

WESTFÄLISCHE
WILHELMS-UNIVERSITÄT
MÜNSTER

**Einfluss des Primärstoffwechsels auf
die Stressantwort und Entwicklung
in *Nicotiana tabacum***

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Sebastian Hassa

aus Warendorf

Münster, April 2015

Biologie

Einfluss des Primärstoffwechsels auf die Stressantwort und Entwicklung in *Nicotiana tabacum*

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrada des
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von

Sebastian Hassa

aus Warendorf

Münster, April 2015

Dekan:	Prof. Dr. Michael Weber
Erste Gutachterin:	Prof. Dr. Antje von Schaewen
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Engelbert Weis
Tag der mündlichen Prüfung:	<u>15.07.2015</u>
Tag der Promotion:	<u>17.07.2015</u>

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung der pflanzlichen Stressresistenz im Zusammenhang mit globalen Problemen der Menschheit	1
1.2	Der oxidative Pentosephosphat-Weg (OPP) – Grundlagen, Regulation und Bedeutung für die pflanzliche Stressresistenz –	3
1.2.1	G6PDH-Isoformen und ihre Regulation.....	4
1.2.2	Bedeutung der G6PDH für die pflanzliche Stresstoleranz	6
1.3	Prolin.....	7
1.4	Pflanzliche Kohlenhydrate – Grundlagen, Regulation und Bedeutung für die pflanzliche Stressresistenz –	9
1.4.1	Steuerung der Kohlenhydratverteilung durch Fructose-2,6-bisphosphat und der <i>sink</i> -Stärke.....	14
1.4.2	Zellwand-Invertase als ein Schlüsselenzym des Kohlenhydratstoffwechsels.....	18
1.5	Stresstoleranz bei Pflanzen	20
1.5.1	Grundlagen der pflanzlichen Pathogenantwort	20
1.5.2	Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der pflanzlichen Stressantwort.....	22
1.5.3	Kohlenhydrate als Signalmoleküle.....	24
1.6	Primärstoffwechsel und pflanzliche Stresstoleranz	25
1.7	Zielsetzung.....	27
2	Material und Methoden.....	29
2.1	Materialien.....	29
2.1.1	Enzyme und Chemikalien.....	29
2.1.2	Kommerzielle Kits	30
2.1.3	Bakterienstämme	30
2.1.3.1	<i>E. coli</i>	30
2.1.3.2	<i>A. tumefaciens</i>	30
2.1.4	Vektoren.....	31
2.1.5	Oligonukleotide.....	31
2.1.6	Computerprogramme.....	32
2.1.7	Confokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM).....	33
2.2	Methoden	33
2.2.1	Arbeiten mit Bakterienstämmen.....	33
2.2.1.1	Anzucht von Bakterien auf Agarplatten.....	33
2.2.1.2	Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen.....	34
2.2.1.3	Herstellung von Glycerinkulturen.....	34
2.2.1.4	Transformation.....	34
2.2.1.5	Transformation hitzekompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.2.1.6	Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	35
2.2.1.7	Blau-Weiß-Selektion.....	35
2.2.1.8	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen.....	36
2.2.2	Arbeiten mit Nukleinsäuren	37
2.2.2.1	Gesamt RNA-Extraktion aus Blattmaterial.....	37

2.2.2.2	Herstellung von cDNA aus mRNA mittels reverser Transkription.....	38
2.2.2.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR.....	38
2.2.2.4	Kolonie-PCR.....	39
2.2.2.5	Reinigung von PCR-Produkten.....	40
2.2.2.6	Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen.....	40
2.2.2.7	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	40
2.2.2.8	DNA-Ligation.....	41
2.2.2.9	Sequenzierung von DNA.....	41
2.2.2.10	Ortsgerichtete Mutagenese (<i>site-directed mutagenesis</i> , SDM).....	41
2.2.2.11	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	42
2.2.2.12	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
2.2.2.13	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	43
2.2.3	Arbeiten mit Pflanzen.....	44
2.2.3.1	Verwendete Organismen und ihre Anzucht.....	44
2.2.3.2	Die Tabakpflanze <i>Nicotiana tabacum</i>	44
2.2.3.3	Das Pathogen <i>Phytophthora nicotianae</i> (van Breda de Haan).....	44
2.2.3.4	Infiltration von <i>source</i> -Blättern.....	45
2.2.3.6	Stabile Transformation von Tabakpflanzen.....	45
2.2.3.7	Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes der <i>source</i> -Blätter.....	47
2.2.3.8	Bestimmung der Aktivität von Zellwand-Invertase in <i>source</i> - Blättern.....	48
2.2.3.10	Erstellung eines metabolischen Profils anhand von MALDI-TOF.....	49
2.2.3.11	Bestimmung der Hormonkonzentration.....	50
2.2.3.12	Bestimmung der Biomasse.....	50
2.2.3.14	Mikroskopischer Nachweis von Zelltod.....	51
2.2.3.15	Mikroskopischer Nachweis von Kallose.....	51
2.2.3.16	Mikroskopischer Nachweis von ROS.....	51
2.2.3.17	Salzstressanalyse von <i>source</i> -Blättern.....	52
2.2.3.18	Saccharoseexport aus <i>source</i> -Blättern.....	52
2.2.4	Arbeiten mit Proteinen.....	52
2.2.4.1	Proteinextraktion aus Tabakblättern.....	52
2.2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford.....	53
2.2.4.3	Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	53
2.2.5	Analyse von Tabaksamen.....	56
2.2.5.4	Proteingehaltbestimmung von Saatgut.....	56
2.2.5.5	Kohlenhydratgehaltbestimmung von Saatgut.....	57
2.2.6	Bestimmung von Fructose-2,6-bisphosphat.....	58
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Charakterisierung der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol.....	60
3.1.1	Charakterisierung der biotischen Stressantwort der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	61
3.1.1.1	Pathogen-induzierte Zelltodrate.....	62
3.1.1.2	Abwehr-induzierte Bildung von Kallose.....	64
3.1.1.3	Abwehr-induzierte Bildung von ROS.....	65
3.1.2	Charakterisierung der abiotischen Stressantwort der Tabaksorte Xanthi.....	68
3.1.2.1	Steigerung der NaCl-Toleranz in <i>source</i> -Blättern nach Isoenzym- austausch der G6PDH.....	68
3.1.2.2	Steigerung der Keimungsrate bei NaCl- und Trockenstress.....	69

3.1.3	Charakterisierung des Primärstoffwechsels der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol	71
3.1.3.1	Anreicherung von Kohlenhydraten in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	71
3.1.3.2	Reduktion des Saccharoseexportes in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	72
3.1.3.3	Erhöhung der <i>sink</i> -Aktivität in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	73
3.1.3.4	Erhöhung der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol	74
3.1.3.5	Veränderungen von Photosyntheseparametern in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol	74
3.1.3.6	Veränderungen von Hormongehalten in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	76
3.1.3.7	Anstieg der Prolingehalte in <i>source</i> -Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol	77
3.1.3.8	Veränderungen der Biomasse, Samenkomposition und Samenqualität der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol	78
3.1.3.9	Steigerung der Biomasseproduktion der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol	78
3.1.3.10	Saatgutqualität der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	80
3.1.3.11	Samenkomposition.....	80
3.1.3.12	Veränderung des Grundmetabolismus bei der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol	81
3.2	Erstellung der Doppeltransformanten.....	84
3.2.1	Erstellung eines neuen RNAi-Konstruktes zur selektiven Reprimierung der cytosolischen G6PDH	85
3.2.2	Das neue Doppelkonstrukt pZM8	86
3.2.2.1	Transformation des neuen Doppelkonstruktes pZM8.....	87
3.2.2.2	Charakterisierung der Doppeltransformanten X::cP2	89
3.2.2.3	Interaktion zwischen <i>P. nicotianae</i> und den Doppeltransformanten X::cP2.....	90
3.2.3	Einfluss der zuckerhaltigen Anzucht auf den Kohlenhydratstatus bei SNN.....	92
3.3	Charakterisierung der cwINV::cP2-Doppeltransformanten.....	95
3.3.1	Messung der cwINV-Aktivität	96
3.3.2	Abwehrreaktion der cwINV-Doppeltransformanten.....	96
3.3.3	Anreicherung von Kohlenhydraten in den cwINV-Doppeltransformanten.....	97
3.4	Charakterisierung der SNN::cP2-Doppeltransformanten	99
4	Diskussion	101
4.1	Veränderungen im Grundstoffwechsel von Tabakblättern und Samen nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol.....	101
4.2	Erhöhung der Stresstoleranz in Tabak nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol.....	104

Inhaltsverzeichnis

4.3	Erhöhung von Biomasse und Ertrag nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol.....	114
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	115
6	Literatur	118
7	Anhang.....	142
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	142
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	145
7.3	Tabellenverzeichnis	147
7.4	Vektor	148
7.4.1	pZM8.....	148
7.5	Sequenzierung.....	148
7.5.1	pZM8.....	148

Lebenslauf

Danksagung

1 Einleitung

1.1 Bedeutung der pflanzlichen Stressresistenz im Zusammenhang mit globalen Problemen der Menschheit

Seit dem letzten Jahrhundert ist die Menschheit mit zahlreichen globalen Problemen konfrontiert. Eins davon ist die kontinuierlich **steigende Weltbevölkerung**, die im Jahr 2050 voraussichtlich auf neun Milliarden gestiegen sein wird. Um den damit verbundenen gesteigerten Nahrungsmittelbedarf zu decken, müsste die globale Agrarproduktion gleichzeitig um 50 bis 70% steigen (Ruan *et al.*, 2010; Shabala, 2013). Doch schon heute werden Ackerbauflächen minimiert und z.B. für Städteplanung verwendet. Allein in Australien hat dieser Trend zu einem **Verlust** von 10% **der Agrarflächen** in den vergangenen 10 Jahren geführt (Millar & Roots, 2012). Darüber hinaus droht der erwartete **Klimawandel** in den nächsten Jahrzehnten die vorhandenen Agrarböden auszulaugen. Abiotische Einflüsse wie steigende Temperaturen und Trockenheit verursachen eine Versalzung nährstoffreicher Böden und verstärken die Nahrungsmittelverknappung. Eine übermäßige Bodenversalzung ist ein großes ökologisches und agronomisches Problem. Schätzungsweise sind 3,6 Milliarden Hektar der 5,2 Milliarden Hektar agrarwirtschaftlich genutzten Anbauflächen davon betroffen (Riadh *et al.*, 2010), was mit einem jährlichen Ernteverlust von weit über 12 Milliarden US Dollar verbunden ist (Übersicht in Qadir *et al.*, 2014).

Neben abiotischen limitieren auch biotische Umweltfaktoren den Ernteertrag. Zahlreiche Krankheitserreger (Pilze, Bakterien, Viren), Pflanzenschädlinge (Nematoden, Insekten) und Parasiten tragen zu erheblichen Ernteausfällen bei Nutzpflanzen bei (Atkinson *et al.*, 2012). Durch den Klimawandel erfolgt zusätzlich eine Verschiebung der Verbreitungsgebiete von Schädlingen und Parasiten, was deren Bekämpfung erschwert. So könnten subtropische Erreger aufgrund steigender Temperaturen zukünftig auch eine starke Bedrohung für Nutzpflanzen in den gemäßigten Klimazonen der Erde werden (Rosenzweig *et al.*, 2001; Brown & Funk, 2008; Madgwick *et al.*, 2011).

Die Zukunft der globalen Agrarproduktion und somit auch die Deckung des Nahrungsmittelbedarfs der Bevölkerung ist daher stark von der abiotischen und biotischen Stressresistenz der Kulturpflanzen abhängig. Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Verbesserung der Stresstoleranz bisher oft mit Verlusten an Biomasse und Ertrag

einhergehen (Purrington, 2000; Brown, 2002). In der Literatur wird dieses Phänomen als *growth-differentiation balance* bezeichnet. Danach sind die Energiereserven einer Pflanze begrenzt und müssen im Zuge der Stressabwehr umverteilt werden (Hermes & Mattson, 1992). So weisen z.B. Arabidopsis-Mutanten mit einer konstitutiv erhöhten Stressantwort ein eingeschränktes Wachstum und eine geringere Fruchtbarkeit auf, während Mutanten mit gestörten Stresssignalwegen eine Zunahme an Biomasse zeigten (Heil & Baldwin, 2002). Daher wurden in den vergangenen Jahren verschiedene Strategien entwickelt, um die Stresstoleranz durch Modulation verschiedener Signal- und Stoffwechselwege zu steigern und gleichzeitig den Ertrag der wichtigen Anbaupflanzen wie Mais, Weizen und Reis zu sichern (Brown, 2002; Barrett-Lennard & Setter, 2010; Ambavaram *et al.*, 2014).

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Obwohl der Primärstoffwechsel im Zusammenhang mit dem Wachstum und der Entwicklung bei Pflanzen gut untersucht ist, wurde seine Beteiligung an der pflanzlichen Stressabwehr bisher nur unvollständig aufgeklärt (Übersicht in Rojas *et al.*, 2014). Dabei liefern Prozesse des Primärstoffwechsels die energetische und metabolische Grundlage für die pflanzliche Abwehr nach Pathogenbefall und werden daher teilweise bereits als integraler Bestandteil von pflanzlicher Stressresistenz angesehen (Übersicht in Bolton, 2009). Ein besseres Verständnis des Zusammenspiels von pflanzlichem Primärstoffwechsel und Stressreaktionen könnte zukünftig die Züchtung neuer resistenter Pflanzen ohne gleichzeitigen Verlust an Biomasse und Ertrag ermöglichen. Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, inwieweit Modifikationen von Enzymen des Primärstoffwechsels zu einer Erhöhung der Stresstoleranz beitragen können ohne gleichzeitig Einbußen an Energie, Ertrag und/oder Biomasse zu verzeichnen. Im Fokus der Untersuchungen standen dabei der oxidative Pentosephosphat-Weg (*oxidative pentose phosphate pathway*, OPP) mit seinem Schlüsselenzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und der Kohlenhydratstoffwechsel mit der Zellwand-Invertase (*cell-wall invertase*, cwINV) als zentrales Enzym. Diese Stoffwechselwege sind in Pflanzen die Hauptlieferanten für Energie in Form von Reduktionsäquivalenten und Zuckergerüsten. Im Folgenden sollen zunächst die Grundlagen dieser Stoffwechselwege, ihre Regulation und die Verknüpfungen mit der pflanzlichen Stressantwort vorgestellt werden.

1.2 Der oxidative Pentosephosphat-Weg (OPP) – Grundlagen, Regulation und Bedeutung für die pflanzliche Stressresistenz –

Die Hauptquelle für reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) in grünen Pflanzenzellen ist die Ferredoxin-NADP-Reduktase am Photosystem I während des photosynthetischen Elektronentransports (Arakaki *et al.*, 1997). In nicht-photosynthetisch aktivem Gewebe oder im Dunkeln kann NADPH von verschiedenen NADP-Dehydrogenasen, wie z.B. der NADP-Isocitrat-Dehydrogenase und Enzymen des OPPs, d.h. G6PDH und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) produziert werden (Emes & Neuhaus, 1997; Thom *et al.*, 1998; Hodges *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2009).

Der OPP kann in einen oxidativen irreversiblen und in einen nicht-oxidativen reversiblen Teil gegliedert werden (Dennis *et al.*, 1997). Im **oxidativen Teil** wird Glucose-6-Phosphat (G6P) durch die G6PDH zu 6-Phosphogluconolacton umgewandelt und weiter über die 6-Phosphogluconolactonase (6PGL) zu 6-Phosphogluconat (6PG) umgesetzt (Abb. 1). Die 6PGDH setzt 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) um. Im oxidativen Abschnitt des OPPs werden in den irreversiblen, exergonen Reaktionen aus 1 Mol G6P jeweils 2 Mol NADPH und 1 Mol CO₂ gebildet. Schlüsselenzym des OPPs ist die G6PDH (Hauschild & von Schaewen, 2003; siehe auch 1.1.2).

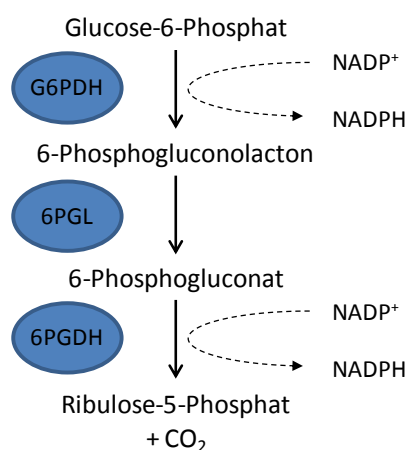


Abbildung 1: Schematische Darstellung des irreversiblen oxidativen Teils des OPPs. Glucose-6-Phosphat (G6P) wird durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) zu 6-Phosphogluconolacton umgewandelt und weiter über die 6-Phosphogluconolactonase (6PGL) zu 6-Phosphogluconat umgesetzt. Die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) setzt 6-Phosphogluconat zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) um.

Im **reversiblen Teil des OPPs** werden anschließend C4-, C5-, C6- und ein C7-Zucker ineinander umgewandelt. Dieser Teil dient nicht der Erzeugung weiterer Reduktionsäquivalente. Seine Intermediate sind vielmehr wichtige Ausgangssubstanzen für Biosyntheseprozesse. So wird bspweise Ribose-5-P (Rib-5-P) als Substrat für die Synthese von Nukleotiden und Erythrose-4-Phosphat (Ery-4-P) im Shikimatweg für die Synthese

von aromatischen Aminosäuren, Phytoalexinen und Zellwandpolymeren benötigt (Hauschild & von Schaewen, 2003).

Bei Pflanzen sind die Enzyme des oxidativen Teils des OPPs sowohl im Cytosol als auch in Plastiden lokalisiert. Die Enzyme des reversiblen Teils hingegen befinden sich vornehmlich in den Plastiden (Schnarrenberg *et al.*, 1995). Bioinformatische Analysen bestätigen diese plastidäre Lokalisation, da die für den reduktiven Teil spezifischen Transaldolasen und Transketolasen im Cytosol nicht nachgewiesen werden konnten (Übersicht in Kruger & von Schaewen, 2003; Caillau & Quick, 2005). Trotz der räumlichen Trennung von plastidärem und cytosolischem OPP können entstehende Metabolite zwischen den Kompartimenten über Phosphat-Translokatoren ausgetauscht werden (Übersicht in Kruger & von Schaewen, 2003). So werden unter anderem Xylulose-5-Phosphat und auch ein geringer Anteil an Ru5P über den sogenannten Xylulose-5-Phosphat/Phosphat-Translokator (XPT) im Austausch gegen anorganisches Phosphat (*inorganic phosphate*, Pi), oder Triose-Phosphat (Triose-P) zwischen Cytosol und Plastiden transportiert (Eicks *et al.*, 2002; Weber & Linka, 2011).

1.2.1 G6PDH-Isoformen und ihre Regulation

Für die G6PDH, das Schlüsselenzym des OPPs, sind mehrere Isoformen bekannt, die plastidär, cytosolisch und teilweise peroximal lokalisiert sind (Kruger & von Schaewen, 2003; Reumann *et al.*, 2004; Wakao & Benning, 2005; Meyer *et al.*, 2011; Hölscher *et al.*, 2013). Für *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) wurden sechs G6PDH-Isoformen identifiziert, zwei cytosolische und vier plastidäre Isoformen (Wakao & Benning, 2005).

Die Regulation der G6PDH-Isoformen in den verschiedenen Kompartimenten weist sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede auf. Sowohl die cytosolischen, als auch die plastidären G6PDH-Isoformen werden über eine negative Rückkopplung durch NADPH inhibiert. Dabei ist das Verhältnis von NADPH zu NADP entscheidend (Lendzian & Bassham, 1975; Fickenscher & Scheibe, 1986; Hauschild & von Schaewen, 2003). Die plastidären G6PDH-Isoformen (P-Formen) unterliegen zusätzlich einer Redox-Regulation und werden durch ein Ferredoxin-Thioredoxin-System reguliert (Scheibe, 1990). Obwohl beide plastidären G6PDH-Isoformen (P1 und P2) gleichen Regulationsmechanismen unterliegen, ist die P2-Isoform weniger sensitiv gegenüber Inhibierung durch NADPH ($K_i_{[NADPH]} > K_m_{[NADP]}$) und Redox-Regulation mittels Bildung von Disulfidbrücken (Wendt *et al.*, 2000; Esposito *et al.*, 2003; Wakao & Benning, 2005). Da Isoenzyme der

P2-Form durch Thiolreagenzien nur zu ca. 50% inhibiert werden, liegt die Vermutung nahe, dass Enzyme der P1-Klasse eher über das photosynthetische Redox-Potential reguliert werden als die der P2-Klasse (Wendt *et al.*, 2000; Wakao & Benning, 2005). Zusätzlich kann es, z.B. in mit Paraquat behandelten Kartoffelblättern im Dunkeln, durch Dephosphorylierung zu einer posttranslationalen Regulierung der plastidären P1 G6PDH-Isoform kommen, wodurch die Enzymaktivität gesteigert wird (Hauschild & von Schaewen, 2003). Auch die Enzymaktivität der cytosolischen G6PD6-Isoform kann bei Stress scheinbar durch Phosphorylierung beeinflusst werden. So stimuliert die Phosphorylierung der Aminosäure Threonin (Thr-467) nahe der NADP-Substratbindestelle in der G6PD6-Isoform die Bindung des Co-Substrates NADP und steigert so die Enzymaktivität (Dal Santo *et al.*, 2012).

Die Promotorregionen der cytosolischen G6PDH-Isoformen besitzen Zucker-regulierbare Domänen, die als SURE-Elemente (*sugar-regulated elements*) bekannt sind und können somit auf transkriptioneller Ebene durch Kohlenhydrate wie Glucose (Glc), Fructose (Frc) und Saccharose (*sucrose*, Suc) gesteuert werden (Hauschild & von Schaewen, 2003). Die Expressionsmuster der einzelnen G6PDH-Isoformen variieren dabei in den verschiedenen Gewebetypen. So wird in Arabidopsis die cytosolische Isoform G6PD5 überwiegend in Blättern exprimiert, wohingegen die Expression der zweiten cytosolischen Isoform G6PD6 in hohem Maße über die gesamte Pflanze verteilt ist. Die plastidären P2-Isoformen (G6PD2 und G6PD3) sind ebenfalls ubiquitär in allen Zellen vorhanden und zeigen die höchsten Expressionsgehalte in heterotrophen Geweben. Die G6PD1-Isoform (P1-Klasse) wird in sich entwickelnden Organen, jedoch nicht in Wurzeln exprimiert (Wakao & Benning, 2005; Wendt *et al.*, 2000). Eine weitere plastidäre G6PD4-Isoform wird nur in sehr geringem Maße exprimiert (Wakao & Benning, 2005) und weist keine katalytische Aktivität auf (Meyer *et al.*, 2011). Vielmehr scheint sie eine essentielle Funktion in der Lokalisation der G6PD1 einzunehmen. Nach der Redox-Aktivierung durch Thioredoxin (TRX) des m-Typs Trx_{m2} interagiert die G6PD4, die als eine neue grundständige P0-Isoformklasse postuliert wird, mit der G6PD1 und bewirkt durch Maskierung des plastidären Importsignals deren Faltung im Cytosol und leitet damit den anschließenden peroximalen Import ein (Meyer *et al.*, 2011).

1.2.2 Bedeutung der G6PDH für die pflanzliche Stresstoleranz

Neben wichtigen Funktionen im Grundstoffwechsel der Pflanze (siehe oben) spielt die G6PDH auch eine entscheidende Rolle während der pflanzlichen Stressantwort. Während der frühen biotischen Stressantwort kommt es in Tabak zu einer Aktivitätssteigerung von G6PDH und OPP (Pugin *et al.*, 1997; Scharte *et al.*, 2005; Scharte *et al.*, 2009). Inhibiert oder reprimiert man hingegen die cytosolische G6PDH oder die P2-Isoform, führt dies zu einer verminderten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) sowie von hypersensitiven Läsionen nach Pathogenbefall (Scharte *et al.*, 2009; Asai *et al.*, 2011).

