

Aus dem Institut für Phytomedizin
Universität Hohenheim
Fachgebiet Phytomedizin, Prof. Dr. H. Buchenauer

Mechanismen der Resistenzinduktion nach Blattbehandlungen mit Phosphaten

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Agrarwissenschaften

der Fakultät III - Agrarwissenschaften I
(Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie)

von

Miroslav Orober
aus Varazdin
2002

Die vorliegende Arbeit wurde am 28.12.2001 von der Fakultät III - Agrarwissenschaften I (Pflanzenproduktion und Landschaftsökologie) – der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Agrarwissenschaften“ angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	28.12.2001
Dekan:	Prof. Dr. K. Stahr
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. H. Buchenauer
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. V. Römheld
3. Prüfer:	Prof. Dr. F. Bangerth

Inhaltsverzeichnis

	Inhaltsverzeichnis	I
	Abkürzungen	V
1.	Einleitung	1
1.1	Induzierte Krankheitsresistenz	3
1.1.1	Das Phänomen der biotisch induzierten Resistenz	3
1.1.2	Charakteristika der induzierten Krankheitsresistenz	5
1.1.3	Resistenzauslösung durch Rhizobakterien	8
1.2	Mechanismen und Prozesse der Aktivierung systemisch aktivierter Resistenz	8
1.2.1	Nekrotisierung und Zelltod	8
1.2.2	Hypersensitive Reaktion	9
1.2.3	Programmierter Zelltod	10
1.2.4	Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	11
1.3	Signalmoleküle bei der Auslösung systemischer Resistenz	13
1.4	Die Rolle von Salizylsäure bei der Auslösung systemischer Krankheitsresistenz	14
1.5	Abwehrmechanismen im Rahmen systemisch aktivierter Resistenz	18
1.5.1	Strukturelle Abwehrmechanismen	18
1.5.2	Biochemische Abwehrmechanismen	19
1.5.3	Hypersensitive Reaktion	22
1.6	Chemische bzw. abiotische Resistenzinduktoren	22
1.7	Phosphat-induzierte Krankheitsresistenz	24
1.8	Ziele der Arbeit	27
2.	Material und Methoden	28
2.1	Pflanzenanzucht	28
2.2.	Wirt-Pathogensysteme	29
2.2.1	Kultivierung der Pathogene und Infektionsversuche	29
2.2.2	Quantifizierung des Krankheitsbefalls	32
2.3	<i>In-vitro</i> -Tests mit <i>Colletotrichum lagenarium</i>	33
2.4	Applikation von Resistenzinduktoren	33
2.5	Probenahme für biochemische Analysen	35
2.5.1	Gewinnung von Gesamtblattextrakten	35

INHALTSVERZEICHNIS

2.5.2.	Gewinnung interzellulärer Waschflüssigkeiten	35
2.6	Biochemische Analysen	36
2.6.1	Bestimmung des Proteingehalts	36
2.6.2	Bestimmung ausgewählter Enzymaktivitäten	36
2.6.3	Bestimmung endogener Salizylsäuregehalte	38
2.6.4	Nachweis von Zelltod	40
2.6.5	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	41
2.6.6	Lipidperoxidation	42
3.	Ergebnisse	43
3.1	Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Mais und Ackerbohne	43
3.1.1	Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Mais	43
3.1.2	Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Ackerbohne	45
3.2	Experimente mit Gurken	46
3.2.1	Induktion von lokaler und systemischer Resistenz in Gurkenpflanzen durch Vorbehandlungen mit Phosphaten	47
3.2.1.1	Induktion lokaler Resistenz durch Phosphate	48
3.2.1.2	Untersuchungen zur direkten Wirkung von Phosphat auf <i>Colletotrichum lagenarium</i>	49
3.2.1.2.1	Einfluss von K_2HPO_4 auf das Myzelwachstum von <i>Colletotrichum lagenarium</i>	50
3.2.1.2.2	Einfluss von K_2HPO_4 auf die Konidienkeimung von <i>Colletotrichum lagenarium</i>	51
3.2.1.3	Systemische Resistenzinduktion durch Phosphate	51
3.2.1.3.1	Phosphat-induzierte systemische Resistenz im System Gurke/ <i>Colletotrichum lagenarium</i>	51
3.2.1.3.2	Phosphat-induzierte Resistenz gegenüber weiteren Pathogenen an Gurkenpflanzen	53
3.2.1.3.3	Charakterisierung der Phosphat-induzierten Resistenz im System Gurke/ <i>Colletotrichum lagenarium</i>	55
3.2.2	Testung der biologischen Wirksamkeit verschiedener Phosphate	59
3.2.3	Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Phosphat und anderen Resistenzinduktoren im System Gurke/ <i>Colletotrichum lagenarium</i>	60
3.2.4	Primäre Reaktionen auf Gurkenblättern nach Phosphatapplikationen	63
3.2.5	Untersuchungen zum Auftreten von Zelltod und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Phosphatbehandlungen	65

3.2.5.1	Untersuchungen zum Auftreten von Zelltod nach Phosphatbehandlungen	65
3.2.5.2	Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies	68
3.2.5.2.1	Nachweis von Superoxidanionen	69
3.2.5.2.2	Nachweis von Wasserstoffperoxid	71
3.2.5.3	Lipidperoxidation	73
3.2.6	Untersuchungen zur Akkumulation von Salizylsäure im Rahmen der Phosphat-induzierten Resistenz	74
3.2.6.1	Systemische Resistenzauslösung und Akkumulation von Salizylsäure nach Phosphatbehandlungen	74
3.2.6.2	Zeitlicher Verlauf der Salizylsäure-Akkumulation nach Phosphatbehandlungen	76
3.2.6.3	Vergleichende Untersuchungen zur Wirkung von Phosphat und anderen Induktoren auf die Akkumulation von Salizylsäure	78
3.2.7	Wirkung verschiedener Agenzien hinsichtlich der Zelltodauslösung, Induktion von Krankheitsresistenz sowie der Akkumulation von Salizylsäure	83
3.2.8	Untersuchungen zur Phosphat-induzierten Aktivierung abwehrassoziierter Enzyme	89
3.2.8.1	Peroxidasen	89
3.2.8.2	Polyphenoloxidase	91
3.3	Phosphat-induzierte Reaktionen bei Tabak	93
3.3.1	Auslösung von Zelltod bei Tabak durch Phosphatbehandlungen	93
3.3.2.	Biologische Wirkung von Phosphatbehandlungen im System Tabak/TMV	94
3.3.3	Untersuchungen zur Salizylsäure-Abhängigkeit der Phosphatwirkung im System Tabak/TMV	95
4.	Diskussion	97
4.1.	Phosphate als Auslöser induzierter Krankheitsresistenz	97
4.1.1	Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Mais und Ackerbohne	97
4.1.2	Biologische Wirkung von Phosphaten gegenüber Krankheiten bei Gurken	99
4.1.2.1	Direkte Wirkung von Phosphaten auf Pathogene und Induktion lokaler Krankheitsresistenz	99
4.1.2.2	Systemisch aktivierte Resistenz gegenüber Pilzkrankheiten	101

INHALTSVERZEICHNIS

4.2	Mechanismen der Phosphat-induzierten Resistenz	105
4.2.1	Nekrotisierung und Zelltod	106
4.2.2	Reaktive Sauerstoffspezies	110
4.2.3	Lipidperoxidation	113
4.3	Salizylsäure	114
4.3.1	Akkumulation von Salizylsäure nach Behandlung mit Phosphaten	114
4.3.2	Vergleich der Effekte von Phosphat und von biotischen sowie abiotischen/chemischen Induktoren auf die Akkumulation von Salizylsäure	116
4.4	Abwehrrassoziierte Proteine	120
4.5	Wirkung von Phosphaten im System Tabak/TMV	123
4.6	Ausblick und Bewertung	124
5.	Zusammenfassung	126
5.	Summary	128
6.	Literaturverzeichnis	130

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
<i>A. bidest.</i>	Aqua bidestillata
<i>A. dest.</i>	Aqua destillata
BTH	Acibenzolar-S-methyl; Wirkstoff in Bion®
cv.	Kultivar
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E, ΔE	Extinktion; Extinktionsänderung
EtOH	Ethanol
f. sp.	forma specialis
FG	Frischgewicht
FSA	freie Salizylsäure
g	Gramm
GBA	Grüner-Bohnen-Agar
GSA	gesamte Salizylsäure
h	Stunde
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HR	hypersensitive Reaktion (hypersensitive reaction)
INA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
ISR	induzierte systemische Resistenz (induced systemic resistance)
IWF	interzelluläre Waschflüssigkeit
LAR	lokal aktivierte Resistenz (local acquired resistance)
LOX	Lipoxygenase
mbar	Millibar
MDA	Malondialdehyd
MeOH	Methanol
MeSA	Methylsalizylat
mM	Millimolar
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MW	Molgewicht
μl	Mikroliter
mg	Milligramm

ABKÜRZUNGEN

NahG	Gen, das die Salizylat-Hydroxylase kodiert
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduziert)
NBT	Nitroblautetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCD	programmierter Zelltod (programmed cell death)
PDA	Kartoffel-Dextrose-Agar
POX	Peroxidase
PPO	Polyphenoloxidase
PR	pathogenesis related
pv.	Pathovar
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
SA	Salizylsäure
SAG	glucosidisch gebundene Salizylsäure
SAR	systemisch aktivierte Resistenz (systemic acquired resistance)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	thiobarbituric acid related substances
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TNV	Tabak-Nekrose-Virus
TRIS	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
v	Volumen
V	Volt
w	Gewicht
x g	relative Erdanziehung

1. Einleitung

Seit den Anfängen der Landwirtschaft bis hin zur Gegenwart verursachen Pflanzenkrankheiten große Schäden an Kulturpflanzen. Die damit verbundenen Ertragseinbußen stellen ein ernstzunehmendes Problem dar. Zu dessen Lösung werden insbesondere seitens der Forschung stets neue Ansätze gesucht, und deren Einführung in die Praxis wird als ein elementarer Bestandteil der Optimierung der landwirtschaftlichen Produktion angesehen. So lag der Anteil von Pflanzenkrankheiten an den weltweit verursachten Ertragsverlusten bei den großen landwirtschaftlichen Kulturen nach Schätzungen für die Jahre 1988 - 1990 bei 9 - 16 % pro Jahr. Hinzu kamen noch Verluste durch Insekten, Unkräuter sowie krankheitsbedingte Nachernteverluste, so dass die Gesamtverluste im Bereich von 30 - 50 % lagen (Oerke *et al.*, 1994). Allein 1995 betrug der Wert der weltweiten Pflanzenproduktion 1200 - 1300 Mrd. US-\$, wovon ca. 500 Mrd. US-\$ durch Krankheiten, Insekten und Unkräuter vernichtet werden. Darüber hinaus würden jährlich weitere Verluste in einer Größenordnung von ca. 330 Mrd. US-\$ ohne den Einsatz von Pflanzenschutzmitteln hinzukommen (Agrios, 1997).

Die ständige Zunahme der Weltbevölkerung und die unzureichende Ernährung eines Großteils der Menschheit zwingen zur Steigerung der Nahrungsmittelproduktion, zumal auch die verfügbare Anbaufläche begrenzt ist. Eine der bedeutendsten Maßnahmen zur Sicherung der Erntemengen bzw. Minderung von Ertragsverlusten ist der Einsatz von chemischen Pflanzenschutzmitteln. Diese dominierende Form des Pflanzenschutzes hat insbesondere in diesem Jahrhundert eine Steigerung der Produktion ermöglicht und die Ernährungslage zumindest für einen Teil der Menschheit verbessert. Die Intensivierung der Pflanzenschutzmaßnahmen durch zunehmenden Einsatz chemischer Mittel wirft aber auch Probleme auf wie z. B. Störung des natürlichen Gleichgewichts durch Selektion resistenter Erregerpopulationen, Gesundheitsgefährdung durch Pflanzenschutzmittelrückstände auf Erntegütern sowie mögliche Qualitätsminderungen von Nahrungsmitteln durch Wirkstoffe (Börner, 1997).

Während somit in den unterentwickelten Ländern die Produktion von Nahrungsmitteln vor allem auf die Steigerung der Quantität zielt, steht in den entwickelten Ländern mehr die Qualität der erzeugten Produkte im Vordergrund. Im Gegensatz zur bisher dominierenden Form des Pflanzenschutzes, der chemischen Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen, wird im Rahmen des integrierten Pflanzenschutzes versucht, zunehmend neue Konzepte zu entwickeln und in die Produktion zu integrieren. Dabei sollen alle verfügbaren Methoden zur Bekämpfung von Krankheiten und Schädlingen eingesetzt werden, um die Kulturpflanze optimal zu schützen sowie die Kosten und Umweltschäden zu minimieren. Ziel ist somit die Ausnutzung natürlicher Regulationsmechanismen, um Befall bzw. Schaden unter der wirtschaftlichen Schadensschwelle zu halten.

1. EINLEITUNG

Das gesteigerte Umweltbewusstsein weiter Bevölkerungsschichten in den entwickelten Ländern führte darüber hinaus in den letzten Jahren zu intensiven Forschungsaktivitäten und eröffnete biologischen bzw. alternativen Pflanzenschutzverfahren neue Perspektiven. So wurde versucht, weitere Konzepte zu entwickeln um eine Beeinträchtigung der pflanzlichen Leistungsfähigkeit entweder generell zu verhindern oder ökologisch/toxikologisch unbedenkliche Methoden zu nutzen. Während z. B. rein protektive Pflanzenschutzbehandlungen oder der Einsatz transgener Pflanzen mit veränderten Eigenschaften (z. B. Herbizidresistenz, Krankheitsresistenz, Schädlingsabwehr) bei weiten Teilen der Öffentlichkeit auf wenig Akzeptanz stoßen, werden biologische Verfahren i. d. R. eher positiv angesehen. Die Tendenz der Anwendung biologischer Verfahren könnte sich in Europa und insbesondere in Deutschland weiter verstärken.

In den letzten Jahren gab es vermehrte Anstrengungen zur Integration biologischer/alternativer Verfahren in die Praxis. So haben Verfahren wie die biologische Bekämpfung - vor allem zur Bekämpfung tierischer Schaderreger - stark an Bedeutung gewonnen. Zudem wird auch versucht, solche Strategien gegenüber phytopathogenen Pilzen und Bakterien zu etablieren. Die biologische Bekämpfung macht sich allgemein natürliche Antagonismen zu Nutzen, indem z. B. pflanzenschädigende Insekten durch den Einsatz von Antagonisten unterdrückt bzw. Bodenbakterien als Gegenspieler von pathogenen Pilzen eingesetzt werden. Die biologische Schädlingsbekämpfung im Obstbau, Weinbau und unter Glas erwies sich in der Praxis als sehr erfolgreich. Auch der Einsatz von Pflanzenstärkungsmitteln, welche die pflanzeigene Widerstandskraft gegenüber Pathogenen und Schädlingen steigern können, wird seit längerem als ernst zu nehmende Option erachtet. Als eine weitere Möglichkeit in diesem Umfeld erweist sich das Prinzip der induzierten Krankheitsresistenz, welches das aufgrund der genetischen Konstitution vorhandene Abwehrpotential von Pflanzen nutzt und diese in einen Zustand gesteigerter Abwehrkraft gegenüber Pathogenbefall versetzt. Diese über die Pflanze erzielbare Wirkung stellt somit eine Abkehr vom Prinzip der direkten Bekämpfung dar. Als weiterführende Perspektive erscheint die Bekämpfung von Pflanzenkrankheiten möglich zu werden, welche bisher nur schwer erfasst werden konnten bzw. gegen die keine Wirkstoffe zugelassen sind. Seitens der Grundlagenforschung sowie der chemischen Industrie wird in den letzten Jahren verstärkt an der Entwicklung von Agenzien und Verfahren gearbeitet, die auf dem Prinzip der induzierten Resistenz beruhen. Eine weitere denkbare Option scheint die biotechnologische Nutzung der induzierten Resistenz zu sein, welche ebenfalls intensiv vorangetrieben wird.

1.1 Induzierte Krankheitsresistenz

1.1.1 Das Phänomen der biotisch induzierten Resistenz

Nach einem Kontakt mit pathogenen oder apathogenen Mikroorganismen oder Viren zeigen Pflanzen oftmals eine gesteigerte Abwehrkraft gegenüber einem Folgebefall mit potentiellen Pathogenen. Diese Reaktion kann sich sowohl lokal, d. h. im Bereich der Infektionsstelle, als auch systemisch auf distalen Pflanzenteilen manifestieren, die keinen Kontakt mit dem Mikroorganismus oder Virus hatten. Dieser in der Natur häufig beobachtete Phänotyp stellt einen zentralen Bestandteil der zahlreichen pflanzlichen Adaptationsmechanismen an die Umwelt dar. Schon zu Beginn dieses Jahrhunderts wurde dieses als induzierte Resistenz bezeichnete Phänomen erkannt und insbesondere in den letzten beiden Jahrzehnten seitens der Forschung intensiv bearbeitet.

Eine Induktion von Resistenz nach vorherigem Pathogenbefall wurde erstmals von Ray (1901) und Beauverie (1901) beschrieben. In ihrer Virulenz abgeschwächte Stämme des Grauschimmelerregers *Botrytis cinerea* wurden zur Inokulation von Begonien verwendet, welche nachfolgend Resistenz gegenüber virulenten *Botrytis*-Stämmen zeigten. Dieses Phänomen wurde in den folgenden Jahren zahlreich beobachtet und auch beschrieben, so dass Chester bereits 1933 in einer Zusammenfassung über die „erworbene physiologische Immunität bei Pflanzen“ über 200 erschienene Publikationen zu diesem Thema aufzählte.

