veränderung des Gehaltes an freier Salicylsäure während der Gehalt an konjugierter Salicylsäure schwach anstieg, wobei er in den ersten drei Tagen noch leicht über dem der Kontrollpflanzen lag (Abb. 38).

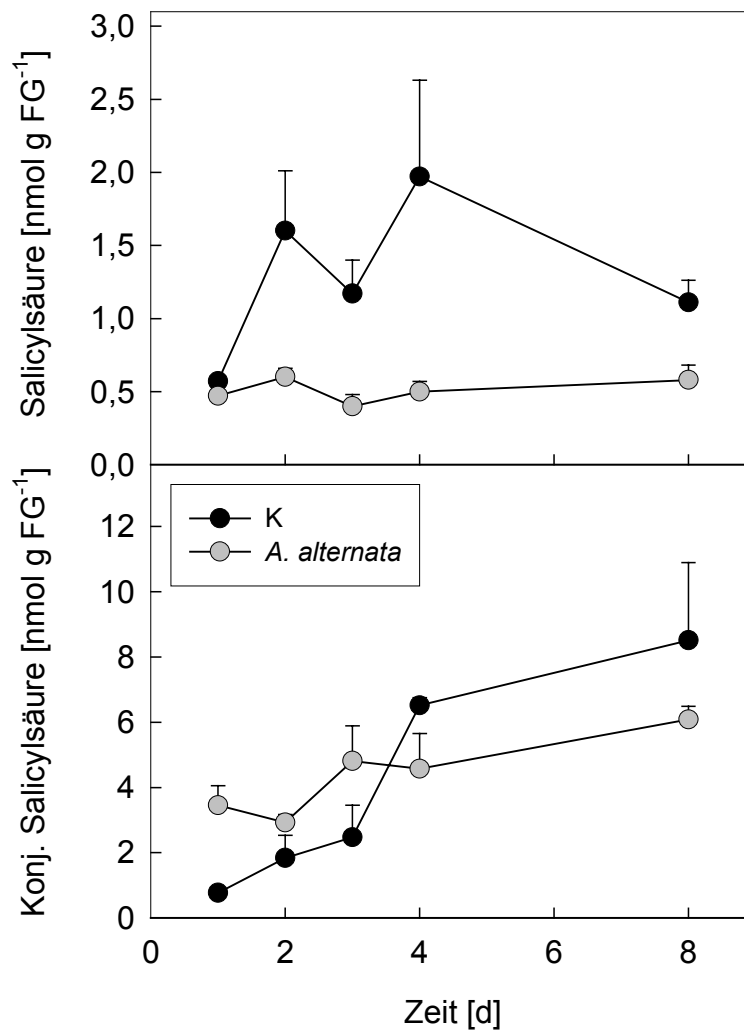


Abb. 38: Zeitverlauf der Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure in mittelalten Tomatenblättern während einer Infektion mit *A. alternata*. Erste Blattschäden wurden ab Tag 2 beobachtet. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Auffällig war die 3-4fache Zunahme an freier Salicylsäure bei den Kontrollpflanzen zwischen dem zweiten und vierten Tag der Infektion. Auch die Gehalte der Konjugate stiegen während des Untersuchungszeitraumes an. Möglicherweise reagierten die Kontrollpflanzen auf die Inkubation bei 100 % Luftfeuchtigkeit mit der Induktion von Salicylsäure.

Eine Bestimmung der Salicylsäuregehalte in mittelalten Blättern von Pflanzen, die drei Tage vor der Infektion mit *Alternaria alternata*, mit *S. liquefaciens* MG1, dem Wildtyp, und der korrespondierenden AHL-negativen Mutante MG44 inokuliert wurden, ergab während der ersten beiden Tage der Infektion gleichbleibend niedrige Gehalte sowohl von freier als auch konjugierter Salicylsäure, die dann beide am vierten Tag zunahmen (Abb. 39).

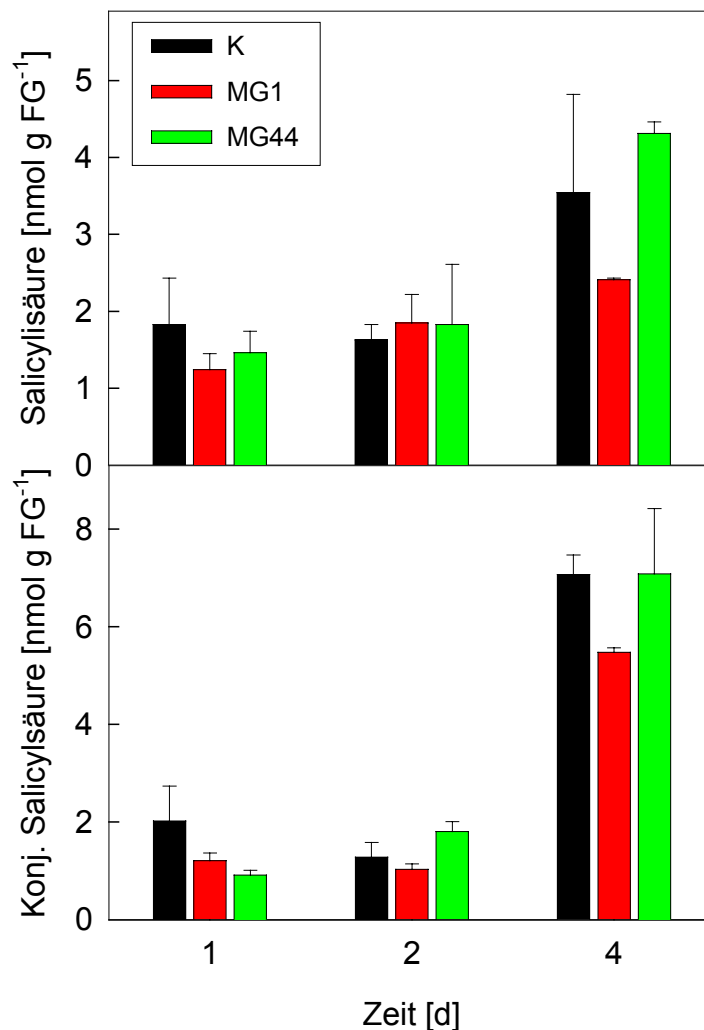


Abb. 39: Einfluss einer Vorbehandlung von Tomatenpflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 auf die Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure während einer Infektion mit *A. alternata*. Blattschäden traten erst ab Tag 2 auf. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

Insbesondere die Kontrollpflanzen und die mit dem Stamm MG44 behandelten Pflanzen zeigten diesen Anstieg bei der freien Salicylsäure (Faktor 2-2,5), während die Gehalte in den mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Pflanzen annähernd gleich blieben. Die Menge an konjugierter Salicylsäure nahm in allen drei Behandlungsvarianten zu, aber auch hier war der

Anstieg bei den mit *S. liquefaciens* MG1 vorbehandelten Pflanzen geringer (Abb. 39). Die Gehalte lagen um 23 % unter den Werten für die Kontrollpflanzen und mit dem Stamm MG44 inokulierten Pflanzen. Diese Unterschiede in den Gehalten an freier und konjugierter Salicylsäure zwischen dem Wildtyp-Stamm MG1 und der AHL-negativen Mutante MG44 ähneln den Unterschieden in der Stärke der Blattschäden nach 4-tägiger Infektion mit *A. alternata*.

## **5.2. Änderungen von Parametern der Ethylenbiosynthese durch *Serratia liquefaciens* und *Alternaria alternata***

Das Pflanzenhormon Ethylen ist nicht nur an entwicklungsabhängigen Prozessen wie Fruchtreife und Seneszenz beteiligt, es stellt auch einen wichtigen Signalstoff bei Stressreaktionen nach Verwundung oder Pathogenbefall dar (Díaz et al., 2002; Johnson & Ecker, 1998). Bei der Ausbildung der induzierten systemischen Resistenz (ISR) in *Arabidopsis thaliana* ist ebenfalls eine intakte Ethylenperzeption und –Signalkette nötig, die aber nicht mit erhöhten Ethylenemissionen einhergeht (Pieterse et al., 1998, 2000). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit konnten in Tomatenpflanzen während der ersten fünf Stunden nach Zugabe einer Suspension von *Serratia liquefaciens* MG1 an die Wurzeln erhöhte Ethylenemissionen festgestellt werden (Abb. 40, oben).

Die Werte stiegen dabei innerhalb einer Stunde von 0,07 auf 0,14 nmol g FG<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> um das Doppelte an und fielen nach fünf Stunden wieder ab. Kontrollpflanzen reagierten auf die Zugabe von 10 mM MgSO<sub>4</sub> mit einem verzögerten Anstieg der Ethylenemission, welche nach acht Stunden ihren Höhepunkt erreichte. Vergleicht man die Ethylengehalte der beiden Behandlungsvarianten innerhalb der ersten drei Stunden (Abb. 40, unten), so findet man bei den Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 behandelt wurden, nach ein und drei Stunden 1,3 und 1,7fach höhere Emissionen an Ethylen.



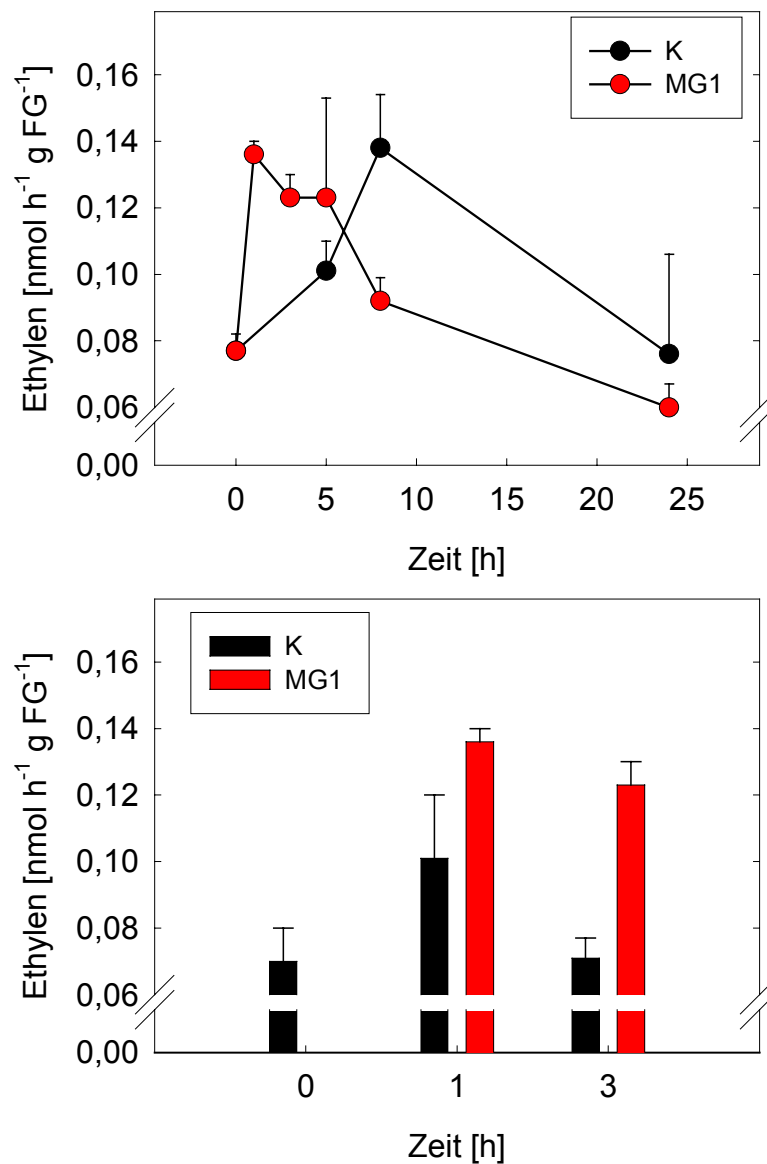


Abb. 40: Zeitverlauf der Ethylenemission aus mittelalten Tomatenblättern (oben) und Ethylengehalte während der ersten Stunden (unten) nach Zugabe von *S. liquefaciens* MG1 an die Wurzeln. Kontrollpflanzen wurden mit 10 mM MgSO<sub>4</sub> behandelt. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Parallel zu der Messung von Ethylen wurden die Gehalte an freier und konjugierter 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) bestimmt. ACC ist bei der Biosynthese die Vorstufe von Ethylen und häufig korrelieren die ACC-Gehalte mit den Ethylenemissionen (Moeder, 1999). Die Werte lagen dabei knapp am Detektionslimit. Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 inokuliert waren, zeigten ähnlich niedrige Werte wie die Kontrollpflanzen (Tabelle 11).

Tabelle 11: Gehalte an freiem und konjugiertem ACC in mittelalten Tomatenblättern nach Zugabe von *Serratia liquefaciens* MG1 und MG44 an die Wurzeln. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3), n. d. = nicht detektierbar.

	Freies ACC [nmol g FG <sup>-1</sup> ]		Konj. ACC [nmol g FG <sup>-1</sup> ]	
	5 h	10 h	5 h	10 h
K	n. d.	0,11 $\pm$ 0,11	0,74 $\pm$ 0,03	0,54 $\pm$ 0,11
MG1	0,06 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,08	0,76 $\pm$ 0,39	0,58 $\pm$ 0,02
MG44	0,08 $\pm$ 0,08	n. d.	0,75 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,16

Nach einer Infektion der Tomatenpflanzen mit *Alternaria alternata* war ein starker Anstieg der Gehalte an freiem und konjugiertem ACC zu beobachten, wobei das Maximum beim freien ACC einen Tag früher auftrat (Abb. 41).

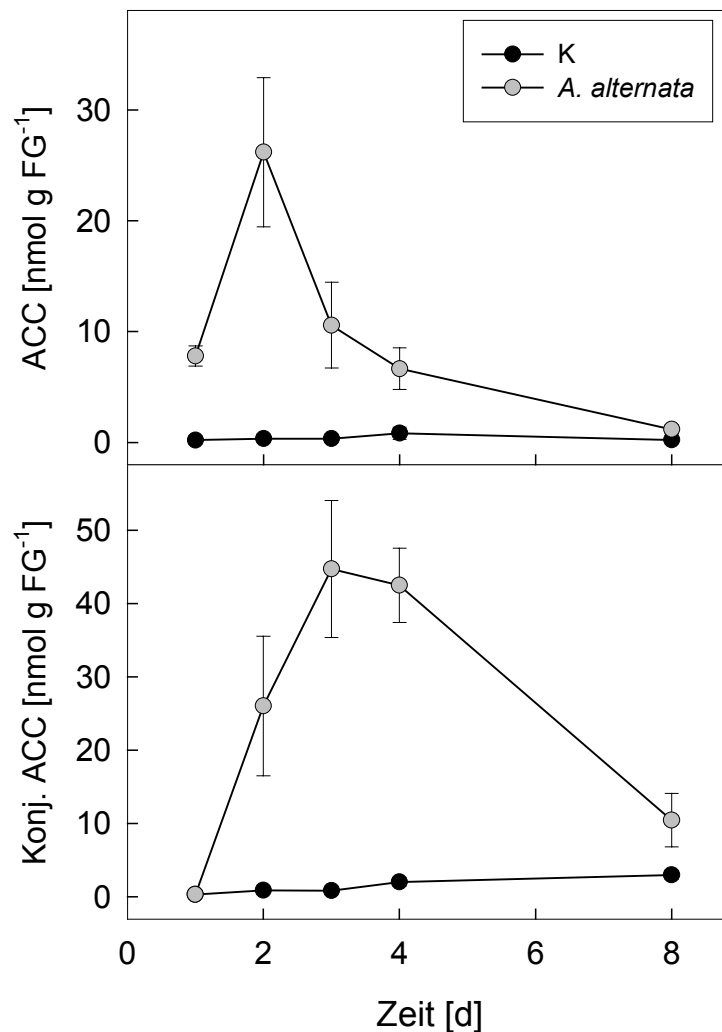


Abb. 41: Zeitverlauf der Gehalte an freiem und konjugiertem ACC in *Alternaria alternata* infizierten mittelalten Tomatenblättern. Beginn der Schäden am zweiten Tag. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Dabei stieg der Gehalt an freiem ACC innerhalb eines Tages um den Faktor 3,4 an, um ebenso rasch wieder abzufallen. Im Vergleich zu den Kontrollpflanzen waren die Gehalte an freiem ACC 77fach induziert. Beim konjugierten ACC begann der Anstieg am zweiten Tag von 0 auf 26,6 nmol g FG<sup>-1</sup> und die Gehalte verdoppelten sich innerhalb der nächsten beiden Tage. Nach acht Tagen näherten sich die Gehalte an freiem und konjugiertem ACC wieder den Ausgangswerten an.

Tomatenpflanzen, die mit *Serratia liquefaciens* MG1 und der AHL-Nullmutante MG44 inokuliert wurden, reagierten während der nachfolgenden Infektion mit *Alternaria alternata* deutlich schwächer (Abb. 42).

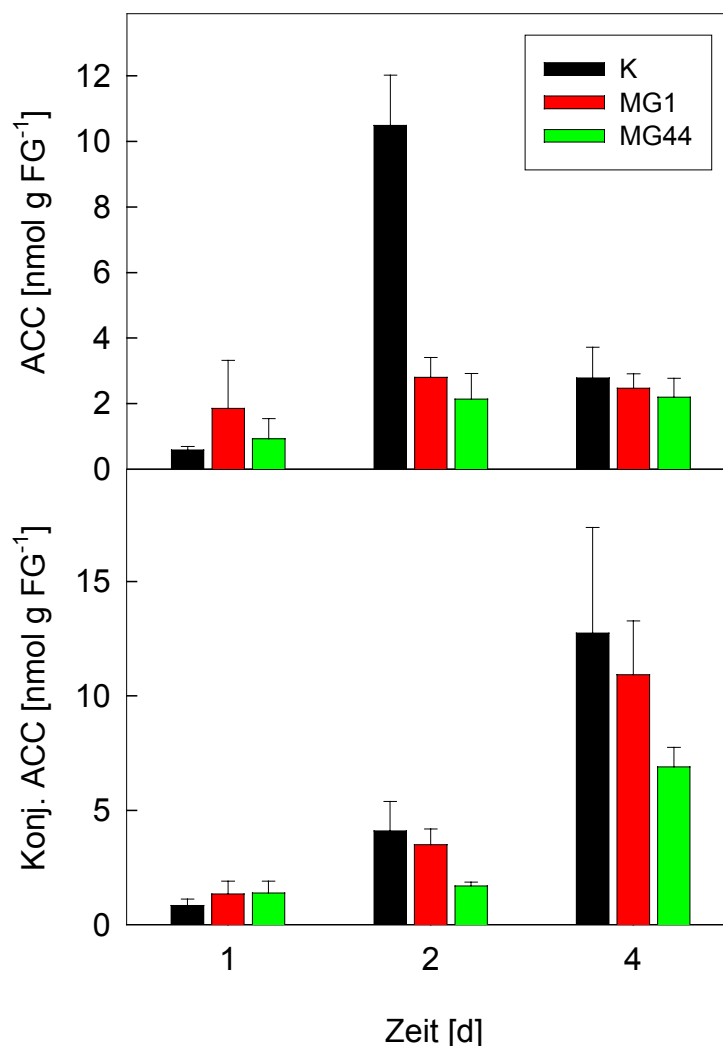


Abb. 42: Einfluss einer Vorbehandlung von Tomatenpflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 und MG44 auf die Gehalte an freiem und konjugiertem ACC in mittelalten Blättern nach Infektion mit *Alternaria alternata*. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE (n = 3).

Pflanzen, die keine Zugabe von Bakterien erfahren hatten, zeigten am zweiten Tag der Infektion fünfmal höhere Gehalte an freiem ACC als die mit den Stämmen MG1 und MG44 inokulierten Pflanzen. Die Menge an konjugiertem ACC nahm in allen Behandlungsvarianten erst am vierten Tag zu, der schwächste Anstieg war bei Pflanzen, an deren Wurzeln *S. liquefaciens* MG44 siedelte zu beobachten.

## **6. Pflanzliche Reaktionen nach Applikation von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen**

### **6.1. Induktion des Salicylsäuregehaltes durch *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton**

Da die Biocontrol-Aktivität von *Serratia liquefaciens* MG1 von der Produktion von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen abhängig ist (vgl. 4.1.1), wurde untersucht, inwiefern diese Substanzen *per se* Tomatenpflanzen beeinflussen können. *S. liquefaciens* MG1 produziert zwei kurzkettige AHL, das *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL, vgl. Einleitung, Abschnitt 2.3; Eberl et al., 1999), daher wurden zunächst die Reaktionen der Tomatenpflanzen auf diese beiden Substanzen untersucht.

Um Störungen von Seiten der natürlich vorkommenden Rhizosphärengemeinschaft an der Wurzel ausschließen zu können, wurde ein System etabliert, das es erlaubt, Tomatenpflanzen unter keimreduzierten Bedingungen in sterilem Quarzsand zu kultivieren (Material und Methoden, Abschnitt 4.2.3).

In einem ersten Experiment wurden verschiedene Mengen an *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton zu den Wurzeln gegeben, und fünf Stunden später die mittelalten Blätter und Wurzeln geerntet, um daraus Salicylsäure extrahieren zu können. Der Gehalt an freier Salicylsäure nahm in den Blättern konzentrationsabhängig maximal um das 1,6fache zu, wobei die Unterschiede aber nicht signifikant waren (Abb. 43). Die Menge an konjugierter Salicylsäure war bei einer Applikation von 1  $\mu\text{M}$  erst 1,5fach erhöht, stieg aber bei 10 und 100  $\mu\text{M}$  auf das Doppelte an. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war der Anstieg signifikant.

Auch in den Wurzeln stieg der Gehalt an freier Salicylsäure nach einer Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  HHL signifikant auf  $0,63 \pm 0,05 \text{ nmol g FG}^{-1}$  um den Faktor 2 an (Abb. 43). Die beiden anderen Behandlungsvarianten zeigten keine Änderungen in ihren Gehalten an freier Salicylsäure. Bei der konjugierten Salicylsäure konnten zwar bei 1  $\mu\text{M}$  HHL leicht erhöhte Werte festgestellt werden, der Gehalt war aber bei keiner der angewandten Konzentration signifikant verschieden.

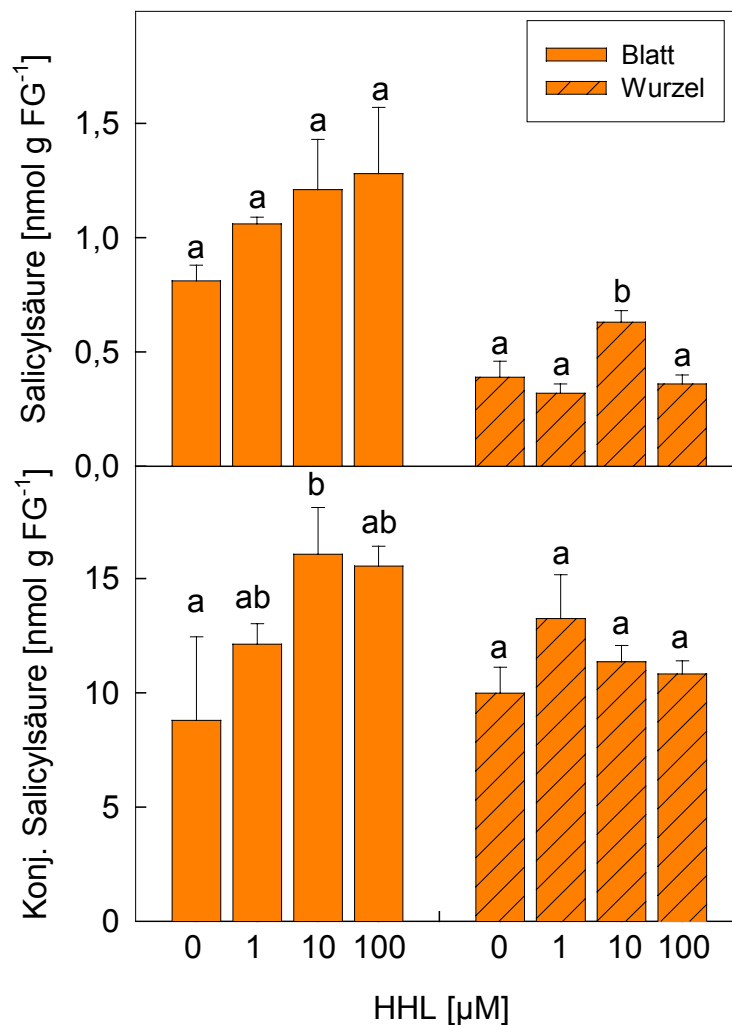


Abb. 43: Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure in Blättern und Wurzeln (rechts, schraffiert) fünf Stunden nach Applikation verschiedener Konzentrationen von *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) an Wurzeln von Tomatenpflanzen kultiviert in Quarzsand. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

Da bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  die stärksten Reaktionen zu beobachten waren, wurden Tomatenpflanzen mit dieser Konzentration an HHL weiterhin behandelt, und die Änderungen der Salicylsäuregehalte über einen Zeitraum von 24 Stunden verfolgt (Abb. 44). Innerhalb der ersten zehn Stunden war in den Blättern ein signifikanter Anstieg der Gehalte an freier Salicylsäure zu beobachten, der dann wieder leicht abfiel.

Der Gehalt an konjugierter Salicylsäure lag in den Blättern zum Zeitpunkt 0 bei etwa  $3,5 \pm 0,4 \text{ nmol g FG}^{-1}$ . Sowohl bei den Kontroll- als auch bei den HHL-behandelten Pflanzen sanken die Gehalte signifikant im weiteren Zeitverlauf. In beiden Behandlungsvarianten wurden annähernd gleiche Gehalte von etwa  $1,6 \text{ nmol g FG}^{-1}$  gemessen (Abb. 44).

In den Wurzeln konnte nach zehn Stunden eine starke Induktion von freier Salicylsäure festgestellt werden. Die Gehalte waren bei den mit HHL behandelten Pflanzen etwa achtmal höher als bei den Kontrollpflanzen. Die Gehalte an konjugierter Salicylsäure nahmen in den Wurzeln zunächst sowohl bei den Kontrollpflanzen als auch bei den mit HHL-behandelten ab, stiegen dann nach zehn Stunden in den Kontrollen wieder an (Abb. 44). Im Gegensatz dazu blieben sie bei den behandelten Pflanzen auf gleichbleibend niedrigem Niveau mit z. T. signifikant niedrigeren Werten.

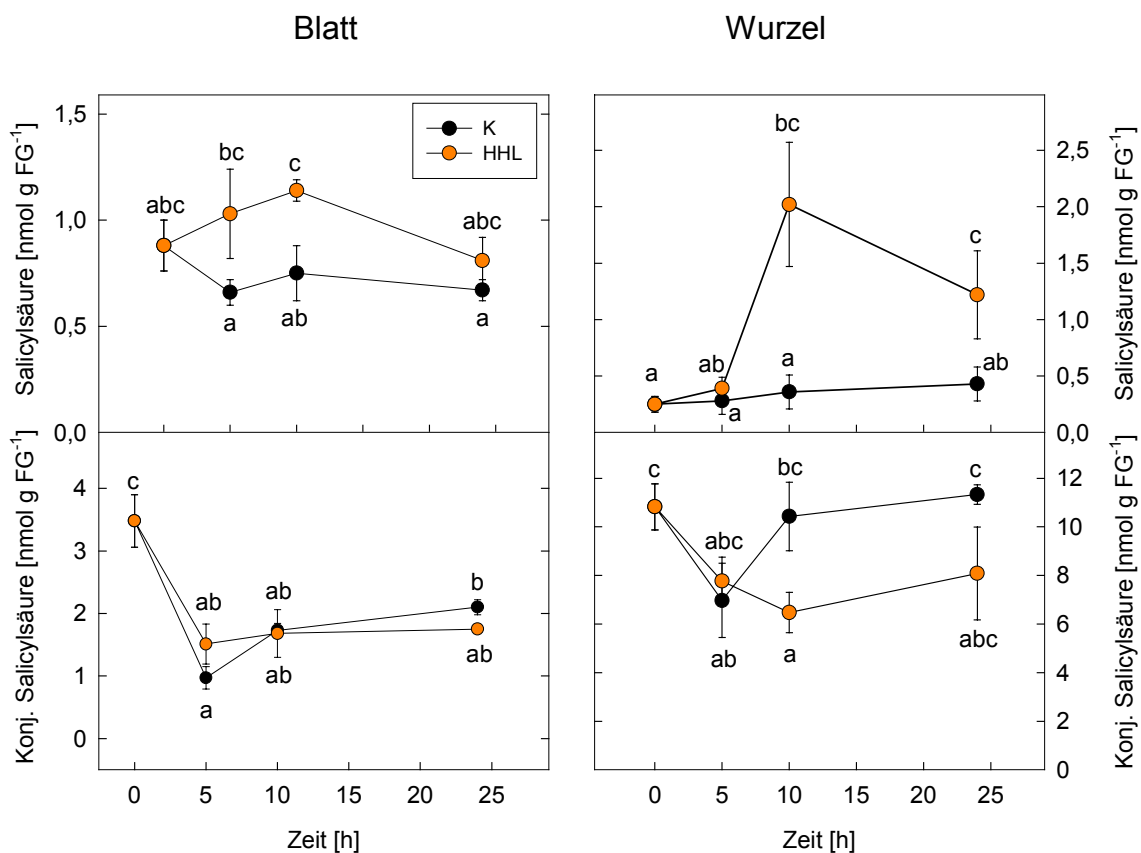


Abb. 44: Zeitverlauf des Gehalts an freier und konjugierter Salicylsäure in Blättern (links) und Wurzeln (rechts) nach Applikation von 10 µM *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL). Die Pflanzen wurden in Quarzsand kultiviert. Gezeigt sind Mittelwerte ± SE (n = 3), unterschiedliche Buchstaben geben im LSD Multiple Range Test signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsvarianten an.

In unabhängigen Experimenten wurden diese Induktionen an freier Salicylsäure auf ihre Reproduzierbarkeit hin überprüft (Abb. 45). Dabei konnte in den Blättern in dem zweiten Experiment kein Anstieg an freier Salicylsäure beobachtet werden, die Werte der

Kontrollpflanzen lagen nach fünf Stunden sogar höher im Vergleich zu den behandelten. Bezüglich der konjugierten Salicylsäure ergab sich ein ähnliches Bild: nach fünf Stunden konnten bei den Kontrollpflanzen ebenfalls höhere Gehalte beobachtet werden; nach zehn Stunden waren die Werte etwa gleich.

Ein anderes Ergebnis ergab die Extraktion der freien Salicylsäure aus den Wurzeln. Hier konnte die Induktion der freien Salicylsäure durch HHL bestätigt werden (Abb. 45). Nach fünf und zehn Stunden war der Gehalt in den mit HHL behandelten Pflanzen mehr als viermal so hoch wie in den Kontrollpflanzen. Der Gehalt an konjugierter Salicylsäure änderte sich nicht im Vergleich zu den Kontrollpflanzen.

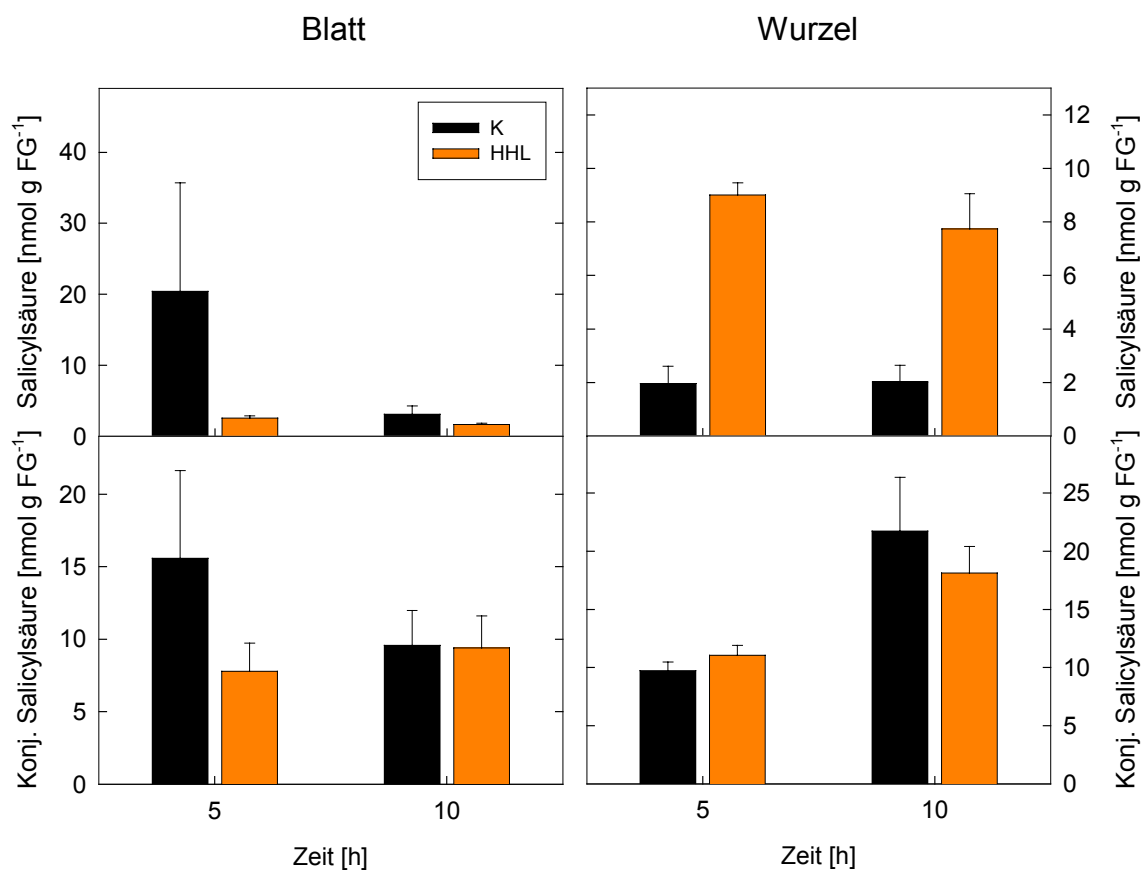


Abb. 45: Gehalte an freier und konjugierter Salicylsäure in Blättern (links) und Wurzeln (rechts) nach Applikation von 10  $\mu$ M *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) an die Wurzeln. Die Pflanzen wurden in Quarzsand kultiviert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

Um die Reaktionen auf eine Zugabe von HHL mit den Reaktionen auf andere Signalstoffe vergleichen zu können, wurden die Pflanzen in der gleichen Art und Weise mit 0,5 mM Salicylsäure behandelt. Salicylsäure kann über die Wurzeln aufgenommen und zu den

Blättern transportiert werden (Moeder, 1999). Es sind also erhöhte Gehalte an Salicylsäure zu erwarten.

Bereits nach fünf Stunden lag der Gehalt an freier Salicylsäure in den Wurzeln 40fach höher in den Pflanzen, denen Salicylsäure zugegeben wurde und selbst nach 24 Stunden war der Gehalt an freier Salicylsäure nur leicht abgesunken (Abb. 46). Parallel dazu begannen die Gehalte der konjugierten Salicylsäure erst nach fünf Stunden anzusteigen und erreichten den höchsten Wert mit  $86 \text{ nmol g FG}^{-1}$  am Ende des Untersuchungszeitraumes.

Auch in den Blättern konnte eine Induktion der freien Salicylsäure beobachtet werden. Das Maximum war aber schon nach zehn Stunden mit  $57,0 \pm 18,8 \text{ nmol g FG}^{-1}$  erreicht, dann sanken die Werte wieder fast auf den Anfangswert. Die konjugierte Salicylsäure stieg ebenfalls nach zehn Stunden stark an und blieb auf diesem Niveau bis ans Ende des Untersuchungszeitraumes (Abb. 46).