Die Produktion von ROS ist eine der frühesten zellulären Antworten nach Pathogenerkennung. Einer der Hauptproduzenten ist dabei die NADPH-Oxidase der Plasmamembran (Torres *et al.*, 2005). Die von der NADPH-Oxidase gebildeten ROS sind ausschlaggebend für die Bildung hypersensitiver Läsionen in Tabakblättern resistenter Pflanzen nach Infektion mit *Phytophthora nicotianae*. Die Bildung von ROS durch die NADPH-Oxidase benötigt NADPH im Cytosol, welches von der G6PDH des OPPs zu Verfügung gestellt wird (Pugin *et al.*, 1997). Die Überexpression einer plastidären P2 G6PDH-Isoform (G6PD3) mit geringerer Inhibierung durch NADPH-Rückkopplung ($K_i_{[NADPH]} > K_m_{[NADP]}$) im Cytosol der Tabaksorte Xanthi, verbesserte sowohl die Pathogenabwehr als auch scheinbar die Resistenz gegen Trockenheit (Scharte *et al.*, 2009). G6PDH und OPP sind also nicht nur an der biotischen Stressantwort, sondern auch an der abiotischen Stressanpassung beteiligt. Die Zugabe von Natriumchlorid (NaCl) (Nemoto & Sasakuma, 2000; Wang *et al.*, 2008) und Aluminium (Slaski *et al.*, 1996) führte zu veränderten Expressionsraten der G6PDH. Aktuelle Studien konnten die Beteiligung von G6PDH bei der Anpassung an Trocken- und Salzstress bestätigen (Übersicht in Li *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2013). Dabei wird die cytosolische G6PD6-Isoform von stressabhängigen Proteinkinasen der Gruppe Glykogensynthase-Kinase 3 (GSK3) reguliert (Dal Santo *et al.*, 2012). Diese in Arabidopsis als ASKas bezeichneten Proteinkinasen phosphorylieren vornehmlich die cytosolische G6PD6-Isoform (siehe oben) und fördern so die Bereitstellung von NADPH für oxidative Schutzmechanismen wie dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Foyer & Halliwell 1976; Wakao & Benning, 2005; Dal Santo *et al.*, 2012).

1.3 Prolin

Eng verbunden mit der Bedeutung des OPPs für die Stressresistenz ist die NADPH-abhängige Synthese von Prolin (Verslues & Sharma, 2010). Dieses galt lange Zeit ausschließlich als kompatibles Osmolyt bei der osmotischen Stressantwort (Csonka & Hanson, 1991). Nach dem heutigen Stand hat Prolin hingegen multifunktionale Aufgaben in einem breiten Spektrum an abiotischen und biotischen Stimuli (Übersicht in Szabados & Savoure, 2010). So kommt es in Pflanzen u.a. während Trocken- (Hare *et al.*, 1998), Salz- (Rhodes *et al.*, 2002; Munns, 2005), Kälte- (Naidu *et al.*, 1991) und Metallstress (Bassi & Sharma, 1993; Sharma & Dietz, 2006) zu einer Akkumulation von Prolin. Prolin erhöht die Stresstoleranz, indem es als Metabolit-Chaperon den mitochondrialen Elektronentransport-Komplex II (Hamilton & Heckathorn, 2001), Membranen, Proteine (Hare *et al.*, 1998; Mansour, 1998) und Enzyme, wie z.B. die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), stabilisiert (Allen *et al.*, 1997). Darüber hinaus kann Prolin als nicht-enzymatisches Antioxidans Hydroxyl-Radikale (OH \cdot) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) direkt entgiften (Alia *et al.*, 2001; Smirnoff & Cumbes, 1989) und auch ROS-Entgiftungsenzyme wie Superoxid-Dismutase (SOD) und Ascorbat-Peroxidase (APX) positiv stimulieren (Xu *et al.*, 2009). So erhöhte die Überexpression des Enzyms Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase (P5CS) aus der Prolinsynthese in Zitronenpflanzen die endogene Prolinkonzentration und verstärkte die APX- und SOD-Aktivität (de Campos *et al.*, 2011). Damit nimmt Prolin u.a. zentrale Schutzfunktionen gegenüber ROS ein (Szabados & Savor, 2010; Natarajan *et al.*, 2012; Kischor & Sreenivasulu, 2014).

Der Prolinmetabolismus ist abhängig von Glutamat und der NADPH-Bereitstellung im Plastidenstroma (siehe Abb. 2). Die Synthese von Prolin aus Glutamat zu Glutamat-Semialdehyd (GSA) wird von der P5CS katalysiert. GSA wird spontan zu Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) umgesetzt (Hu *et al.*, 1992; Savoure *et al.*, 1995; Sekhar *et al.*, 2007). Die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (P5CR) reduziert P5C anschließend zu Prolin (Verbruggen *et al.*, 1993; Sekhar *et al.*, 2007). Bei beiden Syntheseschritten wird NADPH verbraucht. Der Prolinkatabolismus erfolgt in den Mitochondrien über die Prolin-Dehydrogenase (PDH) oder die Prolin-Oxidase (POX). Sie reduzieren P5C aus Prolin und die P5C-Dehydrogenase (P5CDH) wandelt letztendlich P5C in Glutamat um. Als alternativer Syntheseweg kann Prolin noch aus Ornithin synthetisiert werden, welches

zunächst von der Ornithin-delta-Aminotransferase (OAT) in GSA und dann von der P5C in Prolin umgesetzt wird (Roosens *et al.*, 1998; Verbruggen & Hermans, 2008).

Die Enzyme der Biosynthese von Prolin (P5CS1, P5CS2, P5CR) sind normalerweise im Cytosol lokalisiert, wohingegen sich die Prolin-degradierenden Enzyme (P5CDH, PDH2, PDH1 und OAT) in den Mitochondrien befinden (Szabados & Savoure, 2010).

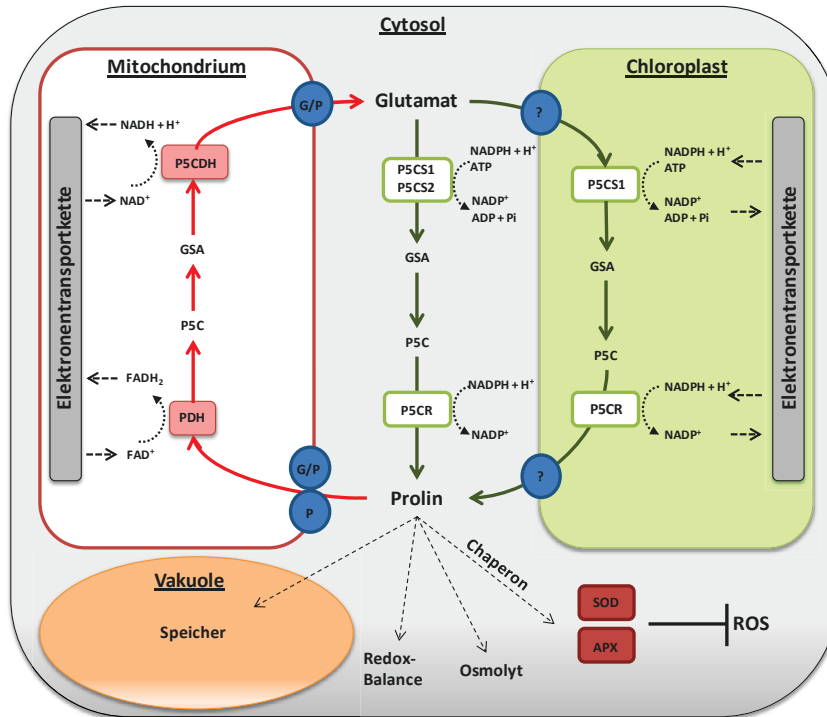


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Prolinmetabolismus in Pflanzen. Der Biosyntheseweg von Prolin ist mit grünen Pfeilen und der Katabolismusweg mit roten Pfeilen markiert. Prolin wird im Cytosol aus Glutamat zu Glutamat-Semialdehyd (GSA) durch Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase (P5CS) katalysiert, von der zwei Enzymvarianten bekannt sind (P5CS1; P5CS2). GSA wird dann spontan zu Pyrrolin-5-Carboxylat (P5C) umgesetzt und anschließend reduziert die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase (P5CR) P5C zu Prolin. Der Prolinkatabolismus erfolgt in den Mitochondrien. Die Prolin-Dehydrogenase (PDH) reduziert importiertes Prolin zu P5C und die P5C-Dehydrogenase (P5CDH) wandelt P5C in Glutamat um, was in das Cytosol exportiert wird. Unter Normalbedingungen wird Prolin im Cytosol von Pflanzen synthetisiert und kann in der Vakuole gespeichert werden. Unter Stresseinfluss erfolgt die Synthese von Prolin in Chloroplasten. Die Prolinaufnahme in Mitochondrien erfolgt über Prolin-Uniporter (P) und den Glutamat/Prolin-Antiporter (G/P). Prolin-Transporter für Chloroplasten sind bislang noch nicht bekannt (angedeutet mit „?“). Prolin hat multifunktionale Aufgaben, so fungiert es u.a. als Osmolyt, Regulator des Redox-Gleichgewichtes und als Metabolit-Chaperon, da es die ROS-Entgiftungsenzyme Superoxid-Dismutase (SOD) und Ascorbat-Peroxidase (APX) stabilisieren kann. Abbildung verändert nach Szabados & Savoure (2010).

Die Unterteilung von Prolinsynthese und Prolinabbau zwischen Cytosol, Chloroplast und Mitochondrium erfordert den Transport von Prolin über die jeweiligen Membranen. Die Aufnahme von Prolin in die Mitochondrien scheint ein aktiver Prozess über Aminosäure-

Transporter zu sein (Yu *et al.*, 1983; Rentsch *et al.*, 1996; Schwacke *et al.*, 1999). Zwei bekannte Transporter in der Mitochondrienmembran sind der Prolin-Uniporter (P) und der Prolin/Glutamat-Antiporter (G/P) (Di Martino *et al.*, 2006). Normalerweise akkumuliert Prolin im Cytosol und fungiert als Metabolit-Chaperon (Übersicht in Hayat *et al.*, 2012). Es stabilisiert die Proteinstruktur und kontrolliert den zellulären Redox-Status, indem es den cytosolischen pH-Wert puffert (Hayat *et al.*, 2012). Im ungestressten Grundzustand wird Prolin bei der Zitrone *Limonium latifolium* in der Vakuole gespeichert. Erst bei Salzstress steigt sein Gehalt im Cytosol an (Gagneul *et al.*, 2007). Dies unterstreicht zum einen die Bedeutung von Prolin während der Stressantwort und zum anderen die Wichtigkeit der Neusynthese und die Freisetzung des gespeicherten Prolins für die Stressabwehr.

1.4 Pflanzliche Kohlenhydrate – Grundlagen, Regulation und Bedeutung für die pflanzliche Stressresistenz –

Synthese von Kohlenhydraten

Kohlenhydrate sind ubiquitär in allen Lebensformen verbreitet und stellen die häufigsten organischen Verbindungen mit vielfältigen Funktionen dar. Diese reichen von Energieträgern in Form von Monosacchariden (Glc) oder langkettigen Speichermolekülen (Stärke, Glykogen), über Schutz- und Gerüstsubstanzen (z.B. Zellulose) bis hin zu Bestandteilen komplexer Kohlenhydratverbindungen wie z.B. Glykoproteinen, Glykolipiden mit Schlüsselfunktionen in einer Reihe von Prozessen wie Signalgebung, Zell-Zell-Kommunikation sowie der molekularen und zellulären Erkennung.

In Pflanzen sind Stärke, Cellulose und Saccharose die bekanntesten Kohlenhydrate. Als Energieträger, Gerüstsubstanzen bzw. Transportmetaboliten werden sie aus Frc und Glc gebildet. In den letzten Jahren wurden weitere Zucker (wie z.B. 6-Desoxyglucose und Trehalose) als signalgebende Moleküle in Signaltransduktionskaskaden der Pflanze eingehend untersucht (Smeekens, 2000).

In photoautotrophen Mesophyllzellen werden in der photosynthetischen Lichtreaktion Lichtquanten in chemische Energie umgewandelt. Die bereitgestellten Reduktionsmittel NADPH und Energieäquivalente in Form von Adenosintriphosphat (ATP), werden im Calvin-Zyklus bei der Umwandlung von 3-Phosphoglycerat (3-PGA) durch die 3-Phosphoglycerat-Kinase zu 1,3-Bisphosphoglycerat und anschließender Reduktion

mittels der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), zur Synthese von Triose-P wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) genutzt (Übersicht in Raines, 2003). Triose-P als Endprodukt der photosynthetischen CO₂-Fixierung wird zum Teil für die Regeneration des Eingangssubstrats des Calvin-Zyklus, Ribulose-1,5-bisphosphat, verwendet. Die beiden Triose-Phosphate GAP und DHAP werden entweder im Chloroplasten zur Synthese von Stärke verwendet oder aus dem Chloroplasten ins Cytosol exportiert, wo daraus Hexosen entstehen, die u.a. der Synthese von Saccharose dienen. Die **Stärkesynthese** durch die ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase) erfolgt in den Plastiden. Die AGPase ist das Schlüsselenzym und wird allosterisch von 3-PGA aktiviert und durch Pi inaktiviert (Cross *et al.*, 2004; Hwang *et al.*, 2005). Darüber hinaus kann sie posttranslational durch Thioredoxin Redox-abhängig de-/aktiviert werden (Hendriks *et al.*, 2003). In Chloroplasten wird Stärke nachts zu Glc oder Maltose (Mal) umgewandelt und über Glucose-Transporter (GlcT) bzw. Maltose-Transporter (MalT) in das Cytoplasma transportiert (Niittylä *et al.*, 2004).

Saccharose- und Trehalosesynthese

Zur Synthese von Saccharose wird Triose-P zunächst über TPTs im Austausch gegen Pi in das Cytosol transportiert (Fliege *et al.*, 1978). Der strikte Gegentausch von Pi mit Triose-P gewährleistet eine Pi-Homöostase im Chloroplastenstroma. Diese ermöglicht die Synthese von ATP aus ADP und Pi in den Lichtreaktionen der Photosynthese (Flügge, 1995). Ein Pi-Mangel würde zu einer Inhibierung der photosynthetischen Elektronentransportkette führen (Sharkey, 1985). Im Cytosol wird Triose-P von einer Aldolase zu Fructose-1,6-bisphosphat (F1,6P₂) umgesetzt. Anschließend erfolgt die Dephosphorylierung durch die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBase) zu Fructose-6-Phosphat (F6P). Dieser Schritt ist ein wichtiger Regulationspunkt der Saccharosesynthese und wird von Fructose-2,6-bisphosphat (F2,6P₂) kontrolliert (Stitt, 1991; siehe unten). Saccharose wird im Cytosol von den Enzymen Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) und Saccharose-Phosphat-Phosphatase (SPP) synthetisiert (siehe Abb. 3). Dabei setzt SPS UDP-Glucose und F6P zu Saccharose-6-Phosphat um, welches von SPP zu Saccharose unter Freisetzung von Pi umgewandelt wird (Leloir & Cardini, 1955). Die SPS ist ein Schlüsselregulator der Saccharosesynthese und wird von G6P aktiviert bzw. von Pi inhibiert (Huber & Huber,

1996). Zusätzlich kann SPS durch Phosphorylierung spezifischer Serinreste reguliert werden, so dass eine Aktivitätsänderung bei osmotischem Stress und Hochlicht erfolgt (Huber & Huber, 1996).

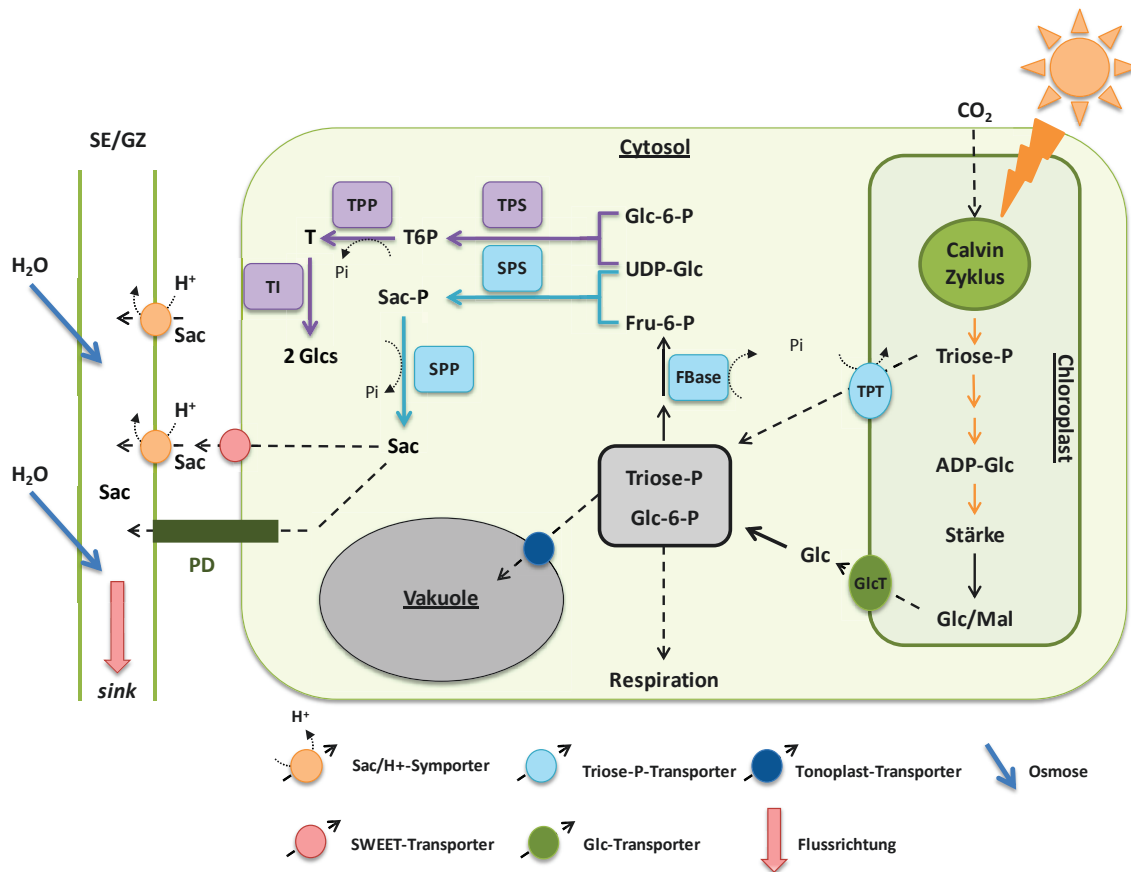


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Saccharosesynthese und Phloembeladung in Mesophyllzellen von source-Blättern. Durch die photosynthetischen Lichtreaktionen werden Lichtquanten und CO_2 in den Chloroplasten in Triose-Phosphate (Triose-P) umgewandelt. Triose-P wird über Triose-Phosphat/Phosphat-Translokatoren (TPT) im Austausch gegen anorganisches Phosphat (Pi) in das Cytosol transportiert oder in Chloroplasten zu ADP-Glucose umgewandelt und zur Stärkesynthese verwendet. Stärke wird während der Nacht in Glucose (Glc) oder Maltose (Mal) umgewandelt und über entsprechende Transporter (GlcT/MalT) in das Cytoplasma entlassen. Glc muss durch Hexokinasen zu Glucose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert und durch die G6P-Isomerase zu Fructose-6-Phosphat (F6P) umgewandelt werden. Im Cytosol wird Saccharose (Sac) aus F6P und UDP-Glucose (UDP-Glc) durch die Saccharose-Phosphat-Synthase (SPS) zu Saccharose-6-Phosphat (Sac-P) umgewandelt, welches von der Saccharose-Phosphat-Phosphatase (SPP) zu Sac umgewandelt wird. Sac kann sowohl über den symplastischen Weg durch Plasmodesmata (PD) von Zelle zu Zelle hin zu dem Siebelement-Geleitzellen-Komplex (SE/GZ-Komplex), als auch über den apoplastischen Weg dorthin transportiert werden. Die Sac-Aufnahme in den Apoplasten erfolgt über SWEET-Transporter. Der Sac-Transport in den SE/GZ-Komplex erfolgt indirekt aktiv durch Sac/H⁺-Symporter. Die Akkumulation von Sac im SE/GZ-Komplex erzeugt einen osmotischen Wassernachstrom und der Langstreckentransport wird durch eine osmotische Druckdifferenz zwischen source- und sink-Gewebe ermöglicht. Die Synthese von Trehalose (T) erfolgt in zwei Schritten: Zunächst wird UDP-Glucose und G6P von der T6P-Synthase (TPS) zu Trehalose-6-Phosphat (T6P) umgewandelt und anschließend wird T6P von T6P-Phosphatase (TPP) unter Abspaltung von Phosphat zu Trehalose (T) synthetisiert. Eine Hydrolyse von Trehalose in zwei Glucosemoleküle durch Trehalase wird vermutet. Abbildung verändert nach Ruan (2014).

Neben Saccharose ist **Trehalose** ein weiteres wichtiges Disaccharid, bestehend aus zwei Glucosemolekülen. Die Synthese von Trehalose erfolgt in zwei Schritten, zunächst wird UDP-Glucose und G6P von der Trehalose-6-Phosphat-Synthase (TPS) zu Trehalose-6-Phosphat (T6P) umgewandelt. Anschließend wird T6P von der T6P-Phosphatase (TPP) unter Abspaltung von Phosphat zu Trehalose synthetisiert (Übersicht in Paul *et al.*, 2008). Hierbei wird eine Hydrolyse von Trehalose in zwei Glucosemoleküle durch eine Trehalase vermutet (Elbein *et al.*, 2003). T6P scheint ebenfalls eine zentrale Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanze einzunehmen und ist eng mit der Verfügbarkeit von Saccharose verbunden. So steigt der T6P-Gehalt bei Arabidopsis nach externer Zugabe von Saccharose signifikant an, weshalb T6P als Signal für die Verfügbarkeit von Saccharose angesehen wird (Lunn *et al.*, 2006).

Saccharoctransport

Saccharose stellt als nicht-reduzierendes Disaccharid die Haupttransportform photosynthetisch assimilierter Kohlenhydrate in Pflanzen dar. Die Dimerisierung der Monosaccharide hat den Vorteil, dass Saccharose keine reduzierenden Enden trägt, dadurch weniger reaktiv ist und unerwünschte Interaktionen so gering wie möglich gehalten werden (Arnold, 1968). Bei Bedarf können die Monosaccharide Glc und Frc mit nur minimalem Energieaufwand Enzym-katalysiert, z.B. durch Invertasen, wieder aus Saccharose freigesetzt werden.

Um die gebildete Saccharose aus den Mesophyllzellen zu exportieren, muss diese zunächst zu den Siebzellen des Blattes transportiert und anschließend in den Siebelement-Geleitzellen-Komplex (SE/GZ-Komplex) aufgenommen werden (siehe Abb. 3). In den Siebelementen erfolgt der Stofftransport, dagegen sind Geleitzellen für die Beladung und die Stoffwechselfunktion, wie Proteinbiosynthese für die Siebelemente, zuständig (Van Bel, 1996; Van Bel & Knoblauch, 2000). Siebelemente sind spezielle Pflanzenzellen, denen u.a. Zellkern, Golgi-Apparat und Vakuole fehlen, wohingegen modifizierte Mitochondrien, Plastiden und ER vorhanden sind (Van Bel & Knoblauch, 2000). Siebelemente sind von den Geleitzellen umgeben und bilden zusammen den funktionellen SE/GZ-Komplex.