Ross etablierte 1961 mit Tabak/Tabakmosaikvirus (TMV) eines der klassischen Testsysteme für Untersuchungen zur induzierten Resistenz, welches auch heute noch als eine Standardmethode Verwendung findet. Die Blätter der hierbei verwendeten Tabaksorte *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc reagieren auf die Vorinokulation mit TMV mit der Bildung nekrotischer Lokalläsionen. Während bei vielen Tabaksorten i. d. R. systemische Mosaiksymptome auftreten, ist die Ursache für die Ausbildung von Lokalläsionen bei der Sorte Xanthi nc auf das Vorliegen des sog. N-Gens im Genom zurückzuführen, das die Bildung lokaler Läsionen initiiert und somit eine systemische Verbreitung des Virus verhindert. Im klassischen Versuchsansatz wurden wenige Tage nach der Vorinokulation der unteren Blätter mit TMV die höher inserierten Blätter mit dem gleichen Pathogen inokuliert. Aufgrund der durch Vorinokulation mit TMV aktivierten systemischen Resistenz waren auf den höher inserierten Blättern die durch TMV hervorgerufenen Läsionen deutlich schwächer ausgeprägt (Ross, 1961a und b). Diese systemische Steigerung der bereits vorhandenen, genetisch fixierten Resistenz konnte auch durch Vorinokulationen mit anderen Viren erreicht werden.

In zahlreichen Arbeiten wurde die Auslösung von induzierter Krankheitsresistenz von der Arbeitsgruppe von J. Kuc (Universität Lexington, Kentucky, USA) insbesondere an *Cucurbitaceen*

1. EINLEITUNG

erforscht (Dean und Kuc, 1987b; Madamanchi und Kuc, 1991; Hammerschmidt und Yang-Cashman, 1995). In einer der grundlegenden Arbeiten zur induzierten Resistenz beschrieben Kuc *et al.* (1975) die systemische Resistenzausprägung gegenüber dem Erreger der Brennfleckenkrankheit *Colletotrichum lagenarium* auf höher inserierten Blättern von Gurkenpflanzen, welche zuvor auf dem unteren Blatt mit demselben Erreger inokuliert wurden und dort ebenfalls nekrotische Läsionen als Symptome aufwiesen. Hammerschmidt *et al.* (1976) konnten an Gurken nach Vorinokulation mit *Cladosporium cucumerinum* lokal ausgeprägte Resistenz auf dem vorinokulierten Blatt gegenüber *C. lagenarium* beobachten. Jenness und Kuc (1977), Jenness *et al.* (1979) sowie Coutts und Wagih (1983) zeigten, dass durch Vorinokulation mit dem Nekrose-auslösenden Tabaknekrosevirus (TNV) bei Gurken Resistenz gegenüber *C. lagenarium* sowie auch gegenüber TNV selbst ausgelöst werden kann. Umgekehrt führten Vorinokulationen mit *C. lagenarium* zur systemischen Resistenzausprägung gegenüber *C. lagenarium* und TNV. In weiteren Versuchen wurde demonstriert, dass die biotische Induktion mit Viren (TNV), Bakterien (*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*) und Pilzen (*C. lagenarium*, *C. cucumerinum*) zu einer unspezifischen systemischen Resistenzausprägung gegenüber Pathogenen aus unterschiedlichen Taxa führt (Caruso und Kuc, 1979; Jenness *et al.*, 1979; Smith *et al.*, 1991). So erwiesen sich *C. lagenarium* und TNV als wirksame biotische Induktoren, die Resistenz in Gurkenpflanzen gegenüber 13 verschiedenen viralen, bakteriellen und pilzlichen Pathogenen auslösen können (Kuc, 1985). Bei Experimenten zur Bestimmung der Dauerhaftigkeit biotisch induzierter Resistenz konnten Kuc *et al.* (1975) und Kuc und Richmond (1977) zeigen, dass nach wiederholter Vorinokulation mit *C. lagenarium* ein systemischer Schutz von Gurkenpflanzen über 10 Wochen gegenüber *C. lagenarium* aufrecht erhalten werden konnte.

Bis heute wurde die erfolgreiche Auslösung induzierter Resistenz in zahlreichen Wirt-Pathogensystemen beschrieben (Lyon *et al.*, 1995a und b; Sticher *et al.*, 1997). Neben Tabak und Gurken wurde biotisch induzierte Resistenz bei zahlreichen weiteren dikotylen Pflanzenarten beobachtet. Dazu gehören bedeutende, landwirtschaftlich intensiv genutzte Kulturpflanzenarten wie Soja (Wrather und Ellrod, 1990), Kartoffel (Cruikshank und Mandryk, 1960; Strömberg und Brishammar, 1991), Tomate (Heller und Gessler, 1986; Kovats *et al.*, 1991), Bohne (Elliston *et al.*, 1971; 1976a und b), aber auch die Modellpflanze *Arabidopsis* (Uknes *et al.*, 1992 und 1993).

Auch bei monokotylen Pflanzenarten wurde Resistenzinduktion beschrieben, besonders in den wirtschaftlich bedeutendsten Kulturen wie Reis, Mais und Weizen. Nach Inokulation von Reis mit dem Bakterium *P. syringae* pv. *syringae*, welches nekrotische Läsionen im Rahmen einer hypersensitiven Reaktion hervorruft, konnte eine systemische Resistenz gegenüber dem Pilz *Pyricularia oryzae* beobachtet werden (Smith und Metraux, 1991). Vorinokulation von Gerste und Weizen mit avirulenten oder virulenten Pathogenen äußerte sich in lokaler Resistenz des vorinokulierten Blattes gegenüber *Erysiphe graminis* (Ouchi *et al.*, 1976a und b; Kunoh *et al.*, 1985; Schweizer *et al.*,

1989). Bei Gerste entwickelten distale, unbehandelte Blätter gegenüber Echtem Mehltau nach Vorinokulation der unteren Blattetagen mit diesem Pathogen systemische Resistenz (Hwang und Heitefuss, 1992).

Der Vielzahl der beschriebenen Wirt-Pathogen-Interaktionen, bei welchen induzierte Resistenz unter Labor- bzw. kontrollierten Bedingungen beobachtet wurde, stehen nur wenige Ergebnisse aus Feld- bzw. Freilandversuchen gegenüber. Tuzun *et al.* (1986) konnten bei Tabak durch eine Stamminjektion einer Sporangiensuspension des Blauschimmelerregers *Peronospora tabacina* unter Feldbedingungen systemische Resistenz gegenüber einer Sekundärinfektion mit demselben Pathogen hervorrufen. Diese äußerte sich in einem deutlich verminderten Befall sowie in Ertragszuwächsen. Auch Pflanzen, die aus Zellkulturen von induziert resistenten Mutterpflanzen gewonnen wurden, zeigten unter Freilandbedingungen eine gesteigerte Abwehrkraft gegenüber *P. tabacina* (Tuzun und Kuc, 1987). Caruso und Kuc (1977b) konnten zeigen, dass *Cucurbitaceen* nach biotischer Induktion mit *C. lagenarium* unter Freilandbedingungen wirkungsvoll gegenüber nachfolgendem Befall mit demselben Erreger geschützt werden können. In weiteren Arbeiten sind Ansätze für die erfolgreiche Umsetzung dieser Methode unter Feldbedingungen beschrieben (Kuc, 1977; McIntyre *et al.*, 1981; Schönbeck *et al.*, 1982; Balder und Schönbeck, 1983; Kehlenbeck *et al.*, 1994; Reglinski *et al.*, 1994).

1.1.2 Charakteristika der induzierten Krankheitsresistenz

Die intensive Forschungsarbeit auf dem Gebiet der induzierten Resistenz führte zu einer Vielzahl von Definitionen, welche dieses Prinzip zu beschreiben versuchen. In Anlehnung an das biologische Phänomen der biotischen Resistenz auslösung definieren Kessmann *et al.* (1994a) die induzierte Resistenz als „eine breit angelegte physiologische Immunität, die auf der Infektion mit einem nekrotisierenden Pathogen beruht“. Zusätzlich können vergleichbare Abwehrreaktionen der Pflanzen durch Behandlungen mit verschiedenen natürlichen sowie synthetischen Agenzien ausgelöst werden (Kessmann *et al.*, 1994a; Lyon *et al.*, 1995a und b; Sticher *et al.*, 1997).

Allgemeiner definieren Schönbeck *et al.* (1993) die induzierte Resistenz als „eine Steigerung der Resistenz von Pflanzen gegenüber Pathogenbefall“. Hierbei ist ein äußerer Stimulus notwendig, welcher keine Veränderung des Genoms hervorrufen darf. Die induzierte Resistenz kann biotisch - durch Inokulationen mit Nicht-Pathogenen, Pathogenen, inaktivierten Pathogenen, inkompatiblen Rassen, Saprophyten, Symbionten und natürliche Metaboliten - als auch abiotisch durch Chemikalien ausgelöst werden.

1. EINLEITUNG

Dean und Kuc (1987b) unterscheiden biotische und abiotische Resistenzinduktoren. Während erstere als Nekrose-auslösende Pathogene charakterisiert wurden, zu denen Pilze, Bakterien und Viren gezählt werden (Ross, 1961a und b; Bergstrom *et al.*, 1982; Tuzun *et al.*, 1986; Kuc, 1993), wurden insbesondere in den neunziger Jahren zunehmend natürliche sowie synthetische Chemikalien, d. h. abiotische Verbindungen beschrieben, die in Pflanzen Resistenz gegenüber Pathogenen auslösen können (Ward *et al.*, 1991; Uknes *et al.*, 1992; Cohen, 1994; Nielsen *et al.*, 1994; Kessmann *et al.*, 1994a; Lyon *et al.*, 1995a und b; Fought und Kuc, 1996; Friedrich *et al.*, 1996; Sunwoo *et al.*, 1996). Auf diese abiotischen Induktoren wird in nachfolgenden Abschnitten näher eingegangen.

Ein weiteres Charakteristikum der induzierten Resistenz ist die mehr oder weniger ausgeprägte Befallsminderung, nicht aber das vollständige Ausbleiben der Symptome. Zudem ist bei induziert resistenten Pflanzen ein bestimmtes Zeitintervall zwischen Induktorbehandlung und Ausprägung der Resistenz erforderlich, das sog. Induktionsintervall (Schönbeck *et al.*, 1980; Steiner und Schönbeck, 1997).

Induzierte Resistenz kann lokal, d. h. an der Stelle, wo der Induktor appliziert wurde, sowie auch systemisch, d. h. in entfernten unbehandelten Pflanzenteilen, ausgeprägt sein. Ross bezeichnete erstmalig die Resistenz der distalen, unbehandelten Blätter als systemisch erworbene Resistenz (systemic acquired resistance, SAR) und die Resistenz des vorinkulierten Blattes bzw. des unmittelbaren räumlichen Umfeldes der Stelle der Induktorbehandlung als lokal erworbene Resistenz (local acquired resistance, LAR) (Ross, 1961a und 1966). In diesen Arbeiten macht der Autor die Ausprägung der SAR von der Entstehung nekrotischer Reaktionen bzw. Symptomen der vorinokulierten Pflanzenteile abhängig.

Häufig wurde induzierte Resistenz mit der Immunisierung von Wirbeltieren verglichen und daher auch von „pflanzlicher Immunisierung“ gesprochen. Der Unterschied zu tierischen Systemen liegt bei der induzierten Resistenz von Pflanzen in der Unspezifität hinsichtlich Induktor und Pathogen, d. h. die Induktion mit verschiedenen Induktoren löst Resistenz gegenüber zahlreichen verschiedenen Pathogenen aus. Bei tierischen Systemen ist generell eine stärkere Spezifität zu beobachten. Ferner scheinen bei Pflanzen prinzipiell andere zelluläre Mechanismen beteiligt zu sein, so dass dieser direkte Vergleich nicht sinnvoll ist.

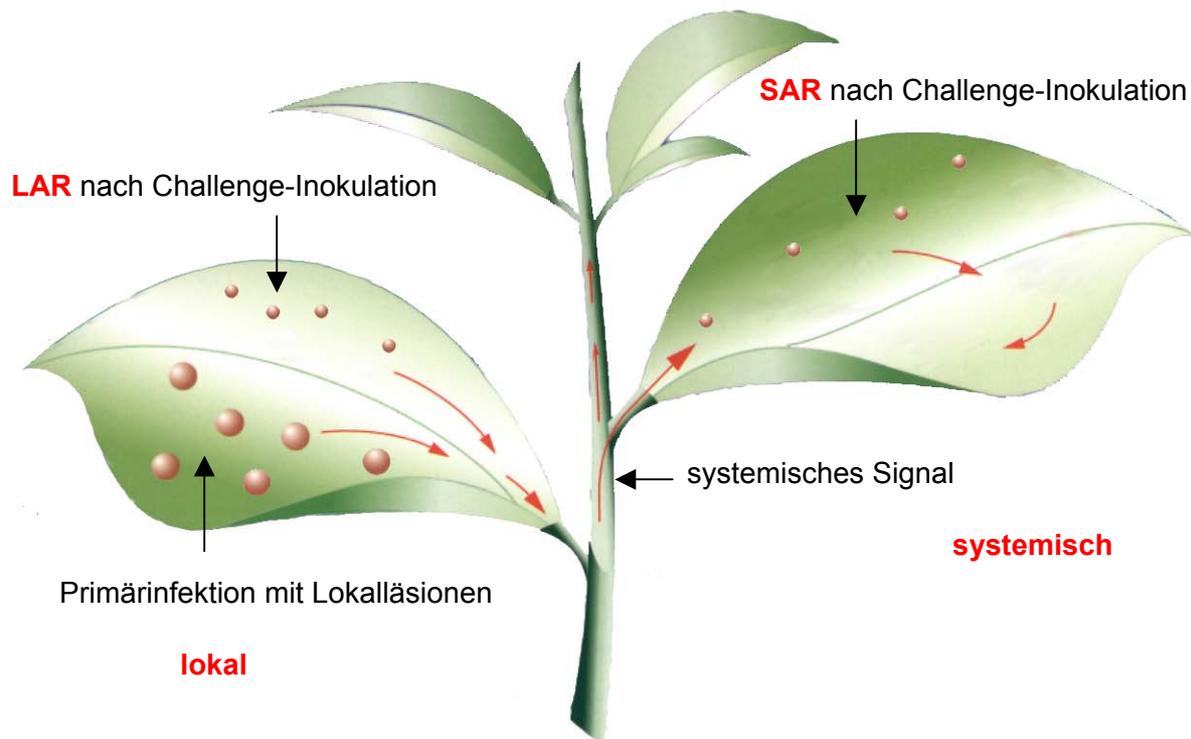


Abb. 1: Grundprinzip der biotisch induzierten Resistenz

LAR: lokal aktivierte Resistenz; SAR: systemisch aktivierte Resistenz, (verändert nach Kessmann *et al.*, 1996)

Das Grundprinzip der biotisch induzierten Resistenz ist schematisch in Abb. 1 dargestellt. Der Kontakt mit einem Nekrose-auslösenden Mikroorganismus oder Virus im Rahmen einer Primärfektion führt auf einem unteren Blatt zur Ausbildung von Lokalläsionen. Bei diesem Prozess wird die Bildung sowie Translokation eines Signals in das umliegende Gewebe sowie in distale Pflanzenteile postuliert (Crafts und Lorenz, 1944; Ross, 1966; Kuc, 1982). Dort werden Reaktionen eingeleitet, die bei einer Sekundärfektion (Challenge-Inokulation) zu einer Minderung der Symptomausprägung der Krankheit führen. Die Krankheitssymptome nach der Challenge-Inokulation sind dabei sowohl auf dem Blatt mit der Primärfektion (LAR) als auch auf dem distalen Blatt (SAR) deutlich schwächer ausgeprägt als die Läsionen der Primärinokulation (Kessmann *et al.*, 1996).

Das gemeinsame Merkmal aller Erreger, die zur SAR-Auslösung befähigt sind, ist die Fähigkeit, Lokalläsionen hervorzurufen, so dass diese kontrollierte Entstehung von nekrotischen Reaktionen nach einer Primärfektion als ein wichtiges Kriterium für die erfolgreiche Resistenzinduktion angesehen wird (Dean und Kuc, 1986a und b; Lawton *et al.*, 1996).

1. EINLEITUNG

1.1.3 Resistenzauslösung durch Rhizobakterien

Neben der beschriebenen und lange bekannten SAR-Auslösung wurde in den letzten Jahren eine weitere Form der induzierten Resistenz, die sog. induzierte systemische Resistenz (induced systemic resistance, ISR), beschrieben. Es handelt sich hierbei um eine biotische Induktion durch nicht-pathogene Rhizobakterien (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR), welche zur Ausprägung von systemischer Resistenz führt. Der Induktionsmechanismus scheint sich jedoch deutlich von dem der SAR zu unterscheiden, da es zu keiner Bildung von Nekrosen nach der Behandlung mit PGPR kommt. ISR-Auslösung konnte nach Applikation von *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. aeruginosa* sowie *Serratia marescens* in verschiedenen Pflanzenarten wie *Arabidopsis*, Bohne, Nelke, Gurke, Rettich, Tabak und Tomate gegenüber bakteriellen, viralen sowie pilzlichen Pathogenen festgestellt werden (Wei *et al.*, 1991; Kloepper *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995 und 1996; Raupach *et al.*, 1995 und 1996; Pieterse *et al.*, 1996; van Loon *et al.*, 1998).

1.2 Mechanismen und Prozesse der Aktivierung systemisch aktivierter Resistenz

1.2.1 Nekrotisierung und Zelltod

Die Entstehung von Nekrosen, d. h. Bereichen mit abgestorbenen Zellen, kann sowohl durch Pathogenbefall als auch durch zahlreiche äußere Umwelteinflüsse im pflanzlichen Gewebe hervorgerufen werden. So definieren Aust *et al.* (1993) Nekrosen allgemein als „lokalen Zell- oder Gewebetod als Folge der Abtötung des Protoplasmas durch physikalische oder toxische Einwirkungen oder als Reaktionen auf parasitische Einflüsse“. Prinzipiell kann hinsichtlich der Entstehung zwischen aktiven und passiven Prozessen unterschieden werden. Die passive Nekrotisierung kann als lokaler Zelltod angesehen werden, der als Folge einer direkten Schädigung der Zellmembran oder Organellen durch Exposition toxischer Substanzen, extremer Temperaturen oder traumatischer Verletzung entsteht (Cohen, 1993) bzw. durch äußere physikalische sowie toxische Einflüsse im Rahmen von Zelltodprozessen hervorgerufen wird (Richael und Gilchrist, 1999).

