

Aus dem Institut für Botanik
Universität Hohenheim
und
Institut für Pflanzenproduktion und Agrarökologie
in den Tropen und Subtropen
Universität Hohenheim

Prof. Dr. Sauerborn

Pathogenitätsfaktoren und induzierte Resistenz
in der Interaktion von *Orobanche ramosa* L.
und *Nicotiana tabacum* L.

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät Naturwissenschaften
der Universität Hohenheim

vorgelegt von
Guido Gonsior
aus Immerath J Erkelenz

2005

Die vorliegende Arbeit wurde am 20 Mai 2005 von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als "Dissertation zur Erlangung eines Doktors der Naturwissenschaften" angenommen.

Tag der mündlichen Prüfung:	23. Juni 2005
Dekan:	Prof. Dr. K. Bosch
Berichterstatter, 1. Prüfer:	Prof. Dr. J. Sauerborn
Mitberichterstatter, 2. Prüfer:	Prof. Dr. O. Spring
3. Prüfer:	Prof. Dr. K. Haas

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Parasitische Blütenpflanzen und ihre agronomische Bedeutung	1
1.2	<i>Orobancha ramosa</i>	1
1.2.1	Geographische Verbreitung	1
1.2.2	Biologie	3
1.2.3	Auswirkung des <i>O. ramosa</i> -Befalls auf die Wirtspflanze	4
1.2.4	Probleme bei der Bekämpfung von <i>O. ramosa</i>	6
1.3	Induzierte Resistenz	7
1.4	Forschungsziele	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien	11
2.1.1	Pflanzenstärkungsmittel	11
2.1.2	Referenzsubstanzen	11
2.1.3	Antiseren und Enzyme	12
2.1.4	Nähr- und Anzuchtmedien	12
2.1.5	Testsysteme und Fertiglösungen	12
2.1.5	Keimungsstimulanz	12
2.2	Pflanzen	13
2.2.1	Untersuchte Arten	13
2.2.2	Anzuchtbedingungen	15
2.3	Geräte	15
2.4	Methoden	16
2.4.1	Kontamination mit <i>O. ramosa</i> -Saatgut	16
2.4.2	Applikation von Pflanzenstärkungsmitteln	17
2.4.3	Auswertung der Topf- und Wurzelkammerversuche	17
2.4.4	Bestimmung der Lignin- und Phenolgehalte	18
2.4.5	Chromatographische und spektroskopische Untersuchungen von Sekundärmetaboliten	19
2.4.6	Analyse der reaktiven Sauerstoffspezies	20
2.4.7	Bestimmung der Enzymaktivitäten	20
2.4.7.1	Aufschluss des Pflanzenmaterials	20
2.4.7.2	Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität	21
2.4.7.3	Bestimmung der Peroxidase-Aktivität	21
2.4.8	Mikroskopische Untersuchungen	21
2.4.9	Native Gelelektrophorese	22
2.4.9.1	Verwendete Lösungen:	22
2.4.10	SDS Gelelektrophorese und Immundetektion	23
2.4.10.1	Verwendete Lösungen:	24
2.4.11	Polymerasekettenreaktion (PCR)	25
2.4.11.1	Verwendetes Pflanzenmaterial	25
2.4.11.2	DNA-Aufarbeitung	25
2.4.11.3	DNA-Auftrennung	26
2.4.12	Keimungstest	26
2.5	Statistische Auswertung	27
3	Ergebnisse	28
3.1	Genetische Variabilität von <i>O. ramosa</i>	28
3.2	Untersuchungen der Pathogenitätsfaktoren von <i>O. ramosa</i>	29

3.2.1 Sekundärmetabolite	29
3.2.2 Reaktive Sauerstoffintermediate	31
3.2.3 Peroxidase-Aktivität	32
3.3 Suszeptibilität verschiedener Tabaksorten gegenüber <i>O. ramosa</i>	32
3.3.1 Wurzelkammerexperimente	36
3.4 Evaluierung von Resistenzinduktoren gegen <i>O. ramosa</i>	41
3.5 Einfluss von Phytohormonen auf den Befall mit <i>O. ramosa</i>	41
3.6 Biochemische Mechanismen der Resistenz gegen <i>O. ramosa</i>	43
3.6.1 Phenole.....	43
3.6.2 Akkumulation von Sekundärmetaboliten an der Eintrittsstelle von <i>O. ramosa</i> in den Wirt.....	44
3.6.3 Sekundärmetabolite der Wirtswurzel	46
3.6.4 Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate nach Bion®-Behandlung	50
3.6.5 PAL- und Peroxidase-Aktivitäten	51
3.6.6 Expression von Resistenzproteinen in Tabakwurzeln.....	52
3.7 Versuche zur Keimung von <i>O. ramosa</i>	53
3.8 Befallsstudien mit transgenen Linien des Wildtabaks <i>Nicotiana attenuata</i>	55
4 Diskussion	59
4.1 Genetische Variabilität von <i>O. ramosa</i>	59
4.2 Pathogenitätsfaktoren von <i>O. ramosa</i>	61
4.2.1 Antioxidatives System von <i>O. ramosa</i>	63
4.3 Induzierte Resistenz.....	64
4.4 Resistenzmechanismen der Wirtspflanzen.....	68
4.4.1 Akkumulation von Sekundärmetaboliten.....	70
4.4.1.1 Phenolakkumulation und Lignifizierung	70
4.4.1.2 Phytoalexinsynthese	71
4.4.1.3 Reaktive Sauerstoffintermediate	72
4.4.2 Expression und Aktivität von Resistenzenzymen.....	74
4.4.3 Evaluierung von Resistenz Genen.....	76
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	80
5 Zusammenfassung	82
6 Literaturverzeichnis.....	84
7 Anhang	101

Abkürzungen

a.i.	active ingredient (Wirksubstanz)
AOX	alternative Oxidase
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
Bp	Basenpaar(e)
BTH	1,2,3-Benzothiadiazol-7-carbothiolsäure-S-methylester
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DC	Dünnschichtchromatographie
DHBS	Dichloro-2-Hydroxybenzenesulfonsäure
DLT	Dunkler luftgetrockneter Tabak
DNA	Deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic acid (Ethylendiamintetraessigsäure)
FG	Frischgewicht
GAE	Gallussäure-Äquivalente
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HR	hypersensitive Reaktion
ISR	Induced Systemic Resistance (induzierte systemische Resistenz)
(I)SSR	(Inter) Simple Sequence Repeats (einfache Sequenzwiederholung)
JA	Jasmonat
LAP	Landesanstalt für Pflanzenbau
LAR	Local Acquired Resistance (lokal erworbene Resistenz)
MeOH	Methanol
MS	Massenspektroskopie
MW	Mittelwert
NBT	Nitroblautetrazolium
NAD(P)H	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate); reduzierte Form
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Kernspinresonanz)
PAL	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PGasen	Polygalacturonasen
PME	Pektinmethylesterase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

PR-	pathogenic related
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROIs	Reactive Oxygen Intermediates (reaktive Sauerstoffintermediate)
SA	Salicylic acid
SAR	Systemic Acquired Resistance (systemisch erworbene Resistenz)
SDS-Page	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
STABW	Standardabweichung
t-	<i>trans-</i>
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA
TE- Puffer	Tris-EDTA Puffer
TG	Trockengewicht
Tris	Tris-(Hydroxymethyl) Aminomethan
UV	ultraviolett
vis	visible (sichtbar)

1 Einleitung

1.1 Parasitische Blütenpflanzen und ihre agronomische Bedeutung

In der Literatur wird davon ausgegangen, dass 1 % aller Blütenpflanzen eine parasitische Lebensweise entwickelt haben (Kuijt 1969; Keyes *et al.* 2001; Heller 2002). Nur wenige von diesen befallen Kulturpflanzen. Die wichtigsten Parasiten von agronomischer Bedeutung entstammen der Familie der *Orobanchaceae*. Besonders die parasitischen Blütenpflanzen der Gattungen *Striga* (Hexenkraut) und *Orobanche* (Sommerwurz) verursachen Ertragsverluste bei einer Reihe von Kulturpflanzen (Musselman 1987; Parker & Wilson 1986; Ramaiah 1987; Sauerborn 1991 a,b). Sommerwurz-Arten befallen beispielsweise Sonnenblumen (*Helianthus annuus* L.), Tomaten (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.), Tabak (*Nicotiana tabacum* L.), sowie Körner- und Futterleguminosen, vorzugsweise in mediterranen Gebieten. Hierbei kommt es im Durchschnitt zu Ertragseinbußen von 34 %, wobei 16 Million ha der globalen Agrarfläche betroffen sind (Linke *et al.* 1989). Neben *Orobanche minor* Sm., *O. aegyptiaca* Pers., *O. cernua* Loefl., *O. crenata* Forsk. und *O. cumana* Wallr. befällt insbesondere *O. ramosa* L. Kulturpflanzen (Parker & Riches 1993).

1.2 *Orobanche ramosa*

1.2.1 Geographische Verbreitung

Die Verbreitung von *O. ramosa* erstreckt sich über Europa, Vorderasien und Nordafrika (Charter & Webb 1972). Vereinzelt Vorkommen finden sich in Südastralien, Südafrika, Chile und Nordamerika (Abb. 1). Nach Westeuropa wurde *O. ramosa* wahrscheinlich schon im 16. Jh. mit dem Hanfanbau aus Asien eingeschleppt (Fuchs-Eckert 1987; Pusch & Barthel 1992).



Abb. 1: Verbreitungskarte von *O. ramosa* (○).

Mit dem in den vergangenen Jahren zunehmenden Anbau von Hanf (*Cannabis sativa* L.) und Virgin-Tabaken breitet sich *O. ramosa* in Deutschland weiter aus und parasitiert insbesondere Tabak im Oberrheingebiet. Bisherige Beobachtungen zeigen, dass es in den Regionen Speyer, Heidelberg und Offenburg zu Ertragsverlusten im Tabakanbau kommt und die Befallsintensität von Jahr zu Jahr zunimmt. Aktuelle Beobachtungen aus Deutschland (Landesanstalt für Pflanzenbau (LAP) Forchheim) und Frankreich (Gibot-Leclerc *et al.* 2001) zeigen zudem, dass *O. ramosa* zunehmend auch Frühkartoffeln und Raps (*Brassica napus* L.) befällt. Es wird angenommen, dass es sich um spezialisierte Pathotypen von *O. ramosa* handelt. Buschmann *et al.* (2005) konnten bereits unterschiedlich pathogene Populationen von *O. ramosa* auf Raps identifizieren. Gilli (1974) zeigte, dass es eine große Variabilität innerhalb der Art *O. ramosa* gibt. Er unterschied sechs phänotypisch verschiedene mitteleuropäische Varietäten. Welche dieser Varietäten auch in Deutschland verbreitet sind, ist nicht geklärt.

1.2.2 Biologie

Die Lebensweise von *O. ramosa* ist holoparasitisch. Das heißt, die Pflanze besitzt kein Chlorophyll und ist bei der Versorgung mit Wasser, Nährstoffen und Assimilaten allein auf den Wirt angewiesen. Zur Aufnahme derselben bildet der Parasit ein Kontaktorgan, das Haustorium, welches eine direkte Verbindung vom Parasiten zum Leitgewebe der Wirtswurzel herstellt (Press & Graves 1995). Hierbei wird sowohl eine Verbindung zum Xylem, als auch zum Phloem gebildet (Pieterse 1979; Pieterse & Pesch 1983).

Die Samen von *O. ramosa* werden durch spezifische Keimungstimulanzen der Wirtspflanze (Xenogonine) zur Keimung angeregt (Magnus & Zwanenburg 1992; Parker & Riches 1993; Buschmann 2004). Anschließend wächst die Keimwurzel (Radicula) zur Wirtswurzel, an welcher es zur Anheftung und zur Entwicklung des Haustoriums kommt. Anschließend folgt ein Tuberkel- (Knöllchen-) Stadium, welches zunächst als Speicherorgan dient und aus dem sich später der *O. ramosa*-Sproß entwickelt (Wegmann 1999). Während des Tuberkelstadiums wird auch die Bildung von Adventivwurzeln induziert. Ob diese zur weiteren Anheftung an die Wirtswurzel dienen und/oder *O. ramosa* auch mit Nährstoffen und Wasser unabhängig vom Wirt versorgen können, ist unklar.

O. ramosa läuft etwa zwei Monate, nachdem ein erfolgreicher Wirtskontakt stattgefunden hat, auf. Nach weiteren zwei Wochen kommt es zur Blütenbildung. Nach dem Verblühen trocknen die Samenkapseln ab und öffnen sich. Die Samen fallen zu Boden und keimen bei Stimulation (Abb. 2).

Eine einzige *O. ramosa*-Pflanze produziert bis zu 100.000 Samen, die im Boden bis zu 15 Jahren keimfähig bleiben (Wegmann 1999). Die Samen haben die Größe von Orchideensamen (0,3 x 0,2 mm), wobei ein Same nur 3-6 µg wiegt (Parker & Riches 1993; Pusch 1996).

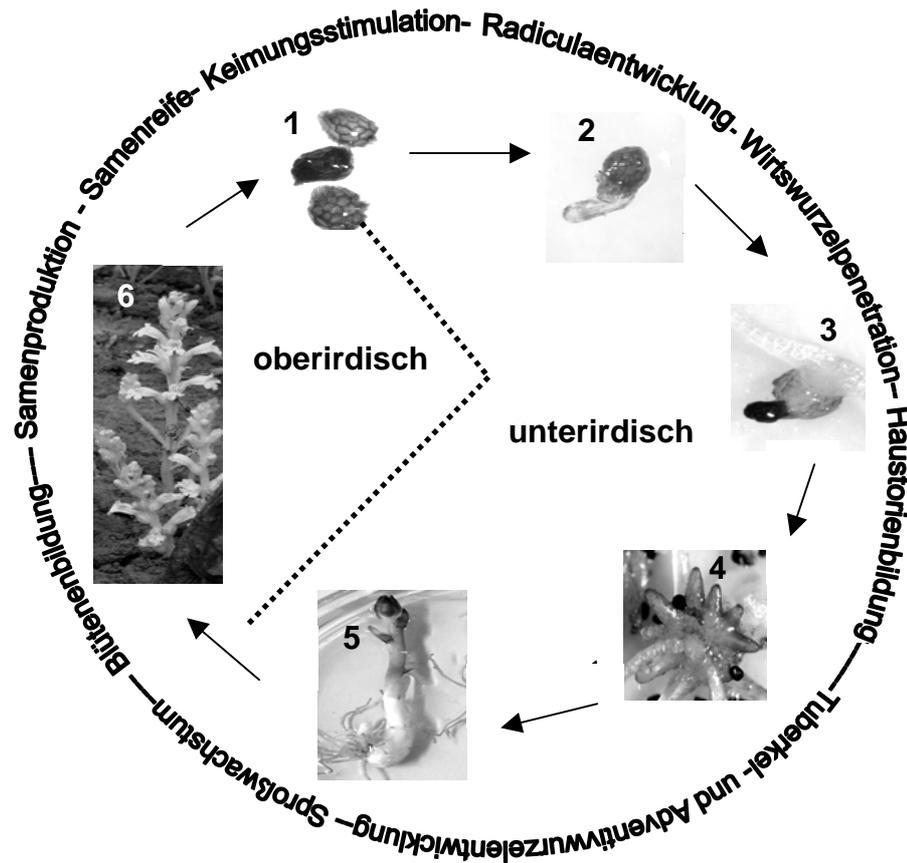


Abb. 2: Lebenszyklus von *O. ramosa*. 1: Samen; 2: gekeimter Samen (Radicula); 3: Anheftung an die Wirtswurzel und Haustoriumentwicklung; 4: Tuberkelstadium; 5: *O. ramosa*-Sproß 6: blühende *O. ramosa*.

1.2.3 Auswirkung des *O. ramosa*-Befalls auf die Wirtspflanze

O. ramosa zeichnet sich durch ein breites Wirtsspektrum aus. Neben Brassicaceen, Apiaceen, Cucurbitaceen, Alliaceen, Asteraceen, Fabaceen und Cannabaceen werden vor allem Solanaceen parasitiert.

Insbesondere bei starkem Befall sind Biomasseverluste der Wirtspflanze bis hin zur Seneszenz die Folge (Gibot-Leclerc *et al.* 2003; Zehhar *et al.* 2002). Befallene Wirtspflanzen zeichnen sich durch chlorotische Blätter und Welkesymptome aus (Abb. 3).



Abb. 3: Mit *O. ramosa* infizierter Tabak (die Pfeile markieren aufgelaufene *O. ramosa*).

Die Schädigungen der Wirtspflanze können mit einer Verarmung an Kohlenhydraten durch *Orobanche*-Befall und der daraus resultierenden Verminderung der Wasseraufnahmefähigkeit korreliert werden (Stewart & Press 1990). Aufgrund des rudimentären Wurzelsystems von *Orobanche*-Spezies sind diese auf eine Wasserversorgung durch die Wirtspflanze angewiesen. Der Wasserfluss vom Wirt zum Parasiten wird durch Differenzen im Wasserpotential und durch hohe Transpiration erreicht (Parker & Riches 1993). Im Zusammenhang mit dem gesteigerten osmotischen Potential im *Orobanche*-Gewebe werden, neben der Akkumulation anorganischer Ionen und einer gesteigerten Invertase-Aktivität, erhöhte Mannit-Gehalte des Parasiten diskutiert. (Parker & Riches 1993; Stewart & Press 1990). In *O. ramosa* konnten große

Mengen von Mannit nachgewiesen werden (Wegmann 1986; Pageau *et al.* 2000).

1.2.4 Probleme bei der Bekämpfung von *O. ramosa*

Bereits Koch (1887) erwähnte die erheblichen Ertragseinbußen in Hanf- und Tabakkulturen durch *O. ramosa* und verwies auf Trivialnamen, die den „ganzen Grimm“ gegen diese parasitische Blütenpflanze zum Ausdruck bringen sollten. Unter anderem wurde *O. ramosa* als „Mitfresser“, „Hanftod“, „nackte Hure“, „Tabakteufel“ und „Tabakwürger“ bezeichnet. Zudem wies Koch darauf hin, dass die Bekämpfung von *O. ramosa* äußerst schwierig sei. Diese Feststellung hat bis in unsere Zeit Bestand. Zum Einen liegt dies daran, dass *O. ramosa* nicht als Einzelpflanze, sondern immer im Zusammenhang mit dem Wirt behandelt werden muss. Zum Anderen sind die Interaktionen zwischen Wirt und Parasit kaum geklärt. Die Aufdeckung der Pathogenitätsfaktoren, die es den Parasiten ermöglichen, die natürlichen Resistenzmechanismen der Wirtspflanze zu überwinden bzw. eine Erforschung der Resistenzmechanismen, die es der Wirtspflanze ermöglichen, einen Befall mit *O. ramosa* zu verhindern, könnten entscheidend zur Entwicklung einer Kontrollmethode beitragen.

Bis heute kann *O. ramosa* nicht effektiv und selektiv kontrolliert werden. Versuche der Landesanstalt für Pflanzenbau in Forchheim zum Herbizideinsatz gegen *O. ramosa* im Tabakanbau zeigten, dass *O. ramosa*, selbst bei für die Wirtspflanzen toxischen Konzentrationen an Herbiziden, aufläuft (Abb. 4)

Auf der Suche nach alternativen Kontrollmethoden konnten Sauerborn *et al.* (2002) zeigen, dass die Kontrolle der Sonnenblumen-Sommerwurz *O. cumana* durch induzierte Resistenz des Wirtes möglich ist. Auch auf andere *Orobanchen*/Wirt-Systeme ist die induzierte Resistenz anwendbar, wie von Perez-

de-Luque *et al.* (2004) anhand einer Verminderung des *O. crenata*-Befalls an Erbsen gezeigt wurde.



Abb. 4: Auflaufen von *O. ramosa* nach Glyphosat-Behandlung (A); Spritzschäden am Tabak durch Glyphosat (B)

1.3 Induzierte Resistenz

Bei einer Behandlung mit chemischen Resistenzfaktoren, aber auch mit verschiedenen Mikroorganismen, kommt es in unterschiedlichen Pflanzen zu einer Aktivierung („priming“) der Widerstandskräfte gegenüber nachfolgenden Infektionen (Conrath *et al.* 2002). Diese Reaktion wird als „induzierte“ Resistenz bezeichnet. Die induzierte Resistenz wird in zwei Kategorien unterteilt (Hammerschmidt 1999; Pieterse & van Loon 1999). Zum einen ist dies die systemisch erworbene Resistenz („Systemic Acquired Resistance“, SAR), die durch Chemikalien oder nekrotisierende Mikroorganismen ausgelöst wird. Zum anderen die induzierte systemische Resistenz (ISR), die durch die Kolonialisierung der Rhizosphäre mit sogenannten wachstumsfördernden Rhizobakterien (plant growth promoting rhizobacteria, PGPR) oder arbuskulärer Mykorrhiza aktiviert wird. Die aktivierten Abwehrmechanismen der Pflanze hemmen die Infektionsmechanismen der Pathogene und bewirken damit die

Vermeidung von Ertrags- und Qualitätsverlusten (Dehne *et al.* 1984; Kessmann *et al.* 1994 a, b)

Die Heterogenität dieser Resistenz-Aktivatoren lässt entweder darauf schließen, dass in Pflanzen eine Vielzahl von Rezeptoren vorhanden sind oder dass diese Rezeptoren sehr unspezifisch sind. Die induzierte Resistenz breitet sich systemisch in der Pflanze aus und bietet auch an nicht behandelten Pflanzenteilen Schutz. Dies setzt eine Signalweiterleitung voraus. Welche Signalstoffe hierbei beteiligt sind und wie die Signalketten in unterschiedlichen Pflanzen ablaufen, wird derzeit diskutiert (Nakashita *et al.* 2002; Verberne 2003). So werden im Zuge einer SAR in Modellorganismen wie *Arabidopsis*, Tabak oder Tomate die Signalketten unter Beteiligung von Salicylsäure (SA) aktiviert. Demgegenüber erfolgt die Signalleitung nach Aktivierung im Sinne einer ISR nicht über Salicylsäure sondern vermutlich über Jasmonsäure (JA) und/oder Ethylen (Conrath *et al.* 2002).

Zu den aktivierten Abwehrmechanismen gehören die „hypersensitiven Reaktionen (HR)“ und die lokale Verstärkung der Zellwände (Kogel *et al.* 1994). Daneben wird die Synthese verschiedener Proteine aktiviert, wie etwa die pathogen-stimulierten PR-Proteine (Ward *et al.* 1991) oder weitere am Aufbau von Abwehrreaktionen beteiligte Proteine, wie z.B. die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) (Stadnik & Buchenauer 2000). Neben der Aktivitätserhöhung der PAL zeigten Katz *et al.* (1998), dass es in Petersilie (*Petroselinum crispum* (Mill.) Nym.) auch zur verstärkten Produktion von Cumarin-Phytoalexinen kommt.

Das Prinzip der systemisch erworbenen Resistenz (SAR) wurde schon 1933 von Chester als pflanzliche Immunität und für den Pflanzenschutz nutzbringend beschrieben. Dennoch wurde erst in den letzten Jahren intensiv auf diesem Gebiet geforscht und Erkenntnisse zu den mechanistischen Grundlagen der SAR

gewonnen (Stichler *et al.* 1997; Heil 1999; Lucas 1999). Dies liegt einerseits an der Entwicklung verfeinerter Untersuchungsmethoden und der damit einhergehenden Zunahme an Informationen zu Wirt-Parasit-Interaktionen sowie andererseits an einem Wandel im Verständnis von Pflanzenschutz. So stand im zwanzigsten Jahrhundert der chemische Pflanzenschutz mit der Entwicklung immer neuer Pestizide im Vordergrund. Demgegenüber ist es das Ziel eines zukunftsorientierten Pflanzenschutzes, die durch die Koevolution mit den Pathogenen entstandenen Widerstandskräfte der Kulturpflanzen zu stärken. Es soll also neben dem kurativen Pflanzenschutz verstärkt ein präventiver stehen.

Die induzierte Resistenz ist ein Pflanzenschutzkonzept, das die natürlicherweise vorhandenen Abwehrmechanismen anfälliger Pflanzen aktiviert und somit zur Pflanzengesundheit beiträgt, ohne dass Veränderungen am Genom vorgenommen werden. Die präventiv induzierten Abwehrreaktionen sind unspezifisch und zielen gegen bakterielle, pilzliche sowie virale Pathogene (Lucas 1999). Insbesondere gegenüber konventionell schwer kontrollierbaren Organismen erwies sich die SAR als wirksam (Stichler *et al.* 1997). Parallel zum steigenden Erkenntniszuwachs zu dem Prinzip der SAR wurden von Seiten der Industrie verschiedene Substanzen (Benzo-thiadiazol-carbonsäure-methylester, Syngenta, meij Seika Kaisha Ltd.) zur Aktivierung und Stärkung der Widerstandskraft entwickelt und zur Produktreife (Bion® bzw. Oryzemat®) gebracht. Neben diesen chemischen Produkten stehen eine Reihe von biologischen Pflanzenstärkungsmitteln zur Verfügung, die auf Inhaltsstoffen aus Pflanzenextrakten, Pilzen oder Bakterien beruhen.

1.4 Forschungsziele

Da die in Deutschland vorkommende *O. ramosa* nicht beschrieben ist, sollte zunächst durch genetische Untersuchungen geklärt werden ob es sich um unterschiedliche Populationen handelt. Zum besseren Verständnis der erfolgreichen Ausbreitung von *O. ramosa* waren zudem Untersuchungen der Pflanze/Pflanze-Interaktion unter besonderer Berücksichtigung der Pathogenitätsfaktoren von *O. ramosa* und der natürlichen Resistenzmechanismen der Wirtspflanze von Interesse. Anhand von Befallsstudien verschiedener Tabaksorten durch *O. ramosa* sollten resistente bzw. wenig anfällige Tabake gefunden werden. Der biochemische Vergleich dieser Sorten mit hoch anfälligen Tabaken sollte schließlich Aufschluss über beteiligte Resistenzmechanismen gegen *O. ramosa* geben. Neben der Suche nach natürlichen Resistenzen gegen *O. ramosa* in verschiedenen Tabaksorten sollten Elicitoren gefunden werden, die vor einer Infektion mit *O. ramosa* schützen. Unter Zuhilfenahme dieser Elicitoren sollten dann die Resistenzmechanismen der Wirtspflanze gegen *O. ramosa* weiter untersucht werden. Parallel wurden transgene Tabaklinien mit Defekten in an der Resistenzantwort beteiligter Gene auf ihre Anfälligkeit gegenüber *O. ramosa* untersucht, um zum weiteren Verständnis der Resistenzmechanismen gegen parasitische Blütenpflanzen beizutragen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Getestete Pflanzenstärkungsmittel wurden in vollentionisiertem Laborwasser aufgenommen. Alle anderen wässrigen Lösungen wurden nach Wasseraufbereitung (SimplicityTM Wasseraufbereitungssystem; Millipore GmbH, Schwalbach, Deutschland) mit Reinstwasser angesetzt.

2.1.1 Pflanzenstärkungsmittel

Bion® (Syngenta, Basel, Schweiz)

Proradix® (Sourcon Padana AG, Tübingen)

Goemar Fruton Spezial® (Spiess-Urania Chemicals GmbH, Kleinkarlbach)

2.1.2 Referenzsubstanzen

Scopolin (zur Verfügung gestellt von Dr. Goro Taguchi, Kyoto Universität, Japan).

Scopoletin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Chlorogensäure (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Nikotin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

t- Zimtsäure (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

Oraposid; Verbascosid (zur Verfügung gestellt vom Laboratoire Substances Naturelles, Parfums Christian Dior, Saint Jean de Braye Cedex, Frankreich und dem Institut de Chimie Organique et Analytique, Orléans Cedex 2, Frankreich)

2.1.3 Antiseren und Enzyme

PAL-Antiserum (zur Verfügung gestellt von Prof. Schroeder, Institut für Biologie 2, Freiburg)

Chitinase- und Glukanase-Antiserum (zur Verfügung gestellt von DANISCO, Kopenhagen, Dänemark)

Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-AP (Biozol, Eching)

Meerrettich-Peroxidase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen)

2.1.4 Nähr- und Anzuchtmedien

Stendersubstrat (Stender AG Schermbeck, Schermbeck)

Wuxal® (Bayer AG, Leverkusen)

2.1.5 Testsysteme und Fertiglösungen

peqGold TriFast™ (peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen)

Quiagen DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen GmbH, Hilden)

Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Biosciences, Piscataway, USA)

TE Puffer (Eurobio, Les Ulis, Frankreich)

Roti®-Load2 (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Roti-Load-DNA Ladepuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

pBR 328 Mix I (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

2.1.5 Keimungsstimulanz

GR 24 (zur Verfügung gestellt von Prof. B. Zwanenburg, Nijmegen, Niederlande)

2.2 Pflanzen

2.2.1 Untersuchte Arten

Als Wirtspflanzen wurden unterschiedliche Sorten von Hanf (*Cannabis sativa* L.), und Tabak (*Nicotiana tabacum* L.) auf ihre Anfälligkeit gegenüber *O. ramosa* getestet (Tab. 1). Hanf- und Tabak-Saatgut wurden von der Landesanstalt für Pflanzenbau (LAP) in Forchheim bezogen. Des weiteren stellte das Max-Planck-Institut für chemische Ökologie in Jena (Arbeitsgruppe Prof. Ian Baldwin) transgene Linien von *Nicotiana attenuata* Torr. (Tab. 2), sowie die Arten *Nicotiana bigelovii* (Torr.) Watson und *Nicotiana clevelandii* Watson zur Verfügung.

Tab. 1: Verwendete Hanf- und Tabaksorten.

Hanf (<i>Cannabis sativa</i> L.)	Fasamo, Ferimon 12, Futura 75, Fedora 17, Felina 34, Epsilon 68, Uso 31
Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	Burley-Sorten (Jupiter, HyB 2, B 011, B 971) Dunkle Luftgetrocknete-Sorten (Adonis, Z 992, Badischer Geudertheimer) Virgin-Sorten (HYV 8, Helena, Golta)

Tab. 2: Transgene Linien von *Nicotiana attenuata* L. (AS antisense; S sense; IR inverted repeat).

Gen	Enzym/ Protein/ Faktor	mutmaßliches Wirkungsziel
AS-FDGS	Ferredoxin-abhängige Glutamat-Synthetase	Aminosäuresynthese
AS-RCA	Rubisco-Aktivase	CO ₂ -Fixierung
AS-GAL83	SNF1 (Serin/Threonin) Kinase-Untereinheit	Zuckerhaushalt
AS-GER	Germin	Signalpeptid, H ₂ O ₂ -Synthese
AS-TD	Threonin-Deaminase	Jasmonat-Akkumulation
AS-WRKY3	Transkriptionsfaktor	Pathogenresistenz
AS-WRKY6	Transkriptionsfaktor	Pathogenresistenz
AS-AOS	Allenoxid-Synthase	Jasmonat-Biosynthese
AS-HPL	Hydroperoxid-Lyase	Phytoalexinsynthese
AS-LOX	Lipoxygenase	Jasmonat-Biosynthese, HR

IR-PMT	Putrescin N- methyltransferase	Phytoalexinsynthese
AS-ETR1	Ethylen-Rezeptor	
AS-ACO	Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase	Ethylensynthese
AS-RALF387	rapid alkalisation factor	Wurzelentwicklung
AS-RALF381	rapid alkalisation factor	Wurzelentwicklung
AS-PI	Protease-Inhibitor	Herbivorenabwehr
S-PI-Ariz.	Protease-Inhibitor (Arizona)	Herbivorenabwehr
AS-SYS	Sytemin	Peptid Hormon
AS-XTH2	Xyloglucan-Endotransglucosylase/hydrolase	Zellwandmodifizierungen

Als Pathogene wurden hauptsächlich zwei Varietäten der verzweigten Sommerwurz (*Orobanche ramosa* L.) verwendet. Es handelte sich um eine blaublühende Form mit braun-gelblichem Spross und eine weißblühende Varietät mit tief gelbem Spross (Abb. 5). Zusätzlich wurden morphologisch ähnliche Populationen unterschiedlicher Standorte getestet. Die Samen von *O. ramosa* wurden 2002 und 2003 von infizierten Hanf- und Tabakfeldern bei Karlsruhe (Forchheim), Speyer (Sandhausen) und Offenburg (Altenheim) gesammelt. Zum Vergleich mit den einheimischen Populationen wurden zudem *O. ramosa*-Populationen aus Mongron (Sudan), Dvory (Slowakei) und Besenov (Slowakei) untersucht.