Saccharose kann sowohl über den sogenannten **symplastischen** Weg durch Plasmodesmata von Zelle zu Zelle bis hin zu dem SE/GZ-Komplex, als auch über einen **apoplastidären Transport** befördert werden (Rennie & Turgeon, 2009). Die Saccharose-

aufnahme in den Apoplasten war für lange Zeit unklar und konnte in neuen Studien aufgeklärt werden. Chen *et al.* (2012) identifizierten Saccharoseausstrom-Transporter der SWEET-Familie an der Plasmamembran bei Arabidopsis (SWEET11 und SWEET12) und bei Reis (SWEET11 und SWEET14). Mutationen der Transporter SWEET11 und SWEET12, die im Phloem lokalisiert sind, reduzierten den Export von Assimilaten und führten zu einem Zuckeranstau in Arabidopsis-Blättern (Chen *et al.*, 2012). Die SWEET-Transporter scheinen auch ein Angriffspunkt für Pathogene bei der Pflanzeninfektion zu sein. Bakterien können gezielt die SWEET-Genexpression in infizierten Reiszellen aktivieren, wodurch Zucker freigesetzt werde, die den Bakterien als Nährstoffquelle dienen (Übersicht in Schroeder *et al.*, 2013).

Aufgrund der hohen Konzentrationsunterschiede von Saccharose zwischen Apoplast und dem SE/GZ-Komplex ist die Saccharoseaufnahme ein aktiver Prozess (Lohaus *et al.*, 1995). Die Aufnahme wird z.B. von einem Saccharose/H⁺-Symporter (SUT1) bei Tabak und *sucrose transport protein* (SUC2) bei Arabidopsis vermittelt (Bürkle *et al.*, 1998; Gottwald *et al.*, 2000). Der Saccharose/H⁺-Symporter nutzt den von der P-Typ H⁺-ATPase aufgebauten Prototengradienten, um Saccharose gegen das Konzentrationsgefälle in den SE/GZ-Komplex zu importieren. Zusätzlich wird vermutet, dass der hohe osmotische Wert in den Siebzellen nicht nur auf dem aktiven Transport von Saccharose beruht, sondern vielmehr auf die Neusynthese von Transportzuckern der Raffinose-Familie in den Übergangszellen zurückgeht (Van Bel, 1996). Dieses als **Polymerfalle** beschriebene Modell besagt, dass Raffinose und Stachyose als Galactose-Oligomere ausgehend von Saccharose in den Übergangszellen neu synthetisiert werden. Die höhermolekularen Zucker können wegen ihrer Größe nicht durch die engen Plasmodesmata zurück diffundieren (Rennie & Turgeon, 2009). Dadurch wird ein Konzentrationsgefälle zwischen Übergangszellen und Bündelscheidenzellen aufgebaut und ein fortlaufender Nachstrom von Saccharose durch Diffusion gewährleistet. Folglich steigt die Konzentration an Zuckern in den Siebelementen, wodurch ein Konzentrationsgradient aufgebaut wird.

Die im Phloem befindlichen Zucker werden über einen Langstreckentransport zu den Kohlenhydrat-verbrauchenden Geweben (*sink*) der Pflanze, wie z.B. Wurzel, Blüten etc., transportiert. Der Langstreckentransport wird durch eine osmotisch Druckdifferenz zwischen *source*- und *sink*-Geweben ermöglicht und ist daher als Druckstrommodell bekannt (Übersicht in Fensom, 1981). Die hohen Zuckerkonzentrationen im Phloem der

source-Blätter erzeugen einen osmotischen Wassernachstrom aus dem benachbarten Xylem, wohingegen die Phloementladung an den *sink*-Gewebe den osmotischen Wert erniedrigt und Wasser wieder in das Xylem einströmt.

Die Phloementladung in *sink*-Gewebe kann symplastisch oder apoplastisch erfolgen (Fisher & Oparka, 1996; Patrick, 1997). Bedingung für die symplastische Phloementladung ist das Vorhandensein von Plasmodesmata, über die Zucker von den Siebelementen mit hoher Transportzuckerkonzentration zu den *sink*-Zellen mit niedriger Konzentration fließen. Die symplastische Phloementladung ist hauptsächlich bei Wurzelspitzen (Oparka *et al.*, 1994), jungen wachsenden Blättern (Haupt *et al.*, 2001) und Speicherorganen, wie Kartoffelknollen, zu finden (Oparka & Wright, 1988). Bei der apoplastischen Entladung wird Saccharose im Apoplasten des SE/GZ-Komplexes von der extrazellulären Zellwand-Invertase in Glc und Frc gespalten, die dann über Hexose-Transporter durch die Plasmamembran in das Cytosol importiert werden (Büttner & Sauer, 2000). Alternativ kann Saccharose auch über Saccharose-Transporter in die Zellen aufgenommen werden und u.a. Energie-konservierend von der Saccharose-Synthase (*sucrose synthase*, SuSy) in UDP-Glucose und Frc gespalten werden (Koch, 2004). Die Art der Phloementladung ist von der Art des *sink*-Gewebe und des Entwicklungsstandes abhängig (Godt & Roitsch, 2006). Während der Samenentwicklung können – aufgrund morphologischer Isolation – Photoassimilate nur apoplastisch und nicht symplastisch transportiert werden. Dies lässt sich auch während der Fruchtreife beobachten, bei der ein Umschalten von symplastischer zu apoplastischer Entladung dokumentiert wurde. Gleiches gilt für die Phloementladung bei Pathogenbefall (Zhang *et al.*, 2006).

1.4.1 Steuerung der Kohlenhydratverteilung durch Fructose-2,6-bisphosphat und der *sink*-Stärke

Die Kohlenhydratverteilung innerhalb der Pflanze wird zum einen durch die relative ***sink*-Stärke** der einzelnen Pflanzenorgane bestimmt (siehe unten) und unterliegt komplexen Regulationsmechanismen an denen auch das Signalmolekül **Fructose-2,6-bisphosphat** (F2,6P₂) beteiligt ist.

Das Fructose-2,6-bisphosphat-System

F2,6P₂ nimmt eine regulatorische Schlüsselrolle im primären Kohlenhydrathaushalt aller eukaryotischen Lebewesen ein (Schaftingen, 1987). In Tieren und Pilzen reguliert F2,6P₂

die Glykolyse und Glukoneogenese durch Stimulierung der 6-Phospho-Fructo-1-Kinase (PFK) und Inhibierung der Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP) (Colosia *et al.*, 1998). In Pflanzen koordiniert F2,6P₂ die Balance von Saccharosesynthese, Glykolyse und Stärkesynthese photosynthetischer Zellen (siehe Abb. 4), indem es regulatorischen Einfluss auf die Umwandlung von Fructose-1,6-bisphosphat (F1,6P₂) und Fructose-6-Phosphat (F6P) ausübt (Stitt *et al.*, 1987).

Das Gleichgewicht zwischen F1,6P₂ und F6P wird von den Enzymen Fructose-1,6-bisphosphatase (FBP), Phosphofruktokinase (PFK) und – für Pflanzen spezifisch – Fructose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (PFP) beeinflusst (siehe Abb. 4). Die Aktivität der Enzyme FBP und PFP wird dabei durch F2,6P₂ gesteuert, da F2,6P₂ als negativer Effektor die FBP inaktiviert und die PFP aktiviert (Cseke *et al.*, 1982; Sabulase & Anderson, 1981). Hohe F2,6P₂-Konzentrationen fördern die Glykolyse, wohingegen niedrige F2,6P₂-Konzentrationen die Glukoneogenese und somit die Bildung von Saccharose begünstigen (Nielsen *et al.*, 2004).

Die Regulation des Effektors F2,6P₂ erfolgt über das bifunktionale Enzym Fructose-2,6-bisphosphatase (F2,6BPase), welches als Kinase (F6P,2K) und als Phosphatase (F2,6BPase) agieren kann. Der Gehalt an F2,6P₂ im Cytosol ist abhängig von seiner Synthese aus F6P durch die F6P,2K. Sein Abbau wird durch die F2,6BPase katalysiert. Die Enzymaktivität der F2,6BPase wird wiederum durch Intermediate des Primärstoffwechsels beeinflusst und ermöglicht so eine koordinierte Anpassung des Kohlenhydratstoffwechsels an die physiologischen Anforderungen der Pflanze (Banzai *et al.*, 2003). So wird z.B. bei Arabidopsis und Spinat die F6P,2K durch F6P und Pi aktiviert und die F2,6P₂-Synthese durch 3-PGA und Triose-P inhibiert (Stitt, 1990; Markham & Kruger, 2002; Villadsen & Nielsen, 2001). F1,6P₂, Pi und das OPP-Intermediat 6PG hemmen die F2,6BPase und somit die F2,6P₂-Hydrolyse (Villadsen & Nielsen, 2001). 6PG wird im oxidativen Abschnitt des OPPs bei der Umsetzung von 6-Phosphogluconolacton durch die 6PGL gebildet und könnte ein direkter Regulationsmechanismus zwischen OPP und dem F2,6P₂-System sein.

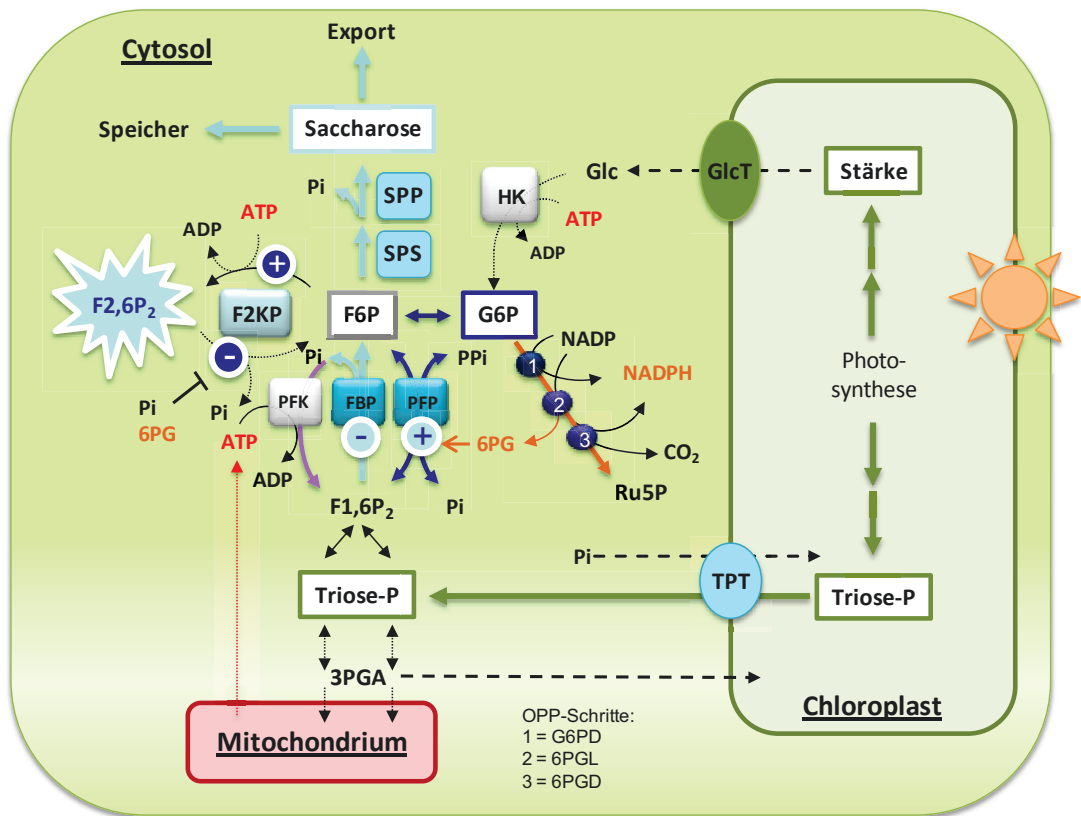


Abbildung 4: Schematische Darstellung der regulatorischen Schlüsselrolle von Fructose-2,6-bisphosphat im primären Kohlenhydrathaushalt von source-Blättern. F2,6P₂ koordiniert die Balance von Glykolyse, Saccharose- und Stärkesynthese. In Pflanzenzellen kann Fructose-1,6-bisphosphat (F1,6P₂) von drei Enzymen synthetisiert werden: Phosphofruktokinase (PFK), Fructose-1,6-bisphosphat (FBP) und Fructose-Phosphat-1-Phosphotransferase (PFP). F2,6P₂ fungiert als negativer Effektor für die FBP (inhibiert, -) und als positiver Effektor für die PFP (aktiviert, +). Die Regulation der F2,6P₂-Konzentration erfolgt über das bifunktionale Enzym Bisphosphat-Kinase/Phosphatase (F2KP). Die Aktivierung der Fructose-6-Phosphat-2-Kinase (F6P,2K) erfolgt durch Fructose-6-Phosphat (F6P) und Pi (+), gleichzeitig wird das Enzym durch 3-PGA inhibiert. F2,6P₂ (-) und F2KP haben Einfluss auf die Synthese von Saccharose und Stärke und passen sie an die Verfügbarkeit von Triose-P und Pi an. In Chloroplasten wird CO₂ und Pi zu Triose-P umgewandelt, welche im Gegenaustausch mit Pi über Triose-Phosphat/Phosphat-Translokatoren (TPT) in das Cytosol transportiert werden. Eine niedrige Pi-Konzentration im Cytosol verhindert den Export von Triose-P über den TPT aus dem Chloroplasten und fördert die Stärkesynthese. Bei hohen cytosolischen Pi-Konzentrationen steigt die Triose-P-Menge und Triose-P wird zu Saccharose umgewandelt. Dabei wird erneut Pi freigesetzt, welches im Gegenzug mit weiterem Triose-P in den Chloroplasten zurücktransportiert wird und den Pi-Pool des Chloroplasten hierdurch auffüllt. Die Fructose-6-Phosphat-2-Phosphatase (F2,6BPase) wird durch F1,6P₂, Pi und 6PG inaktiviert (-). Abbildung verändert nach Nielsen *et al.* (2004) und A. von Schaewen (2014).

Das Zusammenspiel von F2,6P₂ und F2KP bildet ein komplexes regulatorisches System, um die Synthese von Saccharose und Stärke aufeinander abzustimmen und ebenfalls an die Verfügbarkeit von Triose-P und Pi anzupassen. In Chloroplasten wird im Calvin-Zyklus Triose-P unter Verbrauch von NADPH und ATP synthetisiert, welche in das Cytosol im Gegenaustausch mit Pi über TPTs transportiert werden (Fliege *et al.*, 1978). Eine niedrige Pi-Konzentration im Cytosol verhindert den Export von Triose-P über TPTs aus den

Chloroplasten und fördert die Stärkesynthese. Steigt die cytosolische Menge von Triose-P an, sinkt die F2,6P₂-Konzentration und es erfolgt die Aktivierung der FBPAse. Als Konsequenz wird Triose-P vermehrt in Saccharose umgewandelt, wobei Pi freigesetzt wird und zurück in den Chloroplasten transportiert wird. Wenn die Saccharosemenge über einen kritischen Wert steigt, nimmt der F6P-Gehalt und somit auch die Bildung von F2,6P₂ zu. In der Nacht wird die im Stroma der Chloroplasten gespeicherte Stärke in Glc und Mal umgewandelt, über Glc- und Mal-Transporter in das Cytosol entlassen und so für die Saccharosesynthese bereitgestellt.

sink-Stärke

Wie oben erwähnt ist ein wichtiger Faktor für die Kohlenhydratverteilung innerhalb der Pflanze die sogenannte relative *sink*-Stärke der einzelnen Pflanzenorgane. In höheren Pflanzen gibt es eine Vielzahl von Zell- und Gewebetypen, wobei eine grundsätzliche Einteilung in Verbraucher- bzw. Speicher-Gewebe (*sink*-Gewebe) und Assimilatproduzierende Gewebe (*source*-Gewebe) möglich ist. Der Stoffwechsel von *source*-Geweben, wie der von adulten Blättern, ist optimal auf die Gewinnung von Kohlenhydraten aus der Photosynthese und deren Export ausgerichtet (siehe Abschnitt 1.4). Übersteigt die Produktion an Kohlenhydraten den Eigenbedarf der Zelle werden nicht benötigte Photoassimilate als Saccharose zu *sink*-Organen wie Wurzeln, Meristemen, jungen Blättern, Blüten und Samen transportiert und dort verbraucht bzw. gespeichert (Hawker *et al.*, 1991). Der *source*- oder *sink*-Zustand ist dabei nicht statisch und kann im Laufe von Entwicklungsprozessen oder bedingt durch Stressoren (abiotisch sowie biotisch) wechseln. Grundsätzlich haben alle Pflanzenzellen, auch *source*-Blätter, ein *sink*-Potential (Herbers & Sonnewald, 1998; Roitsch, 1999). Wichtige Determinanten zur Bestimmung der relativen *sink*-Stärke in höheren Pflanzen sind dabei Saccharose-spaltende Enzyme wie z.B. **cwINV** (siehe unten) und **SuSy**. SuSy spaltet dabei die Saccharose reversibel in UDP-Glucose und Frc. Diese wird anschließend durch Hexo- oder Fructokinase phosphoryliert, wodurch F6P entsteht. Sowohl UDP-Glucose als auch F6P können weiter verstoffwechselt werden und dienen u.a. als Bausteine für Stärke, Cellulose und Kallose. **Invertasen** spalten Saccharose irreversibel in die Hexosen Frc und Glc. Je nach ihrer Lokalisation und ihrem pH-Optimum werden Invertasen in vakuoläre, Zellwand-gebundene oder neutrale/alkalische Invertasen unterteilt (Roitsch & Gonzalez, 2004).

Die neutralen/alkalischen Invertasen können im Cytosol und Chloroplasten lokalisiert sein (Vargas & Salerno, 2010) und sind am pflanzlichen Wachstum, der Entwicklung, der Blühregulierung und der Samenentwicklung beteiligt (Jia *et al.*, 2008; Barratt *et al.*, 2009; Welham *et al.*, 2009). Sie scheinen auch eine Funktion bei der Aufrechterhaltung der ROS-Homöostase zu haben (Xiang *et al.*, 2011). Die vakuolären und Zellwand-gebundenen Invertasen zählen zu den sauren Invertasen. Die vakuoläre Invertase reguliert die Zellexpansion und die Zuckerspeicherung, vor allem bei der Fruchtreife (Scholes *et al.*, 1996; Roitsch & Gonzalez, 2004; Sergeeva *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2012).

Die vakuoläre Invertase beeinflusst die Zellexpansion in dem sie den Turgordruck der Pflanzenzelle durch die Hydrolyse von Saccharose in Glc und Frc beeinflusst (Wang & Ruan, 2013). Die Anreicherung von Glc und Frc in der Vakuole erhöht das osmotische Potential der Vakuole, wodurch vermehrt Wasser in die Vakuole einströmt, der hydrostatische Druck ansteigt und die Zelle gestreckt wird (Wang *et al.*, 2010). Neben der osmotischen Funktion scheinen die von der vakuolären Invertase gespaltenen Hexosen auch eine Signalfunktion bei der Zellstreckung zu haben. Dabei wird vermutet, dass die vakuoläre Invertase über die gespaltenen Zucker mit Zellwand-gebundenen Kinasen (*wall-associated kinase*, WAK) interagiert. WAKs sind an Pektin in der Zellwand gebunden und ihre Aktivität ist essentiell für die Zellexpansion (Anderson *et al.*, 2001; Lally *et al.*, 2001).

1.4.2 Zellwand-Invertase als ein Schlüsselenzym des Kohlenhydratstoffwechsels

Regulation der cwINV

Die Zellwand-Invertase (cell-wall invertase, cwINV) ist ein *sink*-spezifisches Enzym und steuert die apoplastische Phloementladung. Sie reguliert die *sink/source*-Umsteuerung und wird von verschiedenen Stressstimuli aktiviert (Sturm & Tang, 1999; Roitsch, 1999; Roitsch & Gonzalez, 2004). Die Regulation der cwINV und der vakuolären Invertase erfolgt posttranslational und wird über Inhibitorproteine vermittelt (Rausch & Greiner, 2004). Hierbei konkurriert der Inhibitor mit der Saccharose pH-abhängig um die Substratbindestelle der cwINV, wodurch die Enzymaktivität letztlich von der Saccharosekonzentration und dem pH-Wert abhängig ist (Hothorn *et al.*, 2010).

Bedeutung der cwINV bei der pflanzlichen Pathogenantwort

Die Bedeutung der cwINV für die pflanzliche *sink/source*-Regulation konnte unter anderem an transgenen Tabakpflanzen gezeigt werden. Dabei beeinträchtigte die Überexpression einer Hefe-Invertase im Apoplasten von *source*-Blättern in Tabak den Export von Saccharose und führte zu einer Akkumulation von löslichen Zuckern und Stärke. Hierdurch wurde die Photosynthese inhibiert und das Wachstum der Pflanze beeinträchtigt (von Schaewen *et al.*, 1990). In einer weiteren Studie führte die konstitutive Überexpression der Hefe-Invertase zu einer Aktivierung des respiratorischen Stoffwechsels, sowie zu einer Anreicherung verschiedener Pathogen-induzierter Proteine (*pathogenesis-related proteins*, PR-Proteine) und Kallose. Darüber hinaus zeigten die transgenen Pflanzen eine erhöhte Resistenz gegen das Kartoffel-Virus Y (Herbers *et al.*, 1996; Herbers *et al.*, 2000). Auch in Reis resultierte die Überexpression eines cwINV-Gens (*grain-incomplete filling*, *gif1*) in einer konstitutiven Aktivierung von PR-Proteinen, Kallose und einer höheren Resistenz gegen das bakterielle Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* und den Pilz *Magnaporthe oryzae* (Sun *et al.*, 2014).

Die Reprimierung der apoplastidären cwINV bei der Tabaksorte *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN (SNN) hatte nach der Infektion mit *P. nicotianae* eine verringerte Bildung von Kallose, ROS und PR-Proteinen zufolge. Hierdurch wurde die zuvor resistente Pflanzensorte anfälliger für das Pathogen (Essmann *et al.*, 2008). Diese Beobachtungen und u.a die Daten aus Scharte *et al.* (2005) und Swarbrick *et al.* (2006) verdeutlichen die Schlüsselrolle der cwINV bei der *sink/source*-Ausprägung und der Zuckerbereitstellung für pflanzliche Abwehrprozesse. Gestützt werden diese Ergebnisse durch zahlreiche Untersuchungen, in denen nach Pflanze-Pathogen-Interaktionen die cwINV-Aktivität steigt (Übersicht in Tausin & Giardina, 2014). So ist u.a. die cwINV-Aktivitätssteigerung in *source*-Blättern der resistenten Tabaksorte SNN im Zuge der inkompatiblen Interaktion mit *P. nicotianae* eine der frühesten Abwehrreaktionen der Pflanze (Scharte *et al.*, 2005). Hierbei soll die gesteigerte cwINV-Aktivität die im Apoplasten befindliche Saccharose vermehrt in Hexosen spalten, welche dann über Hexose-Transporter in das Cytosol transportiert werden können (Hayes *et al.*, 2007). Der cytosolische Hexosereimport verringert den extrazellulären Kohlenhydratgehalt und erschwert den eingedrungenen Pathogenen die Besiedlung des Apoplasten (Fotopoulos *et al.*, 2003). Zum anderen dienen die reimportierten Hexosen als Energiequelle, z.B. für den OPP und die Zellatmung, und

beeinflussen die Genexpression Abwehr-relevanter Proteine (siehe Kapitel 1.4.3) und können somit als Signalmoleküle (siehe unten) fungieren.