Wird hingegen der pflanzliche Stoffwechsel benötigt und sind biochemische Prozesse wie z. B. die hypersensitive Reaktion (1.2.2) bzw. programmierter Zelltod (1.2.3) bei der Entstehung von Nekrosen beteiligt, so kann man von aktiven Prozessen sprechen (Heath, 1980; He *et al.*, 1994; Greenberg, 1997).

Im Rahmen von Wirt-Parasit-Interaktionen ist das Auftreten nekrotischer Läsionen ein typisches Krankheitssymptom nach Befall mit Pilzen, Bakterien, Nematoden oder Viren bzw. für Verletzungen durch Insektenfraß. Die Definition der SAR als eine „breit-wirksame Resistenzerscheinung

nach Infektion mit nekrotisierenden Mikroorganismen und Viren“ (Hunt und Ryals, 1996; Neuschwander *et al.*, 1995; Ryals *et al.*, 1996), deutet bereits auf die zentrale Rolle von lokalisiertem Zelltod (Bildung von Nekrosen) bei der SAR-Auslösung hin. Manche Autoren sehen die Bildung von nekrotischen Läsionen als Folge der Primärinfektion mit Pathogenen als die wichtigste Voraussetzung im Prozess der biotischen SAR-Induktion an (Dean und Kuc, 1986a; Lawton *et al.*, 1996). So konnte beispielsweise bei Gurke gezeigt werden, dass langsam und kontrolliert entstehende nekrotische Läsionen - verursacht durch die Primärinfektion mit TNV - essentiell für die Auslösung von lokaler sowie systemisch aktivierter Resistenz waren, während eine Inokulation mit TMV weder nekrotische Läsionen verursachte noch SAR auslöste (Jenns und Kuc, 1980; Dean und Kuc, 1986a und b).

Das Auftreten von nekrotischen Läsionen bzw. Zelltodsymptomen muss jedoch nicht generell zur Ausprägung von SAR führen. Vielmehr ist hierbei die Art des Reizes und die Dauer der Entstehung nekrotischer Läsionen entscheidend. So traten nach Hitze- bzw. Kältebehandlung innerhalb weniger Stunden Wunden bzw. Zelltodsymptome auf, doch es wurde keine Resistenz ausgelöst (Madamanchi und Kuc, 1991; Klessig und Malamy, 1994). Auch durch mechanische Verletzungen (z. B. Behandlungen mit Trockeneis oder Abrasiven), welche das Gewebe sehr schnell abtöteten und ebenfalls makroskopisch sichtbare Nekrosen hervorriefen, konnte keine SAR induziert werden (Hammerschmidt und Kuc, 1982; Kuc, 1983; Malamy *et al.*, 1996). Diese schnell verlaufende Entstehung von Nekrosen als rein passiver Prozess scheint somit nicht zur SAR-Auslösung zu führen. Vielmehr erscheinen hierbei die aktiven zelluläre Prozesse essentiell.

Auch zahlreiche chemische Agenzien, die SAR auslösen, rufen nekrotische Läsionen hervor (Gottstein und Kuc, 1989; Mucharromah und Kuc, 1991; Fought und Kuc, 1996; Sticher *et al.*, 1997). Bisher wurde hierbei jedoch kaum zwischen aktiven und passiven Prozessen unterschieden und Ergebnisse zur physiologischen Entstehung liegen kaum vor.

1.2.2 Hypersensitive Reaktion

Bei inkompatiblen Wirt-Pathogen-Beziehungen kann oftmals die Bildung abgestorbener Zellen an Stellen der versuchten Penetration pilzlicher Erreger beobachtet werden (Hammond-Kossack und Jones, 1996). Man spricht in diesem Fall von der hypersensitiven Reaktion (HR), die von Agrios (1988) als „Zelltod der Wirtszellen innerhalb weniger Stunden nach Pathogenkontakt“ definiert wird. Weitere Definitionen finden sich bei Stakman (1915) bzw. Goodman und Novacky (1994), welche die HR als „rapiden Zelltod pflanzlicher Zellen verbunden mit Krankheitsresistenz“ beschreiben.

1. EINLEITUNG

Die HR wird als ein aktiver Prozess der Nekrotisierung angesehen, welcher den pflanzlichen Metabolismus erfordert (Goodman und Novacky, 1994; Heath, 1997). Eng verbunden mit der HR wird die Freisetzung toxischer Verbindungen sowie reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert, die mit der Erkennung von Pathogenen einhergehen. Die Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Einleitung der HR bzw. ihre Funktion als wichtige Faktoren der HR-Entwicklung zeigten Levine *et al.* (1994), Baker und Orlandi (1995) sowie Jabs *et al.* (1996). In jüngster Zeit wird die HR auch in Zusammenhang mit dem programmierten Zelltod bzw. von Apoptose gebracht (Greenberg, 1997). Ob jede HR auf programmiertem Zelltod basiert, wird jedoch in Frage gestellt (Heath, 1999).

Heath (1980) schreibt der HR eine wichtige Rolle im Rahmen pflanzlicher Abwehrreaktionen zu, da hierbei die Ausbreitung eines Pathogens im Gewebe verhindert wird. So wird obligat biotrophen Pilzen, z. B. Echten Mehltau-Pilzen, durch das Absterben der Wirtszellen die Nährstoffzufuhr entzogen (Prell, 1996).

1.2.3 Programmierter Zelltod

In den intensiv untersuchten tierischen Zellsystemen ist die Apoptose bzw. der programmierte Zelltod (programmed cell death, PCD) als ein aktiver Prozess definiert, der durch ein genetisch fixiertes Selbstzerstörungsprogramm initiiert wird (Bär, 1996) bzw. die selektive Eliminierung unerwünschter Zellen zum Ziel hat (Ellis *et al.*, 1991). Auch bei pflanzlichen Zellen wurde PCD beobachtet, u.a. bei der diploiden Parthenogenese (Havel und Durzan, 1996), der Entwicklung trachealer Elemente (Fukuda, 1997a und b), Seneszenz von Blättern (Buchanan-Wollaston, 1997) sowie in Aleuronzellen von Gerste während der Keimung (Wang *et al.*, 1998). Von zahlreichen Autoren wird vermutet, dass PCD im Rahmen der HR bei Wirt-Pathogen-Interaktionen beteiligt sein könnte (He *et al.*, 1994; Greenberg, 1997). Es handelt sich hierbei um einen aktiven Prozess, welcher die Beteiligung des pflanzlichen Stoffwechsels benötigt (Gilchrist, 1998). Typische Veränderungen beim Auftreten von PCD sind Chromatinkondensation, das Schrumpfen von Zellen sowie DNA-Fragmentierung (sog. Leiterformation) (Katsuhara und Kawasaki, 1996; Orzaez und Granell, 1997a).

Die HR wird von manchen Autoren als eine Form des PCD bzw. der Apoptose angesehen (Greenberg *et al.*, 1994, Heath, 1997). Zumindest wird bei programmiertem Zelltod im Rahmen der biotisch induzierten SAR vermutet, dass PCD und HR analog ablaufen (Greenberg, 1997). Ein Anhaltspunkt dafür ist das Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies bei beiden Prozessen (Mehdy, 1994; Dangl *et al.*, 1996; Lamb und Dixon, 1997).

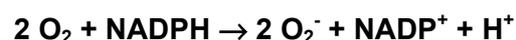
1.2.4 Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Der sog. oxidative burst wird definiert als kurzfristige, rapide Produktion großer Mengen von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) als Folge externer Stimuli (Wojtaszek, 1997). ROS wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanionen (O_2^-) entstehen als toxische Zwischenprodukte der Reduktion von molekularem O_2 , insbesondere in der extrazellulären Matrix (Mehdy, 1994; Wojtaszek, 1997). Weitere sehr reaktive Radikale sind das auftretende Hydroxylradikal (OH^\cdot) sowie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), die jedoch bereits nach wenigen μsec zerfallen, so dass die Nachweismöglichkeiten durch diesen Umstand sehr eingeschränkt sind (Baker und Orlandi, 1999).

Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre konnten zeigen, dass ROS wichtige Komponenten der pflanzlichen Pathogenabwehr sind (Mehdy, 1994; Baker und Orlandi, 1995) und ihnen eine wichtige Rolle bei Signalprozessen z. B. im Rahmen der SAR-Auslösung zukommt (Penell und Lamb, 1997a und b; Alvarez *et al.*, 1998). Die mögliche Rolle von ROS bei der Einleitung des Zelltods sowie der Aktivierung von weiteren wirtseigenen Abwehrreaktionen wurde zusammenfassend von Mehdy (1994), Mehdy *et al.* (1996) sowie Baker und Orlandi (1995 und 1999) dargestellt.

Es fehlen immer noch eindeutige experimentelle Hinweise über die exakte biochemische Identität der ROS-generierenden Systeme, wobei das Vorhandensein mehrerer Systeme anzunehmen ist (Bolwell, 1999). Dazu gehören ein Komplex plasmamembrangebundener NADPH-Oxidase, eine NADPH-abhängige Peroxidase auf der äußeren Plasmamembran bzw. zellwandgebundene/apoplastische Peroxidasen, Aminooxidasen, Oxalat-Oxidasen sowie Lipoxygenasen. Diese und weiterführende Informationen zur Biochemie der ROS finden sich in den Übersichtsartikeln von Bolwell und Wojtaszek (1997) sowie Lamb und Dixon (1997). Das primär entstehende, äußerst reaktive O_2^- -Radikal dismutiert unter Beteiligung der Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 (Baker und Orlandi, 1999). Ferner treten weitere ROS wie Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff im Rahmen dieser Reaktionen auf (Mehdy, 1994; Lamb und Dixon, 1997).

Bei Säugetierzellen kann die Bildung des Superoxidanions durch den katalytisch wirksamen Enzymkomplex der NADPH-Oxidase vereinfacht nach folgender Gleichung dargestellt werden (Desikan *et al.*, 1997):



Ähnliche Enzymkomplexe sind auch bei Pflanzen an der Bildung von O_2^- beteiligt (Dwyer *et al.*, 1995; Tenhaken *et al.*, 1995). Zugleich wird in jüngster Zeit intensiv untersucht, ob die HR wie aus den tierischen Systemen bekannt, charakteristische Merkmale von programmiertem Zelltod (Apoptose) aufweist.

1. EINLEITUNG

Nach Sutherland (1991) haben ROS bei der pflanzlichen Abwehr Einflüsse auf Oxidationsprozesse in Wirtsgeweben, insbesondere der Oxidation von Membranlipiden im Rahmen der hypersensitiven Reaktion (HR) sowie bei der Einleitung von Lignifizierungsprozessen in der Zellwand. Besonders für den äußerst reaktiven Singulett-Sauerstoff werden Funktionen im Rahmen der Auslösung von PCD, der Signalübertragung sowie Abwehrreaktionen vermutet (Knox und Dodge, 1985; Mehdy, 1994).

Oxidativer Streß kann in Pflanzen auf verschiedenen Wegen hervorgerufen werden, wobei insbesondere Pathogen-induzierte ROS-Bildung vielfach beschrieben wurde (Levine *et al.*, 1994; Doke *et al.*, 1996; Low und Merida, 1996; Heath, 1998b). Dabei kann die ROS-Produktion in pflanzlichen Geweben durch Kontakt mit dem Pilz bzw. Hyphen, Pilzzellwandkomponenten oder auch Bakterien initiiert werden (Baker und Orlandi, 1999). Besonders gut untersucht ist der oxidative burst in pflanzlichen Zellkulturen nach Auslösung durch sog. Elicitoren (Levine *et al.*, 1994; Glazener *et al.*, 1996).

In zahlreichen Wirt-Pathogensystemen konnte die Bildung von Wasserstoffperoxid, Superoxid-anionen und Hydroxylradikalen sowie eine kausale Verbindung des oxidativen burst mit der auftretenden HR gezeigt werden (Levine *et al.*, 1994; Mehdy, 1994; Low und Merida, 1996; Lamb und Dixon, 1997). So konnte nach Inokulation von Kartoffelscheiben mit *Phytophthora infestans* sowie nach Infektion von Tomaten mit HR-auslösenden Rassen von *Cladosporium fulvum* der kausale Zusammenhang zwischen ROS (O_2^- und H_2O_2) und frühen Prozessen der Wirt-Pathogen-Interaktion (HR) nachgewiesen werden (Doke, 1983; Vera-Estrella *et al.*, 1992). Auch nach Inokulation von Tabak mit *P. syringae* pv. *syringae* konnte eine gesteigerte Bildung von O_2^- sowie Lipidperoxidation beobachtet werden (Adam *et al.*, 1989). Ebenso ist die HR nach Inokulation von TMV auf Tabakpflanzen, die das N-Gen enthalten, eng mit der Bildung von ROS verknüpft (Mehdy, 1994; Fodor *et al.*, 1997). Einen weiteren Hinweis für die ursächliche Beteiligung von ROS an der Auslösung von Zelltod lieferten Keppler und Novacky (1987), die durch Applikation von Antioxidantien das Ausmaß des Zelltods bei hypersensitiv reagierenden Zellen vermindern konnten.

Auch die Exposition mit Ozon (O_3) verursacht einen oxidativen burst bei Tabak (Schraudner *et al.*, 1998), der mit der Aktivierung pflanzlicher Abwehrreaktionen verbunden zu sein scheint (Sander-mann *et al.*, 1998).

Ein weiterer, oftmals beobachteter Vorgang im Zusammenhang mit dem oxidativen burst und dem Auftreten von Zelltod ist die Lipidperoxidation, welche durch freie Radikale sowie durch Lipoxygenasen (LOX) erfolgt (Gutteridge und Halliwell, 1990). Dabei werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren der Plasmamembran zu Lipidperoxiden umgesetzt (Anderson *et al.*, 1998). Lipidperoxidation ist am Ende des Zellzusammenbruchs als Folge der Zerstörung der Membranintegrität und

Organellen zu beobachten, wobei ROS maßgeblich an dieser Reaktion beteiligt sein können (Duxbury *et al.*, 1991). Nach biotischer Induktion von Tabak mit TMV und dem Auftreten von Läsionen konnte oxidative Schädigung der Plasmamembran sowie gesteigerte Lipidperoxidation anhand erhöhter Gehalte des Abbauproduktes Malondialdehyd nachgewiesen werden (Anderson *et al.*, 1998). Auch nach biotischer Induktion von Gurkenpflanzen mit *C. lagenarium* bzw. TNV wurden gesteigerte LOX-Aktivitäten beobachtet (Avdiushko *et al.*, 1993a). Ebenfalls bei der Zelltodauslösung durch bestimmte Chemikalien konnten Lipidperoxidationsprozesse nachgewiesen werden (Siegrist *et al.*, 2000).

Interessante Experimente zur Aufklärung der Funktionen von ROS im Rahmen der pflanzlichen Pathogenabwehr und Stressphysiologie wurden auch mit transgenen Tabakpflanzen erzielt. Mittler *et al.* (1999) konnten die Bedeutung von ROS-detoxifizierenden Enzymen bei transgenen Pflanzen aufzeigen, bei denen die Expression der antioxidativen Enzyme Ascorbat-Peroxidase sowie Katalase gehemmt war. Diese Pflanzen produzierten verstärkt ROS und waren überempfindlich gegenüber Pathogenen. Bereits bei sehr geringen Inokulumdichten war ein erhöhtes Maß an Zelltod im Vergleich zu den Kontrollpflanzen festzustellen. In transgenen Kartoffeln, die eine pilzliche Glucosidase überexprimieren, wurde ebenfalls eine gesteigerte Bildung von H₂O₂ sowie erhöhte Resistenz gegenüber *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* und *Phytophthora infestans* beobachtet (Wu *et al.*, 1995).

1.3 Signalmoleküle bei der Auslösung systemischer Resistenz

Die bei der biotischen Induktion von Krankheitsresistenz durch Mikroorganismen bzw. Viren verursachte Gewebenekrotisierung stellt einen entscheidenden Prozess während der SAR-Auslösung dar. Ausgehend von dieser Beobachtung ist konsequenterweise zu vermuten, dass in solchen Bereichen endogene Signale gebildet und auch transloziert werden müssen, damit in distalen Pflanzenteilen eine Resistenzausprägung stattfindet (Crafts und Lorenz, 1944; Ross, 1966; Kuc, 1982; Klessig *et al.*, 1998). Da in Gurkenpflanzen Resistenz in Blättern oberhalb und unterhalb des inokulierten Blattes durch biotische Induktoren ausgelöst werden kann, wurde beispielsweise postuliert, dass ein translozierbares, Phloem-mobiles Signal existieren könnte (Guedes *et al.*, 1980; Tuzun und Kuc, 1985). Pfropfungsversuche von Jenns und Kuc (1979) belegten, dass das Signal aus den Gurkenunterlagen in die Pfropfreiser von Melonen gelangt und dort Resistenz ausgelöst wird. Weiterhin konnten Dean und Kuc (1986a und b) zeigen, dass das inokulierte Blatt der Ausgangspunkt des Signals ist, welches innerhalb von 72 h nach der Primärinokulation von Gurkenpflanzen mit *C. lagenarium* über das Phloem transloziert wird.

1. EINLEITUNG

Dieses vielfach postulierte Signal konnte trotz intensiver Untersuchungen bisher nicht eindeutig identifiziert werden. Zahlreiche Verbindungen und Moleküle wie z. B. Stickoxid (NO), Oligosaccharide, Ethylen, Jasmonsäure und Salizylsäure wurden in den letzten Jahren als potentielle Kandidaten diskutiert (Enyedi *et al.*, 1992; Klessig und Malamy, 1994). Von diesen Verbindungen hat sich insbesondere die Salizylsäure (SA) in den vergangenen Jahren als ein für die Resistenzauslösung bedeutendes Molekül erwiesen, welches immer noch von zahlreichen Forschern als zentrale Signalkomponente angesehen wird (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Gaffney *et al.*, 1993; Klessig *et al.*, 1998).