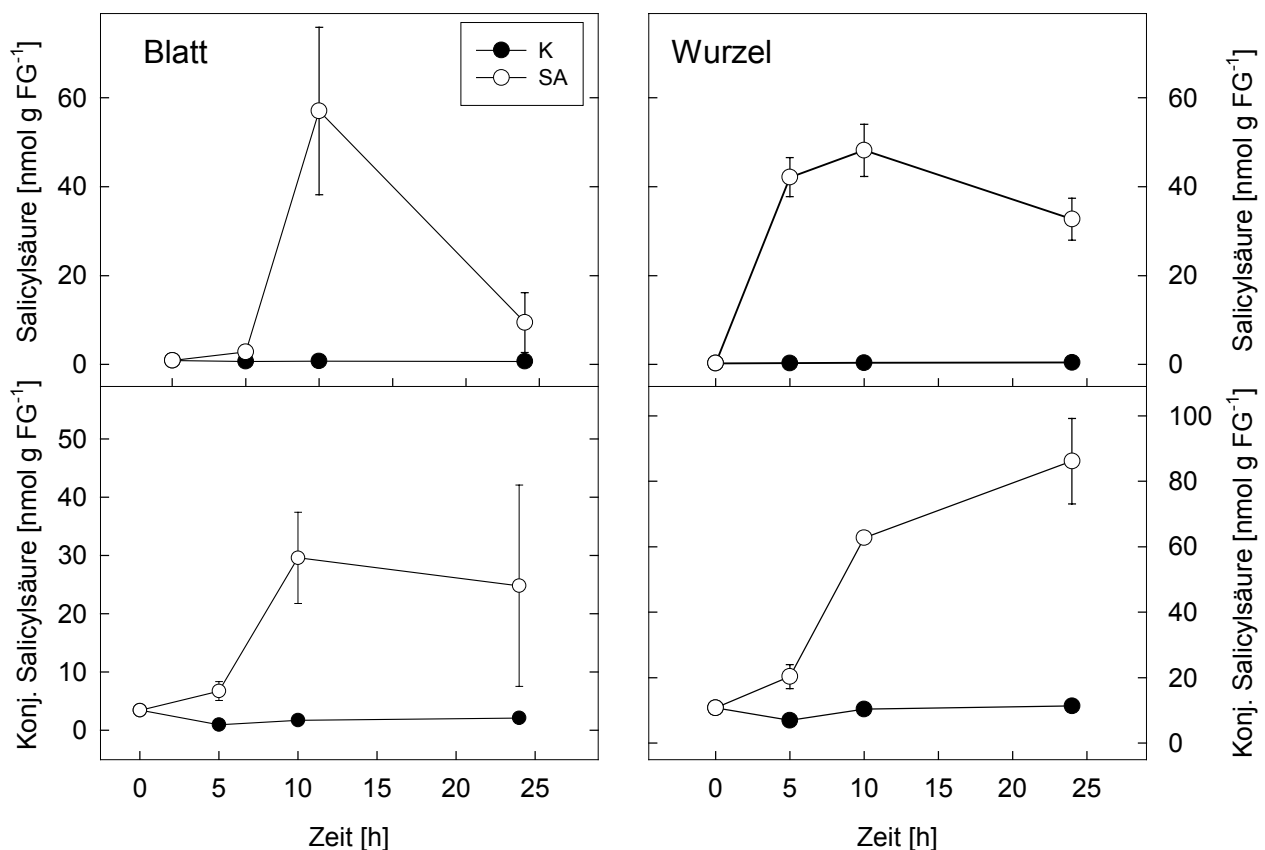


Abb. 46: Zeitverlauf des Gehalts an freier und konjugierter Salicylsäure in Blättern (links) und Wurzeln (rechts) nach Zugabe von  $0,5 \text{ mM}$  Salicylsäure (SA) an die Wurzeln. Die Pflanzen wurden in Quarzsand kultiviert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).



## 6.2. Änderungen der Salicylsäuregehalte nach Zugabe von weiteren *N*-Acyl-L-homoserinlactonen

Insbesondere längerkettige *N*-Acyl-L-homoserinlactone können mit eukaryotischen Zellen (Macrophagen) interagieren und Entzündungsreaktionen auslösen (Smith et al., 2001). Daher wurden neben den beiden von *Serratia liquefaciens* MG1 produzierten AHL *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) auch AHL mit einer Seitenkettenlänge von acht (*N*-Octanoyl-L-homoserinlacton, OHL) bzw. zehn (*N*-Decanoyl-L-homoserinlacton, DHL) C-Atomen eingesetzt.

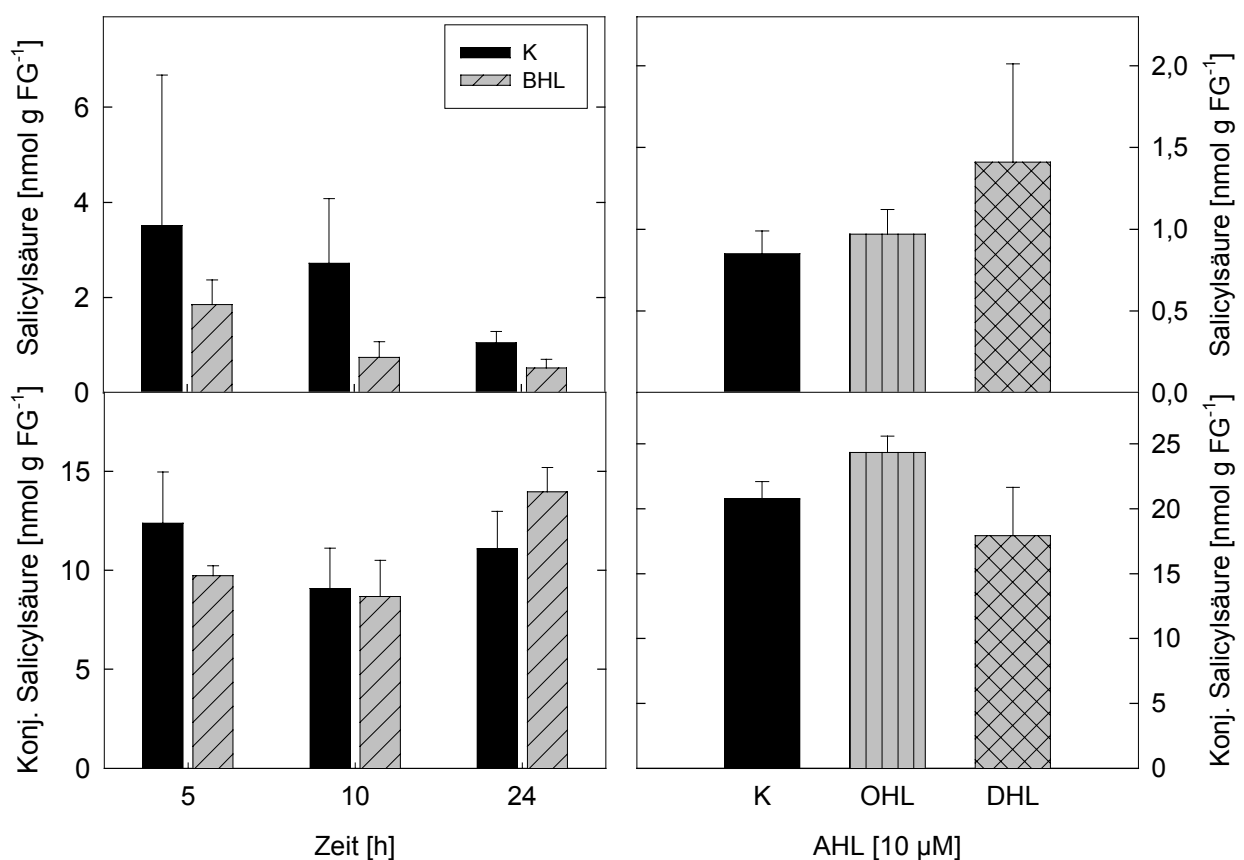


Abb. 47: Gehalte an freier (oben) und konjugierter (unten) Salicylsäure in Wurzeln nach Zugabe von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen mit unterschiedlicher Seitenkettenlänge (*N*-Butanoyl-L-homoserinlacton, BHL [links], *N*-Octanoyl-L-homoserinlacton, OHL und *N*-Decanoyl-L-homoserinlacton, DHL [rechts]) in einer Konzentration von 10  $\mu$ M an Wurzeln von Tomatenpflanzen, kultiviert in Sandkultur. Die Ernte der OHL und DHL-behandelten Wurzeln erfolgte fünf Stunden nach Applikation. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE, mit  $n = 3$ .

Behandelt man die Wurzeln von Tomatenpflanzen, die in Quarzsand kultiviert wurden, mit 10  $\mu$ M BHL, so lagen die Gehalte an freier Salicylsäure in den Kontrollpflanzen zu allen Zeitpunkten höher als in den mit BHL behandelten Pflanzen (Abb. 47). Die Gehalte an

konjugierter Salicylsäure in den behandelten Pflanzen unterschieden sich kaum von den Kontrollpflanzen.

Eine Applikation von längerkettigen AHL wie OHL und DHL führte nach fünf Stunden in den Wurzeln zu einem leichten Anstieg der Gehalte an freier Salicylsäure (Faktor 1,7) im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (Abb. 47). Im Gegensatz dazu waren die Gehalte an konjugierter Salicylsäure nach einer Behandlung mit OHL leicht erhöht und bei DHL etwas niedriger. Die Unterschiede waren aber nicht signifikant.

### **6.3. Einfluss von *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton auf den Gehalt an 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure**

Der Gehalt der unmittelbaren Vorstufe des Ethylens, 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC), blieb durch die Applikation von HHL weitgehend unbeeinflusst. Freies ACC war sowohl in den Blättern als auch in den Wurzeln entweder überhaupt nicht oder nur in äußerst geringen Mengen nachweisbar (Abb. 48, oben).

Nach der Applikation von 10  $\mu$ M HHL an die Wurzeln konnte ein signifikanter Anstieg von konjugiertem ACC in den Blättern über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet werden (Abb. 48, links unten). In Pflanzen, die mit 0,5 mM Salicylsäure behandelt wurden, nahm der Gehalt an konjugiertem ACC nach zehn Stunden ab und stieg im weiteren Verlauf um das 11fache wieder an. Auch bei den Kontrollpflanzen fiel der Gehalt nach zehn Stunden signifikant ab, um anschließend wieder auf den Ausgangswert anzusteigen.

In den Wurzeln waren ausschließlich ACC-Konjugate zu messen, signifikante Unterschiede zeigten sich nur bei den mit Salicylsäure behandelten Pflanzen, hier lag der Gehalt etwa um das Vierfache niedriger als noch fünf Stunden vorher (Abb. 48, rechts unten). Nach 24 Stunden erreichte der Gehalt an konjugiertem ACC wieder das Ausgangsniveau. Eine Zugabe von Salicylsäure kann die Ethylenbiosynthese hemmen (Dong, 1998).

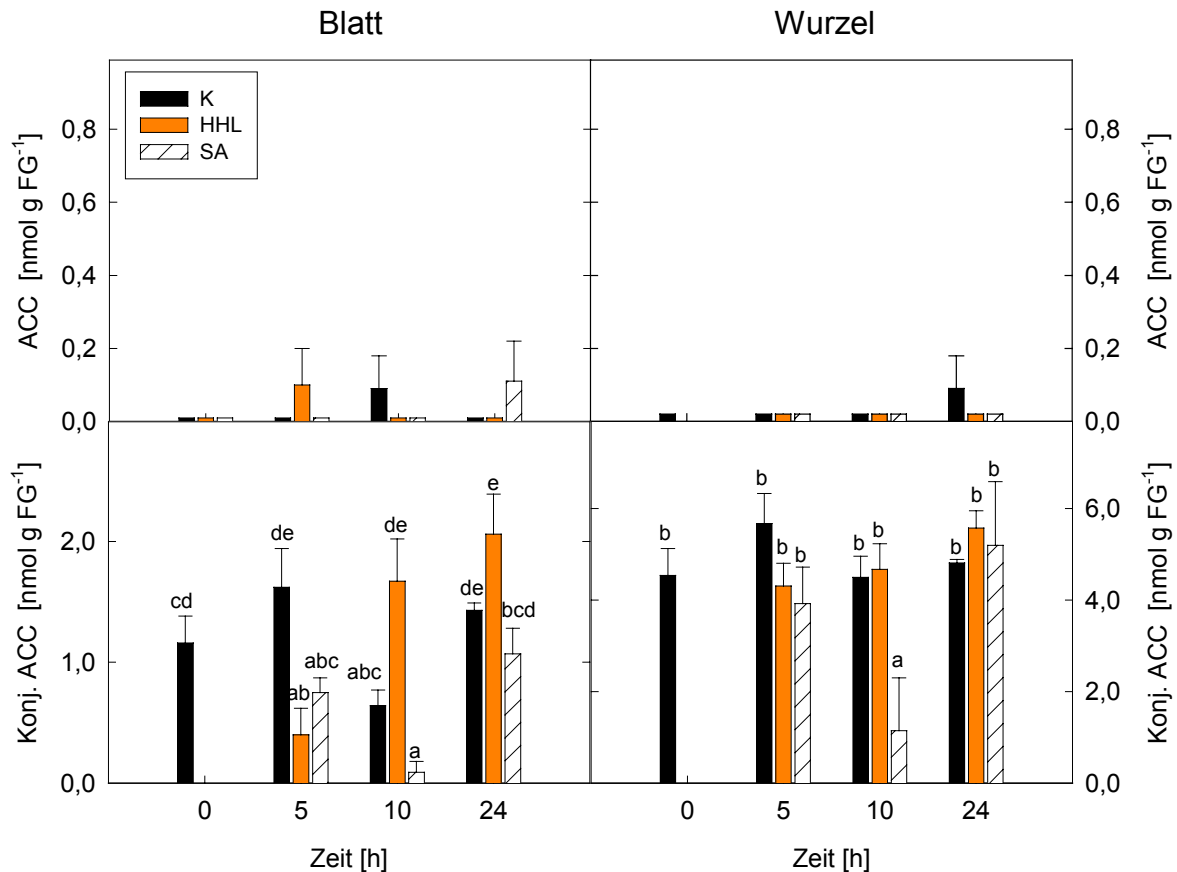


Abb. 48: Zeitverlauf der Gehalte an freier und konjugierter 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure nach Applikation von 10  $\mu$ M *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) in Blättern und Wurzeln. Die Tomatenpflanzen wurden in Quarzsand kultiviert. Gezeigt sind Mittelwerte  $\pm$  SE ( $n = 3$ ).

## 7. Untersuchungen zur Genexpression nach Inokulation mit *Serratia liquefaciens* und Applikation von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen

Mit Hilfe der Microarray-Technologie ist eine gleichzeitige Transkriptanalyse hunderter Gene möglich. Dabei werden spezifische Gensonden auf Membranen oder Glasobjektträgern immobilisiert und anschließend mit einer radioaktiv- oder fluoreszenzmarkierten cDNA hybridisiert (Donson et al., 2002; Van Hal et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde ein Screening der Genexpression mit Hilfe eines Makroarrays durchgeführt, der im Rahmen des EU-Projektes TOMSTRESS entwickelt wurde. Auf diesem Array sind 80 Sonden fixiert, die gegen Abwehrgene, Gene der Ethylenbiosynthese und –perzeption sowie der Signaltransduktion gerichtet sind. Auch Gene, die am Stoffwechsel, an der Entwicklung (Fruchtreife) oder des antioxidativen Systems beteiligt sind, wurden

aufgetragen, sowie einige ESTs, deren Funktion noch unbekannt ist. Jede Sonde wurde dreimal aufgetragen. Eine Liste der fixierten PCR-Produkte ist im Anhang 3 zu finden, eine schematische Darstellung der Auftragung in Material und Methoden, Abschnitt 14.8.1.

Vor der Hybridisierung mit der komplexen Sonde wurde die Qualität der Filter mit einer Referenzhybridisierung mit dem T7-Oligonukleotid überprüft (Thimm et al., 2001). Dabei zeigte sich, dass bei Filtern, die zu unterschiedlichen Zeiten hergestellt wurden, Schwankungen in der Menge des aufgetragenen PCR-Produktes auftreten können (vgl. Material und Methoden, Abschnitt 14.8.3). Innerhalb einer Herstellungscharge waren die Schwankungen allerdings vernachlässigbar, so dass eine Referenzhybridisierung nur berücksichtigt werden musste, wenn Filter unterschiedlicher Chargen miteinander verglichen werden sollten.

Ein weiteres wichtiges Kriterium für die Verlässlichkeit der Array-Technik ist die Normalisierung der einzelnen Filter, um die Daten vergleichen zu können. Häufig angewandte Strategien sind dabei die Normalisierung der Daten über die Gesamtheit der Spots oder die Verwendung von sogenannten „house-keeping“ Genen, die nicht durch die Experimente beeinflusst werden dürfen (Finkelstein et al., 2002). Die dafür verwendeten Gene haben meist essentielle metabolische Funktionen oder sind Bestandteile des Cytoskeletts wie z. B. Actin oder Tubulin. Das für diesen Macroarray zur Normalisierung vorgesehene Actin konnte nicht in allen Fällen verwendet werden, da es sich als veränderlich z. B. nach Pathogenbefall zeigte. Daher mussten die Filter über die Gesamtheit der Signale normalisiert werden, obwohl die Zahl der aufgetragenen Gensonden dafür zu klein ist. Diese Strategie wird sonst nur bei Arrays angewandt, die einen genomweiten Ansatz verfolgen, davon ausgehend, dass sich die Gesamtheit der Gene nicht ändert (Finkelstein et al., 2002). Vergleicht man beide Normalisierungsvarianten, so konnten keine wesentlichen Unterschiede nachgewiesen werden. Die Induktionsfaktoren bewegten sich in ähnlichen Größenordnungen (Material und Methoden, Tabelle 6).

### **7.1. Änderungen der Genexpression nach Infektion der Pflanzen mit *Alternaria alternata***

Auf eine Infektion mit nekrotisierenden Pathogenen reagieren Pflanzen mit einer Reihe von Abwehrreaktionen, u. a. der Expression von diversen Abwehrgenen (Van Loon, 1997). Daher wurden in dieser Arbeit zunächst Änderungen der Genexpression nach einer Infektion mit *Alternaria alternata* untersucht, da hier die deutlichsten Unterschiede zu erwarten waren.

Vor allem am ersten Tag, noch vor Ausprägung sichtbarer Blattschäden, bewirkte der Pilz starke Expressionsänderungen vorwiegend unter den PR (pathogenesis related)-Proteingenen und weiteren Abwehr-assoziierten Genen. Unterschiede in den Signalintensitäten waren auf den Filtern schon mit bloßem Auge zu erkennen (Abb. 49).

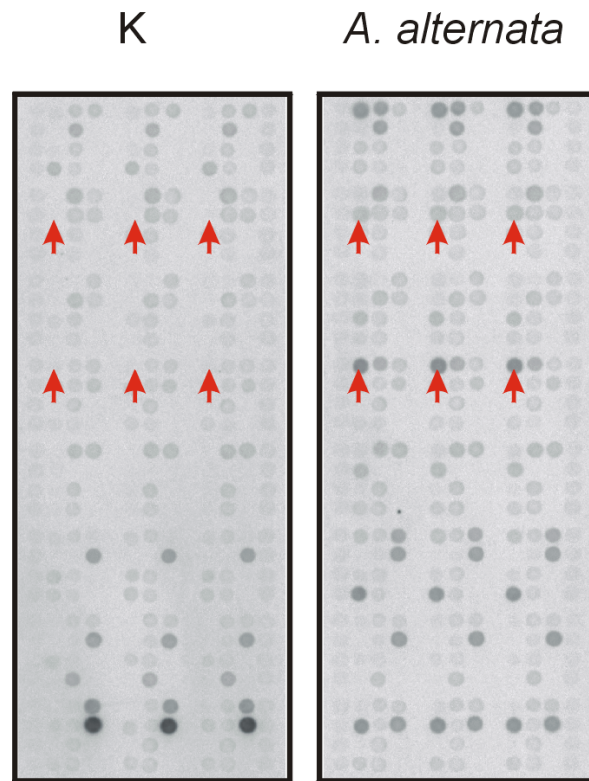


Abb. 49: Analyse der Expression von 80 Tomatengen in mittelalten Blättern mit Hilfe der Macroarray-Technik. Gezeigt werden Filter nach einer Hybridisierung mit  $^{33}\text{P}$ -markierter cDNA, wobei das verwendete Blattmaterial von Pflanzen nach 1-tägiger Infektion mit *A. alternata* stammt. Für die cDNA Synthese aus 4  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden je drei unabhängige Proben gemischt. Jede Gensonde ist dreimal aufgetragen, als Beispiele für induzierte Gene sind die Sonden für PR1a (P4) und das Thaumatin-ähnliche Protein P23 mit roten Pfeilen markiert (Position B2 bzw. D1). Eine Übersicht des Auftragsschemas befindet sich in Material und Methoden, Abschnitt 14.8.1, eine vollständige Liste der Gensonden und ihre Positionen auf dem Filter im Anhang.

22 der 80 untersuchten Gene wiesen Induktionsfaktoren über 2,5 auf, wobei 16 Gene mehr als 10fach und drei mehr als 100fach erhöht waren (Tabelle 12). Zu den am stärksten induzierten Genen zählten die Abwehrgene PR1a und b, 26kD extrazelluläre Chitinase, 30 kD intrazelluläre Chitinase, P23, PR10 und eine putative Lipoxygenase. Auch der Ethylenrezeptor Le-ETR1 und die ACC-Synthase Isoformen 4 und 5 waren mehr als 10fach erhöht. Bemerkenswert waren auch die erhöhten Transkriptmengen an Actin während der Pilzinfektion. In den Blättern waren nur wenige Gene durch eine Infektion mit *A. alternata*

reprimiert, wie z. B. das Gen für das Chlorophyll<sub>a/b</sub> bindende Protein, das um Faktor 10 verringert war.

Tabelle 12: Änderungen der Genexpression nach Infektion von Tomatenpflanzen mit *Alternaria alternata* in mittelalten Blättern. Angegeben sind Induktionsfaktoren, berechnet aus den Signalintensitäten der Behandlung zur Kontrolle. Orange markiert sind Gene mit einem Induktionsfaktor > 2,5, grün Gene < -2,5, n. n.: nicht nachweisbar. Gensonden für noch unveröffentlichte Gene wurden von P. Vera, Valencia, Spanien zur Verfügung gestellt.

Gen / Funktion	Accession / EST	Infektion mit <i>A. alternata</i>	
		1 d	2 d
<b>Abwehr</b>			
PR1a (P4), unbekannt	AJ011520.1	46,4	7,5
PR1b1 (P6), unbekannt	M69248	33,5	9,1
Qa, saure $\beta$ -1,3-Glucanase	X74905.1	6,2	n. n.
Qb, basische $\beta$ -1,3-Glucanase	X74906	10,7	1,9
26 kD saure extrazell. Chitinase	Z15141	28,0	n. n.
27 kD saure extrazell. Chitinase	Z15139	6,3	n. n.
30 kD basische intrazell. Chitinase	Z15140	55,7	9,8
P23, Thaumatin-ähnliches Protein	X70787	112,7	8,0
Proteinase-Inhibitor	X94946	38,2	7,0
CEVI-1, Ligninperoxidase	Y19023	14,2	1,9
PR-10, TSI-1 Protein	Y15846	88,9	n. n.
<b>Jasmonatbiosynthese</b>			
Lipoxygenase C	U37839	3,9	n. n.
LOX, Lipoxygenase (putativ)	P. Vera, unveröffentlicht	129,4	n. n.
<b>Ethylenbiosynthese und - perzeption</b>			
Le-ETR1	U38666	19,4	7,0
SAM-Synthetase 1	Z24741	0,6	n. n.
SAM-Synthetase 2	Z24742	n. n.	n. n.
SAM-Synthetase 3	Z24743	0,8	0,3
ACC-Synthase 1a	U74459	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 1b	U18057	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 2	X59139	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 3	L34171	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 4	X59146	10,2	4,3
ACC-Synthase 5	U18058	40,6	n. n.
ACC-Synthase 6	AB013100	n. n.	n. n.
<b>Antioxidatives System</b>			
APx20, Ascorbatperoxidase (putativ)	P. Vera, unveröffentlicht	2,9	0,7
<b>Signaltransduktion</b>			
SENU3, Cysteinproteinase	Z48736	4,8	0,7

Gen / Funktion	Accession / EST	Infektion mit <i>A. alternata</i>	
		1 d	2 d
MAP Kinase Kinase	AJ000728	3,6	n. n.
<b>Weitere Gene</b>			
Vacuoläre Invertase	Z12026	117,1	14,1
Actin-2	ATU37281	11,1	4,6
Actin-8	ATU42007	18,3	2,9
Chlorophyll a/b bindendes Protein	AW217861	0,1	0,1
ERT16, Stress-assoziiertes Protein	X72733	n. n.	0,3
SENU1, unbekannt	Z75523	1,1	0,3
SEND32, unbekannt	Z75519	0,1	0,1

## 7.2. Genexpressionsänderungen nach Behandlung der Pflanzen mit *Serratia liquefaciens*

Eine Induktion bekannter Abwehrgene in der Pflanze durch die Anwesenheit nicht-pathogener Rhizosphärebakterien konnte bisher nur in Ausnahmefällen gefunden werden. So wurde in *Arabidopsis thaliana* eine erhöhte Transkriptmenge an PR-1 gefunden, nachdem die Pflanzen mit dem Bakterium *Paenibacillus polymyxa* behandelt wurden (Timmusk & Wagner, 1999). In Studien der Gruppe um C. Pieterse wurden keine Änderungen der Genexpression durch *Pseudomonas fluorescens* WCS417r in Blättern und Wurzeln von *A. thaliana* detektiert (Van Wees et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die Genexpression von mittelalten Tomatenblättern untersucht, wobei die Pflanzen mit *Serratia liquefaciens* MG1 und der AHL-Nullmutante MG44 inokuliert wurden. Fünf und zehn Stunden nach Zugabe der Bakterien konnten keine Änderungen in der Genexpression bei Pflanzen, die mit *Serratia liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, festgestellt werden (Tabelle 13).





Gen / Funktion	Accession / EST	MG1		MG44		Anschließende Infektion mit <i>A. alternata</i>			
		5 h	10 h	5 h	10 h	MG1		MG44	
						1 d	2 d	1 d	2 d
ACC-Synthase 2	X58139	1,7	n. n.	0,4	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 3	L34171	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 4	X59146	1,0	0,9	2,6	1,1	1,9	0,7	3,6	0,9
ACC-Synthase 5	U18058	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	0,4	n. n.	0,9
ACC-Synthase 6	AB013100	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	7,2	n. n.
ACC-Oxidase 1	X58273	1,4	0,7	3,3	2,0	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Oxidase 2	Y00478	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Oxidase 3	Z54199	0,7	1,2	n. n.	2,2	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<b>Antioxidatives System</b>									
Ascorbatperoxidase	AI776158	1,2	1,3	1,5	1,5	n. n.	n. n.	3,6	n. n.
Glutathionperoxidase	AI782805	1,4	n. n.	2,1	0,8	n. n.	0,3	5,4	0,6
Catalase 1	AI782815	0,8	0,8	1,8	1,0	0,9	1,4	0,3	1,7
Mn Superoxiddismutase	AI774691	0,8	1,0	1,6	0,7	1,0	1,4	0,2	0,9
<b>Signaltransduktion</b>									
SENU3, Cysteinproteinase	Z48736	1,6	0,8	3,2	0,8	1,7	1,4	n. n.	1,0
SENU2, Cysteinproteinase	AJ003137	1,6	0,7	1,6	1,4	2,1	1,1	3,8	1,2
MAP Kinase Kinase Kinase	AJ005077	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	2,9	n. n.	1,5
<b>weitere Gene</b>									
Actin-2	ATU37281	1,1	1,1	3,1	1,2	1,2	0,6	2,6	0,8
Actin-8	ATU42007	n. n.	0,1	n. n.	0,2	0,1	1,0	n. n.	0,9
Pectinesterase	A24196	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	5,1	n. n.
Chlorophyll a/b bindendes Protein	AW217861	1,4	0,6	2,0	0,5	0,9	3,0	0,7	2,3
TOM75, Reife assoz. Membranprotein	X73847	1,4	1,0	2,6	1,8	1,0	0,9	1,1	0,8
ERT10, kurzkettige ADH	X72730	1,8	n. n.	1,9	n. n.	n. n.	n. n.	3,9	n. n.
ERT13, unbekannt	X72731	1,6	0,5	1,9	0,5	0,6	2,5	0,0	1,5

Gen / Funktion	Accession / EST	MG1		MG44		Anschließende Infektion mit <i>A. alternata</i>			
		5 h	10 h	5 h	10 h	MG1		MG44	
						1 d	2 d	1 d	2 d
ERT17, Ubiquitin konjugierendes Enzym SEND32, unbekannt	X73419	2,4	0,5	2,2	1,2	n. n.	0,9	3,4	1,0
	Z75519	0,8	0,5	2,6	1,1	0,9	3,8	1,3	2,3
INT22, dDTP-Glucose-4-6-Dehydratase (putativ)	D. Grierson, unveröffentlicht	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	60,4	0,8
INT23, Chaperonin (putativ)	D. Grierson, unveröffentlicht	n. n.	0,5	n. n.	0,8	n. n.	n. n.	3,6	n. n.
INT107, unbekannt	D. Grierson, unveröffentlicht	n. n.	0,1	n. n.	0,1	0,8	7,6	n. n.	3,6

Fünf Stunden nach Zugabe der AHL-Nullmutante *S. liquefaciens* MG44 waren die mRNA-Gehalte von zehn Genen erhöht, die Induktionsfaktoren lagen zwischen 2,5 und 3,3 (Tabelle 12). Es handelte sich dabei um Gene, die bei abiotischem Stress wie Verwundung (Proteinase-Inhibitor II) oder nach Pathogenbefall (Ligninperoxidase, CEVI-1 und Lipoxygenase B) eine Rolle spielen können (Fidantsef et al., 1999). Außerdem waren Gene erhöht, die an verschiedenen Schritten der Ethylensynthese beteiligt sind, je eine Isoform der *S*-Adenosylmethionin-Synthetase (SAM-Synthetase 3), der ACC-Synthase (ACS 4) und der ACC-Oxidase (ACO 1). Eine Cysteinproteinase (SENU3), die an der Signaltransduktion beteiligt ist, war 3,2fach induziert, ebenso Actin-2.

Reprimiert waren in diesem Experiment nur wenige Gene (Tabelle 12). Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert wurden, wiesen 10fach geringere Transkriptgehalte an mRNA der 30kD basischen intrazellulären Chitinase nach zehn Stunden auf als Kontrollpflanzen. Bei den anderen Untersuchungsvarianten lag dieses Gene unter dem Detektionslimit. Auch das Gen für Actin-8 war entweder gar nicht nachweisbar, oder nach Behandlung mit MG1 bzw. MG4410 bzw. 5fach reprimiert.

Während einer Infektion mit *Alternaria alternata* wurden zahlreiche Abwehrgene, insbesondere PR-Proteingene, aktiviert (Tabelle 12). Die Untersuchung des Einflusses des Rhizosphärebakteriums *S. liquefaciens* MG1 und der korrespondierenden AHL-Nullmutante auf die Genexpression von Tomatenblättern während einer Infektion mit *A. alternata*, ergab eine verstärkte Expression einiger Gene in Pflanzen, die vor der Infektion mit den Bakterien inokuliert wurden. Die Anwesenheit der AHL-Nullmutante MG44 scheint auch bei diesem Experiment wieder die stärkeren Effekte hervorzurufen (Tabelle 13). Während in mit MG1 behandelten Pflanzen nur sieben Gene verstärkt transkribiert werden, so sind es bei den mit MG44 inokulierten Pflanzen mit 16 Genen mehr als doppelt so viele. Erhöhte Transkriptmengen an Genen für basische Glucanase (Qb), Subtilisin-ähnliche Endoproteinase (P69) und für ein Protein, dessen Funktion noch unbekannt ist (INT107), konnten nach Behandlung sowohl mit dem Wildtyp-Stamm MG1 als auch mit der AHL-Nullmutante MG44 detektiert werden. Zusätzlich waren bei Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG44 inokuliert wurden, weitere Abwehrgene wie z. B. Lipoxygenase C oder Proteinase-Inhibitor II (PinII) induziert, aber auch Gene der Ethylenbiosynthese wie ACC-Synthase 4 und 6. Den höchsten Induktionsfaktor mit 60,4 erreichte ein Gen, das Homologien zu einer dDTP-Glucose-4,6-Dehydratase (INT22) aufwies.

### 7.3. Induktion von Abwehrgenen durch *N*-Acyl-L-homoserinlactone, Salicylsäure und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure

Nachdem Änderungen in der Genexpression durch *S. liquefaciens* gezeigt werden konnten, wurde untersucht, ob *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) selbst auch Auswirkungen auf die Expression von Abwehrgenen haben können. Um Einflüsse der natürlich vorkommenden Rhizosphärengemeinschaft auf die zugegebenen AHL weitgehend ausschließen zu können, wurden die Pflanzen unter keimreduzierten Bedingungen in sterilem Quarzsand kultiviert.

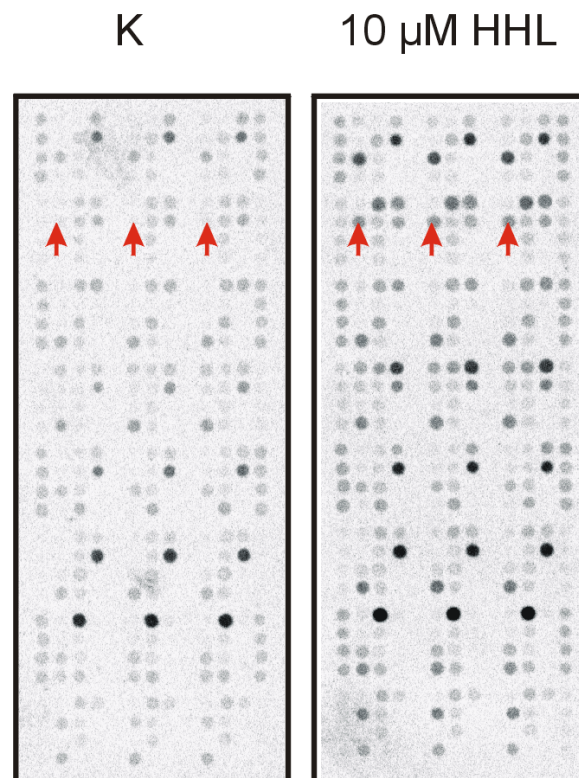


Abb. 50: Analyse der Expression von 80 Tomatengenen in mittelalten Blättern mit Hilfe der Macroarray-Technik. Für die Hybridisierung mit  $^{33}\text{P}$ -markierter cDNA wurde Blattmaterial verwendet, das von Pflanzen nach fünfständiger Behandlung mit  $10\ \mu\text{M}$  *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton stammt. Es wurden je drei unabhängige Proben gemischt und  $4\ \mu\text{g}$  Gesamt-RNA in die cDNA-Synthese eingesetzt. Jede Gensonde ist dreimal aufgetragen, mit roten Pfeilen ist die Sonde für PR1a (P4) markiert (Position B2). Eine Übersicht des Auftragschema befindet sich in Material und Methoden, Abschnitt 14.8.1, eine vollständige Liste der Gensonden und ihre Positionen auf dem Filter im Anhang 3.

Fünf und zehn Stunden nach Applikation der beiden von *S. liquefaciens* MG1 produzierten AHL, *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) in

einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurde aus den mittelalten Blättern die Genexpression mittels Macroarray-Analyse bestimmt. Eine Abbildung von Arrays nach der Hybridisierung mit cDNA-Sonden, hergestellt aus Blattmaterial fünf Stunden nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  HHL, ist in Abb. 50 gezeigt.