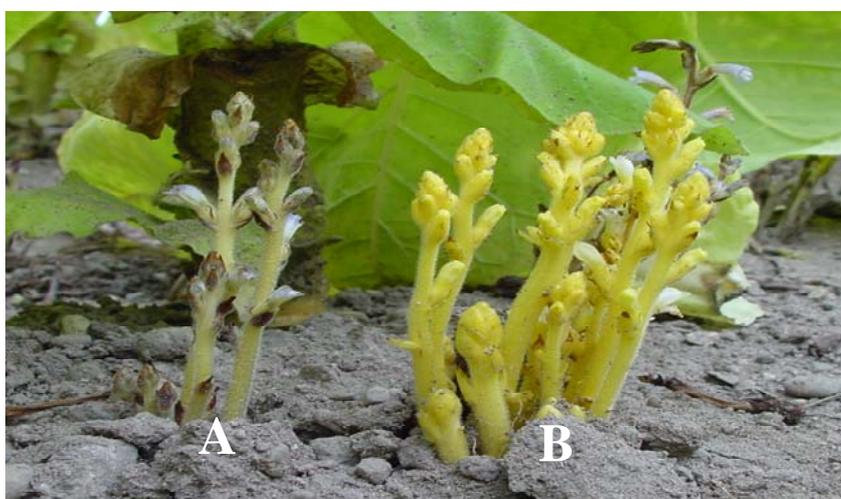


Abb. 5: Unterschiedliche Varietäten von *O. ramosa*; A: blaublühende Form, B: weißblühende Form.

2.2.2 Anzuchtbedingungen

C. sativa- und *N. tabacum*-Pflanzen wurden aus Samen auf Sand angezogen und nach 4 Wochen in 5 kg Plastiktöpfen auf einem Sand/Kompost-Gemisch (1:1, Vol/Vol) kultiviert. Zudem wurden Pflanzen in Wurzelkammern nach Linke & Vogt (1987) überführt. Topf- und Wurzelkammerexperimente fanden unter kontrollierten Gewächshausbedingungen statt. Ein 12 Stunden Lichtregime mit einer Lichtstärke von $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ wurde gewählt. Die Temperatur betrug 22-25 °C am Tag und 15-17 °C während der Nacht. Töpfe und Wurzelkammern waren an ein automatisches Bewässerungssystem angeschlossen. Die Versuchspflanzen wurden alle zwei Wochen mit 40 ml einer Düngerlösung (2 % Wuxal®) gegossen.

Die Samen der Wildtypen von *N. attenuata*, sowie dessen transgenen Linien wurden nach Krügel *et al.* (2002) zur Keimung stimuliert und anschließend in den Gewächshäusern des MPI für chemische Ökologie in Jena bei einem Tag- und Nachtrhythmus von 16/8 h auf Stendersubstrat mittlerer Struktur in 2 l Töpfen angezogen. Hier betrug die Temperatur 28 °C am Tag bei einer Lichtstärke von ebenfalls $100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ und 24 °C während der Nacht.

2.3 Geräte

Elektrophorese-Apparaturen: Bio Rad power pac 300; Mini-Protean® 3 Cell; Mini Trans-Blot® Elektrophoretic Transfer Cell Biorad, München, Deutschland; Agagel Standart, Whatman Biometra®, Göttingen.

PCR- Thermocycler: Mastercycler personal, Eppendorf AG, Hamburg.

pH-meter: mode 15 accumet® mode 15, Accumet Engineering Corporation, Hudson, USA.

Reinraumwerkbänke: BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen.

Tischzentrifuge: Biofugefresco Heraeus, Heraeus Holding GmbH, Hanau.

Gefriertruhe (-80°C): Hera freeze (Alliance), Heraeus Holding GmbH, Hanau.

Trockenschrank: Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach.

Transilluminator: Bachhofer Laboratoriumgeräte, Reutlingen.

Spektralphotometer: Perkin Elmer 552 UV-Vis Spectrometer, Perkin Elmer LAS GmbH, Rodgau-Jügesheim; Specord 50, Analytik Jena AG, Jena.

Autoklav: Hiriyama HICLAVE HV-85, Tokyo, Japan.

Rührer: MR 1000, Heidolph, Schwabach.

Vortexer: Relax top, Heidolph, Schwabach.

Thermoblock: Grant Boekel BBA, Grant Instruments, Cambridge, UK.

Fotodokumentation: Polaroid GelCam, Polaroid GmbH Offenbach; Sony DSC F 505, Sony GmbH, Köln.

Mikroskop: Stemi SV 11 + FI S, Carl Zeiss, Jena.

Waagen: AND GF- 2000; AND GR- 202, Laval LAB INC. Laval, Canada

HPLC- Analytik: Dionex UVD 340S; Dionex P 580 Pump, Dionex GmbH, Idstein.

2.4 Methoden

2.4.1 Kontamination mit *O. ramosa*-Saatgut

Den 5 Liter-Versuchstöpfen wurden 40 mg Samen von *O. ramosa* beigemischt. Dies entspricht in etwa einer Samendichte von 2000 Samen pro Liter Bodenvolumen. In den Versuchen mit transgenen Linien von *N. attenuata*, sowie in den Wurzelkammerexperimenten wurden jeweils 20 mg *O. ramosa*-Samen verwendet.

2.4.2 Applikation von Pflanzenstärkungstoffen

Pflanzenstärkungstoffe wurden erstmalig zwei Wochen nach Verpflanzung der Sämlinge in Töpfe und Wurzelkammern appliziert. Eine Wiederholung der Anwendung erfolgte jede zweite Woche. Bion® wurde in Konzentrationen von 1, 2, 5, 7, 10 und 20 mg pro Liter Boden appliziert. Eine Behandlung mit Proradix® erfolgte in Konzentrationen von 5 und 10 mg/l Boden und Goemar Fruton Spezial® wurde 2,5 %-ig appliziert. Die Pflanzenhormone Salicylsäure und Jasmonat (appliziert als Methyljasmonat) wurden in Konzentrationen von 2,5 und 5 mg/l Bodenvolumen verabreicht.

Alle applizierten Stoffe wurden in 25 ml Wasser gelöst und als Bodenapplikation angewendet. Die Lösungen wurden auf pH 8 eingestellt. Sprühversuche wurden pro Versuchspflanze mit 10 ml einer 0,025 %-igen und 0,05 %-igen Lösung des jeweiligen Resistenzinduktors durchgeführt. Es wurden jeweils Blattober- und unterseiten behandelt.

2.4.3 Auswertung der Topf- und Wurzelkammerversuche

Zwei Wochen nach Auflaufen der ersten *O. ramosa*-Sprosse wurden die Topfversuche ausgewertet. Zur Ermittlung der Befallsrate wurden die unterirdischen und die aufgelaufenen *Orobanch*e-Sprosse gezählt, sowie deren Frisch- und Trockengewichte bestimmt. Zudem wurden die Biomassen der Wirtspflanzen erfasst. Des Weiteren wurden Schäden an den Wirtspflanzen fotografisch dokumentiert. In den Wurzelkammern wurden die gekeimten *O. ramosa* Samen gezählt. Hier erfolgte eine Evaluierung des *O. ramosa* Befalls jede zweite Woche über einen Zeitraum von drei Monaten. Alle Experimente hatten sechs Parallelen und wurden zeitlich versetzt wiederholt.

2.4.4 Bestimmung der Lignin- und Phenolgehalte

Die Quantifizierung der löslichen und gebundenen Phenole erfolgte photometrisch als Gallussäureäquivalente nach der von Goldwasser *et al.* (1999) beschriebenen Methode. Hierzu wurden 0,2 g frisches Wurzelmaterial nach Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml 50 % Methanol suspendiert. Das Homogenat wurde durchmischt und bei 80 °C für 90 min extrahiert. Nach anschließender Zentrifugation (16000 g; 15 min) wurde der Überstand dekantiert und zur Bestimmung der löslichen Phenole im Kühlschrank gelagert. Das Pellet wurde in 1 ml 0,5 N Natronlauge aufgenommen und für 24 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Zur Neutralisation wurden anschließend 0,5 ml 1 N Salzsäure hinzugefügt. Nach Zentrifugation (16000 g; 15 min) wurde der Überstand dekantiert und zur Bestimmung der gebundenen Phenole verwendet. Das Pellet wurde mit 1 ml destilliertem Wasser gewaschen und anschließend bei 14000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach dreimaliger Wiederholung wurde das Pellet mit 1 ml Methanol versetzt und für 20 min bei 16000 g zentrifugiert. Nach Verwerfen des methanolischen Überstandes wurde das Pellet bei 37 °C 48 h getrocknet. Anschließend wurde das Pellet gewogen, in 0,2 ml Thioglycolsäure und 1 ml 2 N Salzsäure aufgenommen und für 4 h bei 95 °C im Thermoblock inkubiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 14000 g und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml 0,5 N Natronlauge über Nacht resuspendiert. Nach Zentrifugation (14000 g; 10 min) wurde der Überstand dekantiert und mit 0,2 ml 10 N Salzsäure versetzt. Das Pellet wurde abermals in 1 ml 0,5 N Natronlauge resuspendiert und der Ligningehalt als Lignin-Thioglycolsäure-Derivat bei 280 nm im Photometer bestimmt (Goldwasser *et al.* 1999).

2.4.5 Chromatographische und spektroskopische Untersuchungen von Sekundärmetaboliten

Wurzelproben der Wirtspflanzen sowie *O. ramosa*-Samen und -Tuberkel wurden nach Keinänen *et al.* (2001) aufgearbeitet, d.h. in flüssigem Stickstoff zermörsert und in, mit Essigsäure leicht angesäuertem, 40 % MeOH suspendiert. Das Homogenat wurde für 12 min bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert und direkt für die HPLC-Analytik verwendet oder bei -28 °C zur späteren Analyse gelagert. Die Auftrennung der Sekundärmetabolite erfolgte über eine „reversed phase“ C-18-Säule (Grom-Sil 120 ODS-5 ST; Ø 4,6 mm; Länge 150 mm; Grom Analytik und HPLC GmbH, Herrenberg) als stationäre Phase. Als flüssige Phase wurde 0,25 % H₃PO₄ und ein linearer Gradient von Acetonitril mit einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ verwendet. Die Detektion erfolgte zeitgleich unter Aufnahme der jeweiligen UV-Spektren der Einzelverbindungen mit Hilfe eines Diodenarray-Detektors bei den Wellenlängen 210, 254, 320 und 365 nm. Die verwendete HPLC-Analytik wurde den online-spektroskopischen Verfahren des Instituts für Chemie angepasst. Somit war es möglich, die analytischen Trennparameter direkt auf die vorhandene HPLC-MS- und HPLC-NMR-Analytik zu übertragen und so ohne langwierige Substanzisolierung relevante Verbindungen spektroskopisch zu bearbeiten (Spring *et al.* 1995; Vogler & Spring 2000).

Zur komparativen Analyse der Phytoalexine Scopolin und Scopoletin wurde Dünnschichtchromatographie eingesetzt. Die Auftrennung dieser Verbindungen erfolgte unter Verwendung von vorbeschichteten DC-Platten (ADAMANT UV 254; Macherey-Nagel, Düren) und einer flüssigen Phase von Chloroform, Ethylacetat und Methanol (2:2:1). Scopolin und Scopoletin wurden aufgrund ihrer UV-

Fluoreszenz detektiert. Die relativen Retentions-Zeiten wurden mit identischen Referenzen verglichen.

2.4.6 Analyse der reaktiven Sauerstoffspezies

Der *in situ* Nachweis von endogenem H_2O_2 erfolgte mit Hilfe der 3,3-Diaminobenzidin (DAB)-Uptake-Methode (Thordal-Christensen *et al.* 1997). DAB wird hierbei mit Hilfe endogener Peroxidasen in Abhängigkeit von der lokalen H_2O_2 -Konzentration zu einem rotbraunen, unlöslichen Polymer oxidiert.

Superoxidradikationen (O_2^-) wurden mit Nitroblautetrazolium (NBT) angefärbt (Auclair & Voisin 1985). Das NBT wird durch O_2^- in je Ein-Elektronen-Reduktionsschritten zum blau-violetten Formazan und weiter zu Diformazan reduziert.

2.4.7 Bestimmung der Enzymaktivitäten

2.4.7.1 Aufschluss des Pflanzenmaterials

Zur Bestimmung der *in vitro* Enzymaktivitäten wurden 0,4 g frisches Wurzelmaterial nach Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml Homogenisationspuffer (50 mM Tris-HCL pH 8,0; 5 mM Dithiothreitol (DTT); 1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF)) suspendiert. Das Homogenat wurde durchmischt und bei 16000 g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Enzymröhrchen dekantiert und anschließend bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Um den proteolytischen Abbau der Enzyme zu verhindern wurden alle Arbeitsschritte bei $0-4\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt.

2.4.7.2 Bestimmung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase-Aktivität

Die PAL-Aktivität wurde mit der von Ferrarese *et al.* (2000) beschriebenen Methode gemessen. Hierzu wurde nach Umwandlung von L-Phenylalanin zu trans-Zimtsäure durch die PAL das Reaktionsprodukt mittels HPLC quantifiziert. Zu 200 ml Wurzelextrakt wurden 10 µl einer 150 µmol wässrigen L-Phenylalanin-Lösung und 600 ml eines 100 µmol Natrium-Borat-Puffers (pH 8,7) pipettiert. Nach 1 h wurde die Reaktion durch Zugabe von 40 µl einer 5 N HCL-Lösung abgestoppt und der Gehalt an t-Zimtsäure anhand des Peakflächenvergleichs mit einer identischen Referenz bestimmt.

2.4.7.3 Bestimmung der Peroxidase-Aktivität

Die Aktivitäten der Peroxidasen wurden durch Oxidation von 3,5-Dichloro-2-hydroxybenzensulfonsäure und anschließender Komplexierung mit 4-Aminoantipyrin nach einigen Modifikationen in Anlehnung an van der Berg *et al.* (1983) und van Gestelen (1998) bei einer Wellenlänge von 510 nm spektroskopisch erfasst. Das Reaktionsgemisch setzte sich aus 100 µl 3,5-Dichloro-2-Hydroxybenzensulfonsäure (DHBS) (100 mM), 100 µl 4-Aminoantipyrin (10 mM), 30 µl Wurzelextrakt, 720 µl Kaliumphosphatpuffer pH 7 (50 mM) und 50 µl H₂O₂ (100 mM) zusammen. Die kontinuierliche Extinktionszunahme wurde über einen Zeitraum von 5 min gemessen. Als Standard wurde Meerrettich-Peroxidase verwendet.

2.4.8 Mikroskopische Untersuchungen

Histologische Untersuchungen der Wirtswurzeln sollten Aufschluss über die Lokalisierung von Abwehrsubstanzen der Wirtspflanzen gegen *O. ramosa* geben. Im Besonderen wurde die Verteilung von autofluoreszierenden, phenolischen

Verbindungen nach Befall mit *O. ramosa* am Infektionsherd untersucht. Hierzu wurde als externe Lichtquelle eine Quecksilber-Höchstdrucklampe mit einem UV-Filter der Firma Zeiss verwendet.

2.4.9 Native Gelelektrophorese

Peroxidasen wurden mittels Elektrophorese unter nicht-denaturierenden Bedingungen getrennt und mit 4-Chlor-1-Naphthol angefärbt. Hierzu wurden 0,4 g frisches Wurzelmaterial nach Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und in 1 ml Aufschlusspuffer suspendiert. Das Homogenat wurde durchmischt und bei 16000 g für 12 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Enzymröhrchen dekantiert und anschließend 10 µl des Wurzelextraktes mit 2,5 µl Aufgabepuffer vermischt und kurz zentrifugiert (4000 g, 20 s). Nach Auftragen der Proben auf ein in 400 ml Laufpuffer für 10 min vorinkubiertes, natives 10 %-iges Polyacrylamid-Gel wurde für 1,5 h eine Stromstärke von 30 mA angelegt. Anschließend wurde das Gel mit 200 ml Inkubationspuffer für 5 min vorbehandelt und dann durch 3,75 mg 4-Chlor-1-Naphthol in 20 ml des Inkubationspuffers, 5 ml Methanol und 100 µl H₂O₂ (20 %) angefärbt.

2.4.9.1 Verwendete Lösungen:

Natives Gel

2,4 ml dest. H₂O

1,5 ml Tris/HCL (pH 8,8)

2 ml 30 % Acrylamid

50 µl 10 % Ammoniumpersulfad

5 µl TEMED

Aufschlusspuffer (pH 7)

0,1 M K_2HPO_4/KH_2PO_4
5 mM Dithioerythritol (DTE)
3 mM EDTA
0,5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidone

Laufpuffer

0,19 M Glycin
12,5 mM Tris

Aufgabelösung

3 ml Glycerin
5 mg Bromphenolblau
7 ml dest. H_2O

Inkubationspuffer (pH 7)

50 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4
500 mM Na

2.4.10 SDS Gelelektrophorese und Immundetektion

Zur Isolation der Proteine wurden 0,2 g frisches Wurzelmaterial nach Zugabe von flüssigem Stickstoff gemörsert und in 0,7 ml peqGold TriFast™ homogenisiert. Nach Behandlung der Proben und Fällung der Proteine, wie im Versuchsprotokoll des Herstellers angegeben, wurde das getrocknete Protein-Pellet in 80 µl 2fach Roti®-Load2 wieder gelöst.

Zur Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde ein 15 %-iges Trenngel mit einem vorgeschalteten 3 %-igen Sammelgel verwendet, auf dem jeweils 10 µl des Proteinextraktes nach Denaturierung (5 min) bei 96°C pipettiert wurden. Die Proteine wurden bei einer angelegten Spannung von 100 Volt über einen Zeitraum von 1,5 h getrennt.

Anschließende Western-Blot-Analysen wurden mit einem kommerziellen System (Mini Trans-Blot[®] Electrophoretic Transfer Cell; Biorad, München), laut Bedienungsanleitung mit Towbin-Puffer als Elektrodenpuffer in Eiswasser durchgeführt. Proteine wurden auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Mikroporenmembran (Immobilon[™]- P Transfer Membrane; Millipore, Bedford, U.S.A) durch Elektroblotten (100 Volt , 50 min) übertragen. Die Immunodetektion erfolgte durch Antiseren gegen PAL aus Petersilie (*Petroselinum crispum* (Mill.) NYM), Chitinase und Glukanase aus Zuckerrübe (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris* var. *altissima* Döll) und einen sekundären Antikörper (Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)-AP; Biozol, Eching) durch die NBT/BCIP Methode in Anlehnung an Blake *et al.* (1984) und Eckert & Kartenbeck (1996).

2.4.10.1 Verwendete Lösungen:

Trenngel

2,4 ml dest. H₂O
2,5 ml 1,5 M Tris/HCL; pH 8,8; 0,4 % SDS
5 ml 30 % Acrylamid
50 µl 10 % Ammoniumpersulfad
5 µl TEMED

Sammelgel

6,33 ml dest. H₂O
2,5 ml 0,5 M Tris/HCL; pH 6,8; 0,4 % SDS
1,07 ml 30 % Acrylamid
100 µl 10 % Ammoniumpersulfad
10 µl TEMED

Laufpuffer

192 mM Glycin

25 mM Tris

0,1 % SDS

Towbin-Puffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

20 % MeOH

2.4.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)**2.4.11.1 Verwendetes Pflanzenmaterial**

Orobanche-Pflanzen wurden aus Saatgut unterschiedlicher Populationen der Standorte Forchheim, Sandhausen, Altenheim, Mongron (Sudan), Dvory (Slowakei) und Besenov (Slowakei) im Gewächshaus auf Tabakpflanzen der Sorte Jupiter angezogen.

2.4.11.2 DNA-Aufarbeitung

200 mg Blütenknospen von *O. ramosa* wurden in flüssigem Stickstoff gemörsert und in RNase- und DNase-freie 1 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur DNA-Isolierung aus dem Pflanzengewebe wurde das Quiagen DNeasy Plant Mini Kit verwendet. Die gewonnene DNA wurde in 100 µl TE Puffer gelöst.

Zur Quantifizierung der DNA wurde die Absorption bei 260 nm spektrophotometrisch bestimmt. 20 ng DNA in 25 µl H₂O₂ (molekularbiologischer Grad; Eppendorf AG, Hamburg) wurden mit Ready-To-Go™ PCR beads (Amersham Biosciences) und 1,5 µl des jeweiligen Primers (Tab. 3) versetzt. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler platziert. Die Amplifikation wurde durchgeführt wie folgt: 1 min bei 94 °C; 35 Zyklen je 1 min mit dem

spezifischen Temperaturregime der verwendeten Primer (Tab. 3); 4 min bei 72 °C und schließlich 10 min bei 72 °C. Das PCR-Produkt wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tab. 3: Liste der verwendeten Primer mit deren Oligo-Sequenzen (5'→3'), sowie die verwendeten Annealing-Temperaturen bei der DNA-Amplifikation.

Primer	Oligo Sequenz (5'→3')	Annealing Temperatur (°C)
A4	GAC AGA CAG ACA GAC A	43
A5	GAT AGA TAG ATA GAT A	43
A6	CAC ACA CAC ACA RG	53
A7	CTC CTC CTC CTC RC	53
A9	CAC ACA CAC ACA AC	52
B1	GTG GTG GTG GC	52
B4	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	58

2.4.11.3 DNA-Auftrennung

Nach Zugabe von 5 µl Roti- Load- DNA Ladepuffer wurden die PCR-Produkte im 3 %-igen Agarosegel (Agarose Resophor, Eurobio, Les Ulis, Frankreich) aufgetrennt. Das Agarosegel wurde mit 1 x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer hergestellt, welcher ebenfalls Verwendung als Laufpuffer fand. Nach 3 h bei einer Spannung von 50 V wurde das Gel in 50 ml TBE-Puffer mit 100 µl Ethidiumbromid angefärbt und das DNA-Bandenmuster bei einer Wellenlänge von 312 nm auf dem Transilluminator fotografisch dokumentiert. Als DNA-Leiter wurde der pBR 328 Mix I der Firma Carl Roth GmbH, Karlsruhe, verwendet.

2.4.12 Keimungstest

Zur Evaluierung der Keimfähigkeit von *O. ramosa* wurden die Samen zunächst oberflächensterilisiert, d. h. in 10 ml einer 0,1 % Tween und 1 % NaOCl-Lösung

für 2 min im Ultraschallbad gewaschen. Anschließend wurden die Samen dreimal mit sterilem Wasser gereinigt und ca. 500-1000 Samen auf sterile angefeuchtete Glasfaserfilterpapiere (Sartorius AG, Göttingen) in Petrischalen überführt und mit Parafilm luftdicht abgeschlossen. Nach einwöchiger Vorkonditionierung im Dunkeln bei 25 °C wurde 1 ml des synthetischen Strigol-Analogons GR 24 als Keimstimulanz in Konzentrationen von 0,1; 0,01; 0,001; und 0,0001 ppm zu den vorkonditionierten Samen appliziert. Die Petrischalen wurden wieder mit Parafilm abgedichtet und für eine weitere Woche im Dunkeln bei 25 °C gelagert. Anschließend wurden die gekeimten Samen unter dem Binokular gezählt und die Keimungsrate bestimmt. Zur Untersuchung der Wirkung der Elicitoren und bestimmter Sekundärmetabolite wurden diese in folgenden Mengen dem Keimstimulanz beigemischt: 1 mg Bion®; 2 mg Proradix®; 25 µl Fruton®; 0,001; 0,01; 0,1 und 1 mg Nikotin, Chlorogensäure und Scopoletin; 0,1 mg Scopolin.

2.5 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten waren nicht normal verteilt und wurden daher mit dem Mann-Whitney-Test auf statistische Unterschiede geprüft ($p \leq 0,05$). Hierzu wurde das Statistikpaket Minitab 13 (Minitab Inc.) verwendet.

Cluster-Analysen zur Ermittlung der Unterschiede der Befallsraten von *O. ramosa* auf den transgenen Tabaklinien wurden mit dem Programm PAST (Hammer *et al.* 2001) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Genetische Variabilität von *O. ramosa*

Zur Erfassung, ob es sich in Deutschland um eine einheitliche *O. ramosa*-Population handelt oder ob es sich um verschiedene Pathotypen handelt, wurde zunächst die genetische Variabilität von *O. ramosa* durch die DNA-Fingerprintmethode der Inter Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction (ISSR-PCR) untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass aus einer Reihe von 7 getesteten Primern (Tab. 3, siehe 2.4.11.2) der Primer (CTC)₄RC am besten zur Beschreibung von *O. ramosa* Populationen geeignet ist. *O. ramosa*-Populationen von deutschen Standorten zeigten neben morphologischen Unterschieden in der Blüten- und Stängelfarbe (Abb. 6) klare Unterschiede in ihren Amplifikationsmustern (Abb. 7).

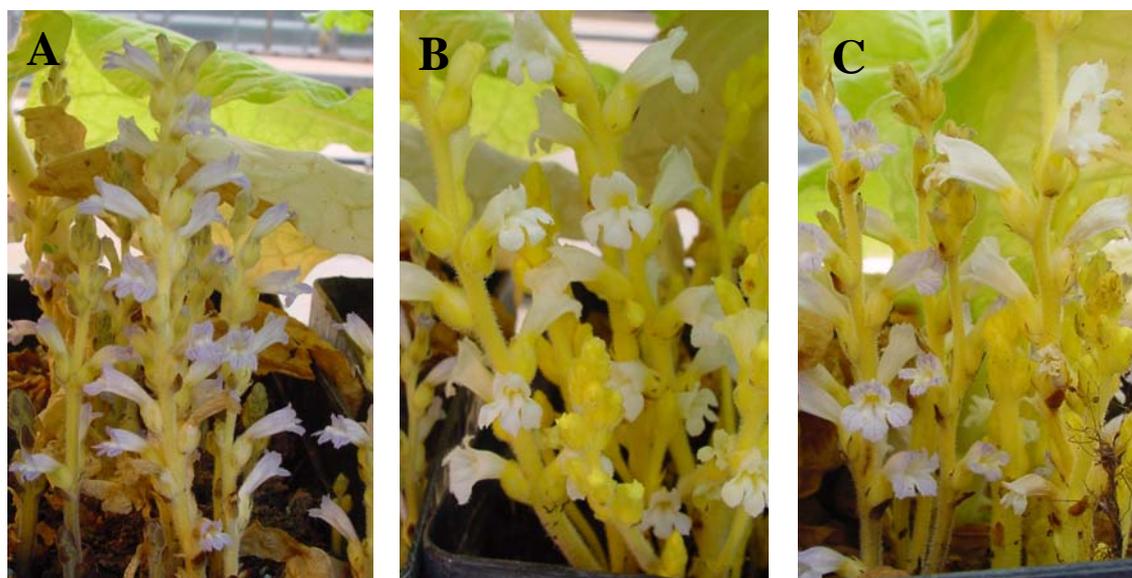


Abb. 6: *O. ramosa*-Populationen unterschiedlicher Standorte; A = Forchheim, B = Altenheim, C = Sandhausen.

Zwischen den PCR-Produkten der Forchheimer und der Sandhausener Population konnten 8 Polymorphismen festgestellt werden. *O. ramosa* aus Altenheim hingegen wies nur 4 Unterschiede im DNA-Bandenmuster gegenüber

der Population aus Forchheim auf, während 7 Abweichungen zwischen der Sandhausener und der Altenheimer Population detektiert wurden. Die geringsten Unterschiede zeigte die Forchheimer *O. ramosa*-Population gegenüber den beiden slowakischen Populationen, mit jeweils nur einem signifikanten Bandenunterschied. *O. ramosa* sudanesischer Herkunft hingegen hatte nur eine geringe Ähnlichkeit zu den anderen getesteten Populationen.

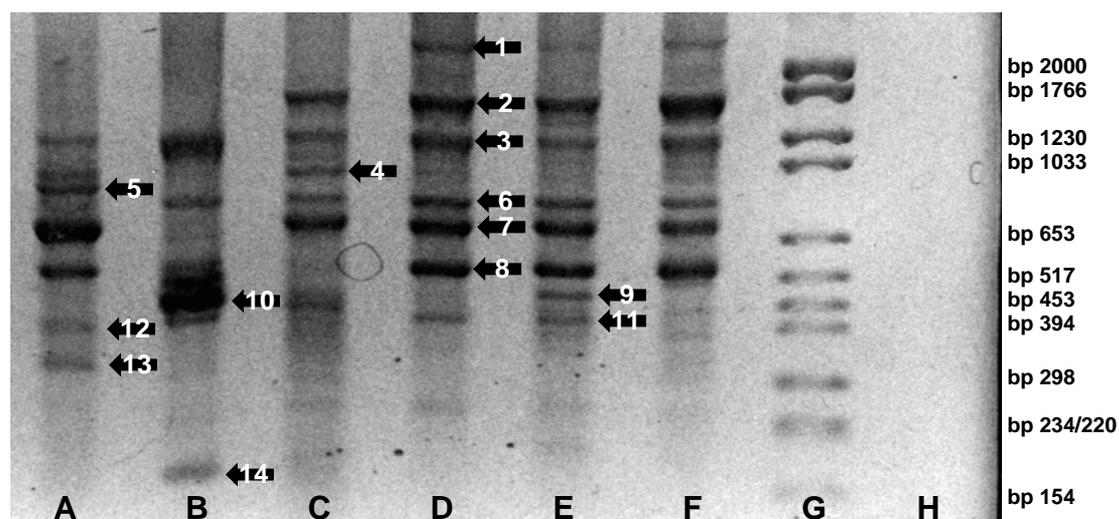


Abb. 7: Intraspezifische Unterschiede im DNA-Bandenmuster (Pfeile markieren von einander verschiedene Banden) von *O. ramosa*- Populationen nach ISSR-PCR mit dem Primer $(CTC)_4RC$. A = Sandhausen (Deutschland), B = Mongron (Sudan), C = Altenheim (Deutschland), D = Forchheim (Deutschland), E = Besenov (Slowakei), F = Dvory (Slowakei), G = Leiter, H = Reinstwasser.

3.2 Untersuchungen der Pathogenitätsfaktoren von *O. ramosa*

3.2.1 Sekundärmetabolite

Zur Klärung der Pathogenitätsfaktoren von *O. ramosa* wurden hochdruckflüssigkeits-chromatographische (HPLC) und massenspektroskopische (MS) Untersuchungen von Extrakten aus gekeimten und ungekeimten Samen, sowie aus Tuberkeln des Parasiten durchgeführt. Zwei Hauptverbindungen konnten anhand von HPLC-MS- und HPLC-UV/Vis-Analysen identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um die Phenylpropanoid-Glycoside Oraposid und

Verbascosid (Tab. 4; Abb. 8). Die UV- Spektren der Referenzen sind im Anhang abgebildet.