1.4 Die Rolle von Salizylsäure bei der Auslösung systemischer Krankheitsresistenz

Die Salizylsäure wurde als natürlich vorkommende phenolische Verbindung in einer Reihe von Pflanzenarten nachgewiesen (Raskin *et al.*, 1990). Interessanterweise fungiert die SA bei thermogenen Aronstabgewächsen als mobiles Signalmolekül (sog. Calorigen), welches maßgeblich an der Regulation des komplexen Blühvorgangs dieser Pflanzen beteiligt ist (Raskin *et al.*, 1987 und 1989). SA wurde in der Vergangenheit deshalb auch als potentielles Pflanzenhormon diskutiert (Raskin, 1992). Weitere physiologische Effekte von SA wurden auch in Bezug auf die Induktion des Blühvorgangs (Cleland und Ajami, 1974), die Hemmung der Phosphat- und Kaliumaufnahme (Glass, 1973, 1974a und b) und die Hemmung der Ethylenbiosynthese (Leslie und Romani, 1986) festgestellt.

Arbeiten von R. White hatten bereits 1979 gezeigt, dass durch die exogene Applikation von SA bei Tabakpflanzen Resistenzreaktionen hervorgerufen werden (White, 1979; Antoniw und White, 1980). Malamy *et al.* (1990) konnten schließlich zeigen, dass es in Tabak nach einer Inokulation mit TMV zu lokaler und systemischer Akkumulation von SA kommt, die der Resistenzausbildung vorausgeht. Bei zahlreichen dikotylen Pflanzenarten konnte die Akkumulation von SA nach Pathogeninokulation und nachfolgend eine erfolgreiche SAR-Auslösung nachgewiesen werden (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991; Yalpani *et al.*, 1991; Meuwly und Metraux, 1993; Kessmann *et al.*, 1994b; Meuwly *et al.*, 1994; Mölders *et al.*, 1994).

Metraux *et al.* (1990) fanden in Gurkenpflanzen nach biotischer Induktion mit TNV bzw. *C. lagenarium* im Phloemsaft erhöhte SA-Gehalte, welche bereits vor der SAR-Ausprägung auftraten. Mittels ¹⁴C-Markierung konnte zudem eine schnell einsetzende Metabolisierung sowie Verlagerung der SA in unbehandelte Pflanzenteile nachgewiesen werden (Metraux *et al.*, 1990). SA-Akkumulation scheint somit neben dem Zelltod ein weiteres entscheidendes Element auf dem Weg der SAR-Auslösung zu sein (Klessig *et al.*, 1998).

Meuwly *et al.* (1995) charakterisierten den SA-Syntheseweg mittels Markierungsexperimenten und Versuchen an Gurkenpflanzen, welche mit TNV und *P. lachrymans* infiziert waren. Die Synthese der SA erfolgt ausgehend von Phenylalanin, welches aus dem Shikimat-Phenylpropanoid-Stoffwechselweg stammt. Phenylalanin wird durch das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) zu *trans*-Zimtsäure umgewandelt. Nach Umsetzung der Zimtsäure in Benzoessäure, der unmittelbaren SA-Vorstufe, entsteht unter Beteiligung der Benzoessäure-2-Hydroxylase schließlich freie SA. Es wird vermutet, dass diese freie SA Signalfunktion bei der Auslösung der SAR besitzt (Malamy und Klessig, 1992). Neben dieser freien Säure kann im Gewebe ein großer Anteil der SA als SA-Glucosid an Zucker gebunden vorliegen. So konnten Meuwly *et al.* (unveröffentlicht) nach Inkubation von Blattextrakten mit β -Glucosidase zusätzlich ca. 80 % mehr SA im Gewebe detektieren, was auf das Vorhandensein eines O-Glucosids in Gurkenpflanzen hindeutet. Das Vorliegen großer Mengen glucosilierter SA wurde auch bei Tabak nachgewiesen (Enyedi *et al.*, 1992; Malamy *et al.*, 1992; Enyedi und Raskin, 1993; Hennig *et al.*, 1993a und b). Diese glucosidisch gebundene SA liegt somit in einer physiologisch inaktiven Form vor und dient wahrscheinlich der Regulation des endogenen SA-Levels. Gebundene SA wird von Klessig und Malamy (1994) als eine SA-Speicherform angesehen, aus der bei Bedarf wieder freie SA gebildet werden kann.

Shulaev *et al.* (1995 und 1997) konnten zeigen, dass neben der SA auch das Methylsalizylat (MeSA) als volatiler Signalstoff für die SAR bei Tabak von Bedeutung ist, welcher nach Inokulation mit TMV aus SA gebildet und in die Atmosphäre abgegeben wurde. Als volatile Komponente kann es die SAR-Ausprägung sowie Expression von Abwehrgenen in benachbarten Pflanzen und in unbehandelten Teilen der lokal infizierten Pflanze anregen (Shulaev *et al.*, 1997; Seskar *et al.*, 1997).

Die allgemein wichtige Rolle der SA bei der pflanzlichen Pathogenabwehr wurde von Mauch-Mani und Slusarenko (1996) auch bei genetisch determinierter Resistenz belegt. So waren transgene *Arabidopsis*-Pflanzen mit gehemmter PAL-Aktivität gegenüber avirulenten Pathogenen, die von diesem Pflanzengenotyp normalerweise effektiv abgewehrt werden können, anfällig. Nach exogener SA-Applikation konnte der resistente Phänotyp wiederhergestellt werden.

Bei einer ganzen Reihe von Untersuchungen wurde eine enge Korrelation zwischen der Akkumulation von SA sowie der SAR-Auslösung bei verschiedenen Pflanzenarten beschrieben (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1991, Yalpani *et al.*, 1991 und 1993a und b; Meuwly und Metraux, 1993; Uknes *et al.*, 1993; Meuwly *et al.*, 1994; Mölders *et al.*, 1995). Ein entscheidender Fortschritt wurde jedoch durch den Einsatz von transgenen Pflanzen (*Arabidopsis*, Tabak) erzielt, die das bakterielle nahG-Gen aus *Pseudomonas putida* konstitutiv exprimierten. Diese Gen kodiert für Salizylathydroxylase, welches die entstehende SA direkt zu Catechol umwandelt. Solche Pflanzen können demnach keine nennenswerten SA-Gehalte nach Infektion mit

1. EINLEITUNG

nekrotisierenden Pathogenen akkumulieren. Es zeigte sich, dass bei solchen Pflanzen mit biotischen Induktoren keine SA mehr hervorgerufen werden kann (Gaffney *et al.*, 1993; Bi *et al.*, 1995; Lawton *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1996).

Diese enge Korrelation zwischen SA-Akkumulation und Resistenz kann jedoch nicht als ein eindeutiger Beweis dafür gewertet werden, dass es sich bei SA um das translozierte primäre Signal handelt. Einige Arbeiten deuten darauf hin, dass SA nicht das unmittelbare Signal für die Auslösung von SAR ist. So konnten Rasmussen *et al.* (1991) bei Gurkenpflanzen nach biotischer Induktion mit *P. syringae* pv. *syringae* SAR auslösen, obwohl das infizierte Blatt bereits 6 h nach der Inokulation entfernt wurde und bis zu diesem Zeitpunkt keine nachweisbare SA-Akkumulation im Phloemsaft festzustellen war. Bei Pfropfungsversuchen an Tabakpflanzen konnten Vernooij *et al.* (1994) zeigen, dass es nach TMV-Inokulation von NahG-Unterlagen, die zur SA-Akkumulation nicht befähigt sind, zur SAR-Ausprägung in aufgepfropften Wildtyp-Reisern kommt. Aufgrund dieser Daten wurde postuliert, dass SA zwar notwendig für die SAR-Auslösung ist, jedoch nicht das primäre Signalmolekül darstellt (Vernooij *et al.*, 1994; Willits und Ryals, 1998). Diese Annahme wird momentan sehr kontrovers diskutiert (Draper, 1997; van Camp *et al.*, 1998).

Der Wirkungsmechanismus bzw. die Funktion der Salizylsäure im Prozess der SAR-Auslösung und Weiterleitung ist bis heute trotz zahlreicher Forschungsergebnisse noch nicht eindeutig aufgeklärt. Aufgrund der umfangreichen Forschungsarbeiten soll an dieser Stelle nur auf einige ausgewählte mögliche Mechanismen eingegangen werden.

SA sowie H₂O₂ werden regulative Funktionen bei der Ausprägung von Krankheitsresistenz zugeschrieben (Wu *et al.*, 1995, Hammond-Kosack und Jones, 1996). Yalpani *et al.* (1991) zeigten, dass eine SA-Applikation ebenso wie TMV-Inokulation die Bildung von Abwehrproteinen bei Tabak induziert. Ein Ansatz zum Verständnis des möglichen Wirkmechanismus der SA wurde von der Arbeitsgruppe von Klessig aufgestellt (Chen *et al.*, 1993; Conrath *et al.*, 1995). Sie konnte zeigen, dass SA die Katalase sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* binden und hemmen kann, wodurch es zum verminderten Abbau von H₂O₂ kommt. Der daraus resultierende Anstieg der H₂O₂-Gehalte könnte am oxidativen burst sowie an hypersensitiven Reaktionen beteiligt sein, so dass H₂O₂ als sog. second messenger wirksam wäre. Andere Gruppen zeigten jedoch, dass die SA die Katalase nicht hemmt (Tenhaken und Rubel, 1997).

Durner und Klessig (1996) vermuten, dass die oxidierte Form der SA als SA-Radikal maßgeblich an der Lipidperoxidation beteiligt ist.

Shirasu *et al.* (1997) konnten bei Suspensionszellen von Soja nachweisen, dass SA die HR verstärkt und maßgeblich an der Bildung von ROS beteiligt ist. Petersilienzellen, die durch SA-Gaben vorkonditioniert wurden, steigerten nach anschließender Elicitorgabe die Expression von SAR-Genen (Kauss *et al.*, 1992) sowie die Bildung von H₂O₂ (Kauss und Jeblick, 1995).

An *Arabidopsis* als Modellpflanze wurden von der Gruppe von J. Ryals (Novartis, USA) zahlreiche Experimente zur Erforschung der Signalprozesse sowie der Funktion von SA bei der Auslösung von SAR durchgeführt (Uknes *et al.*, 1992 und 1993; Ryals *et al.*, 1996). Kessmann *et al.* (1996) haben unterschiedliche *Arabidopsis*-Mutanten erstellt, deren Eigenschaften sich zur Aufklärung von Prozessen innerhalb der Signalkette der SAR-Auslösung eignen. Die sog. *cim*-Mutante (constitutive immunity) exprimiert im nichtinduzierten Zustand im hohen Ausmaß typische SAR-Genprodukte (PR-1) und wies erhöhte SA-Gehalte sowie Resistenz gegenüber Pathogenen auf. Sog. *Isd*-Mutanten (lesion simulating disease) zeigen ebenfalls gesteigerte Aktivitäten bezüglich PR1-Expression und Resistenz, wobei zusätzlich spontan nekrotische Läsionen auftreten. Pflanzen mit der Bezeichnung *nim* (non-inducible immunity) können nicht durch Induktoren wie 2,6-Dichlorisonikotinsäure (INA) induziert werden. Diese Mutanten sowie Pflanzen mit dem nahG-Gen wurden zur Aufklärung der Signalprozesse der SAR benutzt. Es konnte gezeigt werden, dass synthetische Induktoren wie z. B. INA und BTH innerhalb des gleichen Signalwegs zur Auslösung von SAR wirken, der nach biotischer Induktion über die Akkumulation von SA zur SAR führt. Diese Induktoren setzen jedoch später in dieser Signalkette ein (Abb. 2). Ferner wurde gezeigt, dass Jasmonat und Ethylen als endogene Signalmoleküle für die Signaltransduktion im Rahmen der SAR nicht notwendig sind.

Ebenfalls anhand von *Arabidopsis*-Mutanten konnte gezeigt werden, dass konstitutiv hohe SA-Gehalte zu erhöhter Resistenz führen (Dangl *et al.*, 1996; Ryals *et al.*, 1996). *Arabidopsis*-Mutanten (*npr1*: non-expresser of pr genes; *sai1*: salicylic acid insensitive; *nim*: non inducible immunity) können nicht durch SA zur SAR gebracht werden, exprimieren keine PR-Gene, sind anfällig gegenüber avirulenten Pathogenen und können weder durch SA noch synthetische Induktoren (z. B. BTH und INA) induziert werden (Delaney *et al.*, 1995; Cao *et al.*, 1997; Shah *et al.*, 1997). Deshalb wird vermutet, dass SA, BTH und INA über denselben Signaltransduktionsweg wirken, der zur Ausbildung von SAR führt.

Greenberg (1997) vermutet zwei wesentliche Funktionen der SA. Erstens konditioniert sie die Aktivierung des Zelltods, zweitens reguliert sie dessen Ausmaß. *Arabidopsis*-Mutanten (*Isd*), welche spontan Läsionen (Zelltod) entwickeln und hohe SA-Gehalte aufweisen, zeigten bei reduzierten SA-Gehalten ein deutlich geringeres Auftreten von Zelltodsymptomen (Weymann *et al.*, 1995).

1. EINLEITUNG

1.5 Abwehrmechanismen im Rahmen systemisch aktivierter Resistenz

1.5.1 Strukturelle Abwehrmechanismen

Eine wesentliche Bedeutung im Rahmen pflanzlicher Abwehrprozesse kommt strukturellen Barrieren zu, welche die Penetration von Pathogenen erschweren oder verhindern. So wurden nach biotischer Induktion von Gurkenpflanzen durch Inokulation mit *C. lagenarium* Zellwandverstärkungen durch Lignifizierung, Papillenbildung, Silikateinlagerungen sowie die Akkumulation zellwandverstärkender Glycoproteine beschrieben (Hammerschmidt und Kuc, 1982; Kovats *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1993). Durch die Ausbildung dieser Barrieren war im resistenten Gewebe die Anzahl erfolgreicher Pilzpenetrationen stark reduziert, ohne dass die Sporenkeimung und die Appressorienbildung beeinflusst waren (Richmond *et al.*, 1979; Hammerschmidt und Kuc, 1982; Stumm und Gessler, 1986; Dean und Kuc, 1987a; Xuei *et al.*, 1988; Kovats *et al.*, 1991).

Die Lignifizierung ist ein zentraler Abwehrmechanismus im Rahmen der Abwehrprozesse der SAR (Vance *et al.*, 1980; Hammerschmidt und Kuc, 1982; Dean und Kuc, 1987a). Als Bausteine der Ligninbiosynthese treten Derivate der Zimtsäure in Erscheinung, die durch apoplastische Peroxidasen und H_2O_2 zu einem dreidimensionalen Netz verknüpft werden (Groß, 1977; Vance *et al.*, 1980). Der Einbau von Lignin-artigen Phenolen bewirkt eine Verstärkung der Zellwände vor allem im Bereich potentieller Penetrationsstellen. Zudem konnte in biotisch induzierten Gurkenpflanzen eine schneller ablaufende Lignifizierung als bei Kontrollpflanzen beobachtet werden (Dean und Kuc, 1987a), die mit gesteigerten Peroxidase-Aktivitäten einherging (Smith und Hammerschmidt, 1988).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus zur Verhinderung der Penetration pathogener Pilze stellt die Bildung von Papillen dar (Aist, 1976; Aist und Bushnell, 1991). Bei Gurken- und Kartoffelpflanzen mit ausgeprägter SAR konnte eine schnelle Bildung von Papillen im Bereich von Penetrationsstellen beobachtet werden, die von entsprechenden pilzlichen Erregern nur selten durchbrochen wurden (Stumm und Gessler, 1986; Kovats *et al.*, 1991; Strömberg und Brishammar, 1993). Hauptbestandteil von Papillen ist Callose, ein von dem Enzym Callose-Synthase synthetisiertes Polymer aus β -1,3-Glucosemolekülen mit einigen 1,5-Verknüpfungen (Kauss, 1989). Gesteigerte Aktivitäten der plasmamembrangebundenen Callose-Synthase wurden von Schmele und Kauss (1990) nach biotischer Induktion mit TNV lokal und systemisch in Gurkenpflanzen nachgewiesen. Auch bei monokotylen Pflanzenarten wie Weizen und Gerste stellt die Papillenbildung einen zentralen Abwehrmechanismus bei induzierten Pflanzen dar (Kogel *et al.*, 1995; Görlach *et al.*, 1996).

Weitere proteinogene Abwehrkomponenten im Zellwandbereich sind hydroxyprolinreiche Glykoproteine, die als Bausteine struktureller Barrieren gegenüber Pathogenen beteiligt sein können (Hammerschmidt *et al.*, 1984; Esquerre-Tugaye *et al.*, 1985; Stermer und Hammerschmidt, 1987).

1.5.2 Biochemische Abwehrmechanismen

Neben den strukturellen Abwehrmechanismen wurden im Rahmen der Ausprägung von SAR zusätzlich zahlreiche biochemische Abwehrkomponenten beschrieben, von denen abwehrrassoziierte Proteine und antimikrobielle Verbindungen die größte Bedeutung besitzen.