Eine Applikation von 10  $\mu\text{M}$  HHL an die Wurzeln führte zu einer Induktion von sechs der 80 Gene, u.a. wurden die wichtigen PR-Proteine PR1a (P4) und PR1b (P6) mehr als fünffach (9,6 und 6,4) induziert (HHL A in Tabelle 14). Es waren außerdem die mRNA-Gehalte eines Proteinase-Inhibitors (CEVI-57) sowie von P69, einer Subtilisin-ähnlichen Endoproteinase, erhöht. In unabhängigen Wiederholungen des Experimentes konnten ebenfalls Genexpressionsänderungen festgestellt werden (HHL B in Tabelle 14). PR1a wurde in diesem Versuch mit einem Faktor von 3 induziert. Zwei Chitinasegene, 26 kD saure extrazelluläre und 30 kD basische intrazelluläre Chitinase, waren mit einem Faktor 14,2 bzw. 11,8 am stärksten induziert. Außerdem waren die Transkriptmengen der Stoffwechselfene Actin-8 und einer vakuolären Invertase erhöht, sowie das Gen für eine Cysteinproteinase (SENU3), welche an der Signaltransduktion beteiligt ist. Diese sehr schnellen Änderungen nach fünf Stunden konnten bereits nach zehn Stunden nicht mehr nachgewiesen werden.

Eine systemische Induktion verschiedener PR-Proteingene in den Blättern konnte auch nach Behandlung mit BHL beobachtet werden. BHL ist ebenfalls in der Lage, Gene für die beiden PR1-Proteine PR1a (P4) und PR1b (P6) sowie für 26 kD Chitinase zu induzieren. Letztere war mit einem Faktor von 17,8 am stärksten erhöht (Tabelle 14).

Um diese Genänderungen besser einschätzen zu können, wurden Pflanzen auch mit Salicylsäure und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) behandelt. Von beiden Signalstoffen ist bekannt, dass spezifische Gene induziert werden, z. B. hängt die Transkription von PR1a von Salicylsäure ab (Durner et al., 1997). Salicylsäure wurde zum einen an Wurzeln von Pflanzen, kultiviert in Quarzsand, in einer Konzentration von 0,5 mM zugegeben, zum anderen wurden in Erde kultivierte Pflanzen am Sprossansatz abgeschnitten und in eine 5 mM Lösung gestellt. Das gleiche Verfahren wurde auch für die Behandlung mit 0,1 mM ACC verwendet.



Gen / Funktion	Accession / EST	Applikation von <i>N</i> -Acyl-L-homoserinlactonen und Signalstoffen										
		HHL A <sup>1</sup>	HHL B <sup>1</sup>	HHL A <sup>1</sup>	BHL <sup>1</sup>	SA A <sup>1</sup>	SA B <sup>1</sup>	SA <sup>2</sup>		ACC <sup>2</sup>		
		5 h	5 h	10 h	5 h	5 h	5 h	5 h	10 h	5 h	10 h	
ACC-Synthase 3	L34171	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 4	X59146	0,8	0,7	1,0	0,7	1,1	0,7	1,3	0,8	2,3	0,7	
ACC-Synthase 5	U18058	1,1	n. n.	n. n.	n. n.	1,1	n. n.	<b>3,5</b>	1,3	<b>4,3</b>	n. n.	
ACC-Synthase 6	AB013100	0,8	n. n.	n. n.	n. n.	1,5	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
<b>Antioxidatives System</b>												
Glutathionperoxidase (GPX)	AI782805	1,4	1,2	0,7	0,6	1,8	<b>3,6</b>	<b>42,6</b>	<b>4,2</b>	2,0	1,2	
APx20, Ascorbatoxidase (putativ)	P. Vera, unveröffentlicht	0,8	<b>2,8</b>	0,9	1,6	1,2	<b>3,3</b>	1,6	1,8	1,6	0,5	
<b>Signaltransduktion</b>												
Psenu3, Cysteinproteinase	Z48736	<b>2,7</b>	1,2	1,0	1,5	1,0	1,0	0,7	0,6	2,2	0,9	
<b>weitere Gene</b>												
Vacuoläre Invertase	Z12026	n. n.	<b>8,2</b>	1,7	0,8	n. n.	<b>15,1</b>	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	
Actin-2	ATU37281	n. n.	1,1	1,7	0,6	n. n.	1,2	1,4	0,9	<b>2,7</b>	1,1	
Actin-8	ATU42007	n. n.	<b>3,0</b>	n. n.	1,3	n. n.	n. n.	n. n.	<b>2,7</b>	n. n.	n. n.	
ERT16, Stress-assoziiertes Protein	X72733	0,8	<b>0,2</b>	1,2	0,6	1,4	0,6	0,8	n. n.	1,3	1,3	
SENU1, unbekannt	Z75523	<b>0,3</b>	0,8	1,4	1,1	<b>0,3</b>	1,3	0,6	<b>0,3</b>	1,5	0,5	

<sup>1</sup>Anzucht der Pflanzen in sterilem Quarzsand

<sup>2</sup>Anzucht der Pflanzen in Erde. Für die Behandlung mit den Signalstoffen wurden die Pflanzen am Sprossansatz abgeschnitten und in eine 5 mM Salicylsäure- bzw. eine 0,1 mM 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäurelösung gestellt.

Pflanzen, die in Quarzsand kultiviert wurden, zeigten fünf Stunden nach Zugabe der Salicylsäure erhöhte Transkriptgehalte an PR1a, der 26kD und 30kD Chitinase sowie Glutathionperoxidase und einer putativen Ascorbatperoxidase (Tabelle 14). Zudem war die Transkriptmenge einer vakuolären Invertase deutlich erhöht. Pflanzen, die in Salicylsäurelösung gestellt wurden, hatten ein vergleichbares Induktionsmuster, die Induktionsfaktoren waren aber deutlich höher, bei einigen Genen z. T. > 50. Wie zu erwarten, führte eine Behandlung mit ACC zu einem unterschiedlichen Spektrum an veränderten Genen. Gene, die durch Salicylsäure induziert wurden, konnten nach einer Behandlung mit ACC entweder überhaupt nicht oder nur in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen werden (PR1a und b), während andere Gene nur durch ACC induziert wurden (P23, PinII, die Ligninperoxidase CEVI-1). Gene der Ethylenperzeption und -biosynthese wurden durch beide Substanzen erhöht (Le-ETR1, ACC-Synthase 5).

## 8. Northern-Blot Analysen induzierter Abwehrgene

Die Macroarray-Analysen dienten einem ersten Screening der Genexpression. Ausgewählte Gene wurden anschließend über Northern-Blot Analysen näher untersucht. Die Gensonden für PR-Proteine wurden dazu freundlicherweise von Dr. G. Vogt zur Verfügung gestellt.

Über den Macroarray konnten v. a. nach einer Infektion mit *Alternaria alternata* starke Änderungen in der Genexpression in den mittelalten Blättern festgestellt werden (Abb. 51). Die höchsten Induktionsfaktoren wurden dabei am ersten Tag der Infektion beobachtet, noch bevor sichtbare Schäden auf den Blättern zu sehen waren. Am vierten Tag erreichten die mRNA-Gehalte der untersuchten PR-Proteine auch bei den Kontrollen das Niveau der infizierten Pflanzen. Besonders stark induziert (Faktor > 100, bzw. nur in den infizierten Pflanzen nachweisbar, so dass kein Induktionsfaktor berechnet werden konnte) waren die Gene für die beiden PR1-Proteine PR1a (P4) und PR1b1 (P6), sowie der basischen intrazellulären 30 kD Chitinase. Ubiquitin, das oft als „house-keeping“ Gen zur Überprüfung der gleichmäßigen Beladung der Membran herangezogen wird, zeigte in allen Proben eine relativ gleichmäßige Expression.



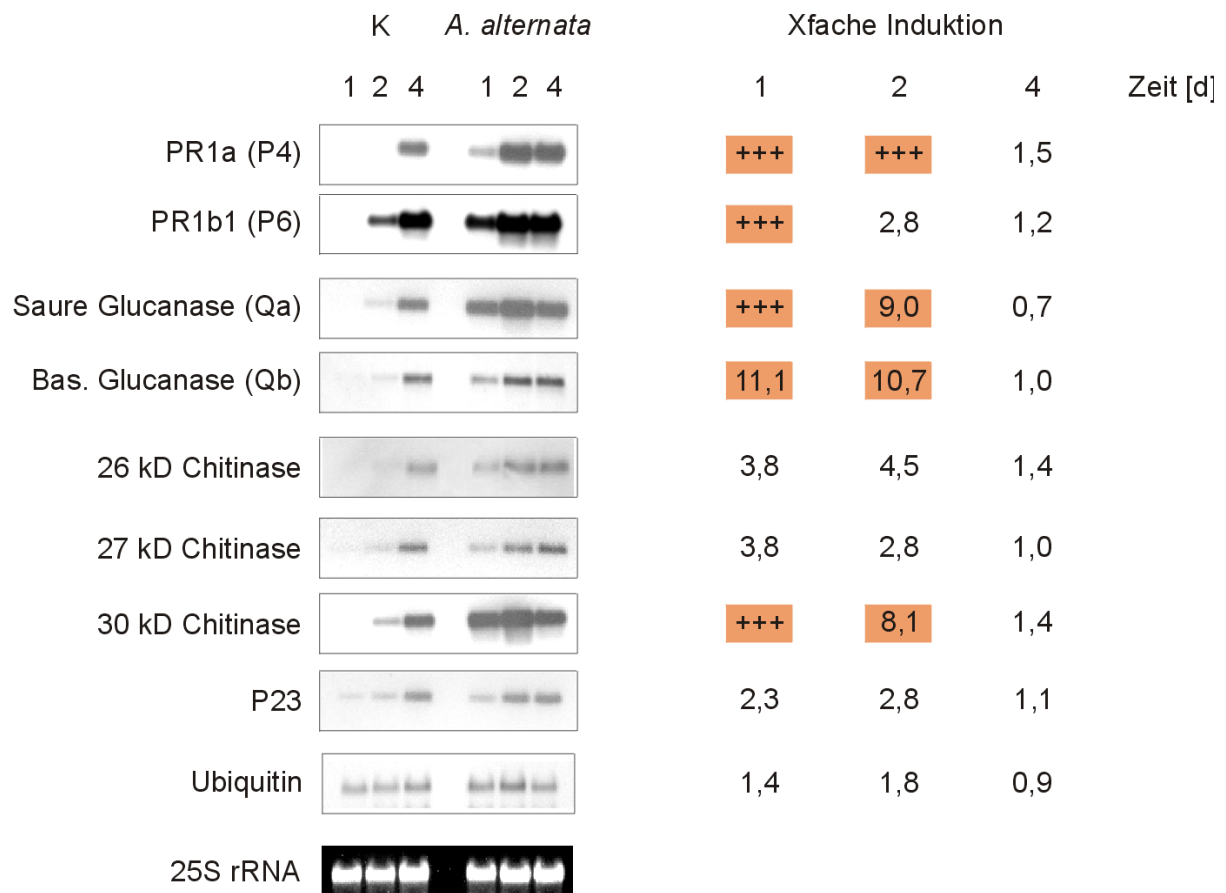


Abb. 51: Northern-Blot-Analysen induzierter PR-Proteine nach einer Infektion von Tomatenpflanzen mit *Alternaria alternata*. Für jeden Zeitpunkt wurde das Blattmaterial von drei Pflanzen gemischt und 5 µg Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran geblottet. Die Hybridisierung erfolgte mit spezifischen DIG-markierten Sonden, die von Dr. G. Vogg zur Verfügung gestellt wurden. Als Nachweis eines gleichmäßigen Probenauftrags wird die 25S rRNA gezeigt, außerdem wurde Ubiquitin als „house-keeping“ Gen zum Überprüfen eines gleichmäßigen Transfers auf die Membran herangezogen. Die Bandenintensitäten der infizierten Proben in Relation zu Kontrollproben ergab den relativen Induktionsfaktor. War in Kontrollproben die Transkriptmenge 0 und konnte daher kein Induktionsfaktor berechnet werden, wurde eine starke Induktion mit +++ veranschaulicht.

Pflanzen, die mit *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton an den Wurzeln behandelt wurden, wiesen bei dem PR-Protein PR1a (P4) in zwei unabhängigen Experimenten erhöhte Transkriptmengen in den Blättern auf. In Northern-Blot Analysen wurde dieses Gen daher genauer untersucht (Abb. 52). Da Pflanzen, die in Quarzsand kultiviert wurden, weniger Biomasse bildeten und damit das Probenmaterial limitiert war, wurde bei den mit Salicylsäure behandelten Proben weniger Gesamt-RNA aufgetragen. Die geringeren Auftragsmengen

wurden über die Bandenintensität der 25S rRNA mit in die Berechnung der relativen Induktionsfaktoren einbezogen. Dennoch war das Gen für PR1a (P4) in den mit HHL-behandelten Pflanzen nach fünf Stunden 9,4fach höher induziert als in den Kontrollen. Die Transkriptmengen nahmen dann im weiteren Zeitverlauf wieder ab. Durch Salicylsäure wurde PR1a erst nach 24 Stunden induziert (Faktor 4,8). Auch die Expression der 30 kD basischen Chitinase war nach HHL-Applikation viermal höher als in den Kontrollen.

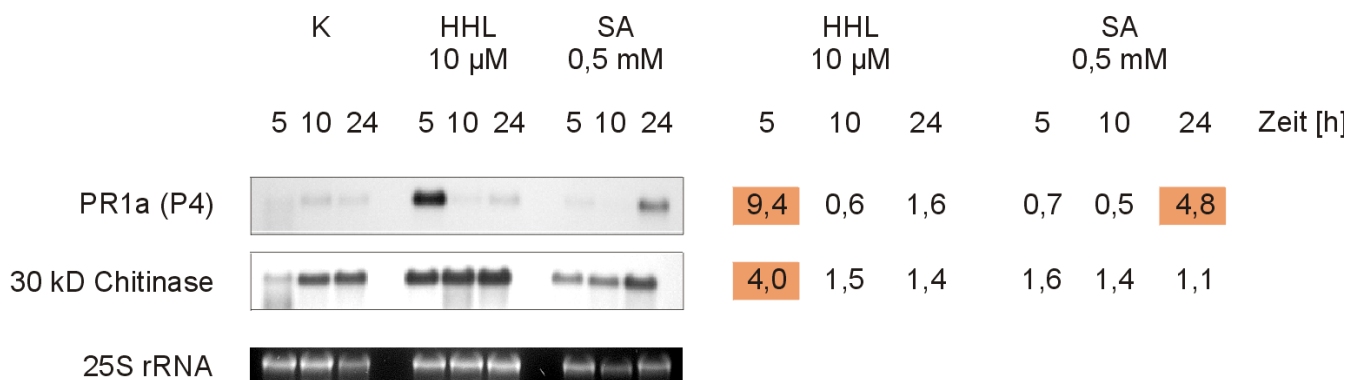


Abb. 52: Zeitverlauf der Expression der PR-Proteine PR1a (P4) und basischen 30 kD Chitinase nach Applikation von 10  $\mu$ M *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und 0,5 mM Salicylsäure (SA) in mittelalten Blättern. Tomatenpflanzen wurden in Quarzsand angezogen, für die Northern-Blot Analyse mit DIG-markierten Sonden wurde Blattmaterial von drei Proben gemischt. Die 25S rRNA wurde zur Überprüfung des gleichmäßigen Probenauftrages verwendet, evtl. Unterschiede in der Auftragsmenge wurden bei der Berechnung der Induktionsfaktoren berücksichtigt.

Auch das zweite von *Serratia liquefaciens* MG1 produzierte *N*-Acyl-L-homoserinlacton, *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) beeinflusste die Genexpression von PR1a (P4) in mittelalten Blättern. Im Northern-Blot war die Transkriptmenge nach fünf Stunden viermal höher in BHL-behandelten Pflanzen als in den Kontrollproben (Abb. 53). Nach zehn und 24 Stunden sanken die mRNA-Gehalte dieses Gens wieder auf die Werte der Kontrollpflanzen ab.

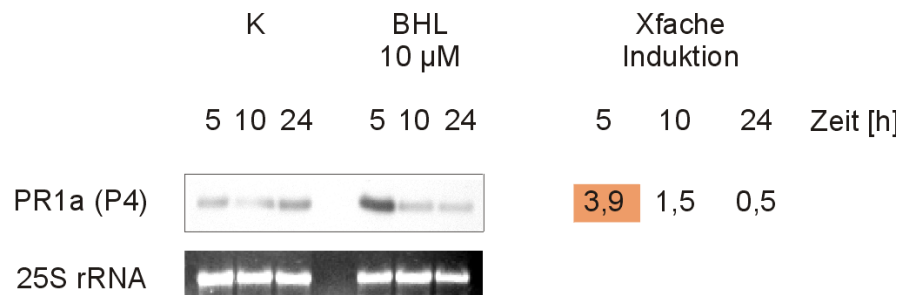


Abb. 53: Zeitverlauf der Genexpression des PR-Proteins PR1a (P4) in mittelalten Blättern nach Applikation von 10  $\mu$ M *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) an die Wurzeln von Tomatenpflanzen. Der gleichmäßige Auftrag von 5  $\mu$ g Gesamt-RNA ist anhand der mit Ethidiumbromid gefärbten Bande der 25S rRNA gezeigt. Die Northern-Hybridisierung wurde mit einer DIG-markierten Sonde durchgeführt. Die Induktionsfaktoren berechnen sich aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten der behandelten Proben zu den Kontrollen.

Des Weiteren wurde die Genexpression ausgewählter PR-Proteine in Pflanzen untersucht, die mit den Signalstoffen Salicylsäure und 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) behandelt wurden. Am Sprossansatz abgeschnittene Pflanzen wurden dazu in 5 mM Salicylsäure- bzw. 0,1 mM ACC-Lösung gestellt. Die mittelalten Blätter wurden nach fünf und zehn Stunden geerntet.

Die stärkste Induktion zeigte PR1a nach zehnstündiger Behandlung mit Salicylsäure (Induktionsfaktor 66). Aber auch schon nach fünf Stunden war dieses Gen durch Salicylsäure und ACC 5-6fach erhöht. 30 kD Chitinase reagierte auf die Behandlung mit beiden Signalstoffen. Nachdem in den mit Salicylsäure behandelten Pflanzen erst nach zehn Stunden ein 6,5facher Anstieg der Expression zu beobachten war, begann die Induktion durch ACC bereits nach fünf Stunden und erreichte nach zehn Stunden einen Induktionsfaktor von 7,8.

Die Genexpression für das Thaumatin-ähnliche Protein P23 wurde nur durch Salicylsäure leicht induziert (Faktor 3), während der Proteinase-Inhibitor II (PINII) reprimiert wurde. Ubiquitin als Kontrollgen blieb in seiner Expression relativ konstant in diesem Versuch.

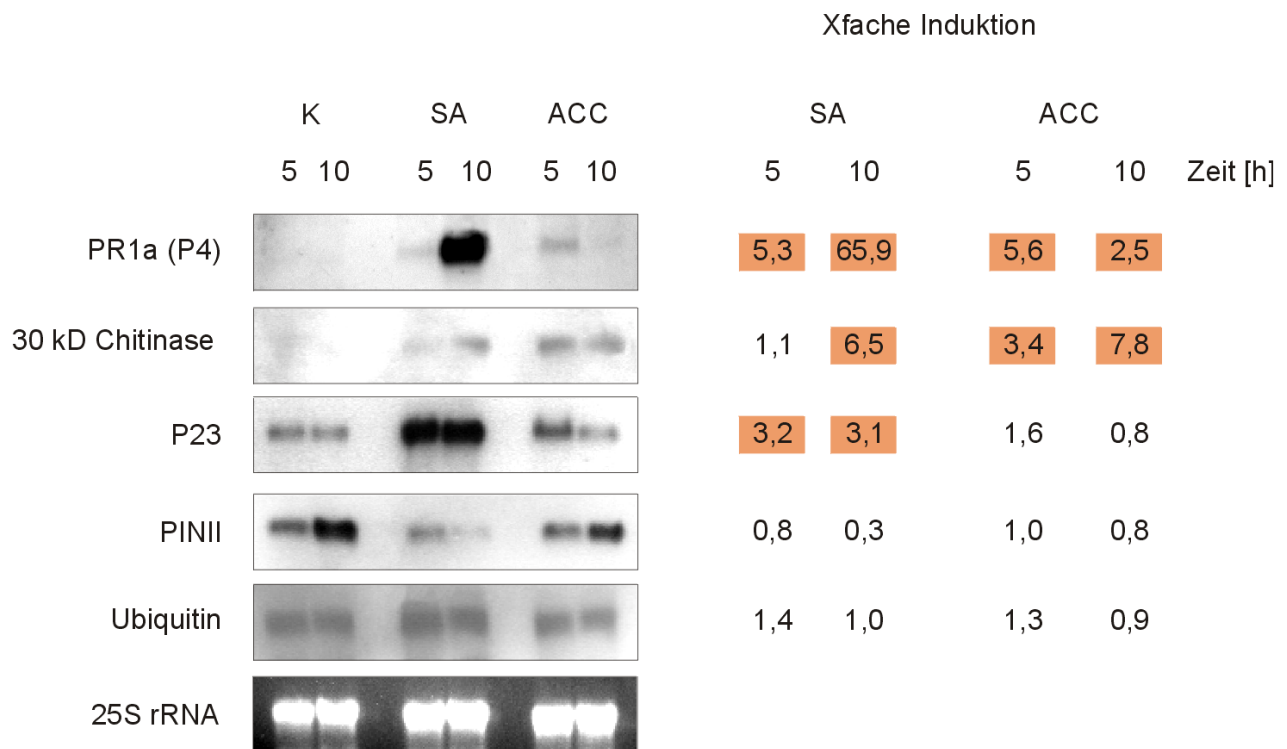


Abb. 54: Einfluss des Signalstoffes Salicylsäure und der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) auf die Transkriptmenge verschiedener PR-Proteine in mittelalten Blättern. Fünf Wochen alte Tomatenpflanzen wurden am Sprossansatz abgeschnitten und in Lösungen mit 5 mM Salicylsäure sowie 0,1 mM ACC gestellt. Die Northern-Hybridisierungen wurden mit DIG-markierten Sonden durchgeführt, eine gleichmäßige Beladung des Gels wurde über die 25S rRNA kontrolliert. Als Induktionsfaktor wurde der Quotient aus den Bandenintensitäten der behandelten Proben und der Kontrollen angegeben.

## IV. Diskussion

### 1. Biocontrol-Aktivität von *N*-Acyl-L-homoserinlacton-produzierenden Rhizosphärebakterien

Die Anwesenheit bestimmter Mikroorganismen an Pflanzenwurzeln kann die pflanzliche Krankheitsresistenz steigern und so den Ertrag von Nutzpflanzen erhöhen. Diese Art der Biocontrol-Aktivität, d. h. die Reduktion von Krankheitserregern mit Hilfe natürlich im Boden vorkommender Mikroorganismen fand in den letzten Jahren große Beachtung als Alternative zu chemischen Pflanzenschutzmitteln (Whipps, 2001; Zehnder et al., 2001). Zugrunde liegende Wirkmechanismen sind zum einen direkte Interaktionen der Rhizosphärebakterien mit den pathogenen Mikroorganismen wie die Produktion von Antibiotika oder die Konkurrenz um Nährstoffe und zum anderen die Stimulierung pflanzlicher Abwehrreaktionen, die zu einer erhöhten Krankheitsresistenz führt (vgl. Einleitung, Tabelle 1; Van Loon et al., 1998; Whipps, 2001).

Viele der gram-negativen Rhizosphärebakterien produzieren *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL) zur Zelldichte-abhängigen Regulation von z. B. Antibiotika, Virulenzfaktoren oder Exoenzymen (Pierson III et al., 1998; Whitehead et al., 2001). Eine wichtige Rolle spielt die Produktion von AHL in dem Biocontrol-Stamm *Pseudomonas aureofaciens* 30-84, dessen Synthese von Phenazinantibiotika mit Hilfe dieser Substanzen reguliert wird (vgl. Einleitung, Abschnitt 2.2). Zudem ist bekannt, dass AHL-produzierende Bakterien mit Eukaryoten interagieren können. So wurde in einer Studie von Teplitski et al. (2000) gezeigt, dass höhere Pflanzen wie Erbse oder Tomate noch nicht charakterisierte Substanzen produzieren, die mit AHL-abhängigen Regulationssystemen interagieren. Es gab zudem bisher keine Daten darüber, inwieweit die Fähigkeit zur AHL-Produktion in Rhizosphärebakterien die Stimulation von Abwehrmechanismen in Pflanzen beeinflusst.

Viele der „Quorum Sensing“-regulierten Phänotypen sind mit der Pathogenität von Krankheitserregern in Mensch und Pflanze verbunden. Daher wäre es wünschenswert, direkt in AHL-vermittelte Regulationssysteme eingreifen zu können. Ein erster Schritt dazu wurde mit der Produktion von AHL durch transgene Pflanzen getan. Tabakpflanzen, die ein AHL-Synthasegen (*yenI* aus *Yersinia enterocolitica*) besitzen, produzieren so hohe Mengen an HHL und OHHL, dass die Phenazinsynthese in einem HHL-defizienten *P. aureofaciens* Stamm wieder möglich war (Fray et al., 1999). Zudem konnte die Pathogenität eines *E. carotovora*-Stammes wiederhergestellt werden, der durch eine Mutation im OHHL-

Synthasegen keine Antibiotika mehr synthetisieren konnte. Diese Studie war ein erstes Beispiel, wie modifizierte Pflanzen mit Biocontrol-Bakterien oder Krankheitserregern kommunizieren können.

In dieser Arbeit wurden Stämme der Gattungen *Serratia* und *Pseudomonas* verwendet, da Vertreter dieser Gattungen in einer Vielzahl von Studien ihre Biocontrol-Eigenschaften bereits unter Beweis gestellt haben. Van Loon et al. (1998) stellten 1998 eine Liste von *Pseudomonas* spp. und *Serratia* spp. zusammen, die in verschiedenen Pflanzenarten (Bohne, Nelke, Gurke, Rettich, Tabak oder Tomate) systemische Resistenz induzieren konnten. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich, dass eine Vorbehandlung von Tomatenpflanzen mit den Rhizosphärebakterien *Serratia liquefaciens* MG1 und *P. putida* IsoF nekrotische Blattschäden bei einer anschließenden Infektion mit *A. alternata* um bis zu 70 % reduzieren konnte (vgl. Ergebnisse, Abb. 30, 35). Die Bakterien bewirkten also eine Stimulierung der pflanzlichen Krankheitsresistenz.

### **1.1. Rolle von N-Acyl-L-homoserinlactonen bei der Biocontrol-Aktivität von *Serratia liquefaciens* MG1**

Nach den Ergebnissen dieser Arbeit ist bei dem ubiquitär vorkommenden Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1, die Fähigkeit zur Synthese von AHL an der Erhöhung der Krankheitsresistenz von Tomatenpflanzen gegen *Alternaria alternata* beteiligt. Tomatenpflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 inokuliert und anschließend mit dem sprosspathogenen Pilz *A. alternata* infiziert wurden, wiesen 70 % weniger nekrotische Blattschäden auf als Kontrollpflanzen. Pflanzen, die mit dem AHL-negativen Stamm MG44 vorbehandelt waren, zeigten eine Reduktion der Schäden um nur 20 % (vgl. Ergebnisse, Abb. 30).

Die Produktion von N-Acyl-L-homoserinlactonen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen konnte im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden (vgl. Ergebnisse, Abb. 18). Ein in die Tomatenrhizosphäre eingebrachter AHL-Monitorstamm reagierte mit der Expression seines Reportergens (Steidle et al., 2001). Er sprach damit auf AHL-Moleküle an, die von der natürlich vorkommenden Bakterienpopulation in so hoher Menge in die Umgebung abgegeben wurden, dass das Reportergen exprimiert wurde. Da unter pflanzenassoziierten Bakterien die Produktion von AHL viel weiter verbreitet ist als bei Isolaten aus dem Boden (Elasri et al., 2001), kann man annehmen, dass gerade auf der Oberfläche der Wurzeln, dem Lebensraum dieser Mikroorganismen, die AHL-

Konzentrationen so hoch sein können, dass die Pflanzenwurzeln diese wahrnehmen und in der Pflanze Reaktionen auslösen können.

Das von Rhizosphärebakterien gebildete Spektrum an AHL-Molekülen umfasst sowohl kurzkettige wie auch langkettige AHL-Moleküle (Eberl, 1999). So produziert der Biocontrol-Stamm *P. aureofaciens* 30-84 wie *S. liquefaciens* MG1 und das pflanzenpathogene Bakterium *Ralstonia solanacearum* HHL (Eberl, 1999; Wood et al., 1997). Andere Pathogene, wie z. B. *Erwinia carotovora* oder *E. chrysanthemi* verwenden 3-Oxo-substituiertes HHL, das *N*-(3-Oxohexanoyl)-homoserinlacton (OHHL). Langkettige AHL-Moleküle findet man bei *Agrobacterium tumefaciens* oder bei *Rhizobium* spp., wobei letztere bis zu sieben verschiedene AHL-Moleküle bilden können (Eberl, 1999). Der ebenfalls in dieser Arbeit verwendete Stamm *P. putida* IsoF, ein Isolat aus der Tomatenrhizosphäre, produziert ein breites Spektrum an AHL-Molekülen, neben kurzkettigen mit sechs C-Atomen, etwa *N*-(3-Oxohexanoyl)-L-homoserinlacton (OHHL), auch langkettige mit acht bis zwölf C-Atomen, etwa *N*-(3-Oxo-octanoyl)-L-homoserinlacton (OOHL), *N*-(3-Oxodecanoyl)-L-homoserinlacton (ODHL) und *N*-(3-Oxododecanoyl)-L-homoserinlacton (ODDHL, Steidle et al., 2001). Das häufige Auftreten von AHL-produzierenden Bakterien in der Rhizosphäre könnte auf eine weitaus größere Bedeutung der AHL-Moleküle hinweisen als bisher angenommen wurde.

Ein Unterschied in der Kolonisierungsdichte an den Wurzeln zwischen dem Wildtyp-Stamm und der AHL-negativen Mutante konnte in den Experimenten nicht festgestellt werden. Beide Stämme erreichten an den Wurzeln Lebendkeimzahlen in der gleichen Größenordnung unabhängig von ihrer Fähigkeit, AHL zu produzieren (Tabelle 8). Eine niedrigere Zelldichte als Grund für die fehlende Biocontrol-Aktivität der AHL-negativen Mutante MG44 kann daher ausgeschlossen werden.

## **1.2. Einfluss der durch *N*-Acyl-L-homoserinlacton-produzierenden Rhizosphärebakterien vermittelten systemischen Resistenz auf das pilzliche Wachstum**

Die Bonitur von Blattschäden liefert zwar Aussagen über die Empfindlichkeit der Pflanzen gegenüber Pathogenen, Rückschlüsse auf das Wachstum der Pilze können aber nicht gezogen werden. Möglicherweise genügen bei manchen Pilzarten schon wenige Hyphen, um starke Schäden zu verursachen, während bei anderen Pilzarten mehr Hyphen nötig sind. Zudem ist es wünschenswert, pilzliche Pathogene in Kulturpflanzen bereits vor dem Auftreten von Schadsymptomen spezifisch nachweisen zu können. Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit

war damit die Entwicklung spezifischer PCR-Testsysteme für die in Infektionsexperimenten eingesetzten Tomatenpathogene, die einen schnellen und sicheren quantitativen Nachweis der Pathogene in der Wirtspflanze ermöglichen sollen.

Der Nachweis des pilzlichen Wachstums kann entweder durch immunologische oder molekularbiologische Verfahren erfolgen (Bahnweg et al., 2000; Mitchell, 1988). Gerade der Einsatz molekularer Marker auf der Grundlage der Polymerasekettenreaktion (PCR) für diagnostische Testverfahren ist im vergangenen Jahrzehnt ausgesprochen beliebt geworden (Miller, 1996; Schots et al., 1994). Unter Verwendung geeigneter Primer und optimaler PCR-Bedingungen ist die PCR äußerst empfindlich, schnell und verhältnismäßig leicht zu handhaben. Viele der PCR-Nachweise für Pathogene nutzen Sequenz-Polymorphismen innerhalb der transkribierten Spacerregionen (ITS) der kernkodierten ribosomalen RNA-Gene (rDNA). Andere greifen auf mitochondriale oder nucleare Sequenzen zurück (Doss & Welty, 1995; Minsavage et al., 1994; Schesser et al., 1991). Die Sequenzierung von polymorphen PCR-DNA Fragmenten (RAPD, random amplified polymorphic DNA), die mit Zufallsprimern amplifiziert wurden, führt zu Sequenz-charakterisierten Regionen (SCAR), die erfolgreich zur Primerentwicklung herangezogen werden können. Diese Strategie wurde erstmals von Paran & Michelmore (1993) im Zusammenhang mit Mehлтаubefall bzw. –resistenz von Salat, später dann für eine Vielzahl weiterer Pilze wie z. B. *Poryphyromonas gingivalis* (Ménard et al., 1994), *Peronospora tabacina* (Wiglesworth et al., 1994), *Phytophthora infestans* (Niepold & Schöber-Butin, 1995), *Sirococcus conigenus* (Bahnweg et al., 2000) und *Fusarium culmorum* sowie *F. graminearum* (Schilling et al., 1996) eingesetzt.

Der erste Schritt zur Entwicklung eines spezifischen PCR-Testes war die Wahl einer geeigneten DNA-Sequenz bzw. eines pathogen-typischen RAPD-DNA Fragmentes. Favorisiert wurden zunächst DNA-Sequenzen der ITS1 und ITS2 Regionen der rDNA (s.o.). Diese liegen im Pilzgenom in mehrhundertfachen Kopien vor, so dass die Sensitivität des PCR-Nachweises gegenüber solchen Sequenzen, die nur in wenigen Kopien vorliegen, erheblich gesteigert werden kann (Schulze et al., 1997). Nur dort, wo dieses Vorgehen nicht erfolgreich war, wurde auf SCAR-Sequenzen zurückgegriffen (z.B. bei *Botrytis cinerea*). Wichtigstes Kriterium bei der Entwicklung spezifischer Primer ist die Spezifität für nur eine Zielsequenz, wobei es je nach Fragestellung um eine Spezifität auf der Art- oder Rassenebene, ggf. aber auch auf höheren taxonomischen Ebenen gehen kann. Im vorliegenden Fall wurde die Spezifität aller ausgewählten Primer(paare) durch Kreuzamplifikation einer Sammlung von über 80 DNAs verschiedener tomatenpathogener



Pilzstämme getestet (vgl. Anhang 2.2). Alle in diesen Spezifitätstesten eingesetzten DNAs wurden aus Organismen isoliert, die für die Tomate pathogen sein können (Blancard, 1997). So kann bei einem positiven PCR-Signal, auch von Freiland- oder Gewächshaustomaten, durch die eingesetzten Primer auf ein bestimmtes Pathogen geschlossen werden. In den gezielten Inokulationsexperimenten dagegen reichte es aus, das eingesetzte Pathogen von seinem Wirt, der Tomate, unterscheiden zu können.

Die kleinste Menge an pilzlicher DNA, die ausreicht, um ein Amplikon zu bilden, welches auf einem konventionellen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbar gemacht werden kann, war ca. 1 pg. Diese Menge entspricht etwa 10 pilzlichen Genomäquivalenten, wenn die Genomgrößen, die durch Pulsfeld-Elektrophorese ermittelt wurden (Xu et al., 1995), und die DNA-Konzentrationen, die hier durch Gelelektrophorese und anschließender quantitativer Image Analyse des Ethidiumbromid-gefärbten Gels für die Berechnung zugrunde gelegt werden. Die quantitative Analyse mittels Real-Time PCR (TaqMan) brachte noch einmal eine Erhöhung der Nachweisempfindlichkeit um den Faktor 10.