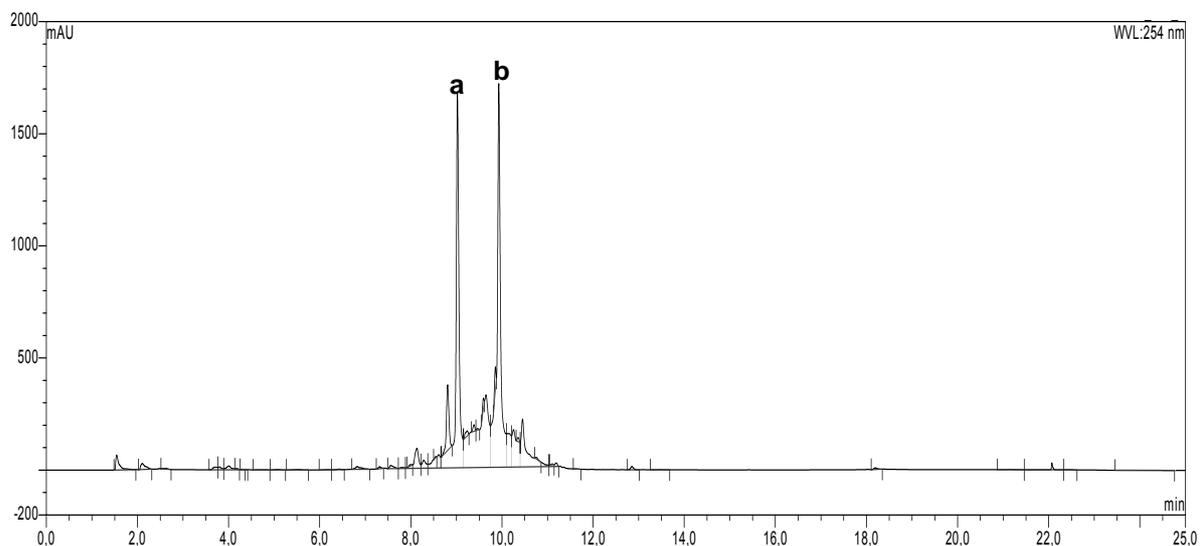


Abb. 8: HPLC-Chromatogramm von methanolischem Extrakt aus 1 µg *O. ramosa*-Tuberkel, erfasst bei einer Wellenlänge von 254 nm. Benannt sind die bekannten Verbindungen: (a) Verbascosid, (b) Oraposid.

Tab. 4: Massen- und UV-spektroskopische Daten der Phenylpropanoide Verbascosid und Oraposid aus *O. ramosa* anhand von HPLC- MS und HPLC-UV/Vis Analysen.

Verbindung	molekulare Formel	Masse (rel. Intensität)	Fragmente (rel. Intensität)	UV _{max} (50% CH ₃ CN)
Verbascosid (Acetosid)	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623 (100) [M – H] ⁺	477 (12), 383 (13), 325 (25)	219, 247, 286, 327
Oraposid (Crenatosid)	C ₂₉ H ₃₄ O ₁₅	621 (10) [M – H] ⁺	681 (30), [M + H ₃ C- COO] ⁺ , 475 (5), 383 (17), 323 (30)	220, 235, 247, 285, 327

Zur Quantifizierung von Verbascosid und Oraposid wurden identische Referenzen verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass sich während der Entwicklung von *O. ramosa* die Phenylpropanoide Verbascosid und Oraposid

akkumulieren. Zudem wurde ein Anstieg der löslichen und gebundenen Phenole gemessen (Tab. 5).

Tab. 5: Konzentrationen an löslichen und gebundenen Phenolen (angegeben als Gallussäure-Äquivalente), sowie der Phenylpropanoid-Glycoside Verbascosid und Oroposid in Entwicklungsstadien von *O. ramosa* (MW \pm STABW; n = 6).

	Samen	gekeimte Samen	Tuberkel
Verbacosid [mg/g FG]	0,02 \pm 0,14	0,23 \pm 0,22	0,99 \pm 0,13
Oroposid [mg/g FG]	0,07 \pm 0,01	0,37 \pm 0,03	1,07 \pm 0,43
lösliche Phenole [mg GAE/g FG]	0,89 \pm 0,09	1,02 \pm 0,09	9,60 \pm 1,31
gebundene Phenole [mg GAE/g FG]	1,55 \pm 0,71	1,79 \pm 0,79	4,01 \pm 0,74

3.2.2 Reaktive Sauerstoffintermediate

Während der Entwicklung von *O. ramosa* fand eine Akkumulation an reaktiven Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Intermediate, ROI) statt. Es konnte gezeigt werden, dass sich sowohl H_2O_2 als auch O_2^- in Tuberkeln von *O. ramosa* anreichern (Abb. 9).



Abb. 9: Mikroskopische Untersuchungen von *O. ramosa*-Tuberkeln zur Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies. A: Anfärbung von endogenen H_2O_2 durch Diaminobenzidin (DAB)-Aufnahme; B: Anfärbung von O_2^- mit Nitroblautetrazolium (NBT); C: ohne Anfärbung.

3.2.3 Peroxidase-Aktivität

Im Zusammenhang mit einer verstärkten Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies (ROIs) konnte eine starke Peroxidase Aktivität in den Tuberkeln gemessen werden, die 4 bis 8fach höher war als die Aktivität in den Wurzeln der Wirte von *O. ramosa* (Tab. 6 und Tab. 10).

Tab. 6: Peroxidase-Aktivität in Entwicklungsstadien von *O. ramosa*. Als Standard wurde Meerrettich-Peroxidase verwendet (MW \pm STABW; n = 6).

	Peroxidase-Aktivität (units/g FG)
Samen	-----
gekeimte Samen	3,69 \pm 4,06
Tuberkel	81,23 \pm 9,12

3. 3 Suszeptibilität verschiedener Tabaksorten gegenüber *O. ramosa*

Zur Evaluierung natürlicher Resistenzen wurden verschiedene Sorten von Tabak auf ihre Anfälligkeit gegenüber *O. ramosa* untersucht. Der Vergleich von wenig anfälligen mit hoch anfälligen Sorten sollte dann die Untersuchung der biochemischen Resistenzmechanismen ermöglichen.

In den Versuchen wurden die Burley-Tabake HyB 2, B 971 und B O11, die Virgin-Tabake Helena, HyV 8 und Golta und die DLT-Tabake Z 992, Adonis und badischer Geudertheimer, sowie zwei *O. ramosa*-Populationen verwendet. Hierbei handelte es sich um eine *O. ramosa*-Population von Tabakfeldern bei Speyer (Sandhausen) und eine Population von Tabakfeldern bei Karlsruhe (Forchheim).

Bei diesen Versuchen konnten keine absolut resistenten Tabaksorten ermittelt werden. Jedoch zeigte sich, dass die Tabaksorten unterschiedlich stark von *O. ramosa* befallen wurden. Zudem zeigten die *O. ramosa*-Populationen

unterschiedliche Befallsintensitäten (Abb. 10 und 11). Die *O. ramosa*-Population aus Speyer verursachte im Vergleich zu der Population aus Karlsruhe einen durchschnittlich um 63 % geringeren Befall. Am stärksten wurden die Virgin-Tabake von beiden *O. ramosa* Populationen parasitiert, während die DLT-Sorten am wenigsten anfällig waren.

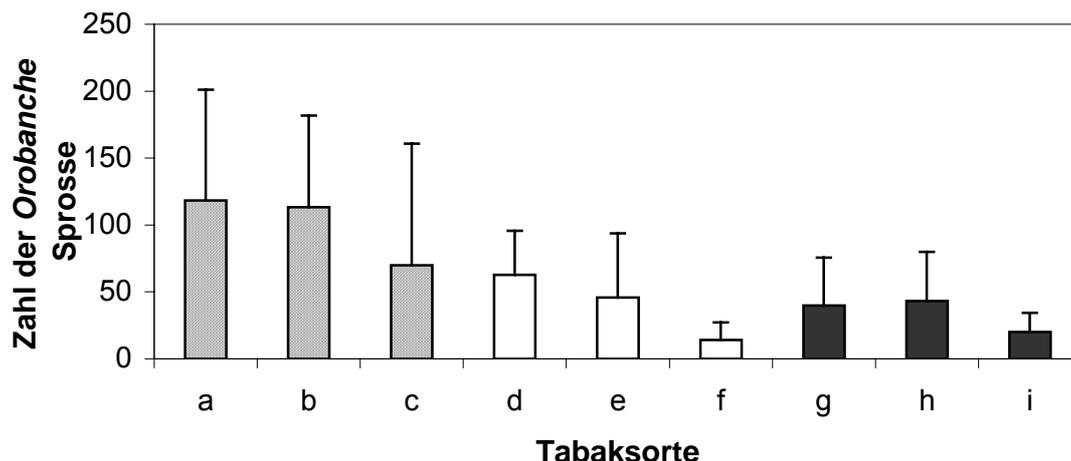


Abb. 10: Zahl der Sprosse von *O. ramosa* (Population aus Karlsruhe) auf verschiedenen Sorten von *N. tabacum*. a-c: Virgin-Tabake (Helena, HyV 8, Golta); d-f: Burley-Tabake (HyB 2, B 971, B 011); g-i: DLT-Tabake (Z 992, Adonis, badischer Geudertheimer); (MW ± STABW; n = 6).

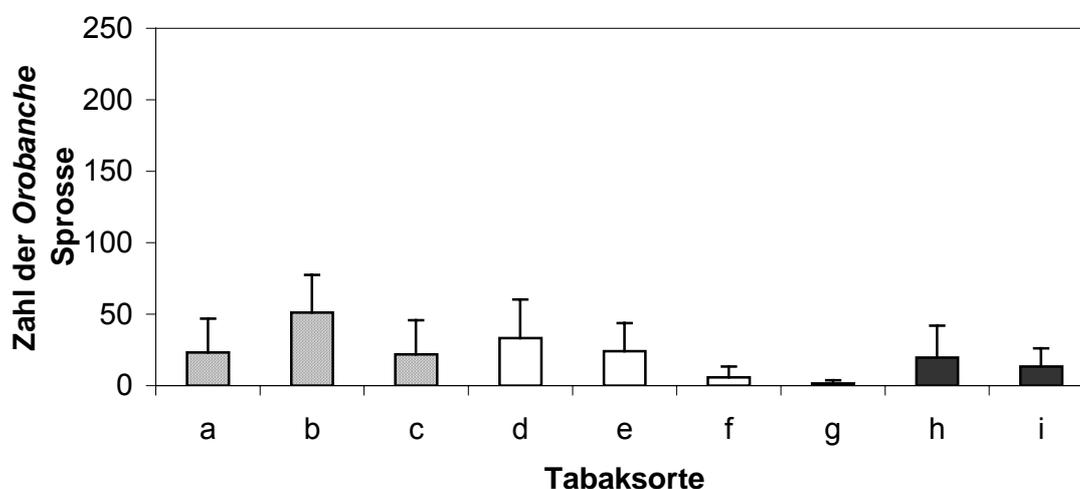


Abb. 11: Zahl der Sprosse von *O. ramosa* (Population aus Speyer) auf verschiedenen Sorten von *N. tabacum*. a-c: Virgin-Tabake (Helena, HyV 8, Golta); d-f: Burley-Tabake (HyB 2, B 971, B 011); g-i: DLT-Tabake (Z 992, Adonis, badischer Geudertheimer); (MW ± STABW; n = 6).

Im Vergleich der Trockenmassen von *O. ramosa* zeigte sich, dass es trotz der unterschiedlichen Befallsraten zu einer vergleichbaren Biomasseproduktion der

O. ramosa-Populationen aus Speyer und Karlsruhe kam (Abb. 12). Von den gewählten Tabaksorten bildeten die *O. ramosa*-Populationen auf der Burley-Sorte B 971 und der DLT-Sorte Z 992 am wenigsten Biomasse, während *O. ramosa*, die an der Virgin-Sorte HyV 8 wuchs, das höchste Trockengewicht aufwies (Abb. 12).

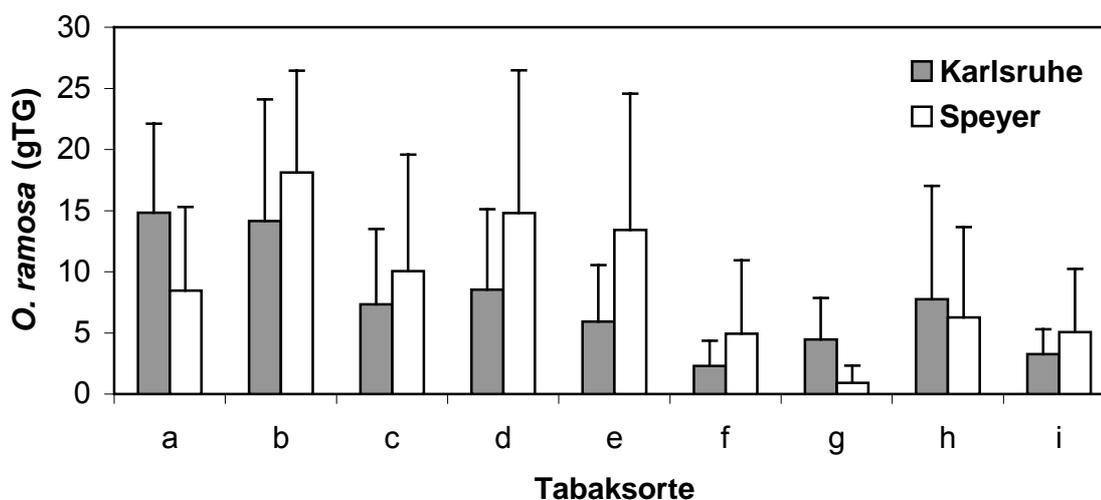


Abb. 12: Biomasseproduktion von *O. ramosa*-Populationen der Standorte Karlsruhe und Speyer auf verschiedenen Sorten von *N. tabacum*. a-c: Virgin-Tabake (Helena, HyV 8, Golta); d-f: Burley-Tabake (HyB 2, B 971, B 011); g-i: DLT-Tabake (Z 992, Adonis, badischer Geudertheimer); (MW \pm STABW; n = 6).

Im Vergleich der Biomassen von befallenen mit nichtbefallenen Tabakpflanzen zeigte sich, dass die Virgin- und Burley-Tabake am stärksten geschädigt wurden. So zeigte z. B. die Burley-Sorte B 971 Biomasseverluste von bis zu 50 % (Abb. 13). Die DLT-Tabaksorten Z 992 und badischer Geudertheimer wurden durch den *O. ramosa* Befall am wenigsten geschädigt.

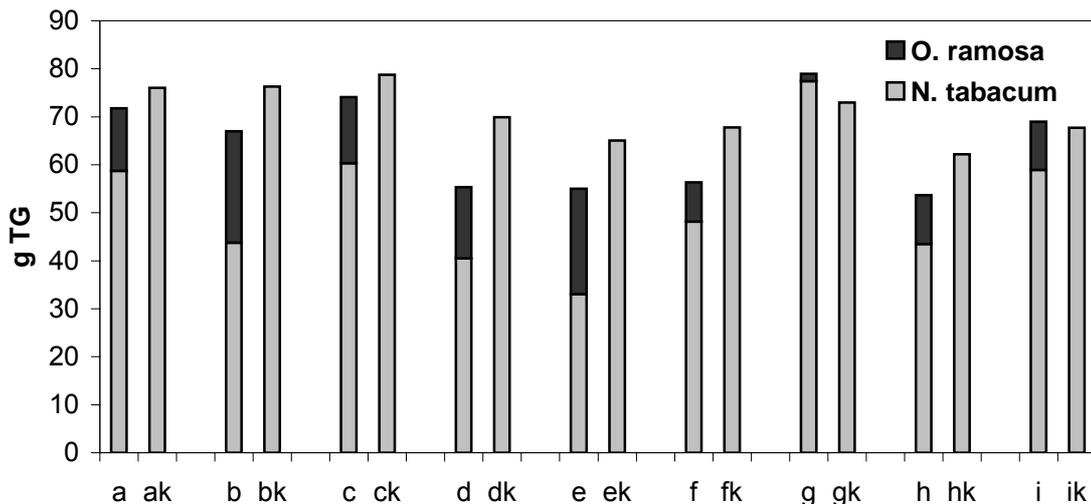


Abb. 13: Biomasseproduktion von *N. tabacum*-Sorten mit und ohne *O. ramosa*-Befall. a-c: Virgin-Tabake (Helena, HyV 8, Golta); d-f: Burley-Tabake (HyB 2, B 971, B 911); g-i: DLT-Tabake (Z 992, Adonis, badischer Geudertheimer); k = Kontrolle (MW; n = 6).

3.3.1 Wurzelkammerexperimente

Zur genaueren Beobachtung des Infektionsverlaufs von *O. ramosa*, sowie zur Erforschung der natürlichen Resistenzmechanismen, wurden die anfällige Virgin-Sorte HyV 8 und die wenig anfällige DLT-Sorte Z 992 für weitere Studien in Wurzelkammern angezogen und mit *O. ramosa* infiziert (Abb. 14). Es konnte gezeigt werden, dass es bei beiden Sorten zur Keimung von *O. ramosa* kommt. Bei Z 992 konnte eine um durchschnittlich 63 % geringere Appressorienbildung und eine um 79 % verringerte Tuberkelbildung gegenüber HyV8 beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine Verbräunung von Tuberkeln in den mit Z 992 besetzten Wurzelkammern.



Abb. 14: Vergleich der Tabaksorten Z 992 (rechts) und HyV 8 (links) hinsichtlich des Befalls mit *O. ramosa*.

Tab. 7: Entwicklung von *O. ramosa* auf den Tabaksorten HyV 8 und Z 992 (MW \pm STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Tabaksorte HyV 8).

	HyV 8	Z 992
Gekeimt (%)	72,7 \pm 21,6	69,4 \pm 23,1
Appressorium	65,3 \pm 42,4	24,1 \pm 16,1 *
Tuberkel	37 \pm 21,1	7,7 \pm 10,9 *

3.4 Evaluierung von Resistenzinduktoren gegen *O. ramosa*

Um zu klären, ob eine Resistenz gegen *O. ramosa* induziert werden kann wurden verschiedene Pflanzenstärkungsmittel untersucht.

Als Resistenzinduktor gegen *O. ramosa* wurde zunächst der Pflanzenstärkungsmittel Bion® (benzo [1,2,3] thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH)) getestet. Es zeigte sich, dass der Befall durch *O. ramosa* bei einer Aufwandmenge von 5 mg/l Boden um bis zu 95 % reduziert werden kann (Abb. 15). Zunächst erfolgte die Applikation von Bion® zwei Wochen nach dem Auspflanzen der Wirtspflanzen in die Versuchstöpfe. Dies bewirkte jedoch

Biomasseverluste bei den Wirtspflanzen. Deshalb wurde die erste Applikation von Bion® bei den folgenden Versuchen um eine Woche verzögert durchgeführt. Konzentrationen über 5 mg Bion® pro Liter Boden bewirkten eine Reduktion der Biomasse der Wirtspflanzen (Abb. 16).

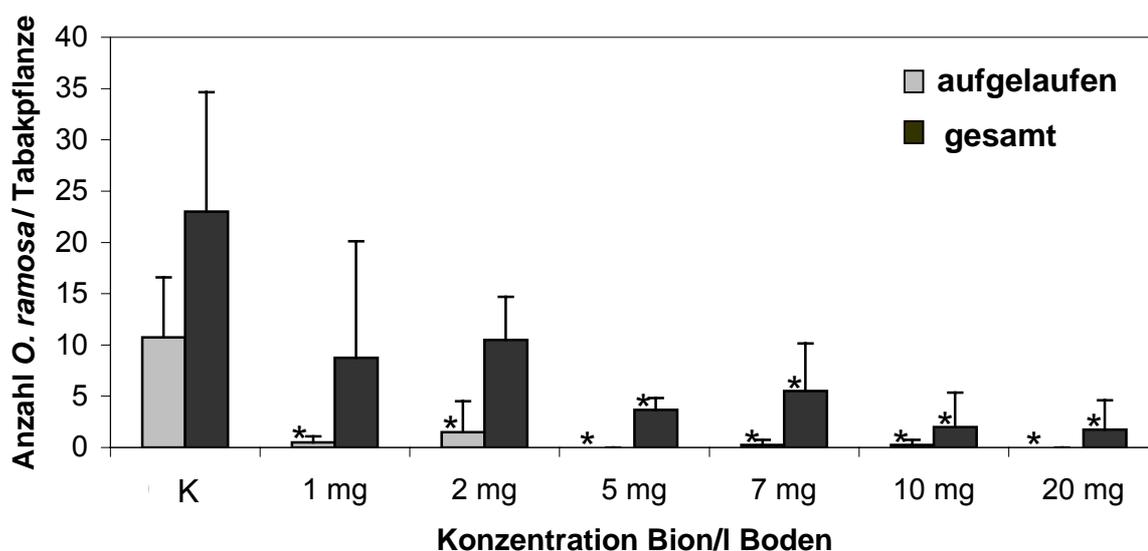


Abb. 15: *O. ramosa*-Befall an Tabak (Jupiter) nach Behandlung mit dem Pflanzenstärkungsmittel Bion® in verschiedenen Konzentrationen (MW ± STABW; n = 5; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K), $p \leq 0,05$).

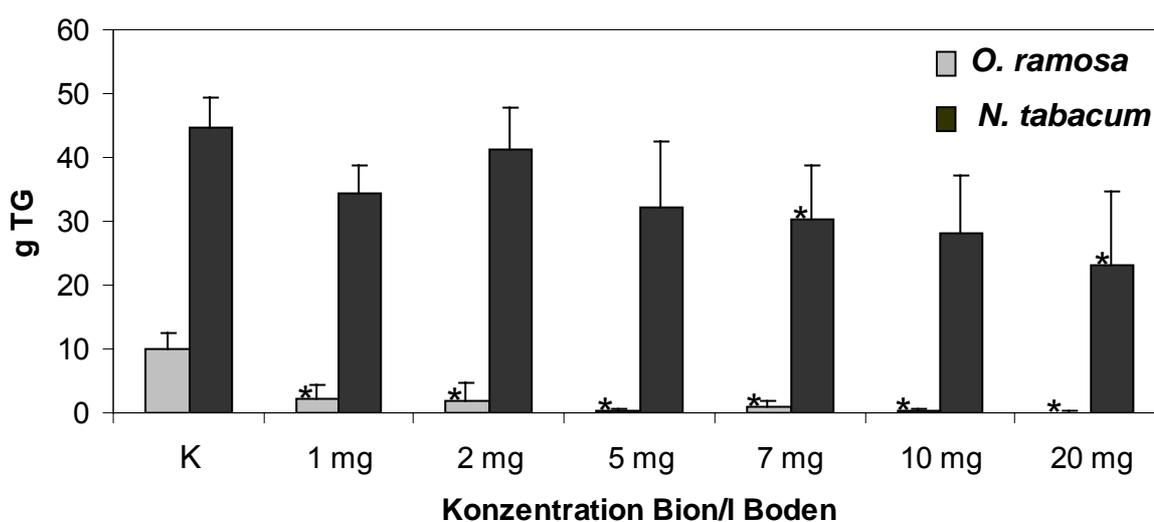


Abb. 16: Biomasseproduktion von *O. ramosa* und Tabak nach Behandlung mit dem Pflanzenstärkungsmittel Bion® in verschiedenen Konzentrationen (MW ± STABW; n = 5; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K), $p \leq 0,05$).

Zur Kontrolle von *O. ramosa* wurden neben Bion® weitere Pflanzenstärkungsmittel getestet. Es erwies sich, dass auch Proradix® und Coemar Fruton Spezial® (Fruton) den Befall mit *O. ramosa* in Hanf und Tabak signifikant reduzierten. Im Vergleich zur Kontrolle wurde die durchschnittliche Anzahl von *Orobanch*e-Sprossen an Hanfwurzeln um 80 % nach Proradix® (10 mg/l Boden), 84 % nach Fruton® (25 ml, 2,5 %) und 91,6 % nach Bion® (5 mg/l Boden)-Applikation reduziert (Abb. 17). In Tabakkulturen zeigten die Pflanzenstärkungsmittel geringere Effektivität. Es wurde eine Reduktion des *Orobanch*e-Befalls von 35,5 % bei mit Proradix® behandelten, 37 % bei mit Fruton® behandelten und 71 % bei mit Bion® behandelten Tabakpflanzen gemessen (Abb. 17).

In Experimenten mit einer um die Hälfte reduzierten Samendichte (1000 Samen pro Liter Boden) konnte der *O. ramosa*-Befall mit Proradix® um 80 % und mit Bion® um 98 % reduziert werden (Tab. 8).

Nach Applikation von 25 ml pro Versuchspflanze einer 2,5 %-igen Fruton®-Lösung wurden Chlorosen an den Hanfblättern beobachtet. Vergleichbare phytotoxische Effekte zeigten sich auch bei Tabakpflanzen. Im Gegensatz dazu zeigten die Anwendungen von Bion® und Proradix® keinen phytotoxischen Effekt auf die verwendeten Hanf- und Tabaksorten. Nach keiner Behandlung mit einem der Pflanzenstärkungsmittel konnte eine signifikante Abnahme der Wirtsbiomassen beobachtet werden (Abb. 18).

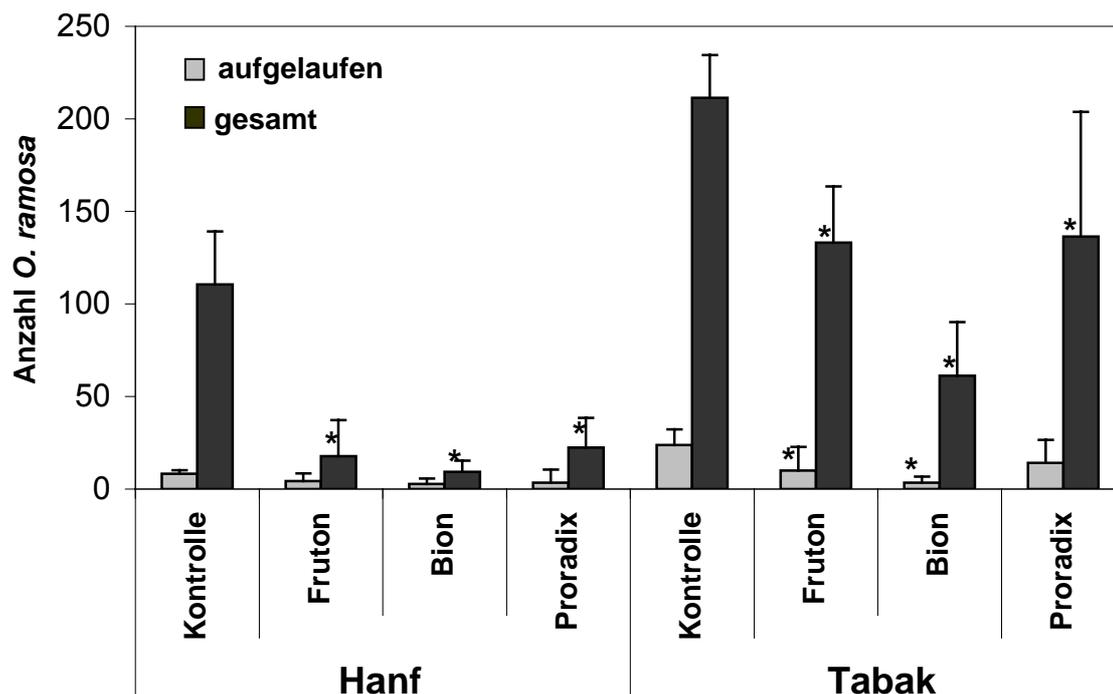


Fig. 17: Durchschnittliche Anzahl der Orobanche-Sprosse pro Hanf- (Sorte Felina 34) und Tabakpflanze (Sorte Jupiter) nach Bodenapplikation von Fruton®, Bion® und Proradix®. Eine Samendichte von 2000 *O. ramosa*-Samen pro Liter Boden wurde verwendet. (MW \pm STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$).

Tab. 8: Durchschnittliche Anzahl der Orobanche-Sprosse und deren Trockengewicht (g) pro Wirtspflanze, geerntet von unbehandelten, Bion®-behandelten und Proradix®-behandelten Tabakpflanzen (Sorte Jupiter). Eine Samendichte von 1000 *O. ramosa*-Samen pro Liter Boden wurde verwendet. (MW \pm STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$).

<i>O. ramosa</i>		
	Anzahl	Trockengewicht (g)
Kontrolle	47 \pm 20,8	16,4 \pm 7,6
Proradix®	11 \pm 11 *	3,4 \pm 5,0 *
Bion®	3,6 \pm 1,2 *	0,25 \pm 0,3 *

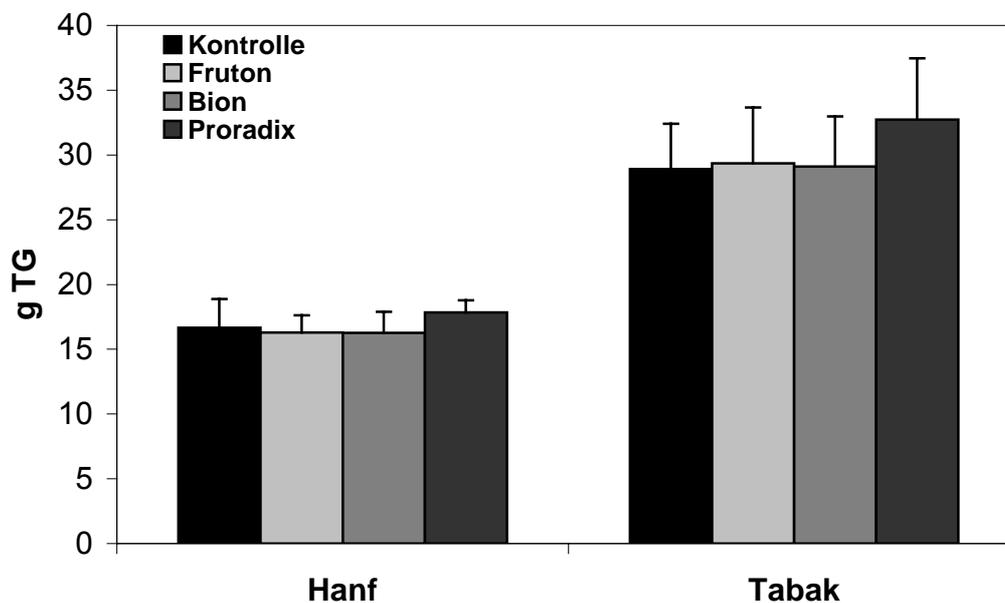


Abb. 18: Biomasseproduktion (g Trockengewicht) der Hanfsorte Felina 34 und der Tabaksorte Jupiter nach Proradix®, Fruton®- und Bion®-Behandlung (MW ± STABW; n = 6).

3.5 Einfluss von Phytohormonen auf den Befall mit *O. ramosa*

Zur genaueren Betrachtung der systemisch induzierten Resistenzen wurde der Einfluss der dafür relevanten Phytohormone Salicylsäure (SA) und Jasmonat (JA) auf den Befall mit *O. ramosa* an Tabak (Sorte Jupiter) untersucht. SA und JA wurden jeweils als Boden- und Sprühapplikation den Tabakpflanzen verabreicht. Es konnte gezeigt werden, dass der Befall mit *O. ramosa* nach SA- und JA-Applikation signifikant abnahm. Die Sprühapplikation von JA zeigte eine bis zu 80 % bessere Reduktion des *O. ramosa*-Befalls als die Bodenapplikation. Bei SA-Behandlung zeigte sich kein Unterschied zwischen Sprüh- und Bodenapplikation (Abb. 19).

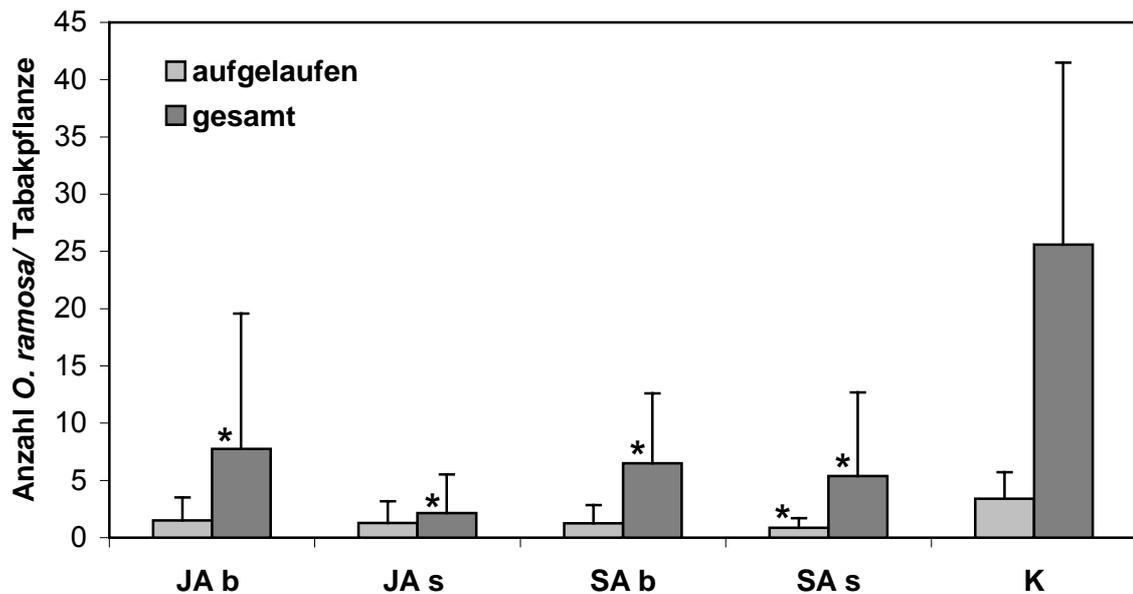


Abb. 19: Einfluss von Salicylsäure (SA) und Methyljasmonat (JA) auf den Befall von Tabak mit *O. ramosa* nach 25 ml Boden- (b) und 10 ml Sprühapplikation (s) pro Versuchspflanze. Jasmonat und Salicylsäure wurden in Konzentrationen von 500 ppm appliziert (MW \pm STABW; n = 8; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K), $p \leq 0,05$).