Bereits in den siebziger Jahren beschrieben van Loon und van Kamen (1970) sowie Gianinazzi *et al.* (1970) nach Inokulation von Tabak mit verschiedenen Viren das Auftreten einer Reihe saurer, extrazellulärer Proteine. Van Loon und Antoniw (1982) gelang es später, die Korrelation zwischen der Resistenzausprägung und dem Auftreten dieser sog. PR-Proteine (pathogenesis related proteins) zu untermauern. Van Loon *et al.* (1994) definieren PR-Proteine allgemein als „pflanzliche Proteine, welche nach einem Pathogenbefall oder vergleichbaren Situationen wie z. B. Nematodenbefall, Insektenfraß, Behandlung mit Chemikalien sowie diversen Stressbehandlungen akkumulieren“. Charakteristisch für diese Proteine ist i. d. R. ein relativ niedriges Molekulargewicht, eine hohe Stabilität, die Löslichkeit bei niedrigem pH-Wert sowie Resistenz gegenüber proteolytischen Enzymen (van Loon *et al.*, 1994). Lokalisiert sind die basischen Isoformen der PR-Proteine in der Vakuole, während die sauren Isoformen vorwiegend im Apoplasten zu finden sind (van Loon 1985). Die Einteilung von PR-Proteinen erfolgt nach van Loon und van Strien (1999) in 14 Familien (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der PR-Proteine (nach van Loon und van Strien, 1999):

Familie	typischer Vertreter	Eigenschaften
PR-1	Tabak PR-1a	unbekannt
PR-2	Tabak PR-2	β-1,3-Glucanase
PR-3	Tabak P, Q	Chitinase Typ I, II, IV, V, VI, VII
PR-4	Tabak `R`	Chitinase Typ I, II
PR-5	Tabak S	Thaumatococcus-ähnlich
PR-6	Tomate Inhibitor I	Proteinaseinhibitor
PR-7	Tomate P ₆₉	Endoproteinase
PR-8	Gurke Chitinase	Chitinase Typ III
PR-9	Tabak `Lignin-bildende Peroxidase`	Peroxidase
PR-10	Petersilie `PR-1`	`Ribonuclease-ähnlich`
PR-11	Tabak Klasse 5 Chitinase	Chitinase Typ I
PR-12	Radies Rs-AAFP3	Defensin
PR-13	<i>Arabidopsis</i> THI.2.1	Thionin
PR-14	Gerste LTP4	Lipidtransferprotein

1. EINLEITUNG

PR-Proteine wurden zwischenzeitlich in vielen mono- und dikotylen Kulturpflanzen nach Pathogenbefall in den befallenen als auch in den unbehandelten Blättern nachgewiesen (van Loon und van Kamen, 1970; Fraser, 1987; Bol *et al.*, 1990; Stintzi *et al.*, 1993; Cohen *et al.*, 1994, Kessmann *et al.*, 1994a; Ryals *et al.*, 1996; Sticher *et al.*, 1997). Die Induktion von PR-Proteinen kann zusätzlich durch Einwirkung abiotischer Faktoren, wie bestimmte Umweltbedingungen oder Behandlung mit Chemikalien erfolgen. Dazu gehören UV-Licht, Verwundung, Plasmolyse, Polyacrylsäure, Auxine, Cytokinine, Schwermetallsalze, Mannitol, Aminosäuren, Thiamin, Arachidonsäure, Ozon, H₂O₂ und osmotischer Stress (van Loon, 1983a; Singh *et al.*, 1989; Kessmann *et al.*, 1994a; Ryals *et al.*, 1996). Des Weiteren lösen auch abiotische Resistenzinduktoren die Bildung von PR-Proteinen aus (Irving und Kuc, 1990; Ward *et al.*, 1991; Avdiushko *et al.*, 1993b; Schneider und Ullrich, 1994; Siegrist *et al.*, 1997).

Einige PR-Proteine werden als wichtige Marker für erfolgreiche SAR-Auslösung angesehen (Kessmann *et al.*, 1994a; Ryals *et al.*, 1996).

Für einzelne Vertreter aus den Familien PR 1-5 konnten *in vitro* antimikrobielle Aktivitäten nachgewiesen werden (Mauch *et al.*, 1988b; Woloshuk *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 1994; Ponstein *et al.*, 1994; Niderman *et al.*, 1995; Abad *et al.*, 1996; Caruso *et al.*, 1996). Des Weiteren zeigte sich nach Überexpression einzelner PR-Proteine erhöhte Pathogenresistenz (Broglie *et al.*, 1991; Alexander *et al.*, 1993; Bowling *et al.*, 1994). Eine besonders deutliche Akkumulation von Proteinen tritt nach SAR-Auslösung in Tabak auf. Die biologische Funktion der in Tabak sehr stark induzierten Proteine aus der PR-1 Gruppe ist bisher noch weitgehend unbekannt, jedoch wurden antifungale Wirkungen gegenüber Oomyceten wie *Phytophthora infestans* beschrieben (Alexander *et al.*, 1993).

In Gurkenpflanzen konnten als wichtige PR-Proteine apoplastische Peroxidasen sowie β -1,3-Glucanasen und Chitinasen nachgewiesen werden (Hammerschmidt *et al.*, 1982; Metraux *et al.*, 1988; Dalisay und Kuc, 1995; Ji und Kuc, 1995; Strobel *et al.*, 1996). Die in Gurke auftretende sog. Klasse 3-Chitinase wird in die PR-Familie 8 eingeordnet (Boller und Metraux, 1988; van Loon und van Strien, 1999). Sie stellt das am stärksten induzierte PR-Protein bei Gurkenpflanzen dar, deren Aktivitätssteigerung sowohl in den inokulierten als auch unbehandelten distalen Blättern nach Inokulation mit *C. lagenarium*, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* sowie TNV nachgewiesen werden konnte (Metraux und Boller, 1986; Metraux *et al.*, 1988; Metraux *et al.*, 1989; Dalisay und Kuc, 1995). Chitinase-Aktivität ließ sich auch durch abiotische Induktoren steigern (Zhang und Punja, 1994). Daneben ist in Gurke vor allem Peroxidaseaktivierung vielfach beschrieben. Anstiege der Peroxidase-Aktivitäten konnten nach lokaler Inokulation der unteren Blätter mit *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Hammerschmidt *et al.*, 1982) sowie *C. lagenarium* (Smith und Hammerschmidt, 1988) in höher inserierten Gurkenblättern nachgewiesen werden.

Neben den PR-Proteinen spielen weitere Proteine im Rahmen der Pathogenabwehr eine wichtige Rolle. So haben Lipoxygenasen (LOX), neben ihrer allgemeinen regulatorischen Funktion innerhalb der pflanzlichen Wachstums- und Entwicklungsphysiologie, auch eine Bedeutung im Abwehrprozess (Slusarenko *et al.*, 1993; Avdiushko *et al.*, 1993a). Sie sind maßgeblich an der Initiierung der hypersensitiven Reaktion (HR) beteiligt, so dass der Anstieg der LOX-Aktivität als ein früh einsetzendes Ereignis im Vorfeld einer HR, z. B. bei inkompatiblen Interaktionen von Pflanzen und Bakterien, beobachtet wird (Croft *et al.*, 1990; Goodman und Novacky, 1994). Bei der SAR-Auslösung in Gurkenpflanzen durch Applikation von Resistenzinduktoren wie Salizylsäure bzw. 2,6-Dichlorisonikotinsäure konnte zudem die Bildung einer neuen LOX-Isoform nachgewiesen werden (Feussner *et al.*, 1997).

Polyphenoloxidasen (PPO) oxidieren phenolische Hydroxyverbindungen zu cytotoxischen Derivaten (Goodman *et al.*, 1986). Gesteigerte PPO-Aktivitäten nach Pathogenbefall wurden von Hall *et al.* (1969) nachgewiesen und ihre Beteiligung an der Ausbildung systemischer Resistenz demonstriert (Bryngelsson und Collinge, 1992).

Als weitere Gruppe biochemischer Abwehrfaktoren im Rahmen der induzierten Resistenz sind wachstumshemmende, antimikrobielle Verbindungen insbesondere gegenüber Bakterien und Pilzen von Bedeutung. Diese als Phytoalexine bezeichneten Substanzen sind niedermolekulare Verbindungen des Sekundärstoffwechsels, die in bestimmten Pflanzenfamilien nach Pathogenbefall akkumulieren und eine breite antibiotische Wirkung aufweisen (Paxton, 1981; Sequeira, 1983). Obwohl das Auftreten von Phytoalexinen bei zahlreichen Pflanzenarten beschrieben worden ist (Kuc, 1995), gelang es erst kürzlich bei Gurkenpflanzen diese Sekundärstoffe als bedeutende Faktoren im Rahmen der induzierten Resistenz zu identifizieren (Daayf *et al.*, 1997). Nach Applikation von Milsana[®], einem Extrakt aus dem Sachalin-Knöterich *Reynoutria sachalinensis*, und anschließender Inokulation mit *Sphaerotheca fuliginea* konnte p-Cumarsäuremethylester als ein Sekundärstoff mit antifungalen Eigenschaften isoliert und identifiziert werden. Diese Arbeitsgruppe konnte insgesamt acht phenolische Phytoalexine mit antifungal Wirkung aus Milsana[®]-behandelten Gurkenblättern isolieren (Daayf *et al.*, 1995 und 1997).

1. EINLEITUNG

1.5.3 Hypersensitive Reaktion

Die hypersensitive Reaktion ist nicht nur hinsichtlich der Induktion von Signalprozessen zur Auslösung von SAR von Bedeutung (1.2.2), sondern stellt auch einen zentralen Abwehrmechanismus bei induziert resistenten Pflanzen dar. Bei biotisch induzierten Pflanzen setzt die HR früher und schneller als bei den Kontrollen ein und vermindert somit die Anzahl der erfolgreichen Penetrationsstellen (Heath, 1980). Nach chemischer SAR-Induktion konnte eine höhere Intensität der Ausbildung hypersensitiv reagierender Zellen u. a. in den Wirt-Pathogensystemen Tomate/*Phytophthora infestans* und Gerste/*Erysiphe graminis* (Jeun *et al.*, 2000) sowie Tomate/*Oidium lycopersicum* (Stierl *et al.*, 1997) festgestellt werden. Die auch in diesem Zusammenhang diskutierten ROS, insbesondere H₂O₂, können auch zahlreiche weitere Funktionen als Abwehrmechanismen haben. So zeigten Peng und Kuc (1992), dass mikromolare Konzentrationen von H₂O₂ die Sporenkeimung verschiedener Pathogene hemmen konnten. Wu *et al.* (1985) konnten mit 0,1 mM H₂O₂ die vollständige Wachstumshemmung bei Kulturen von *Erwinia carotovora ssp. carotovora* sowie eine Hemmung des Wachstums von *P. infestans* von über 95 % beobachten.

1.6 Chemische bzw. abiotische Resistenzinduktoren

Neben den vielfältigen biotischen Induktoren systemischer Krankheitsresistenz sind zahlreiche chemische bzw. abiotische Verbindungen beschrieben worden, die SAR auszulösen vermögen (Kessmann *et al.*, 1994a; Yamaguchi, 1998). Diese lassen sich in Anlehnung an Sticher *et al.* (1997) unterteilen in:

- **natürlich vorkommende organische Verbindungen** z. B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Arachidon-, Linolen-, Linolsäure, etc.), komplexe Kohlenhydrate, Aminosäuren, Oxalat, Salizylsäure und Jasmonsäure sowie deren Derivate
- **Pflanzen-, Kompostextrakte** z. B. Hefeextrakte, mikrobielle Metaboliten, *Reynoutria*-Extrakt
- **anorganische Verbindungen** z. B. Phosphate, Silikate, Schwermetallsalze, Ozon
- **synthetische Verbindungen** z. B. fungizide bzw. herbizide Wirkstoffe (z. B. Propenazole, Ferimzone, Fosetyl-Aluminium, Metalaxyl, Acifluorfen, Paraquat), Pflanzenaktivatoren (z. B. BTH, INA, DL-3-Aminobuttersäure), Saccharin

Obwohl eine ganze Reihe von Resistenz-induzierenden Agenzien beschrieben und zumindest für einige die Einsatzmöglichkeiten in der landwirtschaftlichen Praxis diskutiert wurde, erfüllen nur wenige dieser Substanzen (BTH, INA und SA) die von Kessmann *et al.* (1994a) geforderten Kriterien für chemische Resistenzinduktoren (Metraux *et al.*, 1991; Friedrich *et al.*, 1996; Görlach *et al.*,

1996; Lawton *et al.*, 1996). Im Rahmen dieser Literaturübersicht soll im Detail nur auf die in dieser Arbeit eingesetzten Agenzien näher eingegangen werden.

Die prooxidativen herbiziden Wirkstoffe Paraquat und Acifluorfen führten zur Bildung von ROS (Barna *et al.*, 1993; Strobel und Kuc, 1995), wobei nach Paraquatbehandlung insbesondere Hydroxylradikale (OH^{*}) (Babbs *et al.*, 1989) nachgewiesen wurden. Acifluorfen steigert die Phytoalexingehalte sowie Stressmetabolite bei zahlreichen Kulturpflanzenarten wie Spinat, Soja, Erbse und Baumwolle (Kömives und Casida, 1996). Zudem wurden PAL-Aktivität und Lipidperoxidation gesteigert. Beide Wirkstoffe sind zudem als SAR-Aktivatoren in Tabak und Gurke beschrieben (Strobel und Kuc, 1995).

Agenzien, die nekrotische Reaktionen nach der Behandlung hervorrufen, wurden ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen, um ihre Wirksamkeit mit der von Phosphaten zu vergleichen und um mögliche Übereinstimmungen bezüglich der physiologischen Reaktionen im Prozess der SAR-Auslösung zu untersuchen. Eingesetzt wurden Stoffe, welche bei Gurkenpflanzen Nekrosen auslösen und SAR induzieren, darunter organische Säuren wie Galacturonsäure (Fought und Kuc; 1996) und Schwermetallsalze wie CuSO₄ (Conti *et al.*, 1994; Reuveni *et al.*, 1997).

Milsana[®] kann nach Herger *et al.* (1988) vor allem SAR gegenüber Echten Mehltäupilzen auslösen. Eingehender beschrieben wurde die Wirksamkeit gegenüber *E. graminis* unter Feldbedingungen (Haber, 1993) sowie bei Gurken gegenüber *Sphaerotheca fuliginea* (Schneider und Ulrich, 1994).

Der am besten untersuchte Resistenzinduktor ist BTH (Benzo-[1,2,3]-thiadiazol-[7]-thiocarbonsäure-S-methylester), der aktive Wirkstoff des ersten kommerziellen Pflanzenaktivators Bion[®], der deshalb in der vorliegenden Arbeit als positive Kontrolle mitgeführt wurde. BTH ist in der Lage, bei zahlreichen Pflanzenarten SAR gegenüber einem breitem Spektrum viraler, bakterieller sowie pilzlicher Krankheitserreger zu induzieren (Friedrich *et al.*, 1996, Görlach *et al.*, 1996; Oostendorp *et al.*, 1996; Ruess *et al.*, 1996; Siegrist *et al.*, 1997; Benhamou und Belanger, 1998; Morris *et al.*, 1998). Zudem erfüllt BTH als Pflanzenaktivator die von Kessmann *et al.* (1994a) postulierten Kriterien für einen chemischen Resistenzinduktor: Die Verbindung induziert ein identisches Wirkungsspektrum gegenüber Pathogenen wie ein biotischer Induktor und aktiviert dieselben biochemischen Schutzmechanismen (Friedrich *et al.*, 1996, Görlach *et al.*, 1996; Kessmann *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). Zudem ist eine sog. Aktivierungszeit zwischen dem Applikationszeitpunkt und der einsetzenden Wirkung notwendig und es bestehen keine direkten Wirkungen auf Pathogene (Friedrich *et al.*, 1996). In Studien mit nahG-Pflanzen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass BTH den Signalweg der SAR unabhängig von endogener SA induziert (Delaney *et al.*, 1994; Friedrich *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996). Ausgehend von diesem Befund lässt sich der Eingriff von

1. EINLEITUNG

BTH - wie im folgenden Schema vereinfacht dargestellt - in die Signalwege der SAR einordnen (Abb. 2).

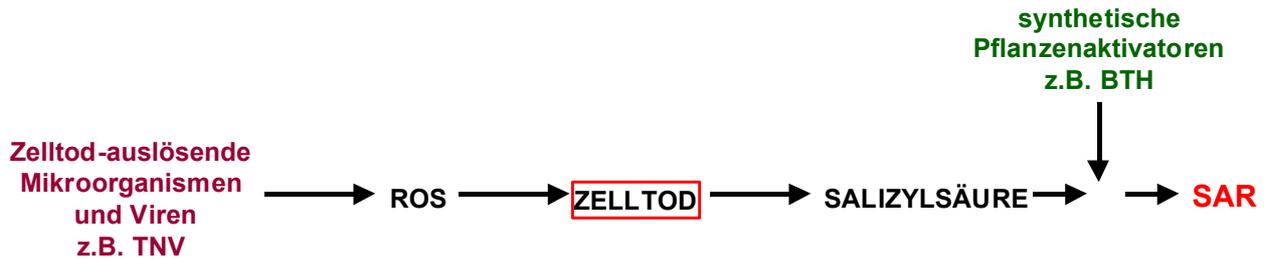


Abb. 2: Vereinfachtes Schema der Signalwege der systemisch aktivierten Resistenz

TNV: Tabaknekrosevirus; **ROS:** Reaktive Sauerstoffspezies; **BTH:** Benzo-[1,2,3]-thiadiazol-[7]-thiocarbonsäure-S-methylester, Bion®; **SAR:** Systemisch aktivierte Resistenz

Während bei einer biotischen Induktion durch Nekrose- bzw. Zelltod-auslösende Mikroorganismen und Viren die Ausprägung der SAR über die die Bildung von ROS (oxidative burst, HR), Auftreten von Zelltod sowie die Akkumulation von SA verläuft, setzen synthetische Pflanzenaktivatoren wie BTH später in dieser Signalkette ein, so dass weder Zelltod noch die Akkumulation von SA zur Ausprägung von SAR notwendig ist (Vernooij *et al.*, 1995; Friedrich *et al.*, 1996).