1.5 Stresstoleranz bei Pflanzen

1.5.1 Grundlagen der pflanzlichen Pathogenantwort

Pflanzen sind als sessile und standortgebundene Organismen vielen Stressoren, u.a. auch Pathogenen, ausgesetzt. Letztere versuchen sie als Quelle für Kohlenhydrate und andere Assimilate zu nutzen (Scharte *et al.*, 2009; Panstruga & Dodds, 2009).

Löst ein Pathogen eine Krankheit im Pflanzenwirt aus, so wird das Pathogen als virulent bezeichnet. Die Pflanze ist dem Pathogen gegenüber **suszeptibel** und es liegt eine **kompatible Interaktion** vor. Ist die Pflanze **resistent** und somit in der Lage das Pathogen zu erkennen und unschädlich zu machen, spricht man von einer **inkompatiblen Interaktion** (Flor, 1971; Hammond-Kosack & Jones, 1996). Im Verlauf der Evolution entwickelten Pflanzen eine Vielzahl konstitutiver und induzierbarer Abwehrstrategien, um Pathogene effektiv zu bekämpfen. Zu den **konstitutiven Abwehrmechanismen**, die bereits vor einem Pathogenbefall vorhanden sind, zählen eine strukturelle Verstärkung von Zellwänden und der Kutikula. Aber auch biochemische Schutzmechanismen, wie die Einlagerung von Phytoanticipinen in die Vakuole, sind wichtige präventive Schutzmechanismen (Glazebrook, 2005; Panstruga & Dodds, 2009; Miedes *et al.*, 2014).

Überwindet das Pathogen die strukturellen Barrieren, so können Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand als *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) (Boller & Felix, 2009; Lotze *et al.*, 2007; Denoux *et al.*, 2008) und mikrobielle Pathogensignaturen, wie *pathogen-associated molecular pattern* (**PAMPs**) oder *microbe-associated molecular patterns* (**MAMPs**) den infizierten Zellen als Signalstoffe dienen (Nürnberger & Scheel, 2001). PAMPs, wie bakterielles Flagellin oder pilzliches Chitin, sind spezifische molekulare Strukturen, die für das Pathogen essentiell sind (Gómez-Gómez & Boller, 2000; Miya *et al.*, 2007). Diese hoch konservierten PAMPs werden von Rezeptoren den *pattern-recognition receptors* (PRRs) in der Plasmamembran erkannt und lösen eine intrazelluläre Immunantwort aus (Bittel & Robatzek, 2007; Boller & Felix, 2009). Zu den PRRs gehören u.a. die rezeptorartigen Kinasen (*receptor-like kinases*, RLK), die eine extrazelluläre N-terminale Erkennungsdomäne und eine cytosolische C-terminale Kinasedomäne haben (Shiu & Bleeker, 2001). Solche als *PAMP-triggered immunity* (PTI)

bekannten Abwehrprozesse begrenzen die Pathogenausbreitung (Jones & Dangl, 2006). Pathogene hingegen können PTI-Komponenten durch Sekretion von virulenten Effektorproteinen, die auch Avirulenzproteine genannt werden, inhibieren und so Abwehrmechanismen unterbinden. Um diese Angriffe abzuwehren, besitzen Pflanzen **Resistenz-Proteine (R-Protein)**. R-Proteine können Effektorproteine über sogenannte NB-LRR-Elemente erkennen und fungieren als Rezeptor (Dangl & Jones, 2001). Die NB-LRR-Rezeptorelemente bestehen aus einer Bindungsdomäne (*nuclear-binding domain*, NB) und langen Leucin-reichen Antennen (*leucin-rich repeat domain*, LRR), die Effektorproteine pathogenen Ursprungs detektieren (Abramovitch *et al.*, 2006; Tsuda *et al.*, 2010). Die unter dem Begriff *effector-triggered immunity* (ETI) zusammengefassten Abwehrmechanismen sind pathogenspezifisch und enden meist in der Auslösung der **hypersensitiven Reaktion (HR)** und **systemic acquired resistance (SAR)**.

Die HR ist eine Spezialform des programmierten Zelltots und repräsentiert den wirkungsvollsten pflanzlichen Abwehrmechanismus gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene. Die infizierten Zellen lösen dabei intra- und interzelluläre Signalkaskaden aus, die Abwehrprogramme aktivieren (Jones & Dangl, 2006; Thomma *et al.*, 2011). Die Zellen durchlaufen ein vorgefertigtes genetisches Programm, dessen Ziel die Eindämmung und die Tötung des Pathogens ist. Die Abwehrmaßnahmen beinhalten die Öffnung von Ionenkanälen in der Plasmamembran (Mazars *et al.*, 2010), die Aktivierung von *mitogen-activated protein kinases* (MAPK) (Zhang & Klessig, 2001) und die Produktion von ROS (Levine *et al.*, 1994). Zusätzlich werden physische Veränderungen eingeleitet, durch die die pflanzliche Zellwand durch Einlagerung von **Lignin** (Lamb & Dixon, 1997) oder **Kallose** (Rodriguez-Galves & Mendgen, 1995) mechanisch verstärkt wird. Pflanzenzellen sind über Plasmodesmata miteinander verbunden, wodurch ein symplastischer Stoffaustausch von Aminosäuren, Zuckern aber auch Makromolekülen wie Ribonukleinsäuren (RNA) und Proteine möglich ist (Ding *et al.*, 1992; Haywood *et al.*, 2002; Kragler, 2013). Pathogene und virale RNA/DNA können sich über diese Kanäle auf benachbarte Zellen ausbreiten und das Gewebe infizieren. Die Ausbildung von Kallosepapillen an den Plasmodesmata und an der Zellwand sollen zum einen die symplastische Ausbreitung von Pathogenen unterbinden und zum anderen pilzlichen Pathogenen das Eindringen über die Zellwand erschweren, um so Zeit für die Aktivierung von zellulären Abwehrprozessen zu gewinnen (Lamb & Dixon, 1997; Boller & Felix, 2009; Voigt, 2014).

Darüber hinaus wird die Expression von sogenannten **PR-Proteinen**, zu denen vor allem lytische Enzyme wie Chitinasen oder Glucanasen gehören, aktiviert und außerdem antimikrobiell wirksame **Phytoalexine** angehäuft (Hammerschmidt, 1999; Van Loon & Van Strien, 1999; Garcia-Brugger *et al.*, 2006). An diesem Signalnetzwerk sind weitere endogene Signalmoleküle wie u.a. Stickstoffmonoxid (NO), Salicylsäure (*salicylic acid*, SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) beteiligt (Jones & Dangl, 2006; Zipfel, 2009). Auf makroskopischer Ebene ist die HR durch die Bildung hypersensitiver Läsionen am Infektionsort erkennbar. Im Zuge einer erfolgreichen Pathogenabwehr können Pflanzen eine generell erhöhte Resistenz aufweisen. Dieses als SAR bekannte Phänomen erstreckt sich über die gesamte Pflanze und führt zu einer schnelleren Abwehr bei erneuter Infektion (Durrant & Dong, 2004).

1.5.2 Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bei der pflanzlichen Stressantwort

ROS (z.B. Superoxid-Anionen (O_2^-), Hydroxylradikale (OH \cdot), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und 1O_2) entstehen durch die schrittweise Reduktion von molekularem Sauerstoff. Es handelt sich dabei um hoch reaktive, toxische Substanzen, die durch unspezifische Reaktionen mit Makromolekülen wie DNA, Pigmenten, Proteinen und Lipiden oxidativen Schaden erzeugen und diese zerstören (Asada & Takahashi, 1987; Lamp & Dixon, 1997; Halliwell, 2006). ROS werden *per se* innerhalb der Pflanzenzelle in Chloroplasten, Mitochondrien und Peroxisomen als Nebenprodukte des Grundstoffwechsels, z.B. während der Photosynthese und Atmung gebildet (Asada, 1999; Doudican *et al.*, 2005; Keunen *et al.*, 2013). Normalerweise werden diese ROS durch eine Vielzahl an enzymatischen und nicht-enzymatischen Schutzreaktionen unschädlich gemacht. Abiotische und biotische Stressbedingungen aber verschieben das ROS-Gleichgewicht auf die Seite der ROS-Produktion. So erhöhen Stressoren wie Starklicht (Takahashi & Murata, 2008), Trockenheit (Asada, 2006; de Carvalho & Cruz, 2008), Versalzung (Miller *et al.*, 2010) und Metalle (Seth *et al.*, 2012) die ROS-Produktion in pflanzlichen Organismen. Darüber hinaus zählt die massive Produktion von ROS, der sogenannte *oxidative burst*, zu den frühesten zellulären Antworten nach Pathogenerkennung (Levine *et al.*, 1994; Lamb & Dixon, 1997; Galletti *et al.*, 2008). Dabei werden im Apoplasten der Pflanze übermäßig ROS generiert. In verschiedenen Inhibitorstudien und Mutantanalysen wurde eine Schlüsselrolle der NADPH-Oxidase bei der apoplastidären ROS-Produktion und folgenden Signaltransduktion erkannt und beschrieben. So bleibt z.B. in resistenten Pflanzen, in

denen die NADPH-Oxidase reprimiert oder blockiert ist, die massive Produktion von ROS und die HR nach Pathogenbefall aus (Keller *et al.*, 1998; Lara-Ortiz *et al.*, 2003; Torres & Dangl, 2005).

ROS wirkt bei Pathogenbefall entweder direkt toxisch oder interagiert mit Signalkaskaden und Moleküle wie SA, NO und Calcium (Ca^{2+}) (Torres *et al.*, 2006). Darüber hinaus beeinflussen ROS die mechanische Verstärkung der pflanzlichen Zellwand. Durch oxidative Quervernetzung von Makromolekülen in der Zellwand, wie Pektinen, Hemicellulosen und Proteinen, sowie Lignifizierung wird die Zellwand gegen Zellwand-abbauende Enzyme pathogenen Ursprungs resistenter (Pugin *et al.*, 1997; Glazebrook, 2005; Bethke *et al.*, 2014).

Trotz ihrer Toxizität können ROS auch als Signalmoleküle und Schlüsselregulatoren für Wachstum, Entwicklung und abiotische sowie biotische Abwehrprozesse fungieren (Mittler, 2002; Neill *et al.*, 2002; Foreman *et al.*, 2003; Mittler *et al.*, 2011). ROS wirken als Signalmoleküle, indem sie mit Histidin-Kinasen, ROS-sensitiven Phosphatasen oder Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren interagieren und die Transkription von Genen beeinflussen. Zu diesen gehören u.a. NPR1 (*non-expressor of PR1*) und der Transkriptionsfaktor TGA2 (Fan & Dong, 2002; Fobert & Depres, 2005). NPR1 spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort der Pflanze in der Abwehr-abhängigen Genexpression von PR1. Die Monomerisierung von NPR1 wird über eine Änderung des Redox-Status im Cytosol reguliert (Tada *et al.*, 2008). Das zuvor im Cytosol als Multimer lokalisierte NPR1 wandert als Monomer in den Kern und interagiert dort mit einem TGA-Transkriptionsfaktor. Somit wird die PR-Gen-Expression induziert (Fu *et al.*, 2012). Gleichzeitig stellt die Oxidation der Aminosäure Cystein von Proteinen eine Möglichkeit der Redox-Kontrolle der enzymatischen Aktivität von Proteinen dar (Fourquet *et al.*, 2008). Interessanterweise wird durch die Oxidation der Aminosäure Methionin (MetS) zu Methioninsulfoxid (MetSO) die hydrophobe Seitenkette polar, wodurch die Proteinstruktur verändert werden kann (Vogt, 1995; Black & Mould, 1991). Diese grundlegende Strukturveränderung verbunden mit der Tatsache, dass die Oxidierung reversibel ist (Kim & Gladyshev, 2007; Tarrago *et al.*, 2009), macht Methionin zu einer potentiell Redox-regulierbaren Aminosäure (Hardin *et al.*, 2009).

Neben den oben beschriebenen Interaktionspartnern können ROS Einfluss auf die Permeabilität von Ca^{2+} -Kanälen nehmen und die Ca^{2+} -Signaturen in der Zelle modulieren

(Takeda *et al.*, 2008; Mazars *et al.*, 2010). Die erhöhten intrazellulären Ca^{2+} -Signaturen werden von Ca^{2+} -Bindeproteinen (*calcium-binding protein*, CBP) wahrgenommen, zu denen in Pflanzen 250 Vertreter gehören (Day *et al.*, 2002). CBPs vollziehen nach Ca^{2+} -Bindung an ihren EF-Händen eine Konformationsänderung, wodurch weitere Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglicht und diese reguliert werden (Dodd *et al.*, 2010). Zu den CBPs zählen Calmodulin, *Ca*²⁺-*dependent protein kinases* (CDPKs), *calcineurin B-like proteins* (CBL-Proteine) und NADPH-Oxidasen (Harmon *et al.*, 2001; de Falco *et al.*, 2010). Diese können wiederum Phosphorylierungskaskaden wie MAPKs aktivieren und posttranskriptionelle Regulationsmechanismen von Abwehrprozessen einleiten (Wurzinger *et al.*, 2011). So wird das ursprüngliche ROS-Signal vielschichtig verschaltet und verstärkt (Zwerger & Hirt, 2001; Ichimura *et al.*, 2002).

1.5.3 Kohlenhydrate als Signalmoleküle

Kohlenhydrate sind neben der zentralen Rolle in der pflanzlichen Entwicklung auch an der Regulation des Metabolismus und bei der Stressantwort beteiligt (Rolland *et al.*, 2006). **Saccharose** und insbesondere **Hexose** fungieren als Signalmoleküle (*sugar sensing*) und beeinflussen Entwicklungsprozesse wie u.a. Wachstum, Blütenbildung, Differenzierung von vaskulären Zellen und Speicherorganen (Koch, 1996; Rolland *et al.*, 2006; Wind *et al.*, 2010; Tognetti *et al.*, 2013). Als universelle intrazelluläre Glucosesensoren dienen dabei Hexokinasen (HKX), die erstmals bei Arabidopsis identifiziert wurden (Jang *et al.*, 1997). Neben HKX werden die Zuckersignale über eine Reihe weiterer Zuckersignalwege weitergegeben, z.B. an die Plasmamembran gebundene G-Protein-gekoppelte Signalwege (Grigston *et al.*, 2008), Zuckerkennung durch Snf- (*sucrose non-fermenting*) ähnliche Proteinkinasen (Baena-Gonzalez *et al.*, 2007), sowie eine Hexoseerkennung im sekretorischen Signalweg (Herbers *et al.*, 1996). Neben den Hexosen können auch andere Kohlenhydrate, wie z.B. **Trehalose** (siehe oben), als Signalmoleküle fungieren. Es wird vermutet, dass T6P mit SnRK1 (*sucrose non-fermenting related kinase 1*), einem Repressor des pflanzlichen Wachstums, interagiert und dessen Aktivität inhibiert (Lunn *et al.*, 2006; Nunes *et al.*, 2013). Somit scheint T6P als Signal für die Steuerung von Wachstum, Zellwandbiosynthese und Stärkesynthese zu wirken (Übersicht in Paul *et al.*, 2008).

Kohlenhydrate induzieren die Genexpression von vielen *sink*-spezifischen Genen wie z.B. die der SuSy, der cwINV und der G6PDH (Salanoubat & Belliard, 1989; Roitsch *et al.*, 1995; Hauschild & von Schaewen, 2003). Genau gegensätzlich erfolgt die Regulation von

Genen des *source*-Stoffwechsels. Gene der Photosynthese, wie die des Chlorophyll-*a*-Bindeproteins und die der kernkodierten kleinen Untereinheit der RubisCO, werden durch Kohlenhydrate reprimiert (Sheen, 1990; Krapp *et al.*, 1993). Auf diese Art und Weise sind Zucker an der Ausprägung des *sink/source*-Verhältnisses innerhalb der Pflanze beteiligt und passen es an die Zuckerverfügbarkeit an (Roitsch, 1999).

1.6 Primärstoffwechsel und pflanzliche Stresstoleranz

Egal ob es sich um abiotische oder biotische Stressoren handelt, die Abwehr benötigt – wie oben beschrieben – ein hohes Maß an Energie in Form von ATP, Reduktionsäquivalenten und Kohlenstoffbausteinen (Berger *et al.*, 2007; Seo *et al.*, 2007). Der Energiebedarf kann durch eine Reihe von metabolischen Umstellungen des Primärstoffwechsels bereitgestellt werden (Rojas *et al.*, 2014). Eine besondere Bedeutung während der pflanzlichen Stresstoleranz haben der OPP (siehe Kapitel 1.2) und der Kohlenhydratstoffwechsel (siehe Kapitel 1.4). Die NADPH-Oxidase-abhängige Bildung von ROS benötigt NADPH, welches von G6PDH und 6PGDH im OPP zu Verfügung gestellt wird (Pugin *et al.*, 1997). Auch die Reorganisation des Zytoskelettes, sowie die Bildung von Kallose erfordern ATP und UDP-Glc (Takemoto & Hardham, 2004; Maor & Shirasu, 2005). Eine Veränderung dieser Stoffwechselprozesse begünstigt somit die erfolgreiche Pathogenabwehr und wird bereits als integraler Bestandteil der pflanzlichen Stressresistenz postuliert (Übersicht in Bolton, 2009).

Die Bereitstellung von Kohlenhydraten für Abwehrprozesse stellt in photoautotrophen, ungestressten *source*-Zellen – besonders im Licht – jedoch ein grundsätzliches Problem dar. Neben dem schnellen Zuckerausport sind heterotrophe, Abwehr-unterstützende Stoffwechselprozesse wie Glykolyse, Atmung, OPP und der Shikimatweg in der Regel auf ein Grundniveau gedrosselt (Scheideler *et al.*, 2002). Im Verlauf der pflanzlichen Pathogenabwehr kann es in phototrophen Pflanzenzellen deshalb zu einer metabolischen Umstellung auf heterotrophen Stoffwechsel kommen. Es erfolgt eine **Umstellung von *source* auf *sink*-Metabolismus**, sodass Stoffwechselintermediate, sowie Reduktionsäquivalente für die Abwehr bereitgestellt werden können (Roitsch, 1999; Scharte *et al.*, 2005).

Diese stressbedingte *source/sink*-Umstellung und die Bedeutung von OPP, dem Kohlenhydratstoffwechsel und den Schlüsselenzymen NADPH-Oxidase, G6PDH und cwINV konnte u.a. bei der erfolgreichen Pathogenabwehr der hochresistenten Tabaksorte SNN

gegen das hemibiotrophe Pathogen *P. nicotianae* aufgezeigt werden (Scharte *et al.*, 2005; Essmann *et al.*, 2008; Scharte *et al.*, 2009). Zwischen diesen Wegen bestehen viele Zusammenhänge und Berührungspunkte (Abb. 5).

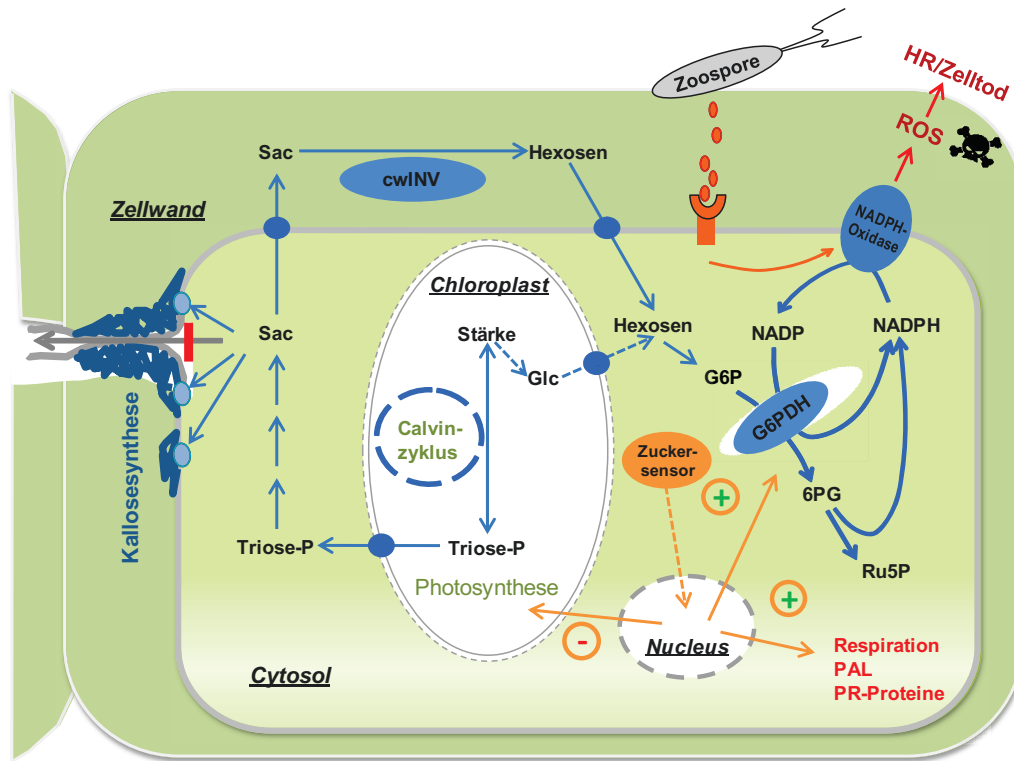


Abbildung 5: Einfluss der cwINV und der G6PDH auf die Pathogenabwehr in source-Blättern von Tabak. Kohlenhydrat-verbrauchende Prozesse, wie die Bildung von Kallose und ROS, werden unmittelbar nach Infektion mit *P. nicotianae* (Zoospore) in einer resistenten Tabakpflanze induziert. Durch Verschluss der Plasmodesmata mit Kallose, in Verbindung mit einer gesteigerten cwINV-Aktivität, wird der symplastische Export von Saccharose gestoppt. Die reimportierten Hexosen induzieren die Genexpression von vielen *sink*-spezifischen Genen wie z.B. die der cwINV und der cytosolischen G6PDH (+) und werden als Energiequelle z.B. für den OPP, die Kallosebildung und die Zellatmung genutzt. Des Weiteren sind sie eine wichtige Voraussetzung für die ROS-Bildung und den hypersensitiven Zelltod, da die NADPH-Oxidase-abhängige ROS-Bildung NADPH benötigt, welches von G6PDH und 6PGDH im OPP zu Verfügung gestellt wird. Genau gegensätzlich erfolgt die Regulation von Genen des *source*-Stoffwechsels wie der Photosynthesegene (-). Auf diese Art und Weise sind Zucker an der Ausprägung des *sink/source*-Verhältnisses innerhalb der Pflanze beteiligt und passen den Stoffwechsel an die Zuckerverfügbarkeit an. Die Abbildung basiert auf Ergebnissen von Scharte *et al.* (2005, 2009) und Essmann *et al.* (2008) sowie der einschlägigen Literatur (Abbildung verändert nach J. Scharte und E. Weis).

Kohlenhydrat-verbrauchende Prozesse, wie die Bildung von Kallose und die massive ROS-Bildung werden unmittelbar nach Infektion mit *P. nicotianae* in resistenten Pflanzen induziert. Durch einen Verschluss der Plasmodesmata mit Kallose, in Verbindung mit einer gesteigerten cwINV-Aktivität, kommt es zunächst zu einem Stopp des symplastischen und später auch des apoplastischen Exports von Saccharose. Der Reimport

dieser Zucker in die infizierten Zellen ist eine wichtige Voraussetzung für die Induktion weiterer Abwehrprozesse, wie z.B. verstärkte Kallose- und ROS-Bildung, was den hypersensitiven Zelltod zur Folge hat. Dieses Szenario scheint nicht nur für biotischen Stress zu gelten, da z.B. Tabakpflanzen mit veränderter G6PDH nicht nur gegen Pathogene, sondern auch scheinbar gegen Trockenstress resistenter wurden (Scharte *et al.*, 2009). Zusammengefasst lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die pflanzliche Stressantwort generell abhängig von der Zuckerverfügbarkeit ist und eine damit verbundene, frühe ROS-Produktion ermöglicht.