Bei *A. alternata* besteht in der Regel eine sehr gute Korrelation zwischen den DNA-Gehalten mit der Ausbreitung der Nekrosen (Tabelle 15). Steigende DNA-Gehalte gehen mit einer Zunahme der Schäden einher. Bei *C. herbarum* war ebenfalls überwiegend eine Korrelation der Blattschäden mit den DNA-Gehalten zu beobachten. Bei *B. cinerea* nimmt die Menge an Pilz-DNA mit der Zeit ab, obwohl die Schäden zunehmen (Abb. 29). Dies zeigt, dass die DNA-Gehalte nicht immer mit der Schadentwicklung übereinstimmen. Bei einer Infektion mit *B. cinerea* wird in den Pflanzen HR ausgelöst. Es wurde zwar berichtet, dass HR-assoziiertes kontrollierter Zelltod das Fortschreiten der Infektion weiter begünstigt (Govrin & Levine, 2000), aber möglicherweise wird der Pilz doch durch die hochgefahrte Abwehr teilweise in seinem Wachstum eingedämmt, während der durch seine Toxine und Elicitoren verursachte ungeordnete Zelltod weiterläuft.

*S. liquefaciens* MG1 und *P. putida* IsoF induzierten in den Tomatenpflanzen Abwehrmechanismen, die das Wachstum von *A. alternata* eindämmen konnten (Tabelle 15). Dieser Effekt war bei der AHL-Nullmutante MG44 nicht zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren die DNA-Gehalte von *B. cinerea* in der Regel in den Pflanzen höher, die mit den Rhizosphärebakterien inokuliert wurden. Erstaunlicherweise waren auch in Pflanzen, die mit dem AHL-negativen Stamm *P. putida* F117 inokuliert waren, die DNA-Gehalte von *C. herbarum* höher als in den Kontrollpflanzen, obwohl die Symptome reduziert waren

(Tabelle 15). Möglicherweise stimuliert die aktivierte Abwehr in diesen Pflanzen die Aggressivität des Pilzes.

Tabelle 15: Zusammenfassende Darstellung der Biocontrol-Experimente mit AHL-produzierenden Rhizosphärebakterien und ihren korrespondierenden AHL-Nullmutanten, sowie dem Biocontrol-Stamm *Pseudomonas fluorescens* WCS417r. Angegeben sind die Änderungen der nekrotischen Blattschäden und der DNA-Gehalte von pathogenen Pilzen in mittelalten Blättern in % nach viertägiger Pilzinfektion bezogen auf die jeweiligen Kontrollpflanzen. Rot: signifikante Reduktionen der Nekrosen und DNA-Gehalte, wenn sie mit den Blattschäden korrelieren.

	<i>Alternaria alternata</i>		<i>Botrytis cinerea</i>		<i>Cladosporium herbarum</i>	
	Nekrosen [%]	DNA-Gehalte [%]	Nekrosen [%]	DNA-Gehalte [%]	Nekrosen [%]	DNA-Gehalte [%]
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	<b>- 70</b>	<b>- 79</b>	+ 3	+ 86	<b>- 6</b>	<b>+ 6</b>
<i>Serratia liquefaciens</i> MG44 (AHL-negativ)	- 20	- 10	- 13	- 64	- 8	- 32
<i>Pseudomonas putida</i> IsoF	<b>- 70</b>	+ 48	- 10	+ 72	<b>- 64</b>	<b>- 55</b>
<i>Pseudomonas putida</i> F117 (AHL-negativ)	<b>- 50</b>	<b>- 55</b>	- 20	+ 543	<b>- 61</b>	+ 61
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	<b>- 80</b>	<b>- 67</b>	- 20	+ 607	<b>- 10</b>	<b>-23</b>

Die Möglichkeit, pilzliche Pathogene in Kulturpflanzen bereits vor dem Auftreten von Schadsymptomen spezifisch nachweisen zu können, eröffnet neue Perspektiven im Pflanzenschutz und in der Pflanzenzüchtung. Schutzmaßnahmen können gezielt und mit geringerer Belastung der Umwelt eingesetzt werden. Züchtungsprogramme zur Gewinnung resistenter Kulturpflanzen werden erheblich beschleunigt durch frühe und quantifizierbare Erfassung der Pathogenbelastung, vor allem dann, wenn diese (wie z. B. *Fusarium* spp.) sich auch endophytisch (also ohne sichtbares Krankheitsbild) in der Pflanze ausbreiten können. Die klassische Identifizierung von pathogenen Pilzen mittels morphologischer Charakteristika erfordert vor allem bei anamorphen Entwicklungsstadien erhebliche Erfahrung. Phänotypische Merkmale wie Myzelfarbe oder Form und Größe von Konidiosporen sind sogar intraspezifisch hochvariabel und können durch Kulturbedingungen, Medienzusammensetzung oder Umwelteinflüsse beeinflusst werden. Die Anwendung von Kreuzungstesten

hingegen erfordert nicht nur geeignete Tester-Stämme, sie ist auch sehr zeitaufwändig und damit für Pflanzenzüchter und Pflanzenschutzämter kaum brauchbar.

### 1.3. Spezifität der Biocontrol-Aktivität gegen verschiedene perthotrophe Pilze

Charakteristisch für die durch *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis thaliana* induzierte systemische Resistenz (ISR) ist der unspezifische Schutz gegen verschiedene Typen von Krankheitserregern. So erhöhte sich der Schutz sowohl gegen bakterielle Erreger (*P. syringae* pv. *tomato*, *Xanthomonas campestris* pv. *armoraciae*) als auch gegen pathogene Pilze (*Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani*, *Peronospora parasitica*; Pieterse et al., 1996, 2001; Van Wees et al., 1997).

Die in dieser Studie eingesetzten Rhizosphärebakterien erwiesen sich am effektivsten gegenüber *A. alternata*, wobei *S. liquefaciens* MG1 einen spezifischen Schutz nur gegen diesen einen Pilz induzierte, nicht aber gegen die beiden anderen verwendeten Pathogene *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum* (Tabelle 15). Mit *P. putida* IsoF inokulierte Pflanzen hatten 64 % weniger Nekrosen nach Infektion mit *C. herbarum* und die AHL-negative Mutante F117 zeigte eine ähnlich hohe Biocontrol-Aktivität wie der Wildtyp-Stamm. Dieses Rhizosphärebakterium erhöhte damit die pflanzliche Resistenz gegenüber zwei der drei verwendeten Pathogene (*A. alternata*, *C. herbarum*) und bewirkte bei einer Infektion mit *B. cinerea* einen geringen Rückgang der Schäden.

Die Gründe für die Unterschiede in der Biocontrol-Aktivität könnten zum einen in der unterschiedlich stark ausgeprägten Aggressivität der einzelnen Pilze liegen und zum anderen in unterschiedlichen Abwehrantworten der Tomatenpflanzen. Dabei könnten entweder die drei Pilze jeweils andere Abwehrreaktionen auslösen oder auch die Rhizosphärebakterien, so dass nicht bei jeder Rhizosphärebakterium / Pathogen Kombination die optimalen Abwehrmechanismen induziert werden.

Perthotrophe Pilze zeichnen sich in ihrer Ernährungsweise dadurch aus, dass sie lebende Gewebe befallen, diese mit Hilfe von toxischen Substanzen abtöten und sich dann von dem absterbenden und später auch toten Gewebe ernähren (Hoffmann et al., 1994; Prell & Day, 2001). Eine Infektion mit *Botrytis cinerea* verläuft im allgemeinen in drei Stadien: während der ersten 24 Stunden bilden sich primäre Läsionen und im Wirt wird eine hypersensitive Antwort (HR) ausgelöst (Benito et al., 1998). In der zweiten Phase verändern sie sich nicht, sie scheinen eingegrenzt zu sein. Im dritten Stadium breitet sich der Pilz aggressiv über das Blatt von nur 10-30 % der primären Läsionen aus. Eine HR kann also

perthotrophe Pilze nicht eindämmen, sie scheint sogar die Infektion mit diesen Pilzen zu begünstigen (Govrin & Levine, 2000). Die HR ist zwar ein erfolgreicher Abwehrmechanismus gegenüber biotrophen Pathogenen, da durch den lokalen Zelltod die Erreger von ihrer Nährstoffversorgung durch lebende Zellen abgeschnitten werden, nicht aber gegenüber perthotrophen (Heath, 2000). Zudem scheinen diese Organismen gut an die während der HR freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) adaptiert zu sein (Mayer et al., 2001). Sie besitzen z. B. diverse Enzyme, darunter Superoxiddismutasen, Catalasen oder Peroxidasen, die ROS inaktivieren und entgiften können. Zudem scheint *B. cinerea* besonders unempfindlich gegenüber  $H_2O_2$  zu sein, da Sporen selbst bei einer Konzentration von 180 mM noch auskeimen können (Gil-ad & Mayer, 1999). Die Virulenz des Pathogens wird nicht nur durch die Effektivität seiner Entgiftungsenzyme bestimmt, sondern in weitaus stärkerem Maße auch von sogenannten induzierbaren Angriffsenzymen (Staples & Mayer, 1995). Mit Hilfe dieser Enzyme baut *B. cinerea* pflanzliche Zellwände ab, um die Infektion auszuweiten. Besondere Bedeutung für die Virulenz haben dabei  $\beta$ -Glucosidasen, Pectinmethylesterasen und Polygalacturonasen (Staples & Mayer, 1995).

Inwieweit diese Virulenzfaktoren auch bei anderen perthotrophen Pilzen von Bedeutung sind, ist noch weitgehend unklar. Es ist davon auszugehen, dass aufgrund der ähnlichen Ernährungsweise auch vergleichbare Infektionsverläufe vorhanden sind. Dennoch können Unterschiede in der Aggressivität der in dieser Arbeit verwendeten Pilze der Grund für die Unterschiede in der Effektivität der Biocontrol-Mechanismen der drei Rhizosphärebakterienstämme sein. Die Ausbreitung der Nekrosen verlief bei *B. cinerea* deutlich schneller als bei *A. alternata*; dieser Pilz scheint also wesentlich aggressiver zu sein (vgl. Ergebnisse Abb. 30, 35). Möglicherweise dämmen die durch die Rhizosphärebakterien induzierten Abwehrreaktionen *A. alternata* schon während der ersten Stadien der Infektion ein, wohingegen *B. cinerea* diese überwinden kann. Mikroskopische Beobachtungen vom Zeitpunkt der Auskeimung und dem weiteren Wachstum der Hyphen sollten Aufschluss darüber geben, wann die pflanzliche Abwehr die Infektion eindämmt.

#### **1.4. Induktion systemischer Resistenz in Tomatenpflanzen durch *Serratia liquefaciens* MG1**

Eine systemische Resistenz in Pflanzen ist dadurch gekennzeichnet, dass nach einer lokalen Infektion mit einem Pathogen, der Applikation von chemischen Substanzen oder von nicht-pathogenen Rhizosphärebakterien Signalwege aktiviert werden, die zu einem erhöhten

systemischen Abwehrstatus führen, so dass nachfolgende Infektionen weniger starke Symptome hervorrufen (Heil, 2001; Van Loon et al., 1998). Systemische Resistenzen, die von nicht-pathogenen Rhizosphärebakterien ausgelöst werden, unterscheiden sich von anderen Biocontrol-Mechanismen dadurch, dass keine antagonistischen Effekte zwischen dem Rhizosphärebakterium und dem Pathogen stattfinden, und die erhöhte Widerstandsfähigkeit allein auf der Aktivierung von pflanzlichen Abwehrreaktionen beruht (Van Loon et al., 1998). Der beobachtete Rückgang von Blattschäden in Tomatenpflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 vorbehandelt wurden, ist auf die Induktion systemischer Abwehrreaktionen zurückzuführen, da eine räumliche Trennung von Pilz und Bakterium gewährleistet war. Die Zugabe der Bakterien erfolgte an den Wurzeln; eine Wanderung der Bakterien über den Spross in die Blätter war nicht nachweisbar (vgl. Ergebnisse, Tabelle 8). *S. liquefaciens* MG1 kolonisierte die Pflanzenwurzeln nur auf der Oberfläche (vgl. Ergebnisse, Abb. 16), ein endophytisches Wachstum wurde nicht beobachtet (S. Gantner, A. Hartmann, GSF-Institut für Bodenökologie, pers. Mitteilung). Das Verhindern eines Kontaktes zwischen *Serratia liquefaciens* MG1 und den pathogenen Pilzen ist deshalb so wichtig, weil diese Bakteriengattung antagonistische Wirkungen auf das Wachstum von Pilzen haben kann (Berg et al., 2002; Kalbe et al., 1996). Untersuchungen des Einflusses dieses Stammes auf das Wachstum von *A. alternata* in Hemmassays auf Agarplatten zeigten eine 2-5 mm breite Zone mit vermindertem Pilzwachstum rund um die Bakterienkolonie (vgl. Ergebnisse Tabelle 10, Abb. 28) Gegenüber *B. cinerea* war der hemmende Effekt geringer, der Pilz konnte in unmittelbarer Umgebung der Bakterienkolonie uneingeschränkt wachsen, nur nicht auf der Kolonie selbst. *S. liquefaciens* MG1 produziert eine Reihe von Exoenzymen, wie z. B. Chitinasen, Nucleasen und Proteasen, die pilzliche Zellwände angreifen und auch Elicitoren freisetzen können (Givskov et al., 1997). Eine Aktivierung der pflanzlichen Abwehr durch Elicitoren scheint in den hier beschriebenen Versuchen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen, da der AHL-negative Stamm nur eine geringfügige Reduktion der Schäden in den Pflanzen bewirkte.

In der Regel liegt zwischen der Applikation des induzierenden Agens und dem Einsetzen der Resistenz in der Pflanze ein Zeitintervall. Meist dauert es einige Tage bis zu einer Woche, bis sich SAR oder eine durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien vermittelte systemische Resistenz etabliert (Durner et al., 1997; Van Loon et al., 1998). Nach den Ergebnissen dieser Arbeit wurde eine induzierte systemische Resistenz drei Tage nach Zugabe der Bakterien etabliert. Dies stimmt mit den meisten Studien überein, bei denen ein Zeitraum von einigen Tagen zwischen der Inokulation der Pflanzen mit den Bakterien und der

Pathogeninfektion gewählt wurde (Pieterse et al., 1996, 2000). Es wurden aber auch Beispiele beschrieben, nach denen eine Resistenz bereits einen Tag nach Zugabe von *P. fluorescens* WCS374 in Rettichpflanzen etabliert wurde (Leeman et al., 1995) bzw. der Schutz bis zu drei Wochen anhielt (Van Wees et al., 1999).

Zum leichteren Nachweis der Rhizosphärebakterien an der Wurzel wurden Stämme verwendet, die mit dem Gen für das grün fluoreszierende Protein *gfp* bzw. für das rot fluoreszierende Protein *rfp* markiert waren. Eine Beeinträchtigung des Wachstums gegenüber den Wildtyp-Stämmen konnte durch die *gfp* bzw. *rfp* –Markierung nicht festgestellt werden (Steidle et al., 2002; S. Gantner, A. Hartmann, GSF-Institut für Bodenökologie, persönliche Mitteilung). Die Induktion der Resistenz durch Rhizosphärebakterien erfolgte, nachdem ein bestimmter Schwellenwert der Inokulatdichte überschritten ist. Wurde die zugegebene Zellzahl weiter erhöht, so hatte dies keine Auswirkungen auf die Stärke der Resistenz (Leeman et al., 1995; Raaijmakers et al., 1995). Für die Versuche wurden hohe Inokulationsdichten gewählt, um sicherzugehen, dass die Bakterien während des ganzen Versuchszeitraumes anwesend sind, da eine Abnahme der Zellzahlen innerhalb von neun Tagen bei geringen Inokulationsdichten beobachtet wurde (vgl. Ergebnisse Abb. 15). Der Schwellenwert von  $10^5$  cfu (colony forming units) g FG<sup>-1</sup>, der für die Induktion einer systemischen Resistenz als notwendig beschrieben wurde (Raaijmakers et al., 1995), wurde in allen Experimenten erreicht bzw. sogar überschritten (vgl. Ergebnisse Tabellen 8, 9). Die Unterschiede in der Biocontrol-Aktivität der einzelnen Rhizosphärebakterien / Pathogenkombinationen liegen daher nicht an einer ungenügenden Kolonisierung der Wurzeln. Möglicherweise sind diese hohen Zellzahlen aber nicht nötig, da beschrieben wurde, dass eine systemische Resistenz, einmal etabliert, unabhängig von der verbleibenden Population bestehen bleibt (Liu et al., 1995). Es sollte in weiteren Studien überprüft werden, ob geringere Zellzahlen bei einer Inokulation mit den AHL-produzierenden Rhizosphärebakterien ausreichen, um eine Resistenz gegen *A. alternata* zu etablieren.

Nicht völlig ausgeschlossen ist ein Transport von Antibiotika oder anderer antagonistisch wirkender Metabolite über die Pflanze zum Ort des Pathogenbefalls. Diese Metabolite könnten auch toxisch auf die Pflanze wirken und als milder Stress eine systemisch erworbene Resistenz (SAR) auslösen (Van Loon et al., 1998). So konnte ein modifizierter Stamm von *P. fluorescens* CHA0, der erhöhte Mengen der Antibiotika Diacetylphloroglucinol und Pyoluteorin produzierte, die Pflanzen zwar besser gegen Wurzelfäule schützen, reduzierte aber gleichzeitig das Wachstum der Pflanzen (Maurhofer et al., 1994, 1995).

## 2. Abwehrreaktionen und Signalstoffe bei induzierter systemischer Resistenz gegen *Alternaria alternata*

Pflanzen erkennen pathogene Bakterien oder Pilze über verschiedene Substanzen, die von der Zelloberfläche der Mikroben stammen oder beim Eindringen in die Gewebe freigesetzt werden. Diese Substanzen, allgemeine Elicitoren genannt, werden unspezifisch von verschiedenen Pflanzenspezies erkannt und setzen anschließend eine Kaskade von Abwehrreaktionen in Gang (Nürnberger & Brunner, 2002). Als Elicitoren können verschiedene Substanzklassen wirken, wie (Glyco)proteine, Peptide oder Lipide. Bei der Aktivierung einer Reihe von Abwehrreaktionen auf Pathogenbefall übernehmen insbesondere die Moleküle Salicylsäure, Ethylen und Jasmonat, aber auch Stickstoffmonoxid (NO) eine wichtige Funktion bei der Signalweiterleitung und Aktivierung von Abwehr-assoziierten Proteinen und niedermolekularen Substanzen (Alvarez, 2000; Durner et al., 1997; Klessig et al., 2000; Langebartels & Kangasjärvi, 2003; Pieterse & Van Loon, 1999).

Von großem Interesse war es, in dieser Arbeit die Gehalte von Salicylsäure und der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) nach Einwirkung von AHL-produzierenden Rhizosphärebakterien und anschließender Pathogeninfektion zu untersuchen bzw. nach Behandlung der Pflanzen mit AHL-Molekülen. Da zudem die Möglichkeit besteht, dass AHL-Moleküle selbst von der Pflanze wahrgenommen werden können, wurden Pflanzen mit den beiden von *S. liquefaciens* MG1 produzierten AHL-Molekülen HHL und BHL behandelt. Die gewählte Konzentration von 10 µM entspricht der Konzentration an BHL und HHL, die *S. liquefaciens* MG1 in Flüssigkultur produzieren kann (Eberl et al., 1999). Es darf davon ausgegangen werden, dass in der Rhizosphäre oder in Biofilmen AHL-Konzentrationen in dieser Größenordnung erreicht, wenn nicht sogar überschritten werden (L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München, persönliche Mitteilung). Ein Zerfall der AHL-Moleküle kann weitgehend ausgeschlossen werden, da diese in wässrigen Lösungen bei neutralen oder sauren pH-Werten relativ stabil sind. Der Homoserinlactonring wird erst unter stark alkalischen Bedingungen geöffnet (Leadbetter & Greenberg, 2000; Schaefer et al., 2000).

In Tabelle 16 sind die Änderungen der Gehalte von Ethylen bzw. ACC und Salicylsäure nach Behandlungsvarianten, Zeitraum der Änderung und Ort der Reaktion aufgeschlüsselt zusammenfassend dargestellt. Auffällig war dabei die sehr schnelle systemische Erhöhung der Ethylenemission nach Inokulation der Pflanzen mit *S. liquefaciens* MG1 innerhalb weniger Stunden. Neben diesen kurzfristigen Änderungen der Signalstoffgehalte waren auch

Reaktionen in einem Zeitraum von Tagen zu beobachten: *S. liquefaciens* MG1 bewirkte einen Anstieg von freier und konjugierter Salicylsäure, sowie konjugierter Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure), die einen zu Salicylsäure verwandten Inhaltsstoff darstellt. Nach Applikation von *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton reagierten die Pflanzen innerhalb von fünf Stunden mit einer Erhöhung der Gehalte an freier Salicylsäure in den Wurzeln und weniger stark ausgeprägt systemisch in den Blättern (Tabelle 16). Freies ACC war nicht nachzuweisen, bei den ACC-Konjugaten war ein geringer Anstieg zu verzeichnen. Die Gehalte an konjugierter Salicylsäure blieben von HHL unbeeinflusst.

Tabelle 16: Zusammenfassende Darstellung der Einflüsse von *Serratia liquefaciens* MG1 (Wildtyp), *S. liquefaciens* MG44 (*N*-Acyl-L-homoserinlacton-Nullmutante) und *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) auf die Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) und der pflanzlichen Signalstoffe Ethylen, Salicylsäure, (SA) und Gentisinsäure (GA). + : Anstieg der Gehalte, - : nicht messbar, n. d.: nicht untersucht.

Behandlungsvariante			Zeit	Organ	Ethylen, ACC	konj. ACC	SA	konj. SA, konj. GA
kein Pathogen	MG1	Stunden	Blatt	+++ <sup>1</sup>	-	n. d.	n. d.	
		Tage	Blatt	-	-	+++	++++ <sup>3</sup>	
	HHL	Stunden	Wurzel	-	-	++++	-	
		Stunden	Blatt	-	++	++	-	
Infektion mit <i>A. alternata</i>	Keine sichtbaren Schäden	K (ohne Pilz)	0-1 Tage nach der Infektion	Blatt	-	-	+	+
		K (ohne Bakterien)			++ <sup>2</sup>	+	++	++
		MG1			++ <sup>2</sup>	+	+	+
		MG44			++ <sup>2</sup>	+	+	+
	sichtbare Schäden bei infizierten Pflanzen	K (ohne Pilz)	2-4 Tage nach der Infektion		-	-	++	++
		K (ohne Bakterien)			+++++ <sup>2</sup>	+++++	+++	+++
		MG1			++ <sup>2</sup>	++++	++	++
		MG44			++ <sup>2</sup>	+++	+++	+++

<sup>1</sup>Änderungen in der Ethylenemission

<sup>2</sup>Änderungen in den Gehalten von freiem ACC

<sup>3</sup>Änderungen sowohl der SA- als auch der GA-Gehalte

Vergleicht man nun die Einflüsse einer Vorbehandlung mit dem AHL-produzierenden Wildtyp-Stamm MG1 bzw. mit der AHL-negativen Mutante MG44 auf die Gehalte von Salicylsäure und ACC während einer anschließenden Infektion mit *A. alternata*, so fällt auf, dass die stärksten Reaktionen erst beim Einsetzen von sichtbaren Schäden auftreten (Tabelle



16). Dabei wiesen die Pflanzen ohne Vorbehandlung mit den Bakterien die höchsten Gehalte an freiem ACC und freier Salicylsäure auf, wobei die Gehalte der freien Salicylsäure in den mit *S. liquefaciens* MG44 inokulierten Pflanzen genauso hoch waren wie die der Kontrollpflanzen ohne Vorbehandlung. Die Gehalte an konjugierter Salicylsäure verhielten sich ähnlich. Damit konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von *S. liquefaciens* MG1 und HHL auf pflanzliche Signalstoffe bei Tomate gezeigt werden.

### **2.1. Rolle von Ethylen bei der systemischen Resistenz durch *Serratia liquefaciens* MG1**

Eine der schnellsten Reaktionen, die in den hier beschriebenen Experimenten beobachtet wurde, war die Erhöhung der Ethylenemission in den Blättern nur ein bis drei Stunden nach Applikation von *S. liquefaciens* MG1 an die Wurzeln von Tomatenpflanzen (Tabelle 16, Abb. 40). Auch Pflanzen, die verwundet wurden, emittieren bereits nach einer Stunde erhöhte Mengen an Ethylen, damit stellt Ethylen eines der frühesten Signalmoleküle dar (O'Donnell et al., 1996).

Die Vorläuferverbindung 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) konnte in den inokulierten Pflanzen nicht detektiert werden, obwohl die ACC-Gehalte im allgemeinen sehr gut mit der Freisetzung des gasförmigen Pflanzenhormons korrelieren (Moeder et al., 2002; Tuomainen et al., 1997). Da sich die gemessene Ethylenemission nur in einem sehr geringen Konzentrationsbereich bewegte ( $0,14 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g FG}^{-1}$ ) ist es möglich, dass keine erhöhte ACC-Synthese stattfand oder dass das ACC vollständig durch konstitutive ACC-Oxidasen umgesetzt wurde. Im Vergleich dazu werden bei Pathogenbefall Ethylenwerte von über  $3 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g FG}^{-1}$  induziert (Biles et al., 1990; Elad, 1990).

Während der anschließenden Infektion mit *A. alternata* stiegen die Gehalte an freiem ACC parallel zur Entwicklung der Blattschäden stark an, wobei das Maximum mit dem Einsetzen von sichtbaren Schäden zusammenfiel (Tabelle 16). Die Konjugate reagierten etwa mit einem Tag Verzögerung. Bei Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 oder der AHL-Nullmutante MG44 vorbehandelt wurden, fehlte das Maximum an freiem ACC am zweiten Tag. Zu diesem Zeitpunkt waren die Kontrollpflanzen schon etwa doppelt so stark geschädigt wie die behandelten Pflanzen. Die Gehalte an gebundenem ACC erreichten erst am vierten Tag ihre höchsten Werte, wobei auch hier die behandelten Pflanzen weniger hohe Mengen akkumulierten. Interessant ist, dass die mit dem AHL-negativen Stamm MG44 behandelten Pflanzen die geringste Akkumulation zeigten, obwohl die Schäden im Vergleich zu den

Kontrollpflanzen nur um 20 % reduziert waren. Die ACC-Gehalte im späteren Verlauf der Infektion sind daher eher als ein Maß für die Symptomentwicklung anzusehen als für eine Beteiligung an einer erfolgreichen Abwehr gegen *A. alternata*.

Pieterse und Kollegen konnten zeigen, dass die durch *P. fluorescens* WCS417r induzierte systemische Resistenz (ISR) von einem intakten Jasmonat – und Ethylensignalweg abhängig ist. Wurden die *Arabidopsis*-Mutanten *etr1-1* und *jar1-1* mit exogenem ACC behandelt, so konnte in *jar1-1* ein erhöhter Schutz gegen *P. syringae* pv. *tomato* ausgelöst werden, in *etr1-1* dagegen nicht (Pieterse et al., 1998). Daraus lässt sich schließen, dass Komponenten des Jasmonat- vor denen des Ethylensignalweges liegen. Die ISR geht nicht mit erhöhten Emissionen dieser Signalstoffe einher, sondern basiert eher auf einer erhöhten Sensitivität gegenüber diesen Pflanzenhormonen (Pieterse et al., 2000). Bei der induzierten systemischen Resistenz durch *S. liquefaciens* MG1 könnten die Induktionen der Ethylenemission die Pflanzen ebenfalls sensitiver gegenüber diesem Hormon machen.

Verschiedene Pathogene induzieren in *A. thaliana* unterschiedliche Abwehrwege. So werden bei Infektionen mit biotrophen Pathogenen häufig Salicylsäure-abhängige Signalwege aktiviert, bei perthotrophen Pathogenen wie *B. cinerea* oder *A. brassicicola* greifen in der Regel Jasmonat- und Ethylenvermittelte Abwehrreaktionen. (Thomma et al., 1998, 1999, 2000, 2001). Eine exogene Applikation von Ethylen führte zu einer verminderten Anfälligkeit von Tomatenpflanzen gegenüber *B. cinerea*, während die Behandlung mit Inhibitoren der Ethylenperzeption in stärker ausgeprägten Symptomen resultierte (Díaz et al., 2002). Ethylen-insensitive Tabakpflanzen verlieren ihre nicht-wirtsspezifische Resistenz gegen natürlich im Boden vorkommende Pilze (Knoester et al., 1998). Auf der anderen Seite fördert Ethylen Seneszenz und Fruchtreife, was manchen perthotrophen Pathogenen die Infektion erleichtern kann (Abeles et al., 1992; Díaz et al., 2002). Ethylen fördert auch die Entwicklung von Nekrosen (Lund et al., 1998). In Ethylen-insensitiven Tomatenpflanzen führt eine Infektion mit den virulenten Bakterienstämmen *Xanthomonas campestris* oder *Pseudomonas syringae* zu einer abgeschwächten Symptomentwicklung, wobei die Entwicklung der primären Läsionen genauso verlief wie in Wildtyp-Pflanzen, während die nachfolgende Ausbreitung von Chlorosen und Nekrosen deutlich schwächer war. Eine defekte Ethylenperzeption etabliert in diesem Beispiel eine erhöhte Toleranz in den Pflanzen. Dieser Effekt wird v. a. durch die Wirkung von Ethylen-abhängiger Salicylsäure vermittelt, die in einer veränderten Zelltod-Entwicklung resultiert (O'Donnell et al., 2001). Diese Beispiele lassen erkennen, dass die Beteiligung von Ethylen-vermittelten Abwehrreaktionen, je nach Pathogen / Wirtkombination zu einer verstärkten oder erniedrigten Anfälligkeit führt. Nach den

Ergebnissen dieser Studie scheint die späte Ethylenbildung bei einer Infektion mit *A. alternata* eher die Stärke der Infektion widerzuspiegeln als Teil einer erfolgreichen Abwehr gegen den Pilz zu sein.

Verwundungen der Pflanze erleichtern das Eindringen von Pathogenen, auch wenn die meisten perthotrophen Pilze über Mechanismen verfügen, die ihnen die Penetration durch die Blattepidermis ermöglichen. Eine Infektion mit nekrotisierenden Pilzen selbst kann ebenfalls Verwundungsreaktionen auslösen. Ethylen wird von verwundetem Gewebe freigesetzt und agiert zusammen mit anderen Komponenten des Verwundungs-Signalweges wie z. B. Jasmonat, Oligogalacturonide, Abscisinsäure, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und bei Solanaceen dem Oligopeptid Systemin (Ryan, 2000). Es werden Abwehrreaktionen ausgelöst, die gewöhnlich gegen Herbivore gerichtet sind, in manchen Fällen aber auch effektiv gegen Pathogene wirken (Bostock, 1999). *B. cinerea* setzt während der Infektion Oligogalacturonide frei, die Elicitoren für Verwundungsreaktionen darstellen können (Ten Have et al., 1998). Tomatenlinien, die einen Defekt im Jasmonat oder im Systeminsignalweg besitzen, waren anfälliger gegen eine Infektion mit *B. cinerea*, was auf eine Beteiligung von Jasmonat und Systemin an der Resistenz gegen diesen Pilz hindeutet (Díaz et al., 2002). Werden diese beiden Mutanten und Wildtyp-Pflanzen mit Ethylen behandelt, so beobachtet man in den drei Linien eine vergleichbare Erhöhung der Resistenz gegen *B. cinerea* (Díaz et al., 2002). Die Autoren schlossen daraus, dass in Tomatenpflanzen der Ethylen- und der Jasmonatsignalweg unabhängig voneinander agieren können, beide aber an einer Resistenz gegen *B. cinerea* beteiligt sind. Im Gegensatz dazu wirken die beiden Signalwege in *A. thaliana* synergistisch (Thomma et al., 1999).

## **2.2. Beteiligung von Salicylsäure bei der systemischen Resistenz induziert durch das N-Acyl-L-homoserinlacton produzierende Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1**

Unbestritten ist die Beteiligung von Salicylsäure bei der systemisch erworbenen Resistenz (SAR), die sich nach einer lokalen Infektion mit nekrotisierenden Pathogenen entwickeln kann und mit einer langandauernden Resistenz gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen einhergeht (Alvarez, 2000; Durner et al., 1997; Klessig et al., 2000). Eine Erhöhung der Gehalte an Salicylsäure während Pathogeninfektionen wurde in einer Vielzahl von Pflanzen beschrieben, z. B. in Gurke (Métraux et al., 1990), Tabak (Costet et al., 1999; Enyedi et al., 1992) oder Ackerschmalwand (Cameron et al., 1999).

Drei Tage nach Zugabe des AHL-produzierenden Bakteriums *Serratia liquefaciens* MG1 wurden erhöhte Gehalte sowohl der freien als auch der konjugierten Salicylsäure in den Tomatenblättern gemessen (Abb. 37, Tabelle 16). Die Pflanzen könnten entweder von den Bakterien produzierte Salicylsäure über die Wurzeln aufnehmen und in die Blätter transportieren oder die Bakterien produzieren eine Substanz, die die Biosynthese von Salicylsäure induziert. Obwohl Salicylsäure im Phloem transportiert werden kann, ist ein noch unbekannter Signalstoff für das Auslösen der SAR in distalen Pflanzenteilen zuständig (Durner et al., 1997).

Viele Rhizosphärebakterien wie z. B. *Pseudomonas* spp. oder *Serratia* spp. produzieren Salicylsäure unter Eisen-limitierenden Bedingungen, da diese zur Synthese von Siderophoren dienen kann (De Meyer & Höfte, 1997; Mercado-Blanco et al., 2001; Press et al., 1997). Ein Transport von den Wurzeln in die Blätter ist möglich, wie Experimente mit radioaktiv markierter Salicylsäure in Tabakpflanzen gezeigt haben (Moeder, 1999). M. Höfte und Kollegen beschreiben in ihren Arbeiten die Induktion einer systemischen Resistenz in Bohnen und Tabak durch Salicylsäure, die von dem Stamm *P. aeruginosa* 7NSK2 gebildet wurde (De Meyer et al., 1999; De Meyer & Höfte, 1997). Dabei genügten schon nanomolare Konzentrationen, um eine Resistenz gegen *B. cinerea* in Bohnenpflanzen hervorzurufen (De Meyer et al., 1999). Außerdem war die Etablierung, nicht aber die Induktion einer Resistenz abhängig von einer *in planta* Akkumulation von Salicylsäure, wie Pfropfexperimente mit *nahG*-Tabakpflanzen und Wildtyp Wurzelstöcken als Unterlage zeigten (De Meyer et al., 1999). In diesen Pflanzen konnte sich eine systemische Resistenz entwickeln. *NahG*-Tomatenpflanzen konnten ebenfalls keine Resistenz gegen *B. cinerea* etablieren (Audenaert et al., 2002). Zudem wurden erhöhte Salicylsäuregehalte in Blättern von Bohnenpflanzen gemessen, die mit dem *P. aeruginosa* Stamm KMPCH inokuliert wurden, der zwar Salicylsäure, aber keine weiteren Siderophore bildet (De Meyer et al., 1999). In Bohnen- und Tomatenpflanzen wurde durch diesen Stamm die Aktivität der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase in den Wurzeln erhöht (Audenaert et al., 2002; De Meyer et al., 1999). Die durch *P. aeruginosa* 7NSK2 vermittelte Resistenz ist damit wie die SAR von Salicylsäure-abhängig.