1.7 Phosphat-induzierte Krankheitsresistenz

Neben synthetischen Aktivatoren wie BTH wurden in den letzten beiden Jahrzehnten weitere abiotische Induktoren wie z. B. Phosphate in die Untersuchungen zur Auslösung von SAR einbezogen. Ende der achtziger Jahre beschrieb die Arbeitsgruppe von J. Kuc erstmalig die Einsatzmöglichkeit von Phosphaten als Auslöser von SAR in Gurken gegenüber verschiedenen Krankheiten, welche durch Viren, Bakterien und Pilze hervorgerufen werden (Gottstein und Kuc, 1989; Mucharromah und Kuc, 1991). Bei diesen Experimenten erwiesen sich insbesondere basische Kalium- und Natrium-Phosphate wie K_3PO_4 , K_2HPO_4 , Na_3PO_4 sowie Na_2HPO_4 als wirksam. In den folgenden Jahren wurde die Wirksamkeit von Phosphaten als Auslöser systemischer Krankheitsresistenz in weiteren Wirt-Pathogen-Interaktionen beschrieben (Tab. 2)

Tab. 2: Phosphat-induzierte Resistenz in verschiedenen Wirt-Pathogensystemen

Wirt	Pathogen	Quelle
Ackerbohne	<i>Uromyces viciae-fabae</i>	Walters und Murray, 1992
Mais	<i>Exserohilum turcicum</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1994a; Reuveni <i>et al.</i> , 1996a
	<i>Puccinia sorghi</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1994b; Reuveni <i>et al.</i> , 1996a
Weinrebe	<i>Uncinula necator</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1993b
Kartoffel	<i>Phytophthora infestans</i>	Strömberg und Brishammar, 1991
Gerste	<i>Erysiphe graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> ,	Hermann <i>et al.</i> , 1994
	<i>Rhynchosporium secalis</i> ,	
	<i>Helminthosporium teres</i>	
Gurke	<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Doubrava <i>et al.</i> , 1988; Gottstein und Kuc, 1989; Mucharromah und Kuc, 1991
	<i>Cladosporium cucumerinum</i>	Gottstein und Kuc, 1989
	<i>Dydimella bryoniae</i>	Gottstein und Kuc, 1989
	<i>Pseudomonas lachrymans</i>	Gottstein und Kuc, 1989
	<i>Erwinia tracheiphila</i>	Gottstein und Kuc, 1989
	Tabaknekrosevirus (TNV)	Gottstein und Kuc, 1989
	Gurkenmosaikvirus (CMV)	Gottstein und Kuc, 1989
	<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1993a, 1995, 1996b, 1997
Paprika	<i>Leveillula taurica</i>	Reuveni <i>et al.</i> , 1998c
Reis	<i>Pyricularia oryzae</i>	Manandhar <i>et al.</i> , 1998

Insbesondere sind hierbei die zahlreichen Arbeiten der Gruppe um Reuveni (Universität Haifa, Israel) zu erwähnen, welche bei Mais, Gurke und weiteren Kulturpflanzenarten die LAR- sowie SAR-auslösende Wirkung von Phosphaten gegenüber verschiedenen pilzlichen Blattkrankheiten untersuchte. So konnten bei Gurkenpflanzen K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $Na_4P_2O_5$ sowie Na_3PO_4 (100 mM) - z. T. erst zwei Stunden vor der Inokulation auf die Blätter appliziert – in den distalen Blättern SAR gegenüber dem Echten Mehltau mit Wirkungsgraden bis zu 84 % auslösen (Reuveni *et al.*, 1993a und 1995). Die Wirkung der Phosphat-induzierten SAR war bis zu 25 Tage nach der Induktion feststellbar und zusätzlich konnten direkte bzw. kurative Effekte beobachtet werden (Reuveni *et al.*, 1995 und 1996b).

1. EINLEITUNG

Die überwiegende Anzahl dieser Arbeiten zur Resistenzauslösung durch Phosphate konzentriert sich jedoch auf die phänomenologische Beschreibung der Effekte gegenüber den verschiedenen Pathogenen bzw. Krankheiten. Zur Untersuchung der physiologischen Veränderungen nach der Induktorbehandlung wurden bisher nur wenige Ansätze verfolgt, so dass kaum Ergebnisse vorliegen. Die lokale und systemische Induktion von Peroxidase (Descalzo *et al.*, 1990; Irving und Kuc, 1990) sowie Chitinase (Irving und Kuc, 1990) ebenso wie die lokale Aktivierung verschiedener Enzyme wie Peroxidase, Polyphenoloxidase, Lipoxygenase, Chitinase und α -Glucosidase konnten nachgewiesen werden (Avdiushko *et al.*, 1993b). In Bezug auf den Mechanismus der Phosphatwirkung wurde vermutet, dass die Aktivierung der Resistenz als Folge des Salzstress (Mucharomah und Kuc, 1991) bzw. durch die verbesserte Nährstoffversorgung und gesteigerte Photosynthese erfolgen könnte (Murray und Walters, 1992). Gottstein und Kuc (1989) nahmen an, dass Phosphatbehandlungen - ähnlich wie Oxalatbehandlungen (Doubrava *et al.*, 1988) - zu einer Chelatisierung bzw. Immobilisierung von Ca^{2+} -Ionen führen. Die Ergebnisse von Walters und Murray (1992) bei Phosphat- und EDTA-behandelten Ackerbohnen scheinen diese Hypothese zu stützen.

Phosphat-induzierte Resistenz unter Feldbedingungen

In der Literatur findet sich nur eine geringe Anzahl von Arbeiten, welche die Auslösung von SAR unter Freiland- bzw. Feldbedingungen beschreiben (1.1.1). Demgegenüber steht eine ansehnliche Zahl an Publikationen, die Ergebnisse aus Experimenten unter Labor- bzw. Gewächshausbedingungen enthalten. Hinsichtlich der Phosphat-induzierten SAR unter Freilandbedingungen konnten Gottstein und Kuc (1989) eine über fünf Wochen andauernde Wirksamkeit von K_2HPO_4 im System Gurke/*C. lagenarium* beobachten. In Gewächshausexperimenten sowie Feldversuchen mit Reis setzten Manandhar *et al.* (1998) unter anderem K_2HPO_4 zur Bekämpfung der sog. rice-blast-disease, hervorgerufen durch *Pyricularia oryzae*, ein. Wirkungsgrade bis zu 42 % konnten durch Phosphatapplikationen in Feldversuchen erreicht werden. Diese waren mit den Wirkungsgraden von SA-Applikationen vergleichbar und brachten Ertragssteigerungen bis zu 32 %.

Direkte/kurative Wirkung von Phosphaten

Neben der Auslösung von SAR können Phosphatapplikationen Pathogene auch direkt beeinflussen. In Feldversuchen an Nektarinen, Mango und Wein konnten Reuveni und Reuveni (1995) eine direkte bzw. kurative Wirkung von K_2HPO_4 gegenüber dem Echtem Mehltau feststellen. Die Wirkungsgrade der Phosphat-Applikationen lagen zwar unter denen von spezifischen Mehltau-Fungiziden, doch konnten durch wechselnden Einsatz von Phosphaten und Fungiziden die Aufwandmengen der Fungizide bis zu 50 % verringert werden. Auch Pasini *et al.* (1997) beobachteten nach Applikation von KH_2PO_4 direkte antifungale Effekte gegenüber dem Echtem Mehltau *Sphaerotheca pannosa* an Rosen. Bei Äpfeln wurden durch Phosphatbehandlungen (KH_2PO_4 und K_2HPO_4) Wirkungsgrade bis zu 50 % gegenüber *Podosphaera leucotricha* erreicht (Reuveni *et al.*, 1998a). Weitere direkte Effekte von KH_2PO_4 und/oder K_2HPO_4 sind bei Zucchini (Garibaldi *et al.*, 1995), Gurke (Reuveni *et al.*, 1996b), Nektarine (Reuveni und Reuveni, 1998a) sowie Mango (Reuveni *et al.*, 1998b) gegenüber Echten Mehltaupilzen beobachtet worden.

Düngerwirkung von Phosphaten

Neben der Auslösung von SAR haben Blattapplikationen mit Phosphaten positive Einflüsse auf das Pflanzenwachstum, da es sich hierbei auch um eine Blattdüngung mit einem Makronährstoff handelt. So beeinflusste die Applikation von K_2HPO_4 das Wachstum von Gurkenpflanzen positiv über eine Steigerung der Pflanzenhöhe, der Blattfläche sowie der Trockenmasse (Reuveni *et al.*, 1993a und 1996b). Bei Mais stimulierten einmalige Gaben von K_2HPO_4 das Pflanzenwachstum (Reuveni *et al.*, 1994a). Monokaliumphosphat (MKP) wird als Blattdünger in Israel kommerziell vertrieben (Rotem Amfert Negev Ltd., Israel) und soll bei zahlreichen Kulturpflanzenarten auch einen Schutz gegenüber Pathogenen bieten (Reuveni *et al.*, 1998b). Im System Gurke/*S. fuliginea* wurde es als Bestandteil der Nährlösung oder über das Blatt appliziert als SAR-induzierend beschrieben (Reuveni *et al.*, 2000). Auch der Einsatz von phosphathaltigen NPK-Blattdüngern steigerte neben der Krankheitsresistenz die Qualität sowie die Erträge von zahlreichen Kulturen (Reuveni und Reuveni, 1998b).

1.8 Ziele der Arbeit

Da weitergehende und vertiefende Untersuchungen zum Verständnis der Mechanismen der Phosphat-induzierten Resistenz bislang weitgehend fehlen, haben diese Arbeiten zum Ziel, einen Beitrag zur Aufklärung der Mechanismen und Reaktionen zu leisten, die nach einer Blattapplikation von Phosphatverbindungen in Kulturpflanzen ausgelöst werden und die zur Ausprägung von Resistenz gegenüber verschiedenen Krankheitserregern führen. In den Arbeiten sollten vor allem die durch Phosphatbehandlungen initiierten frühen Prozesse auf biochemischer Ebene untersucht und mit anderen Formen der Resistenzauslösung, insbesondere der biotischen Induktion durch Nekrose-auslösende Pathogene sowie der Induktion mittels synthetischer Aktivatoren verglichen werden. Dabei sollte geklärt werden wie und wo Phosphatelemente der zur SAR-Auslösung führenden Signalkette aktivieren oder mit diesen interagieren. Dazu sollten die in der Literatur beschriebenen Systeme genutzt und anhand der bereits vorliegenden umfangreichen Kenntnisse zur biotischen Induktion versucht werden, Induktionsprinzipien vergleichend zu betrachten. Als wesentliche Schwerpunkte waren dazu Untersuchungen zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, Auslösung von Zelltod, lokaler und systemischer Akkumulation von Salizylsäure und Aktivierung von abwehrassoziierten Enzymen vorgesehen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2. Material und Methoden

2.1 Pflanzenanzucht

Gurke

Für Experimente mit Gurkenpflanzen (*Cucumis sativus* L.) wurde hauptsächlich die Sorte „Wisconsin SMR 58“ verwendet. Zudem wurden in einigen Versuchen die Sorten „Delikatess“, „Chinesische Schlangen“ sowie „Delila“ eingesetzt. Die Pflanzen wurden in Gefäßen (10 - 11 cm Durchmesser) in einer Mischung aus Fruhstorfer® Einheitserde Typ T (Archut, Lauterbach - Wallenrod) und Quarzsand (3:1; v/v) ausgesät und im Gewächshaus bei ca. 24 °C Tag- und 18 - 20 °C Nachttemperatur angezogen. Eine zusätzliche Beleuchtung für 16 h täglich wurde durch Hg- bzw. Metalldampflampen (Philips SONT-Agro 400) gewährleistet. Ein Teil der Experimente wurde in Klimakammern (York, Mannheim) durchgeführt, wo die Pflanzen bei Tag-/Nachttemperaturen von 24 °C/18 °C und einer Licht-/Dunkelphase von 16 h/8 h kultiviert wurden. Die Belichtungsintensität betrug beim Tagzyklus max. 40000 Lux, wobei jeweils morgens und abends 1 h als Adaptationsphase mit steigenden bzw. abnehmenden Lichtintensitäten im Programm implementiert war. Die Düngung erfolgte 3 - 4 mal pro Woche durch Gießen mit einer Düngerlösung. Diese bestand aus 3 - 6 ml/l Wuxal Super® (N-P-K: 8-8-6; Aglukon, Düsseldorf) und 1 ml/l Spurennährstoff-Düngerlösung Gaby Plus Mikro T® (Gabi-Biochemie, Bad Salzuflen) (Tab. 3).

Tab. 3: Zusammensetzung der Düngerlösungen

Wuxal Super®		Gabi Plus Mikro T®	
N	8 %	Fe	0,5 %
P ₂ O ₅	8 %	Cu	0,3 %
K ₂ O	6 %	B	0,15 %
B	0,01 %	Mn	0,15 %
Cu	0,007 %	Mo	0,15 %
Mn	0,013 %	Zn	0,02 %
Mo	0,001 %	+ geringe Mengen S	
Zn	0,005 %		

Tabak

Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) der Sorte Xanthi nc sowie der transgenen Sorte NahG-10, welche ein für Salizylhydroxylase kodierendes Gen aus *Pseudomonas putida* enthalten (Gaffney *et al.*, 1993), wurden im Gewächshaus in Humusoil®/Sand (3:1; v/v) (Floragard, Oldenburg) ausgesät und nach 2 - 3 Wochen in dasselbe Substrat pikiert. Die Bedingungen im Gewächshaus bzw. der Klimakammer entsprachen der Anzucht von Gurkenpflanzen. Die Düngung erfolgte 2 mal pro Woche durch Giessen mit einer Düngerlösung bestehend aus 5 - 10 ml/l Wuxal Super® und 1 - 2 ml/l Spurennährstoff-Düngerlösung Gaby Plus Mikro T®.

Mais

Von den Maispflanzen (*Zea mays* L.) wurde die Süßmaissorte „Jubilee“ (Sandoz-Seeds, Kleve) sowie die Hybridsorte „Helix“ (KWS, Kleinwanzleben) in Gefäßen (12 - 20 cm Durchmesser) in einer Mischung aus Fruhstorfer® Einheitserde Typ T und Quarzsand (3:1; v/v) ausgesät und unter Gewächshausbedingungen kultiviert. Die Düngung erfolgte wie für die Tabakpflanzen beschrieben.

Ackerbohne

Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) cv. „Con Amore“ (Nickerson-Zwaan, Edemissen) wurde in Humussoil®/Sand (3:1; v/v) ausgesät und unter den für Gurkenpflanzen beschriebenen Bedingungen kultiviert.

2.2 Wirt-Pathogensysteme

2.2.1 Kultivierung der Pathogene und Infektionsversuche

Gurke/*Colletotrichum lagenarium*

Der Brennfleckererreger *Colletotrichum orbiculare* (Berk. & Mont.) Arx [syn. *C. lagenarium* (Pass.) Ellis & Halst.] befällt die Blätter und Früchte von *Cucurbitaceen*, insbesondere von Wassermelone, Melone und Gurke. Die Symptome treten auf den befallenen Blättern als sog. Brennflecken hervor und die Krankheit wird daher auch als Anthraknose bezeichnet. Bereits 96 h nach der Inokulation treten die ersten Symptome in Form chlorotischer Läsionen in Erscheinung. Diese entwickeln sich innerhalb von 5 bis 8 Tagen zu dunkelbraunen Nekrosen. Für die Infektion sind eine hohe Luftfeuchtigkeit von nahezu 100 % sowie Temperaturen von 22 - 27 °C über mindestens 24 h optimal. Die beiden verwendeten Isolate stammen von der Arbeitsgruppe Kauss, Universität Kaiserslautern, bzw. von der BASF AG, Limburgerhof.

Die Kultivierung des Pilzes erfolgte auf Grünen-Bohnen-Agar (GBA) bzw. auf Kartoffel-Dextrose-Agar (Potato-Dextrose-Agar, PDA). Zur Herstellung des GBA-Mediums wurden je 100 g vorgekochte Brechbohnen aus der Dose mehrfach mit deion. Wasser gespült und anschließend 125 ml deion. Wasser zugesetzt und die Mischung in einem Mixer homogenisiert. Zu diesem Homogenat wurde zusätzlich 125 ml deion. Wasser mit 5 g Agar Agar pro 100 g eingesetzter Brechbohnen zugegeben und bei 121 °C für 30 - 40 min autoklaviert. Für das PDA-Medium wurden 400 ml deion. Wasser mit 2 g Agar Agar und 15,6 g PDA (Fluka, Buchs, Schweiz) gemischt und bei 121 °C für 20 min autoklaviert. *C. lagenarium* wurde auf GBA-Medium unter Raumbedingungen bei ca. 22 – 24 °C im Dunkeln und auf PDA-Medium bei 25 °C unter UV-Licht kultiviert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Zur Gewinnung der Konidien suspensionen wurde die Oberfläche 10 - 14 Tage alter Kulturen mit 10 - 20 ml deion. Wasser abgeschwemmt und das Gemisch durch mehrere Lagen Mull filtriert. Anschließend wurden jeweils 2 ml der Konidien suspension in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipetiert und 5 min bei $8000 \times g$ und $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die pelletierten Konidien bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und die Sporendichte der Ausgangssuspension wurde mittels eines Hämozytometers (Fuchs-Rosenthal-Zählkammer) unter dem Mikroskop bestimmt. Zur Inokulation wurden die pelletierten Konidien mit entsprechenden Volumina deion. Wassers resuspendiert und die gewünschte Konidiendichte erzielt. Die Inokulation von Gurkenpflanzen erfolgte in Abhängigkeit vom Versuchsansatz als Tropfen- oder Sprühinokulation.

Bei der Tropfeninokulation wurden in Abhängigkeit vom Alter der zu inokulierenden Pflanzen Sporendichten von $7,5 \times 10^5$ bis 2×10^6 Konidien/ml eingesetzt. Die Blätter der Gurkenpflanzen wurden mit 10 - 30 Tropfen/Blatt (5 - 10 μl pro Tropfen) der Sporensuspension mit einer Eppendorf-Multipette inokuliert und für mindestens 24 h unter einer folienbespannten, dunklen Haube bei hoher Luftfeuchtigkeit im Gewächshaus oder Klimakammer inkubiert. Nach der Inkubation in der feuchten Kammer wurden die Pflanzen unter den bisherigen Bedingungen im Gewächshaus oder in der Klimakammer kultiviert. Die Bonitur erfolgte nach 7 - 14 Tagen durch Auszählen der Läsionen und Bestimmung des mittleren Durchmessers einer repräsentativen Anzahl an Läsionen.