Bei SA-behandelten Tabakpflanzen zeigte sich eine im Durchschnitt höhere Biomasseproduktion als bei JA-behandelten. Bei den mit den Hormonen JA und SA behandelten Pflanzen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede der Biomassen im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb. 20).

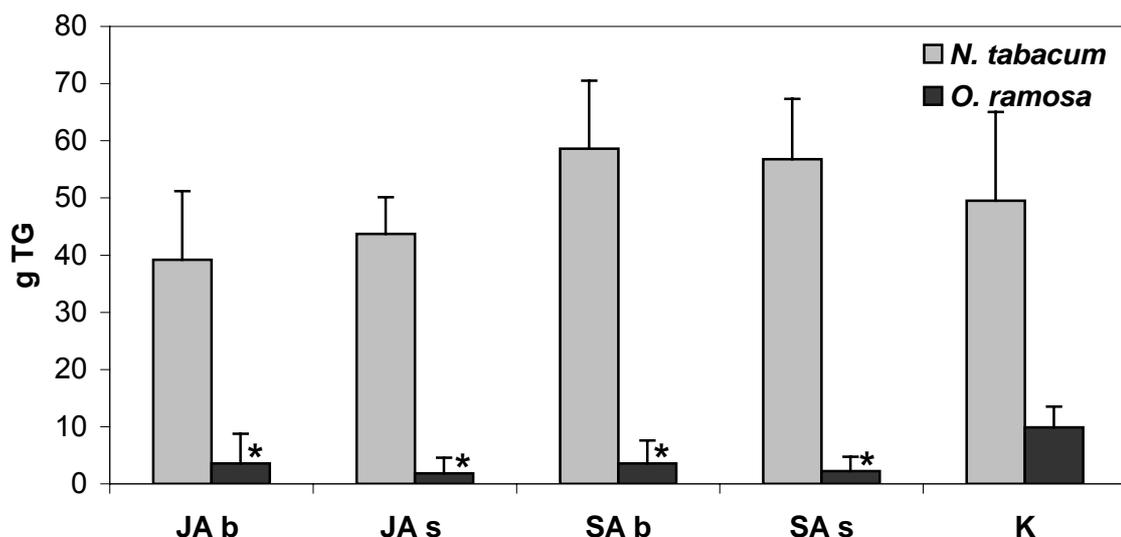


Abb. 20: Einfluss von Salicylsäure (SA) und Methyljasmonat (JA) auf die Biomassen von *O. ramosa* und Tabak nach 25 ml Boden- (b) und 10 ml Sprühapplikation (s) pro Versuchspflanze. Jasmonat und Salicylsäure wurden in Konzentrationen von 500 ppm appliziert (MW \pm STABW; n = 8; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K), $p \leq 0,05$).

3.6 Biochemische Mechanismen der Resistenz gegen *O. ramosa*

Zur Klärung natürlicher Resistenzmechanismen wurde die anfällige Sorte HyV 8 mit der kaum befallenen Sorte Z 992 verglichen. Untersuchungen zu induzierten Abwehrmechanismen wurden mit der in Deutschland vornehmlich kultivierten Tabaksorte Jupiter durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass ähnliche metabolische Aktivitäten in infizierten, in mit Resistenzinduktoren behandelten und in kaum gegen *O. ramosa* anfälligem Tabak zu finden sind.

3.6.1 Phenole

Messungen der Phenolkonzentrationen zeigten (Tab. 9), dass es sowohl in Bion®-behandelten als auch in infizierten Tabakpflanzen zu einer Anreicherung von phenolischen Verbindungen in der Wirtswurzel kommt. Die von *O. ramosa* wenig parasitierte Tabaksorte Z 992 wies im Vergleich zu der anfälligen

Tabaksorte HyV 8 ebenfalls höhere Phenolkonzentrationen auf. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Ligninkonzentration gemessen werden (Tab. 9).

Tab. 9: Konzentrationen an löslichen und gebundenen Phenolen (angegeben als Gallussäure-Äquivalente), sowie an Lignin in Tabakwurzeln (MW \pm STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$).

<i>N. tabacum</i> (Wurzeln)	lösliche Phenole (mg GAE/g FG)	gebundene Phenole (mg GAE/g FG)	Lignin (μ g/g FG)
Jupiter (Kontrolle)	0,69 \pm 0,12	0,39 \pm 0,09	264 \pm 59
Jupiter (Bion behandelt)	0,91 \pm 0,15 *	0,49 \pm 0,11	289 \pm 64
Jupiter (<i>O. ramosa</i> infiziert)	1 \pm 0,17 *	0,61 \pm 0,16 *	257 \pm 38
HyV 8 (anfällig)	0,72 \pm 0,15	0,30 \pm 0,17	244 \pm 43
Z 992 (tolerant)	1,47 \pm 0,47 *	0,59 \pm 0,25 *	268 \pm 69

3.6.2 Akkumulation von Sekundärmetaboliten an der Eintrittsstelle von *O. ramosa* in den Wirt

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass es zu einer Akkumulation von noch nicht identifizierten Verbindungen in der Wirtswurzel am Ort der Penetration von *O. ramosa* kommt, welche eine starke bläuliche Eigenfluoreszenz im UV-Licht aufwies (Abb. 21). Weiterführende Untersuchungen von *O. ramosa*-infizierten Tabakwurzeln zeigten, dass deren phenolische Extrakte ebenfalls eine bläuliche Fluoreszenz hatten. Ligninaufschlüsse aus Tabakwurzeln zeigten eine grünliche Fluoreszenz (Abb. 22).

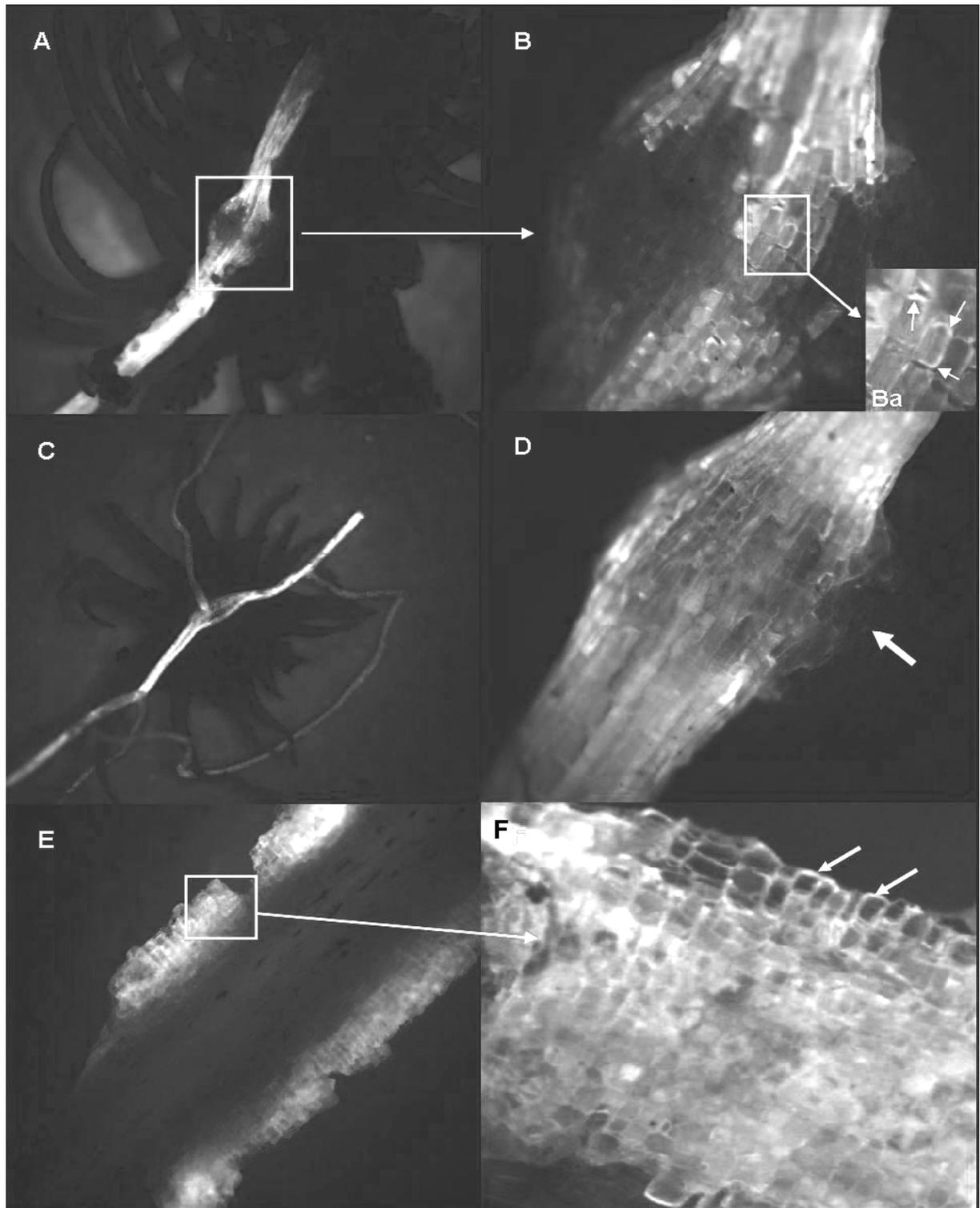


Abb. 21: Akkumulation von in UV-Licht autofluoreszierenden Verbindungen in Tabakwurzeln nach Befall mit *O. ramosa*. A,B,C,D: Mit *O. ramosa* (schwarz im Hintergrund) befallene Tabakwurzeln; E: Querschnitt durch eine mit *O. ramosa* befallene Tabakwurzel; F, Ba: Zellwandnahe Anreicherung von Sekundärmetaboliten.

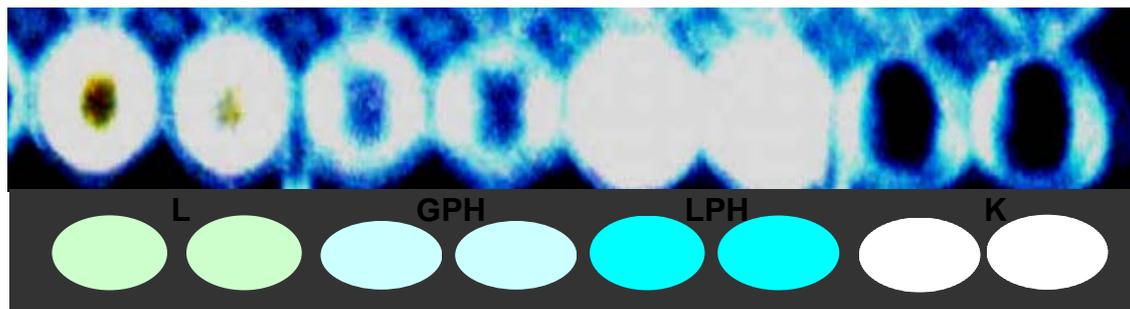


Abb. 22: UV-Autofluoreszenz von Phenol- und Ligninextrakten aus Tabakwurzeln (je heller die Flächen, desto stärker war die gemessene Fluoreszenz). Im unteren Bildteil sind die Farben dargestellt, wie sie bei einer Wellenlänge von 266 nm zu sehen waren. L: Lignin; GPH: gebundene Phenole; LPH: lösliche Phenole; K: Kontrolle (40 % Methanol).

3.6.3 Sekundärmetabolite der Wirtswurzel

Zur genaueren Bestimmung der bei der Pathogenabwehr gebildeten Sekundärmetabolite wurden HPLC-analytische Untersuchungen von Extrakten aus Tabakwurzeln durchgeführt. Drei Verbindungen zeigten signifikante Veränderungen im Zusammenhang mit der Anfälligkeit von Tabak gegen *O. ramosa* (Abb. 23). Diese wurden anhand von Referenzsubstanzen als das Alkaloid Nikotin und die zwei Cumarine Scopolin und Scopoletin identifiziert. Die UV-Spektren dieser Verbindungen sind im Anhang abgebildet.

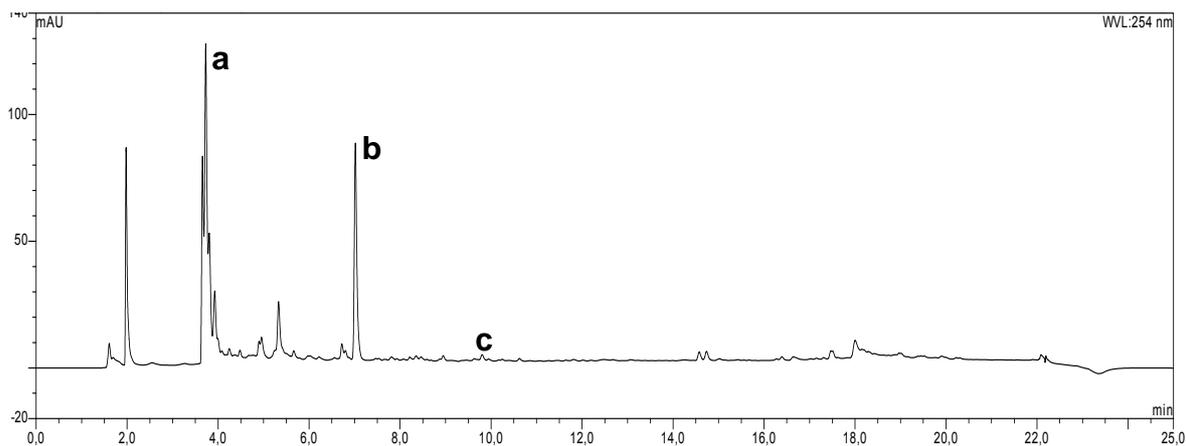


Abb. 23: HPLC-Chromatogramm von methanolischem Extrakt aus 4 µg Tabakwurzeln, erfasst bei einer Wellenlänge von 254 nm. Benannt sind die bekannten Verbindungen: (a) Nikotin, (b) Scopolin, (c) Scopoletin.

Wurzeln der Sorten HyV 8 bildeten im Durchschnitt 60 % weniger Nikotin, 31 % weniger Scopolin und 71 % weniger Scopoletin als die weniger von *O. ramosa* parasitierte Sorte Z 992 (Abb. 24).

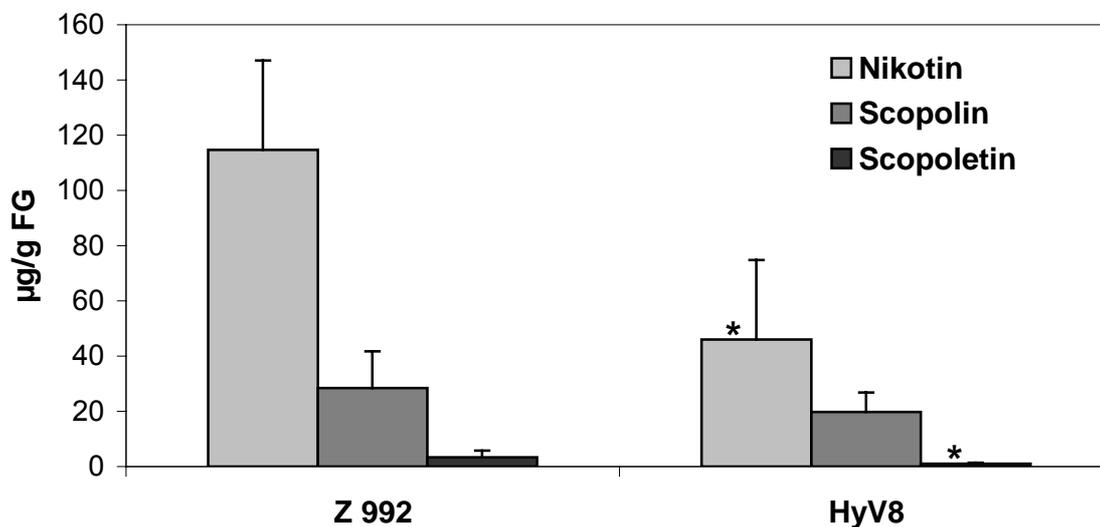


Abb. 24: Durchschnittliche Konzentrationen an Nikotin, Scopolin und Scopoletin in Tabakwurzeln der Sorten HyV 8 und Z 992 (MW ± STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Tabaksorte Z 992, $p \leq 0,05$).

In mit Bion® behandelten und *O. ramosa*-infizierten Tabakpflanzen kam es ebenfalls zu einer Steigerung der Nikotin-, Scopoletin- und Scopolin-Konzentrationen. Nach Bion® Gabe wurde in den Tabakwurzeln eine Steigerung der Nikotinkonzentration von 38 %, der Scopolinkonzentration von 58 % und der Scopoletinkonzentration von 69% gemessen. Während des *O. ramosa*-Befalls kam es zu einer Steigerung der Nikotinkonzentration um 48 %, der Scopolinkonzentration um 48 % und der Scopoletinkonzentration um 60 % (Abb. 25). Vereinzelt konnte in mit Bion® behandelten Tabakpflanzen die Akkumulation von Chlorogensäure beobachtet werden. Allerdings zeigten diese Versuchspflanzen entsprechend geringere Scopolin-Konzentrationen.

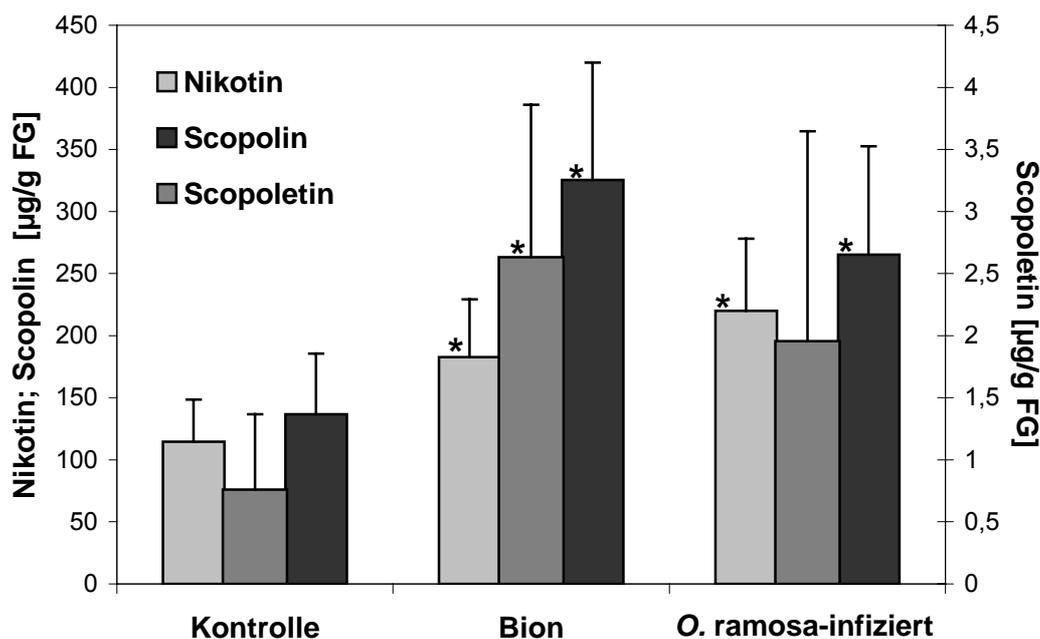


Abb. 25: Konzentrationen an Nikotin, Scopolin und Scopoletin in mit *O. ramosa* infizierten und mit Bion® behandelten (ohne *O. ramosa*-Infektion) Tabakwurzeln im Vergleich zur Kontrolle (MW ± STABW; n = 10; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$).

Unter sterilen Bedingungen in Klimakammern konnte im Gegensatz zu Wurzeln von mit Bion® behandelten und *Orobanch*e-infizierten Tabakpflanzen kein Scopoletin in Wurzeln der Kontrollpflanzen gemessen werden. Im Vergleich zur Kontrolle waren die Scopolinkonzentrationen in den Tabakwurzeln nach Bion-Applikation um 93 % und während der *O. ramosa*-Infektion um 96 % gesteigert (Abb. 26).

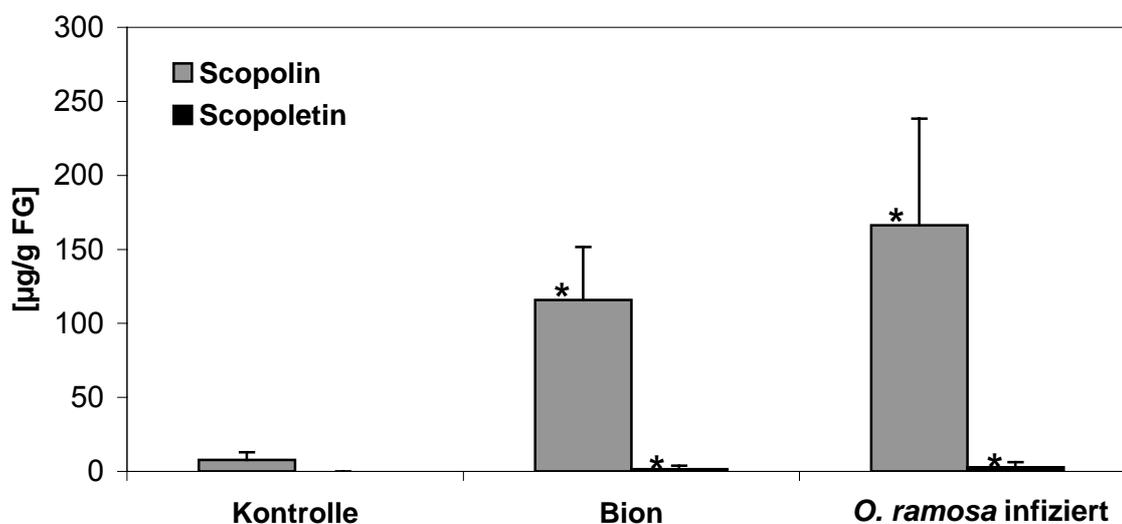


Abb. 26: Konzentrationen von Nikotin, Scopolin und Scopoletin in mit *O. ramosa*-infizierten und mit Bion® behandelten (ohne *O. ramosa*-Infektion) Tabakwurzeln im Vergleich zur Kontrolle unter sterilen Bedingungen in Klimakammerexperimenten (MW ± STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, $p \leq 0,05$).

Zur ergänzenden Analyse von induzierbaren Resistenzmechanismen wurden die Sekundärmetabolite Scopolin und Scopoletin auf einer DC-Platte aufgetrennt, anhand ihrer Autofluoreszenz unter UV-Licht detektiert und mit identischen Verbindungen verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Bion® Applikation zu einer konzentrationsabhängigen Akkumulation von Scopolin und Scopoletin kommt (Abb. 27). Die beiden Verbindungen zeigten eine bläuliche Fluoreszenz bei 266 nm.

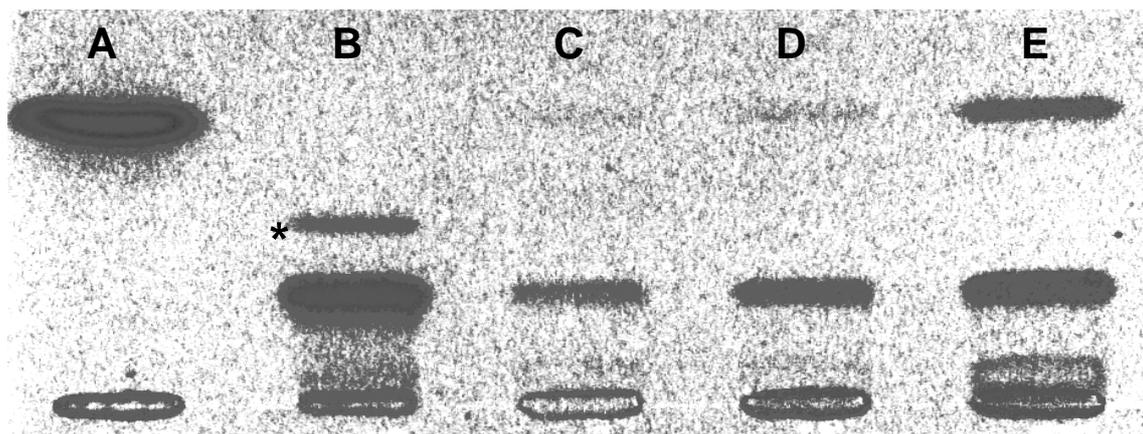


Abb. 27: Detektion von Scopolin und Scopoletin in Tabakwurzelextrakten nach Bion®-Behandlung durch Autofluoreszenz unter UV-Licht. Die Auftrennung erfolgte auf einer Dünnschichtchromatographie-Platte. (A) = Scopoletin-Standard; (B) = Scopolin-Standard (* Verunreinigungen); (C) = Kontrolle; (D) = Bion®-Behandlung 5 mg/l Boden (E) = Bion®-Behandlung 20 mg/l Boden; Konz. der Standards = 0,01 mg; Konz. der Extrakte = 8 mg Wurzel.

3.6.4 Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate nach Bion®-Behandlung

Als weiterer induzierbarer Resistenzmechanismus wurde die Bildung reaktiver Sauerstoffintermediate in Tabakwurzeln untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es nach Bion®-Applikation zu einer Akkumulation von H_2O_2 kommt und außerdem unterschiedliche Peroxidasen exprimiert werden (Abb. 28).



Abb. 28: A: Anfärbung von endogenem H_2O_2 in Tabakwurzeln nach Bion® Applikation durch Diaminobenzidin (DAB)-Aufnahme; B: Auftrennung induzierter Peroxidasen durch native Gelelektrophorese nach Bion®-Applikation (5 mg/l Boden).

3.6.5 PAL- und Peroxidase-Aktivitäten

Zur Identifizierung der an der Pathogenabwehr beteiligten Enzyme wurden die Aktivitäten der Peroxidasen und der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bei anfälligen und kaum anfälligen Tabaksorten, sowie nach Befall mit *O. ramosa* und nach Bion®-Applikation bestimmt (siehe 2.4.7.2 und 2.4.7.3). Es zeigte sich, dass die Peroxidase- und PAL-Aktivitäten in Tabakwurzeln sowohl nach Befall mit *O. ramosa* als auch nach Applikation von Bion® gesteigert wurden (Tab. 10). Die Peroxidase-Aktivitäten steigerten sich nach *O. ramosa*-Befall um 59 % und nach Bion®-Applikation um 56%. Zudem zeigte die Sorte Z 992 eine 37 bis 46 % höhere Peroxidase-Aktivität als die anfälligen Sorten Jupiter und HyV 8.

Während mit der Methode nach Ferrarese *et al.* (2004) (siehe 2.4.7.2) keine PAL-Aktivität in den unbehandelten Tabakwurzeln detektiert werden konnte, zeigten mit *O. ramosa* infizierte und mit Bion® behandelte Tabakpflanzen eine durchschnittliche Aktivität um 20 nmol *t*-Zimtsäure h⁻¹ g⁻¹ FG.

Tab. 10: Peroxidase- und PAL-Aktivitäten in Wurzeln der Tabaksorten Jupiter, HyV 8 und Z 992, sowie nach Behandlung mit Bion® und bei *O. ramosa*-Befall (MW ± STABW; n = 6* = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle, p ≤ 0,05); n.d. = nicht detektierbar.

	Peroxidase-Aktivität (unit g ⁻¹ FG)	PAL-Aktivität (nmol <i>t</i> -Zimtsäure h ⁻¹ g ⁻¹ FG)
Jupiter (Kontrolle)	7,6 ± 2,1	n.d.
Jupiter (<i>O. ramosa</i> infiziert)	18,6 ± 3,2 *	18,7 ± 22,5
Jupiter (Bion behandelt)	17,3 ± 3,2 *	26,9 ± 23,4
HyV 8	10,4 ± 1,7	n.d.
Z 992	16,4 ± 6,5 *	n.d.

3.6.6 Expression von Resistenzproteinen in Tabakwurzeln

Zur Evaluierung der erfolgreich getesteten Resistenzinduktoren und deren Wirkung sowie zur weiteren Erfassung beteiligter Stoffwechselwege bei der Stressantwort gegenüber *O. ramosa*, wurden Westernblot-Analysen durchgeführt. Bei *O. ramosa*-Befall von Tabakwurzeln zeigte sich eine Expression von Chitinase und Glukanase, wobei die Tabaksorte HyV 8 die schwächste Expression aufwies. Die PAL wurde sowohl nach *O. ramosa*-Befall als auch in den Kontrollen gleichermaßen exprimiert (Abb. 29). Somit war nur die Aktivität der PAL gesteigert (siehe 3.6.5), nicht aber deren Expression.

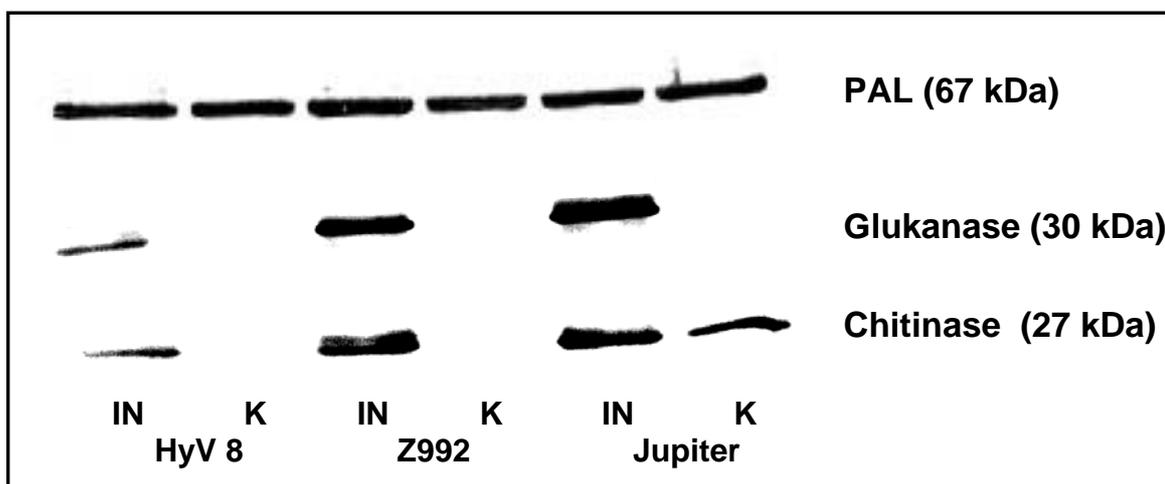


Abb. 29: Expression von Chitinase, Glukanase und PAL in Wurzeln der Tabaksorten HyV 8, Z 992 und Jupiter nach Infektion (IN) mit *O. ramosa* im Vergleich zur Kontrolle (K).

Nach Behandlung mit den Resistenzinduktoren Bion®, Proradix® und Fruton® wurde Chitinase verstärkt exprimiert. Eine verstärkte Glukanase-Expression konnte nur nach Fruton®- und Bion®-Applikation beobachtet werden. Nach Behandlungen mit den Resistenzinduktoren zeigte die PAL keine Unterschiede im Expressionsmuster. Die PAL war bereits in unbehandelten Tabakwurzeln stark exprimiert (Abb. 30).