1.7 Zielsetzung

Wie in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben ist die pflanzliche Stressabwehr ein komplexes Netzwerk aus verschiedensten Stoffwechselprozessen des Primärstoffwechsels. Diese sind aufeinander abgestimmt und über Signalkaskaden miteinander verknüpft. Trotz der Komplexität konnten Schlüsselkomponenten in den Abwehrmechanismen identifiziert werden. Zu ihnen gehören Prozesse wie der OPP mit seinem Schlüsselenzym G6PDH und der Kohlenhydratstoffwechsel mit cwINV als zentrales Enzym. Diese Stoffwechselwege sind in Pflanzen die Hauptlieferanten für Energie in Form von Reduktionsäquivalenten und Zuckergerüsten.

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, inwieweit eine Modulation von Gehalt oder kinetischen Parametern dieser Enzyme zu einer Erhöhung der Stresstoleranz beitragen können. In bereits durchgeführten Untersuchungen verbesserte der Austausch von cytosolischen G6PDH-Enzymen durch eine plastidäre G6PDH-Isoform (AtG6PD3; P2-Klasse) – mit geringer NADPH-Rückkopplung-Inhibierung im Cytosol der Pflanze – die Abwehrreaktion der transgenen Pflanzen (Xanthi::cP2) im Vergleich zu suszeptiblen Xanthi-Pflanze (Scharte *et al.*, 2009). In einem zweiten Transformationsschritt wurden die Xanthi::cP2-Pflanzen zusätzlich mit einem binären RNAi-Konstrukt transformiert, welches die endogene cytosolische G6PDH reprimiert. Bei den sogenannten Supertransformanten Xanthi::cP2::cytRNAi [(cP2(67), cP2(83))] erfolgten pflanzlichen Abwehrreaktionen nun noch stärker und einheitlicher als bei den Xanthi::cP2-Linien und unabhängiger von den jeweiligen Elternlinien. Sie schienen des Weiteren toleranter gegenüber Trockenstress (Scharte *et al.*, 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum einen die Auswirkungen des G6PDH-Isoenzymaustausches im Cytosol der Tabaksorte Xanthi auf die **biotische** und **abiotische Stresstoleranz** und die Charakterisierung des **Primärstoffwechsels** der Supertransformanten untersucht, in dem biochemische sowie Stoffwechseluntersuchungen durchgeführt wurden. Da die Verbesserung der Stresstoleranz oft mit Verlusten an **Biomasse** und **Ertrag** einhergeht, sollten zum anderen die Auswirkungen des G6PDH-Isoenzymaustausches auf die Biomasseproduktion und auf Qualität, Quantität und Komposition des Saatgutes untersucht werden.

Ein weiterer zentraler Aspekt dieser Arbeit stellte die Erstellung eines neuen **binären Doppelkonstruktes** dar. Die Erstellung, Selektion und Regeneration der stabilen Supertransformanten cP2(67) und cP2(83) bei Scharte *et al.* (2009) war sehr zeit- und arbeitsintensiv. Zudem war die Überprüfung des genetischen Hintergrundes der erzeugten Transformanten äußerst wichtig und begrenzte den Transformationsumfang. Um den zeitlichen Aufwand zu reduzieren und mehrere Tabaksorten (SNN, SNN::cwINV, Xanthi) simultan transformieren zu können, sollten die Expressionskassetten der beiden binären Konstrukte pZM5 und pBinAR-*cytG6PD*-RNAi aus Scharte *et al.* (2009) in einem **binären Doppelkonstrukt** vereint werden, die Funktionalität des Doppelkonstruktes überprüft und die Auswirkungen des Isoenzymaustausches auf den Metabolismus und die Stresstoleranz der Tabaksorten SNN, cwINV und Xanthi untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Enzyme und Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den in Tabelle 1 aufgeführten Firmen bezogen.

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme.

Hersteller	Chemikalien und Enzyme
AppliChem, Darmstadt, BRD	Agar, Tris, Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), X-Gal, Hefe-Extrakt
Biomol, Hamburg, BRD	Glycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES), Magnesiumchlorid
Duchefa, Haarlem, NL	MS-Medium
Fermentas, St. Leon-Rot, BRD	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), Loadind Dye 6x, Lambda PstI Marker, PEG 4000, T4 DNA Ligase, Restriktionsenzyme (und dazugehörige Puffer), RNase, dNTP, DNase, Reverse Transkriptase, Oligo dT
Finnzymes, Espoo, Fin	Phusion „High Fidelity“ DNA-Polymerase
Invitrogen, Karlsruhe, BRD	Agarose, Bacto™-Agar
Merck, Darmstadt, BRD	Natriumdihydrogenphosphat, Kaliumhydrogenphosphat, Phosphorsäure, Natriumacetat, Trichloressigsäure, Ethidiumbromid, Ethanol, Essigsäure, Tetracyclin, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Magnesiumchlorid, Magnesiumphosphat, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dimethylformamid (DMF), Natriumhydroxid, Magnesiumsulfat
Omnilab, Bremen, BRD	Ampicillin, Kanamycin (Kann)
Roth, Karlsruhe, BRD	Phenol/Chloroform/IAA, Agarose, Glycerin, Trypton, Saccharose, Pepton1,4 Dithiothreitol, NADP-Dinatriumsalz
Segenetic, Borken, BRD	Taq-DNA-Polymerase, DNA-Marker
Sigma-Aldrich, Hamburg, BRD	4-Chloro-1-naphtol, β -Mercaptoethanol, Rubidiumchlorid, Glucose, Hormone: 6-Benzylaminopurin (BAP), α -Naphthalen-essigsäure (NAA), Pefabloc SC, PVP
Stratagene, Amsterdam, NL	AccuScript “High Fidelity” Reverse Transcriptase

2.1.2 Kommerzielle Kits

Die verwendeten *kits* sind in der Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Folgende *kits* wurden eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet.

Hersteller	Bezeichnung
Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	NucleoBond Xtra Midi NucleoSpin Extract II; NucleoSpin Plasmid; NucleoSpin Plasmid QuickPure

2.1.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) verwendet. Diese werden nachfolgend beschrieben:

2.1.3.1 *E. coli*

Tabelle 3: Verwendeter *E. coli*-Stamm.

Stamm, Quelle	Genotyp	Resistenz	Verwendung
XL1-Blue Stratagene, Heidelberg, Deutschland	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15Tn10 (Tet ^R)]	Tetrazyklin (Tet ^R)	Transformation von DNA

2.1.3.2 *A. tumefaciens*

Tabelle 4: Verwendeter *A. tumefaciens*-Stamm.

Stamm	Genotyp	Resistenz	Verwendung
<i>A. tumefaciens</i> Deblaere <i>et al.</i> (1985)	pGV2260:C58C1 Hintergrund Rif ^R , pTiB6S3 ΔT-DNA (Amp ^R)	Rifampicin, Ampicillin	Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>

2.1.4 Vektoren

In Tabelle 5 werden die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren mit ihren charakteristischen Eigenschaften beschrieben.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Vektoren.

Vektor	Resistenzgen	Merkmal	Referenz
pBluescript II SK (-)	Amp ^R	~3 kb, Klonierungsvektor mit blau/weiß-Selektion	Stratagene, Heideberg
pUC-RNAi	in Bakterien: Amp ^R	~2,9 kb, Klonierungsvektor für RNAi-Konstrukte, enthält ein GA20 Oxidase-Intron	Chen <i>et al.</i> (2003)
pZM5	In Bakterien: Amp ^R , Spec ^R	~14 kb binärer Vektor	Scharte <i>et al.</i> (2009)
pK7GWIWG2(II)	Spec ^R	~12,9, kb, Klonierungsvektor, Träger des T35S-Terminators	Department of Plant Systems Biology, VIB, Ghent University
psMAS:StrepII	Amp ^R	~2,6, kb Klonierungsvektor mit pUC18 Rückgrat, enthält MAS-Promotor	AG Kudla, WWU Münster
pBSK-pMAS-T35S	Amp ^R	~4,47 kb Klonierungsvektor für dsRNAi-Kassette enthält MAS-Promotor, T35S-Terminator	Diese Arbeit
pBSK-cytRNAi-Kassette_Tabak	Amp ^R	~5,3 kb Klonierungsvektor enthält cytRNAi-Kassette für Tabak	Diese Arbeit
pZM5_MutSacI	In Bakterien: Amp ^R , Spec ^R	~14 kb binärer Vektor, Träger des cP2, neu SacI modifiziert	Diese Arbeit
pZM8_Tabak	In Bakterien: Amp ^R , Spec ^R	~15 kb binärer Expressionsvektor des Tabak Doppelkonstruktes	Diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Im Zuge dieser Arbeit kamen Oligonukleotidprimer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Kettenreaktion und für den Austausch von Nukleotiden mit Hilfe der ortsgerichteten Mutagenese zum Einsatz. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Deutschland) hergestellt und sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Im Rahmen dieser Arbeit für PCR und ortsgerichteter Mutagenese verwendete Oligonukleotidprimer; s: sense, as: antisense.

Nr	Bezeichnung	Nukleotidsequenz
1	cyt G6PDH s	5'-CACCGTCGACAATATGAAGGCTATAAGGATGACC-3'
2	cyt G6PDH as	5'-GGATCCTATATGACAGGTCTAATTCACCTTTGAAC-3'
3	T35S s	5'-GGATCCTTCTAGAGGGCCCG-3'
4	T35S as	5'-CAAACCTGTGATATCCCGCGG-3'
5	T35S-MutPstI s	5'-CGTCGCATGCCTACAGGTCACTGGATTTTGG-3'
6	T35S-MutPstI as	5'-CCAAAATCCAGTGACCTGTAGGCATGCGACG-3'
7	pZM5-SacIneu s	5'-GCAAGCTTGGTACCAGAGCTCCCGATCATGAGCGG-3'
8	pZM5-SacIneu as	5'-CCGCTCATGATCGGGGAGCTCTGGTACCAAGCTTGC-3'
9	pZM5-MutHindIII s	5'-CAGAAGCCATGTACATGAACTTACGGTCAAGAAACCTG-3'
10	pZM5-MutHindIII as	5'-CCAGGTTTCTTGACCGTAAGTTTCATGTACATGGCTTCTG-3'
11	cytG6PDHHindIII as	5'-CAGAAGCCATGTACATGAACTTACGGTCAAGAAACCTG-3'
12	pUC-RNAi-seq s	5'-GGGGATGTGCTGCAAGGCG-3'

2.1.6 Computerprogramme

In dieser Arbeit wurden mehrere bioinformatische Methoden angewendet. So wurden Nukleotidsequenzen mit dem Programm CLUSTAL W verglichen und Sequenz-Alignments unter Verwendung der Standardeinstellung erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). Restriktionsstellen von bekannten DNA-Sequenzen wurden mit *NEBcutter2* (www.neb.com) bestimmt. Über *Support Double Digest™* (www.fermentas.com/double-digest) konnten die enzymespezifischen Reaktionspuffer und die Bedingungen für Restriktionsansätze bestimmt werden. Die in der Arbeit verwendeten Primer wurden mit dem Programm *DNA Calculators* von Sigma Genosys erstellt. Die Erstellung der Plasmidkarten erfolgte mit dem Programm *Plasm* (<http://en.bio-soft.net/plasmid/Plasm.html>). Zur Dokumentation von Agarosegelen wurde das Programm *Biostep Argus XI* (Version 2.2.8) verwendet. Desweiteren wurden die Programme Microsoft® Office® 2010 und Microsoft® Office® Power Point 2010 genutzt. Der Signalintensitätsvergleich der MALDI-TOF-Messungen erfolgte mit dem Analyse-programm *MoverZ*.

2.1.7 Confokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM)

Die gezeigten mikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem confokalen Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM) der Firma Leica (Leica Microsystems GmbH, Wezlar, Deutschland) vom Typ TCS SP2 mit inversem DM-IRE2 Motor-Mikroskop, ebenfalls Leica, durchgeführt. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit dem 63-fachen Wasser-Immersionsobjektiv HCX APO L U-V-I 63x 0,9 W (Leica Microsystems GmbH, Wezlar, Deutschland).

2.2 Methoden

2.2.1 Arbeiten mit Bakterienstämmen

2.2.1.1 Anzucht von Bakterien auf Agarplatten

E. coli und *A. tumefaciens* wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C bzw. 28°C auf YT-Medium ausplattiert. Um das Wachstum nicht-transformierter Bakterien zu verhindern, wurde den Medien die für die jeweiligen Stämme und Vektoren charakteristischen Antibiotika zugesetzt. Die Konzentration der Stammlösungen und die Endkonzentration in den Medien sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Die Platten wurden nach Ausstreichen der Bakterien über Nacht bei 37°C bzw. 28°C inkubiert.

Tabelle 7: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium für *E. coli* und *A. tumefaciens*.

Antibiotika	Endkonzentration im Medium	
	<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Ampicillin (Amp)	200 µg/ml	100 µg/ml
Kanamycin (Kan)	25 µg/ml	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	100 µg/ml	100 µg/ml
Spectomycin (Spec)	50 µg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin (Tet)	10 µg/ml	100 µg/ml

YT-Medium:

0,8% (w/v) Select-Pepton

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

0,25% (w/v) NaCl

[optional für Agarplatten: 1,5% (w/v) Agar]

pH 7 mit NaOH eingestellt und autoklaviert

LB-Medium:

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

1% (w/v) NaCl

Bei diesem Medium wurde vor dem Autoklavieren ein pH von 7 mit NaOH eingestellt.

2.2.1.2 Anzucht von Bakterien in Flüssigkulturen

Die Anzucht von *E. coli*-Bakterien in Flüssigkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen in YT-Medium unter Zusatz von Antibiotika. Dazu wurde in einem Reagenzglas 3 ml des entsprechenden Mediums vorgelegt und mit einem sterilen Zahnstocher eine Einzelkolonie von einer Agarplatte gestochen oder Bakterienmaterial aus einer Glyzerinkultur abgenommen und damit das Medium angeimpft. Die angeimpfte Flüssigkultur wurde über Nacht für 14-17 Stunden aerob bei 37°C inkubiert (ÜN-Kultur).

2.2.1.3 Herstellung von Glyzerinkulturen

Bakterienkulturen können über einen längeren Zeitraum in glyzerinhaltigem Medium konserviert und gelagert werden. Hierzu wurden 1,5 ml der ÜN-Kultur mit 225 µl 100% Glyzerin (steril) in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, gemischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.4 Transformation

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung von freier, löslicher DNA auf ein Empfängerbakterium. Zellen die dazu in der Lage sind werden als kompetent bezeichnet.

2.2.1.5 Transformation hitzekompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation wurden 200 µl hitzekompetente XL1-Blue *E. coli*-Zellen 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend die zu transformierende DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen für 90 s bei 42°C im Wasserbad einem Hitzeschock unterzogen. Nach Abkühlen der Zellen für 1 min auf Eis und Zugabe von 800 µl ΨB-Medium ohne Antibiotika wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C aerob inkubiert. Nach der Regenerationsphase wurden die Zellen auf YT-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

ΨB-Medium:

2% (w/v) Bacto-Trypton

0,5% (w/v) Hefe-Extrakt

0,4% (w/v) MgSO₄

10 mM KCl

Bei diesem Medium wurde vor dem Autoklavieren ein pH von 7,6 eingestellt.

2.2.1.6 Transformation von *A. tumefaciens*

Kompetente *A. tumefaciens*-Zellen wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut und 1 µg der zu transformierenden DNA hinzugegeben. Der Ansatz wurde kurz gemischt und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension 5 min in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei 37°C aufgetaut. Zur Erholung wurden die Agrobakterien nach Zugabe von 1 ml YT ohne Antibiotika 2-4 h bei 28°C inkubiert. Nach dieser Regenerationsphase wurden die Zellen auf YT-Platten mit dem für das transformierte Plasmid entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und 2 Tage bei 28°C inkubiert.

2.2.1.7 Blau-Weiß-Selektion

Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion können positive Transformanten bei der Klonierung in Vektoren mit einem *lacZα*-Gen optisch identifiziert werden. Grundlage dieser Methode ist die enzymatische Umsetzung des Substrates 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) durch die β-Galaktosidase. Das Enzym ist auf dem *lacZ*-Gen kodiert

und katalysiert in Anwesenheit des Induktors IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid) die Umsetzung von X-Gal zu Galactose und zu einem blauen Farbstoff (5-Brom-4-chloro-indoxyl). Der Klonierungsvektor pBluescript II SK (pBSK) ist Träger des *lacZ*-Gens. Das Plasmid kodiert das α -Fragment der β -Galactosidase, welche in dem *E. coli*-Stamm XL1-*Blue* deletiert ist und komplementiert diese. Die *multiple cloning site* (MCS) des pBSK-Vektors liegt im α -Fragment der β -Galactosidase. Bakterienkolonien, in denen das *lacZ* α -Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört ist, bleiben nach Inkubation mit IPTG und X-Gal weiß, während Klone ohne Insertion das α -Fragment der β -Galaktosidase exprimieren und sich blau färben. Um die Selektion durchzuführen wurden die Agarplatten 1 Stunde vor dem Ausplattieren des Transformationsansatzes mit 80 μ l X-Gal (200 mg/ml) und 8 μ l IPTG (20% w/v) versetzt.

2.2.1.8 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Birnboim & Doly, 1979). Hierzu wurden 1,5 ml einer tags zuvor angeimpften ÜN-Kultur für 30 s bei 13000 g pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 200 μ l Puffer P1 resuspendiert. Durch Zugabe von 200 μ l des Puffer P2 erfolgten die Lyse der Zellen und die Denaturierung der DNA. Nach 6 bis 8 maligem Invertieren der Zellsuspension wurden 200 μ l des Puffers P3 zugeben. Der Kaliumacetat-haltige Puffer P3 bewirkt das Ausfallen von Proteinen und chromosomaler DNA als Salz-Detergenz-Komplex. Darüber hinaus wird die zuvor alkalische Lösung durch den Puffer 3 neutralisiert. Diese konnten nach erneutem 6 bis 8 maligem Invertieren und inkubieren für 10 min auf Eis bei 4°C, 14000 g, 10 min abzentrifugiert werden. Die im Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 450 μ l Isopropanol gefällt und für 10 min bei 4°C und 14000 g pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Plasmid-DNA mit 300 μ l 70% (w/v) Ethanol gewaschen. Zuletzt wurde die pelletierte Plasmid-DNA unter der Sterilbank getrocknet und in 30 μ l H₂O aufgenommen.

Puffer P1:

50 mM Tris-HCl

10 mM EDTA

0,1 mg/ml RNase

Puffer P2:

0,2 M NaOH

1% Natriumdodecylsulfat (SDS)

Puffer P3:

3 M Kaliumacetat

pH 4,8 mit Essigsäure einstellen

2.2.2 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Für molekularbiologische Arbeiten wie DNA-Sequenzierung, Ligation oder Transformation wurde besonders reine Plasmid-DNA mit Hilfe des *kits* „NucleoSpinPlasmid“ (Macherey & Nagel, Düren, Deutschland) gewonnen.

2.2.2.1 Gesamt RNA-Extraktion aus Blattmaterial

Vorbereitend wurden die gesamten Arbeitsflächen und Mörser mit 70%igem Ethanol gereinigt. Zur RNA-Extraktion aus Blattmaterial wurden Blätter in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren. Das gefrorene Blattmaterial wurde in flüssigem N₂ homogenisiert und anschließend unter dem Abzug mit je 2 ml RNA-Extraktionspuffer homogenisiert und mit 0,7 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (PCI) versetzt. Nach Auftauen der Probe wurde diese in Eis gekühlte Sarstedt-Röhrchen überführt und für max. 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Blatt-, Zellwandbestandteile und denaturierten Proteine für 10 min bei 4°C, 4000 rpm pelletiert. Nach der Zentrifugation wurden der Überstand abgenommen und mit 2 ml PCI erneut phenolisiert, geschüttelt und 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde anschließend zur Fällung der Nukleinsäuren mit einem Volumen Isopropanol versetzt und ca. 2 h bei -20°C gelagert. Die Probe wurde für 10 min bei 4000 rpm und 4°C pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet einer sauren Ethanol-Fällung unterzogen. Dazu wurde das Pellet in 800 µl DEPC-H₂O gelöst, mit 80 µl Essigsäure und 4 ml Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde 20 min auf Eis inkubiert und anschließend wurden die Nukleinsäuren bei 4000 rpm, 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Sediment in 1,2 ml 3 M Natriumacetat (pH 5,7) resuspendiert. Die Suspension wurde bei 13000 rpm, 4°C für 15

min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um dem Pellet das Salz zu entziehen wurde es 2 x mit 400 µl 80% (w/v) Ethanol gewaschen und jeweils 4 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden danach verworfen. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl A. bidest aufgenommen.

RNA-Extraktionspuffer:

50 g Guanidiniumisothiocyanat
0,5 g N-Laurylsarcosine
ad 80 ml A. bidest, lösen durch Erwärmen
83 ml 3 M Natriumacetat pH 5,7
pH 7 mit 1 N NaOH einstellen
+ 0,7 ml β-Mercaptoethanol ⚠ (Abzug)
ad 100 ml mit A.bidest

PCI: Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v)

DEPC:

0,4% (w/v) DEPC in A. bidest

2.2.2.2 Herstellung von cDNA aus mRNA mittels reverser Transkription

Durch eine reverse Transkription (RT) wurde einzelsträngige mRNA mit Hilfe einer Reversen Transkriptase „*AccuScript®High Fidelity Reverse Transcriptase*“ von Stratagene (Santa Clara, USA) in die entsprechende cDNA umgeschrieben. Die Erststrangsynthese erfolgte mit Oligo(dt)-Primern, die an das polyadenylierte Ende der mRNA binden. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.2.2.3 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion-Methode (PCR) findet für die Erzeugung und Vervielfältigung spezifischer DNA-Fragmente Verwendung. Bei der PCR wird eine Folge von sich wiederholenden Zyklen durchgeführt, bei denen es zur Amplifikation zwischen zwei Oligonukleotidprimern liegenden DNA-Abschnitten kommt. In einem ersten Schritt wird

die zu amplifizierende DNA thermisch denaturiert, sodass sie als Einzelstrang vorliegt. Anschließend kommt es zur sequenzspezifischen Hybridisierung der Primer mit der DNA-Sequenz und zur Strangsynthese, vermittelt durch eine Hitze-stabile DNA-Polymerase. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zwei DNA-Polymerasen verwendet, die sich in ihrer *proofreading*-Aktivität unterscheiden. Die Taq-DNA-Polymerase (Segetec, Borken, Deutschland) aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus* ohne *proofreading*-Aktivität wurde für die Kolonie-PCR verwendet. Die *Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes, Espoo, Finnland) mit einer 3'-5'-*proof-reading*-Exonukleaseaktivität wurde für Klonierungen eingesetzt. Beide DNA-Polymerasen wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.4 Kolonie-PCR

Um rekombinante Klone zu identifizieren wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierzu wurden geeignete Oligonukleotidprimer verwendet, die im Falle einer erfolgreichen Klonierung zur Amplifizierung eines typischen DNA-Fragments führen, welches anschließend gelelektrophoretisch nachgewiesen wurde. Als DNA-Matrize diente Plasmid-DNA von zuvor transformierten Bakterienkolonien. Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wurden die PCR-Ansätze mit Zellmaterial einer *E. coli*-Kolonie versehen.