Bei der in einigen Versuchen durchgeführten Sprühinokulation wurde das gesamte Blatt mit einer Sporensuspension ($1 - 3 \times 10^5$ Sporen/ml) mittels einer Sprühpistole (SATA, Kornwestheim) besprüht und unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Die Bonitur der Symptome wurde 7 - 14 Tage nach der Inokulation durch visuelles Abschätzen der befallenen Blattfläche durchgeführt.

Gurke/*Sphaerotheca fuliginea*

Der Echte Gurkenmehltau, verursacht durch *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht.) Pollacci, ist ein obligat biotropher Ektoparasit. Er vermehrt sich hauptsächlich asexuell über Konidien und bildet als Krankheitssymptom weißliche Kolonien auf den Blattoberseiten, welche bei hohem Infektionsdruck zusammenfließen und einen dichten weißen Belag bilden.

Der Mehltau wurde zur Erhaltung auf jungen Gurkenpflanzen kultiviert und im wöchentlichen Abstand auf neue Pflanzen übertragen. Dazu wurden Konidien von Mehltau-befallenen Blättern älterer Pflanzen auf unbefallene Pflanzen gestäubt. Die Herstellung einer Konidien suspension erfolgte durch Abschwemmen von ca. 10 Tage alten Blättern mit deion. Wasser unter Zusatz von Tween 20[®] (0,01 %; v/v). Die Einstellung der Sporendichte auf $5 - 25 \times 10^4$ Sporen/ml erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers nach Fuchs-Rosenthal. Zur Inokulation wurden die Blätter durch Sprühen der Konidien suspension mit einer Haushaltssprühflasche gleichmäßig benetzt.

Gurke/*Pseudoperonospora cubensis*

Der Falsche Gurkenmehltau, hervorgerufen durch *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. et Curtis) Rostovtsev, wurde zur Erhaltung auf Gurkenpflanzen kultiviert und im wöchentlichen Abstand auf neue Pflanzen übertragen. Dazu wurden die befallenen Pflanzen über Nacht in einer feuchten Kammer inkubiert und die Sporangien mit deion. Wasser unter Zusatz von Tween 20® (0,01 %; v/v) abgeschwemmt. Diese Sporangiensuspension wurde mit einer Spühpistole auf Gurkenpflanzen gesprüht und die Pflanzen für 24 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach 7 - 10 Tagen konnten von diesen befallenen Pflanzen Inokulum für die Inokulation von Versuchspflanzen gewonnen werden. Dabei wurde genauso verfahren wie bei der Vermehrung. Die Einstellung der Sporendichte auf $2 - 25 \times 10^3$ Sporangien/ml erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers nach Fuchs-Rosenthal.

Tabak/Tabakmosaikvirus (TMV)

Die überwiegende Zahl der Experimente an Tabak erfolgte mit der Sorte Xanthi nc, die das Resistenzgen N enthält. Dieses ruft nach Befall mit TMV die Ausbildung von Lokalläsionen hervor, wodurch das Virus an einer systemischen Verbreitung und der Ausprägung der typischen Mosaiksymptome gehindert wird. Zur Inokulation von Tabak wurde gereinigtes TMV aus infizierten Blättern von *N. tabacum* cv. Samsun nn (ohne Resistenzgen) verwendet. Die TMV-Stammlösung mit 6 mg TMV/ml (in H₂O mit 50 % Glycerin; v/v) wurde bei -80 °C gelagert und zur Inokulation mit N-Phosphat-Puffer (25 mM; pH 7) auf 5 - 20 µg TMV/ml unter Zusatz des Abrasivs Celite (1 mg/ml) verdünnt. Die Inokulation erfolgte i. d. R. abends im Gewächshaus, wobei die Suspension des Inokulums unter ständigem Rühren auf einem Laborrührgerät gleichmäßig mit einem flachen Pinsel auf die Oberseiten der Blätter aufgetragen wurde. Die Bonitur erfolgte 7 - 14 Tage nach der Inokulation nach Sichtbarwerden von nekrotischen TMV-Lokalläsionen. Dabei wurden die Anzahl der TMV-Lokalläsionen/Blatt sowie der Durchmesser einer ausreichend großen Anzahl von Einzelläsionen bestimmt.

Mais/*Exserohilum turcicum*

Mehrere Feldisolate des Erregers der Northern-Leaf-Blight *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard et Suggs aus Deutschland, Schweiz, Frankreich, Kenia, Österreich und Israel wurden von G. Welz (Institut für Pflanzenzüchtung, Universität Hohenheim) zur Verfügung gestellt. Die Kultivierung der Isolate sowie die Gewinnung von Konidien erfolgte auf modifiziertem Sachs-Medium bzw. auf Maispflanzen. Modifiziertes Sachs-Medium (Hebert, 1971) setzte sich wie folgt zusammen: 1 g Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O; 0,196 g KH₂PO₄; 0,25 g KCl; 0,25 g MgSO₄ x 7 H₂O; 0,85 g CaCO₃; eine Messerspitze FeCl₃ sowie 20 g Agar Agar pro 1000 ml deion. Wasser. Zur Anregung der Sporulation wurde dem Medium zusätzlich jeweils 5 g Glucose sowie wasserlösliche Stärke zugegeben. Das Medium wurde für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die Kulturen wurden unter UV-Licht für 10 Tage gehalten und zur Gewinnung des Inokulums mit deion. Wasser (0,01 - 0,03 % Tween 20®; v/v)

2. MATERIAL UND METHODEN

abgeschwemmt. Erfolgte die Sporengewinnung vom frischen Pflanzenmaterial, so wurden infizierte Pflanzen für 16 h bei 100 % Luftfeuchte inkubiert und die Sporen von der Blattoberfläche mit deion. Wasser (0,01 - 0,03 % Tween 20®; v/v) abgewaschen. Nach Einstellung der Sporendichte wurden die Blätter von Maispflanzen durch Sprühen einer Sporensuspension mittels einer Sprühpistole inokuliert. Die inokulierten Pflanzen wurden für 24 h bei 100 % Luftfeuchte unter einer folienbespannten Haube bei 20 – 25 °C im Dunkeln inkubiert. Die Krankheitssymptome traten 7 - 10 Tage nach der Inokulation als spitz zulaufende, großflächige Verbräunungen mit Welkesymptomen auf den Blättern in Erscheinung. Die befallene Blattfläche auf jedem inokulierten Blatt wurde visuell geschätzt. Hierbei wurde der Neuzuwachs der Blätter an der Blattbasis nicht berücksichtigt.

Mais/*Puccinia maydis*

Der obligat biotrophe Erreger des Maisrostes, *Puccinia sorghi* (Schw.), wurde auf Maispflanzen im Gewächshaus erhalten. Von infizierten Pflanzen gesammelte Uredosporen konnten bis zu 3 Monate bei 4 °C gelagert und für Infektionsversuche verwendet werden. Zur Inokulation der Versuchspflanzen wurden Sporensuspensionen mit Dichten von 10⁴ - 10⁵ Sporen/ml (in deion. Wasser mit 0,01 - 0,03 % Tween 20®; v/v; oder 0,5 % Agar Agar; v/v) auf die Blattoberseiten gesprüht und die Pflanzen für mindestens 12 h in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Bonitur erfolgte ca. 7 Tage nach der Inokulation durch Abschätzen der befallenen Blattfläche.

Ackerbohne/*Uromyces viciae-fabae*

Ebenfalls wie bei *P. sorghi* wurde der Erreger des Ackerbohlenrostes, *Uromyces viciae-fabae* (Pers.) J. Schrot., auf den Wirtspflanzen im Gewächshaus erhalten. Die Gewinnung der Uredosporen und die Infektionsmethoden entsprechen weitgehend denen, die im System Mais/*P. sorghi* beschrieben wurden. Die Bonitur erfolgte nach dem Sichtbarwerden der Symptome ca. 7 Tage nach Inokulation durch Auszählen der Rostpusteln mit einem Zählrahmen (4 cm²) an mehreren Stellen des Blattes.

2.2.2 Quantifizierung des Krankheitsbefalls

Die Symptomausprägung nach der Inokulation mit verschiedenen Pathogenen (*P. sorghi*, *E. turcicum*, *C. lagenarium*, *S. fuliginea*, *P. cubensis*) erfolgte durch Schätzen der befallenen Blattfläche. Daraus wurde der Wirkungsgrad (WG) der Behandlung nach folgender Formel berechnet (Abbott, 1925):

$$\text{Wirkungsgrad (WG)} = \left(\frac{(\text{Befall der Kontrolle} - \text{Befall der Behandlung}) \times 100}{\text{Befall der Kontrolle}} \right)$$

2.3 *In-vitro*-Tests mit *Colletotrichum lagenarium*

Untersuchungen zum Myzelwachstum

Dem Nährmedium PDA (38 g/l; Difco, Heidelberg) wurden nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min definierte Volumina einer K₂HPO₄-Stammlösung (1 M) nach Filtration durch einen sterilen Membranfilter zugegeben, so dass Endkonzentrationen im Bereich von 1 - 100 mM K₂HPO₄ vorlagen. Ein Impfstück von 5 mm Durchmesser wurde mit einem Korkbohrer von einer sporulierenden Kultur ausgestanzt und mittig auf das Nährmedium platziert. Die Kulturschalen wurden unter UV-Licht und bei 25 °C bzw. unter Raumbedingungen aufbewahrt. Die Durchmesser der Kolonien wurden täglich ermittelt.

Untersuchung der Konidienkeimung

Agar-Medium (20 g Agar Agar/l) wurden nach dem Autoklavieren bei 121 °C für 20 min definierte Volumina einer K₂HPO₄-Stammlösung (1 M) nach Filtration durch einen sterilen Membranfilter zugegeben, so dass Endkonzentrationen im Bereich von 1 - 100 mM K₂HPO₄ vorlagen. Die Kulturschalen wurden entweder mit einer Sporensuspension (2,5 x 10⁵ Sporen/ml) analog zur Sprühinokulation ganzer Pflanzen besprüht, oder 750 µl einer Sporensuspension (5 x 10⁵ Sporen/ml) wurden auf das Medium pipettiert und gleichmäßig mit einem Glasspatel verteilt. Nach Inkubation für 24 h in einer feuchten Kammer (ca. 100 % rel. Luftfeuchtigkeit) im Dunkeln und bei Raumtemperatur wurden die Keimungsraten der Konidien unter dem Mikroskop bestimmt.

2.4 Applikation von Resistenzinduktoren

Die Applikation verschiedener Induktoren sowie weiterer Testsubstanzen erfolgte i. d. R. durch Besprühen der Blätter mittels einer druckluftbetriebenen Sprühpistole (SATA, Kornwestheim; Düsendurchmesser 0,3 bzw. 0,5 mm; Betriebsdruck ca. 1 bar).

Phosphate

Die eingesetzten Phosphate (1 - 200 mM) wurden in deion. Wasser gelöst. Um die Aufnahmeperiode zu verlängern, wurden die Phosphat-behandelten Pflanzen i. d. R. über Nacht in einer feuchten Atmosphäre (angefeuchtetes Vlies unter einer mit durchsichtiger Folie bespannten Haube) im Gewächshaus oder Klimakammer inkubiert. Bei einigen Versuchen wurde auf die Inkubation verzichtet, wodurch das Abtrocknen der Pflanzen beschleunigt wurde.

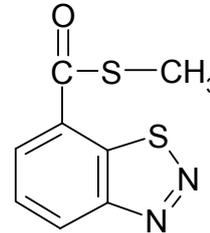
BTH

Benzo-[1,2,3]-thiadiazol-[7]-thiocarbonsäure-S-methylester (BTH; C₆H₆N₂OS₂; Molekulargewicht 210,12; Trivialname: Acibenzolar-S-methyl; Handelspräparat: Bion[®]; Abb. 3) wurde als wasser-

2. MATERIAL UND METHODEN

dispergierbares Granulat (WG 50) von der Firma Novartis (Basel, Schweiz) bezogen. Dieser synthetische Pflanzenaktivator wurde in den meisten der ausgeführten Experimente als Positivkontrolle eingesetzt. Die applizierten Konzentrationen lagen in Abhängigkeit von der Pflanzenart im Bereich von 0,01 - 0,5 mM.

Abb. 3: Strukturformel von Acibenzolar-S-methyl (BTH)



Tabak-Nekrose-Virus (TNV)

Zur Inokulation von Gurkenpflanzen mit dem biotischen Induktor TNV, welcher nekrotische Lokalläsionen hervorruft, wurde Presssaft von infizierten Gurken- oder Bohnenpflanzen (in 50 mM Na-Phosphat-Puffer; pH 7) benutzt (Kutzner *et al.*, 1992). Die Inokulation der Gurkenpflanzen erfolgte durch gleichmäßiges Auftragen des Inokulums mit einem Pinsel auf Celite-bestäubte Blätter. Überschüssiges Inokulum wurde 30 min nach der Inokulation durch Überbrausen der Blätter mit Wasser entfernt. Die notwendige Presssaftverdünnung wurde im Vorfeld der Versuche jeweils an Gurkenpflanzen ausgetestet.

Tabak-Mosaik-Virus (TMV)

Für die biotische Induktion bzw. Vorinkulation von Tabakpflanzen wurde gereinigtes TMV eingesetzt und die im System Tabak/TMV beschriebene Inokulationsmethode verwendet (2.2.1)

Weitere Testsubstanzen

Analog zur Testung verschiedener Phosphate wurde eine Reihe von unterschiedlichen Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Auslösung von Krankheitsresistenz untersucht. Hierzu gehörten u.a. KNO₃, KCl, KOH, Paraquat, Acifluorfen, NaCl, CuSO₄, H₃BO₃, Milsana[®] und Galacturonsäure. Vor der Sprühapplikation wurden diese Verbindungen in Wasser unter Zusatz von Ethanol (1 %; v/v) oder Aceton (2 %; v/v) gelöst. Nach Bedarf wurden den Lösungen bei einigen Experimenten die Detergentien Tween 20[®] bzw. Triton X-100[®] zugegeben. Herbizide Wirkstoffe wurden z. T. als Tropfen mit einer Pipette auf die Blattoberseiten appliziert.

2.5 Probenahme für biochemische Analysen

Für weiterführende biochemische Untersuchungen der behandelten Pflanzen wurden Blattextrakte sowie zur Untersuchung des Apoplasten interzelluläre Waschflüssigkeiten (IWF) gewonnen.

2.5.1 Gewinnung von Gesamtblattextrakten

Von den behandelten Pflanzen wurden für die nachfolgend aufgeführten biochemischen Analysen Gesamtblattextrakte hergestellt. Die genaue Extraktionsmethode ist jeweils bei den einzelnen Untersuchungen näher beschrieben. Grundsätzlich wurde frisches bzw. bei -80 °C gelagertes Blattmaterial unter Zusatz von Seesand (Fluka, Seelze) und flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu Pulver zerkleinert. Nach Zugabe entsprechender Pufferlösungen wurde das Blattmaterial homogenisiert und anschließend für 10 - 20 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen, nach Bedarf aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

2.5.2 Gewinnung interzellulärer Waschflüssigkeiten

Zur Gewinnung interzellulärer Waschflüssigkeiten (IWF) wurde eine modifizierte Infiltrations- und Zentrifugationsmethode nach Klement (1965) sowie Rathmell und Sequeira (1974) angewandt. Abgetrennte Gurkenblätter wurden mit deionisiertem Wasser gewaschen, mit Handtuchpapier abgetrocknet und in eine Duran-Schale (23 cm Durchmesser) gelegt, die mit vorgekühlter Infiltrationslösung (bidestilliertes Wasser oder Pufferlösungen; 4 °C) gefüllt war. Die Blätter wurden mit VA-Stahlnetzen bzw. Teflonnetzen beschwert, um ein Aufschwimmen zu verhindern. Die Schale wurde auf Eis in einen entsprechend breiten Kunststoffexsikkator gestellt. Nach Anlegen eines Vakuums (ca. 20 mbar) für ca. 5 - 15 min wurde der Exsikkator wieder langsam über einen Zeitraum von 5 min belüftet. Nach Erreichen des atmosphärischen Druckes war der Apoplast mit der Infiltrationslösung gefüllt und die Blätter zeigten eine intensive und gleichmäßige dunkelgrüne Farbe. Nach sorgfältigem Abtrocknen mit Handtuchpapier wurden die Blätter vorsichtig gerollt, so dass die Blattunterseite nach außen zeigte und in 50 ml Duran-Zentrifugengläser gestellt, welche im unteren Bereich ein an den Rand bündig anliegendes Metallsieb mit Fuß enthielten. Dadurch konnte eine räumliche Trennung der austretenden IWF vom Blattmaterial sowie eine möglichst vollständige Entleerung des Apoplasten mit der infiltrierten Lösung gewährleistet werden. Die Proben wurden anschließend bei 4 °C für 20 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert. Die IWF sammelte sich unterhalb des Siebeinsatzes und wurde mit einer Pipette entnommen, nach Bedarf aliquotiert, unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Qualität der IWF wurde die Aktivität von Malatdehydrogenase als Markerenzym für cytosolische Kontaminationen bestimmt (2.6.2).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.6 Biochemische Analysen

2.6.1 Bestimmung des Proteingehalts

Die Bestimmung des Proteingehalts der Blattextrakte sowie in den IWF erfolgte photometrisch nach der Methode von Bradford (1976). Zur Herstellung des Bradford-Reagenz wurden 100 mg Coomassie-Blue G250 in 50 ml Ethanol gelöst und unter Zugabe von 100 ml H₃PO₄ (85 %) mit *A. bidest.* auf 1 l aufgefüllt. Anschließend wurde die Lösung filtriert und bei Zimmertemperatur gelagert. 0,1 ml der entsprechend verdünnten Probe wurden mit 1 ml Bradford-Reagenz versetzt und nach 5 min mit Hilfe eines Spektrophotometers (LKB Biochrom 4060, Pharmacia, Freiburg) bei 595 nm gegen den Leerwert (0,1 ml H₂O statt Probe) gemessen. Zur Quantifizierung wurde eine Eichgerade im Bereich von 1 - 10 µg Protein mit Hilfe von Rinderserumalbumin erstellt.