Zusätzlich zur Induktion der Salicylsäure war bei den mit *S. liquefaciens* MG1 inokulierten Pflanzen ein weiterer pflanzlicher Signalstoff, die verwandte 2,5-Dihydroxybenzoesäure (Gentisinsäure) erhöht (Tabelle 16, Abb. 37). In unseren Experimenten war nur die konjugierte Form detektierbar. Nach einer Viroidinfektion von Tomatenpflanzen konnte neben konjugierter auch freie Gentisinsäure in Tomatenpflanzen nachgewiesen werden (Bellés et al., 1999). Es wird vermutet, dass Salicylsäure in

Gentisinsäure umgewandelt werden kann, denn nach Besprühen von Pflanzen mit 10 millimolar Salicylsäurelösung steigen auch die Gehalte an Gentisinsäure und bei Zugabe von radioaktiv markierter Salicylsäure findet man die Radioaktivität auch in der Gentisinsäure wieder (Bellés et al., 1999). Die Rolle von Gentisinsäure als Signal in Abwehrreaktionen ist noch weitgehend unklar. Sie kann ein zu Salicylsäure unterschiedliches Spektrum an PR-Proteinen in Tomatenpflanzen induzieren, darunter zwei Isoformen von basischen Chitinasen und P23, ein Thaumatin-ähnliches Protein (Bellés et al., 1999). Sie scheint daher unabhängig von Salicylsäure zu wirken.

Noch schnellere Reaktionen wurden beobachtet, wenn in Sandkultur gezogene Pflanzen mit *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) behandelt wurden. Innerhalb weniger Stunden konnte ein lokaler Anstieg von Salicylsäure in den Wurzeln und in geringerem Ausmaß auch in den Blättern beobachtet werden (Tabelle 16; Abb. 44). Die systemische Induktion der Salicylsäure in den Blättern wurde nicht in allen Experimenten beobachtet. Ein Grund dafür könnte sein, dass, obwohl die Pflanzen unter keimreduzierten Bedingungen in sterilem Quarzsand angezogen wurden, Kontaminationen mit AHL-abbauenden Bakterien nicht ausgeschlossen werden können, und die Konzentrationen der AHL-Moleküle zwar für eine lokale, nicht aber für eine systemische Erhöhung der Salicylsäuregehalte ausreichte. Aus der Literatur ist bekannt, dass AHL-Moleküle von bestimmten Bakterien abgebaut werden können, so konnte das Bodenbakterium *Variovorax paradoxus* den Lactonring spalten und AHL-Moleküle als Stickstoffquelle nutzen (Leadbetter & Greenberg, 2000). Erst kürzlich wurde mit den *N*-Acyl-homoserinlactonasen eine neuartige Enzymfamilie in *Bacillus* spp. beschrieben, die AHL-Moleküle durch die Spaltung des Lactonringes inaktivieren kann (Dong et al., 2000, 2002).

Bei der induzierten systemischen Resistenz (ISR), hervorgerufen durch *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis thaliana*, ist die Signaltransduktion unabhängig von Salicylsäure (Pieterse et al., 2001). Transgene Pflanzen (*nahG*), die keine Salicylsäure akkumulieren können, entwickelten eine ähnlich stark ausgeprägte Resistenz gegen *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 nach Kolonisierung der Wurzeln mit *P. fluorescens* WCS417r wie Wildtyp-Pflanzen (Pieterse et al., 1996; Van Wees et al., 1997). Die Mutanten *sid1-1* und *sid2-1*, die einen Defekt in der Induktion der SAR durch Salicylsäure besitzen, konnten ebenfalls eine WCS417r vermittelte ISR ausprägen (Pieterse et al., 2001). Zudem wurden nie erhöhte Salicylsäuregehalte nach Inokulation von *Arabidopsis thaliana* mit *P. fluorescens* WCS417r gemessen (Pieterse et al., 2000). Neben *P. fluorescens* WCS417r können auch weitere Rhizosphärebakterien (z. B. *P. fluorescens* WCS358r) diesen Salicylsäure-unabhängigen ISR-

Signalweg in *A. thaliana* induzieren (Van Wees et al., 1997), aber auch in anderen Pflanzenarten scheint dieser Signalweg vorhanden zu sein. Press et al. (1997) berichten, dass *Serratia marcescens* 90-166 sowohl in Wildtyp-Tabakpflanzen als auch in transgenen *nahG*-Pflanzen eine Resistenz gegen *P. syringae* pv. *tabaci* induzieren konnte. Die Induktion der hier beschriebenen systemischen Resistenz durch *S. liquefaciens* MG1 in Tomatenpflanzen unterscheidet sich damit deutlich von der ISR, da in dieser Studie erstmals erhöhte Gehalte an Salicylsäure nach Inokulation mit den Bakterien gemessen werden konnten.

Bei einer Infektion mit *A. alternata* wurde in infizierten Pflanzen keine Induktion von Salicylsäure gefunden (Tabelle 16). Infizierte Pflanzen, die vor der Zugabe des Pathogens mit *S. liquefaciens* MG1 behandelt wurden, zeigten eine Korrelation der Salicylsäure-Gehalte mit der Symptomentwicklung (Tabelle 16). Pflanzen, die weniger Schäden aufwiesen, hatten auch geringere Salicylsäurewerte. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele beschrieben, wonach während Pathogeninfektionen die Ausprägung der Schäden häufig mit den Salicylsäure-Gehalten korreliert (zusammengefasst in Alvarez, 2000; Durner et al., 1997).

Salicylsäure-abhängige Abwehrwege wie z. B. SAR sind in *A. thaliana* nicht oder nur in sehr geringem Maße effektiv gegen perthotrophe Pathogene wie *B. cinerea* oder *A. brassicicola* (Thomma et al., 1998; Zimmerli et al., 2000). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Murphy et al. (2000) und De Meyer et al. (1999), dass eine Applikation von Salicylsäure in Tabak- oder Bohnenpflanzen eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegenüber *B. cinerea* bewirken kann. Ein weiteres Beispiel ist die systemische Resistenz durch *P. aeruginosa* 7NSK2, die nicht in *nahG*-Tabak- oder Tomatenpflanzen induziert werden kann, also auf einem Salicylsäure-abhängigen Weg basiert (s. o., Audenaert et al., 2002; De Meyer et al., 1999).

### **3. Änderungen in der Genexpression durch N-Acyl-L-homoserinlactone und *Serratia liquefaciens* MG1**

Die durch die Signalstoffe Salicylsäure, Ethylen und Jasmonat vermittelten Abwehrwege führen zur Aktivierung spezifischer Abwehrproteine und –substanzen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine parallele Analyse von 80 Tomatengenomen mit Hilfe eines Macroarrays durchgeführt. Die aufgetragenen Sonden sind gegen PR-Proteingene gerichtet, gegen Gene der Ethylenbiosynthese und –perzeption, des antioxidativen Systems, sowie Gene für

Stoffwechsel und Entwicklungs-abhängige Prozesse, wie z. B. Fruchtreife und Seneszenz (vgl. Anhang 3). Bei einigen Genen ist die Funktion noch unbekannt.

Die beiden von *S. liquefaciens* MG1 produzierten AHL-Moleküle *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) bewirkten eine systemische Änderung der Genexpression in den Blättern (Abb. 55). Werden die Änderungen der Transkriptmengen aus mehreren Versuchen mit HHL und BHL zusammengefasst, so waren 12 Gene induziert und 2 reprimiert. Damit war die Anzahl der durch AHL induzierten Gene vergleichbar mit der Anzahl an Genen, die durch Gaben von Salicylsäure (10) bzw. von der Ethylenvorstufe 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC, 13) erhöht exprimiert wurden (Abb. 55).

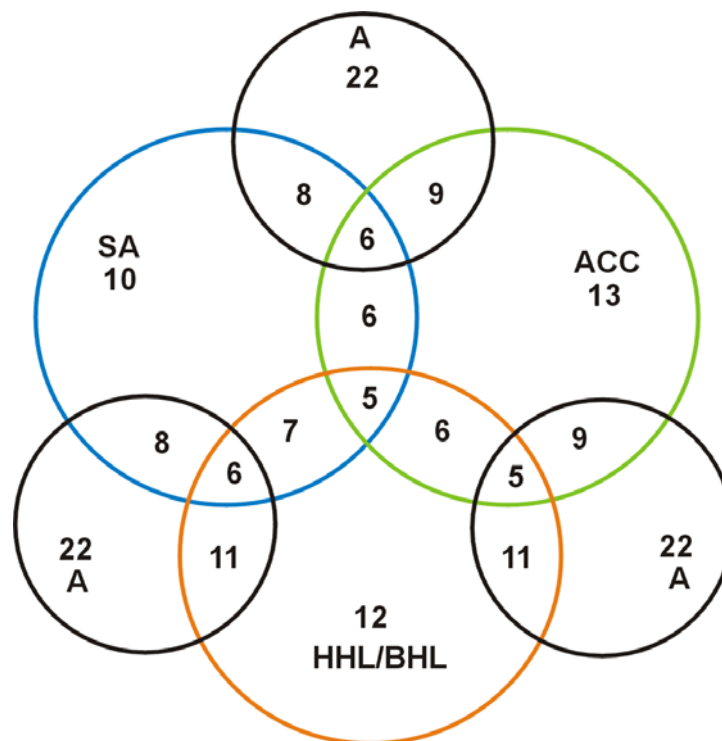


Abb. 55: Venn-Diagramm der Anzahl überlappender bzw. nicht-überlappender induzierter Gene nach Infektion mit *Alternaria alternata* (A) oder Applikation von Salicylsäure (SA), 1-Aminocyclopropan-1-carbonsäure (ACC) bzw. *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) und *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL).

Vergleicht man die durch HHL/BHL induzierten Gene mit den durch Salicylsäure und ACC induzierten, so fällt auf, dass ca. die Hälfte dieser Gene (7 bzw. 6 von 12) auch durch einen dieser beiden Stoffe induziert wurden. Einige Gene wurden sogar durch alle drei Behandlungsvarianten verändert. Von den fünf Genen, die sowohl auf AHL-Moleküle als auch auf Salicylsäure und ACC ansprachen, gehörten vier zu den PR-Proteinen (PR1b1, 26 kD saure extrazelluläre Chitinase, 30 kD basische intrazelluläre Chitinase, Proteinase-

Inhibitor CEVI-57). Außerdem wurde noch der Ethylenrezeptor Le-ETR1 von allen drei Substanzklassen induziert.

Dies zeigt deutlich, dass die einzelnen Signalwege nicht unabhängig voneinander agieren, sondern miteinander in Verbindung stehen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam Schenk et al. (2000) in seinen Versuchen mit *A. thaliana*, bei denen etwa 5 % der untersuchten Gene durch mehr als eine Behandlungsvariante (Salicylsäure, Methyljasmonat, Ethylen oder einem avirulenten Stamm von *A. brassicicola*) induziert waren. In unseren Untersuchungen waren während der Infektion mit *A. alternata* die Anzahl der induzierten (22; Abb. 55) und reprimierten (5) Gene am höchsten. Dies war zu erwarten, da Infektionen mit Pathogenen häufig mit starken Reaktionen auch auf Genebene einhergehen (Schenk et al., 2000).

Tabelle 17: Systemisch induzierte Gene durch *N*-Hexanoyl-L-homoserinlacton (HHL) bzw. *N*-Butanoyl-L-homoserinlacton (BHL) in Tomatenblättern (vgl. Ergebnisse, Tabelle 14).

	<b>Gen</b>	<b>Induziert durch</b>	<b>Maximaler Induktionsfaktor</b>	<b>Funktion</b>
<b>Salicylsäure-abhängige Gene</b>	PR1a (P4)	HHL, BHL	10	Abwehr
	PR1b1 (P6)	HHL, BHL	6	Abwehr
<b>Ethylen-abhängige Gene</b>	CEVI-57, Proteinase-Inhibitor	HHL, BHL	4	Abwehr
	P69, Subtilisin-ähnliche Endoproteinase	HHL	3	Abwehr
<b>Durch Salicylsäure und Ethylen induzierte Gene</b>	Qa, saure Glucanase	BHL	8	Abwehr
	26 kD saure Chitinase	HHL, BHL	18	Abwehr
	30 kD basische Chitinase	HHL	12	Abwehr
	Le-ETR1	HHL	3	Ethylenperzeption
<b>Weitere Gene</b>	Ascorbatperoxidase	HHL	3	Antioxidatives System
	SENU3, Cysteinproteinase	HHL	3	Signaltransduktion, Seneszenz
	Invertase	HHL	8	Stoffwechsel
	Actin-8	HHL	3	Cytoskelett

In Tabelle 17 sind die systemisch induzierten Gene nach einer Applikation von HHL bzw. BHL zusammengestellt. Eine erhöhte Transkriptakkumulation wurde dabei sowohl von Salicylsäure- als auch Ethylen-abhängigen Genen gefunden; einige der Gene lassen sich nach den Ergebnissen dieser Arbeit und Vergleichen mit der Literatur nicht eindeutig in einen Signalweg einordnen. Neben den an der Abwehr beteiligten Genen wurde auch die



Expression von Genen anderer Bereiche wie z. B. des antioxidativen Systems, des Cytoskeletts oder der Signaltransduktion verändert.

Die Arraydaten ausgewählter Gene wurden anhand Northern Blot Analysen überprüft. In Tabelle 18 ist ein Vergleich der beiden Techniken zur Untersuchung von Genexpressionsänderungen zusammengefasst. In der Mehrzahl der Fälle konnten die Arraydaten bestätigt werden, wobei sich die Northern Blot Analysen sensitiver erwiesen, obwohl vergleichbare Gesamt-RNA-Gehalte eingesetzt wurden.

Tabelle 18: Induktionsfaktoren ausgewählter Gene nach Macroarray- bzw. Northern Blot Analysen. Waren bei den Kontrollen keine Signale messbar und konnten daher auch keine Induktionsfaktoren berechnet werden, so ist eine starke Induktion mit +++ gekennzeichnet, n. n.: nicht nachweisbar.

Behandlung	Gen / Funktion	Macroarray	Northern Blot
<i>A. alternata</i>	PR1a (P4)	46,4	+++
	PR1b1 (P6)	33,5	+++
	Qa, saure Glucanase	6,2	+++
	Qb, basische Glucanase	10,7	11,1
	26 kD Chitinase	28,0	3,8
	27 kD Chitinase	6,3	3,8
	30 kD Chitinase	55,7	+++
	P23	112,7	2,3
HHL	PR1a (P4)	9,6	9,4
	30 kD Chitinase	11,8	4,0
BHL	PR1a (P4)	10,3	3,9
SA	PR1a (P4)	n. n. / 31,4	5,3 / 65,9
	30 kD Chitinase	n. n. / 6,4	1,1 / 6,5
	P23	n. n. / n. n.	3,2 / 3,1
	Proteinase-Inhibitor II	0,5 / 0	0,8 / 0,3
ACC	PR1a (P4)	n. n. / n. n.	5,6 / 2,5
	30 kD Chitinase	n. n. / 3,6	3,4 / 7,8
	P23	57,2 / n. n.	1,6 / 0,8
	Proteinase-Inhibitor II	3,3 / 0,5	1,0 / 0,8

In Tomatenpflanzen wird in den hier beschriebenen Experimenten PR1a (P4) durch Salicylsäure induziert (Tabelle 19). Auch das zweite untersuchte PR1-Protein PR1b1 wird deutlich stärker durch Salicylsäure induziert, spricht aber auch auf ACC an. Interessanterweise wird PR1a (P4) und PR1b1 sowohl durch HHL als auch durch BHL bereits nach fünf Stunden systemisch in den Blättern induziert. Tornero et al. (1997) konnten ebenfalls eine Induktion von PR1b1 in Tomate durch Salicylsäure und ACC feststellen,

zudem akkumulierte dieses Protein auch lokal im Gewebe während der HR, nicht aber systemisch. Außerdem werden diese extrazellulären PR1-Proteine durch verschiedene pilzliche oder bakterielle Pathogene wie z. B. *Cladosporium fulvum* (Van Kan et al., 1992), *Phytophthora infestans* (Fidantsef et al., 1999), *A. alternata* (diese Studie) oder *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Fidantsef et al., 1999) induziert. Auch bei Insektenfraß durch Läuse akkumulierte P4-mRNA in Tomatenblättern (Fidantsef et al., 1999).

PR-Proteine der Klasse 1 in Tabak und Tomate gehören zu kleinen Multigenfamilien mit acht Mitgliedern bei Tabak und drei Mitgliedern bei Tomate (Van Loon & van Strien, 1999). Das saure Protein PR1a aus Tabak wurde als erstes aufgereinigt und als Typ-Protein festgelegt (Van Loon & van Strien, 1999). Die basischen PR1-Proteine aus Tomate PR1a (P4) und PR1b (PR1b1) zeigen mehr Ähnlichkeiten zu dem basischen Protein PR1g als zu den sauren Isoformen PR1a und PR1b von Tabak. In Tabakpflanzen werden die Gene für die basischen und sauren Isoformen differentiell reguliert, so wird eine basische Isoform durch Ethylen aktiviert (Eyal et al., 1993) und saure Isoformen während der HR und dem Beginn der SAR durch Salicylsäure (Uknes et al., 1993).

Die Funktion der PR1-Proteinfamilie konnte bisher noch nicht entschlüsselt werden, obwohl sie in vielen eukaryotischen Organismen, z. B. Hefe, vorkommt, was auf einen gemeinsamen Ursprung hindeutet (Van Loon & van Strien, 1999). Eine Überexpression von saurem PR1-Protein in Tabakpflanzen führte zu einer erhöhten Resistenz gegen die Oomyceten *Peronospora tabacina* und *Phytophthora infestans* (Alexander et al., 1993). Außerdem wurde eine inhibitorische Wirkung auf *P. infestans in vitro* und *in vivo* durch ein basisches PR1-Protein festgestellt (Niderman et al., 1995).

Weitere Gene, die durch AHL induziert werden können, kodieren zum einen für 26 kD saure extrazelluläre (HHL / BHL) und 30 kD basische intrazelluläre Chitinase (HHL), beide gehören zu den PR3-Proteinen (Tabellen 17, 19). Während die mRNA für 26 kD saure Chitinase auch nach Behandlung mit Salicylsäure und ACC stark akkumulierte, waren bei der basischen Isoform die Induktionsfaktoren insbesondere bei den mit ACC behandelten Pflanzen deutlich niedriger. Eine dritte untersuchte Isoform, die 27 kD saure extrazelluläre Chitinase, konnte nur durch Salicylsäure leicht induziert werden. Damit reagierten diese Chitinase-Isoformen mit unterschiedlichen Expressionsmustern auf verschiedene Signalwege (Tabelle 19).

Aus der Literatur ist bekannt, dass diese drei Chitinasen in Tomatenpflanzen während einer kompatiblen oder inkompatiblen Infektion mit *C. fulvum* akkumulieren, wobei die beiden sauren Isoformen schneller reagieren (Danhash et al., 1993). Zudem wurde durch eine

Behandlung mit Salicylsäure die 26 kD Chitinase induziert, die basische 30 kD Chitinase dagegen nicht (Van Kan et al., 1995). Hydrolytische Enzyme wie Chitinasen oder  $\beta$ -1,3-Glucanasen spielen eine wichtige Rolle bei einer Infektion mit pathogenen Pilzen, da sie pilzliche Zellwände, die hauptsächlich Chitin und Glucan enthalten angreifen und durch die Freisetzung von Elicitoren die Abwehr stimulieren können (Lawrence et al., 2000). So waren Tomatenlinien, die eine höhere konstitutive Produktion dieser hydrolytischen Enzyme aufwiesen widerstandsfähiger gegenüber einer Infektion mit *A. solani* (Lawrence et al., 2000). Durch Infektion mit verschiedenen Pathogenen werden diese PR-Proteine in Tomatenpflanzen induziert, z. B. durch eine Infektion mit *A. alternata* (diese Studie), *A. solani* (Lawrence et al., 2000) oder *B. cinerea* (Benito et al., 1998; Díaz et al., 2002).

Der Proteinase-Inhibitor CEVI-57 wurde ursprünglich aus Tomatenpflanzen isoliert, die mit dem Citrus Exocortis Viroid infiziert waren (Gadea et al., 1996). Auch dieses Gen sprach auf eine Behandlung mit AHL-Molekülen an (Tabelle 17). Es konnte durch Salicylsäure und in stärkerem Maße auch durch ACC induziert werden (Tabelle 19). Dies stimmt mit Angaben in der Literatur überein, wonach CEVI-57 durch die Ethylen freisetzende Substanz Etephon verstärkt transkribiert wurde (Gadea et al., 1996).

Proteinase-Inhibitoren, insbesondere die Proteinase-Inhibitoren I und II aus Tomate, werden in Verbindung mit pflanzlichen Antworten auf Verwundungsreaktionen und Insektenfraß gebracht. Diese Proteine akkumulieren dabei in den Vakuolen von Mesophyllzellen einige Stunden nach dem Zeitpunkt der Verwundung (Ryan, 2000). Bei der Signaltransduktion während Verwundungsreaktionen wird Jasmonat und Ethylen benötigt. Proteinase-Inhibitor II Gene werden durch beide Pflanzenhormone induziert, durch Salicylsäure aber reprimiert (O'Donnell et al., 1996). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen akkumulierte die mRNA für PinII nur nach Behandlung mit ACC, Salicylsäure verringerte die Genexpression in den Tomatenblättern. Durch die beiden AHL-Moleküle wurde die Transkriptmenge nicht beeinflusst (Tabelle 19).

Eine geringe mRNA Akkumulation war bei P69, Subtilisin-ähnliche Endoproteinase, nach Behandlung mit HHL und ACC, nicht aber mit Salicylsäure zu beobachten (Tabelle 19). P69 akkumuliert im intrazellulären Raum nach Viroidinfektion, wird aber auch durch pathogene Pilze oder Nematoden, sowie durch Salicylsäure und Ethylen induziert (Tornero et al., 1996). In Tomate werden Subtilisin-ähnliche Endoproteinasen durch eine Multigenfamilie bestehend aus sechs Mitgliedern kodiert, deren Genexpression differentiell bei Pathogenbefall oder Entwicklungs-abhängigen Prozessen reguliert wird (Jordá et al., 1999, 2000).



Gen / Funktion	Accession / EST						Anschließende Infektion mit <i>A. alternata</i>		<i>A. alternata</i>
		HHL/BHL	SA	ACC	MG1	MG44	MG1	MG44	
<b>Ethylenbiosynthese und -perzeption</b>									
Le-ETR1	U38666	↑	↑↑	↑↑	n. n.	n. n.	=	=	↑↑↑
SAM-Synthetase 1	Z24741	=	↓↓↓	=	=	=	=	=	=
SAM-Synthetase 2	Z24742	=	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	=	=	n. n.
SAM-Synthetase 3	Z24743	=	=	=	=	↑	=	↓↓	↓
ACC-Synthase 1a	U74459	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 1b	U18057	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 2	X59139	n. n.	n. n.	n. n.	=	=	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 3	L34171	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Synthase 4	X59146	=	=	=	=	↑	=	↑	↑↑↑
ACC-Synthase 5	U18058	n. n.	↑	↑	n. n.	n. n.	=	=	↑↑↑
ACC-Synthase 6	AB013100	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	↑↑	n. n.
ACC-Oxidase 1	X58273	n. n.	n. n.	n. n.	=	↑	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Oxidase 2	Y00478	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
ACC-Oxidase 3	Z54199	n. n.	n. n.	n. n.	=	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.
<b>Antioxidatives System</b>									
APx20, putative Ascorbatperoxidase	P. Vera, unveröffentlicht	↑	=	=	=	=	=	=	↑
Ascorbatperoxidase	AI776158	=	n. n.	n. n.	=	=	n. n.	↑	n. n.
Glutathionperoxidase	AI782805	=	↑↑↑	=	=	=	↓	↑↑	=
Catalase 1	AI782815	=	=	=	=	=	=	↓	=
Mn Superoxiddismutase	AI774691	=	=	=	=	=	=	↓↓	=
<b>Signaltransduktion</b>									
Psenu3, Cysteinproteinase	Z48736	↑	=	=	=	↑	=	=	↑↑
SENU2, Cysteinproteinase	AJ003137	=	=	↑	=	=	=	↑	=
MAP Kinase Kinase	AJ000728	=	n. n.	n. n.	=	=	=	=	↑↑
MAP Kinase Kinase Kinase	AJ005077	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.,	n. n.	↑	=	n. n.

Gen / Funktion	Accession / EST						Anschließende Infektion mit <i>A. alternata</i>		<i>A. alternata</i>
		HHL/BHL	SA	ACC	MG1	MG44	MG1	MG44	
<b>Weitere Gene</b>									
Actin-2	ATU37281	=	=	↑	=	↑	=	↑	↑↑↑
Actin-8	ATU42007	↑	↓	=	↓↓↓	↓↓	↓↓↓	=	↑↑↑
Vacuoläre Invertase	Z12026	↑↑	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	=	=	↑↑↑↑
Pectinesterase	A24196	=	=	=	n. n.	n. n.	n. n.	↑↑	n. n.
Chlorophyll a/b bindendes Protein	AW217861	=	=	=	=	=	↑	=	↓↓↓
TOM75, Reife assoz. Membranprotein	X73847	=	=	=	=	↑	=	=	=
ERT10, kurzkettige ADH	X72730	=	n. n.	n. n.	=	=	n. n.	↑	n. n.
ERT13, unbekannt	X72731	=	=	=	=	=	↑	↓↓↓↓	=
ERT16, Stress-assoziiertes Protein	X72733	↓↓	=	=	=	=	n. n.	n. n.	↓
ERT17, Ubiquitin konjugierendes Enzym	X73419	=	=	↑	=	=	=	↑	=
SENU1, unbekannt	Z75523	↓	↓	=	=	=	=	=	↓
SEND32, unbekannt	Z75519	=	=	=	=	↑	↑	=	↓↓↓
INT22, dDTP-Glucose-4,6-Dehydratase (putativ)	D. Grierson, unveröffentlicht	=	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	n. n.	↑↑↑	n. n.
INT23, Chaperonin (putativ)	D. Grierson, unveröffentlicht	=	=	=	=	=	n. n.	↑	n. n.
INT107, unbekannt	D. Grierson, unveröffentlicht	=	n. n.	n. n.	↓↓↓	↓↓	↑↑	↑	n. n.

Diese Proteinasen sind wahrscheinlich am Umbau und der Neuorganisation der Zellen während des Zell- oder des Gewebewachstums, aber auch an Umbauprozessen der extrazellulären Matrix bei Pathogenbefall beteiligt (Heath, 2000; Jordá et al., 2000).

Ebenfalls durch HHL induziert wurde das Gen für den Ethylenrezeptor Le-ETR1 (Tabelle 19). Die Ethylenperzeption in Pflanzen erfolgt über eine Familie von Ethylenrezeptoren, von denen in *Arabidopsis thaliana* fünf Mitglieder beschrieben wurden und in Tomate sechs (Wang et al., 2002). Le-ETR1 ist ein modular aufgebautes Protein mit drei Transmembrandomainen, die die Bindungsstelle für Ethylen enthalten. Das Protein kann außerdem eine konservierte Histidinkinase und eine „receiver“ Domäne mit signifikanten Homologien zu bakteriellen Zwei-Komponenten Systemen enthalten (Chang & Shockey, 1999; Parkinson & Kofoid, 1992; Urao et al., 2000). Die Ethylenrezeptorfamilie in Tomate zeigt eine differentielle Expression in verschiedenen Geweben bei diversen Stressfaktoren (Ciardi et al., 2000; Tieman & Klee, 1999). So reagierten drei der Rezeptoren, darunter auch Le-ETR1, mit einer differentiellen Regulation auf Ozonexposition (Moeder et al., 2002) und andere auf Pathogeninfektion (Ciardi et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *A. alternata* infizierte Pflanzen ebenfalls Le-ETR1 in verstärktem Maße exprimierten. Von den an der Ethylenbiosynthese beteiligten Genen für die Isoformen der S-Adenosylmethionin (SAM) Synthetase, der ACC-Synthase (ACS) und der ACC-Oxidase (ACO) wurde unter den gegebenen Versuchsbedingungen keines durch die AHL-Moleküle und nur ACC-Synthase 5 durch Salicylsäure und ACC induziert. Insbesondere die Isoenzyme der ACC-Synthase und der ACC-Oxidase stellen hochregulierte Genfamilien dar, die schnell induziert und abgeschaltet werden. Erst kürzlich wurde in einer Studie gezeigt, wie Ozon die Genexpression der Ethylenbiosynthesegene in Tomatenpflanzen beeinflusst (Moeder et al., 2002). Dabei konnten schnelle Reaktionen innerhalb der ersten Stunde von langsameren nach zwei Stunden unterschieden werden, was eine biphasische Regulation der Ethylenbiosynthese und Perzeption nach Ozonbehandlung vermuten lässt. In unseren Versuchen wurden durch *A. alternata* zwei ACC-Synthase Isoformen induziert, ACS4 und -5. Transkripte für diese beiden Isoformen wurden auch nach Elicitor-Behandlung von Tomatenzellkulturen in erhöhten Mengen nachgewiesen, wobei ACS5 zusammen mit ACS2 und -6 wesentlich stärker induziert wurde als ACS4 (Oetiker et al., 1997).

Neben den PR-Proteinen und dem Ethylenrezeptor LeETR1 waren Gene des antioxidativen Systems (Ascorbatperoxidase), des Cytoskeletts (Actin-2), des Zuckerstoffwechsels

(vacuoläre Invertase) und eine Cysteinproteinase (SENU 3) durch die Applikation der AHL-Moleküle erhöht.

Ascorbatperoxidasen spielen zusammen mit weiteren Peroxidasen und Catalasen eine wichtige Rolle bei der Entgiftung von reaktiven Sauerstoffspezies. Auf verschiedene Stressarten reagieren Pflanzen mit der vermehrten Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, daher sind Pflanzen auf effektive Entgiftungsenzyme angewiesen (Dat et al., 2000; Desikan et al., 2001; Langebartels et al., 2002). Niedermolekulare Antioxidantien, vor allem Ascorbat und Glutathion, wirken dabei als Reduktionsmittel von ROS (Horemans et al., 1999; Neill et al., 2002). Ascorbat- und Glutathionperoxidasen kommen in nahezu allen Zellkompartimenten vor, während Catalasen auf Peroxisomen beschränkt sind (Mittler, 2002). Aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität zu H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scheinen Peroxidasen eher für die Feinregulation von ROS zuständig zu sein und Catalasen für das Entfernen hoher Mengen an ROS in Stress-Situationen (Mittler, 2002).

Die Cysteinproteinase SENU3 wurde als ein während der Seneszenz von Blättern auftretendes Transkript isoliert und nahm mit zunehmenden Blattalter zu (Drake et al., 1996). Eine Beteiligung von Cysteinproteasen am programmierten Zelltod während HR wird diskutiert (Heath, 2000). In Säugern wird bei der Apoptose, einer Form von programmiertem Zelltod, eine Familie von Cysteinproteasen, die Caspasen aktiviert, die eine Reihe von Zellbestandteilen degradieren (Green & Reed, 1998). HR assoziierter Zelltod konnte in Tabakpflanzen durch Caspaseinhibitoren ebenfalls gehemmt werden (Lam et al., 2001). Möglicherweise ist dies aber auch ein Zeichen, dass HHL-behandelte Pflanzen etwas früher in die Seneszenz eintreten, auch wenn keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen sichtbar waren.

Geringe Veränderungen konnten auch bei Actin, einem Bestandteil des Cytoskeletts beobachtet werden und bei dem Stoffwechsel-assoziierten Gen für vakuoläre Invertase (Tabelle 19). Dies deutet darauf hin, dass durch AHL-Moleküle weite Bereiche des pflanzlichen Transkriptom verändert werden. Auch nach Infektion mit *A. alternata* waren Actingene erhöht. Eine verstärkte Expression von Genen des Cytoskeletts wurde auch in Malvenpflanzen beschrieben, die mit *Colletotrichum gloeosporioides* infiziert waren (Jin et al., 1999). Dabei stiegen die Transkriptgehalte nur während der biotrophen Phase der Infektion und nahmen während der nekrotrophen Phase wieder ab. Bei den *A. alternata* – infizierten Pflanzen waren die höchsten Actin-Induktionen noch vor der Entwicklung sichtbarer Schäden nachzuweisen. Bei Pathogeninfektionen finden häufig Umbauprozesse des



Cytoskeletts statt, insbesondere wenn eine hypersensitiven Antwort (HR) ausgelöst wird (Heath, 2000). Das Actin-Cytoskelett ist dabei an Bewegungen der Organellen beteiligt.

In Tomatenpflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 behandelt wurden, waren unter den 80 mit der Arraytechnik untersuchten Genen keine Induktionen in den Blättern feststellbar. Erstaunlicherweise konnte die AHL-negative Mutante MG44 deutlich stärkere Expressionsänderungen hervorrufen, die zudem schon nach fünf Stunden nachweisbar waren. Zehn Gene wurden mit einem Faktor zwischen 2,5 und 3,3 induziert. Es werden im Wildtyp-Stamm bakterielle Gene unbekannter Funktion durch AHL-Moleküle reprimiert (Givskov et al., 1998), deren Genprodukte möglicherweise Änderungen in der pflanzlichen Genexpression hervorrufen können und dies bei fehlender AHL-Produktion auch tun.

Aus der Literatur sind nur wenige Beispiele für Transkriptänderungen nach Inokulation mit nicht-pathogenen Rhizosphärebakterien bekannt. So konnte das Rhizosphärebakterium *Paenibacillus polymyxa* in *A. thaliana* Gene induzieren, die sowohl für biotischen Stress (*PRI*; *HEL*; *AtVSP*, *A. thaliana* vegetative storage protein) als auch für abiotischen Stress charakteristisch sind (Timmusk & Wagner, 1999). Die Autoren vermuten, dass die Bakterien in diesem System einen milden Stress auf die Pflanzen ausüben und so verschiedene Abwehrmechanismen aktivieren.

Eine durch *P. fluorescens* WCS417r vermittelte ISR in *A. thaliana* geht nicht mit typischen PR-Proteinen einher. So konnte trotz intensiver Studien keine erhöhte Expression bekannter Abwehrgene in Wurzeln oder Blättern inokulierter Pflanzen nachgewiesen werden (Van Wees et al., 1999). Es wurden dabei sowohl Salicylsäure als auch Ethylen und / oder Jasmonat induzierbare Gene getestet. Selbst eine Analyse von 8000 Genen mit Hilfe der Chip-Technik ergab nur wenige Änderungen in der Genexpression, was den Schluss zulässt, dass die ISR nicht mit starken Genänderungen assoziiert ist (Pieterse et al., 2002). Damit liegen deutliche Unterschiede in der hier beschriebenen AHL-induzierten Resistenz vor. Doch auch ohne messbare Expressionsänderungen typischer Abwehr-assoziiertes Gene wird durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien die Resistenz in den Pflanzen erhöht. Pieterse et al. (2001) vermuten, dass bei *A. thaliana* eine erhöhte Abwehrkapazität in den Pflanzen besteht, die zu einer rascheren und stärkeren Stimulierung der Abwehrmechanismen führt. Für diese These spricht die Beobachtung, dass in den vorbehandelten Pflanzen das Jasmonat-induzierbare Gen *AtVSP* bei einer anschließenden Pathogeninfektion verstärkt exprimiert wird (Van Wees et al., 1997).

Solch eine potenzierte Expression („priming“) von Abwehrgenen während einer Pathogeninfektion konnte auch nach Inokulation mit dem AHL-produzierenden Rhizosphärebakterium *S. liquefaciens* MG1 festgestellt werden. Möglicherweise tragen AHL-Moleküle in den Pflanzen zu einer erhöhten Sensitivität („priming“) gegenüber nachfolgenden Pathogeninfektionen bei (Conrath et al., 2002).