PCR-Ansatz für die Taq-Polymerase:

15 µl H₂O

2 µl 10-fach Taq-Puffer

1 µl Primer *sense* (10 µM)

1 µl Primer *antisense* (10 µM)

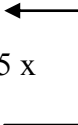
0,8 µl 10 mM dNTP-Mix

0,2 µl Taq-DNA-Polymerase

+ DNA-Template (hier: Bakterienkolonie)

PCR-Bedingungen für die Taq-Polymerase:

95°C	5 min	
95°C	45 s	
58°C	15 s	(Primer spezifisch) 35 x
72°C	30 s/kb	
72°C	7 min	
4°C	halten	

**2.2.2.5 Reinigung von PCR-Produkten**

Die Reinigung der PCR-Produkte von überschüssigen Primern, Salzen und Nucleotiden erfolgte über das *kit* „NucleoSpin Extrakt II“ von Macherey & Nagel (Düren, Deutschland). Hierzu wurden die PCR-Produkte entweder direkt nach der PCR oder aus einem Agarose-Gelstück gereinigt. Die entsprechende Bande wurde auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und anschließend nach Herstellerangaben mit dem „NucleoSpin Extrakt II“ *kit* gereinigt.

2.2.2.6 Restriktionsverdau von DNA-Sequenzen

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die sequenzspezifisch doppelsträngige DNA schneiden in dem sie bestimmte Basensequenzen erkennen und dort die Phosphodiesterbindungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats hydrolysieren. Hierbei können so genannten „klebrige“ Enden (*sticky ends*) oder „glatte“ Enden (*blunt ends*) erzeugt werden. Mittels DNA-Restriktionen können unter anderem DNA-Fragmente und Vektoren für Ligationen vorbereitet oder Restriktionsanalysen von Klonierungen erstellt werden. Die Restriktionsansätze wurden nach Angaben des Herstellers (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) pipettiert.

2.2.2.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Re-Ligation von geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern, wurden die endständige 5'-Phosphatgruppe linearisierter DNA enzymatisch durch Zugabe von „*Thermosensitive Fast-APTM Alkaline Phosphatase*“ (MBI Fermentas, St. Leon-Rot,

Deutschland) abgespalten. Die Alkalische Phosphatase wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.2.8 DNA-Ligation

Mit Hilfe der T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) können DNA-Fragmente, welche durch Restriktionsenzyme gespalten wurden, wieder verknüpft werden. Dazu müssen die Enden der linearen DNA glatt (*blunt*) oder komplementär (*sticky*) vorliegen. Die kovalenten Bindungen zwischen dem Ribose- und dem Phosphatrest der DNA-Fragmente werden durch die T4-DNA-Ligase erneut verknüpft. Die Ligation erfolgte nach Herstellerangaben unter Berücksichtigung der einzusetzenden Insert-DNA Menge.

Diese wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{ng Vektor} \times \text{kb Insert}}{\text{kb Insert}} \times 3 = \text{ng Insert}$$

Der Ligationsansatz wurde durch Inkubation für 5 min bei 70°C inaktiviert und konnte anschließend in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert werden.

2.2.2.9 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger *et al.* (1992) und wurde von der Firma Seqlab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

2.2.2.10 Ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM)

Die ortsgerichtete Mutagenese (*site-directed mutagenesis*, SDM) ermöglicht den gezielten Austausch, das Einfügen oder das Entfernen von einzelnen Basen und somit das Einfügen und Entfernen von Restriktionsschnittstellen. Das Prinzip basiert auf den Einsatz von zwei synthetisierten Oligonukleotidprimern, welche zueinander komplementär sind und die gewünschte Mutation beinhalten. Mit Hilfe der Phusion-DNA-Polymerase wurden die beiden Oligonukleotidprimer verlängert und dabei ein mutiertes Plasmid generiert. Die erstellten Primer beinhalteten eine mittige Mutation und sowohl in 5'- als auch


3'-Orientierung befanden sich 10–15 bindende Basenpaare. Die methylierten, *Template*-Plasmide ohne Basenaustausch wurden nach der PCR mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *DpnI* (0,5 µl) für 1 h bei 37°C verdaut. Im Anschluss wurde die nicht-methylierte, PCR-amplifizierte Plasmid-DNA in kompetente *E. coli* XL1-*Blue* Zellen transformiert.

PCR-Ansatz:

15 µl H₂O
4 µl Phusion-Puffer HF (5x)
1 µl Primer *sense* (10 µM)
1 µl Primer *antisense* (10 µM)
0,5 µl 10 mM dNTPs
5-10 ng Plasmid-DNA
0,5 µl Phusion
ad 20 µl mit H₂O

PCR-Programm:

98°C	30 s	
98°C	10 s	
55°C	30 s	(Primer spezifisch) 35x
72°C	30 s/kb	
72°C	5-10 min	
4°C	halten	



2.2.2.11 Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm unter Verwendung eines Photometers (Bio Photometer Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Eine Absorptionseinheit entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989).

2.2.2.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung, Reinigung und Identifikation von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld und ermöglicht qualitative Aussagen über die Größe von DNA-Fragmenten zu treffen. Die verwendete Agarosekonzentration richtete sich nach der aufzutrennenden Fragmentgröße und lag im Bereich von 0,7% bis 2%. Für analytische Gele wurde Agarose der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) und für präperative Gele Agarose der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Agarose wurde in 1-fachen TAE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden der flüssigen Agarose pro 100 ml 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und der Ansatz in eine horizontale Elektrophorese-Apparatur überführt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und fluoresziert unter UV-Licht (320 nm). Hierdurch können DNA-Fragmente im Gel sichtbar gemacht werden. Nach Erstarren des Gels wurde es mit 1-fachen TAE-Puffer überdeckt. Die zu analysierenden Proben wurden mit 6x Ladepuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größenmarker wurde der 1 kb Marker der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt (siehe Anhang). Die Auftrennung der DNA-Fragmente fand bei einer Spannung von 80–100 V statt.

50x TAE:

242 g/l Tris

100 ml 0,5 M Na₂ EDTA (pH 8)

57,1 ml Eisessig

2.2.2.13 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die entsprechenden DNA-Fragmente wurde auf einem UV-Tisch mit einem Skalpell aus dem Agarose-Gel geschnitten und anschließend nach Herstellerangaben mit dem „NucleoSpin Extract II“ Kit aufgereinigt.

2.2.3 Arbeiten mit Pflanzen

2.2.3.1 Verwendete Organismen und ihre Anzucht

2.2.3.2 Die Tabakpflanze *Nicotiana tabacum*

In dieser Arbeit wurden die hochresistente Tabakpflanze *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun NN (SNN; Vereinigte Saatuchten e.G., Ebstorf) und die suszeptible Tabakpflanze *N. tabacum* L. cv Xanthi verwendet. Diese wurden im institutseigenen Gewächshaus angezogen. Die Pflanzen wurden in Einheitserde Typ ED 73 (Gebr. Patzer GmbH & Co KG, Sinnetal-Jossa, Deutschland) gepflanzt und regelmäßig mit Hackaphos gelb (7,6% (w/v) Nitratstickstoff, 12,4% (w/v) Ammoniumstickstoff, 16% (w/v) wasserlösliches Kaliumoxid) gedüngt.

Es wurden transgene Xanthi-Pflanzen verwendet, in denen eine plastidäre G6PDH-Isoform (AtG6PD3; P2) mit geringer *Feedback*-Inhibierung durch NADPH im Cytosol der Pflanzen überexprimiert wird und zusätzlich mit einem binären RNAi-Konstrukt (pBinAR-cytG6PD-RNAi) erneut transformiert worden waren. Die resultierenden Supertransformanten Xanthi::cP2::cytRNAi [(cP2(67), cP2(83))] wurden erstmals in Scharte *et al.* (2009) beschrieben.

Darüber hinaus wurde eine transgene Tabaklinie verwendet, bei der mittels RNAi die Aktivität der apoplastidären Zellwand-Invertase unterdrückt ist (SNN::cwINV). In Essmann *et al.* (2008) wurden diese Transformanten eingehend beschrieben. Die transgene Tabaklinie wurde über Kopfstecklinge vermehrt und in Magenta-Boxen auf Murashige-Skoog-Medium (MS-Medium) mit 2% (w/v) Saccharose unter Langtagbedingungen gehalten.

Alle Pflanzen aus dem Gewächshaus wurden mindestens 3 Tage vor Verwendung in eine Klimakammer überführt und unter standardisierten Licht- und Temperaturbedingungen kultiviert. Die Hellphase betrug 14 h bei einer Temperatur von 24°C, während der zehnstündigen Dunkelphase herrschte eine Temperatur von 22°C. Die Lichtstärke während der Hellphase betrug 300-350 µE.

2.2.3.3 Das Pathogen *Phytophthora nicotianae* (Van Breda de Haan)

In dieser Arbeit wurde das Isolat 1828 (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) von *P. nicotianae* verwendet. Zur Stammhaltung und zum Wachstum wurden alle zwei Wochen Tomatenagar-Platten mit Myzel beimpft und bei 24°C für mindestens zwei Wochen

inkubiert. Die Freisetzung der Zoosporen erfolgte nach Broembsen & Deacon (1996). Die Zoosporen wurden in sterilem Leitungswasser aufgenommen und schockgefroren bei -20°C gelagert.

2.2.3.4 Infiltration von *source*-Blättern

Die Infiltration der Tabakpflanzen erfolgte mit Hilfe einer Infiltrationszange. Über diese modifizierte Chirurgenzange kann mittels Injektionsnadel der Spritzeninhalt in den Intrazellularraum eines Blattes injiziert werden. Die Infiltration von Leitungswasser (Kontrolle) und der Sporensuspension (Infektion) erfolgte in gegenüberliegenden Interkostalfeldern, um Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Dabei wurden *source*-Blätter zu Beginn der Hellphase infiltriert.

2.2.3.5 Sterilisation von Tabaksamen

Die Sterilisation der Samen erfolgte in 1,5 ml Reaktionsgefäßen. Zunächst wurden die trockenen Samen in der Mikrowelle zweimal für 7 min bei 700 Watt erhitzt (zusammen mit einem wassergefüllten Erlenmeyerkolben). Danach wurden die Samen in 1 ml 70% Ethanol für 2 min geschwenkt. Der Alkohol wurde verworfen und eine 1%ige Natriumhypochlorid hinzugeben. Der Ansatz wurde für 10 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Entfernen der Lösung wurde der Samen dreimal für 10 min mit 1 ml sterilem H_2O gewaschen. Im Anschluss konnte der Samen auf die entsprechenden MS-Platten gegossen und mit einem sterilen Zahnstocher vereinzelt werden.

2.2.3.6 Stabile Transformation von Tabakpflanzen

Die stabile Transformation von *Nicotiana tabacum* der Sorte SNN (WT), Xanthi (WT) und der transgenen Tabakpflanze SNN::cwINV erfolgte mittels Blattscheiben-Transformation. Hierzu wurden insgesamt 3 Blätter der entsprechenden in Gewebekultur gewachsenen Pflanzen verwendet. Unter sterilen Bedingungen wurden nacheinander die Mittelrippe sowie die Blattränder entfernt und die Blätter in $0,5\text{ cm}^2$ große Stücke zerteilt. Die Blattstücke wurden mit der Blattoberseite nach unten in eine mit 10 ml flüssigem MS-Medium vorbereitete Petrischale überführt. Anschließend wurden die Blattstückchen

mit 100 µl einer am Vortag angeimpften transformierten Agrobakterien ÜK tröpfchenweise versetzt und mit einer Glaspipette gut verteilt. Die Petrischale wurde mit Parafilm verschlossen und die Blattscheiben 2 Tage im Dunkeln inkubiert. Zum Entfernen der Agrobakterien wurden die Blattscheiben 5mal mit Cefotaxin-haltigem flüssigen MS-Medium gewaschen und auf sterilem Filterpapier getrocknet. Im Anschluss konnten die Blattscheiben auf festes MS-Medium mit den Hormonen BAP (6-Benzylaminpurin) und NAA (1-Naphtylelessigsäure) zur Sprossbildung ausgebracht werden. Zur Selektion transformierter Zellen wurden dem Medium zuvor Plasmid-spezifische Antibiotika zugesetzt. Zusätzlich wurde das Agrobakterienwachstum durch Cefotaxim unterdrückt. Bis zur Sproßbildung wurden die Blattscheiben alle 2 Wochen auf neues Selektionsmedium überführt. Dabei wurde das Kallusgewebe immer wieder entfernt werden, um die Nährstoffversorgung der vereinzelt Sprosse zu gewährleisten. Nach gelungener Sprossbildung wurden die Sprosse zur Wurzelbildung auf hormonfreies MS-Selektionsmedium überführt und weiter kultiviert.

Flüssiges MS-Medium mit 2% (w/v) Saccharose:

0,44% (w/v) MS-Salz
2% (w/v) Saccharose
pH 5,6 mit KOH eingestellt und autoklaviert
(für Waschschrte: 1 µg/ml Cefotaxin zugesetzt)

Festes MS-Medium mit 2% (w/v) Saccharose zur Selektion:

0,44% (w/v) MS-Salz
2% (w/v) Saccharose
0,4% (w/v) Agar
pH 5,6 mit KOH eingestellt und autoklaviert
0,1 µg/ml NAA; 1 µg/ml BAP
+ entsprechende Antibiotika

Tabelle 8: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im festen MS-Medium mit 2% (w/v) Saccharose für stabile Transformation von *Nicotiana tabacum*.

Antibiotika	Endkonzentration im Medium		
	Xanthi (WT)	SNN::cwINV	SNN (WT)
Cefotaxin (Cef)	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Hygromycin (Hyg)	1 µg/ml	1 µg/ml	1 µg/ml
Kanamycin (Kan)		1 µg/ml	

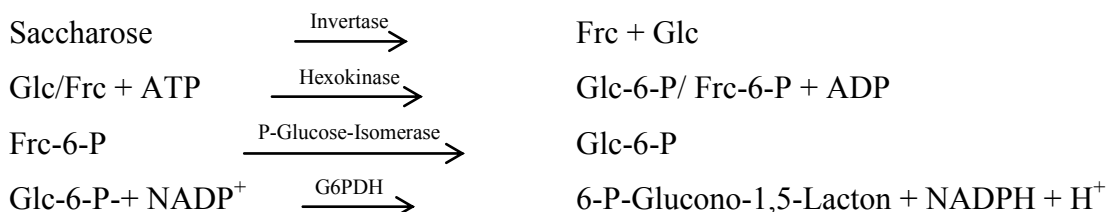
2.2.3.7 Bestimmung des Kohlenhydratgehaltes der *source*-Blätter

Probenaufarbeitung

Die Messung des Gesamtkohlenhydratgehaltes der *source*-Blätter erfolgte nach Essmann *et al.* (2008). Dazu wurde eine Blattstanze (d = 1,8 cm) in einem mit flüssigem Stickstoff vorgekühlten Mörser mechanisch zerkleinert, mit 3 M HClO₄ (Perchlorsäure) homogenisiert und in ein Reagenzglas überführt. Mörser und Pistill wurden dreimal mit je 500 µl Aqua bidest gespült und dieses ebenfalls zu der Lösung im Reagenzglas gegeben. Durch Zugabe von 500 µl 3 M KHCO₃ (Kaliumhydrogencarbonat) wurden die Probe neutralisiert und zentrifugiert (5 min bei 4000 g, 4°C). Der Überstand wurde mit Hilfe von pH-Indikatorpapier und KHCO₃ auf pH 6–7 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation (4000 g, 4°C) wurden 1500 µl des Überstandes in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –20°C gelagert. Der Rest wurde gewogen, um den Gesamtüberstand zu ermitteln.

Messung der Kohlenhydratkonzentration

Die Konzentrationen von Saccharose, Frc und Glc wurde über die enzymatische Bildung von 6-P-Glucono-1,5-Lacton und NADPH durch die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt (Kunst *et al.*, 1984). Absorptionssteigerung durch äquimolar gebildetes NADPH kann photometrisch bei 334 nm registriert werden.



Dazu wurden 20 µl Probe mit 330 µl Messpuffer versetzt und der Nullwert bei 334 nm bestimmt. Die Quantifizierung der Hexosengehalte erfolgte durch stufenweise Zugabe der Enzyme Hexoskinase, G6PDH, P-Glucose-Isomerase und Invertase. Anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes konnten die Kohlenhydratkonzentrationen berechnet und auf die Blattfläche (m²) bezogen werden.

Tabelle 9: Messpuffer.

Reagenz	Endkonzentration
Imidazol	0,1 M
MgCl ₂	1,5 mM
NADP ⁺	0,05 M
ATP	0,1 M
DTT	0,05 M

2.2.3.8 Bestimmung der Aktivität von Zellwand-Invertase in *source*-Blättern

Probenaufarbeitung

Die Extraktion der Zellwand-Invertase erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kocal *et al.* (2008). Dazu wurden Blattstanzen (d = 0,8 cm) aus *source*-Blättern der Tabakpflanzen in flüssigem Stickstoff homogenisiert, mit 500 µl Enzymextraktionspuffer versetzt und zentrifugiert (14.000 rpm, 4°C, 5 min). Das Pellet wurde zweimal mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen und in Probe und Leerwert aufgeteilt.

Tabelle 10: Enzymextraktionspuffer.

Reagenz	Endkonzentration
Tris (pH 6,9)	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Glycerol	15% [v/v]
EDTA	1 mM
DTT	5 mM
PMSF	0,1 mM

Inkubation der Rohextrakte

Proben und Leerwerte wurden mit Inkubationspuffer versetzt und resuspendiert. Die Proben wurden eine Stunde bei 37°C inkubiert, danach wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von Abstopppuffer und einer fünfminütigen Hitzedenaturierung bei 95°C beendet. Auch die Leerwerte wurden zusätzlich mit Abstopppuffer versetzt, resuspendiert und sofort hitzedenaturiert. Danach wurden auch die Leerwerte eine Stunde bei 37°C inkubiert um sie mit den Proben gleich behandelt zu haben.

Tabelle 11: Inkubationspuffer

Reagenz	Endkonzentration
Saccharose	100 mM
Na-Acetat pH 4,9	50 mM

2.2.3.9 Messung der Invertaseaktivität

30 µl Probe wurde mit 320 µl Invertase-Reaktionspuffer versetzt und die Invertaseaktivität nach Kunst *et al.* (1984) im Mikroplattenreader (Tecan, Safire) bei 37°C bestimmt. Die Enzymaktivität der Zellwand-Invertase wurde über das Lambert-Beer'sche Gesetz aus den maximalen Extinktionen berechnet und auf Blattfläche (m²) bezogen dargestellt (Essmann *et al.*, 2008).

Tabelle 12: Invertase-Reaktionspuffer.

Reagenz	Endkonzentration
Imidazol	0,1 M
MgCl ₂	1,5 mM
NADP+	0,05 M
ATP	0,1 M
DTT	0,05 M

2.2.3.10 Erstellung eines metabolischen Profils anhand von MALDI-TOF

In Kooperation mit Prof. Klaus Dreisewerd und Prof. Franz Hillenkamp (Leiter der Forschungsabteilung Biomedizinische Massenspektrometrie am Institut für Hygiene der

medizinischen Fakultät, WWU Münster) wurde anhand von MALDI-TOF-Massenspektrometrie ein metabolisches Profil der Tabaksorte erstellt. Dazu wurden Blattproben aus nicht infizierten *source*-Blättern 6 Stunden nach Belichtung genommen, diese in flüssigen Stickstoff schockgefroren und vermessen. Mit Hilfe des mathematisches Verfahrens der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) wurden die Massenprofile nach größtmöglicher Varianz getrennt und visualisiert (Ibanez *et al.*, 2010).

2.2.3.11 Bestimmung der Hormonkonzentration

1 Stunden nach Belichtung wurden aus dem *source*-Blatt der jeweiligen Pflanze 2 Interkostalfelder ausgeschnitten, in Alufolie verpackt und direkt in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Hormongehalte (SA, IAA, OPDA, JA-Ile, ABA und ABA-GE) wurden als Kooperation von Prof. Dr. Ivo Feussner (*General and Developmental Plant Physiology*, Göttingen, Deutschland) mittels HPLC-Tandem Massenspektrometrie nach Ralhan *et al.* (2012) bestimmt.

2.2.3.12 Bestimmung der Biomasse

Zur Analyse der Biomasse wurde das Frisch- und Trockengewicht bestimmt. Hierzu wurden Pflanzen im Gewächshaus unter Standardbedingungen nach 3 monatigem Wachstum verwendet. Die oberirdischen Pflanzenbestandteile wie Blätter, Spross und Blütendolde wurden geerntet, gewogen (Frischgewicht) und drei Tage bei 80°C im Wärmeschrank getrocknet und ebenfalls gewogen (Trockengewicht).

2.2.3.13 Bestimmung der Prolinkonzentration

In Kooperation mit Prof. Dr. Forlani von der Universität Ferrara in Italien wurde der Prolingehalt von Keimlingen nach der Methode von Bates *et al.* (1998) gemessen. Die Prolinmessungen erfolgten an 45 Tage alten Keimlingen (14 h Licht bei 300 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Für Salzstressmessungen wurden die Keimlinge nach 45 Tagen für zwei Tage mit 150 mM NaCl inkubiert.

2.2.3.14 Mikroskopischer Nachweis von Zelltod

Die Zelltodratenbestimmung erfolgte mittels einer Propidium-Iodidfärbung. Dazu wurde 0,5 mg/ml Propidium-Iodid in mit *P. nicotianae* infizierte *source*-Blätter (Zeitpunkt 6 hpi) injiziert. Propidium-Iodid kann ausschließlich durch perforierte Membranen toter Zellen in das Cytosol diffundieren und interkaliert dort mit Nukleinsäuren im Zellkern (Curtis & Hays, 2007). Diese Eigenschaft wird zur Lebend/Tot-Diskriminierung von Zellen verwendet. Während der Interkalation mit Nukleinsäuren verschiebt sich das Emissionsmaximum von Propidium-Iodid von 590 nm zu 617 nm. Nach Anregung bei 488 nm wurde die Fluoreszenz von 590-650 nm am cLSM detektiert. Zusätzlich wurde die Chlorophyllfluoreszenz (Anregung: 488 nm; Emission: 670–710 nm) aufgenommen, um lebende Zellen sichtbar zu machen. Je Pflanze wurden 33 Aufnahmen aus vier Blattstücken erstellt und das Verhältnis von toten zu lebenden Zellen bestimmt.

2.2.3.15 Mikroskopischer Nachweis von Kallose

Kallose wurde durch das Fluorochrom Sirofluor, welches in Anilinblau vorhanden ist, nach Gómez-Gómez *et al.* (1999) angefärbt. Dazu wurde die Epidermis von infizierten Blattstücken entfernt und diese in Farmers Fluid (3:1 Ethanol:Essigsäure) entfärbt. Zur Färbung wurden die Präparate 15 min in Wasser neutralisiert und 20 min in Anilinblau (0,1% in 0,1 M K_2HPO_4 pH 7) inkubiert. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (DMRBE, LEICA, Wetzlar, Deutschland) wurden Bilder zur statistischen Auswertung aufgenommen (340-380 nm Anregungsfilter, 400 nm dichromatischer Spiegel, 425 nm Barrierefilter). Hochauflösende Bilder des Schwammparenchyms und der Leitbahnen wurden mit dem cLSM aufgenommen (Anregung: 405 nm; Emission: 510-520 nm).

2.2.3.16 Mikroskopischer Nachweis von ROS

Für den Nachweis von ROS (H_2O_2) wurden Blattstücke für 10 min in 10 μ M H_2DCF -DA (INVITROGEN, Karlsruhe, Deutschland) inkubiert. Das nicht fluoreszierende H_2DCF -DA wird durch H_2O_2 zum stark fluoreszierenden 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Das Fluoreszenz-Signal (Anregung: 488 nm; Emission: 535 nm) ist dabei proportional zur ROS-Produktion und kann am cLSM hochauflösend im Blattgewebe untersucht werden.