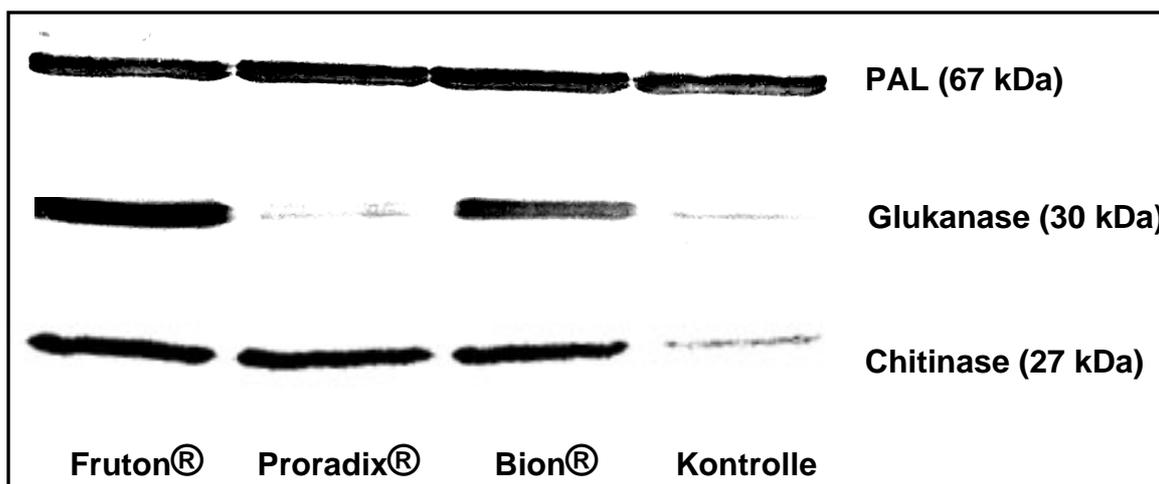


Abb. 30: Expression von Chitinase, Glukanase und PAL in Wurzeln der Tabaksorte Jupiter nach Behandlung mit den Resistenzinduktoren Fruton®, Proradix® und Bion® im Vergleich zur Kontrolle (K).

3.7 Versuche zur Keimung von *O. ramosa*

Um den Einfluss von Resistenzinduktoren und Sekundärmetaboliten der Tabakwurzel auf die Keimung von *O. ramosa* zu evaluieren, wurden Keimtests mit dem synthetischen Keimstimulanz GR 24 in Kombination mit den zu testenden Substanzen durchgeführt (Tab. 11). Die Resistenzinduktoren Bion® und Proradix® hatten keinerlei Einfluss auf die Keimfähigkeit von *O. ramosa*, während Fruton® die Keimfähigkeit im Durchschnitt um 68 % senkte. Scopoletin verminderte die Keimfähigkeit von *O. ramosa*, während Scopolin, Chlorogensäure und Nikotin keinen Effekt auf die Keimung von *O. ramosa* hatten. Scopoletin bewirkte eine deutliche Blaufärbung und Schädigung der Radicula keimender *O. ramosa*-Samen. Nach Chlorogensäure-Applikation wurde eine Verbräunung der Radicula beobachtet (Abb 31).

Tab. 11: Keimprozente von *O. ramosa* und Entwicklung der Radicula nach Behandlungen mit Resistenzinduktoren und Sekundärmetaboliten der Wirtspflanze. Als Keimstimulanz wurde GR 24 verwendet (MW \pm STABW; n = 6; * = signifikant unterschiedlich zur Kontrolle (K), $p \leq 0,05$).

Behandlung	Keimprozente (%)	Einfluss auf Radicula
GR 24 0,001 ppm (K)	98,2 \pm 3,3	keine
GR 24+ Nikotin (1 μ g)	97,7 \pm 1,4	keine
GR 24+ Nikotin (10 μ g)	97,3 \pm 0,6	keine
GR 24+ Nikotin (100 μ g)	98 \pm 0,8	keine
GR 24+ Chlorogensäure (1 μ g)	97,3 \pm 2,1	keine
GR 24+ Chlorogensäure (10 μ g)	97,3 \pm 1,5	keine
GR 24+ Chlorogensäure (100 μ g)	97 \pm 2,6	Verbräunung
GR 24+ Chlorogensäure (1000 μ g)	91,2 \pm 8,8	Verbräunung
GR 24+ Scopoletin (1 μ g)	93,3 \pm 4	keine
GR 24+ Scopoletin (10 μ g)	89 \pm 13,1 *	Blaufärbung, Deformation
GR 24+ Scopoletin (100 μ g)	37,3 \pm 33,56 *	Blaufärbung, Deformation
GR 24+ Scopoletin (1000 μ g)	0 *	
GR 24+ Scopolin (100 μ g)	98,6 \pm 1,3	keine
GR 24+ Fruton (2,5 %)	30 \pm 21,3 *	keine
GR 24+ Bion	97,5 \pm 2,4	keine
GR 24+ Proradix	96,8 \pm 5,2	keine

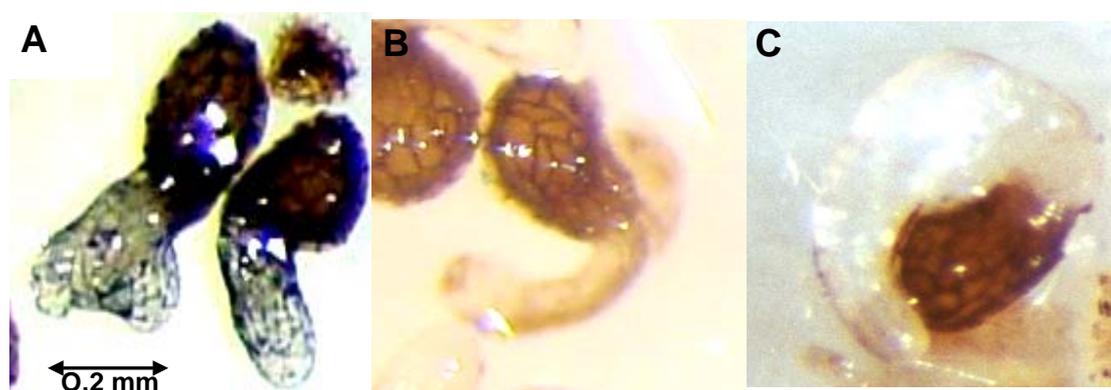


Abb. 31: Wirkung von Sekundärmetaboliten auf die Radicula von *O. ramosa*. A: Blaufärbung und Deformation nach Scopoletin-Applikation; B: Verbräunung nach Chlorogensäure-Applikation; C: ohne Behandlung.

3.8 Befallsstudien mit transgenen Linien des Wildtabaks *Nicotiana attenuata*

Zur Ermittlung der beteiligten Resistenzmechanismen gegen *O. ramosa* wurden transgene Linien von *N. attenuata* auf ihre Anfälligkeit gegenüber *O. ramosa* getestet. Die verwendeten Linien zeigten im Vergleich zu den Wildtypen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Biomasseproduktion.

Die transgenen Linien des aus Utah (USA) stammenden diploiden Wildtyps zeigten nur eine geringe Anfälligkeit gegenüber der verwendeten *O. ramosa*-Population aus Sandhausen. Die tetraploiden Linien eines aus Arizona (Ariz.; A) stammenden Wildtyps wurden stärker parasitiert (Abb. 32). Bei Untersuchungen zur Biomasseproduktion von *O. ramosa* auf transgenen Linien von *N. attenuata* bildete *O. ramosa* auf der AS-RCA-Linie die geringste und auf der AS-GAL 83 die größte Biomasse (Abb. 33).

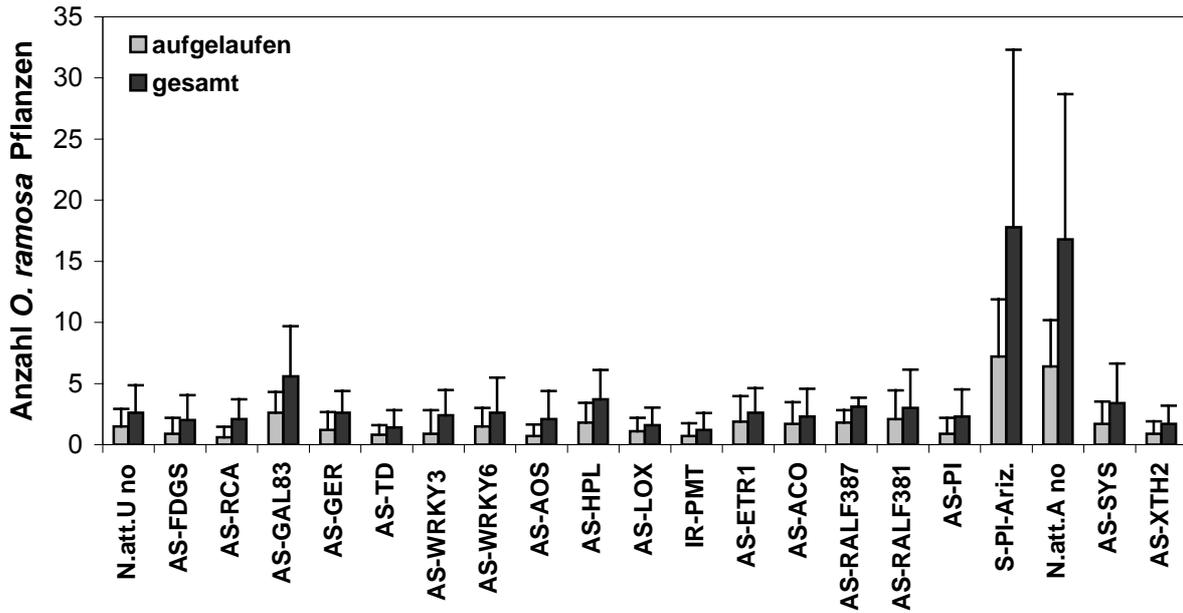


Abb. 32: *O. ramosa*-Befall transgener Linien von *N. attenuata* (detaillierte Beschreibung der Versuchslinien, siehe Material und Methoden). (MW \pm STABW; n = 10).

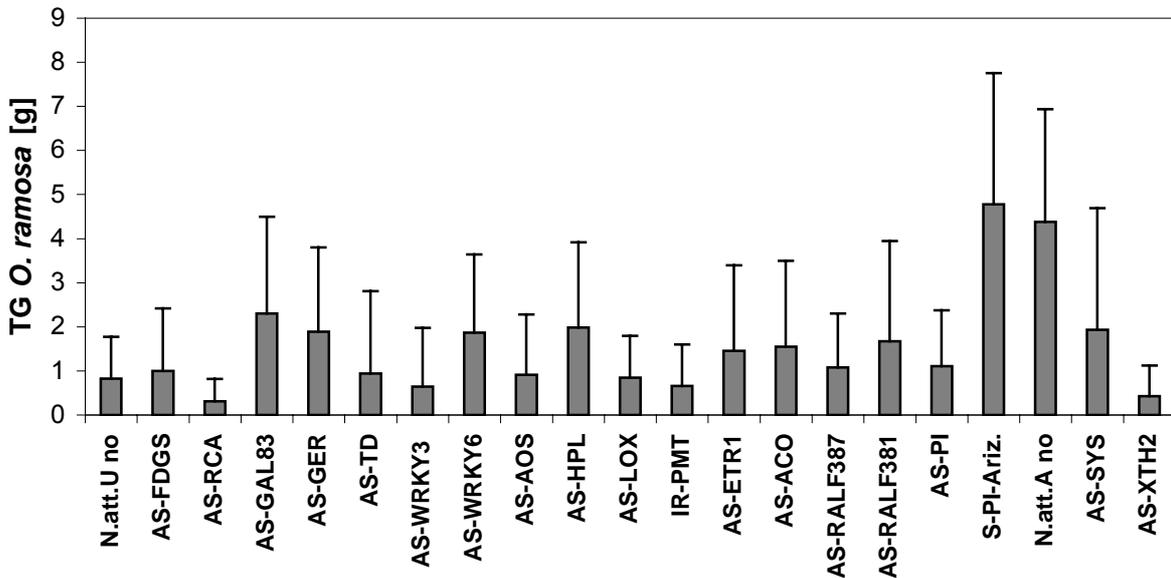


Abb. 33: Biomasseproduktion von *O. ramosa* an transgenen Linien von *N. attenuata* (detaillierte Beschreibung der Versuchslinien, siehe Material und Methoden). (MW \pm STABW; n = 10).

Aufgrund des niedrigen Befalls mit *O. ramosa* und den daraus resultierenden hohen Standardabweichungen konnten keine eindeutigen Aussagen über an der Resistenzantwort beteiligte Gene getroffen werden. Um tendenzielle

Unterschiede der transgenen Linien im Vergleich zur Kontrolle zu verdeutlichen, wurden Cluster-Analysen durchgeführt. Neben den tetraploiden Varianten von *N. attenuata* aus Arizona (S-PI-Ariz.; N. att. A no) wiesen vor allem die Linien AS-WRKY 6 und AS-GAL 83 Unterschiede zum diploiden Wildtyp von *N. attenuata* (N.att.U no) auf. Diese zeigten sowohl bezüglich der aufgelaufenen sowie auch den insgesamt gezählten *O. ramosa* Sprossen und der Biomasseproduktion von *O. ramosa* die geringsten Übereinstimmungen mit dem Wildtyp (Abb. 34-36). Auf den transgenen Linien AS-ETR1, AS-HPL, AS-SYS und AS-ACO wies *O. ramosa* größere Unterschiede in der Biomasseproduktion im Vergleich zum Wildtyp auf, als auf den anderen transgenen Linien (Abb. 36). Das gleiche Bild zeigte sich bezüglich der aufgelaufenen *O. ramosa* Sprosse (Abb. 34).

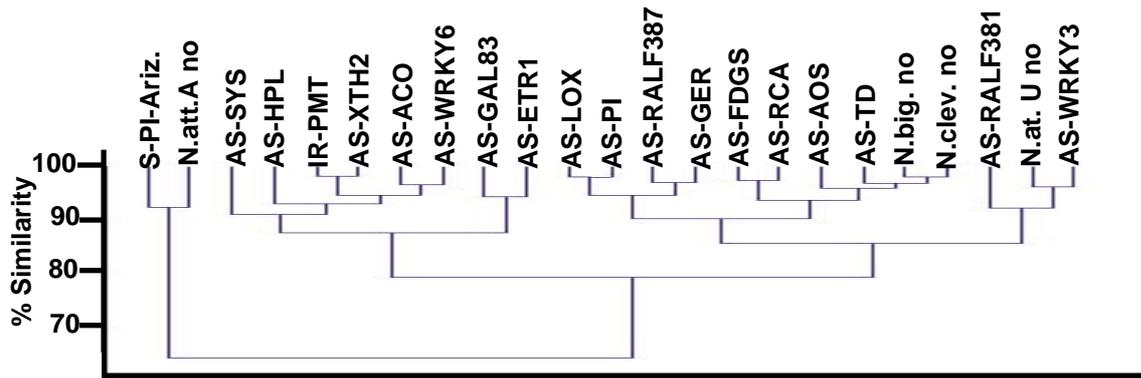


Abb. 34: Clusteranalysen basierend auf der durchschnittlich gezählten Zahl aufgelaufener *O. ramosa*-Sprosse, parasitierend an transgenen Linien von *N. attenuata*, sowie an den Wildarten *N. clevelandii* und *N. bigelovii* (detaillierte Beschreibung der Versuchslinien, siehe Material und Methoden).

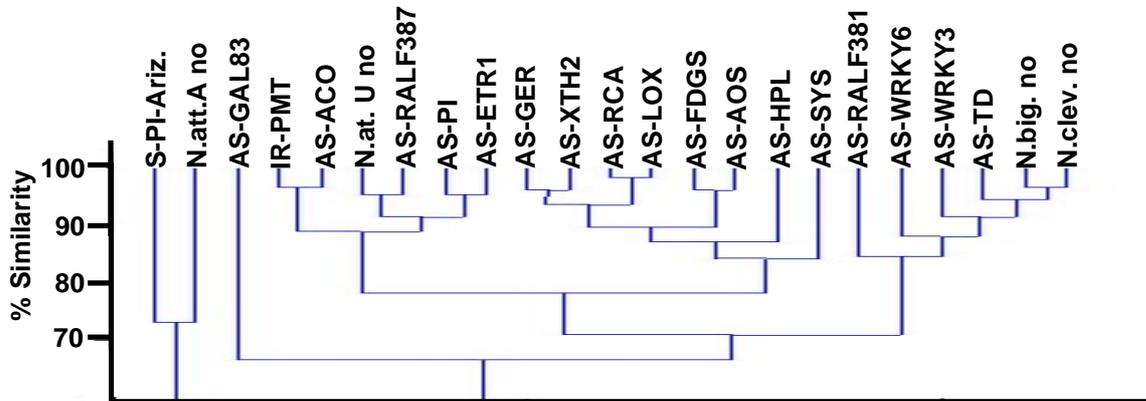


Abb. 35: Clusteranalysen basierend auf der durchschnittlich gezählten Anzahl der gesamten ober- und unterirdisch ausgebildeten *O. ramosa*-Sprosse, parasitierend an transgenen Linien von *N. attenuata*, sowie an den Wildarten *N. clevelandii* und *N. bigelovii* (detaillierte Beschreibung der Versuchslinien, siehe Material und Methoden).

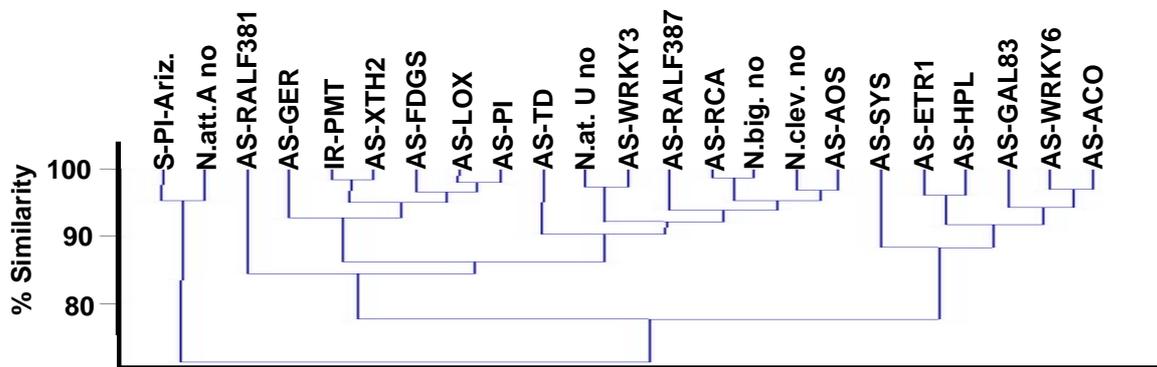


Abb. 36: Clusteranalysen basierend auf der durchschnittlich gebildeten Biomasse von *O. ramosa* parasitierend an transgenen Linien von *N. attenuata*, sowie an den Wildarten *N. clevelandii* und *N. bigelovii* (detaillierte Beschreibung der Versuchslinien, siehe Material und Methoden).

4 Diskussion

Die holoparasitische Blütenpflanze *O. ramosa* verursachte in den letzten Jahren erhebliche Ertragsverluste im deutschen Tabakanbau. Der Versuch, *O. ramosa* in Deutschland effektiv und selektiv zu kontrollieren, war bislang erfolglos. Dies liegt in erster Linie an fehlenden, grundlegenden Informationen zu dem Parasiten selbst und seinen nicht verstandenen Interaktionen mit den Wirtspflanzen (Buschmann 2004).

In der hier vorliegenden Studie werden neue Erkenntnisse über die in Deutschland vorkommenden *O. ramosa*-Populationen und deren Interaktion mit ihren Wirtspflanzen berichtet. Unter Verwendung von Pflanzenstärkungstoffen konnte in Tabak eine Resistenz gegen *O. ramosa* induziert werden. Anhand dieser induzierten Resistenz und dem biochemischen Vergleich von *O. ramosa*-anfälligen und toleranten Tabaksorten konnten schließlich Erkenntnisse zur Resistenzantwort auf *O. ramosa* gewonnen werden.

4.1 Genetische Variabilität von *O. ramosa*

Insgesamt nimmt die Verbreitung von *O. ramosa* zu, doch die Befallsszenarien des Parasiten in den einzelnen Tabakanbaugebieten sind sehr unterschiedlich. Laut persönlicher Angaben einiger Tabakpflanzer war *O. ramosa* „schon immer“ auf Feldern verbreitet, ohne große Schäden zu verursachen. Andere Pflanzer hingegen, insbesondere in der Gegend um Heidelberg, mussten 2002 und 2003 totale Ernteauffälle auf zuvor *Orobanch*e-freien Flächen hinnehmen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich unterschiedlich aggressive Pathotypen von *O. ramosa* entwickelt haben. Molekulargenetische Untersuchungen (siehe 3.1) belegen in diesem Zusammenhang eine starke

Heterogenität der *O. ramosa*-Populationen an deutschen Standorten. Auffällig war, dass eine Population von den Versuchsfeldern der Landesanstalt für Pflanzenbau (LAP) in Forchheim Ähnlichkeit zu slowakischen Populationen zeigte. Die Forchheimer Population konnte an Hanf und Tabak, aber auch an Kartoffel und Möhre, nachgewiesen werden, was auf eine wenig wirtsspezifische Population hindeutet. Arbeiten unserer Forschungsgruppe zeigten zudem, dass *O. ramosa* aus Forchheim auch Raps befällt, während andere deutsche Varietäten diesen kaum parasitieren (Buschmann *et al.* 2004 im Druck).

Aufgrund der beobachtbaren Diversität von Orobanchaceen, nicht nur auf der Ebene von Spezies, sondern auch auf der Ebene von Varietäten und Formen (Kojic *et al.* 2001), scheint eine genetische Beschreibung der Populationen notwendig. Nicht zuletzt, da eine Differenzierung aufgrund morphologischer Merkmale kaum möglich ist. So beschrieb z. B. Gilli (1974) 6 Varietäten von *O. ramosa* fast ausschließlich anhand der Blütenfarben. Da die Blütenfarbe bei *O. ramosa* nur zwischen weiß und blau/lila variiert, ist eine genaue Zuordnung ohne direkten Vergleich auf Grund der zum Teil marginalen Farbunterschiede äußerst schwierig. Zudem wird die Ausprägung der Blütenfarbe von *O. ramosa* auch durch die Bodenbeschaffenheit und die Wirtspflanzen beeinflusst, wie sich in unseren Gewächshausversuchen zeigte. Auch Schneeweiss *et al.* (2004) postulierten, dass eine genaue Beschreibung der *Orobanche*-Populationen allein anhand ihrer morphologischen Merkmale zu ungenau ist.

Bislang zeigten Román *et al.* (2003), dass mittels Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-Analysen die genetische Verwandtschaft von *Orobanche*-Arten untersucht werden kann. Sie konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den von ihnen untersuchten *O. ramosa*-Populationen finden. Allerdings zeigten sie klare Unterschiede zwischen *O. crenata*-

Populationen, die auf unterschiedlichen Wirten wuchsen. Benharrat *et al.* (2002) verwendete eine PCR der Simple Sequence Repeat (SSR) mit dem Primer (GATA)₄ zur Beschreibung der beiden nahe verwandten Arten *O. cumana* und *O. cernua*. Bornert & Branchard (2001) machten deutlich, dass ISSR-PCR eine zuverlässige und reproduzierbare Methode darstellt, um genetische Fingerabdrücke von nahe verwandten Spezies zu erstellen. Mit dieser Studie konnte belegt werden, dass die ISSR-PCR ebenfalls eine geeignete Methode zur genaueren Bestimmung der morphologisch ähnlichen, aber physiologisch verschiedenen *O. ramosa*-Varietäten, darstellt.

Da das Wirtsspektrum der in Deutschland auftretenden *O. ramosa*-Varietäten noch nicht erfasst ist, ist es von zentraler Bedeutung, die einzelnen Populationen von *O. ramosa* weiter zu charakterisieren und mit Populationen aus anderen Ländern, mit bekanntem Wirtsspektrum, zu vergleichen. Die so gewonnenen Erkenntnisse können genutzt werden, um klare Aussagen zu treffen hinsichtlich der von „deutschen“ Populationen für andere Kulturpflanzen neben Hanf und Tabak ausgehenden Gefährdung eines Befalls.

4.2 Pathogenitätsfaktoren von *O. ramosa*

Zum Verständnis der raschen und erfolgreichen Ausbreitung von *O. ramosa* ist neben der Charakterisierung der einzelnen Varietäten auch die Erfassung der beteiligten Pathogenitätsfaktoren von zentraler Bedeutung. Als Pathogenitätsfaktoren werden Mechanismen beschrieben, die zur Überwindung von natürlichen Resistenzbarrieren der Wirtspflanzen genutzt werden (Shiraishi *et al.* 1994). Bis heute ist wenig über diese Mechanismen bei *Orobanche*-Spezies bekannt. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass die Penetration der Wirtswurzel durch *Orobanche* sowohl mechanisch als auch mit Hilfe

extrazellulärer Enzyme erfolgt. Hierbei löst z.B. *O. aegyptiaca* die Mittellamelle mittels Pektinmethylesterasen (PME) (Bar Nun *et al.* 1996) oder Polygalacturonasen (PGasen) (Singh & Singh 1993) enzymatisch auf. Ergebnisse von Losner-Goshen *et al.* (1998) bestätigen, dass pektinabbauende Enzyme (Pektinasen) wie die Pektinmethylesterase (PME) und die Polygalacturonase an der Penetration der Wirtswurzel durch parasitische Unkräuter beteiligt sind.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es bei *O. ramosa* zu einer Anreicherung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROIs) kommt (siehe 3.2.2). Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass nach Applikation von Antioxidanzien wie Ascorbat und Chlorogensäure der Befall mit *O. ramosa* reduziert werden konnte (Buschmann unveröffentlicht). Dies verdeutlicht, dass ROIs für die Entwicklung von *O. ramosa* von essentieller Bedeutung sind. Ob reaktive Sauerstoffspezies einen direkten Effekt auf die Wachstumsprozesse von *O. ramosa* haben, oder ob sie dazu dienen das Wirtsgewebe zu schädigen und damit eine Penetration der Wirtswurzel zu ermöglichen, bleibt zu klären.

Kim *et al.* (1998) und Keyes *et al.* (2001) diskutierten auch die Rolle von H_2O_2 bei der parasitischen Blütenpflanze *Striga asiatica* als Initiator für die Erkennung der Wirtspflanze und die Entwicklung des Haustoriums. Keyes *et al.* (2000) beschreibt weiter, dass in Verbindung mit H_2O_2 Peroxidasen und Zellwand Pektine der Wirtspflanzen genutzt werden, um ein einfaches Benzoquinon-Signal zu generieren, welches dann die Bildung des Haustoriums induziert. Ob die konstitutive Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies auch bei holoparasitischen Blütenpflanzen wie *O. ramosa* die Wirtserkennung begleitet, muss in weiteren Studien geklärt werden.

4.2.1 Antioxidatives System von *O. ramosa*

Für *O. ramosa* ist es essentiell, effektive antioxidative Schutzmechanismen gegen die von ihr gebildeten ROIs zu bilden, um einer Selbstvergiftung entgegenzuwirken. Grace & Logan (2000) postulierten, dass neben den antioxidativen Systemen von SOD, Ascorbat-Peroxidase, Katalase, Monodehydratascorbat-Reduktase, Gluthathion-Reduktase und den Antioxidanzien Ascorbat und Glutathion, phenolischen Verbindungen eine wichtige Rolle bei der Steigerung der antioxidativen Kapazität zukommt. Castelluccio *et al.* (1995) beschrieben ebenfalls das antioxidative Potential von Phenolen höherer Pflanzen, wie Chlorogensäure und deren Derivaten. In diesem Zusammenhang konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass die antioxidativen phenolischen Verbindungen Verbascosid und Oroposid in *O. ramosa* akkumuliert werden. Diese Verbindungen haben eine höhere antioxidative Kapazität als Ascorbat und werden in der Parfümindustrie erfolgreich als Antioxidanzien verwandt (Viron *et al.* 1998). Sie könnten entweder direkt oder indirekt in Verbindung mit Peroxidasen als Schutz vor den hohen Konzentrationen an reaktiven Sauerstoff-Spezies dienen. Dies korreliert mit der hohen Peroxidase-Aktivität von *O. ramosa*, welche die Aktivität ihrer Wirtspflanze Tabak um das 8fache überstiegen.

Als weiteres Enzym, welches an der Detoxifikation von ROIs bei *O. ramosa* beteiligt sein könnte, wird die alternative Oxidase (AOX) diskutiert. Bar Nun *et al.* (2003) zeigten, dass AOX-Inhibitoren den Befall mit *O. aegyptiaca* an Tomate reduzieren. Dies bestätigt, dass ein effektives antioxidatives System die Voraussetzung für eine erfolgreiche Entwicklung von *Orobanche* auf ihren Wirten darstellt.

4.3 Induzierte Resistenz

Den vorliegenden Ergebnissen nach ist die Kontrolle von *O. ramosa* durch Behandlung mit resistenzinduzierenden Elicitoren möglich (siehe 3.4). Sauerborn *et al.* (2002) zeigten, dass BTH, der aktive Inhaltsstoff von Bion®, eine induzierte Resistenz gegenüber der Sonnenblumen-Sommerwurz (*O. cumana*) aktivieren kann. Durch eine prophylaktische Anwendung von BTH erreichten sie eine 95%ige Reduktion des Befalls. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Reduktion des *O. ramosa*-Befalls durch BTH-induzierte Resistenz in Tabak- und Hanfkulturen ebenfalls möglich ist. In anderen Pflanze/Pathogen-Systemen wurde die Wirkung von BTH bereits eingehend untersucht. So beschreibt Oostendorp *et al.* (2001) Bion® (BTH) als den am Besten untersuchten Resistenzaktivator. In der Literatur gibt es viele Beispiele für die Wirksamkeit von Benzothiadiazolderivaten gegen pilzliche, virale und bakterielle Pathogene, sowie gegen Oomyceten. Beispielsweise wurden die Induzierung von Krankheitsresistenz in Weizen (*Triticum aestivum* L.) (Görlach *et al.* 1996) und Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) (Bokshi *et al.* 2003) gegen Echten Mehltau, in Sonnenblume (Tosi & Zazzerini 2000) und Blumenkohl (*Brassica oleracea* L. convar. *botrytis* (L.)) (Ziadi *et al.* 2001) gegen Falschen Mehltau, in Rose (*Rosa hybrida* L.) gegen Sternrußtau (Suo & Leung 2002), in Bohne (*Phaseolus vulgaris* L.) gegen Rostpilz (Iriti & Faoro 2003), in Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) gegen Grauschimmel (Aucho *et al.* 2004) und in Tabak gegen den Tabak-Mosaik-Virus (Friedrich *et al.* 1996), Blauschimmel (Perez *et al.* 2003) und Wildfeuer (Cole 1999) untersucht. BTH agiert bei der Resistenzinduktion als funktionelles Analogon zu SA (Nakashita *et al.* 2002). Allerdings bleiben Zweifel, ob BTH eine SAR auslöst oder vielmehr nur eine lokal erworbene Resistenz (LAR) gegen *O. ramosa* induziert. Zumindest konnte der Befall von *O. ramosa* durch Sprühen

von Bion® auf Tabakblätter nicht signifikant reduziert werden (unveröffentlichte Daten). Im Gegensatz hierzu zeigten Pérez-de-Luque *et al.* (2004), dass eine Sprühapplikation von BTH gegen *O. crenata* auf Erbse (*Pisum sativum* L.) die Tuberkelentwicklung unterdrückt. Die Ergebnisse der Sprühversuche mit SA zeigten ebenfalls eine klare Befallsreduktion von *O. ramosa* an Tabakwurzeln, welches die systemische Resistenzinduktion im Sinne einer SAR unterstreicht. Da BTH als Analogon zu SA wirkt und auch ohne Steigerung des SA Gehaltes Resistenz induziert (Nakashita *et al.* 2002), bleibt zu klären, worauf die unterschiedlichen Wirkungen der beiden Verbindungen beruhen. Ein Grund könnte eine verminderte Aufnahme und Translokation von BTH in der Wirtspflanze sein. Dagegen sprechen jedoch Untersuchungen vom Scarponi *et al.* (2001) die zeigten, dass BTH und dessen Derivate sehr schnell in Tomatenpflanzen verteilt werden und mittels SAR gegen *Pseudomonas syringae* schützten.