In unseren Experimenten waren unabhängig von der AHL-Produktion nach Applikation der Rhizosphärebakterien und anschließender Infektion mit *A. alternata*, Qb, basische  $\beta$ -1,3-Glucanase und P69, Subtilisin-ähnliche Endoprotease z. T. mehr als fünffach induziert (Tabelle 19). Darüber hinaus waren in den Pflanzen, die mit der AHL-Nullmutante MG44 vorbehandelt und gleichzeitig mit *A. alternata* infiziert waren, noch 15 weitere Gene verstärkt exprimiert und in den mit *S. liquefaciens* MG1 vorbehandelten Pflanzen vier Gene (Tabelle 19). Damit bewirkte die fehlende AHL-Produktion bei *S. liquefaciens* MG44 auch während der Pathogeninfektion stärkere Expressionsänderungen. Erhöht waren dabei noch die PR-Proteingene PR1b1, Proteinase-Inhibitor II, Gene des antioxidativen Systems, der Ethylenbiosynthese, des Stoffwechsels und der Signaltransduktion. Auch Gene unbekannter Funktion wurden verstärkt transkribiert. Die in der Pflanze durch *S. liquefaciens* MG44 veränderten Gene scheinen jedoch keinen großen Effekt auf die Resistenz gegen *A. alternata* zu haben, da Pflanzen, die mit diesem Stamm inokuliert wurden, nur geringfügig resistenter sind als Kontrollpflanzen.

#### **4. Zusammenfassende Darstellung der an der AHL-induzierten systemischen Resistenz beteiligten Signalwege und Abwehrproteine**

Bei *Serratia liquefaciens* MG1 konnte nur der AHL-produzierende Wildtyp-Stamm eine erhöhte Resistenz in Tomatenpflanzen auslösen. Das von *S. liquefaciens* MG1 produzierte AHL-Molekül HHL bewirkte zudem pflanzliche Antworten auf Ebene der Signalstoffe und typischer PR-Proteine.

Diese Befunde und die Beobachtung, dass AHL keine HR oder Nekrosen auslösen, deuten darauf hin, dass AHL als neue generelle Elicitoren angesehen werden können, vergleichbar Flagellin und Lipopolysacchariden (LPS; Felix et al., 1999; Newman et al., 2001). Aufgereinigte LPS des Pflanzenpathogens *Xanthomonas campestris* konnten Änderungen in Abwehr-assoziierten Genen hervorrufen, z. B. die Erhöhung einer  $\beta$ -1,3-Glucanase in *Brassica* sp. (Newman et al., 2001). Außerdem wurden phenolische

Verbindungen (Hydroxycinnamoyl-Tyramin-Konjugate) nach einer Infiltration von LPS in Blättern und anschließender Infektion mit *X. campestris* rascher und in höheren Mengen gebildet (Newman et al., 2001). Flagellin führte in *Arabidopsis*-Keimlingen zu einer Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies und induzierte die PR-Proteine PR1 und PR5 (Gómez-Gómez & Boller, 2000). Die Perzeption von Flagellin erfolgt wahrscheinlich über die Rezeptor-Kinase FLS2, die nach Bindung von Flagellin eine Kaskade von Phosphorylierungsreaktionen in Gang setzt, die am Ende des Signalweges zur Aktivierung von Abwehrgenen und -reaktionen führt (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Meindl et al., 2000).

Im Gegensatz zu diesen sehr komplexen Molekülen findet man unter den generellen Elicitoren auch niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Chitinfragmente oder Ergosterol, die aus pilzlichen Zellwänden bzw. Membranen freigesetzt werden (Boller, 1995). Ergosterol, das wichtigste Sterol höherer Pilze, kann von Tomatenzellen spezifisch erkannt werden und löst für Elicitoren charakteristische Antworten aus, wie z. B. Änderungen der Membraneigenschaften, einen  $K^+$ -Efflux und eine damit einhergehende Alkalinisierung des Mediums (Granado et al., 1995). Außerdem werden nach einer Behandlung mit Ergosterol vermehrt reaktive Sauerstoffspezies, insbesondere  $H_2O_2$ , freigesetzt (Fauth et al., 1998). Neuere Studien berichten, dass Ergosterol spezifisch MAP Kinase Signalwege aktivieren kann (Cardinale et al., 2000). Dabei reagierten sowohl Stress-assoziierte MAP Kinasen als auch MAP Kinasen, die bisher als nicht induzierbar durch externe Stimuli galten. Außerdem bindet Ergosterol an Elicitine, kleine Peptidmoleküle, die von *Phytophthora* -Arten freigesetzt werden und als Elicitoren wirken. Der Elicitin-Sterol Komplex kann dann an pflanzliche Rezeptoren binden und Abwehrreaktionen wie HR und SAR auslösen (Blein et al., 2002; Osman et al., 2001a, 2001b).

AHL-Moleküle als neue niedermolekulare Elicitoren können die Anwesenheit von Fremd-Mikroorganismen anzeigen, wobei die Pflanzen nicht zwischen harmlosen Rhizosphärebakterien und Pathogenen (z. B. *Erwinia carotovora*) unterscheiden können. Möglicherweise fungiert zusätzlich zu der Wirkung der AHL-Moleküle ein noch nicht identifiziertes AHL-reguliertes Genprodukt als Auslöser einer erhöhten Resistenz in der Pflanze. Am besten charakterisiert ist in *Serratia liquefaciens* MG1 die Zelldichte-abhängige Produktion von Serrawettin W2, einer die Oberflächenspannung herabsetzenden Substanz (Eberl et al., 1999). Serrawettin ermöglicht es, spezialisierten, hyper-flagellierten Zellen über feste Oberflächen zu schwärmen. Inwieweit diese Art der schnellen Fortbewegung in der Rhizosphäre auf der Oberfläche von Pflanzenwurzeln von Bedeutung ist, ist noch weitgehend

ungeklärt, da das Phänomen des Schwärmens bisher nur auf Agarplatten beobachtet wurde (Eberl et al., 1999). Neben den Genen zur Serrawettin-Synthese werden in *S. liquefaciens* MG1 auch Komponenten eines Exoenzymexporters über ein „Quorum Sensing“-abhängiges System reguliert. Dieses Typ I Proteinsekretionssystem ist für den Export einer Lipase, einer Metalloprotease und eines S-Layer Proteins zuständig (Riedel et al., 2001). Eine Knock-out Mutation des Gens für die AHL-Synthase in dem Stamm MG44 führte zu einer fünffachen Reduktion der extrazellulären Proteaseaktivität, wodurch Elicitoren freigesetzt werden könnten (Eberl et al., 1996). Außerdem sind noch nicht alle AHL-regulierten Gene identifiziert, da in vergleichenden Analysen des Proteoms zwischen dem AHL-bildenden Stamm MG1 und dem AHL-negativen MG44 mittels 2D-Gelelektrophorese 28 Proteine mit einer veränderten Expression gefunden wurden (Givskov et al., 1998).

AHL-Moleküle als generelle Elicitoren aktivierten in Tomatenpflanzen sowohl Salicylsäure- als auch Ethylen-abhängige Abwehrantworten, was sich in der erhöhten Produktion der beiden Signalstoffe und der Aktivierung der für beide Signalwege typischen Abwehrgene widerspiegelt (Abb. 56). Diese Befunde führen zur Definition eines neuen Signalweges, der AHL induzierten systemischen Resistenz (AIR). Die AIR erfüllt die drei wichtigsten Kriterien für eine systemische Resistenz nach Van Loon et al. (1998). So ist erstens eine räumliche Trennung der Rhizosphärebakterien von dem Ort der Pathogeninfektion gewährleistet, die eventuelle antagonistische Wirkungen auf die Pathogene ausschließt. Die erhöhte Krankheitsresistenz ist allein auf systemische Reaktionen der Pflanze zurückzuführen. Zweitens wird ein Zeitraum vom Auslösen der Abwehrreaktionen bis zur Etablierung der Resistenz benötigt. Bei *S. liquefaciens* MG1 vergingen drei Tage von der Inokulation mit den Bakterien und der Pathogeninfektion. Drittens sollte das induzierende Agens keine toxischen Effekte auf die Pflanze ausüben. Eine Behandlung mit AHL führte zu keinen Läsionen oder Wachstumsrückgängen.

Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Signalwege und Abwehrkomponenten findet sich in Abb. 56. Im Unterschied zu der hier postulierten AIR verläuft die durch *P. fluorescens* WCS417r induzierte systemische Resistenz (ISR) in *A. thaliana* ohne Beteiligung von Salicylsäure, aber abhängig von einer intakten Jasmonat- und Ethylen-Signaltransduktion (Pieterse et al., 2001). Bei diesem Signalweg wird durch die Bakterien die Sensitivität gegenüber dem Pflanzenhormon Ethylen erhöht, so dass sich die Pflanzen in einem Status der erhöhten Resistenz befinden, der dann bei Pathogenbefall zu einer schnelleren und stärkeren Mobilisierung der Abwehr führen kann. Pflanzen, in denen ISR ausgelöst wurde, hatten eine erhöhte Kapazität, ACC in Ethylen umzuwandeln, obwohl ISR

nicht mit erhöhten Emissionen dieses Pflanzenhormons einhergeht (Pieterse et al., 2000). Außerdem wurde ein Jasmonat-induzierbares Gen (*AtVSP*) bei einer anschließenden Pathogeninfektion in den induzierten Pflanzen verstärkt transkribiert (Van Wees et al., 1999).

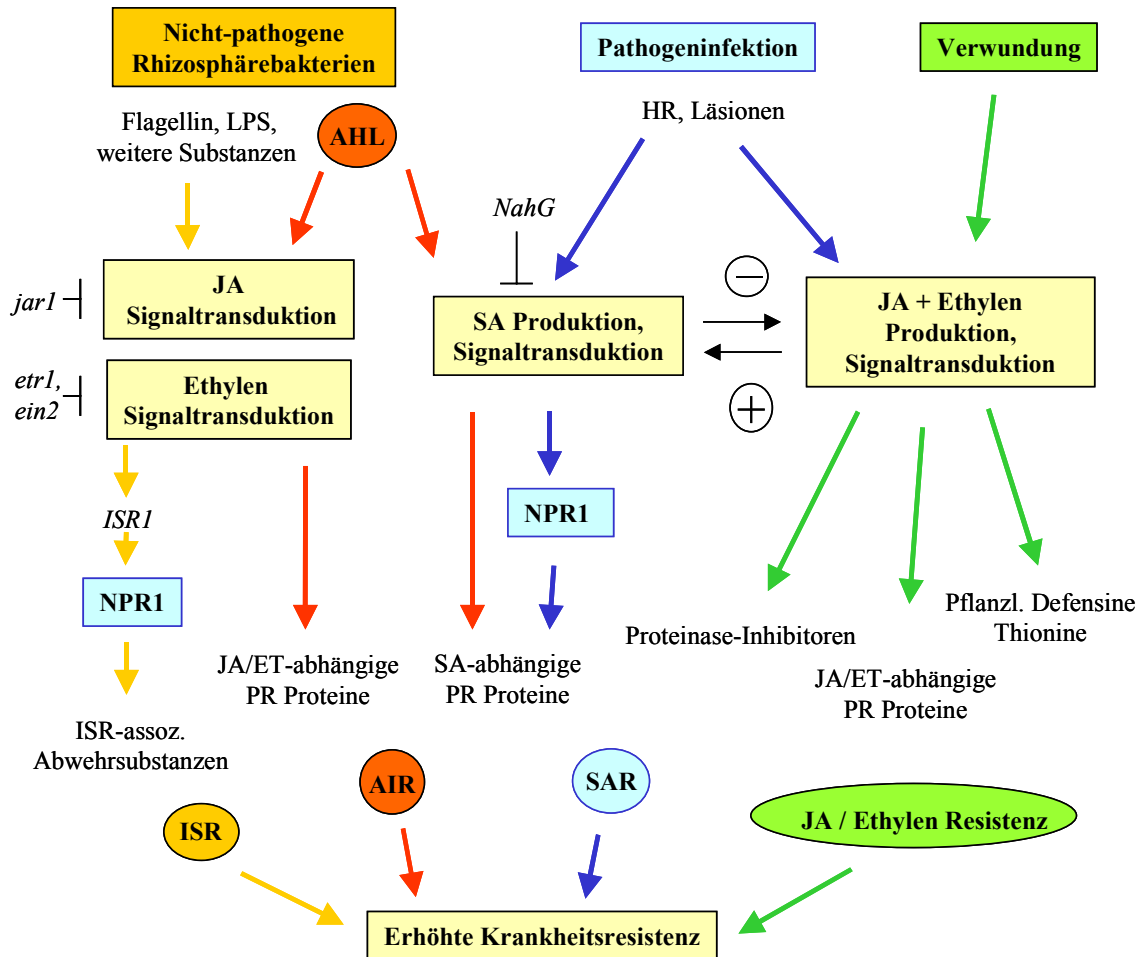


Abb. 56: Zusammenfassende Darstellung der zu einer erhöhten Krankheitsresistenz führenden Signalwege in Pflanzen. Bei der durch AHL-produzierende Rhizosphärebakterien vermittelten Resistenz (AIR) ist sowohl Salicylsäure als auch Ethylen beteiligt, wobei PR-Proteine induziert werden, die von beiden Signalstoffen abhängig sind. Das regulatorische Protein NPR1 wird sowohl bei der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) als auch bei durch nicht-pathogene Rhizosphärebakterien ausgelösten ISR benötigt, wobei nur bei der SAR charakteristische PR-Proteine induziert werden. *Arabidopsis*-Mutanten, die einen Defekt in der Jasmonat- (*jar1*) oder Ethylen-Signaltransduktion (*etr1*, *ein2*) haben können keine ISR ausbilden. Transgene Pflanzen (*nahG*), die keine Salicylsäure akkumulieren, haben einen Defekt in der SAR. Die einzelnen Signalwege können sich gegenseitig aktivieren oder hemmen. Das Schema wurde modifiziert nach Pieterse & Van Loon (1999) und Pieterse et al. (2001).

Diese Art des „priming“ findet man auch bei anderen Varianten der induzierten systemischen Resistenz, z. B. bei SAR (Conrath et al., 2002). Auch chemische Substanzen, z. B. Salicylsäure-Analoga oder  $\beta$ -Aminobuttersäure, führen in Pflanzen zu einem Status erhöhter Resistenz, der dann bei Pathogenbefall mit einer potenzierten Expression von Abwehrgenen einhergehen kann (Conrath et al., 2002; Zimmerli et al., 2000).

Inwieweit dieses Phänomen auch bei der durch *S. liquefaciens* MG1 ausgelösten Resistenz eine Rolle spielt, ist noch weitgehend unklar. Möglicherweise reicht die geringe Erhöhung der Ethylenemission bei Zugabe der Bakterien aus, um die Pflanzen in einen Zustand der „erhöhten Wachsamkeit“ zu versetzen. Dafür spricht, dass bei anschließender Infektion mit *A. alternata* einige Abwehrgene (z. B. basische  $\beta$ -1,3-Glucanase, P69) verstärkt transkribiert werden, während vor der Pathogeninfektion bei *S. liquefaciens* MG1 keine Abwehrgene erhöht vorliegen (Tabelle 19).

Die unterschiedlichen Signalwege bei AIR und der durch *P. fluorescens* WCS417r ausgelösten ISR könnten möglicherweise dadurch erklärt werden, dass *P. fluorescens* keine detektierbaren Mengen an AHL bildet. Der AHL-Sensorstamm *E. coli* MT102, der das Sensorplasmid pJB132 trägt, reagierte nicht mit der Expression des Reportergenes *gfp* in Gegenwart des Stammes WCS417r (A. Steidle, L. Eberl, Institut für Mikrobiologie, TU München, unveröffentlicht). Dieses Konstrukt enthält das *luxR*-Gen aus *Vibrio fischeri* und den Promotor der AHL-Synthase *luxI* und reagiert am stärksten auf OHHL (Nachweisgrenze etwa 5 nM) und etwa 10fach schwächer auf HHL, OHL und OddHL (Anderson et al., 2001). Für BHL nimmt die Sensitivität etwa 500fach ab. Dennoch deckt dieser Sensorstamm eine breite Palette an AHL-Molekülen ab, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass *P. fluorescens* WCS417r nicht noch andere AHL-Moleküle bildet.

Die einzelnen Signalwege agieren nicht unabhängig voneinander, sondern stehen in einem hochregulierten Netzwerk untereinander (Kunkel & Brooks, 2002). Microarray-Analysen mit Tausenden von Genen zeigten dies sehr deutlich, da diverse Gene auf verschiedene Signalstoffe wie Salicylsäure, Ethylen oder Jasmonat ansprechen (Schenk et al., 2000). Ähnliche überlappende Geninduktionen waren in dieser Studie zu beobachten, obwohl nur eine verhältnismäßig geringe Anzahl von Genen (80) untersucht wurde, die aber die wichtigsten bisher bekannten Abwehrproteine in Tomate umfasste (Abb. 55).

Jasmonat- und Ethylen-abhängige Signalwege haben meist eine synergistische Wirkung, während Salicylsäure antagonistisch auf Jasmonat-vermittelte Reaktionen wirkt (Abb. 56; Kunkel & Brooks, 2002; Reymond & Farmer, 1998). Daneben sind aber auch

Beispiele beschrieben, wonach Abwehrgene ohne Beteiligung bekannter Signalwege induziert werden (Guo et al., 2000). Es ist daher nicht auszuschließen, dass auch bei AIR Salicylsäure bzw. Ethylen / Jasmonat-unabhängige Signalwege involviert sind.

Eine gleichzeitige Aktivierung verschiedener Signalwege kann zu einer höheren Resistenz führen als ein Weg allein. Solch eine additive Wirkung entsteht, wenn in Pflanzen eine ISR zusammen mit einer SAR ausgelöst wird (Van Wees et al., 2000). Ob AIR zusammen mit SAR ebenfalls zu einer erhöhten Widerstandskraft führen oder das Spektrum der Resistenz gegen verschiedene Pathogene erweitern kann, muss in weiteren Studien erst noch geklärt werden.

## 5. Ausblick

Nachdem in dieser Arbeit ein erster Einblick in die Bedeutung von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen (AHL) als generelle Elicitoren von pflanzlichen Abwehrreaktionen gelungen ist, sollte in weiterführenden Studien das Zusammenspiel der verschiedenen Signalwege genauer charakterisiert werden. Mutanten, die entweder in der Biosynthese oder der Signaltransduktion der Signalstoffe Ethylen, Jasmonat und Salicylsäure defekt sind, könnten Informationen liefern, welche Rolle diese Substanzen bei AIR im Vergleich zu ISR und SAR spielen. So stellt sich z. B. die Frage, ob auch AIR, ähnlich wie ISR und SAR, von dem regulatorischen Protein NPR1 abhängig ist (Pieterse et al., 1998).

Untersuchungen pflanzlicher Abwehrreaktionen bei einer Interaktion mit AHL-Molekülen unterschiedlicher *N*-Acylseitenketten sollten weiter intensiviert und auf reaktive Sauerstoffspezies und an deren Bildung bzw. deren Abbau beteiligte Enzymsysteme ausgedehnt werden. Die Verwendung einer cDNA-Bank von AIR-ausbildenden Pflanzen in Kombination mit Microarray-Technik könnte zur Identifizierung weiterer AIR-assoziierter Gene führen. Eine ähnliche Studie zur Genexpression Viroid-behandelter Tomatenpflanzen wurde erst kürzlich veröffentlicht, wonach mit Hilfe einer über 1000 Gene umfassenden subtraktiven cDNA-Bank Transkriptänderungen untersucht wurden (Itaya et al., 2002). Dabei bietet es sich an, die Untersuchungen auch auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* auszudehnen. Für diese Pflanze sind bereits genomweite Microarrays kommerziell erhältlich und gut charakterisierte Signalmutanten stehen zur Verfügung (Glazebrook, 2001). Die in Tomatenpflanzen cv. MicroTom und *A. thaliana* gefundenen AIR-assozierten Gene und

Abwehrsubstanzen könnten dann hinsichtlich ihres Auftretens mit weiteren Tomatensorten und anderen Nutzpflanzen wie Tabak oder Kartoffel verglichen werden.

Wichtig zu wissen wäre auch, ob eine Infiltration von AHL-Molekülen in Blätter oder eine Applikation an die Wurzeln ausreicht, um eine systemische Resistenz gegen verschiedene Pathogene hervorzurufen. Die Identifizierung des Genlocus *ISR1* in *A. thaliana* gelang mit Hilfe des Vergleichs verschiedener Ökotypen dieser Pflanze (Ton et al., 1999). Ähnliche Studien könnten auch zur Identifizierung AIR-assoziiierter Genloci führen. Ein anderer Ansatz wäre das Untersuchen von mutagenisierten Pflanzenpopulationen auf ihre Fähigkeit hin, AIR zu entwickeln. Die Sorte MicroTom eignet sich aufgrund ihres Zwergwuchses besonders gut für diese Art von Experimenten, z. B. für eine chemische Mutagenese mit Ethylmethansulfonat (EMS). Beispiele für EMS-mutagenisierte Populationen von Tomate sind in Emmanuel & Levy (2002) beschrieben. EMS induziert Punktmutationen und man schätzt, dass eine Population von 3000 Pflanzen ungefähr 20 Mutationen pro Gen umfasst (Colbert et al., 2001).

Die Perzeption von AHL-Molekülen, ihre Aufnahme und möglicher Transport in Pflanzen ist noch völlig ungeklärt. Generelle Elicitoren wie Flagellin, Glucane oder Elicidine werden über spezifische Rezeptoren in der Zellwand erkannt (Blein et al., 2002; Ebel & Mithöfer, 1998; Gómez-Gómez & Boller, 2002). Daher steht die Suche nach einem möglichen pflanzlichen AHL-Rezeptor im Vordergrund weiterführender Studien. In gramnegativen Bakterien binden AHL-Moleküle an spezielle Rezeptoren der *luxR*-Familie, die an spezielle Promotorsequenzen binden und dann die Transkription bestimmter Gene aktivieren oder reprimieren (Fuqua et al., 1996). Die Suche nach *luxR* Consensussequenzen im Genom von *A. thaliana* könnte zur Klonierung möglicher AHL-Rezeptorgene führen. Gleichzeitige Studien mit radioaktiv markierten AHL-Molekülen sollten Hinweise liefern, ob und wie AHL in pflanzlichen Zellen aufgenommen werden und an Proteine binden. Kurzkettige AHL-Moleküle diffundieren durch bakterielle Zellwände, langkettige passieren durch aktiven Transport die Zellwände (Eberl, 1999).

Von großem Interesse ist schließlich eine mögliche Anwendung von AHL-produzierenden Rhizosphärebakterien oder von AHL-Molekülen als Pflanzenstärkungsmittel in der Landwirtschaft. Die Ausbringung von Biocontrol-Bakterien im Freiland gestaltet sich häufig als schwierig, da sich die Bakterien erst in der natürlichen Flora etablieren müssen, um ihre Wirkung zu entfalten (Zehnder et al., 2001). Die Ausbringung von AHL-Molekülen oder Derivaten von AHL-Molekülen wäre daher eine einfache Alternative.



## V. Zusammenfassung

In der Rhizosphäre lebende Bakterien können die Widerstandskraft von Pflanzen gegenüber Pathogeninfektionen steigern und so das Wachstum und den Ertrag von Nutzpflanzen erhöhen. Viele dieser Pflanzen-assoziierten Bakterien produzieren *N*-Acyl-L-homoserinlactone (AHL), die Zelldichte-abhängig die Produktion von Antibiotika oder Exoenzymen steuern. Ziel dieser Arbeit war es, die Abwehrreaktionen von Tomatenpflanzen bei einer Interaktion mit AHL – produzierenden Rhizosphärebakterien zu untersuchen.

(1) Eine Inokulation mit dem ubiquitär vorkommenden Rhizosphärebakterium *Serratia liquefaciens* MG1 konnte die Krankheitsresistenz der Pflanzen gegenüber dem sprosspathogenen Pilz *Alternaria alternata* erhöhen. Dies äußerte sich in einer signifikanten Reduzierung der Blattschäden um bis zu 70 %. Diese Biocontrol-Aktivität war von der Produktion von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen (AHL) abhängig, da eine Inokulation der Pflanzen mit der AHL-negativen Mutante MG44 zu ähnlich hohen Blattschäden führte wie bei Kontrollpflanzen. Gegenüber anderen perthotrophen Pilzen wie *Botrytis cinerea* und *Cladosporium herbarum* konnte keine Biocontrol-Aktivität festgestellt werden.

(2) Es konnte erstmals eine *in situ* Produktion von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen in der Rhizosphäre von Tomatenpflanzen cv. MicroTom nachgewiesen werden. Tomatenpflanzen wurden dabei mit einem AHL-Sensorstamm inokuliert, der AHL-Moleküle durch die Bildung des grün fluoreszierenden Proteins (Gfp) anzeigte. Das Kolonisierungsverhalten des Wildtyp-Stammes von *S. liquefaciens* und seiner korrespondierenden AHL-Nullmutante war vergleichbar. Ein Vordringen von *S. liquefaciens* MG1 von den Wurzeln in die Blätter konnte nicht nachgewiesen werden. Direkte Interaktionen der Bakterien mit den im Sprossbereich inokulierten pathogenen Pilzen können daher ausgeschlossen werden.

(3) Eine Quantifizierung von *A. alternata* DNA in Blättern mittels Real-Time PCR ergab in Pflanzen, die mit *S. liquefaciens* MG1 vorbehandelt wurden, um 79 % niedrigere DNA-Gehalte als in Kontrollpflanzen. Bei Pflanzen, die mit der AHL-Nullmutante MG44 inokuliert wurden und bei Kontrollpflanzen war die Menge an Pilz-DNA vergleichbar. Die Blattschäden korrelierten dabei sehr gut mit den DNA-Gehalten. Zuvor wurden im Rahmen dieser Arbeit Primer, basierend auf den ITS-Regionen für *A. alternata* entwickelt, deren Spezifität gegen eine DNA-Bank aus über 80 verschiedenen tomatenpathogenen Pilzen getestet wurde.

(4) Zum ersten Mal konnte ein Einfluss von Rhizosphärebakterien auf die Produktion pflanzlicher Signalstoffe gezeigt werden. Eine Besiedelung der Wurzeln mit *S. liquefaciens* MG1 führte zu einer systemischen Erhöhung der Ethylenbiosynthese in den Blättern in den ersten Stunden nach Zugabe der Bakterien und einer Induktion von Salicylsäure und Gentisinsäure (2,5-Dihydroxybenzoesäure) drei Tage nach Inokulation. Zudem führte eine Applikation von *N*-Hexanoyl-homoserinlacton (HHL) zu signifikant erhöhten Salicylsäuregehalten in den Wurzeln.

(5) Untersuchungen der Expression von Abwehrgenen aus Tomate mit der Macroarray-Technik zeigten eine systemische Induktion von wichtigen PR- (pathogenesis related) Proteingenen, insbesondere des Salicylsäure-abhängigen PR-Proteins PR1a, durch HHL. Über Northern-Blot-Analysen wurden diese Befunde verifiziert. Auch Ethylen-abhängige Gene waren aktiviert, z. B. Proteinase-Inhibitor CEVI-57 oder 30 kD basische Chitinase. Eine Inokulation der Tomatenpflanzen mit der AHL-Nullmutante *S. liquefaciens* MG44 bewirkte nur leicht erhöhte Gehalte an Abwehrgenen, sowie Genen des Ethylenstoffwechsels; diese Änderungen konnte der Wildtyp-Stamm nicht hervorrufen. Nach einer Infektion mit dem Pathogen *A. alternata* waren 22 der 80 untersuchten Gene erhöht und 5 reprimiert. Zudem zeigten die PR-Proteine Qb, basische  $\beta$ -1,3-Glucanase und P69, Subtilisin-ähnliche Endoproteinase eine verstärkte Transkriptakkumulation in den inokulierten Pflanzen.

(6) Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Produktion von *N*-Acyl-L-homoserinlactonen eine wichtige Rolle bei der Biocontrol-Aktivität, d. h. der Reduktion von pflanzlichen Krankheitssymptomen, von *S. liquefaciens* MG1, spielt. Bei dieser AHL-induzierten systemischen Resistenz (AIR) sind mehrere Signalwege beteiligt; es werden sowohl Salicylsäure- wie auch Ethylen-abhängige Abwehrgene in ihrer Expression erhöht. Es kann gefolgert werden, dass AHL als neue generelle Elicitoren pflanzliche Abwehrreaktionen aktivieren und damit zur Erhöhung der pflanzlichen Resistenz beitragen können.

## VI. Literaturverzeichnis

- Abeles, F. B., Morgan, P. W. & Saltveit, M. E. (1992). *Ethylene in Plant Biology*, Academic Press. New York.
- Agrios, G. N. (1997). *Plant Pathology*, Academic Press. San Diego, California.
- Alexander, D., Goodman, R. M., Gut-Rella, M., Glascock, C., Weymann, K., Friedrich, L., Maddox, D., Ahl-Goy, P., Luntz, T., Ward, E. & Ryals, J. (1993). Increased tolerance to two Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 7327-7331.
- Alström, S. (1991). Induction of disease resistance in common bean. *J General Appl Microbiol*, **37**, 495-498.
- Alvarez, M. E. (2000). Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Mol Biol*, **44**, 429-442.
- Anderson, J. B., Heydorn, A., Hentzer, M., Eberl, L., Geisenberger, O., Christensen, B. B., Molin, S. & Givskov, M. (2001). *gfp*-based *N*-acyl homoserine-lactone sensor systems for detection of bacterial communication. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 575-585.
- Arteca, J. M. & Arteca, R. N. (1999). A multi-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase (*ACS6*) in mature *Arabidopsis* leaves. *Plant Mol Biol*, **39**, 209-219.
- Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P. & Höfte, M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2: Role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 1147-1156.
- Bahnweg, G., Schubert, R., Kehr, R. D., Müller-Starck, G., Heller, W., Langebartels, C. & 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.
- Bahnweg, G., Schulze, S., Möller, E. M., Rosenbrock, H., Langebartels, C. & Sandermann, H. (1998). DNA isolation from recalcitrant materials such as tree roots, bark, and forest soil for the detection of fungal pathogens by polymerase chain reaction. *Anal Biochem*, **262**, 79-82.
- Barka, E. A., Belarbi, A., Hachet, C., Nowak, J. & Audran, J.-C. (2000). Enhancement of in vitro growth and resistance to gray mold of *Vitis vinifera* co-cultured with plant growth-promoting rhizobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **186**, 91-95.
- Barry, C. S., Blume, B., Bouzayen, M., Cooper, W., Hamilton, A. J. & Grierson, D. (1996). Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *Plant J*, **9**, 525-535.
- Barry, C. S., Fox, E. A., Yen, H.-C., Lee, S., Ying, T.-J., Grierson, D. & Giovannoi, J. J. (2001). Analysis of the ethylene response in the *epinastic* mutant of tomato. *Plant Physiol*, **127**, 58-66.
- Beers, E. P. & McDowell, J. M. (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 561-567.
- Belandreau, J. & Knowles, R. (1978). *Interactions between non-pathogenic Soil Microorganisms and Plants*. Elsevier, London.
- Bellés, J. M., Garro, R., Fayos, J., Navarro, P., Primo, J. & Conejero, V. (1999). Gentisic acid as a pathogen-inducible signal, additional to salicylic acid for activation of plant defenses in tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 227-235.
- Benito, E. P., ten Have, A., van 't Klooster, J. W. & van Kan, J. A. L. (1998). Fungal and plant gene expression during synchronized infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Eur J Plant Pathol*, **104**, 207-220.

- Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. & Smalla, K. (2002). Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 3328-3338.
- Berger, S. (2002). Jasmonate-related mutants of *Arabidopsis* as tools for studying stress signaling. *Planta*, **214**, 497-504.
- Beyeler, M., Keel, C., Michaux, P. & Haas, D. (1999). Enhanced production of indole-3-acetic acid by a genetically modified strain of *Pseudomonas fluorescens* CHA0 affects root growth of cucumber, but does not improve protection of the plant against *Pythium* root rot. *FEMS Microbiol Ecol*, **28**, 225-233.
- Bi, Y.-M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R. & Draper, J. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *Plant J*, **8**, 235-245.
- Biles, C. L., Abeles, F. B. & Wilson, C. L. (1990). The role of ethylene in anthracnose of cucumber, *Cucumis sativus*, caused by *Colletotrichum lagenarium*. *Phytopathology*, **80**, 732-736.
- Blancard, D. (1997). *A Colour Atlas of Tomato Diseases. Observation, Identification and Control*. John Wiley & Sons, New York.
- Blein, J.-P., Coutons-Thüvenot, P., Marion, D. & Ponchet, M. (2002). From elicitors to lipid-transfer proteins: A new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci*, **7**, 293-296.
- Bloemberg, G. V. & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 343-350.
- Boettcher, K. J. & Ruby, E. G. (1995). Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J Bacteriol*, **177**, 1053-1058.
- Boller, T. (1995). Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **46**, 189-214.
- Bonas, U. & Van den Ackerveken, G. (1997). Recognition of bacterial avirulence proteins occurs inside the plant cell: A general phenomenon in resistance to bacterial diseases. *Plant J*, **12**, 1-7.
- Bostock, R. M. (1999). Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiol Mol Plant Pathol*, **55**, 99-109.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F. & Martin-Tanguy, J. (1999). Polyamines and environmental challenges: Recent development. *Plant Science*, **140**, 103-125.
- Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. & Höfte, M. (1996). Involvement of pyochelin and pyoverdine in suppression of *Pythium*-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Appl Environ Microbiol*, **62**, 865-871.
- Cameron, R. K., Paiva, N. L., Lamb, C. J. & Dixon, R. A. (1999). Accumulation of salicylic acid and PR-1 gene transcripts in relation to the systemic acquired resistance (SAR) response induced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **55**, 121-130.
- Campbell, B. & Thomson, J. A. (1996). 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase genes from *Pseudomonas* strains. *FEMS Microbiol Lett*, **138**, 207-210.
- Cardinale, F., Jonak, C., Ligterink, W., Niehaus, K., Boller, T. & Hirt, H. (2000). Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. *J Biol Chem*, **275**, 36734-36740.
- Cha, C., Gao, P., Chen, Y.-C., Shaw, P. D. & Farrand, S. K. (1998). Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, **11**, 1119-1129.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, **263**, 802-805.

- Chamnongpol, S., Willekens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Camp, W. (1998). Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 5818-5823.
- Chancey, S. T., Wood, D. W. & Pierson III, L. S. (1999). Two-component transcriptional regulation of *N*-acyl-homoserine lactone production in *Pseudomonas aureofaciens*. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2294-2299.
- Chang, C. & Shockey, J. A. (1999). The ethylene-response pathway: Signal perception to gene regulation. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 352-358.
- Charkowski, A. O., Alfano, J. R., Preston, G., Yuan, L., He, S. Y. & Collmer, A. (1998). The *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate. *J Bacteriol*, **180**, 5211-5217.
- Chen, Z., Silva, H. & Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, **262**, 1883-1886.
- Chin-A-Woeng, T. F. C., de Priester, W., van der Bij, A. J. & Lugtenberg, B. J. J. (1997). Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 79-86.
- Ciardi, J. A., Tieman, D. M., Lund, S. T., Jones, J. B., Stall, R. E. & Klee, H. J. (2000). Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiol*, **123**, 81-92.
- Colbert, T., Till, B. J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M. N., Yeung, A. T., McCallum, C. M., Comai, L. & Henikoff, S. (2001). High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol*, **126**, 480-484.
- Conconi, A., Smerdon, M. J., Howe, G. A. & Ryan, C. A. (1996). The octadecanoid signalling pathway in plants mediates a response to ultraviolet radiation. *Nature*, **383**, 826-829.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. & Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci*, **7**, 210-216.
- Costet, L., Cordelier, S., Dorey, S., Baillieul, F., Fritig, B. & Kauffmann, S. (1999). Relationship between localized acquired resistance (LAR) and the hypersensitive response (HR): HR is necessary for LAR to occur and salicylic acid is not sufficient to trigger LAR. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 655-662.
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 4114-4119.
- Danhash, N., Wagemakers, C. A. M., van Kan, J. A. L. & de Wit, P. J. G. M. (1993). Molecular characterization of four chitinase cDNAs obtained from *Cladosporium fulvum*-infected tomato. *Plant Mol Biol*, **22**, 1017-1029.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*, **57**, 779-795.
- De Meyer, G., Audenaert, K. & Höfte, M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2-induced systemic resistance in tobacco depends on *in planta* salicylic acid accumulation but is not associated with PR1a expression. *Eur J Plant Pathol*, **105**, 513-517.
- De Meyer, G., Capieau, K., Audenaert, K., Buchala, A., Métraux, J.-P. & Höfte, M. (1999). Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 450-458.