Bei einer Anregung von 488 nm wurde die Fluoreszenz von DCF im Emissionsbereich 500-535 nm und die von Chlorophyll zwischen 670-710 nm detektiert.

2.2.3.17 Salzstressanalyse von *source*-Blättern

Um die generelle Toleranz von *source*-Blättern gegenüber NaCl-Stress zu testen wurden Stanzstücke (1,8 cm) aus verschiedenen Tabakpflanzen genommen. Die Stressantwort wurde nach dem Protokoll von Hamid Badawi *et al.* (2004) untersucht. Dazu wurden die Stanzstücke für 5 Tage in unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0 bis 250 mM) inkubiert. Zusätzlich enthielt der Puffer 2 mM EDTA, 0.1% Tween20, 60 mM Na-Phosphat, pH 6. Die Stresstoleranz wurde anhand der Ausbleichung der Blattscheiben bestimmt.

2.2.3.18 Saccharoseexport aus *source*-Blättern

Zur Bestimmung des Saccharoseexportes aus Blättern wurden 6 Wochen alte Tabakpflanzen verwendet. Die *source*-Blätter wurden zum Zeitpunkt 11 Uhr (3 h nach Beginn der Lichtphase) vom Stängel abgeschnitten, unter Wasser gekürzt und sofort in Reaktionsgefäße mit 100 µl einer 15 mM EDTA-Lösung, pH 7,25 gestellt (Tedone *et al.*, 2004). Nach einer sechzehnständigen Inkubation (Lichtphase 11-17 Uhr; Nachtphase 17-9 Uhr) in wassergesättigter Atmosphäre wurden die Blätter entfernt und die Reaktionsansätze für 3 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. Die Quantifizierung der exportierten Saccharose wurde wie in Abschnitt 2.2.3.7 beschrieben durchgeführt.

2.2.4 Arbeiten mit Proteinen

2.2.4.1 Proteinextraktion aus Tabakblättern

Zur Proteinextraktion wurde Blattmaterial (1,8 cm Stanzstück) frisch geerntet und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden mit 200 µl Extraktionspuffer und einer Spatelspitze Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) versehen. Die Aufarbeitung erfolgte mit einem kalten Metallpistill im Reaktionsgefäß auf Eis.

Tabelle 13: Extraktionspuffer.

Reagenz	Endkonzentration
HEPES	50 mM
Na ₂ S ₂ O ₅	2 mM
Pefabloc SC	1mM
EDTA	1 mM
DTT	5 mM
Protease-Inhibitor-Mix (für Pflanzenextrakte, Sigma)	0,1 mM

Die löslichen Proteine konnten durch Zentrifugation (13000 g, 10 min, 4°C) von den unlöslichen Zellbestandteilen getrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden.

2.2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1967) photometrisch bei 595 nm mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt. Die Eichgerade wurde mittels Rinder-Serumalbumin (BSA, 0-20 µg) erstellt. Als Leerwert diente eine Probe ohne Protein. Der Proteinbestimmungsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

X µl Probe mit H₂O _{bidest} auf 500 µl Endvolumen auffüllen

500 µl 2fach Bradford-Reagenz

Bradford-Reagenz:

50 mg Coomasie Brilliant Blue G250

23,5 ml Ethanol

53 ml *ortho*-Phosphorsäure (83%)

Ad 500 ml H₂O

2.2.4.3 Proteinauftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die denaturierende, diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) dient der Auftrennung und Größenbestimmung von denaturierten Polypeptiden. Dazu wurden 10%ige Trenngele und 4%ige Sammelgele verwendet, welche in der

MiniProtean II Elektrophorese-Apparatur der Firma Bio-Rad (München) gegossen wurden. Vor der Elektrophorese wurden die Proteinextrakte mit 6x SDS-Gelladepuffer versetzt und 5 min bei 100°C denaturiert. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurden die Proben zusammen mit dem Molekularmassenstandard *Prestained Protein Ladder* von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 mA pro SDS-Gel in 1x SDS-Laufpuffer.

6x SDS-Gelladepuffer:

1,5 M TrisHCL, pH 6,8	14 ml
30% SDS	22,4 ml
0,15 Bromphenolblaulösung	2,8 ml
Glycerin	14 ml

Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenngel (10%) und Sammelgel (4%).

	Trenngel 10%	Sammelgel 4%
H ₂ O	9,84 ml	4,81 ml
40 % Acrylamid/Bisacrylamid	4,96 ml	0,74 ml
1,5 M Tris (pH 8,8) Trenngelpuffer	5 ml	-
0,5 M Tris (pH 6,8) Sammelgelpuffer	-	1,87 ml
SDS 10%	200 µl	75 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	37,5 µl
TEMED	10 µl	7,5 µl

10 x SDS-Laufpuffer:

1,9 M Glycin
250 mM Tris
1% SDS-Lösung

2.2.4.4 Nachweis von Proteinen durch Western-Blot-Analyse

Zum qualitativen Nachweis von Proteinen dient die Western-Blot-Analyse. Hierbei werden Proteine in einer gekühlten vertikalen Nasskammer (Bio-Rad, München) vom SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Protran 0,45 µm, Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen.

Gel, Membran und Filterpapiere (3 mm Whatman) wurden für den Blot 10 min in Transferpuffer equilibriert. Als Transferpuffer diente ein diskontinuierliches Tris/Glycin-Puffersystem. Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 350 mA für 1,5 Stunden.

Transferpuffer:

25 mM Tris

192 mM Glycin

20% (v/v) Methanol

2.2.4.5 Proteinfärbung mittels Ponceau Rot

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran in Ponceau-Rot-Lösung (0,3% (v/v) Ponceau-S in 3% TCA) gefärbt, um den Erfolg des Proteintransfers zu überprüfen. Dazu wurde die Membran für 10 Minuten in Ponceau-Rot-Lösung inkubiert und überschüssige Färbelösung anschließend mit dest. Wasser abgewaschen.

2.2.4.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Vor dem immunologischen Nachweis der geblotteten Proteine wurde die Membran vollständig in TBST entfärbt und zur Absättigung der freien Proteinbindestellen in 2% (w/v) Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem spezifischen Primärantikörper (bei RT). Dazu wurde der Primärantikörper im Verhältnis 1:10000 in 2% Milchpulver in TBST gelöst. Es folgten drei zehnminütige Waschrunde, um ungebundene Antikörper auszuwaschen. Der Sekundärantikörper (Konjugat mit Meerrettich-Peroxidase) wurde im Verhältnis 1:15000 in 2% Milchpulver in TBST gelöst und für 1 Stunde mit der Membran inkubiert. Durch die an den Sekundärantikörper gebundene Meerrettichperoxidase konnte die Antikörper-Antigen-Bindung visualisiert werden. Dazu wurde die Membran mit dem ECLTM *western blotting detection reagent* vollständig benetzt und 1 min inkubiert. Das bei der Peroxidase-abhängigen Substratumsetzung emittierte Licht wurde mit einer sensitiven Kamera (MicroChemi, DNR Bio-Imaging Systems, Israel) aufgenommen.

2.2.5 Analyse von Tabaksamen

2.2.5.1 Bestimmung des Tausendkorngewichtes

Das Tausendkorngewicht (TKG) der Tabaksamen wurde mit dem Präzisionszähler C3 (Elmor, Schweiz) über Schüttelschnecke mit Lichtschranke bestimmt. Mittels eines zusätzlichen Softwaremoduls, einer elektronischen Waage und einem Untergestell konnte der Präzisionszähler C3 zur direkten Bestimmung des Tausendkorngewichtes einer Probe eingesetzt werden. Sowohl der C3 wie auch die Waage waren mit dem Steuerungsrechner verbunden. Aus der bestimmten Samenzahl und dem Probengewicht wurde das TKG automatisch errechnet.

2.2.5.2 Stresstest (NaCl und Mannitol)

Samen der zu testenden Linie wurde sterilisiert und auf MS-Platten mit den entsprechenden NaCl- oder Mannitolkonzentrationen vereinzelt. Nach zweitägiger Stratifizierung bei 4°C im Dunkeln wurden die Platten unter Langtagbedingungen zur Keimung gebracht. Nach 10 Tagen wurde die prozentuale Keimungsrate bestimmt.

2.2.5.3 Lipidgehaltbestimmung von Saatgut

Die Fettgehaltbestimmung aus Samen erfolgte nach einem optimierten Protokoll von Wingenter *et al.* (2010). Zunächst wurden 0,025 g luftgetrocknete Samen in flüssigem Stickstoff homogenisiert und in 0,75 ml Isopropanol aufgenommen. Das Homogenisat wurde in ein 1,5 Reaktionsgefäß überführt und 12 h bei 4°C auf einem Laborschüttler bei 100 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 13000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand in ein vorgewogenes Reaktionsgefäß pipettiert. Das Isopropanol wurde bei Raumtemperatur unter Vakuum abgedampft und das Endgewicht des Reaktionsgefäßes ermittelt. Die Gewichts Differenz zwischen Leerwert und Endgewicht des Reaktionsgefäßes entsprach dem Lipidgehalt der Probe.

2.2.5.4 Proteingehaltbestimmung von Saatgut

Für die Proteingehaltbestimmung wurden 0,005 g Samen mit 200 µl Extraktionspuffer bei Raumtemperatur in einem Mörser homogenisiert. Die Proben wurden in ein 1,5 ml

Reaktionsgefäß überführt, bei 13000 g bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde 1:5 mit A. bidest verdünnt und der Proteingehalt mit dem Pierce-Reagenz (Thermo Fisher Scientific, USA) nach Herstellerangaben bestimmt.

Tabelle 15: Extraktionspuffer.

Reagenz	Endkonzentration
HEPES	50 mM
MgCl ₂	5 mM
Triton X-100	1%
Glycerol	15%
SDS	2%
EDTA	1mM
PMSF	100 µM

2.2.5.5 Kohlenhydratgehaltbestimmung von Saatgut

Zur Extraktion der löslichen Zucker und Stärke wurden 5 mg Samen in 500 µl 80% (v/v) Ethanol gemörsert und bei 70°C für 90 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 16000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In zwei weiteren Waschschrritten wurde das Pellet mit jeweils 250 µl 80% Ethanol gewaschen, die Überstände vereint und diese bei Raumtemperatur im Vakuum verdampft. Der Rückstand wurde in 10 µl H₂O gelöst und beinhaltet die löslichen Kohlenhydrate. Um die unlösliche Stärke aus dem Pellet zu extrahieren wurde dieses in 200 µl 0,2 M KOH aufgenommen und eine Stunde bei 95°C inkubiert. Nach Zugabe von 35 µl 1 M Essigsäure und einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 16000 g konnte die Stärke quantifiziert werden (siehe unten).

Die Quantifizierung der löslichen Zucker erfolgte durch einen gekoppelten enzymatischen Photometer-Test. Dazu wurde 10 µl Extrakt in 990 µl Reaktionspuffer aufgenommen. Durch schrittweise Zugabe von Hexokinase (4,5 Units), Phospho-Glucose-Isomerase (1 Unit) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (1 Unit) entsteht NADPH in äquimolarer Menge zur Hexosekonzentration. Die Absorptionssteigerung durch entstehendes NADPH kann photometrisch bei 334 nm registriert werden. Aus der Absorptionsänderung konnte mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die entstandene Menge an Hexosen bestimmt

werden. Der Stärkegehalt wurde mit einem kommerziellen *kit* (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben bestimmt.

2.2.6 Bestimmung von Fructose-2,6-bisphosphat

Probenaufarbeitung

Gefrorene Blattstanzen (1,9 cm) wurden in flüssigen Stickstoff unter Zugabe von 500 ml eiskaltem 50 mM KOH gemörsert. Anschließend wurde der Probenextrakt in ein Reaktionsgefäß überführt und 60 min bei 80°C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe alle 15 min kurz gevortext. Anschließend wurde die Probe mit einer Spatelspitze feiner Aktivkohle versetzt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach mehrmaliger Zentrifugation bei 16000 g, 4°C wurde der Überstand in eine neues Reaktionsgefäß überführt, bei 4°C gelagert und innerhalb von 24 Stunden gemessen.

Messung der Fructose-2,6-bisphosphat-Konzentration

Die Messung von Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalten (F2,6P₂) erfolgte photometrisch nach dem Prinzip der Endpunktbestimmung (verändert nach Stitt, 1987). Dazu wurden 5 µl Probenextrakt in 200 µl Reaktionspuffer auf eine 96 *well*-Platte pipettiert und die Leerwerte in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Safire) bei 340 nm aufgenommen. Für die Eichung wurde eine interne Standardkurve mit einer definierten F2,6P₂-Konzentration von 2 pmol F2,6P₂ erstellt. Nach Zugabe des Enzym-Mastermixes wurden die Absorptionsänderung jeweils 30 min verfolgt und die F2,6P₂-Konzentration der Probe nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

Reaktionspuffer (10 ml):

100 mM Tris/HCl, pH 8; 1 mM MgCl₂

+ 10 µl Frc-6-P (aus 250 mM in 10 mM HEPES)

+ 100 µl NADH (aus 15 mM Stammlösung in 10 mM HEPES pH?)

+ 1 mg Pyrophosphat (ICN, Disodiumsalt, Anhydrous)

Enzym-Mastermix:

1 mM MgCl₂

100 μM NADH

4,8 mM Frc-6-P

0,4 U Aldolase (Sigma)

6 U Triose-Phosphat-Isomerase (Sigma)

0,2 U GAPDH (Sigma)

0,025 U Fructose-6-P-Kinase (NaPPi abhängig, Sigma)

0,4 mM NaPPi

Messung:

- pro well: 5 μl Probe + 200μl Reaktionspuffer (mit bzw. ohne 2 pmol F_{2,6}P₂) pipettieren
- dann 0-Wert aufzeichnen (3-5 Zyklen)
- Reaktion starten durch Zugabe von je 5 μl Enzymmastermix
- 30 min Absorptionsänderungen verfolgen bei 340 nm
- abschließend Endpunktbestimmung. Nach einer Inkubation von 30 min bei 30°C

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Im Rahmen dieser Arbeit sollten Auswirkungen des Isoenzymaustausches der G6PDH-Aktivität im Cytosol auf die Stressresistenz und die Entwicklung der Tabaksorte Xanthi weiter untersucht und mögliche Ursachen eruiert werden.

Erste Charakterisierungen erfolgten durch Scharte *et al.* (2009). Für den Isoenzymaustausch wurde eine plastidäre G6PDH-Isoform (AtG6PD3, P2) mit geringer NADPH-Rückkopplung-Inhibierung in das Cytosol der Pflanze über den Vektor pZM5 eingebracht und exprimiert (Abb. 6). Die transgenen Pflanzen (Xanthi::cP2) der T1-Generation waren in der Abwehrreaktion (Bildung von ROS und HR-Läsionen) gegenüber den suszeptiblen Wildtyppflanzen der Tabaksorte Xanthi verbessert, allerdings in unterschiedlichen Ausprägungen (Scharte *et al.*, 2009). In einem zweiten Transformationsschritt wurden zwei unabhängige cP2-Linien, mit unterschiedlich starker Ausprägung der HR (Linie 67 stark, Linie 83 schwach) zusätzlich mit einem binären RNAi-Konstrukt (pBinAR-cytG6PD-RNAi) transformiert, welches nicht nur die endogene cytosolische G6PDH sondern zum Teil auch die überexprimierte cP2 mit reprimierte.

Dennoch waren bei den sogenannten Supertransformanten Xanthi::cP2::cytRNAi [(cP2(67), cP2(83))] die pflanzlichen Abwehrreaktionen noch stärker und vor allem einheitlicher als bei den Xanthi::cP2 und auch unabhängig von den jeweiligen Elternlinien. Sie waren des Weiteren wesentlich resistenter gegenüber Trockenstress (Scharte *et al.*, 2009).

Der genetische Hintergrund der Supertransformanten wurde über Western-Blot-Analysen überprüft und die Pflanzen nach Pathogen- und Antibiotikaresistenz selektioniert (Abb. 6). Anschließend wurden Pflanzen mit eindeutigen Blot-Ergebnissen und starker HR in die nächste Generation überführt. Ab der 4. Generation (ST4) konnten die Pflanzen ohne Antibiotikaselektion auf Erde angezogen werden, da sie bezüglich der Merkmalsausprägung stabil waren. Die Supertransformanten der 6. Generation (ST6) und ihr Saatgut sind Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit und werden im Folgenden als cP2(67) und cP2(83) bezeichnet.

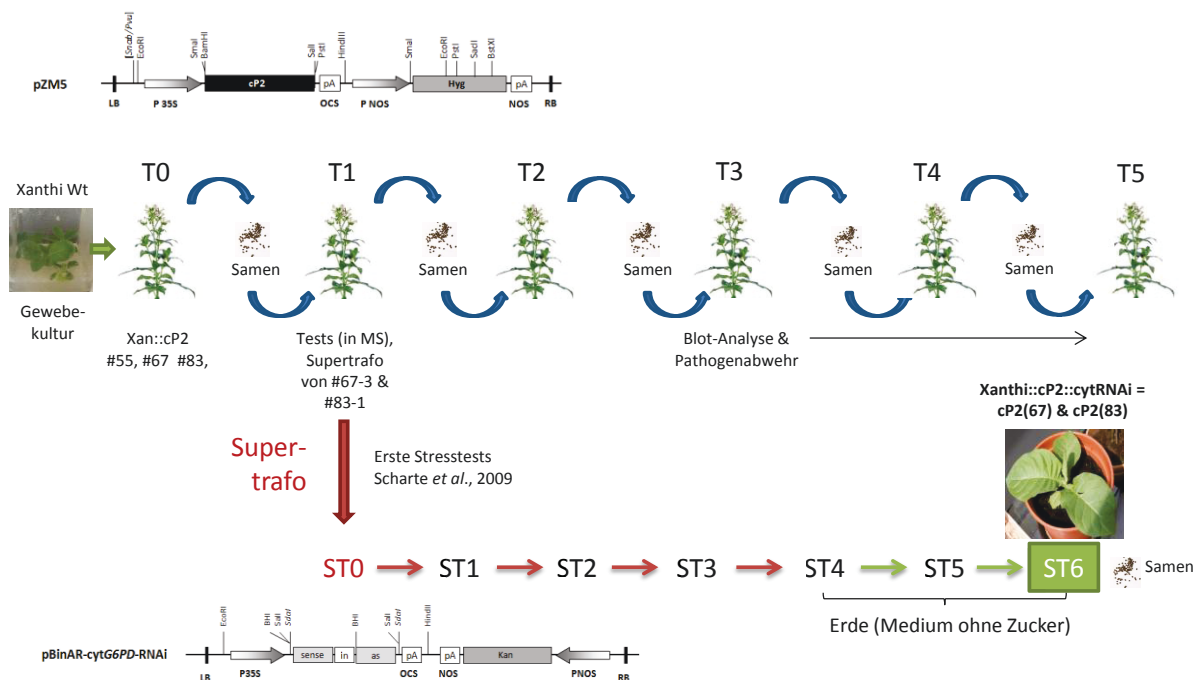


Abbildung 6: Schematische Übersicht zur Erzeugung und Selektion der cP2::cytRNAi-Supertransformanten. Eine Gewebekulturpflanze der Linie Xanthi war im Vorfeld mittels Blattscheibentransformation mit dem binären Vektor pZM5 transformiert worden (Zeiner Mezher, Universität Osnabrück). Hierdurch wurde eine plastidäre G6PDH-Isoform (AtG6PD3, P2-Klasse) mit geringerer NADPH-Rückkopplungsinhibition ($K_i_{[NADPH]} > K_m_{[NADPH]}$) im Cytosol der Tabakpflanze Xanthi eingebracht und überexprimiert. In einem zweiten Schritt war dann mit Hilfe des auf der RNAi-Methode basierenden pBinAR-cytG6PD-RNAi-Konstruktes die T1-Generation der cP2-Linie #67-3 und #83-1 transformiert worden (Olessja Becker, WWU Münster). Dadurch sollten gezielt die endogenen cytosolischen G6PDH-Isoformen reprimiert werden. Die so erzeugten Supertransformanten (ST; Scharte *et al.*, 2009) wurden mittels Western-Blot-Analysen überprüft, die Pflanzen aufgrund von Pathogen- und Antibiotikaresistenz selektioniert und sowohl die robustesten Pflanzen der cP2- sowie der Supertransformanten in die nächsten Generationen überführt (T0-T5, bzw. ST0-ST6). Ab Generation ST4 wurden die Supertransformanten auf Erde angezogen. (Abbildung verändert nach J. Scharte und A. von Schaewen).

3.1.1 Charakterisierung der biotischen Stressantwort der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Eine erfolgreiche Pathogenantwort während einer biotrophen Pflanze-Pathogen-Interaktion ist durch eine schnelle Pathogenerkennung und Aktivierung von Abwehrmechanismen (ROS, Kallose etc.) gekennzeichnet und führt zum programmierten Zelltod infizierter Zellen und verhindert somit eine Besiedlung der Pflanze durch das Pathogen (siehe Einleitung, Kapitel 1.5). Anhand der induzierten Abwehrparameter kann die Abwehr in Umfang und Effektivität beurteilt werden.

3.1.1.1 Pathogen-induzierte Zelltodrate

Durch den zeitlichen Verlauf des hypersensitiven Zelltodes bei Tabakpflanzen nach der Infektion mit *P. nicotianae* können mögliche Rückschlüsse auf die pflanzliche Abwehrreaktion gezogen werden. Dazu wurden infizierte *source*-Gewebeproben mit Propidium-Iodid angefärbt und hochauflösende Bilder dieser Infektionsbereiche am cLSM aufgenommen. In Abbildung 7 sind der zeitliche Verlauf und die Ausprägung des Zelltodes im Schwammparenchym von infiziertem Gewebe der Tabaksorte SNN exemplarisch für den Infektionsverlauf dargestellt. Eine Färbung des Zellkerns oder der gesamten Zelle mit Propidium-Iodid (blaue Fluoreszenz) wird hierbei als Indikation für Zelltod gewertet, da Propidium-Iodid ausschließlich durch perforierte Membranen toter Zellen diffundieren und dort mit Nukleinsäuren im Zellkern interkalieren kann (Curtis & Hays, 2007). Bereits 3 Stunden nach Infektion (*hours post infection*, hpi) konnten erste tote Zellen im infizierten Blattgewebe detektiert werden, die im weiteren Infektionsverlauf vermehrt auftraten. Zum Zeitpunkt 12 hpi zeigt das gesamte infizierte Gewebe Anzeichen des hypersensitiven Zelltodes. In den Kontrollen war eine Ausprägung der HR nicht zu beobachten. Zahlreiche Gewebeaufnahmen am cLSM zum Zeitpunkt 6 hpi bilden die Grundlage für die statistische Auswertung der Zelltodrate in Abbildung 8.