Klarzynski *et al.* (2003) zeigten, dass eine SAR gegen den Tabak-Mosaik-Virus auch durch strukturelle Komponenten der Zellwände von Braunalgen (Oligosaccharide) induziert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten, dass Extrakte der marinen Braunalge *Ascophyllum nodosum* L. (Coemar Fruton Spezial®) den Befall mit *O. ramosa* in Hanf- und Tabak deutlich vermindern können. Ob die Reduktion auf einer SAR oder auf einem phytotoxischen Effekt beruht, ist unklar. In Keimungsexperimenten zeigte Coemar Fruton Spezial® im Gegensatz zu Bion® und Proradix® einen direkten Effekt auf die Keimfähigkeit von *O. ramosa*, zudem wurden Schädigungen an den Wirtspflanzen beobachtet. Die gefundene Expression der PR-Proteine Glukanase und Chitinase deutet hingegen auf die Fähigkeit von Coemar Fruton Spezial® hin, Resistenzmechanismen im Sinne einer SAR zu induzieren.

Neben der SAR gegen *O. ramosa* konnte gezeigt werden, dass auch Stämme von *Pseudomonas* spp. (Proradix®) den Befall mit *O. ramosa* reduzieren. Sarma *et al.* (2002) zeigten, dass *Pseudomonas fluorescens* Verteidigungsmechanismen, wie die Phenolakkumulation, induzieren kann. Gozzo (2003) folgerte in seinem Literaturüberblick, dass wurzelkolonisierende Bakterien im Zusammenspiel mit den Phytohormonen Jasmonat und Ethylen eines der beachtenswertesten natürlichen Verteidigungsphänomene von Pflanzen induzieren. Dieses wird als induzierte systemische Resistenz (ISR) beschrieben (Mauch-Mani & Metraux 1998; Metraux *et al.* 2002; Pieterse *et al.* 2002). In diesem Zusammenhang konnten Vieira dos Santos *et al.* (2003) beobachten, dass Jasmonat-koreguliert Gene eine gesteigerte Expression in *Arabidopsis thaliana* nach *O. ramosa*-Befall zeigten. Die Tatsache, dass *O. ramosa* auf *Arabidopsis* weiterwächst, führt zu der Annahme, dass die Jasmonat-induzierten Verteidigungsreaktionen nicht alleine für eine effektive Kontrolle von *O. ramosa* verantwortlich sind oder zu spät exprimiert werden. Rubiales *et al.* (2003) fanden, dass Resistenzmechanismen von Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) gegen *O. crenata* nur auf die frühen Infektionsstadien von *O. crenata* wirken, wobei es zu einer Verbräunung an der Infektionsstelle kommt. In diesem Kontext könnte der Zeitvorteil einer präinduzierten Resistenz gegen eine *O. ramosa*-Infektion eine entscheidende Rolle spielen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass sowohl nach Boden-, als auch nach Sprühapplikation von JA der Befall mit *O. ramosa* in Tabakkulturen signifikant reduziert war und bekräftigen damit diese Annahme.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kontrolle von *O. ramosa* sowohl auf der Basis einer SA-getragenen SAR als auch auf der Basis einer JA-getragenen ISR möglich ist. Hierbei kann es zu sogenannten „crosstalks“

zwischen unterschiedlichen Signalwegen bei abiotischem und biotischem Stress kommen (Taylor *et al.* 2004; Taylor & McAinsh 2004; Chinnusamy *et al.* 2004). Bei gleichzeitiger Applikation der Pflanzenhormone SA und JA unterdrückte allerdings SA die Expression JA-induzierter Stoffwechselwege (Cipollini *et al.* 2004). Regulierend bei diesen „crosstalks“ scheint das Protein NPR1 (non-expressor of PR genes), welches auch als NIM1 (none inducible immunity) bezeichnet wird, zu wirken (Spoel *et al.* 2003; Kohler *et al.* 2002; Metraux 2002). Die einzelnen Signalwege sind jedoch noch nicht gänzlich geklärt. So wird z.B. zwischen der Akkumulation von SA und der Aktivierung von NPR1 ein „missing link“ vermutet (Mou *et al.* 2003).

Auch Ethylen könnte eine regulierende Funktion bei der Abwehr gegen *O. ramosa* zukommen. Von Cordelier *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass Ethylen die Sensitivität von Tabak für SA steigert. Verberne *et al.* (2003) postulierten, dass Ethylen für die Generation von systemischen Signalmolekülen verantwortlich ist, welche SA-Akkumulation, Verteidigungsgenexpression und SAR auslösen. Die Feststellung, dass an der SA-unabhängigen ISR auch Ethylen beteiligt ist, führte Verberne *et al.* (2003) zu der Annahme, dass an langen Signalwegen von SAR und ISR gleiche Mechanismen beteiligt sein könnten.

Es ist wahrscheinlich, dass neben SA, JA und Ethylen noch weitere Pflanzenhormone an der induzierten Resistenz gegen parasitische Unkräuter beteiligt sind. Nakashita *et al.* (2003) zeigten die Rolle von Brassinosteroiden bei der Resistenz von Tabak und Reis gegenüber Pathogenen und beschrieben ein Steroidhormon begleitete Krankheitsresistenz (BDR), die zusätzlich zur SAR genutzt werden kann. Roemmelt *et al.* (2003) induzierten eine Resistenz gegen Feuerbrand bei Apfelbäumen durch Inhibierung der 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase. Diese ist an der Biosynthese des Pflanzenhormons Gibberellin

beteiligt (Bazzi *et al.* 2003). Audenaert *et al.* (2002) postulierten, dass das Pflanzenhormon Abscisinsäure (ABA) die Anfälligkeit von Tomate gegen *Botrytis cinerea* steigert und SA-abhängige Verteidigungswege unterdrückt. Somit könnten Gibberelline und ABA eine antagonistische Rolle bei der induzierten Resistenz gegenüber *O. ramosa* einnehmen.

4.4 Resistenzmechanismen der Wirtspflanzen

Aus zahlreichen Untersuchungen zur Pflanze-Pathogen-Interaktion (Tuzun 2001; Van't Slot & Knogge 2002; Montesano *et al.* 2003) ist bekannt, dass die meisten Pathogene von der Wirtspflanze erkannt werden. Das betroffene Wirtsgewebe initiiert daraufhin hormongesteuerte Abwehrreaktionen, um das Eindringen des Pathogens zu unterbinden. Im Rahmen einer hypersensitiven Reaktion (HR) kommt es zu Nekrosen rund um den Infektionsort. Neben dem lokalen Zelltod werden an der Infektionsstelle häufig eine Reihe von Zellwandveränderungen beobachtet. Diese Veränderungen, zu denen die Auflagerung von Kallose (Ride 1983; Kauss 1987; Zehhar 2003) und Suberin sowie die Verstärkung der Zellwand durch Lignin, gehören (Griesebach & Ebel 1987; Lewis & Yamato 1990; Zehhar 2003), dienen als physikalische Barrieren. Auch kommt es im Rahmen der HR zur Bildung von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROIs), die an der Verstärkung von Zellwänden, der Lignifizierung, dem Signaltransfer und der direkten Pathogenabwehr beteiligt sind (Doke *et al.* 1996).

Die lokalen Reaktionen werden schließlich durch die Synthese antibiotisch wirksamer Substanzen, den sogenannten Phytoalexinen, ergänzt (Dixon *et al.*, 1983 a,b; Dixon 1986; Ebel 1986; Durango *et al.* 2002). Viele Phytoalexine gehen aus dem Phenylpropan-Stoffwechsel der Pflanze hervor, in dem das Enzym Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) als Schlüsselenzym fungiert (Korth *et al.*

2001; Hahlbrock & Scheel 1989). Als weitere Reaktion auf den Pathogenbefall werden die sogenannten pathogenesis related (PR) proteins exprimiert (Antoniw & Pierpoint 1978; Van Loon *et al.* 1994). Viele der bisher untersuchten PR-Proteine dienen der Abwehr pilzlicher Pathogene oder ihre Funktion ist noch nicht geklärt. So sind z.B. die am umfassendsten untersuchten PR-Proteine hydrolytische Chitinasen (PR-3, 4, 8, 11) oder β -1,3-Glukanasen (PR-2) (van Loon & van Strien 1999). Vom PR-1a Protein ist zwar bekannt, dass es nach Pathogenbefall in Tabak stark akkumuliert wird (Alexander *et al.* 1993; Conrath 1997 *et al.*), aber die genaue biochemische Funktion ist nach wie vor nicht geklärt. PR-9-Proteine wurden als Peroxidasen identifiziert. Peroxidasen spielen u.a. bei der Verknüpfung von Zellwandproteinen (Bradley *et al.* 1992), der Lignifizierung (Walter 1992), der Wundheilung (Scherf *et al.* 1993), der Produktion von Radikalen (Peng & Kuc 1992), sowie bei der Regulation der Akkumulation von Phytoalexinen (Joel & Portnoy 1998) eine zentrale Rolle.

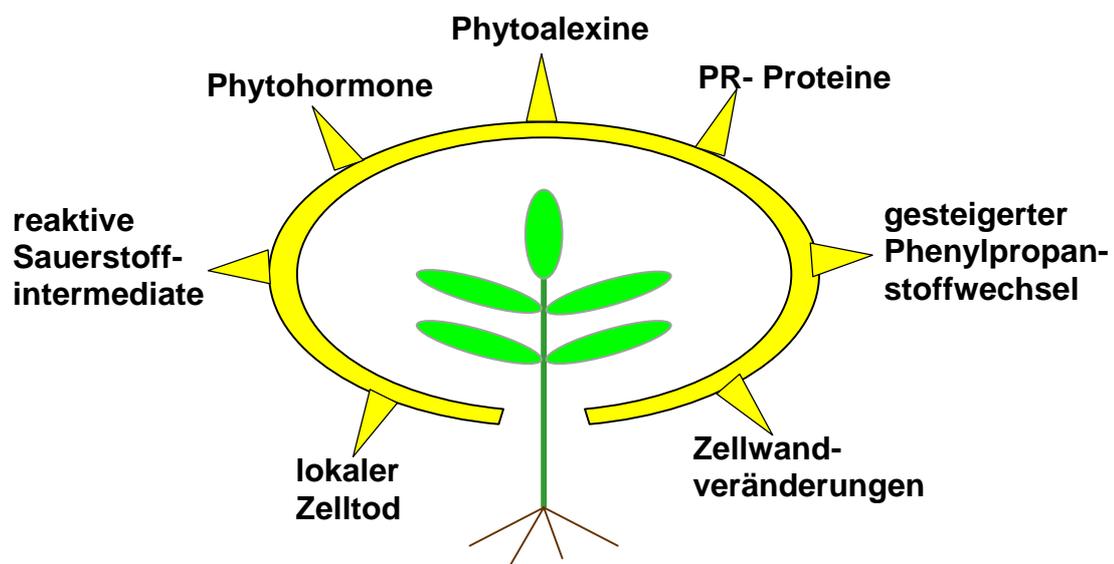


Abb. 37: Schematische Darstellung pflanzlicher Resistenzantworten auf Pathogenbefall.

Ob die beschriebenen Resistenzmechanismen von Pflanzen auch gegenüber holoparasitischen Blütenpflanzen wirksam sind, ist weitgehend ungeklärt, da sich die Forschung bislang auf mikrobielle Pathogene beschränkte. Die Wirksamkeit dieser Mechanismen bei der Resistenz von Tabak gegen *O. ramosa* wird im Folgenden diskutiert.

4.4.1 Akkumulation von Sekundärmetaboliten

4.4.1.1 Phenolakkumulation und Lignifizierung

Die induzierte Synthese von phenolischen Verbindungen ist ein bekannter Mechanismus bei Wirt/Pathogen-Interaktionen (Cahill & McComb 1992; Somssich & Hahlbrock 1998). Als Abwehrreaktion gegen Pektin-auflösende Exoenzyme von *Orobanch*e, wie die Polygalacturonasen (PGasen), werden von resistenten Wirtspflanzen Polyphenole in den Apoplasten ausgeschieden, welche die PGasen hemmen (Friend 1977). Zudem kommt es bei einigen Wirtspflanzen zu einer verstärkten Lignifizierung an der Endodermis und zu einer Auflagerung unbekannter Materialien auf die Zellwände der Wurzel-Haustorium-Interaktion (Dörr *et al.* 1994; Goldwasser *et al.* 1999, 2000).

Phenolische Verbindungen scheinen auch eine zentrale Rolle bei der Resistenz gegen parasitische Blütenpflanzen zu spielen, da sie sich sowohl nach Befall mit *O. ramosa* als auch bei induzierter Resistenz gegen den Parasiten akkumulieren. Des Weiteren zeigen wenig gegen *O. ramosa* anfällige Tabaksorten erhöhte Phenolkonzentrationen (siehe 3.6.1).

Eine gesteigerte Ligninsynthese wurde in Tabakwurzeln nicht beobachtet. Obgleich die Ligninsynthese in anderen Wirt/Orobanch-Systemen als Verteidigungsmechanismus diskutiert wird (Goldwasser *et al.* 2000), kommt ihr im untersuchten Tabak/*O. ramosa* System keine Bedeutung zu.

4.4.1.2 Phytoalexinsynthese

Goldwasser *et al.* (2000) beschrieben, dass bei resistenten Wicken (*Vicia* spp.) mechanische und chemische Barrieren gegen *O. aegyptiaca* gebildet werden, die zu einer Verbräunung an der Verbindungsstelle zwischen Parasit und Wirt führen. Bei resistenten Genotypen wurde die Haustoriumbildung durch Sekretion unidentifizierter Bestandteile an der Wurzelendodermissschicht gestoppt. Auch bei Befall von *O. ramosa* an Tabak kommt es zur Akkumulation von Sekundärmetaboliten am Infektionsort (siehe 3.7.2).

Bei Befall mit Pathogenen werden Phytoalexine in den Wirtspflanzen akkumuliert. Hierbei handelt es sich vornehmlich um Verbindungen aus den Stoffklassen der Phenylpropanoide, Alkaloide und Dipertene (Barik *et al.* 1997; Keinänen *et al.* 2001). Bei den chromatographischen Untersuchungen dieser Studie konnte gezeigt werden, dass in Tabakpflanzen nach Befall mit *O. ramosa* neben dem Alkaloid Nikotin vor allem die Cumarine Scopoletin und Scopolin akkumuliert werden. Zudem wurden diese Verbindungen nach Resistenzinduktion gegen *O. ramosa* durch Bion in Tabakwurzeln angereichert und in der wenig anfälligen Sorte Z 992 verstärkt gebildet. Jurd *et al.* (1971) und Gomez-Vasquez *et al.* (2004) wiesen in ihren Untersuchungen eine toxische, antimikrobielle Wirkung von Scopoletin nach. Churngchow & Rattarasarn (2001) beschrieben Scopoletin als Hauptverteidigungsmechanismus in Kautschuk (*Hevea brasiliensis*) gegenüber dem Pathogen *Phytophthora palmivora*. Keimversuche während dieser Studie (Tab. 11) zeigten, dass Scopoletin die Keimung von *O. ramosa* unterdrücken kann, und dass schon geringe Konzentrationen dieses Phytoalexins die Entwicklung der Radicula von *O. ramosa* beeinträchtigen. Scopoletin könnte somit ein entscheidender Resistenzfaktor von Tabak gegenüber *O. ramosa* sein, da es bereits die frühe Entwicklung des *O. ramosa*-Keimlings beeinträchtigt. Die

Tatsache, dass Scopoletin unter sterilen Versuchsbedingungen nur in infizierten und Bion-behandelten Wurzeln, aber nicht in der Kontrolle, detektiert werden konnte, korreliert mit der Phytotoxizität dieser Verbindung. Erst bei einer Infektion findet ein Flux des nichttoxischen Scopolins in den Apoplasten und seine Transformation in die aktive Form Scopoletin statt (Strack 1997). Scopolin bewirkte folglich auch keine Beeinträchtigung der Keimung und der Radiculaentwicklung.

Als weiterer Sekundärmetabolit konnte Nikotin in Wurzeln der kaum von *O. ramosa* befallenen Tabaksorte Z 992 in höheren Konzentrationen gemessen werden als in Wurzeln der anfälligen Sorte HyV 8. Die Tatsache, dass eine Steigerung der Nikotin-Konzentration auch nach SAR gemessen wurde zeigt, dass Nikotin ein verlässlicher Indikator für induzierte Resistenz bei Tabak ist. Dies verdeutlichen auch Untersuchungen von Baldwin (2001) und Laue *et al.* (2000), die zeigten, dass eine Nikotinsynthese auch nach ISR durch das Resistenz-induzierende Pflanzenhormon JA gesteigert wird. In unseren Experimenten konnten keine negativen Einflüsse auf die Keimung und Radiculaentwicklung von *O. ramosa* nachgewiesen werden. Ob *O. ramosa* in späteren Entwicklungsstadien durch Nikotin beeinträchtigt wird, ist nicht erforscht. Ein möglicher, negativer Effekt des Alkaloids auf die Entwicklung von *O. ramosa* sollte deshalb weiter untersucht werden.

4.4.1.3 Reaktive Sauerstoffintermediate

Als weitere Sekundärmetabolite spielen die ROIs im Rahmen der hypersensitiven Reaktion eine wichtige Rolle. Ihre Akkumulation und Funktion wurde für verschiedene Pflanze-Parasit-Interaktionen, aber auch für die systemisch erworbene Resistenz, beschrieben (Mittler & Lam 1996; Doke *et al.* 1996; Apostol

et al. 1989; Hammond-Kosack & Jones 1996). Kawano (2003) beschrieb in seinem Literaturüberblick, dass die Bildung von ROIs durch extrazelluläre Peroxidasen von SA abhängig ist. Garrido (2003) zeigte, dass Methyljasmonat die Gehalte an H_2O_2 und O_2 , sowie die Sauerstoffaufnahme und die Aktivitäten der NAD(P)H-Oxidase und Peroxidase in den Wurzeln von Sonnenblumen ansteigen lässt.

Inwieweit sich ROIs auch bei der Interaktion von Wirtspflanzen und *Orobanche* akkumulieren, und welche Rolle sie hierbei spielen, ist bislang nicht bekannt. Untersuchungen von Buschmann und Sauerborn (2002) zeigten, dass eine hohe Konzentration von Phenylpropanoiden mit einer Steigerung von reaktiven Sauerstoffspezies in Sonnenblumenwurzeln nach Bion®-Behandlung gegen *O. cumana* korreliert. Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Bion®-Behandlung von Tabakpflanzen reaktive Sauerstoffspezies in der Wirtswurzel akkumuliert werden. Ob die gesteigerten Konzentrationen von ROIs in der Wirtswurzel nach Bion®-Applikation ausreichen, um penetrierende *O. ramosa* abzutöten, bleibt allerdings fraglich, da *O. ramosa* selbst große Mengen an ROIs produziert und über ein starkes antioxidatives System verfügt (siehe 4.2.1). Ein direkter Effekt der von der Wirtswurzel gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies auf *O. ramosa* kann wohl ausgeschlossen werden. Allerdings könnte ein endogener H_2O_2 -Anstieg das Wirtsgewebe lokal absterben lassen und somit die Versorgung von *O. ramosa* durch das Haustorium behindern. Eine Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies bei der Induzierung des lokalen Zelltods wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Overmyer *et al.* 2003; Yoda *et al.* 2003; Ganesh *et al.* 2003; Dat *et al.* 2003). Ob ein lokaler Zelltod allein die schnell wachsenden Haustorien von *O. ramosa* aufhalten kann, ist unklar.

Ebenfalls möglich wäre eine Kombination mit anderen Abwehrmechanismen der Wirtspflanze, die eine Penetration der Wirtswurzel durch *O. ramosa* verlangsamen. So könnten die Zellwände der Wirtspflanze mit Hilfe von Wasserstoffperoxid und Phenolen, wie z.B. Scopoletin, weiter vernetzt werden. Dafür würden die gesteigerten Konzentrationen an gebundenen Phenolen nach SAR sprechen.

4.4.2 Expression und Aktivität von Resistenzenzymen

Bei der Betrachtung der an der Resistenz gegen *O. ramosa* beteiligten Enzyme zeigte sich, dass Peroxidasen, Chitinase und Glukanase nach Behandlung mit Resistenzinduktoren und bei *O. ramosa*-Befall verstärkt exprimiert werden (siehe 3.6.4 und 3.6.6). Die PAL wies hingegen keine Veränderung in ihrer Expression auf. Dass es zu erheblichen PAL-Transkriptmengen in unbehandelten Tabakpflanzen kommt, zeigen auch Ergebnisse von Budde (1999). Es scheint, dass die PAL stets gleichbleibend exprimiert wird und eine Regulation des PAL-Stoffwechsels und damit die Synthese von Lignin, Scopolin, Scopoletin und SA über Aktivitätsänderungen des Enzyms stattfinden. In der vorliegenden Studie konnte ein Anstieg in der Aktivität der PAL nach SAR-Induktion gemessen werden, welcher auch in von *O. ramosa* parasitierten Wurzeln beobachtet wurde. Dass die gesteigerte Wirkung der PAL-Aktivität nach Resistenzinduktion auf einer Aktivitätssteigerung und nicht auf einer verstärkten Expression beruht, postulierten auch Stadnik & Buchenauer (2000) aufgrund ihrer Ergebnisse zur BTH induzierten Resistenz in Weizen gegen *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt). Die zentrale Rolle der PAL bei der Resistenz von Tabak gegen pilzliche und virale Pathogene ist bekannt (Shadle *et al.* 2003). Die hier vorliegenden

Ergebnisse zeigen eine zentrale Funktion der PAL auch bei der Resistenz von Tabak gegenüber parasitischen Blütenpflanzen.

Goldwasser *et al.* (1999) beschrieben, dass neben der Induktion des Phenylpropanoid-Stoffwechsels auch Peroxidasen an der Resistenz von Wicken gegen *O. aegyptiaca* beteiligt sind. Die durchgeführten Sortenversuche zeigen erhöhte Peroxidase-Aktivitäten in wenig von *O. ramosa* parasitierten Tabakkulturen. Um diese Ergebnisse zu spezifizieren, wurden die Wirtsreaktionen vor und nach SAR Induktion verglichen. Nach der Bion®-Behandlung wurden unterschiedliche Peroxidasen exprimiert, und es kam insgesamt zu einer Steigerung der Peroxidase-Aktivität. Bereits Antonova & Terborg (1996) mutmaßten, dass Peroxidasen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Orobanchaceen mit ihren Wirten spielen. Peroxidasen werden als Regulativ für die Phytoalexinproduktion und deren Anreicherung im Apoplasten beschrieben (Gutierrez *et al.* 1995; Buschmann *et al.* 2000). So konnte eine simultane Steigerung von Peroxidasen und Scopoletin als Verwundungsreaktion in Maniok beobachtet werden (Reilly *et al.* 2004). Peroxidasen besitzen in Verbindung mit Scopoletin starke antioxidative Eigenschaften und spielen eine entscheidende Rolle bei der H₂O₂-Detoxifizierung (Chong *et al.* 1999). Scopoletin fungiert hierbei als Elektronendonator. Zudem sind Peroxidasen an der Polymerisation von Scopoletin beteiligt (Gutierrez *et al.* 1995; Edwards *et al.* 1997; Buschmann *et al.* 2000). Peroxidasen könnten somit in Verbindung mit Phenolen wie Scopoletin die Penetration des Parasiten weiter behindern.

Ferner wurden die Enzyme Chitinase und Glukanase nach der Infektion mit *O. ramosa* und nach SAR verstärkt in Tabakwurzel exprimiert. Diese, nur bei Pathogenbefall gebildeten, Proteine sind klare Indikatoren dafür, dass *O. ramosa* von der Wirtspflanze erkannt wird. Allerdings sind diese PR Proteine lediglich

gegen pilzliche Pathogene wirksam und können nicht als Resistenzmechanismen gegen parasitische Wirtspflanzen dienen. Dass HyV8 eine schwächere Expression dieser PR-Proteine im Vergleich zu Z 992 zeigt, deutet auf eine allgemein schwächere Resistenzantwort dieser Sorte hin. Dies wird durch Aussagen von Mitarbeitern der LAP Forchheim und von Landwirten gestützt, nach welchen die Virgin-Sorten weniger widerstandsfähig gegen Schädlinge sind als die DLT-Sorten. Ein Grund für die schwache Widerstandskraft von Virgin-Tabaken gegen Pathogene könnte in den hohen Zuckergehalten dieser Sorten liegen. Es scheint, dass ein geringerer Anteil der Zuckervorräte für den Sekundärmetabolismus genutzt wird und *O. ramosa* ideale Bedingungen für die eigene Entwicklung vorfindet.

4.4.3 Evaluierung von Resistenzgenen

Zur weiteren Betrachtung der beteiligten Stoffwechselwege wurden transgene Linien des Wildtabaks *N. attenuata* auf ihre Anfälligkeit gegenüber *O. ramosa* untersucht. Anhand dieser Untersuchungen konnten erste Erkenntnisse über die an der Resistenz gegen *O. ramosa* beteiligten Genen gewonnen werden. Beispielsweise zeigten *N. attenuata*-Pflanzen mit einem Knockout der Rubisco-Aktivase den geringsten Befall. Dies war insofern zu erwarten, als die holoparasitische *O. ramosa* nicht in der Lage ist, Photosynthese zu betreiben und somit essentiell auf den Zuckertransport vom Wirt angewiesen ist. Press *et al.* (1991) beschrieben zusammenfassend, dass der Verlust der Rubisco-Aktivität bei parasitischen Blütenpflanzen mit der Abhängigkeit vom Wirt korreliert ist. So haben bereits Hemiparasiten deutlich niedrigere Aktivitäten im Vergleich zu nicht parasitischen Pflanzen. Bei holoparasitischen Blütenpflanzen waren keine oder nur noch rudimentäre Aktivitäten der Rubisco messbar.

Ist die CO₂-Fixierung der Wirtspflanze durch eine verminderte Aktivierung der Rubisco gestört, kommt es zu einer ebenfalls verminderten Glukose-Produktion und somit zu einer Unterversorgung von *O. ramosa* mit Zuckermetaboliten. Die zentrale Rolle des Zuckerhaushaltes der Wirtspflanze für *O. ramosa* wird auch dadurch verdeutlicht, dass bei transgenen Linien von *N. attenuata* aus Utah, die einen Defekt im Gal 83-Gen hatten, der höchste *O. ramosa*-Befall festgestellt wurde. Gal 83 ist eine Untereinheit des Proteinkinase-Komplexes SNF1, welcher den Kohlenhydrat- und Fettsäuremetabolismus während Nährstoff- und Umweltstress reguliert (Hardie *et al.* 1998; Roitsch 1999). Hermsmeier *et al.* (2001) diskutierten, dass dem SNF1-Kinase-Komplex eine Funktion bei der Verteilung von Ressourcen bei Pathogen- und Herbivorenbefall zukommt. Dass die SNF1-Proteinkinase die Derepression Glukose-reprimierter Gene regelt, ist bekannt (Celenza & Carlson 1986). An Hefen wurde gezeigt, dass mit einem defekten SNF1-Gen ein Wachstum nur auf Glukose- und Fruktose-Nährmedien beschränkt blieb und eine Nutzung von anderen Kohlenstoffquellen unterdrückt wurde (Krijger 2002). Inwieweit ein veränderter Zuckerhaushalt von Wirtspflanzen die Verfügbarkeit von Kohlenhydraten für *O. ramosa* herabsetzt, ist unklar. Zumindest zeigen erste Ergebnisse, dass eine Veränderung des Kohlenhydratmetabolismus der Wirte von *O. ramosa* Auswirkungen auf die Befallsintensität hatte. Dass die Virgin-Tabake, die sich im Vergleich zu anderen Tabaksorten durch einen stärkeren Kohlenhydratstoffwechsel auszeichnen, zu den am stärksten parasitierten gehören, unterstreicht die zentrale Bedeutung des Zuckerhaushaltes der Wirte bei der Resistenz gegen *O. ramosa*.

Clusteranalysen der verwendeten Linien, basierend auf der durchschnittlichen Biomasseproduktion und der Sproßanzahl von *O. ramosa* ergaben deutliche

Unterschiede zwischen dem Wildtyp und den transgenen Linien AS-WRKY 6, AS-HPL, AS-SYS, AS-ETR1 und AS-ACO.

Eine schnelle, transkriptionelle Aktivierung von Genen spielt eine entscheidende Rolle bei der Resistenz gegenüber Pathogenen. WRKY-Proteine sind an der Aktivierung von SA- und Pathogen-induzierten Genen in Tabak beteiligt (Yang *et al.* (1999); Cheng & Cheng 2000; Ligterink *et al.* 1997; Kroj *et al.* 2003; Kim & Zhang 2004). Transkriptionsfaktoren des WRKY6-Typs könnten somit ebenfalls eine Funktion in der Resistenz gegenüber *O. ramosa* haben.

Allenoxid-Synthase (AOS), Lipoxygenase (LOX) und Hydroperoxid-Lyase (HPL) sind Schlüsselenzyme in der Oxilipin-Signalkaskade, welche eine Rolle bei der JA- und GLV (green leaf volatile)-Synthese spielen. Ihre Funktion in der Antwort auf Herbivorenbefall wurde bereits von Baldwin (2001) beschrieben. Systemin wird von Baldwin (2001) als wichtiges Peptidhormon in der Pathogenantwort diskutiert, welches z. B. die Bildung von Proteasen gegen Herbivorenbefall induziert. Inwieweit Systemin und die Enzyme der Oxilipin-Signalkaskade auch regulierend bei der Resistenz gegenüber parasitischen Blütenpflanzen wirken, bedarf weiterer Studien.

Dass Ethylen ein wichtiges Hormon bei der SA- und JA-induzierten Resistenz gegenüber Pathogenen ist, wurde bereits beschrieben. Vorliegende Ergebnisse zeigen, dass bei Pflanzen mit einem Defekt im Gen des Ethylenrezeptors ETR1 und im Enzym Aminocyclopropancarboxylat-Oxidase (ACO), welches an der Ethylensynthese beteiligt ist, die Entwicklung von *O. ramosa* begünstigt wird. Dies korreliert mit Ergebnissen von Vieira Dos Santos *et al.* (2003), die eine Steigerung von Genen des Ethylenstoffwechsels in *Arabidopsis* bei *O. ramosa*-Befall beobachteten. Zudem wiesen sie eine Steigerung der Expression von LOX- und AOS-Genen nach.

Die Ergebnisse der Versuche mit transgenen Linien von *N. attenuata* sind aufgrund der niedrigen Befallsraten und der hohen Standardabweichungen nur bedingt aussagekräftig. Sie deuten lediglich auf Gene hin, die eine Funktion bei der Resistenz gegen *O. ramosa* einnehmen könnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Klarheit über die Resistenzmechanismen gegen *O. ramosa* zu gewinnen. Hierzu sollten Versuche mit über 20 Parallelen je Tabaklinie durchgeführt werden, um Schwankungen in der Ausprägung der unterdrückten Gene der transgenen Linien zu puffern.

Eine Möglichkeit zur Steigerung der Befallsraten wäre die Verwendung transgener Linien einer tetraploiden Varietät von *N. attenuata*. Warum die verwendete tetraploide Varietät aus Arizona signifikant höhere Befallsraten als die diploide Varietät aus Utah zeigt, ist ungeklärt. Lou & Baldwin (2003) konnten zeigen, dass es zu einer unterschiedlichen Ausprägung von Resistenzmechanismen bei *Nicotiana*-Spezies in Abhängigkeit vom Ploidiegrad kommt. So zeigten diploide Tabakarten niedrigere Nikotingehalte im Vergleich zu Tetraploiden. Diterpene Glykoside und Caffeoylputrescin waren stärker in diploiden Spezies exprimiert. Als Folge der unterschiedlichen Ausprägung der Resistenzantworten war das Wachstum von *Manduca sexta*-Raupen auf diploiden *N. attenuata* geringer, als auf tetraploiden Tabaken.