2.6.2 Bestimmung ausgewählter Enzymaktivitäten

Malatdehydrogenase

Zur Überprüfung der Qualität der IWF wurde die Aktivität von Malatdehydrogenase (MDH; L-Malat: NADP⁺-Oxidoreduktase; EC 1.1.1.82) als Markerenzym für cytosolische Kontamination bestimmt und mit den Aktivitäten von Blattextrakten verglichen. MDH ist ausschließlich im Cytosol lokalisiert, wo sie die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat katalysiert.

MDH-Aktivitätstest:	1 ml Gesamtvolumen
0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,4	960 µ – x µl
NADH (20 mg/ml in <i>A. dest.</i>)	20 µl
Oxaloesigsäure (3,3 mg/ml in <i>A. dest.</i>)	20 µl
Probe	x µl

Die Messung erfolgte bei 365 nm über 2 min. Betrug die MDH-Aktivität in der IWF mehr als 2 % der Aktivität des Blattextraktes, so galt die Probe als kontaminiert und wurde verworfen.

Peroxidase

Die Aktivität von Peroxidase (POX; Guajacol:H₂O₂ Oxidoreduktase; EC 1.11.1.7) in den Blattextrakten sowie in der IWF wurde photometrisch nach der Methode von Hammerschmidt *et al.* (1982) bestimmt. Bei diesem Test verknüpfen Peroxidasen mit Hilfe von H₂O₂ das farblose Guajacol (2-Methoxyphenol) zu einem rotbraunen tetrameren Komplex, dessen Bildung photometrisch verfolgt werden kann. IWF und Blattextrakte (1 g Frischgewicht, homogenisiert in 4 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer; pH 7) wurden auf ihre Peroxidase-Aktivität untersucht. Der Ansatz bestand

aus 0,01 M Na-Phosphatpuffer (pH 6) mit 0,1 M H₂O₂ und 0,25 % Guajacol (v/v). Das Volumen der Probe (2 - 50 µl) wurde mit dem entsprechenden Volumen des Ansatzes bis auf 3 ml Gesamtvolumen in der Küvette aufgefüllt. Der Extinktionsanstieg wurde für 2 min bei 470 nm verfolgt. Aus der Steigung der Extinktionsgeraden wurde die Gesamtaktivität ($\Delta E_{470} \times \text{min}^{-1} \text{ Gesamtvolumen}^{-1}$) und die spezifische Aktivität ($\Delta E_{470} \times \text{min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$) berechnet.

Zusätzlich zur photometrischen Aktivitätsmessung wurde die Aktivität von POX und das Auftreten von Isoenzymen gelelektrophoretisch nachgewiesen. Für die native Gelelektrophorese wurde ein Minigelsystem (Hoefler-Pharmacia, Freiburg) verwendet. Folgende Lösungen waren zur Gelbereitung notwendig:

Probenpuffer (1-fach):

TRIS/HCl-Puffer 1 M; pH 6,8	3,4 ml
Glycerin	5 ml
2-Mercaptoethanol	2,5 ml
mit A. dest. auf 50 ml aufgefüllt	

Trenngel (7,5 %):

Acrylamidstammlösung (30 % T, 0,8 % C Bis)	3 ml
TRIS/HCl-Puffer 0,375 M; pH 8,8	3 ml
Glycerin	1 ml
TEMED	30 µl
A. bidest.	5 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10 %; w/v)	30 µl

Sammelgel (4 %):

Acrylamidstammlösung (30 % T, 0,8 % C Bis)	1 ml
TRIS/HCl-Puffer 0,375 M; pH 6,8	1,5 ml
TEMED	10 µl
A. bidest.	3,5 ml
Ammoniumperoxodisulfat (APS; 10 %; w/v)	20 µl

Die einzelnen Bahnen wurden mit je 20 µl Probe beladen. Die IWF wurde zuvor 1:1 mit Probenpuffer (2-fach konzentriert) gemischt. Die Auftrennung erfolgte zunächst für 45 min bei 60 V, anschließend für 1 h bei 200 V. Zum Nachweis von POX-Aktivität wurden das Gel in eine Lösung aus 50 mg 3-Amino-9-ethyl-carbazol in 10 ml N,N-Dimethylformamid, 200 µl H₂O₂ (30 %; v/v) und 190 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5) gelegt. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 7 % (v/v) Essigsäure in 50 % MeOH gestoppt und das Gel unmittelbar danach fotografiert.

2. MATERIAL UND METHODEN

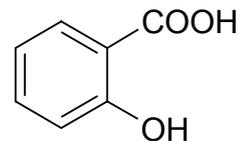
Polyphenoxidasen

Polyphenoxidasen (PPO; O-Diphenol:O₂ Oxidoreduktase; EC 1.10.3.1) sind Cu²⁺-haltige Enzyme, welche die Oxidation von Phenolen unter Beteiligung von O₂ katalysieren. Die Bestimmung der PPO-Aktivität erfolgte spektralphotometrisch nach der Methode von Retig und Chet (1974). Als Proben wurden Blattextrakte (1 g Frischgewicht, homogenisiert in 4 ml 100 mM TRIS/HCl; pH 7,5) nach Zentrifugation (5 min bei 10000 x g) bzw. IWF nach Infiltration mit *A. bidest.* eingesetzt. Probenvolumina von 10 - 50 µl wurden zum Substrat (1 % Catechol; w/v; in *A. bidest.*) gegeben und die Reaktion bei 400 nm über 2 min verfolgt.

2.6.3 Bestimmung endogener Salizylsäuregehalte

Salizylsäure (2-Hydroxybenzoesäure, C₇H₆O₃, Molekulargewicht 138,12; Abb. 4) kann in der Pflanze als freie Säure oder als inaktive Form glucosidisch an Zucker gebunden (β-Glucosid) vorliegen (Hennig *et al.*, 1993a und b; Meuwly *et al.*, 1995). Der Gesamtgehalt an Salizylsäure (SA) wird somit als Summe der freien Säure (FSA) und der gebundenen SA (SAG) berechnet (Dat *et al.*, 1998).

Abb. 4: Strukturformel der Salizylsäure



Probenahme

Blätter von Gurken- bzw. Tabakpflanzen wurden abgetrennt und entweder vollständig beprobt oder bei größeren Blättern wurde die Mittelrippe erster Ordnung entfernt. Die Blattproben wurden entweder direkt aufgearbeitet oder nach Einwiegen von ca. 1 g Frischgewicht in Polypropylen-Röhrchen (14 ml; Greiner, Frickenhausen) bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert.

Probenaufbereitung zur Quantifizierung freier Salizylsäure

Für die Analyse von frei vorliegender SA in Gurkenblättern wurde eine vereinfachte Extraktionsmethode in Anlehnung an Meuwly *et al.* (1995) entwickelt. Ca. 1 g Frischgewicht wurden mit 0,9 g Seesand und flüssigem Stickstoff in einem Porzellanmörser zu feinem Pulver zerkleinert. Anschließend wurden 3 - 4 ml Methanol *p. A.* (90 %; v/v) zugegeben und das Material homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Polypropylen-Röhrchen überführt, der Mörser zweimal mit jeweils 2 ml MeOH (90 %; v/v) gespült und die Probenröhrchen anschließend für 30 s geschüttelt (Vortex). Nach einer Zentrifugation (15 min; 4 °C; 20000 x g) wurde der Überstand vorsichtig abgezogen und in einen Rotationsverdampferkolben (50 ml) überführt. Das verbliebene Pellet wurde mit 2 - 4 ml MeOH (90 %; v/v) resuspendiert, geschüttelt (ca. 30 s) und nochmals wie vorher

zentrifugiert. Der Überstand nach der zweiten Zentrifugation wurde zum Überstand der ersten Zentrifugation in den Rotationsverdampferkolben gegeben und die methanolische Phase im Rotationsverdampfer auf ca. 1 - 2 ml eingengt (40 °C, 100 - 200 mbar). Dem verbliebenen wässrigen Extrakt wurden 50 - 100 µl Trichloressigsäure (TCA; 5 %; w/v) zugegeben und der Kolben anschließend im Ultraschallbad mehrfach geschwenkt. Diese wässrige Phase wurde in einen Messkolben (5 ml) überführt und der Rotationsverdampferkolben mit 1 ml MeOH *p. A.* (100 %) sowie ca. 1 - 2 ml *A. bidest.* nachgespült. Der pH-Wert der Probe musste dann mit NaOH bzw. TCA auf 4 - 5 eingestellt werden. Das Probenvolumen im Messkolben wurde mit *A. bidest.* einheitlich auf 5 ml aufgefüllt und Aliquots von 1 - 2 ml wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Diese Proben wurden anschließend zur Reinigung für 10 min bei 3000 x *g* zentrifugiert und der Überstand schließlich in HPLC-Vials abgefüllt.

Probenaufbereitung zur Quantifizierung des Gesamtgehalts an Salizylsäure

Ein Aliquot von 750 µl aus der Probe zur Bestimmung der freien SA wurde in ein Duran-Kulturröhrchen gegeben, mit 250 µl HCl *p. A.* (32 %; v/v) versetzt und leicht geschüttelt. Die Gefäße wurden mit teflonbeschichteten Deckeln so abgedeckt, dass der Gasaustausch mit der Atmosphäre möglich war, und für 2 h bei 80 °C im Trockenschrank inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden 750 - 1000 µl NaOH (2 M) zur Neutralisation hinzugefügt und der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe von NaHCO₃ (1 M) auf 4 - 5 eingestellt. Nach Zugabe von 1 ml MeOH *p. A.* (100 %) wurden die Proben in 5 ml Messkolben gegeben und mit *A. bidest.* aufgefüllt. Aliquots von 1 - 2 ml wurden in HPLC-Vials überführt.

Quantitative Bestimmung von Salizylsäure mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie

Die Bestimmung der SA-Gehalte erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatografie (HPLC). Die HPLC-Anlage zur quantitativen Bestimmung der Salizylsäuregehalte bestand aus Probengeber, Pumpe, Mischer (Pharmacia, Freiburg) sowie einem Fluoreszenz-Detektor (Fluor LC 304, Linear Instruments, Reno, USA). Zur Auftrennung wurde eine Gromsil[®]-Säule (120 ODS-3CP; 5 µm; Grom, Herrenberg) eingesetzt. Die Anregungswellenlänge am Fluoreszenzdetektor betrug 304 nm, die Emissionswellenlänge 408 nm. Folgendes Gradientensystem wurde unter wechselnden Flussraten aus den Laufmitteln A (Methanol) und B (Na-Acetat-Puffer 20 mM; pH 4; mit 10 % Methanol; v/v) verwendet (Tab. 4).

2. MATERIAL UND METHODEN

Tab. 4: Gradientensystem zur Quantifizierung von Salizylsäure

(A: Methanol; B: Na-Acetat-Puffer)

Zeit (min)	Flussrate (ml/min)	Anteil A (%)	Anteil B (%)
0	0,650	5	95
8	0,650	6	94
8,1	0,750	6	94
16,5	0,750	50	50
25	0,750	100	0
27	0,750	99	1
31	0,750	6	94
31,1	0,650	6	94
35	0,650	5	95

Probenvolumina im Bereich von 10 - 100 µl wurden eingespritzt. Die Identifizierung der Peaks sowie die quantitative Auswertung erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten sowie der Peakflächen mit definierten Mengen von SA-Standards im Bereich von 5 - 250 µg SA/l mit Hilfe der computergestützten Auswertungssoftware Datasystem 450-MT2/DAD (Kontron, München).

2.6.4 Nachweis von Zelltod

Das Auftreten von Zelltod im Gewebe Induktor-behandelter Blätter wurde durch Anwendung modifizierter histochemischer Färbemethoden mit Trypanblau (Keogh *et al.*, 1980) und Evansblau (Baker und Mock, 1994) nachgewiesen.

Nachweis mit Trypanblau

Mit einem Korkbohrer ausgestanzte Blattscheiben (10 - 15 mm Durchmesser) wurden 2 min in der Färbelösung (10 ml Milchsäure, 10 ml Glycerin, 10 ml Phenol, 10 ml Wasser, 0,02 g Trypanblau) gekocht. Die blau gefärbten Blattscheiben wurden über Nacht in einer Lösung (2,5 g Chloralhydrat/ml deion. Wasser) entfärbt und anschließend unter einem Fotomikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Göttingen) fotografiert. Blau angefärbte Zellbereiche deuten hierbei auf Zelltodauslösung hin.

Nachweis mit Evansblau

Blattscheiben (15 - 25 mm Durchmesser) wurden mit einem Korkbohrer vorsichtig aus dem Blattgewebe zwischen den großen Blattnerve ausgestanzt und in den Zylinder einer Kunststoff-Injektionsspritze (30 ml) überführt. Der Ausgang der Spritze wurde von Hand zugehalten und nach Zugabe von ca. 20 ml Farbstofflösung (0,5 % Evansblau; w/v; in *A. bidest.*) der Druckkolben vorsichtig eingesetzt. Nach Herausdrücken der Luft aus der Spritze waren die Blattscheiben vollständig von der Farbstofflösung umgeben. Durch Heben des Druckkolbens wurde ein Unterdruck an-

gelegt und dadurch der Apoplast der Blattscheiben nach vorsichtigem Herablassen des Kolbens mit dem Farbstoff infiltriert. Diese Prozedur wurde insgesamt bis zu dreimal wiederholt bis die Blattscheiben vollständig mit Farbstoff infiltriert waren. Überschüssiges Evansblau wurde durch mehrmaliges Spülen mit deion. Wasser entfernt und die Blattscheiben in Schnappdeckelgläsern in deion. Wasser nach vollständiger Entfernung des Farbstoffs bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zur Dokumentation wurden die Blattscheiben auf einem Leuchttisch bei Durchlicht fotografiert.

2.6.5 Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies

Der Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) erfolgte histochemisch in Anlehnung an die Methoden von Schraudner *et al.* (1998). Dazu wurden spezifische Farbstoffe in den Apoplasten des Pflanzengewebes infiltriert, die mit typischen Farbreaktionen das Vorhandensein von Superoxidanionen (O_2^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) anzeigen.

Nachweis von Superoxidanionen

Der Farbstoff Nitroblautetrazolium (NBT) wird durch O_2^- zu einem dunkelblauen, unlöslichen Formazankomplex reduziert, welcher einen qualitativen Nachweis sowie die Lokalisation dieses Radikals ermöglicht. Ausgestanzte Blattstücke (10 - 20 mm Durchmesser) wurden in Analogie zum Nachweis von Zelltod mit Evansblau mit einer NBT-Lösung infiltriert. Diese bestand aus 0,1 % NBT (w/v) in Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 6,4) sowie 10 mM Natriumazid. Die infiltrierten Blattscheiben wurden in Petrischalen für 30 min dem Tageslicht ausgesetzt und anschließend mit einer Entfärbelösung, bestehend aus 0,15 % Trichloressigsäure (w/v) in Ethanol:Aceton (4:1; v/v) modifiziert nach Hückelhoven und Kogel (1998) im Dunkeln entfärbt. Bis zur vollständigen Entfärbung des Blattmaterials wurde die Entfärbelösung mehrfach ausgewechselt und die Proben anschließend in Ethanol (96 %; v/v) bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Nachweis von Wasserstoffperoxid

3,3'-Diaminobenzidin 4 HCl (DAB) ist ein spezifischer Farbstoff zum Nachweis von H_2O_2 , der sich mit Wasserstoffperoxid unter Beteiligung endogener Peroxidasen zu dunkelroten-rotbraunen unlöslichen Komplexen verbindet (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). In Analogie zum Nachweis von O_2^- mittels NBT wurde eine DAB-Lösung (0,1 % DAB; w/v; in 10 mM MES-Puffer; pH 6,5) in die Blattscheiben infiltriert und diese danach wie für O_2^- beschrieben weiterbearbeitet.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.6.6 Lipidperoxidation

Lipidperoxidation kann durch freie Radikale sowie durch Lipoxygenase (LOX; Linoleat: Sauerstoff Oxidoreduktase; EC 1.13.11.12) erfolgen (Gutteridge und Halliwell, 1990). Dabei werden mehrfach-ungesättigte Fettsäuren der Plasmamembran zu Lipidperoxiden umgesetzt (Anderson *et al.*, 1998). Die hier benutzte Methode zur Quantifizierung der Lipidperoxidation nach oxidativer Schädigung der Plasmamembran eignet sich zur Bestimmung des Abbauproduktes Malondialdehyd (MDA) mit Hilfe der Thiobarbitursäure (TBA) (Rusterucci *et al.*, 1996).

Blattmaterial (1 g Frischgewicht) wurde mit flüssigem Stickstoff in einem Mörser zu feinem Pulver vermahlen und mit 3 ml TCA (10 % w/v) homogenisiert. Die Probe wurde 20 min bei 20000 x g zentrifugiert und 750 µl des Überstands als Aliquot entnommen. Dieses wurde mit 750 µl Thiobarbitursäurelösung (0,67 % TBA; w/v; in 10 % TCA; w/v) versetzt und 15 min gekocht. Nach dem Abkühlen auf Eis wurden die Proben bei 532 nm sowie 600 nm spektralphotometrisch gegen den Blindwert (750 µl Wasser statt Probe) vermessen. Die unspezifische Extinktion bei 600 nm wurde jeweils von dem Messwert bei 532 nm abgezogen. Der Extinktionskoeffizient ϵ für TBARS (thiobarbituric acid related substances) beträgt $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Heath und Packer, 1968), so dass nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die TBARS-Konzentrationen anhand folgender Formel berechnet werden konnten.

$$E = c * d * \epsilon \Leftrightarrow c = \frac{E}{d * \epsilon}$$

$E = E_{532} - E_{600}$; $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$; c = Konzentration; d = 1 cm (Schichtdicke der Küvette)