- De Meyer, G. & Höfte, M. (1997). Salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 induces resistance to leaf infection by *Botrytis cinerea* on bean. *Phytopathology*, **87**, 588-593.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. & Lamb, C. (2001). Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, **98**, 13454-13459.
- Desikan, R., Clarke, A., Atherford, P., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (1999). Harpin induces mitogen-activated protein kinase activity during defence responses in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Planta*, **210**, 97-103.
- Desikan, R., Mackerness, S. A. H., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol*, **127**, 159-172.
- Desikan, R., Reynolds, A., Hancock, J. T. & Neill, S. J. (1998). Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. *Biochem J*, **330**, 115-120.
- Díaz, J., ten Have, A. & van Kan, J. A. L. (2002). The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, **129**, 1341-1351.
- Dong, X. (1998). SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 316-323.
- Dong, Y.-H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J.-L. & Zhang, L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching *N*-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 1754-1759.
- Dong, Y.-H., Xu, J.-L., Li, X.-C. & Zhang, L.-H. (2000). AiiA, a novel enzyme that inactivates acyl homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 3526-3531.
- Donson, J., Fang, Y., Espiritu-Santo, G., Xing, W., Salazar, A., Miyamoto, S., Armendarez, V. & Volkmuth, W. (2002). Comprehensive gene expression analysis by transcript profiling. *Plant Mol Biol*, **48**, 75-97.
- Doss, R. & Welty, R. E. (1995). A polymerase chain reaction-based procedure for detection of *Acremonium coenophialum* in tall fescue. *Phytopathology*, **85**, 913-917.
- Drake, R., John, I., Farrel, A., Cooper, W., Schuch, W. & Grierson, D. (1996). Isolation and analysis of cDNAs encoding tomato cysteine proteases expressed during leaf senescence. *Plant Mol Biol*, **30**, 755-767.
- Draper, J. (1997). Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci*, **2**, 162-166.
- Duffy, B. K. & Défago, G. (1999). Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2429-2438.
- Duijff, B. J., Gianinazzi-Pearson, V. & Lemanceau, P. (1997). Involvement of the outer membrane lipopolysaccharides in the endophytic colonization of tomato roots by biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain WCS417r. *New Phytol*, **135**, 325-334.
- Duijff, B. J., Recorbet, G., Bakker, P. A. H. M., Loper, J. E. & Lemanceau, P. (1999). Microbial antagonism at the root level is involved in the suppression of Fusarium wilt by the combination of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and *Pseudomonas putida* WCS358. *Phytopathology*, **89**, 1073-1079.
- Durner, J. & Klessig, D. (1995). Inhibition of ascorbate peroxidase by salicylic acid and 2,6-dichloroisonicotinic acid, two inducers of plant defense responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 11312-11316.
- Durner, J. & Klessig, D. F. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*, **2**, 369-374.
- Durner, J., Shah, J. & Klessig, D. F. (1997). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, **2**, 266-274.

- Ebel, J. (1999). Glucan elicitor-activated defense responses in soybean. In *Different Pathways through Life*, eds. A. Denke, K. Dornisch, F. Fleischmann & et al., Lincom. München, pp. 282-298.
- Ebel, J. & Mithöfer, A. (1998). Early events in the elicitation of plant defense responses. *Planta*, **206**, 335-348.
- Eberl, L. (1999). N-Acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *System Appl Microbiol*, **22**, 493-506.
- Eberl, L., Molin, S. & Givskov, M. (1999). Surface motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, **181**, 1703-1712.
- Eberl, L., Winson, M. K., Sternberg, C., Stewart, G. S. A. B., Christensen, G., Chabra, R. S., Bycroft, B., Williams, P., Molin, S. & Givskov, M. (1996). Involvement of N-acyl-L-homoserine lactone autoinducers in controlling the multicellular behavior of *Serratia liquefaciens*. *Mol Microbiol*, **20**, 127-136.
- Elad, Y. (1990). Production of ethylene by tissues of tomato, pepper, french-bean and cucumber in response to infection by *Botrytis cinerea*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **36**, 277-287.
- Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickmann, E., Oger, P. M. & Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 1198-1209.
- Emmanuel, E. & Levy, A. A. (2002). Tomato mutants as tools for functional genomics. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 112-117.
- Enyedi, A. J. & Raskin, I. (1993). Induction of UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase activity in tobacco mosaic virus-inoculated tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. *Plant Physiol*, **101**, 1375-1380.
- Enyedi, A. J., Yalpani, N., Silverman, P. & Raskin, I. (1992). Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**, 2480-2484.
- Eyal, Y., Meller, Y., Ladun, S. & Fluhr, R. (1993). A basic-type PR-1 promoter directs ethylene responsiveness, vascular and abscission zone-specific expression. *Plant J*, **4**, 225-234.
- Fauth, M., Schweizer, P., Buchala, A., Markstädter, C., Riederer, M., Kato, T. & Kauss, H. (1998). Cutin monomers and surface wax constituents elicit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elicitors. *Plant Physiol*, **117**, 1373-1380.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J*, **18**, 265-276.
- Fidantsef, A. L., Stout, M. J., Thaler, J. S., Duffey, S. S. & Bostock, R. M. (1999). Signal interactions in pathogen and insect attack: Expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiol Mol Plant Pathol*, **54**, 97-114.
- Finkelstein, D., Ewing, R., Gollub, J., Sterky, F., Cherry, J. M. & Somerville, S. (2002). Microarray data quality analysis: Lessons from the AFGC project. *Plant Mol Biol*, **48**, 119-131.
- Fray, R. G. (2002). Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing. *Annals Bot*, **89**, 245-253.
- Fray, R. G., Throup, J. P., Daykin, M., Wallace, A., Williams, P., Stewart, G. S. A. B. & Grierson, D. (1999). Plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones communicate with bacteria. *Nature Biotechnol*, **17**, 1017-1020.

- Fuqua, C., Winans, S. C. & Greenberg, E. P. (1996). Census and Consensus in bacterial ecosystems: The LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol*, **50**, 727-751.
- Fuqua, W. C. & Winans, S. C. (1994). A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol*, **176**, 2796-2806.
- Gadea, J., Mayda, M. E., Conejero, V. & Vera, P. (1996). Characterization of defense-related genes ectopically expressed in viroid-infected tomato plants. *Mol Plant Microbe Interact*, **9**, 409-415.
- Gil-ad, N. L. & Mayer, A. M. (1999). Evidence for rapid breakdown of hydrogen peroxide by *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett*, **176**, 455-461.
- Givskov, M., de Nys, R., Manefeld, M., Gram, L., Maximilien, R., Eberl, L., Molin, S., Steinberg, P. D. & Kjelleberg, S. (1996). Eukaryotic interference with homoserine lactone-mediated prokaryotic signalling. *J Bacteriol*, **178**, 6618-6622.
- Givskov, M., Eberl, L. & Molin, S. (1997). Control of exoenzyme production, motility and cell differentiation in *Serratia liquefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*, **148**, 115-122.
- Givskov, M., Olson, L. & Molin, S. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the gene for an extracellular phospholipase from *Serratia liquefaciens*. *J Bacteriol*, **170**, 5855-5862.
- Givskov, M., Östling, J., Eberl, L., Lindum, P. W., Christensen, A. B., Christiansen, G., Molin, S. & Kjelleberg, S. (1998). Two separate regulatory systems participate in control of swarming motility of *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, **180**, 742-745.
- Glazebrook, J. (2001). Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis* - 2001 status. *Curr Opin Plant Biol*, **4**, 301-308.
- Glick, B. R., Penrose, D. M. & Li, J. (1998). A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol*, **190**, 63-68.
- Gómez-Gómez, L. & Boller, T. (2002). Flagellin perception: A paradigm for innate immunity. *Trends Plant Sci*, **7**, 251-256.
- Gómez-Gómez, L. & Boller, T. (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, **5**, 1003-1011.
- Govan, J. R. W., Hughes, J. E. & Vandamme, P. (1996). *Burkholderia cepacia*: Medical, taxonomic and ecological issues. *J Med Microbiol*, **45**, 395-407.
- Govrin, E. M. & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr Biol*, **10**, 751-757.
- Granado, J., Felix, G. & Boller, T. (1995). Perception of fungal sterols in plants. Subnanomolar concentrations of ergosterol elicit extracellular alkalization in tomato cells. *Plant Physiol*, **107**, 485-490.
- Green, D. R. & Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.
- Grimmont, F. & Grimmont, P. A. D. (1992). The genus *Serratia*. In *The prokaryotes - a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*, eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder & K. H. Schleifer, Vol. III, Springer Verlag. New York, pp. 2823-2848.
- Guo, A., Salih, G. & Klessig, D. F. (2000). Activation of a diverse set of genes during the tobacco resistance response to TMV is independent of salicylic acid; induction of a subset is also ethylene independent. *Plant J*, **21**, 409-418.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hanzelka, B. L., Parsek, M. R., Val, D. L., Dunlap, P. V., Cronan Jr, J. E. & Greenberg, E. P. (1999). Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS Protein. *J Bacteriol*, **181**, 5766-5770.



- Hastings, J. W. & Greenberg, E. P. (1999). Quorum sensing: The explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. *J Bacteriol*, **181**, 2667-2668.
- He, S. Y., Huang, H.-C. & Collmer, A. (1993). *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpin<sub>PSS</sub>: A protein that is secreted via the Hrp pathway and elicits the hypersensitive response in plants. *Cell*, **73**, 1255-1266.
- Heath, M. C. (2000). Hypersensitive response-related death. *Plant Mol Biol*, **44**, 321-334.
- Heiden, A. C., Hoffmann, T., Kahl, J., Kley, D., Klockow, D., Langebartels, C., Mehlhorn, H., Sandermann, H., Schraudner, M., Schuh, G. & Wildt, J. (1999). Emission of volatile organic compounds from ozone-exposed plants. *Ecol Appl*, **9**, 1160-1167.
- Heil, M. (2001). The ecological concept of costs of induced systemic resistance (ISR). *Eur J Plant Pathol*, **107**, 137-146.
- Hock, B. & Elstner, E. F. (1995). *Schadwirkungen auf Pflanzen, Spektrum*. Heidelberg.
- Hoffmann, G. M., Nienhaus, F., Poehling, H.-M., Schönbeck, F., Weltzien, H. C. & Wilbert, H. (1994). *Lehrbuch der Phytomedizin*, Blackwell Wissenschafts-Verlag. Berlin.
- Horemans, N., Foyer, C. & Asard, H. (1999). The functions of ascorbate and ascorbate transport systems in plant membranes. In *Different Pathways through Life*, eds. A. Denke, K. Dornisch, F. Fleischmann & et al., Lincom. München, pp. 217-238.
- Itaya, A., Matsuda, Y., Gonzales, R. A., Nelson, R. S. & Ding, B. (2002). *Potato spindle tuber viroid* strains of different pathogenicity induces and suppresses expression of common and unique genes in infected tomato. *Mol Plant Microbe Interact*, **15**, 990-999.
- Jabs, T. (1999). Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol*, **57**, 231-245.
- Jin, S., Xu, R., Wei, Y. & Goodwin, P. H. (1999). Increased expression of a plant actin gene during a biotrophic interaction between round-leaved mallow, *Malva pusilla*, and *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*. *Planta*, **209**, 487-494.
- Johnson, P. R. & Ecker, J. R. (1998). The ethylene gas signal transduction pathway: A molecular perspective. *Annu Rev Genet*, **32**, 227-254.
- Jordá, L., Coego, A., Conejero, V. & Vera, P. (1999). A genomic cluster containing four differentially regulated subtilisin-like processing protease genes is in tomato plants. *J Biol Chem*, **274**, 2360-2365.
- Jordá, L., Conejero, V. & Vera, P. (2000). Characterization of *P69E* and *P69F*, two differentially regulated genes encoding new members of the subtilisin-like proteinase family from tomato plants. *Plant Physiol*, **122**, 67-73.
- Judelson, H. (1997). The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: Modern approaches to a historical challenge. *Fungal Gen Biol*, **22**, 65-76.
- Kalbe, C., Marten, P. & Berg, G. (1996). Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbial Res*, **151**, 433-439.
- Kaplan, H. & Greenberg, E. P. (1985). Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol*, **163**, 1210-1214.
- Kawano, T. & Muto, S. (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture. *J Exp Bot*, **51**, 685-693.
- Kende, H. (1993). Ethylene biosynthesis. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **44**, 283-307.
- Kim, S. Y., Choi, D., Lee, M. M., Lee, S. H. & Kim, W. T. (1998). Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant Cell Physiol*, **39**, 565-573.
- King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of phycocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med*, **44**, 301-307.
- Kinkema, M., Fan, W. & Dong, X. (2000). Nuclear localisation of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression. *Plant Cell*, **12**, 2339-2350.

- Klessig, D. F., Durner, J., Noad, R., Navarre, D. A., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J. M., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E. & Silva, H. (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 8849-8855.
- Kloepper, J. W., Leong, J., Teintze, M. & Schroth, M. N. (1980). Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature*, **286**, 885-886.
- Knoester, M., Pieterse, C. M. J., Bol, J. F. & Van Loon, L. C. (1999). Systemic resistance in Arabidopsis induced by rhizobacteria requires ethylene-dependent signaling at the site of application. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 720-727.
- Knoester, M., van Loon, L. C., van den Heuvel, J., Hennig, J., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 1933-1937.
- Kunkel, B. N. & Brooks, D. M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 325-331.
- Lam, E., Kato, N. & Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, **411**, 848-853.
- Lamb, C. & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **48**, 251-275.
- Langebartels, C., Ernst, D., Kangasjärvi, J. & Sandermann, H. (2000). Ozone effects on plant defense. *Meth Enzymol*, **319**, 520-535.
- Langebartels, C. & Kangasjärvi, J. (2003). Ethylene and jasmonate as regulators of cell death in disease resistance. In *Molecular Ecotoxicology of Plants*, ed. H. Sandermann, Springer, Heidelberg, (in press).
- Langebartels, C., Wohlgemuth, H., Kschieschan, S., Grün, S. & Sandermann, H. (2002). Oxidative burst and cell death in ozone-exposed plants. *Plant Physiol Biochem*, **40**, 567-575.
- Laue, R. E., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S. A. B., Hardman, A., Downie, J. A., O'Gara, F. & Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserinelactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, **146**, 2469-2480.
- Lawrence, C. B., Singh, N. P., Qiu, J., Gardner, R. G. & Tuzun, S. (2000). Constitutive hydrolytic enzymes are associated with polygenic resistance of tomato to *Alternaria solani* and may function as an elicitor release mechanism. *Physiol Mol Plant Pathol*, **57**, 211-220.
- Leadbetter, J. R. & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J Bacteriol*, **182**, 6921-6926.
- Lee, H. & Raskin, I. (1999). Purification, cloning, and expression of a pathogen inducible UDP-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from tobacco. *J Biol Chem*, **274**, 36637-36642.
- Leeman, M., den Ouden, F. M., van Pelt, J. A., Dirkx, F. P. M., Steijl, H., Bakker, P. A. H. M. & Schippers, B. (1996). Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, **86**, 149-155.
- Leeman, M., van Pelt, J. A., den Ouden, F., Heinsbroek, M. & Bakker, P. A. H. M. (1995). Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt using a novel bioassay. *Eur J Plant Pathol*, **101**, 655-664.
- Leeman, M., van Pelt, J. A., den Ouden, F. M., Heinsbroek, M., Bakker, P. A. H. M. & Schippers, B. (1995). Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology*, **85**, 1021-1027.

- León, J., Rojo, E. & Sánchez-Serrano, J. J. (2001). Wound signalling in plants. *J Exp Bot*, **354**, 1-9.
- Leone, G. & Tonneijk, A. E. G. (1990). Acute ozone exposure predispose *Phaseolus vulgaris* beans to *Botrytis cinerea*. *Neth J Plant Path*, **96**, 65-74.
- Lerouge, I. & Vanderleyden, J. (2001). O-antigen structural variation: Mechanisms and possible roles in animal/plant-microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev*, **26**, 17-47.
- Ligon, J. M., Hill, D. S., Hammer, P. E., Torkewitz, N. R., Hofmann, D., Kempf, H.-J. & van Pée, K.-H. (2000). Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manag Sci*, **56**, 688-695.
- Lincoln, J. E., Campbell, A. D., Oetiker, J., Rottmann, W. H., Oeller, P. W., Shen, N. F. & Theologis, A. (1993). LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem*, **268**, 19422-19430.
- Liu, L., Kloepper, J. W. & Tuzun, S. (1995). Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology*, **85**, 1064-1068.
- Long, S. R. (2001). Genes and signals in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol*, **125**, 69-72.
- Loper, J. E. & Henkels, M. D. (1999). Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 5357-5363.
- Lund, S. T., Stall, R. E. & Klee, H. J. (1998). Ethylene regulates the susceptible response to pathogen infection in tomato. *Plant Cell*, **10**, 371-382.
- Mäe, A., Montesano, M., Koiv, V. & Palva, E. T. (2001). Transgenic plants producing the bacterial pheromone N-Acyl-homoserine lactone exhibit enhanced resistance to the bacterial phytopathogen *Erwinia carotovora*. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 1035-1042.
- Manefield, M., Welch, M., Givskov, M., Salmond, G. P. C. & Kjelleberg, S. (2001). Halogenated furanones from the red alga, *Delisea pulchra*, inhibit carbapenem antibiotic synthesis and exoenzyme virulence factor production in the phytopathogen *Erwinia carotovora*. *FEMS Microbiol Lett*, **205**, 131-138.
- Martin, M. N., Cohen, J. D. & Saftner, R. A. (1995). A new 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid-conjugating activity in tomato fruit. *Plant Physiol*, **109**, 917-926.
- Martin, M. N. & Saftner, R. A. (1995). Purification and Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid *N*-malonyltransferase from tomato fruit. *Plant Physiol*, **108**, 1241-1249.
- Maurhofer, M., Hase, C., Meuwly, P., Métraux, J.-P. & Défago, G. (1994). Induction of systemic resistance of tobacco to tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0: Influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology*, **84**, 139-146.
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. & Défago, G. (1995). Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathol*, **44**, 40-50.
- Mayer, A. M., Staples, R. C. & Gil-ad, N. L. (2001). Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry*, **58**, 33-41.
- Meindl, T., Boller, T. & Felix, G. (2000). The bacterial elicitor flagellin activates its receptor in tomato cells according to the address-message concept. *Plant Cell*, **12**, 1783-1794.
- Meissner, R., Jacobson, Y., Melamed, S., Levyatuv, S., Shalev, G., Ashri, A., Elkind, Y. & Levy, A. (1997). A new model system for tomato genetics. *Plant J*, **12**, 1465-1472.

- Ménard, C., Gosselin, P., Duhaime, J.-F. & Moutin, C. (1994). Polymerase chain reaction using arbitrary primer for the design and construction of a DNA probe specific for *Porphyromonas gingivalis*. *Res Microbiol*, **145**, 595-602.
- Mercado-Blanco, J., van der Drift, K. M. G. M., Olsson, P. E., Thomas-Oates, J. E., van Loon, L. C. & Bakker, P. A. H. M. (2001). Analysis of the *pmsCEAB* gene cluster involved in biosynthesis of salicylic acid and the siderophore pseudomonine in the biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* WCS374. *J Bacteriol*, **183**, 1909-1920.
- Métraux, J. P., Signer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. & Inverardi, B. (1990). Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004-1006.
- Meuwly, P. & Métraux, J.-P. (1993). Ortho-anisic acid as internal standard for the simultaneous quantitation of salicylic acid and its putative biosynthetic precursors in cucumber leaves. *Anal Biochem*, **214**, 500-505.
- Meyer, J.-M. (2000). Pyoverdines: Pigments, siderophores and potential taxonomic markers of fluorescent *Pseudomonas* species. *Arch Microbiol*, **174**, 135-142.
- Meyer, J.-M., Geoffroy, V. A., Baida, N., Gardan, L., Izard, D., Lemanceau, P., Achouak, W. & Palleroni, N. J. (2002). Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. *Appl Environ Microbiol*, **68**, 2745-2753.
- Miles, A. A. & Misra, S. S. (1938). The estimation of the bacterial power of blood. *J Hyg*, **10**, 732.
- Miller, S. A. (1996). Detecting propagules of plant pathogenic fungi. *Adv Bot Res*, **23**, 73-102.
- Minsavage, G. V., Thompson, C. M., Hopkins, D. L., Leite, R. M. V. B. C. & Stall, R. E. (1994). Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Nucl Acid Res*, **20**, 6115-6116.
- Mitchell, L. A. (1988). A sensitive dot immunoassay employing monoclonal antibodies for detection of *Sirococcus strobilinus* in spruce seed. *Plant Dis*, **72**, 664-667.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, **7**, 405-410.
- Moeder, W. (1999). Untersuchungen zum Auftreten von Signalsubstanzen im Blatt-Apoplasten von *Nicotiana tabacum* und *Vicia faba* bei oxidativem Streß, Dissertation an der TU München.
- Moeder, W., Tauriainen, A., Barry, C. S., Betz, C., Tuomainen, J., Utriainen, M., Grierson, D., Sandermann, H., Langebartels, C. & Kangasjärvi, J. (2002). Ethylene synthesis regulated by bi-phasic induction of ACC synthase and ACC oxidase genes is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation and cell death in ozone-exposed tomato. *Plant Physiol*, **130**, 1918-1926.
- Mueller, J. M. (1997). Enzymes involved in jasmonic acid biosynthesis. *Physiol Plant*, **100**, 653-663.
- Murphy, A. M., Holcombe, L. J. & Carr, J. P. (2000). Characteristics of salicylic acid-induced delay in disease caused by a necrotrophic fungal pathogen in tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol*, **57**, 47-54.
- Nakatsuka, A., Murachi, S., Okunishi, H., Shiomi, S., Nakano, R., Kubo, Y. & Inaba, A. (1998). Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, **118**, 1295-1305.
- Neill, S., Desikan, R. & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide signalling. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 388-395.

- Neuenschwander, U., Vernooij, B., Friedrich, L., Uknes, S., Kessmann, H. & Ryals, J. (1995). Is hydrogen peroxide a second messenger of salicylic acid in systemic acquired resistance? *Plant J*, **8**, 227-233.
- Newman, M.-A., Dow, J. M. & Daniels, M. J. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and plant-pathogen interactions. *Eur J Plant Pathol*, **107**, 95-102.
- Niderman, T., Genetet, I., Bruyère, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B. & Möisinger, E. (1995). Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal. *Plant Physiol*, **108**, 17-27.
- Niepold, F. & Schöber-Butin, B. (1995). Application of the PCR technique to detect *Phytophthora infestans* in potato tubers and leaves. *Microbiol Res*, **150**, 379-385.
- Nürnbergger, T. & Brunner, F. (2002). Innate immunity in plants and animals: Emerging parallels between the recognition of general elicitors and pathogen-associated molecular patterns. *Curr Opin Plant Biol*, **5**, 1-7.
- O'Donnell, P. J., Calvert, C., Atzorn, R., Wasternack, C. H. M. O. & Bowles, D. J. (1996). Ethylene as a signal mediating the wound response of tomato plants. *Science*, **274**, 1914.
- O'Donnell, P. J., Jones, J. B., Antoine, F. R., Ciardi, J. & Klee, H. J. (2001). Ethylene-dependent salicylic acid regulates an expanded cell death response to a plant pathogen. *Plant J*, **25**, 315-323.
- Oetiker, J. H., Olson, D. C., Shiu, O. Y. & Yang, S. F. (1997). Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Mol Biol*, **34**, 275-286.
- Osman, H., Mikes, V., Milat, M.-L., Ponchet, M., Marion, D., Prangé, T., Maume, B. F., Vauthrin, S. & Blein, J.-P. (2001a). Fatty acids bind to the fungal elicitor cryptogein and compete with sterols. *FEBS Lett*, **489**, 55-58.
- Osman, H., Vauthrin, S., Mikes, V., Milat, M.-L., Panabières, F., Marais, A., Brunie, S., Maume, B., Ponchet, M. & Blein, J.-P. (2001b). Mediation of elicitor activity on tobacco is assumed by elicitor-sterol complexes. *Mol Biol Cell*, **12**, 2825-2834.
- Paran, I. & Michelmore, R. W. (1993). Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor Appl Gen*, **85**, 985-993.
- Parkinson, J. S. & Kofoed, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet*, **26**, 71-112.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan Jr, J. E. & Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 4360-4365.
- Patten, C. L. & Glick, B. R. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can J Microbiol*, **42**, 207-220.
- Penninckx, I. A. M. A., Eggermont, K., Terras, F. R. G., Thomma, B. P. H. J., de Samblaux, G. W., Buchala, A., Métraux, J.-P., Manners, J. M. & Broeckeaert, W. F. (1996). Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in Arabidopsis follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Picard, C., Di Cello, F., Ventura, M., Fani, R. & Guckert, A. (2000). Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stages of plant growth. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 948-955.
- Pierson III, L. S. & Pierson, E. A. (1996). Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: Role in rhizosphere ecology and pathogen suppression. *FEMS Microbiol Lett*, **136**, 101-108.
- Pierson III, L. S., Wood, D. W. & Pierson, E. A. (1998). Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **36**, 207-225.
- Pieterse, C. M. J. & Van Loon, L. C. (1999). Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends Plant Sci*, **4**, 52-58.

- Pieterse, C. M. J., van Pelt, J. A., Ton, J., Parchman, S., Mueller, M. J., Buchala, A. J., Métraux, J. P. & van Loon, L. C. (2000). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiol Mol Plant Pathol*, **57**, 123-134.
- Pieterse, C. M. J., van Pelt, J. A., van Wees, S. C. M., Ton, J., Léon-Kloosterziel, K. M., Keurentjes, J. J. B., Verhagen, B. W. M., Knoester, M., van der Sluis, I., Bakker, P. A. H. M. & van Loon, L. C. (2001). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: Triggering, signalling and expression. *Eur J Plant Pathol*, **107**, 51-61.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. & van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**, 1225-1237.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Ton, J., van Pelt, J. A. & van Loon, L. C. (2002). Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol*, **4**, 535-544.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. & van Loon, L. C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Prell, H. H. & Day, P. R. (2001). *Plant-fungal pathogen interaction*. Springer, Berlin.
- Press, C. M., Wilson, M., Tuzun, S. & Kloepper, J. W. (1997). Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 761-768.
- Raaijmakers, J. M., Leeman, M., van Oorschot, M. P. M., van der Sluis, I., Schippers, B. & Bakker, P. A. H. M. (1995). Dose-response relationships in biological control of fusarium wilt of radish by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, **85**, 1075-1081.
- Raaijmakers, J. M., Weller, D. M. & Thomashow, L. S. (1997). Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 881-887.
- Rao, M. V., Lee, H. I., Creelman, R. A., Mullet, J. E. & Davis, K. R. (2000). Jasmonic acid signaling modulates ozone-induced hypersensitive cell death. *Plant Cell*, **12**, 1633-1646.
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S. & Kloepper, J. W. (1996). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic virus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Dis*, **80**, 891-894.
- Reymond, P. & Farmer, E. E. (1998). Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression. *Curr Opin Plant Biol*, **1**, 404-411.
- Ribnicky, D. M., Shulaev, V. & Raskin, I. (1998). Intermediates of salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiol*, **118**, 565-572.
- Riedel, K., Ohnesorg, T., Krogfelt, K. A., Hansen, T. S., Omori, K., Givskov, M. & Eberl, L. (2001). *N*-Acyl-L-homoserine lactone-mediated regulation of the Lip secretion system in *Serratia liquefaciens* MG1. *J Bacteriol*, **183**, 1805-1809.
- Ryals, J., Weymann, K., Lawton, K., Friedrich, L., Ellis, D., Steiner, H.-Y., Johnson, J., Delaney, T. P., Jesse, T., Vos, P. & Uknes, S. (1997). The *Arabidopsis* *NIM1* protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IκB. *Plant Cell*, **9**, 425-439.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1477**, 112-121.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W. & Langebartels, C. (1998). Ozone: An abiotic elicitor of plant defense reactions. *Trends Plant Sci*, **3**, 47-50.
- Schaefer, A. L., Hanzelka, B. L., Parsek, M. R. & Greenberg, E. P. (2000). Detection, purification and structural elucidation of acyl homoserine lactone inducer of *Vibrio fischeri* luminescence and other related molecules. *Meth Enzymol*, **305**, 288-301.
- Schaefer, A. L., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan Jr, J. E. & Greenberg, E. P. (1996). Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: Acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 9505-9509.
- Schenk, P. M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J. P., Richmond, T., Somerville, S. C. & Manners, J. M. (2000). Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 11655-11660.
- Schesser, K., Luder, A. & Henson, J. M. (1991). Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus *Gaeumannomyces graminis* in infected wheat plants. *Appl Environ Microbiol*, **57**, 553-556.
- Schilling, A. G., Möller, E. M. & Geiger, H. H. (1996). PCR-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. *Phytopathology*, **86**, 515-522.
- Schlaghnauffer, C. D., Arteca, R. N. & Pell, E. J. (1997). Sequential expression of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes in response to biotic and abiotic stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves. *Plant Mol Biol*, **35**, 683-688.
- Schots, A., Dewey, F. M. & Oliver, R. P. (1994). *Modern Assays for Plant Pathogenic Fungi: Identification, Detection and Quantification*. CAB International, Oxford, UK.
- Schulze, S., Bahnweg, G., Möller, E. M. & Sandermann, H. (1997). Identification of the genus *Armillaria* by specific amplification of an rDNA-ITS fragment and evaluation of genetic variation within *Armillaria ostoyae* by rDNA-RFLP and RAPD analysis. *Eur J For Pathol*, **27**, 1-15.
- Scott, J. W. & Harbough, B. K. (1989). Micro-Tom - a miniature dwarf tomato. *Florida Agr Expt Sta Circ*, **370**, 1-6.
- Shulaev, V., León, J. & Raskin, I. (1995). Is salicylic acid a translocated signal of systemic acquired resistance in tobacco? *Plant Cell*, **7**, 1691-1701.
- Simons, M., van der Bij, A. J., Brand, I., de Weger, L. A., Wijffelman, C. A. & Lugtenberg, B. J. J. (1996). Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, **9**, 600-607.
- Smith, R. S., Fedyk, E. R., Springer, T. A., Mukaida, N., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2001). IL-8 Production in human lung fibroblasts and epithelial cells activated by the *Pseudomonas* autoinducer *N*-3-Oxododecanoyl homoserine lactone is transcriptionally regulated by NF- $\kappa$ B and activator Protein-2. *J Immunol*, **167**, 366-374.
- Smith, R. S., Kelly, R., Iglewski, B. H. & Phipps, R. P. (2002). The *Pseudomonas* autoinducer *N*-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> production in human lung fibroblasts: Implications for inflammation. *J Immunol*, **169**, 2636-2642.
- Spanu, P. & Boller, T. (1989). Ethylene biosynthesis in tomato plants infected by *Phytophthora infestans*. *J Plant Physiol*, **134**, 533-537.
- Staples, R. C. & Mayer, A. M. (1995). Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiol Lett*, **134**, 1-7.
- Steenhoudt, O. & Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: Genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol Rev*, **24**, 487-506.
- Steidle, A., Allesen-Holm, M., Riedel, K., Berg, G., Givskov, M., Molin, S. & Eberl, L. (2002). Identification and characterization of a *N*-acylhomoserine lactone-dependent

- quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* IsoF. *Appl Environ Microbiol*, submitted.
- Steidle, A., Sigl, K., Schuegger, R., Ihring, A., Schmid, M., Gantner, S., Stoffels, M., Riedel, K., Givskov, M., Hartmann, A., Langebartels, C. & Eberl, L. (2001). Visualization of *N*-acylhomoserine lactone-mediated cell-cell communication between bacteria colonizing the tomato rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 5761-5770.
- Stepanova, A. N. & Ecker, J. R. (2000). Ethylene signaling: From mutants to molecules. *Curr Opin Plant Biol*, **3**, 353-360.
- Stevens, R. B. (1974). *Mycology Guidebook*. University of Washington Press, Seattle.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. & Métraux, J. P. (1997). Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **35**, 235-270.
- Telford, G., Wheeler, D., Williams, P., Tomkins, P. T., Appleby, P., Sewell, H., Stewart, G. S. A. B., Bycroft, B. W. & Pritchard, D. I. (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal molecule *N*-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone has immunomodulatory activity. *Infect Immun*, **66**, 36-42.
- Ten Have, A., Mulder, W., Visser, J. & van Kan, J. A. L. (1998). The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. *Mol Plant Microbe Interact*, **11**, 1009-1016.
- Teplitski, M., Robinson, J. B. & Bauer, W. D. (2000). Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, **13**, 637-648.
- Thimm, O., Essigmann, B., Kloska, S., Altmann, T. & Buckhout, T. J. (2001). Response of *Arabidopsis* to iron deficiency stress as revealed by microarray analysis. *Plant Physiol*, **127**, 1030-1043.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Broeckaert, W. F. & Cammue, B. P. A. (2000). Disease development of several fungi on *Arabidopsis* can be reduced by treatment with methyl jasmonat. *Plant Physiol Biochem*, **38**, 421-427.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B. P. A. & Broeckaert, W. F. (1998). Separate jasmonat-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 15107-15111.
- Thomma, B. P. H. J., Eggermont, K., Tierens, K. F. M. J. & Broeckaert, W. F. (1999). Requirement of functional *ethylene-insensitive 2* gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol*, **121**, 1093-1101.
- Thomma, B. P. H. J., Tierens, K. F. M., Penninckx, I. A. M. A., Mauch-Mani, B., Broeckaert, W. F. & Cammue, B. P. A. (2001). Different micro-organisms differentially induce *Arabidopsis* disease response pathways. *Plant Physiol Biochem*, **39**, 673-680.
- Thomson, N. R., Thomas, J. D. & Salmond, G. P. C. (1999). Virulence determinants in the bacterial phytopathogen *Erwinia*. *Meth Microbiol*, **29**, 347-426.
- Tieman, D. M. & Klee, H. J. (1999). Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol*, **120**, 165-172.
- Tieman, D. M., Taylor, M. G., Ciardi, J. A. & Klee, H. J. (2000). The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 5663-5668.
- Timmusk, S. & Wagner, E. G. H. (1999). The plant-growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* induces changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression: A possible connection between biotic and abiotic stress responses. *Mol Plant Microbe Interact*, **11**, 951-959.