Die Analyse von an der Resistenzantwort gegen *O. ramosa* beteiligten Genen wies auf eine Vielzahl von beteiligten Stoffwechselwegen hin. Dies verdeutlicht, dass es sich bei der Resistenz gegen *O. ramosa* um ein Netzwerk zahlreicher Verteidigungsmechanismen handelt.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Somssich & Hahlbrock (1998) beschrieben die Pathogenabwehr von Pflanzen als ein „Paradigma biologischer Komplexität“. Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass es zu komplexen Interaktionen zwischen parasitischen Blütenpflanzen und ihren Wirten kommt. Erste Einblicke in die Interaktionen zwischen Tabak und *O. ramosa* zeigten, dass sich nicht nur eine Strategie zur Pathogenabwehr entwickelt hat, sondern eine Vielzahl von Verteidigungsreaktionen aktiviert werden. Zudem können diese Verteidigungsreaktionen durch unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden. Es bleibt zu vermuten, dass nur ein geringer Teil der Strategien mit denen Wirtspflanzen auf parasitische Unkräuter reagieren, erfasst wurde. Insbesondere die komplexen Anpassungen auf zellulärer Ebene, sowie die Wege der Signaltransduktion bei der Resistenz gegen parasitische Blütenpflanzen sind nach wie vor kaum erforscht. Es bedarf weiterer Studien, um dieses Netzwerk der Pathogenresistenz aufzuklären. Hierzu ist es von Vorteil, dass diese Resistenzmechanismen durch chemische und biologische Elicitoren induziert werden können. So zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass eine Resistenz gegen *O. ramosa* in Tabak und Hanf sowohl durch eine JA-abhängige ISR als auch durch eine SA-abhängige SAR induziert werden kann. Das System Tabak/*O. ramosa* bietet demnach die Möglichkeit, Mechanismen der induzierten Resistenz zu klären. Dass es sich bei *O. ramosa* um einen Wurzelparasiten handelt, ist hier von besonderem Interesse, da sich die Forschung seit der Entdeckung induzierter pflanzlicher Antworten vor ca. 30 Jahren hauptsächlich mit Pathogenen an oberirdischen Pflanzenorganen beschäftigt hat (van Dam *et al.* 2003).

Dass eine Induzierung der pflanzeneigenen Abwehrmechanismen gegen parasitische Unkräuter möglich ist, postulierten bereits Sauerborn *et al.* (2002).

Die vorliegende Studie zeigt, dass als Resistenzinduktoren beschriebene Stoffe, wie Stämme des Rhizosphären-Bakteriums *Pseudomonas spp.* (Proradix®), Salicylsäurederivate (Bion®) und Extrakte der marinen Braunalge *Ascophyllum nodosum L.* (Goemar Fruton Spezial®) zur Kontrolle von *O. ramosa* in Hanf- und Tabakkulturen genutzt werden können. Basierend auf den gefundenen Ergebnissen und einer durchschnittlichen Wirtspflanzendichte von 32.000 Pflanzen (Tabak) pro Hektar (Fischbeck *et al.* 1982) müssten bei Feldexperimenten 0,8 kg ha⁻¹ Bion® und 1,6 kg ha⁻¹ Proradix® ausgebracht werden. Die erfolgreiche Anwendung induzierter Resistenz unter Feldbedingungen bewies Bokshi *et al.* (2003) mit einer Bion®- induzierten Resistenz in Kartoffel gegen echten Mehltau und Braunfäule. Perez-de-Luque *et al.* (2004) veröffentlichten kürzlich Studien zum Einsatz von Bion® gegen *O. crenata* im Erbsenanbau. Sie konnten den Befall mit *O. crenata* um 50% reduzieren. Diese Befunde zeigen, dass induzierte Krankheitsresistenz im Pflanzenschutz gegen parasitische Unkräuter von Nutzen sein kann und neben der Erforschung grundlegender Pflanze-/ Parasit-Interaktion auch eine praktikable Anwendung findet.

5 Zusammenfassung

Die holoparasitische Blütenpflanze *Orobanche ramosa* L. verursacht in zunehmendem Maße Ertragsverluste in Kulturpflanzenbeständen gemäßigter und subtropischer Regionen. In Deutschland und Frankreich ist *O. ramosa* im Begriff, neue Gebiete zu besiedeln und könnte künftig stärker als bisher den Anbau von Tabak und Raps sowie anderer Kulturpflanzen beeinträchtigen. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Biologie und Pathogenität von *O. ramosa* unter besonderer Berücksichtigung der Interaktionen mit ihren Wirten durchgeführt. Zudem war die Betrachtung induzierbarer Abwehrmechanismen gegen *O. ramosa* von Interesse.

In der vorgelegten Studie konnte zunächst gezeigt werden, dass sich die in Deutschland vorkommenden Populationen von *O. ramosa* genetisch unterscheiden und sich durch ein teilweise unterschiedliches Wirtsspektrum auszeichnen.

Als möglicher Pathogenitätsfaktor von *O. ramosa* wurde eine starke Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies gefunden, die mit einer hohen Peroxidase-Aktivität und einer hohen antioxidativen Kapazität durch die Phenylpropanoide Verbascosid und Oraposid in Verbindung stand.

Zur Erforschung der Abwehrmechanismen von Wirtspflanzen gegen *O. ramosa* wurden Resistenzaktivatoren an dem System *Nicotiana tabacum*/*O. ramosa* erfolgreich getestet. Induzierte Resistenz gegen *O. ramosa* konnte sowohl durch eine Salicylsäure-abhängige systemisch erworbene Resistenz (SAR), als auch durch eine Jasmonat-abhängige induzierte systemische Resistenz (ISR) gefördert werden.

Als Resistenzfaktoren gegen *O. ramosa* kommen die Phytoalexine Scopoletin und dessen Synthesevorstufe Scopolin, sowie das Alkaloid Nikotin in Frage, die

in wenig anfälligen Tabaksorten in höheren Konzentrationen akkumuliert wurden als in anfälligen. Zudem zeigte die wenig anfällige Tabaksorte Z 992 höhere Phenolgehalte und eine gesteigerte Peroxidase Aktivität. Nach induzierter Resistenz gegen *O. ramosa* konnten zusätzlich eine gesteigerte Phenylalanin-Amonium-Lyase-Aktivität und die Expression der PR-Proteine Chitinase und Glukanase gemessen werden.

Des weiteren konnte an transgenen Tabaklinien gezeigt werden, dass sowohl dem Pflanzenhormon Ethylen als auch dem Zuckerhaushalt eine Bedeutung bei der Anfälligkeit gegen *O. ramosa* zukommen kann.

6 Literaturverzeichnis

- Alexander D, Goodman RM, Gutrella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahlgoy P, Luntz T, Ward E and others. 1993. Increased tolerance to 2 Oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related Protein-1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(15):7327-7331.
- Antoniw JF, Pierpoint WS. 1978. Purification of a tobacco leaf protein associated with resistance to virus infection. *Biochemical Society Transaction* 6:248-250.
- Antonova TS, Terborg SJ. 1996. The role of peroxidase in the resistance of sunflower against *Orobanche cumana* in Russia. *Weed Research* 36(2):113-121.
- Apostol I, Heinsteins PF, Low PS. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: Role in defence and signal transduction. *Plant Physiology* 90:109-116.
- Aucho EA, Audenaert K, Meziane H, Höfte M. 2004. The salicylic acid-dependent defence pathway is effective against different pathogen in tomato and tobacco. *Plant Pathology* 53:65-72.
- Auclair C, Voisin E. 1985. Nitroblue tetrazolium reduction. In: Greenwald RA, editor. *CRC Handbook of Method for Oxygen Radical Research*. FL: CRC Press Inc. p 123-132.
- Audenaert K, De Meyer GB, Hofte MM. 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. *Plant Physiology* 128(2):491-501.
- Baldwin IT. 2001. An ecologically motivated analysis of plant-herbivore interactions in native tobacco. *Plant Physiology* 127:1449-1458.
- Bar Nun N, BenHod G, Lavi E, Mayer AM. 1996. Purification of pectin methylesterase from *Orobanche aegyptiaca*. *Phytochemistry* 41(2):403-406.
- Bar Nun N, Plakhine D, Joel DM, Mayer AM. 2003. Changes in the activity of the alternative oxidase in *Orobanche* seeds during conditioning and their possible physiological function. *Phytochemistry* 64(1):235-241.
- Barik BR, Dey AK, Kundu AB. 1997. Chemical constituents of *Cannabis sativa*. *Journal of the Indian Chemical Society* 74(8):652-652.

- Bazzi C, Messina C, Tortoreto L, Bini F, Cecca GS, Stefani E. 2003. Investigations on the possible use of abiotic and biotic elicitors in defence-related responses in plants. *European Journal of Horticultural Science* 68(3):115-122.
- Benharrat H, Veronesi C, Theodet C, Thalouarn P. 2002. *Orobanche* species and population discrimination using Intersimple Sequence Repeat (ISSR). *Weed Research* 42(6):470-475.
- Blake MS, Johnston KH, Rusell-Jones GJ, Gotschlich EC. 1984. A rapid, sensitive method for detection of alkaline phosphate-conjugated anti-body on Western blots. *Analytical Biochemistry* 136:175-179.
- Bokshi AI, Morris SC, Deverall BJ. 2003. Effects of benzothiadiazole and acetylsalicylic acid on β -1,3-glucanase activity and disease resistance in potato. *Plant Pathology* 52:22-27.
- Bornet B, Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers: Reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:209-215.
- Bradley DJ, Kjellbom P, Lamb CJ. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative crosslinking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* (70):21-30.
- Budde IP. 1999. Molekularbiologische und physiologische Untersuchungen zum Einfluß der Temperatur auf die Interaktion von *Pseudomonas syringae* mit Wirts- und Nichtwirtspflanzen [Dissertation]. Marburg/Lahn: Philipps-Universität Marburg.
- Buschmann H. 2004. Hanftod, Tabakwürger - bald auch eine Bedrohung für den Raps? Das parasitische Unkraut *Orobanche ramosa* auf dem Vormarsch. *Gesunde Pflanze* 56:39-47.
- Buschmann H, Kömle S, Gonsior G, Sauerborn J. 2005. Susceptibility of oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *napus*) to branched broomrape (*Orobanche ramosa* L.). *Journal of Plant Diseases and Protection* 112 (1):65-70.
- Buschmann H, Rodriguez MX, Tohme J, Beeching JR. 2000. Accumulation of hydroxycoumarins during post-harvest deterioration of tuberous roots of Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Annals of Botany* 86(6):1153-1160.

- Buschmann H, Sauerborn J. 2002. Induced resistance in sunflower against *Orobanche cumana*. *Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases*. IOBC/wprs Bulletin 25(6):145-148.
- Cahill DM, McComb JA. 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40:315-332.
- Castelluccio C, Paganga G, Melikian N, Bolwell GP, Pridham J, Sampson J, Riceevans C. 1995. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher-plants. *FEBS Letters* 368(1):188-192.
- Celenza JL, Carlson M. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 223:1175-1180.
- Charter AO, Webb DA. 1972. *Orobanche*. *Flora Europaea* 3:286-293.
- Chen C, Chen Z. 2000. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology* 42:387-396.
- Chester K. 1933. The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review in Biology* 8:129-154, 275-324.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu J-K. 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 55(395):225-236.
- Chong J, Baltz R, Fritig B, Saindrenan P. 1999. An early salicylic acid-, pathogen- and elicitor-inducible tobacco glucosyltransferase: role in compartmentalization of phenolics and H₂O₂ metabolism. *FEBS Letters* 458(2):204-208.
- Churngchow N, Rattarasarn M. 2001. Biosynthesis of scopoletin in *Hevea brasiliensis* leaves inoculated with *Phytophthora palmivora*. *Journal of Plant Physiology* 158(7):875-882.
- Cipollini D, Enright S, Traw MB, Bergelson J. 2004. Salicylic acid inhibits jasmonic acid-induced resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Spodoptera exigua*. *Molecular Ecology*. 13:1643-1653.

- Cole DL. 1999. The efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. *Crop Protection* 18(4):267-273.
- Conrath U, Pieterse CMJ, Mauch-Mani B. 2002. Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science* 7(5):210-216.
- Conrath U, Silva H, Klessig DF. 1997. Protein dephosphorylation mediates salicylic acid-induced expression of PR-1 genes in tobacco. *Plant Journal* 11(4):747-757.
- Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S. 2003. Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology* 51(1):109-118.
- Dat JF, Pellinen R, Beeckman T, Van de Cotte B, Langebartels C, Kangasjarvi J, Inze D, Van Breusegem F. 2003. Changes in hydrogen peroxide homeostasis trigger an active cell death process in tobacco. *Plant Journal* 33(4):621-632.
- Dehne HW, Stenzel K, Schonbeck F. 1984. The efficiency of induced resistance under practical culture conditions. 3. Reproduction of powdery mildew on induced resistant plants. *Journal of Plant Diseases and Protection* 91(3):258-265.
- Dixon RA. 1986. The phytoalexin response - elicitation, signaling and control of host gene-expression. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 61(3):239-291.
- Dixon RA, Dey PM, Lamb CJ. 1983a. Phytoalexins - enzymology and molecular-biology. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 55:1-136.
- Dixon RA, Dey PM, Lawton MA, Lamb CJ. 1983b. Phytoalexin Induction in French bean - intercellular transmission of elicitation in cell-suspension cultures and hypocotyl sections of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology* 71(2):251-256.
- Doke N, Miura Y, Sanchez LM, Park HJ, Noritake T, Yoshioka H, Kawakita K. 1996. The oxidative burst protects plants against pathogen attack: Mechanism and role as an emergency signal for plant bio-defence - A review. *Gene* 179(1):45-51.

- Dörr I, Staack A, Kollmann R. 1994. Resistance of *Helianthus* to *Orobanche* - Histological and cytological Studies. Biology and management of *Orobanche*. Proceedings of the Third International Workshop on *Orobanche* and related *Striga* Research. p 276-289.
- Durango D, Quinones W, Torres F, Rosero Y, Gil J, Echeverri F. 2002. Phytoalexin accumulation in Colombian bean varieties and aminosugars as elicitors. *Molecules* 7(11):817-832.
- Ebel J. 1986. Phytoalexin synthesis - the biochemical-analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology* 24:235-264.
- Eckert WA, Kartenbeck J. 1997. Proteine: Standardmethoden der Molekular- und Zellbiologie: Präparation, Gelelektrophorese, Membrantransfer und Immundetektion. Berlin, Heidelberg: Springer. 275 p.
- Edwards R, Stones SM, Gutierrez Mellado MC, Jorin J. 1997. Characterization and inducibility of a scopoletin-degrading enzyme from sunflower. *Phytochemistry* 45(6):1109-1114.
- Ferrarese MLL, Rodrigues JD, Ferrarese-Filho O. 2000. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean root extract measured by reverse-phase high performance liquid chromatography. *Plant Biology* 2:152-153.
- Fischbeck G, Heyland K-U, Knauer N. 1982. Spezieller Pflanzenbau. Stuttgart: Ulmer. 394 p.
- Friedrich L, Lawton K, Ruess W, Masner P, Specker N, Rella MG, Meier B, Dincher S, Staub T, Uknes S and others. 1996. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal* 10(1):61-70.
- Friend J. 1977. Phenolic substances and plant disease. Recent advances in *Phytochemistry* 12:557-588.
- Fuchs-Eckert HP. 1987. Zur Situation von *Orobanche ramosa* LINNAEUS (Hanfwürger, Tabaktod, ästige Sommerwurz) in der Schweiz. Jahresbericht der Naturforschenden Gesellschaft Graubünden 104:127-157.
- Ganesh KA, Iwahashi H, Rakwal R. 2003. Small GTPase `Rop`: molecular switch for plant defense responses. *FEBS Letters* 546:173-180.
- Garrido I, Espinosa F, Cordoba-Pedregosa MC, Gonzalez-Reyes JA, Alvarez-Tinaut MC. 2003. Redox-related peroxidative responses evoked by methyl-

- jasmonate in axenically cultured aeroponic sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedling roots. *Protoplasma* 221(1-2):79-91.
- Gibot-Leclerc S, Brault M, Pinochet X, Salle G. 2003. Potential role of winter rape weeds in the extension of broomrape in Poitou-Charentes. *Comptes Rendus Biologies* 326(7):645-658.
- Gibot-Leclerc S, Tuquet C, Corbineau F, Arjauré G, Sallé G. 2001. New insights on *Orobanche ramosa* L. parasiting oilseed rape in western part of France. 7th International Parasitic Weed Symposium.
- Gilli A. 1974. Bestimmungsschlüssel der mitteleuropäischen Varietäten und Formen von *Orobanche*. In: Heg G, editor. *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*. Berlin u. Hamburg: p 172-181.
- Goldwasser Y, Hershenhorn J, Plakhine D, Kleifeld Y, Rubin B. 1999. Biochemical factors involved in vetch resistance to *Orobanche aegyptiaca*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:87-96.
- Goldwasser Y, Plakhine D, Kleifeld Y, Zamski E, Rubin B. 2000. The differential susceptibility of vetch (*Vicia* spp.) to *Orobanche aegyptiaca*: Anatomical studies. *Annals of Botany* 85:257-262.
- Gomez-Vasquez R, Day R, Buschmann H, Randles S, Beeching JR, Cooper RM. 2004. Phenylpropanoids, phenylalanine ammonia lyase and peroxidases in elicitor-challenged Cassava (*Manihot esculenta*) suspension cells and leaves. *Annals of Botany* 94:1-11.
- Görlach J, Volrath S, Knauf-Beiter G, Hengy G, Beckhove U, Kogel KH, Oostendorp M, Staub T, Ward E, Kessmann H and others. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell* 8:629-643.
- Gozzo F. 2003. Systemic acquired resistance in crop protection: From nature to a chemical approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16):4487-4503.
- Grace SC, Logan BA. 2000. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 355(1402):1499-1510.
- Griesebach H, Ebel J. 1987. Phytoalexine, chemische Abwehrstoffe höherer Pflanzen? *Angewandte Chemie* 90:668-681.

- Gutierrez MC, Parry A, Tena M, Jorin J, Edwards R. 1995. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. *Phytochemistry* 38(5):1185-1191.
- Hahlbrock K, Scheel D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369.
- Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Palaeontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. http://palaeoelectonica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- Hammerschmidt R. 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2):77-84.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG. 1996. Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8(10):1773-1791.
- Hardie DG, Carling D, Carlson M. 1998. The AMP-activated/ SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annual Review of Biochemistry* 67:821-855.
- Heil M. 1999. Systemic acquired resistance: Available information and open ecological questions. *Journal of Ecology* 87(2):341-346.
- Heller R. 2002. *Striga*-Resistenz in *Sorghum bicolor* und genetische Variabilität von *Striga hermonthica* [Dissertation]. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität.
- Hermsmeier D, Schittko U, Baldwin IT. 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata* L.. Large-scale changes in the accumulation of growth- and defense-related plants mRNAs. *Plant Physiology* 125:683-700.
- Iriti M, Faoro F. 2003. Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 151(3):171-180.
- Joel DM, Portnoy VH. 1998. The angiospermous root parasite *Orobanche* L. (Orobanchaceae) induces expression of a pathogenesis related (PR) gene in susceptible tobacco roots. *Annals of Botany* 81(6):779-781.
- Jurd L, Corse J, King AD, Bayne H, Mihara K. 1971. Antimicrobial properties of 6,7-dihydroxy-, 7,8-dihydroxy-, 6-hydroxy- and 8-hydroxycoumarins. *Phytochemistry* 10:2971-2974.

- Katz VA, Thulke OU, Conrath U. 1998. A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiology* 117(4):1333-1339.
- Kauss H. 1987. Callose-Synthese: Regulation durch induzierten Ca^{2+} -Einstrom in Pflanzenzellen. *Naturwissenschaften* 74:275-281.
- Kawano T. 2003. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports* 21(9):829-837.
- Keinänen M, Oldham NJ, Baldwin IT. 2001. Rapid HPLC screening of jasmonate-induced increases in tobacco alkaloids, phenolics and diterpene glycosides in *Nicotiana attenuata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8):3553-3558.
- Kessmann H, Staub T, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, Uknes S, Ryals J. 1994a. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32:439-459.
- Kessmann H, Staub T, Ligon J, Oostendorp M, Ryals J. 1994b. Activation of systemic acquired disease resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 100(6):359-369.
- Keyes WJ, O'Malley RC, Kim D, Lynn DG. 2000. Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: Xenognosin generation, perception, and response. *Journal of Plant Growth Regulation* 19:217-231.
- Keyes WJ, Taylor JV, Apkarian RP, Lynn DG. 2001. Dancing together. Social controls in parasitic plant development. *Plant Physiology* 127:1508-1512.
- Kim CY, Zwang S. 2004. Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *The Plant Journal* 38:142-151.
- Kim DJ, Kocz R, Boone L, Keyes WJ, Lynn DG. 1998. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chemistry & Biology* 5(2):103-117.
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin JC, Kloareg B, Fritig B. 2003. Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16(2):115-122.

- Koch L. 1887. Die Entwicklungsgeschichte der *Orobanchen*, mit besonderer Berücksichtigung ihrer Beziehung zu den Kulturpflanzen. Heidelberg: Carl Winter's Universitätsbuchhandlung.
- Kogel KH, Beckhove U, Dreschers J, Munch S, Romme Y. 1994. Acquired-resistance in barley - The resistance mechanism induced by 2,6-Dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance. *Plant Physiology* 106(4):1269-1277.
- Kohler A, Schwindling S, Conrath U. 2002. Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 128(3):1046-1056.
- Kojic M, Masirevic S, Jovanovic D. 2001. Distribution and biodiversity of broomrape (*Orobanche* L.) worldwide and in Serbia. *Helia* 35:73-92.
- Korth KL, Blount JW, Cheng F, Rasmussen S, Lamb C, Dixon RA. 2001. Changes in phenylpropanoid metabolites associated with homology-dependent silencing of phenylalanine ammonia-lyase and its somatic reversion in tobacco. *Physiologia Plantarum* 111:137-149.
- Krijger J-J. 2002. Carbon source-responsive elements and gene regulation by CAT 8 and SIP4 in the yeast *Kluyveromyces lactis* [Dissertation]. Halle: Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Kroj T, Rudd JJ, Nürnberger T, Gabler Y, Lee J, Scheel D. 2003. Mitogen-activated protein kinases play an essential role in oxidative burst-independent expression of pathogenesis-related genes in parsley. *Journal of Biological Chemistry* 278(4):2256-2264.
- Krügel T, Lim M, Gase K, Halitschke R, Baldwin IT. 2002. Agrobacterium-mediated transformation of *Nicotiana attenuata*, a model ecological expression system. *Chemoecology* 12:177-183.
- Kuijt J. 1969. The biology of parasitic flowering plants. Berkeley, CA: University of California Press.
- Laue G, Preston CA, Baldwin IT. 2000. Fast track to the trichome: induction of N-acetyl nornicotines precedes nicotine induction in *Nicotiana repanda*. *Planta* 210:510-514.

- Lewis NG, Yamato E. 1990. Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 41:455-496.
- Ligterink W, Kroj T, zur Nieden U, Hirt H, Scheel D. 1997. Receptor-mediated activation of MAP kinase in pathogen defence of plants. Science 276:2054-2057.
- Linke KH, Sauerborn J, Saxena MC. 1989. *Orobanche* Field Guide. Parasitic Weeds Collaborative Research Program, University of Hohenheim, Institute of Plant Production in the Tropics and Subtropics, and International Center for Agricultural Research in Dry Areas (ICARDA), Aleppo, Syria, 42 p.
- Linke KH, Vogt W. 1987. A method and its application for observing germination and early development of *Striga* (Scrophulariaceae) and *Orobanche* (Orobanchaceae). In: HChr Weber & Forstreuter (eds.), Proceedings, 4th Int. Symposium on Parasitic Flowering Plants, Marburg, Germany, 501-509.
- Losner-Goshen D, Portnoy VH, Mayer AM, Joel DM. 1998. Pectolytic activity by the haustorium of the parasitic plant *Orobanche* L. (*Orobanchaceae*) in host roots. Annals of Botany 81(2):319-326.
- Lou Y, Baldwin IT. 2003. *Manduca sexta* recognition and resistance among allopolyploid *Nicotiana* host plants. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America 100(2):14581-14586.
- Lucas JA. 1999. Plant immunisation: from myth to SAR. Pesticide Science 55(2):193-196.
- Mangnus EM, Zwanenburg B. 1992. Tentative molecular mechanism for germination stimulation of *Striga* and *Orobanche* seeds by Strigol and its synthetic analogs. Journal of Agricultural and Food Chemistry 40(6):1066-1070.
- Mauch-Mani B, Metraux JP. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. Annals of Botany 82(5):535-540.
- Metraux JP, Nawrath C, Genoud T. 2002. Systemic acquired resistance. Euphytica 124(2):237-243.
- Metraux JP. 2002. Recent breakthroughs in the study of salicylic acid biosynthesis. Trends in Plant Science 7: 332-334.
- Mittler R, Lam E. 1996. Sacrifice in the face of foes: Pathogen-induced programmed cell death in plants. Trends in Microbiology 4(1):10-15.

- Montesano M, Hyytiainen H, Wettstein R, Palva ET. 2003. A novel potato defence-related alcohol: NADP(+) oxidoreductase induced in response to *Erwinia carotovora*. *Plant Molecular Biology* 52(1):177-189.
- Mou Z, Fan WH, Dong XN. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113(7):935-944.
- Musselman LJ. 1987. Parasitic Plants in World Agriculture. International Botanical Congress Abstracts 17.
- Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S. 2003. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice. *Plant Journal* 33(5):887-898.
- Nakashita H, Yoshioka K, Yasuda M, Nitta T, Arai Y, Yoshida S, Yamaguchi I. 2002. Probenazole induces systemic acquired resistance in tobacco through salicylic acid accumulation. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(4):197-203.
- Oostendorp M, Kunz W, Dietrich B, Staub T. 2001. Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology* 107(1):19-28.
- Overmyer K, Brosche M, Kangasjarvi J. 2003. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. *Trends in Plant Science* 8(7):335-342.
- Pageau K, Rousset A, Simier P, Delavault P, Zehhar N, Fer A. 2000. Special features of mechanisms controlling germination and carbon and nitrogen metabolism in two parasitic angiosperms: *Striga hermonthica* and *Orobancha ramosa*. *Comptes Rendus de l'Academie d'Agriculture de France* 86(8):69-84.
- Parker C, Riches CR. 1993. Parasitic weeds of the world: Biology and Control. Wallingford, Oxon, UK: CAB international. 332 p.
- Parker C, Wilson AK. 1986. Parasitic weeds and their control in the near-East. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Plant Protection Bulletin 34(2):83-98.
- Peng M, Kuc J. 1992. Peroxidase generated hydrogen peroxide as source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology* 82:696-699.

- Perez L, Rodriguez ME, Rodriguez F, Roson C. 2003. Efficacy of acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f. sp. *tabacina*. *Crop Protection* 22(2):405-413.
- Perez-de-Luque A, Jorin JV, Rubiales D. 2004. Crenate broomrape control in pea by foliar application of benzothiadiazole (BTH). *Phytoparasitica* 32(1):21-29.
- Pieterse AH. 1979. The broomrapes (*Orobanchaceae*). A review. *Abstracts of Tropical Agriculture* 5:9-35.
- Pieterse AH, Pesch CJ. 1983. The witchweeds (*Striga* spp.). A review. *Abstracts of Tropical Agriculture* 9:9-37.
- Pieterse CMJ, van Loon LC. 1999. Salicylic acid-independent plant defence pathways. *Trends in Plant Science* 4(2):52-58.
- Pieterse CMJ, Van Wees SCM, Ton J, Van Pelt JA, Van Loon LC. 2002. Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 4(5):535-544.
- Press MC, Graves JD. 1995. Parasitic plants. London: Chapman & Hall. 292 p.
- Press MC, Schmith S, Stewart GR. 1991. Carbon acquisition and assimilation in parasitic plants. *Functional Ecology* 5:278-283.
- Pusch J. 1996. Die Sommerwurzarten des ehemaligen Kreises Artern. *Schutzreport* 12:6-62.
- Pusch J, Barthel K-J. 1992. Über Merkmale und Verbreitung der Gattung *Orobanche* L. in den östlichen Bundesländern Deutschlands. *Gleditschia* 20(1):33-56.
- Ramaiah KV. 1987. Control of *Striga* and *Orobanche* species - A review. In: Weber HC, Forstreuter W, editors. Parasitic Flowering Plants. Marburg: Phillips-Universität. p 637-664.
- Reilly K, Gomez-Vasquez R, Buschmann H, Tohme J, Beeching JR. 2004. Oxidative stress responses during cassava post-harvest physiological deterioration. *Plant Molecular Biology* 53:669-685.
- Ride JP. 1983. Cell walls and other structural barriers in defense. In: Callow JA, editor. *Biochemical Plant Pathology*. New York: John Wiley & Sons. p 215-236.

- Roemmelt S, Zimmermann N, Rademacher W, Treutter D. 2003. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* 64:709-716.
- Roitsch T. 1999. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2:198-206.
- Román B, Alfaro C, Torres AM, Moreno MT, Satovic Z, Pujadas A, Rubiales D. 2003. Genetic relationships among *Orobanche* species as revealed by RAPD analysis. *Annals of Botany* 91(6):637-642.
- Rubiales D, Alcantara C, Sillero JC. 2003. Variations in resistance to *Orobanche crenata* in species of *Cicer*. *Weed Research* 44:27-32.
- Sarma BK, Singh DP, Mehta S, Singh HB, Singh UP. 2002. Plant growth-promoting rhizobacteria-elicited alterations in phenolic profile of chickpea (*Cicer arietinum*) infected by *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift* 150:277-282.
- Sauerborn J. 1991a. Parasitic flowering plants: Ecology and management. Weikersheim, Germany: Josef Margraf Verlag. 127 p.
- Sauerborn J. 1991b. Parasitic flowering plants in agricultural ecosystems of West Asia. In: *Flora et Vegetatio Mundi, Band IX. Contributiones selectae ad floram et vegetationem orientis; Third Plant Life of Southwest Asia Symposium*, Berlin, Germany, 83-93.
- Sauerborn J, Buschmann H, Ghiasi KG, Kogel KH. 2002. Benzothiadiazole activates resistance in sunflower (*Helianthus annuus*) to the root-parasitic weed *Orobanche cumana*. *Phytopathology* 92(1):59-64.
- Scarponi L, Buonauro R, Martinetti L. 2001. Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Pest Management Science* 57(3):262-268.
- Scherf BA, Bajar AM, Kolattukudy PE. 1993. Abolition of an inducible highly anionic peroxidase activity in transgenic tomato. *Plant Physiology* 101:201-208.
- Schneeweiss GM, Colwell A, Park JM, Jang CG, Stuessy TF. 2004. Phylogeny of holoparasitic *Orobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from nuclear ITS sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30(2):465-478.

- Shadle GL, Wesley SV, Korth KL, Chen F, Lamb C, Dixon RA. 2003. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of L-phenylalanine ammonia-lyase. *Phytochemistry* 64(1):153-161.
- Shiraishi T, Yamada T, Saitoh K, Kato T, Toyoda K, Yoshioka H, Kim HM, Ichinose Y, Tahara M, Oku H. 1994. Suppressors - determinants of specificity produced by plant-pathogens. *Plant and Cell Physiology* 35(8):1107-1119.
- Singh A, Singh M. 1993. Cell wall degrading enzymes in *Orobanche aegyptiaca* and its host *Brassica campestris*. *Physiologia Plantarum* 89(1):177-181.
- Somssich IE, Hahlbrock K. 1998. Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3(3):86-90.
- Spoel SH, Koornneef A, Claessens SMC, Korzelius JP, Van Pelt JA, Mueller MJ, Buchala AJ, Metraux JP, Brown R, Kazan K and others. 2003. NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate- dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell* 15(3):760-770.
- Spring O, Buschmann H, Vogler B, Schilling EE, Spraul M, Hoffmann M. 1995. Sesquiterpene lactone chemistry of *Zaluzania grayana* from online LC-NMR Measurements. *Phytochemistry* 39(3):909-612.
- Stadnik MJ, Buchenauer H. 2000. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57(1):25-34.
- Stewart GR, Press MC. 1990. The physiology and biochemistry of parasitic angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41:127-151.
- Stichler L, Mauch-Mani B, Métraux JP. 1997. Systemic acquired resistance. *Annual Review of Phytopathology* 35:235-270.
- Strack D. 1997. Phenolic metabolism. In: Dey PM, Harborne JB, editors. *Plant biochemistry*. London: Academic Press Ltd. p 387-416.
- Suo Y, Leung DWM. 2002. BTH-induced accumulation of extracellular proteins and blackspot disease in rose. *Biologia Plantarum* 45(2):273-279.

- Taylor JE, Hatcher PE, Paul ND. 2004. Crosstalk between plant responses to pathogens and herbivores: a view from the outside. *Journal of Experimental Botany* 55(395):159-168.
- Taylor JE, McAinsh R. 2004. Signalling crosstalk in plants: emerging issues. *Journal of Experimental Botany* 55(395):147-149.
- Thordal-Christensen H, Zhang ZG, Wei YD, Collinge DB. 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley- powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11(6):1187-1194.
- Tosi L, Zizzerini A. 2000. Interactions between *Plasmopara helianthi*, *Glomus mosseae* and two plant activators in sunflower plants. *European Journal of Plant Pathology* 106(8):735-744.
- Tuzun S. 2001. The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. *European Journal of Plant Pathology* 107(1):85-93.
- van Dam NM, Harvey JA, Wäckers FL, Bezemer T, van der Putten WH, Vet LEM. 2003. Interactions between aboveground and belowground induced responses against phytophages. *Basic and Applied Ecology* 4:63-77.
- Van der Berg BM, Chibbar RN, Van Huystee RB. 1983. A comparative study of a cationic peroxidase from peanut and an anionic peroxidase from Petunia. *Plant Cell Reports* 2:304-307.
- Van Gestelen P, Asard H, Horemans N, Caubergs RJ. 1998. Superoxide-producing NAD(P)H oxidases in plasma membrane vesicles from elicitor responsive bean plants. *Physiologia Plantarum* 104(4):653-660.
- Van Loon LC, Pierpoint WS, Boller T, Conejero V. 1994. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:245-264.
- Van Loon LC, Van Strien EA. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(2):85-97.
- Van't Slot KAE, Knogge W. 2002. A dual role for microbial pathogen-derived effector proteins in plant disease and resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 21(3):229-271.

- Verberne MC, Hoekstra J, Bol JF, Linthorst HJM. 2003. Signaling of systemic acquired resistance in tobacco depends on ethylene perception. *Plant Journal* 35(1):27-32.
- Viera Dos Santos CV, Letousey P, Delavault P, Thalouarn P. 2003. Defense gene expression analysis of *Arabidopsis thaliana* parasitized by *Orobanche ramosa*. *Phytopathology* 93(4):451-457.
- Viron C, Lhermite S, Andre P, Lafosse M. 1998. Isolation of phenylpropanoid glycosides from *Orobanche rapum* by high speed countercurrent chromatography. *Phytochemical Analysis* 9(1):39-43.
- Vogler B, Spring O. 2000. Application of LC-NMR measurements in phytochemical studies. *Recent Research Developments in Phytochemistry* 4:207-222.
- Walter MH. 1992. Regulation of lignification in defense. In: Boller T, Meins F, editors. *Genes involved in plant defense*. New York: Springer-Verlag. p 327-352.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahlgoy P, Metraux JP, Ryals JA. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired-resistance. *Plant Cell* 3(10):1085-1094.
- Wegmann K. 1986. Biochemistry of osmoregulation and possible reasons of resistance against *Orobanche*. In: S.J. Terborg, editor. *Proceedings of a Workshop on Biology and Control of Orobanche*. Wageningen, NL: p 107-113.
- Wegmann K. 1999. Die Orobanche und Möglichkeit der Bekämpfung im deutschen Tabakbau. *Der Deutsche Tabakbau* 78(6):11-13.
- Yang PZ, Chen CH, Wang ZP, Fan BF, Chen ZX. 1999. A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter. *Plant Journal* 18(2):141-149.
- Yoda H, Yamaguchi Y, Sano H. 2003. Induction of hypersensitive cell death by hydrogen peroxide produced through polyamine degradation in tobacco plants. *Plant Physiology* 132(4):1973-1981.

- Zehhar N, Ingouff M, Bouya D, Fer A. 2002. Possible involvement of gibberellins and ethylene in *Orobancha ramosa* germination. *Weed Research (Oxford)* 42(6):464-469.
- Zehhar N, Labrousse P, Arnaud MC, Boulet C, Bouya D, Fer A. 2003. Study of resistance to *Orobancha ramosa* in host (oilseed rape and carrot) and non-host (maize) plants. *European Journal of Plant Pathology* 109(1):75-82.
- Ziadi S, Barbedette S, Godard JF, Monot C, Le Corre D, Silue D. 2001. Production of pathogenesis-related proteins in the cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*) - downy mildew (*Peronospora parasitica*) pathosystem treated with acibenzolar-S-methyl. *Plant Pathology* 50(5):579-586.

6 Anhang

Standardkurven

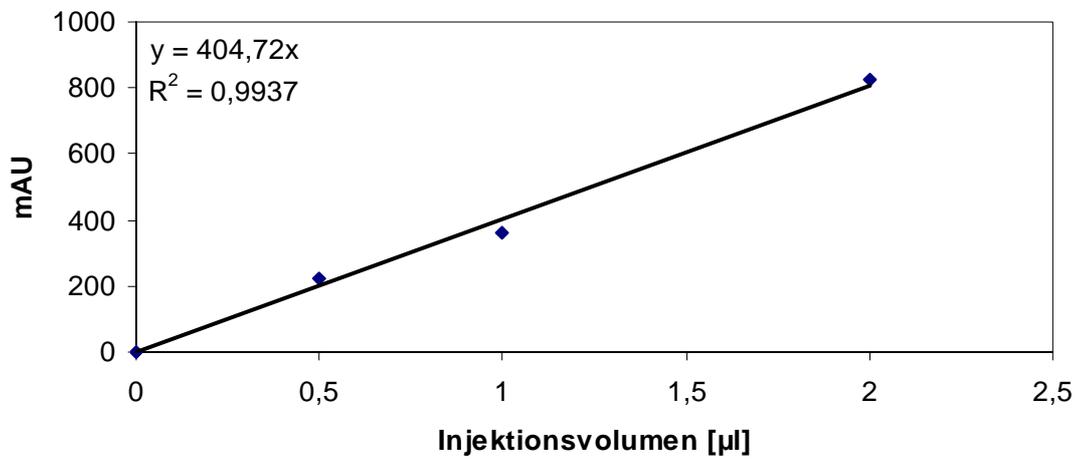


Abb. 38: Standardkurve von Nikotin (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 254 nm

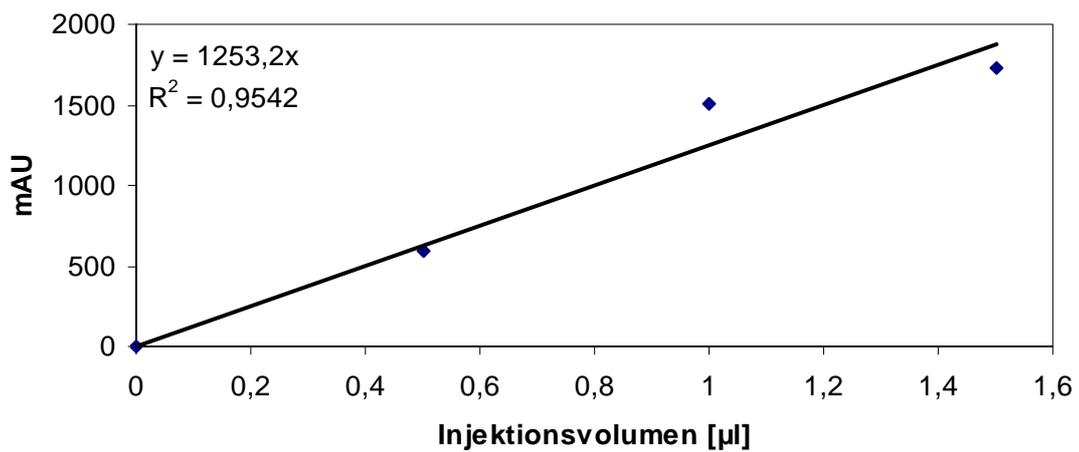


Abb. 39: Standardkurve von Scopoletin (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 210 nm

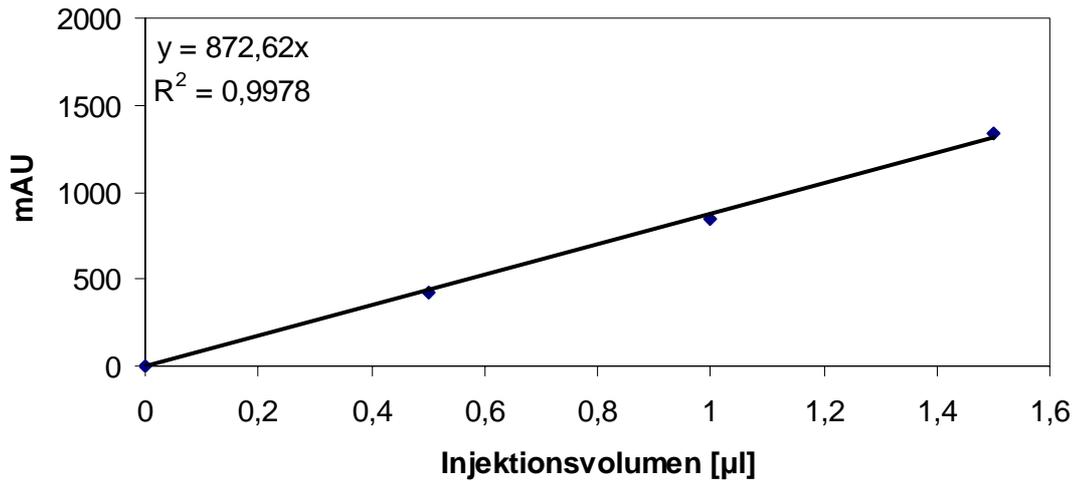


Abb. 40: Standardkurve von Scopolin (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 210 nm

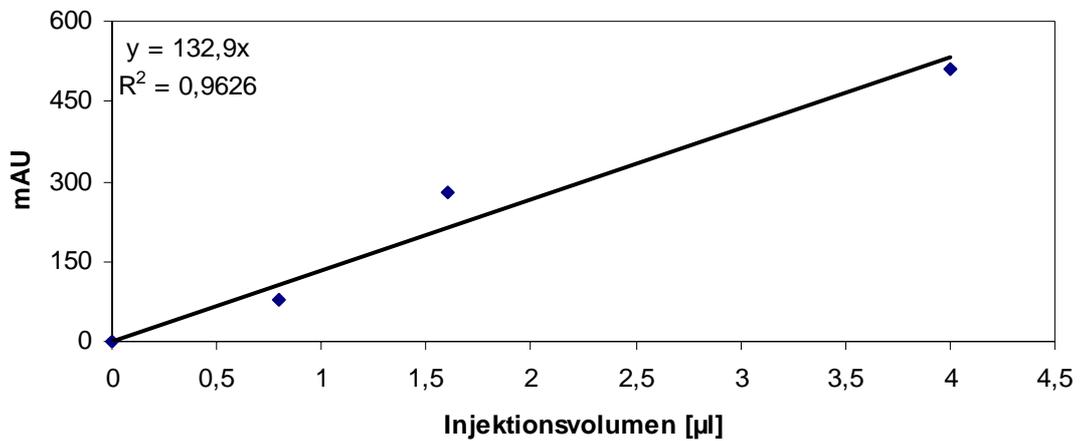


Abb. 41: Standardkurve von Verbascosid (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 254 nm

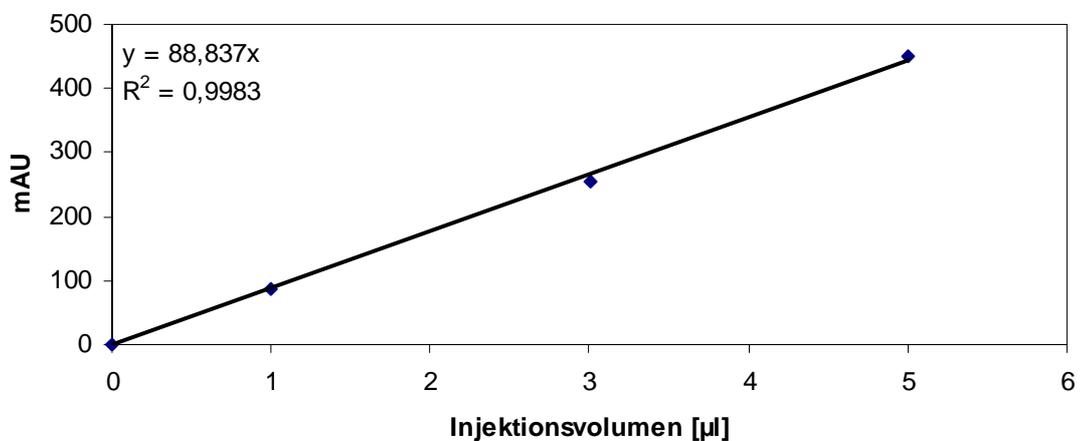


Abb. 42: Standardkurve von Oraposid (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 254 nm

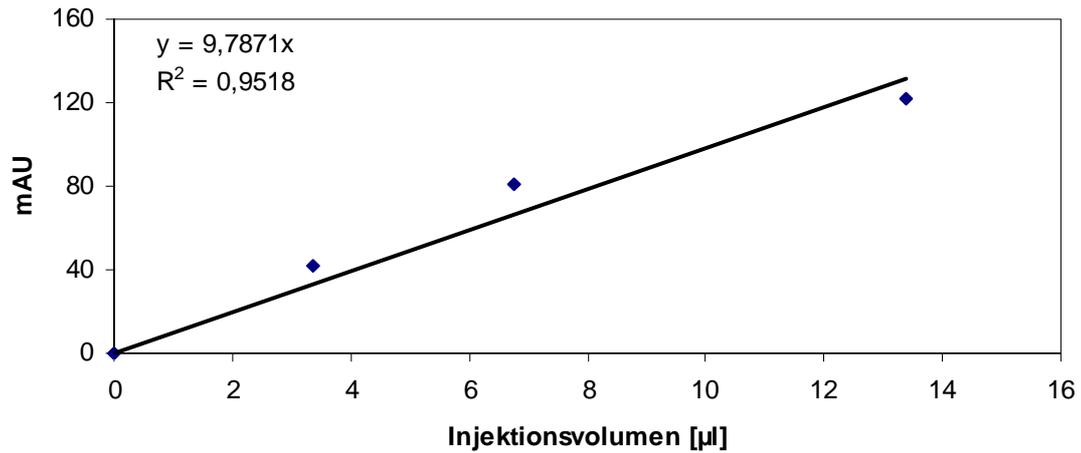


Abb. 43: Standardkurve von *trans*- Zimtsäure (1mg/ml) bei einer Wellenlänge von 254 nm

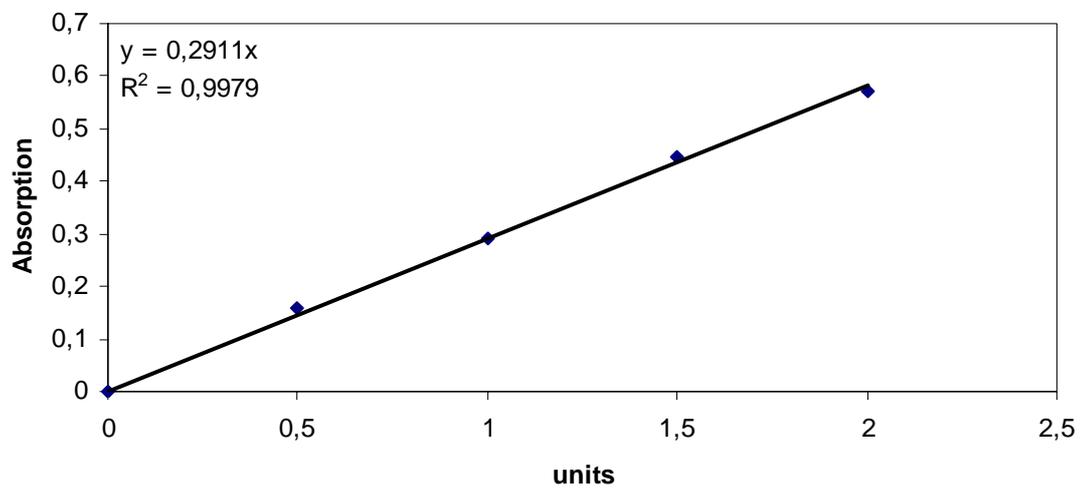


Abb. 44: Standardkurve der Meerrettich-Peroxidase-Aktivität. Die Messung erfolgte durch Oxidation von DHBS bei einer Wellenlänge von 510 nm.

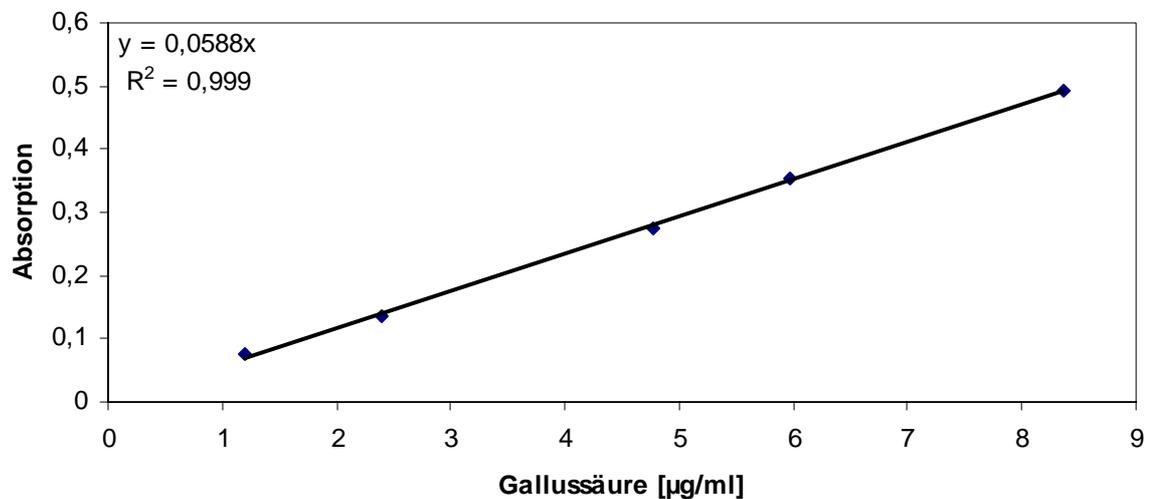
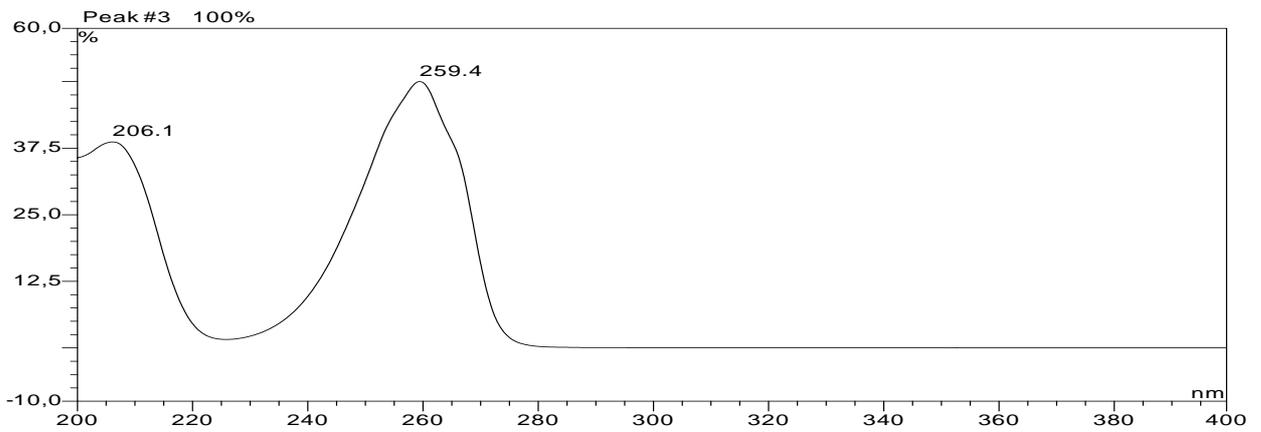
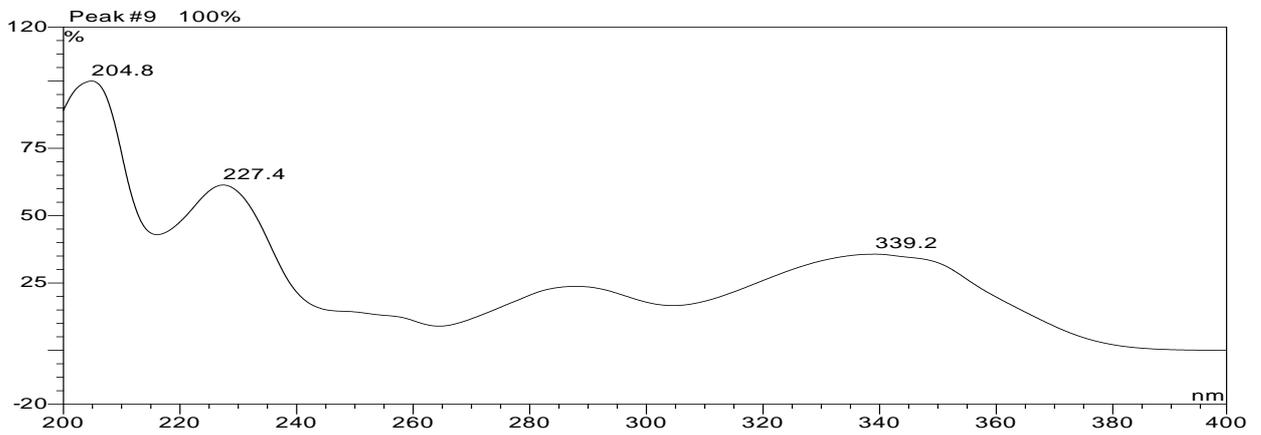
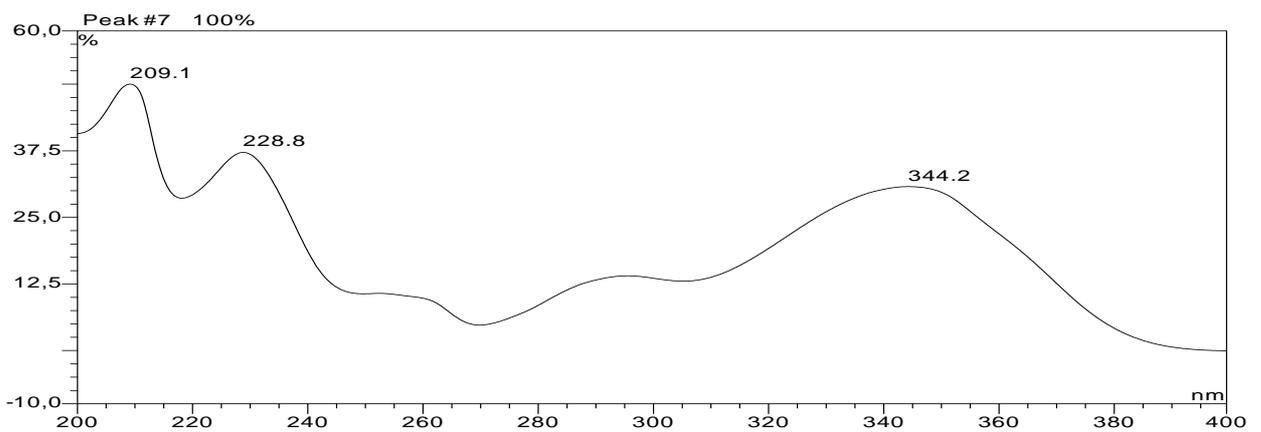
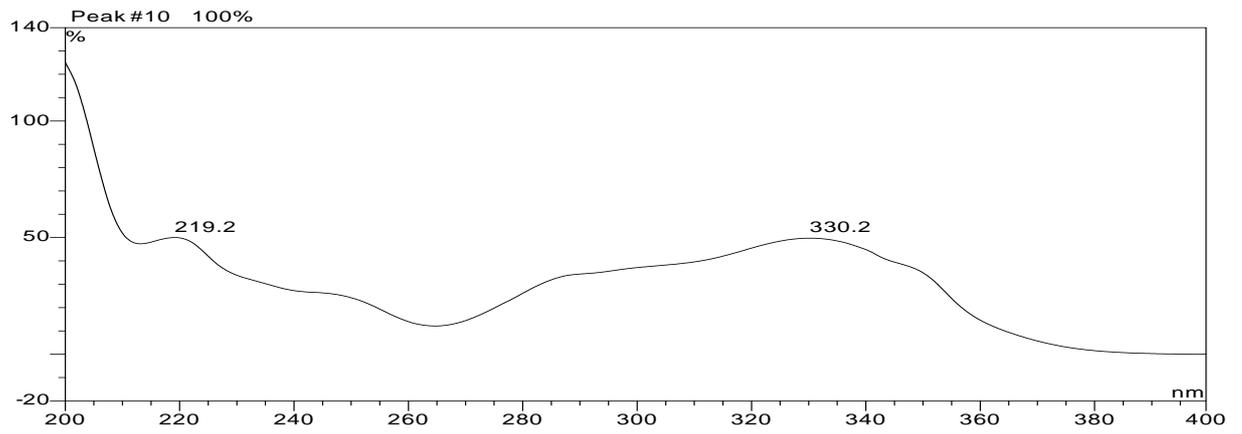
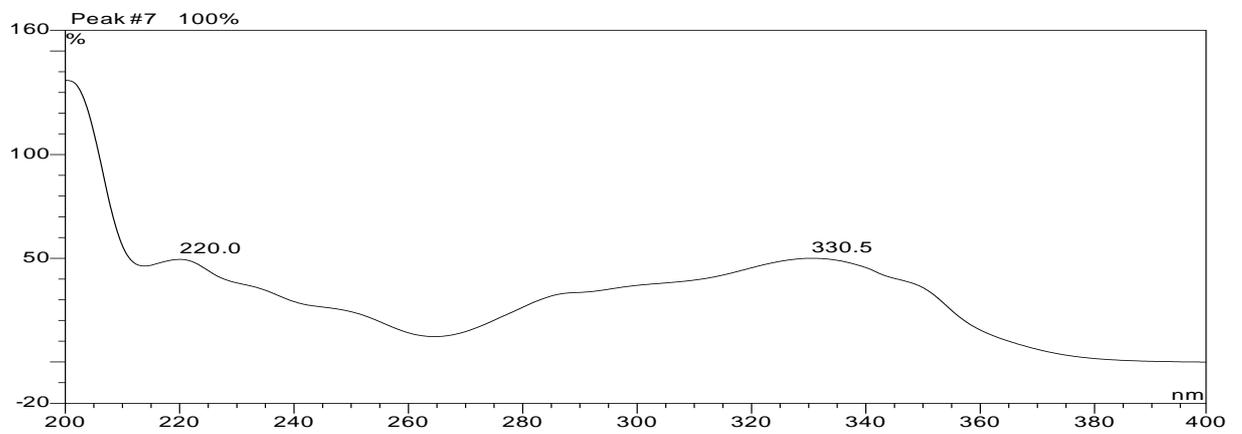
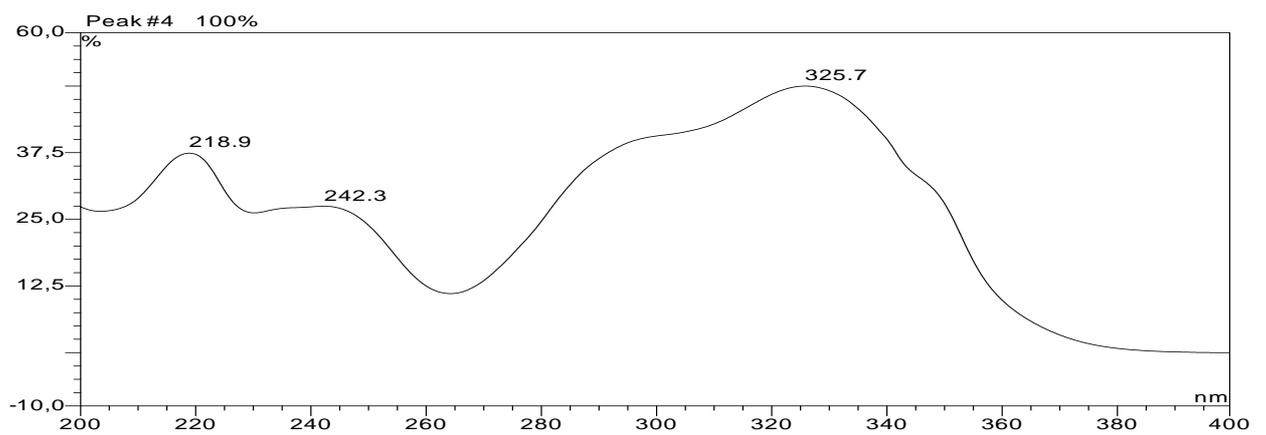


Abb. 45: Standardkurve von Gallussäure bei einer Wellenlänge von 725 nm

Spektren identifizierter Sekundärmetabolite**Abb. 46: Nikotinspektrum****Abb. 47: Scopolinspektrum****Abb. 48: Scopoletinspektrum**

**Abb. 49:** Verbascosidspektrum**Abb. 50:** Oraposidspektrum**Abb. 51:** Chlorogensäurespektrum

Danksgiving

An erster Stelle sei meinen Eltern für die vielen kleinen und großen Hilfen bevor und während meiner Promotion gedankt.

Ganz besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Sauerborn, Herrn Prof. Dr. Spring und Herrn Dr. Buschmann für die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Holger Buschmann danke ich zudem für die Tipps und Tricks während meiner Labortätigkeit.

Mein spezieller Dank gilt der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Baldwin des Max Planck Instituts für chemische Ökologie in Jena für die gute Zusammenarbeit. Besonders Frau Dr. Tamara Krügel und Frau Susan Kutschbach möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz in den Gewächshäusern des MPI's danken.

Herrn Dr. Ulrich Mayer danke ich für die frühe Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Herrn Michael Lausberg danke ich für die realistische Einschätzung wissenschaftlicher Strukturen.

Frau Gundula Szinicz und Herrn Dr. Jan Grenz einen lieben Dank für die kritische Durchsicht meiner Dissertationsschrift.

Herrn Maligo möchte ich für die lockeren Gespräche danken.

Dem Team, insbesondere Frau Elizabeth Zimmermann, Frau Dr. Dorette Müller-Stöver und Herrn Zhi Wei Fan sei schließlich mein Dank für die Bewältigung aller Labor- und Lebensfragen gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Name: Guido Gonsior
Geburtstag: 10.11.1971
Geburtsort: Immerath
Familienstand: ledig
Eltern: Klaus Dieter Gonsior, Malermeister
Maria Helena Gonsior geb. Gillissen

Schulbildung: 09/1978 - 07/1982 Grundschule Kleingladbach
08/1982 - 06/1991 Gymnasium der Stadt Hückelhoven
Abschluß: allgemeine Hochschulreife

Wehr-/Ersatzdienst: 07/1991 - 09/1992 Fliegerhorst Nörvenich
Altenheim Hückelhoven

Studium: 10/1992 - 08/1995 Biologie an der Universität Regensburg
09/1995 - 09/2001 Biologie an der Universität Oldenburg
Abschluß: Diplom-Biologe

Beschäftigung: 07/2002 - 11/2004 angestellt als wissenschaftliche Hilfskraft
am Institut für Pflanzenproduktion und
Agrarökologie in den Tropen und
Subtropen der Universität Hohenheim

Sprachen: Englisch; Grundkenntnisse in Französisch

Weitere Qualifikationen: Ausbildung zum Forschungstaucher

Hohenheim, den 27.01.05

Erklärung:

Hiermit versichere ich, dass ich die Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Guido Gonsior