- Ton, J., Davison, S., Van Wees, S. C. M., Van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2001). The Arabidopsis *ISR1* locus controlling rhizobacteria-mediated induced systemic resistance is involved in ethylene signaling. *Plant Physiol*, **125**, 652-661.
- Ton, J., Pieterse, C. M. J. & Van Loon, L. C. (1999). Identification of a locus in Arabidopsis controlling both the expression of rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) and basal resistance against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 911-918.
- Tornero, P., Conejero, V. & Vera, P. (1996). Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 6332-6337.
- Tornero, P., Gadea, J., Conejero, V. & Vera, P. (1997). Two *PR-1* genes from tomato are differentially regulated and reveal a novel mode of expression for a pathogenesis-related gene during the hypersensitive response and development. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 624-634.
- Tuomainen, J., Betz, C., Kangasjärvi, J., Ernst, D., Yin, Z.-H., Langebartels, C. & Sandermann, H. J. (1997). Ozone induction of ethylene emission in tomato plants: Regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes. *Plant J*, **12**, 1151-1162.
- Uknes, S., Dincher, S., Friedrich, L., Negrotto, D., Williams, S., Thompson-Taylor, H., Potter, S., Ward, E. & Ryals, J. (1993). Regulation of pathogenesis-related protein-1a gene expression in tobacco. *Plant Cell*, **5**, 159-169.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2000). Two-component systems in plant signal transduction. *Trends Plant Sci*, **5**, 67-74.
- Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F. & Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Sci*, **161**, 405-414.
- Van Hal, N. L. W., Vorst, O., van Houwelingen, A. M. M. L., Kok, E. J., Peijnenburg, A., Aharoni, A., van Tunen, A. & Keijer, J. (2000). The application of DNA microarrays in gene expression analysis. *J Biotechnol*, **78**, 271-280.
- Van Kan, J. A. L., Cozijnsen, T., Danhash, N. & de Wit, P. J. G. M. (1995). Induction of tomato stress protein mRNAs by ethephon, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylate. *Plant Mol Biol*, **27**, 1205-1213.
- Van Kan, J. A. L., Joosten, M. H. A. J., Wagemakers, C. A. M., van den Berg-Velthuis, G. C. M. & de Wit, P. J. G. M. (1992). Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*. *Plant Mol Biol*, **20**, 513-527.
- Van Loon, L. C. (1997). Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur J Plant Pathol*, **103**, 753-765.
- Van Loon, L. C. (1999). Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In *Pathogenesis-related proteins in plants*, eds. S. K. Datta & S. Muthukrishnan, CRC. Boca Raton, pp. 1-19.
- Van Loon, L. C., Bakker, P. A. H. M. & Pieterse, C. M. J. (1998). Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu Rev Phytopathol*, **36**, 453-483.
- Van Loon, L. C. & van Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Mol Plant Pathol*, **55**, 85-97.
- Van Peer, R., Niemann, G. J. & Schippers, B. (1991). Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. *Phytopathology*, **81**, 728-734.
- Van Wees, S. C. M., de Swart, E. A. M., van Pelt, J. A., van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (2000). Enhancement of induced disease resistance by simultaneous activation of

- salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 8711-8716.
- Van Wees, S. C. M., Luijendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L. C. & Pieterse, C. M. J. (1999). Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Mol Biol*, **41**, 537-549.
- Van Wees, S. C. M., Pieterse, C. M. J., Trijssenaar, A., van 't Westende, Y. A. M., Hartog, F. & van Loon, L. C. (1997). Differential induction of systemic resistance in *Arabidopsis* by biocontrol bacteria. *Mol Plant Microbe Interact*, **10**, 716-724.
- Vandamme, P., Holmes, B., Vancanneyt, M., Coenye, T., Hoste, B., Coopman, R., Revets, H., Lauwers, S., Gillis, M., Kersters, K. & Govan, J. R. W. (1997). Occurrence of multiple genomovars of *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis patients and proposal of *Burkholderia multivorans* sp. nov. *J Sys Bacteriol*, **47**, 1188-1200.
- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. & Bohlmann, H. (1998). Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J*, **14**, 285-295.
- Wang, K. L.-C., Li, H. & Ecker, J. R. (2002). Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*, 131-151.
- Wei, G., Kloeppe, J. W. & Tuzun, S. (1991). Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, **81**, 1508-1512.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*, **52**, 487-511.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR-Protocols: A Guide to Methods and Applications*, eds. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White, Academic Press. New York, pp. 315-322.
- Whitehead, N. A., Barnard, A. M. L., Slater, H., Simpson, N. J. L. & Salmond, G. P. C. (2001). Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 365-404.
- Wiglesworth, M. D., Nesmith, W. C., Schardl, C. L., Li, D. & Siegel, M. R. (1994). Use of specific repetitive sequences on *Peronospora tabacina* for early detection of the tobacco blue mold pathogen. *Phytopathology*, **84**, 435-430.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G. & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, **414**, 562-565.
- Winkelmann, G. (2002). Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans*, **30**, 691-696.
- Wood, D. W., Gong, F., Daykin, M. M., Williams, P. & Pierson III, L. S. (1997). *N*-Acyl homoserine lactone-mediated regulation of phenazine gene expression by *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 in the wheat rhizosphere. *J Bacteriol*, **179**, 7663-7670.
- Xu, J.-R., Yan, K., Dickman, M. B. & Leslie, J. F. (1995). Electrophoretic karyotypes distinguish the biological species of *Gibberella fujikuroi* (Fusarium Section Liseola). *Mol Plant Microbe Interact*, **8**, 74-84.
- Xu, Y., Chang, P. F. L., Liu, D., Narasimhan, M. L., Raghothama, K. G., Hasegawa, P. M. & Bressan, R. A. (1994). Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **6**, 1077-1085.
- Yang, C.-H. & Crowley, D. E. (2000). Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 345-351.

- Yang, S. F. & Hoffman, N. E. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, **35**, 155-189.
- You, I.-S., Ghosal, D. & Gunsalus, I. C. (1991). Nucleotide sequence analysis of the *Pseudomonas putida* PpG7 salicylate hydroxylase gene (*nahG*) and its 3'-flanking region. *Biochemistry*, **30**, 1635-1641.
- Zarembinski, T. I. & Theologis, A. (1994). Ethylene biosynthesis and action: A case of conservation. *Plant Mol Biol*, **26**, 1579-1597.
- Zehnder, G. W., Murphy, J. F., Sikora, E. J. & Kloepper, J. W. (2001). Application of rhizobacteria for induced resistance. *Eur J Plant Pathol*, **107**, 39-50.
- Zhang, Y., Fan, W., Kinkema, M., Li, X. & Dong, X. (1999). Interaction of NPR1 with basic leucine zipper protein transcription factors that bind sequences required for salicylic acid induction of the *PR-1* gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 6523-6528.
- Zimmerli, L., Jakab, G., Métraux, J. P. & Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in *Arabidopsis* by  $\beta$ -aminobutyric acid. *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**, 12920-12925.
- Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. & Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant J*, **23**, 11-28.

## VII. Anhang

### 1. Verwendete Primer

#### 1.1. Primer für die Amplifikation der transkribierten Spacerregionen (ITS) der kernkodierten ribosomalen RNA-Gene (rDNA) pathogener Pilze

Die Sequenzen wurden White et al. (1990) entnommen.

5´-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3´ ITS1  
5´-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3´ ITS4

#### 1.2. Primer für die Quantifizierung tomatenpathogene Pilze mittels Real-Time PCR

##### *Alternaria alternata:*

5´-TCTAGCTTTGCTGGAGACTC -3´ A.alt F1  
5´-AGACCTTTGCTGATAGAGAGT-3´ A.alt R1.1

##### *Cladosporium herbarum:*

5´-GCTACGGCCGGGATGTTTC-3´ Clad F1  
5´-GCAAAGTTAGGCAAGAGTTTG Clad R2

##### *Botrytis cinerea:*

5´-GGATTTATACATCCAATGGGAA-3´ Bcin O13 f3  
5´-GAGTAGGTAGGTATAGGTAAG-3´ Bcin O13 r1

#### 1.3. Primer zur Amplifikation von klonierten PCR-Produkten aus dem Vector pGEM-T-Easy

5´-taatacgactcactataggg-3´ T7  
5´-tatttaggtgacactatag-3´ Sp6

Der Vector stammt von der Firma Promega, Madison, USA.

Der Primer T7 wurde außerdem für die Referenzhybridisierung der Filter in den Macroarray-Analysen verwendet (s. Material und Methoden, 14.8.3)

## 2. Entwicklung von PCR-Primern für den quantitativen Nachweis von tomatenpathogenen Pilzen

### 2.1. Alignment der ITS-Regionen wichtiger tomatenpathogener Pilze

Alignment der Sequenzen der transkribierten Spacerregionen (ITS) der kernkodierten ribosomalen RNA-Gene (rDNA) von den drei in dieser Arbeit verwendeten Pilzen (*Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*) und weiteren wichtigen tomatenpathogenen Pilzen (*Alternaria solani*, *Fusarium oxysporium*, *Fusarium solani* und *Pyrenochaeta lycopersici*). Die ITS-Regionen wurden mit den universellen Primern ITS1 und ITS4 amplifiziert, die Sequenzen der Primer sind unterstrichen. Gelb eingezeichnet sind die spezifischen Primer für *Alternaria alternata*, grau für *Cladosporium herbarum*, diese wurden für die Real-Time PCR verwendet. Die Sequenzen der Rückwärtsprimer sind in den nachfolgenden Sequenzen als „reverse complement“ zu lesen.

		Primer ITS1	23S rDNA	← ⇒	ITS1-Region
<i>A. alternata</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> GGGATCATTA	GGGATCATTA		CACAAATATG AAGGCGGGCT
<i>A. solani</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> GGGATCATTA	GGGATCATTA		CACAAATATG AAGGCGGGCT
<i>B. cinerea</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> AGGATCATTA	AGGATCATTA		CA-----
<i>C. herbarum</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> GGGATCATTA	GGGATCATTA		CAagtgacc-
<i>F. oxysporum</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> GGGATCATTA	GGGATCATTA		CC-----
<i>F. solani</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> GGGATCATTA	GGGATCATTA		CC-----
<i>P. lycopersici</i>	1	<u>TCCGTAGCTG AACCTGCGGA</u> AGGATCATTA	AGGATCATTA		actgtaacat tgg--GGGCT
					<b>Clad F1</b>
<i>A. alternata</i>	51	GGAACCTCTC GG-----	GG-----		-GGTTA-CAG CCTTGCTGAA
<i>A. solani</i>	51	GGCACCTCCC GG-----	GG-----		-GGTggcCAG CCTTGCTGAA
<i>B. cinerea</i>	33	-----	-----		-----GAG
<i>C. herbarum</i>	40	-----	-----		-----C CGGCTA-CGG CCGGGATG--
<i>F. oxysporum</i>	33	-----	-----		-----GAG
<i>F. solani</i>	33	-----	-----		-----GAG
<i>P. lycopersici</i>	49	GGTggagggt tgcgcacttt	gtgcggtggtC		CTTCCC-CGC CCTGTCTG--
<i>A. alternata</i>	81	TTATT-----	-----		-----C-ACC C-----TTG TCTTTTGCGT
<i>A. solani</i>	82	TTATT-----	-----		-----CcACC C-----GTG TCTTTTGCGT
<i>B. cinerea</i>	36	TTcatgcccg aaagggTAGA	CCTCCC-ACC		C-----TTG TGTATTATTA
<i>C. herbarum</i>	58	-----	-----		-----TTCAT-AAC C-----CTT TGTTGTCCGA
<i>F. oxysporum</i>	36	TT-----	-----		-----TACA ACTCCC-AAA C-----CCC TGTGAA-CAT
<i>F. solani</i>	36	TTATT-----	-----		-----C-Aac tcatcaaCCC TGTGAA-CAT
<i>P. lycopersici</i>	96	-----	-----		-----CTACT-GCC C-----ATG TCTTTTGCGT
<i>A. alternata</i>	104	ACTTCTT-GT TTCCTTGG--	-----		TGGGTTCGCC CACCACTAGG
<i>A. solani</i>	106	ACTTCTT-GT TTCCTCGG--	-----		TGGGCTCGCC CACCACAAGG
<i>B. cinerea</i>	79	CTTTGTT-GC TTTGGCGag-	---		CTGCCTT CGGGCcttgt at-----
<i>C. herbarum</i>	80	CTCTGTT-GC CTCCGGGGcg	accCTGCCTT		CGGGCGGGG CTCCGGGT--
<i>F. oxysporum</i>	64	ACCACTT-GT TGCCTCGG--	-----		CGGATCAGCC CGctCCCGT
<i>F. solani</i>	64	ACCtaaacGT TGCTTCGG--	-----		CGGgaacaga cgg-CCCCGT
<i>P. lycopersici</i>	118	ACCATT-GT TTCCTCGG--	-----		CGGGTTGCC CGTCGATT--

		Clad R2					
<i>A. alternata</i>	141	ACAA-----	-----	----AC--AT	AAACC-TTTT	GTAA----TT	
<i>A. solani</i>	143	ACCA-----	-----	----ACCCAT	AAACcTTTT	GCAA----TG	
<i>B. cinerea</i>	116	-----	-G-CTCGCCA	GAGAATACCA	AAACT-CTTT	TTATTAATGT	
<i>C. herbarum</i>	127	-----	-----	--GGACACTT	<b>CAAAC-TCTT</b>	<b>GCCTAACCTT</b>	
<i>F. oxysporum</i>	101	AAAACGGGAC	GG-CCCGCCA	GAGGACCCCT	AAACT-CTGT	TTCTATATGT	
<i>F. solani</i>	101	GAAACGGGCC	GccCCCGCCA	GAGGACCCCT	AACTC-TGTT	TCTATAATGT	
<i>P. lycopersici</i>	153	-----	-----	--GGACACTA	CAACC-CTTT	GTAA----TT	

		ITS1-Region $\leftarrow \Rightarrow$ 5,8S rDNA					
<i>A. alternata</i>	164	GCAATCAGCG	TCAGTAACAA	ATTAATAA-T	TA----CAAC	TTTCAACAAC	
<i>A. solani</i>	169	GCAATCAGCG	TCAGTAACAA	TGTAATAATT	TA----CAAC	TTTCAACAAC	
<i>B. cinerea</i>	153	c--GTCTGAG	TActata---	--TAATAG-T	TA----AAAC	TTTCAACAAC	
<i>C. herbarum</i>	154	<b>GCAGTCTGAG</b>	TAA--ActtA	ATTAATAAAT	TA----AAAC	TTTTAACAAC	
<i>F. oxysporum</i>	149	AACTTCTGAG	TAA--AACc-	ATAAATAAAT	CA----AAAC	TTTCAACAAC	
<i>F. solani</i>	150	TTCTTCTGAG	TAA--AACAA	GCAAATAAAT	TA----AAAC	TTTCAACAAC	
<i>P. lycopersici</i>	176	GCAATCAGCG	TCAGAAAact	----ATAA-T	TAttacAACc	TTTCAACAAC	

<i>A. alternata</i>	209	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT
<i>A. solani</i>	215	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT
<i>B. cinerea</i>	191	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT
<i>C. herbarum</i>	198	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT
<i>F. oxysporum</i>	192	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCAAAA	TGCGATAAGT
<i>F. solani</i>	194	GGATCTCTTG	GCTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT
<i>P. lycopersici</i>	221	GGATCTCTTG	GTTCTGGCAT	CGATGAAGAA	CGCAGCGAAA	TGCGATAAGT

<i>A. alternata</i>	259	AGTGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>A. solani</i>	265	AGTGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>B. cinerea</i>	241	AATGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>C. herbarum</i>	248	AATGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>F. oxysporum</i>	242	AATGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>F. solani</i>	244	AATGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG
<i>P. lycopersici</i>	271	AGTGTGAATT	GCAGAATCA	GTGAATCATC	GAATCTTTGA	ACGCACATTG

<i>A. alternata</i>	309	CGCCCTTTGG	TATTCCAAAG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTGTACCC
<i>A. solani</i>	315	CGCCCTTTGG	TATTCCAAAG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTGTACCC
<i>B. cinerea</i>	291	CGCCCTTTGG	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTCAACCC
<i>C. herbarum</i>	298	CGCCCTTTGG	TATTCCGGGG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTCAACCC
<i>F. oxysporum</i>	292	CGCCTGCCAG	TATTCTGGCG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTCAACCC
<i>F. solani</i>	294	CGCCCGCCAG	TATTCTGGCG	GGCATGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTACAACCC
<i>P. lycopersici</i>	321	CGCCCTTTGG	TATTCCATGG	GGCACGCCTG	TTCGAGCGTC	ATTTGTACCC

		5,8S rDNA	$\leftarrow \Rightarrow$	ITS2 Region	Aalt F3	
<i>A. alternata</i>	359	TCAAGCTTT-	--GCTTGGTG	TTGGGCGTCT	Tgtc <b>cttagc</b>	t- <b>TTGCTGGA</b>
<i>A. solani</i>	365	TCAAGCTTT-	--GCTTGGTG	TTGGGCGTCT	TTTTGTCTCC	CCTTGCGGGA
<i>B. cinerea</i>	341	TCAAGCTTA-	--GCTTGGTA	TTGAGTCTAT	GTCagtaatg	gcaggctcta
<i>C. herbarum</i>	348	TCAAGCTTC-	--GCTTGGTA	TTGGGCAACG	CGGTCCGCCG	-----
<i>F. oxysporum</i>	342	TCAAGCACA-	--GCTTGGTG	TTGGGACTCG	CGTTAATTCG	-----
<i>F. solani</i>	344	TCAGGCCccc	ggGCCTGGCG	TTGGGGATCG	GCGGAGCCCC	CCGTGGGcac
<i>P. lycopersici</i>	371	TCAAGCATT-	--GCTTGGTG	TTGGGTGTTT	GTcCcgctgt	tacgcgtg--

<i>A. alternata</i>	405	<b>GACTCG</b> --CC	TTAAAGTAAT	TGGCAGCCGG	CCTACTGGTT	TCGG-----
<i>A. solani</i>	412	GACTCG--CC	TTAAAGTCAT	TGGCAGCCGG	CCTACTGGTT	TCGG-----
<i>B. cinerea</i>	388	a-----	-----AAT	CAGTGGCGGC	GCCGCTGGGT	CCTG-----
<i>C. herbarum</i>	385	---CGTGCC	TCAAATcgtc	cg-----	---GCTGGGT	Cttctgtccc
<i>F. oxysporum</i>	379	---CGTCC	CCAAATTGAT	TGGCGGTAC	GTCG-AGCTT	CCAT-----
<i>F. solani</i>	394	acgcCGTCCC	CCAAATACAG	TGGCGGTCCC	GCCGAGCTT	CCAT-----
<i>P. lycopersici</i>	416	GACTCG--CC	TTGAAGCAAT	TGGCAGCCGG	CaatCTGGTG	ATGG-----

**Aalt R1,1**

<i>A. alternata</i>	447	---AGCGCAG CACAAGTCGC <b>ACTCTCTATC AGCa--AAGG TCTA</b> ----GC
<i>A. solani</i>	454	---AGCGCAG CACAAGTCGC GCTCTCTTCC AGCcccAAGG TCTA----GC
<i>B. cinerea</i>	416	---AACGTAG TAATAtct-- CTCGTTACAG GTTCTCGGTG TGCTTCTGCC
<i>C. herbarum</i>	420	ctaAGCGTTG TGGAAActat -TCGCTAAAG GGTGTTGCGG AGGCTACGCC
<i>F. oxysporum</i>	418	---AGCGTAG TAGTAAACC CTCGTTACTG GTAATCGtcg cGGCCACGCC
<i>F. solani</i>	438	---CGCGTAG TAGCTAACAC CTCGCGACTG Gagagcgggc gGGCCACGCC
<i>P. lycopersici</i>	458	---AGCGCAG CACATTTTGC GCTtcttgct atagata--- -----ACGGC

**ITS2-Region  $\leftarrow \Rightarrow$  18S rDNA**

<i>A. alternata</i>	488	ATCCATTAAG CC---TTTTT TCAACTTTTG ACCTCGGATC AGGTAGGGAT
<i>A. solani</i>	497	ATCCACCAAG CCTttTTTT TCAACTTTTG ACCTCGGATC AGGTAGGGAT
<i>B. cinerea</i>	461	---AAAACCC AA---ATTTT TCTATGGTTG ACCTCGGATC AGGTAGGGAT
<i>C. herbarum</i>	469	GTAAAACAAC CCca----TT TCTAAGGTTG ACCTCAGATC AGGTAGGGAT
<i>F. oxysporum</i>	465	GTTAAACCCC AA---CTTCT G--AATGTTG ACCTCGGATC AGGTAGGAAT
<i>F. solani</i>	485	GTAAAACACC CA---ACTCT TCTGAAGTTG ACCTCAAATC AGGTAGGAAT
<i>P. lycopersici</i>	497	GTCCATCAAG CC---TTTTT TTTGCTCTTG ACCTCGGATC AGGTAGGGAT

**Primer ITS4**

<i>A. alternata</i>	535	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>A. solani</i>	547	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>B. cinerea</i>	505	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>C. herbarum</i>	515	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>F. oxysporum</i>	510	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>F. solani</i>	532	ACCCGATGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA
<i>P. lycopersici</i>	544	ACCCGCTGAA CTTAAGCATA TCAATAAGCG GAGGA

## 2.2. DNA-Bank der tomatenpathogenen Pilze und Auftragsschema der PCR-Reaktionen auf die Agarosegele

Die einzelnen Pilzstämme stammen größtenteils von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig (DSM) und vom Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, NL.

Nr. der Gelspur	Name des Templates	Herkunft
1	DNA-Größenstandard	
2	<i>Lycopersicon esculentum</i> cv. MicroTom	Diese Arbeit
3	<i>Alternaria alternata</i>	DSM 62006
4	<i>Alternaria alternata</i>	G. Bahnweg, Isolat aus Buche
5	<i>Alternaria alternata</i>	DSM 62010
6	<i>Alternaria</i> sp. <i>Tomate</i>	G. Bahnweg, Isolat aus Tomate
7	<i>Alternaria solani</i>	DSM 62028
8	<i>Alternaria solani</i>	CBS 347.79
9	<i>Alternaria solani</i>	CBS 105.51
10	<i>Alternaria tenuissima</i>	DSM 63360
11	<i>Athelia rolfsii</i>	DSM 63030
12	<i>Athelia rolfsii</i>	DSM 2652
13	<i>Athelia rolfsii</i>	DSM 2651
14	<i>Botrytis cinerea</i>	A. von Tiedemann, Rostock (NL Bc21/1.22)
15	<i>Botrytis cinerea</i>	A. von Tiedemann, Rostock (NL Bc25/1.23)
16	<i>Botrytis cinerea</i>	A. von Tiedemann, Rostock (NL Bc26/1.24)
17	<i>Cladosporium fulvum</i>	CBS 178.54
18	<i>Cladosporium fulvum</i>	CBS 120.46
19	<i>Cladosporium herbarum</i>	DSM 63422
20	<i>Colletotrichum dematium</i>	CBS 371.67
21	<i>Colletotrichum dematium</i>	DSM 62147
22	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DSM 62146
23	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	DSM 62136
24	<i>Colletotrichum coccodes</i>	CBS 527.77
25	<i>Colletotrichum coccodes</i>	DSM 62126
26	<i>Corynespora cassicola</i>	DSM 62475
27	<i>Corynespora cassicola</i>	DSM 2496
28	<i>Didymella lycopersici</i>	CBS 735.74
29	<i>Didymella lycopersici</i>	CBS 378.67
30	<i>Fusarium acuminatum</i>	DSM 62148
31	DNA-Größenstandard	
32	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	DSM 62059



Nr. der Gelspur	Name des Templates	Herkunft
33	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	CBS 160.85
34	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>	CBS 646.78
35	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	CBS 873.95
36	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	CBS 874.95
37	<i>Fusarium solani</i>	DSM 1164
38	<i>Fusarium solani</i>	DSM 62416
39	<i>Fusarium sambucinum</i>	DSM 62433
40	<i>Fusarium sambucinum</i>	DSM 62397
41	<i>Geotrichum candidum</i>	DSM 6593
42	<i>Geotrichum candidum</i>	DSM 10452
43	<i>Helminthosporium solani</i>	CBS 359.49
44	<i>Helminthosporium solani</i>	CBS 640.85
45	<i>Mycocentrospora acerina</i>	DSM 62101
46	<i>Phoma destructiva</i>	CBS 133.93
47	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	CBS 119.94
48	<i>Phoma terrestris</i>	DSM 62936
49	<i>Phoma terrestris</i>	CBS 377.52
50	<i>Phytophthora infestans</i>	CBS 430.90
51	<i>Phytophthora infestans</i>	CBS 439.78
52	<i>Phytophthora infestans</i>	CBS 327.90
53	<i>Phytophthora parasitica</i>	H. Prell, Göttingen
54	<i>Phytophthora nicotianae</i>	J.P.Helgeson, Madison
55	<i>Phytophthora nicotianae</i>	DSM 1828
56	<i>Pullularia pullulans</i>	DSM 2404
57	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	CBS 267.59
58	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	DSM 62931
59	<i>Pyrenochaeta lycopersici</i>	CBS 306.65
60	<i>Pythium aphanidermatum</i>	CBS 634.70
61	DNA-Größenstandard	
62	<i>Pythium debaryanum</i>	DSM 62946
63	<i>Pythium irregulare</i>	DSM 62956
64	<i>Pythium irregulare</i>	CBS 469.50
65	<i>Pythium myriotylum</i>	CBS 315.33
66	<i>Pythium ultimum</i>	DSM 62987
67	<i>Pythium ultimum</i>	CBS 805.95
68	<i>Rhizoctonia solani</i>	CBS 168.83
69	<i>Rhizoctonia solani</i>	CBS 209.84
70	<i>Rhizopus stolonifer</i>	DSM 63011

Nr. der Gelspur	Name des Templates	Herkunft
71	<i>Rhizopus stolonifer</i>	DSM 2194
72	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	CBS 537.77
73	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	CBS 499.50
74	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	DSM 1946
75	<i>Septoria lycopersici</i>	CBS 354.49
76	<i>Septoria lycopersici</i> var. <i>malagutii</i>	CBS 106.80
77	<i>Stemphylium lycopersici</i>	CBS 321.87
78	<i>Stemphylium sarciniiforme</i>	DSM 63045
79	<i>Stemphylium solani</i>	CBS 408.54
80	<i>Stemphylium vesicarium</i>	CBS 668.80
81	<i>Pleospora herbarum</i> var. <i>herbarum</i>	CBS 406.76
82	<i>Pleospora herbarum</i> var. <i>herbarum</i>	CBS 205.82
83	<i>Pleospora herbarum</i>	DSM 62928
84	<i>Thielaviopsis basicola</i>	DSM 63050
85	<i>Tiarosporella phaseolina</i>	DSM 62744
86	<i>Verticillium albo-atrum</i>	CBS 321.91
87	<i>Verticillium albo-atrum</i>	CBS 385.91
88	<i>Verticillium dahliae</i>	DSM 63083
89	<i>Verticillium dahliae</i>	DSM 63084
90	<i>Helminthosporium triseptatum</i>	CBS 319.69

### 3. Auftragsschema des Macroarrays für Tomaten-Abwehrgene

Die Sonden für die Gene wurden von F. van Breusegem, Gent, B; G. Vogg, Würzburg; J. Kangasjärvi, Helsinki, FIN; P. Vera, Valencia, ES und D. Grierson, Nottingham, GB zur Verfügung gestellt. Die Filter wurden im Rahmen des EU-Projektes TOMSTRESS in der Arbeitsgruppe von F. Van Breusegem, Gent, Belgien, hergestellt.

Position auf Filter		Name	Gen / Funktion	Accession / EST
1. Charge	2., 3. Charge			
A1	A1	Chi9	30 kD basische intrazell. Chitinase	Z15140
B1	B1	Chi3	26 kD saure extrazell. Chitinase	Z15141
C1	C1	Chi17	27 kD saure extrazell. Chitinase	Z15139
D1	D1	P23	Thaumatococcus-ähnliches Protein	X70787
E1	E1	NIF1	NPR1-interagierendes Protein	AF143442
F1	F1	Qb	Basische $\beta$ -1,3-Glucanase	X74906
G1	G1	TGAS118	$\gamma$ -Thionin	LES133601
H1	H1	PAL	Phenylalanin Ammoniak-Lyase	M83314.1
A2	A2	Qa	Saure $\beta$ -1,3-Glucanase	X74905.1
B2	B2	PR1a (P4)	Unbekannt	AJ011520.1
C2	C2	WIPII	Proteinase-Inhibitor II	K03291
D2	D2	UBI3	Ubiquitin	X58253
E2	E2	InvLp11	Vacuoläre Invertase	Z12026
F2	F2	ACS1b	ACC-Synthase 1b	U18057
G2	G2	pEGTCTR2	MAP Kinase Kinase Kinase	AJ318955
	H2	ACT2	Actin-2	ATU37281
	A3	ACT8	Actin-8	ATU42007
H2	B3	Psenu3	Cysteinproteinase	Z48736
A3	C3	Le-ETR1	Ethylenrezeptor	U38666
B3	D3	ACS1a	ACC-Synthase 1a	U74459
C3	E3	ACS2	ACC-Synthase 2	X59139
D3	F3	SAM1	SAM-Synthetase 1	Z24741
E3	G3	SAM2	SAM-Synthetase 2	Z24742
F3	H3	Le-ACS6	ACC-Synthase 6	AB013100
G3	A4	SAM3	SAM-Synthetase 3	Z24743
H3	B4	Le-ACO1	ACC-Oxidase 1	X58273
A4	C4	PR-10	TSI-1 Protein	Y15846
B4	D4	PR-1b	Unbekannt	Y08804
C4	E4	Le-ACS5	ACC-Synthase 5	U18058
D4	F4	Le-ACS4	ACC-Synthase 4	X59146
E4	G4	Le-ACS3	ACC-Synthase 3	L34171
F4	H4	pinII	Proteinase Inhibitor II	K03291
G4	A5	CEVI-1	Ligninperoxidase	Y19023
H4	B5	CEVI-19	Desaturase	P. Vera, unveröffentlicht
A5	C5	CEVI-34	Lipoxygenase (putativ)	P. Vera, unveröffentlicht
B5	D5	CEVI-57	Proteinase-Inhibitor	X94946
C5	E5	APx20	Ascorbatperoxidase (putativ)	P. Vera, unveröffentlicht

Position auf Filter		Name	Gen / Funktion	Accession / EST
1. Charge	2., 3. Charge			
D5	F5	P69	Subtilisin-ähnliche Endoproteinase	X95270
E5	G5	tAPX	Ascorbatperoxidase	AI776158
F5	H5	GPX	Glutathionperoxidase	AI782805
G5	A6	CAT1	Catalase 1	AI782815
H5	B6	MnSOD	Mn Superoxiddismutase	AI774691
A6	C6	FeSOD	Fe Superoxiddismutase	AI898983
B6	D6	ChlCu/ZnSOD	chloropl. Cu/Zn Superoxiddismutase	AI781095
C6	E6	Le-ACO2	ACC-Oxidase 2	Y00478
D6	F6	Le-ACO3	ACC-Oxidase 3	Z54199
E6	G6	ERT1	Unbekannt	X72729
F6	H6	ERT10	kurzkettige Alkohol-Dehydrogenase	X72730
G6	A7	ERT13	Unbekannt	X72731
H6	B7	ERT14	Unbekannt	X72732
A7	C7	ERT15	Unbekannt	X72734
B7	D7	ERT16	Tomate stress-assoz. Protein	X72733
C7	E7	ERT17	Ubiquitin-konjugierendes Enzym	X73419
D7	F7	INT7	Unbekannt	D. Grierson, unveröffentlicht
E7	G7	INT22	dDTP-Glucose-4,6-Dehydratase	D. Grierson, unveröffentlicht
F7	H7	INT23	Chaperonin	D. Grierson, unveröffentlicht
G7	A8	INT107	Unbekannt	D. Grierson, unveröffentlicht
H7	B8	INT106	Tetratricopeptid repeat Protein	D. Grierson, unveröffentlicht
A8	C8	INT119	UFD1 (ubiquitin fusion degradation Protein)	D. Grierson, unveröffentlicht
B8	D8	INT129	Unbekannt	D. Grierson, unveröffentlicht
C8	E8	LOX3 (LOXc)	Lipoxygenase C	U37839
D8	F8	NR	Ethylenrezeptor, never ripe (NR)	Z54099
E8	G8	TOM75 (NY507)	Reife-assoz. Protein	X73847
F8	H8	PE1	Pectinesterase	A24196
G8	A9	PTL1 (LOXa)	Lipoxygenase A	U09026
H8	B9	PTL2 (LOXb)	Lipoxygenase B	U09025
A9	C9	SENU1	Unbekannt	Z75523
B9	D9	SENU3	Cysteinproteinase	Z48736
C9	E9	SENU2	Cysteinproteinase	AJ003137
D9	F9	SENU4	P6, unbekannt	M69248
E9	G9	SENU5	Unbekannt	Z75524
F9	H9	SEND32	Unbekannt	Z75519
G9	A10	TCTR2	MAP Kinase Kinase Kinase	AJ005077
H9	B10	TOM5 (p21a)	Phytoensynthese	Y00521
A10	C10	TMEK1	MAP Kinase Kinase	AJ000728
B10	D10	TRE (Le-ACO1)	ACC-Oxidase 1	X58273
C10	E10	UidA	$\beta$ -Glucuronidase	X02395
D10	F10	Dehydrin	putativ	AW036449
E10	G10	AOX	Alternative Oxidase (putativ)	AW034721
F10	H10	Cab-1b	Chlorophyll <sub>a/b</sub> bindendes Protein	AW217861

Allen, die in irgendeiner Form zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, gilt an dieser Stelle mein herzlicher Dank:

- Herrn Prof. K.-H. Schleifer und Herrn Prof. H. Sandermann für ihr Interesse an meinem Thema, sowie die Vertretung meiner Arbeit an der Universität bzw. die Möglichkeit, die Arbeit an diesem Institut anzufertigen.
- Herrn Dr. C. Langebartels für die hervorragende, sorgfältige Betreuung meiner Arbeit und für sein unermüdliches Interesse an meinem Thema, selbst bei hoher eigener Belastung.
- Frau Alexandra Ihring für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für die vielen schönen Ergebnisse, die sie im Rahmen ihrer Diplomarbeit zu diesem Projekt beisteuern konnte.
- Herrn Dr. G. Bahnweg und Frau Claudia Knappe nicht nur für die Hilfe bei den Infektionsversuchen, Ernten und der Pilzquantifizierung sondern auch für ihre freundschaftlichen und mitfühlenden Aufmunterungen, wenn im Laboralltag „nicht immer alles nach Wunsch verlief.“
- Allen an diesem Projekt Beteiligten, besonders Herrn Dr. L. Eberl und Herrn Prof Dr. A. Hartmann, sowie meinen Mitstreitern in diesem Projekt, Anette Steidle, Katja Sigl und Stephan Gantner, für die vielfältigen Diskussionen und Anregungen und für die Bereitstellung der Bakterienstämme und schöner LSM-Aufnahmen.
- Herrn Dr. H.-P. Seidl, Institut für Mikrobiologie, TUM, für die rasche Bereitstellung sporulierender *A. alternata* Kulturen, sowie Herrn Dr. C. Baron, Institut für Mikrobiologie, LMU, für den Bakterienstamm *P. fluorescens* WCS417r.
- Frau Dr. Heike Wohlgemuth für ihre Freundschaft, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt ihr botanisches „Know-How“.
- Allen Kollegen im Labor 22 für die außerordentlich gute Zusammenarbeit, vielseitigen Hilfen und freundschaftliche Atmosphäre im Laboralltag, insbesondere Elke Gerstner, Lucia Gößl, Dr. Sebastian Grün, Dr. Florian Kaffarnik, Sabine Kschieschan, Judith Mayr, Wolfgang Mayr, Elke Mattes, Rosina Ludwig und Dr. Gerd Vogg.
- Frau Susanne Stich für ihre kompetente Hilfe bei immer wieder neuartigen HPLC-Phänomenen
- Frau Bärbel Groß und Frau Renate Kreitmeyer für die liebevolle und sorgfältige Aufzucht meiner Versuchspflanzen, sowie für die vielen kleinen Hilfen (Puffer, Medien...) im Labor, die die Arbeit doch sehr erleichtern.
- Frau Evi Bieber für ihr immer offenes Ohr in Sachen Computer und Molekularbiologie.
- Matthias Affenzeller, Sabine Glombitza, Michael Götz, und Tobias Sahr für ihre stete Diskussionsbereitschaft und Hilfestellungen in Fragen zur Molekularbiologie im allgemeinen und der Arraytechnik im besonderen.
- Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern des Instituts für Biochemische Pflanzenpathologie für die angenehme Atmosphäre, Arbeitsgruppen-übergreifende Hilfsbereitschaft und Kollegialität.
- Den Technikern von EPOKA für ihre Hilfe bei kaputten Geräten und Problemen mit den Klimakammern.
- Meinen Eltern und meinen Freunden für ihre Unterstützung während meiner Doktorarbeit.