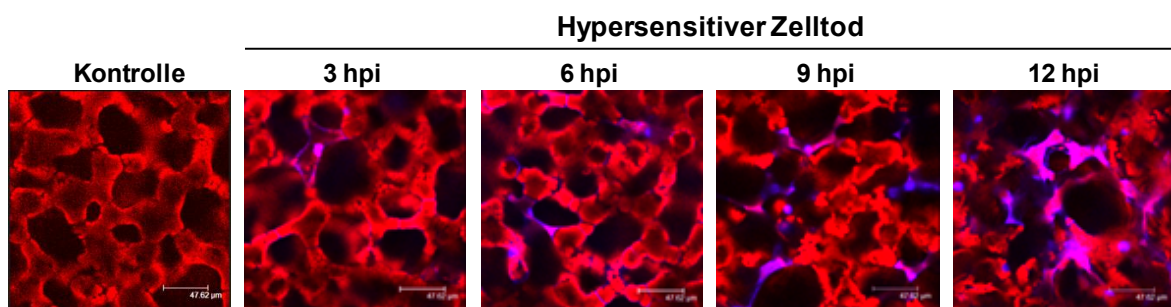


Abbildung 7: Abwehr-induzierte Bildung von hypersensitiven Zelltod im Schwammparenchym der Tabaksorte SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*. Der zeitliche Verlauf des hypersensitiven Zelltodes bei SNN nach Infektion ist für die Zeitpunkte 3, 6, 9 und 12 hpi dargestellt. Als Kontrolle wurden Blätter mit Wasser infiltriert und 6 Stunden nach Infiltration untersucht. Die lasermikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Anregung von 488 nm erstellt. Eine Färbung des Zellkerns oder der gesamten Zelle mit Propidium-Iodid (blaue Fluoreszenz, Emissionsbereich 590-650 nm) wurde als Indikation für Zelltod gewertet und Aufnahmen zum Zeitpunkt 6 hpi bildeten die Grundlage für die Bestimmung der Zelltodrate (Abb. 8). Die Chlorophyll-Fluoreszenz wurde mit einer Anregung von 488 nm in den Emissionsbereichen 500-535 nm und 670-710 nm detektiert. Die Skala (Balken rechts unten) repräsentiert eine Größe von 47,62 µm.

Der Isoenzymaustausch der G6PDH in der suszeptiblen Tabaksorte Xanthi führte bei beiden transformierten Linien [cP2(67), cP2(83)] zu einer 2,5-fachen Erhöhung der Zelltodrate 6 Stunden nach Infektion im Vergleich zum Xanthi-Wildtyp (Abb. 8). Die Zelltodraten korrelieren mit der verstärkten Bildung hypersensitiver Läsionen in den Transformanten (Scharte *et al.*, 2009). Dies deutet auf eine schnellere und verbesserte Abtötung infizierter Zellen und somit auf eine Steigerung der Resistenz hin. Die Resistenzausprägung kann in etwa intermediär zwischen dem suszeptiblen Xanthi-Wildtyp und dem resistenten SNN-Wildtyp eingeordnet werden.

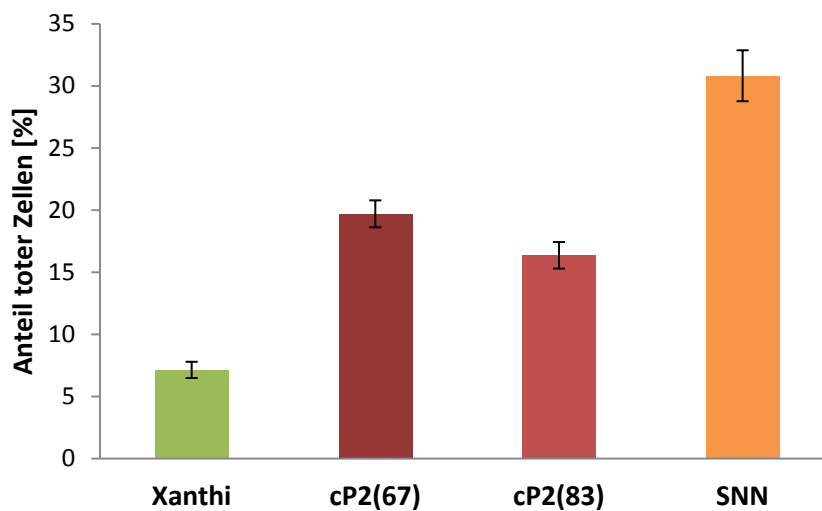


Abbildung 8: Bestimmung der hypersensitiven Zelltodrate der untersuchten Tabakpflanzen. Angegeben ist die prozentuale Anzahl toter Zellen pro cLSM-Bildausschnitt für die Transformanten cP2(67), cP2(83) und die Wildtypen SNN sowie Xanthi nach Infektion von *source*-Blättern mit *P. nicotianae* (6 hpi). Als Grundlage dienten, wie in Abb. 7 exemplarisch dargestellt, lasermikroskopische Aufnahmen zum Zeitpunkt 6 hpi. Die cLSM-Bilder wurden bei einer Anregung von 488 nm erstellt. Eine Färbung des Zellkerns oder der gesamten Zelle mit Propidium-Iodid (blaue Fluoreszenz, Emissionsbereich 590-650 nm) wurde als Indikation für Zelltod gewertet. Insgesamt wurden 6 Pflanzen je Sorte untersucht und je Pflanze 33 cLSM-Bilder aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte toter Zellen aus 6 unabhängigen Messreihen (gewonnen aus allen cLSM-Bildern) und der Standardfehler (n = 6 Pflanze; +/- SE).

3.1.1.2 Abwehr-induzierte Bildung von Kallose

Die Einlagerung von Kallose an Plasmodesmata, in die Zellwand oder in Form von Papillen sind mögliche, früh induzierte Abwehrmaßnahmen der Pflanze nach Pathogenbefall (siehe Einleitung, Kapitel 1.5). Zur Bestimmung der Kallosebildung wird das Schwammparenchym von Pflanzenzellen mit Anilinblau gefärbt und anhand von cLSM-Aufnahmen ausgewertet. Nach UV-Anregung fluoresziert Kallose dann in bläulichen Farbnuancen. Die Abbildung 9 verdeutlicht dieses Verfahren an SNN-Tabakpflanzen. Dabei treten Kalloseeinlagerungen an den Zell-Zellkontaktstellen auf und verschließen die Plasmodesmata zeitnah nach Infektion mit *P. nicotianae* (0,5 hpi) im infizierten Mesophyllgewebe von SNN (Abb. 9 B). Im weiteren Infektionsverlauf nimmt die Kallosebildung zu und weitet sich auf die Zellwand aus, so dass letztendlich die gesamte, infizierte Zelle umschlossen wird (Abb. 9 D-F) und abstirbt.

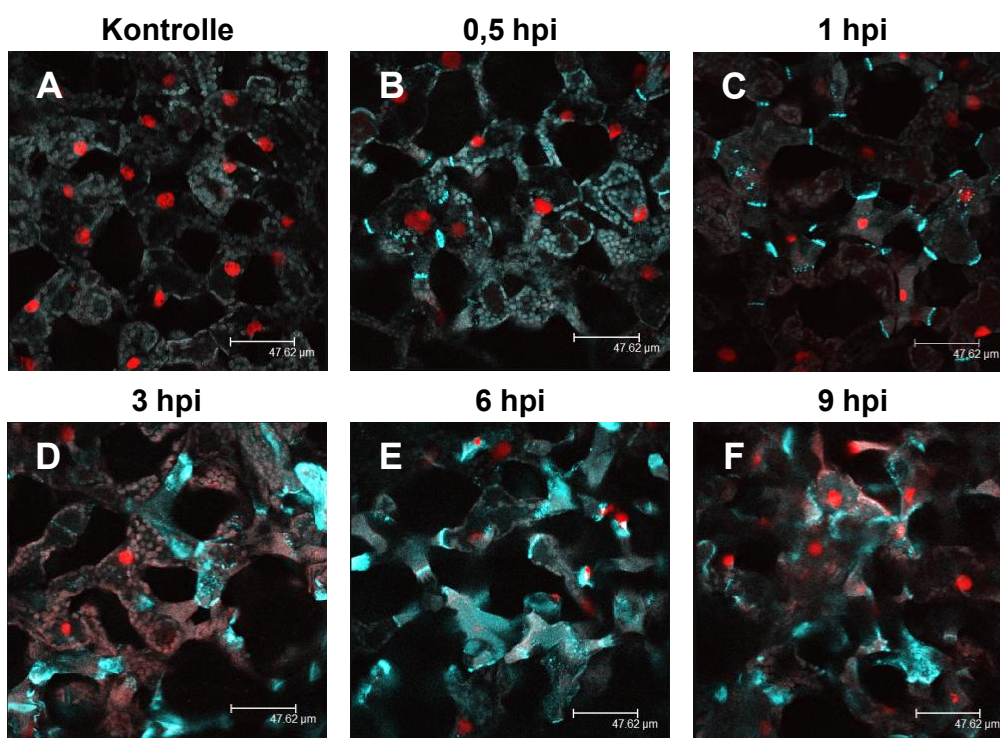


Abbildung 9: Kallosebildung im Schwammparenchym von SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Kallosebildung im Infektionsgewebe zu den Zeitpunkten 0,5; 1; 3; 6 und 9 hpi. Zum Nachweis der Kallosebildung wurden die infizierten Blattstücke mit Anilinblau gefärbt. Um Zellen sichtbar zu machen und den Kontrast der Aufnahmen zu verstärken wurden die Proben zusätzlich mit Propidium-Iodid behandelt (rote Fluoreszenz). Die angefärbte Kallose emittiert bei UV-Licht grün-blaues Fluoreszenzlicht, wohingegen der Zellkern durch Propidium-Iodid rot markiert wird. Mit fortschreitender Infektionsdauer breitet sich die Kallosebildung, beginnend an den Plasmodesmata, über die gesamte Zelle aus und verschließt diese. Die angegebene Skala hat eine Größe von 47,62 µm.

Die quantitative Auswertung der Kallosebildung der untersuchten Tabakpflanzen verdeutlicht die gesteigerte Kallosesynthese der transformierten Tabaksorte Xanthi (Abb. 10). Durch den Isoenzymaustausch der G6PDH erhöht sich die Kallosebildung nach Infektion (6 hpi) in den cP2-Linien um etwa das Doppelte im Vergleich zum suszeptiblen Xanthi und ist vom Gehalt in etwa intermediär zwischen dem suszeptiblen Xanthi-Wildtyp und dem resistenten SNN-Wildtyp einzuordnen.

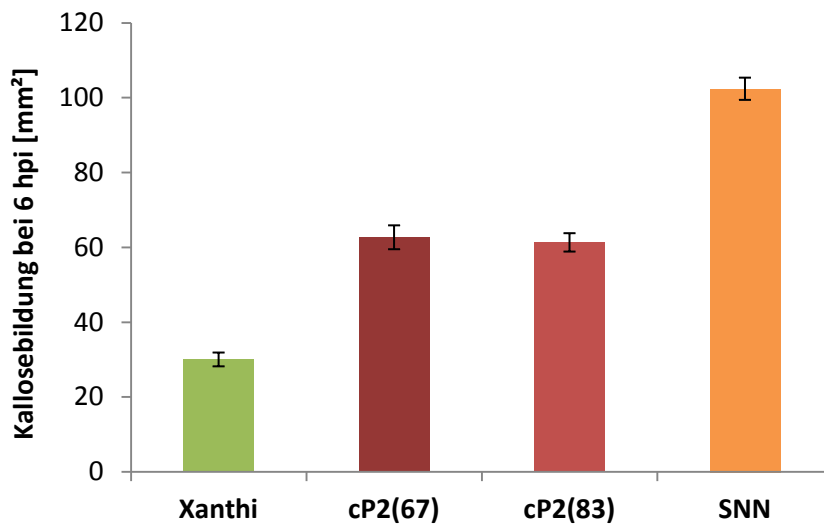


Abbildung 10: Abwehr-induzierte Kallosebildung der untersuchten Tabaklinien. Dargestellt ist die quantitative Auswertung der Abwehr-induzierten Kallosebildung an den Zell-Zellkontakten von Mesophyllzellen nach Infektion mit *P. nicotianae* (6 hpi) für die Transformanten cP2(67), cP2(83) und für die Wildtypen Xanthi bzw. SNN. Dargestellt ist die Auswertung von 60 fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Anilinblau-Färbung) je Pflanze, jeweils bezogen auf die Fläche (mm²). Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Infektionsdurchgängen (n = 4 Pflanzen; +/- SE).

3.1.1.3 Abwehr-induzierte Bildung von ROS

ROS besitzen im Rahmen der pflanzlichen Abwehr essentielle Funktionen und werden im Laufe der Abwehr und des hypersensitiven Zelltodes in verschiedenen Zellkompartimenten gebildet (siehe Einleitung, Kapitel 1.5.1). Den Hauptanteil der generierten ROS bildet H₂O₂, da es die stabilste Form der ROS darstellt (Wojtaszek, 1997). In Abbildung 11 sind Detailaufnahmen von ROS-Bildungs- bzw. Detektionsorten dargestellt. Zu ihnen gehören Peroxisomen (Abb. 11 A), Chloroplasten (Abb. 11 B), Bereiche der Epidermis (Abb. 10 C) und die Interzellularräume des Schwammparenchyms (Abb. 11 D). ROS oxidieren das nicht-fluoreszierende H₂DCFDA zum stark fluoreszierenden H₂DCF. Die ROS-Entwicklung wird somit anhand von grüner Fluoreszenz sichtbar und die Fluoreszenzstärke korreliert mit der Menge an gebildetem ROS.

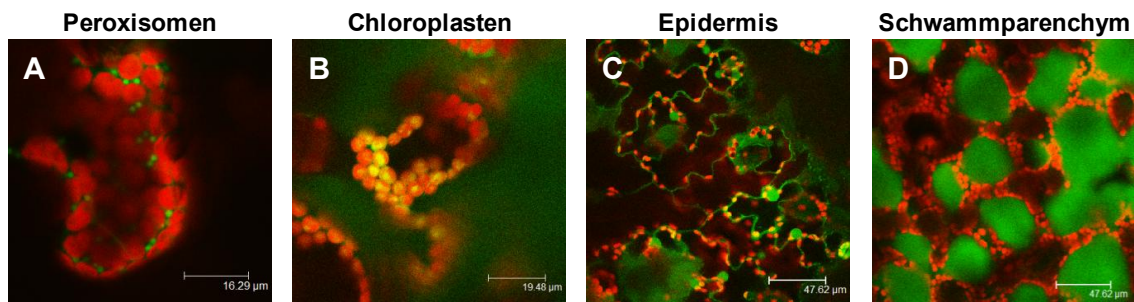


Abbildung 11: Repräsentative cLSM-Aufnahmen der Bildungsorte von Abwehr-induzierten ROS in source-Blättern der Tabakpflanze SNN. Dargestellt ist die H₂DCF-Fluoreszenz in grün als Indikator für ROS-Bildung nach Infektion mit *P. nicotianae* (Chlorophyll-Fluoreszenz der Chloroplasten in rot) in verschiedenen Zellkompartimenten, wie Peroxisomen (A), Chloroplasten (B), Bereiche der Epidermis (C) und in Interzellularen des Schwammparenchyms (Zellen selbst dunkel) (D). Die Anregung der Gewebeproben erfolgte bei 488 nm. Die Detektion der H₂DCF Fluoreszenz erfolgte im Emissionsbereich 500-535 nm (grün). Die Chlorophyllfluoreszenz wurde zwischen 670-710 nm aufgenommen (rot). Die angegebene Skala hat eine Größe von 47,62 µm.

Um eine quantitative und qualitative Aussage über die ROS-Fluoreszenzstärke 15 min nach Infektion mit *P. nicotianae* zu treffen, wurde die Pixelintensität der cLSM-Übersichtsaufnahmen der Epidermis und des Schwammparenchyms der jeweiligen Pflanzensorte berechnet (Abb. 12 und 13). Anhand der computergestützten Intensitätsverrechnung wird ersichtlich, dass die Supertransformatanten eine wesentliche höhere Fluoreszenzintensität und somit mehr ROS-Bildung aufweisen als der Wildtyp Xanthi.

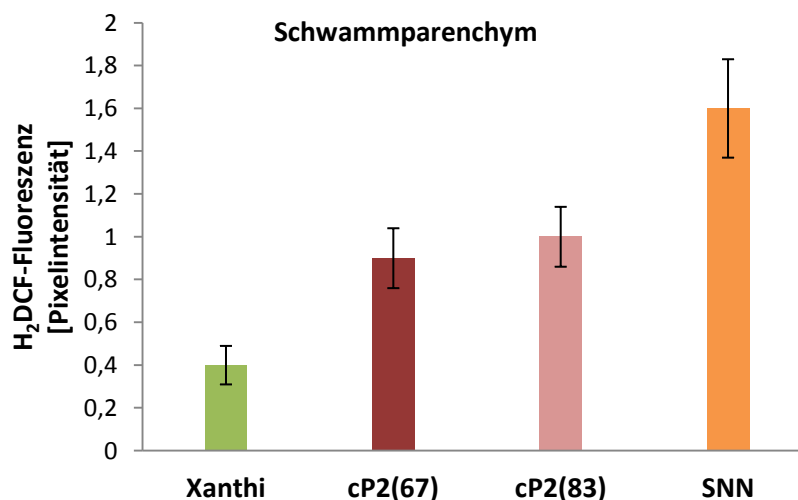


Abbildung 12: Abwehr-induzierte ROS-Bildung im Schwammparenchym. Dargestellt ist die Pixelintensität der ROS-Fluoreszenz 15 min nach Infektion mit *P. nicotianae* bei den untersuchten Tabakpflanzen. Die Pixelintensität wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm Optimas bestimmt. Die Supertransformatanten cP2(67) und cP2(83) weisen eine wesentliche höhere Fluoreszenzintensität und somit mehr ROS-Bildung als Xanthi auf. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n = 4; +/- SE).

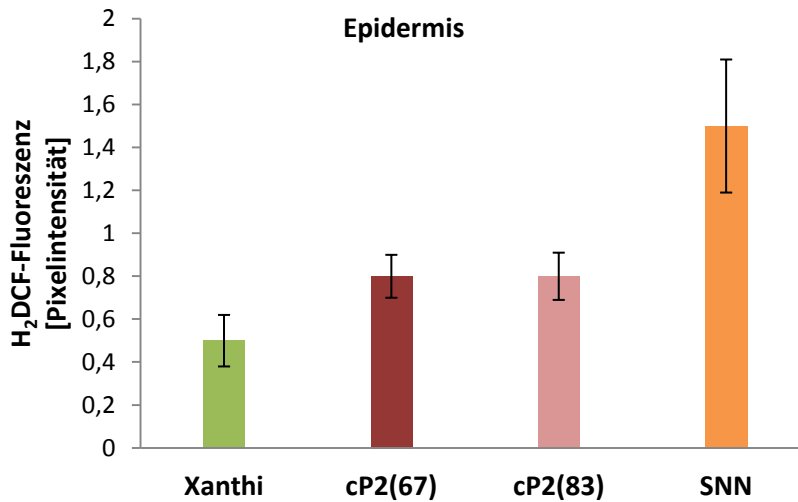


Abbildung 13: Abwehr-induzierte ROS-Bildung in der Epidermis. Dargestellt ist die Pixelintensität der ROS-Fluoreszenz 15 min nach Infektion mit *P. nicotianae* bei den untersuchten Tabakpflanzen. Die Pixelintensität wurde mit dem Bildverarbeitungsprogramm Optimas bestimmt. Die Supertransformanten cP2(67) und cP2(83) weisen eine wesentliche höhere Fluoreszenzintensität und somit mehr ROS-Bildung als Xanthi auf. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n= 4; +/- SE).

Zusammenfassung:

Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol wurde die biotische Stressresistenz deutlich verstärkt. ROS-Entwicklung (Kapitel 3.1.1.3), Kallosebildung (Kapitel 3.1.1.2) und die Zelltodrate (Kapitel 3.1.1.1) verdoppelten sich in den Transformanten im Vergleich zum suszeptiblen Xanthi und näherten sich dem resistenten SNN an.

3.1.2 Charakterisierung der abiotischen Stressantwort der Tabaksorte Xanthi

3.1.2.1 Steigerung der NaCl-Toleranz in *source*-Blättern nach Isoenzymaustausch der G6PDH

Die G6PDH nimmt eine wichtige Rolle in der Anpassung an Salz- und Trockenstress ein, indem sie unter anderem den zellulären Redox-Status durch die Bereitstellung von NADPH beeinflusst (Dal Santo *et al.*, 2012). Abiotische Stimuli erhöhen den oxidativen Stress in Pflanzenzellen und erfordern die Entgiftung von ROS über z.B. NADPH-abhängige Entgiftungsmechanismen wie den Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Mittler, 2002). NADPH kann Glutathion (GSH) über die Glutathion-Reduktase reduzieren, so dass reduziertes GSH als Redox-Puffer in Pflanzen fungieren kann und die Redox-Homöostase in der Stressabwehr steuert (Übersicht in Noctor & Foyer, 2011). Dafür kann der OPP die erforderliche Reduktionskraft bereitstellen (siehe Einleitung, Kapitel 1.2). Durch den Isoenzymaustausch der G6PDH stieg die Natriumchlorid-Toleranz (Natriumchlorid, NaCl) von *source*-Blättern. Blattscheiben der Supertransformanten waren in der Lage eine höhere NaCl-Konzentration zu tolerieren als der Wildtyp Xanthi (Abb. 14). Deutliche Gewebeschädigungen und chlorotische Erscheinungen waren bei den cP2-Linien erst ab 150 mM NaCl sichtbar, wohingegen die Blattscheiben der Mutterlinie Xanthi schon bei einer geringen NaCl-Konzentration (50 mM) ausbleichen.

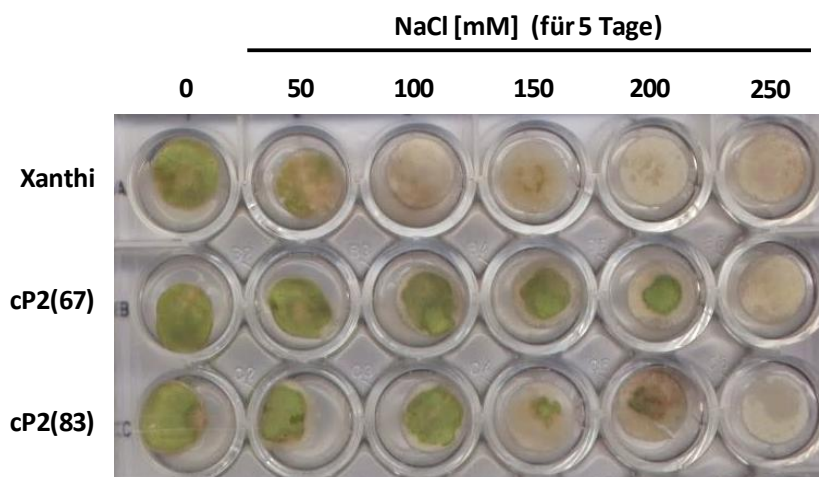


Abbildung 14: Steigerung der NaCl-Toleranz von *source*-Blättern durch G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol. Stanzstücke (1,8 cm) aus *source*-Blättern der Linien cP2(67), cP2(83), Xanthi wurden 5 Tage in unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (0 bis 250 mM) inkubiert. Zusätzlich enthielt die Lösung 2 mM EDTA, 0.1% Tween20, 60 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6. Die NaCl-Toleranz wurde anhand der Ausbleichung (Chlorose) der Blattscheiben bestimmt. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängig durchgeführte Durchgänge.

3.1.2.2 Steigerung der Keimungsrate bei NaCl- und Trockenstress

Neben einer höheren Salz- und Trockentoleranz (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1 und Scharte *et al.*, 2009) verbesserte der G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol auch die Keimungsrate des Saatgutes während NaCl- und Trockenstress (Abb. 15 und 16).

Besonders bei erhöhten NaCl-Konzentrationen zeigte sich eine höhere Keimungsaktivität bei den cP2-Linien im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 15). Dabei keimten die Linien cP2(67) und cP2(83) mit etwa vergleichbarer Rate. Mit steigender NaCl-Konzentration sank die Keimungsaktivität aller Linien, jedoch tolerierten die Transformanten wesentlich höhere NaCl-Konzentrationen. Keimten noch ca. 35% der cP2-Samen bei 150 mM NaCl, so waren es bei den Wildtypen SNN nur 10% und Xanthi sogar nur 3%.

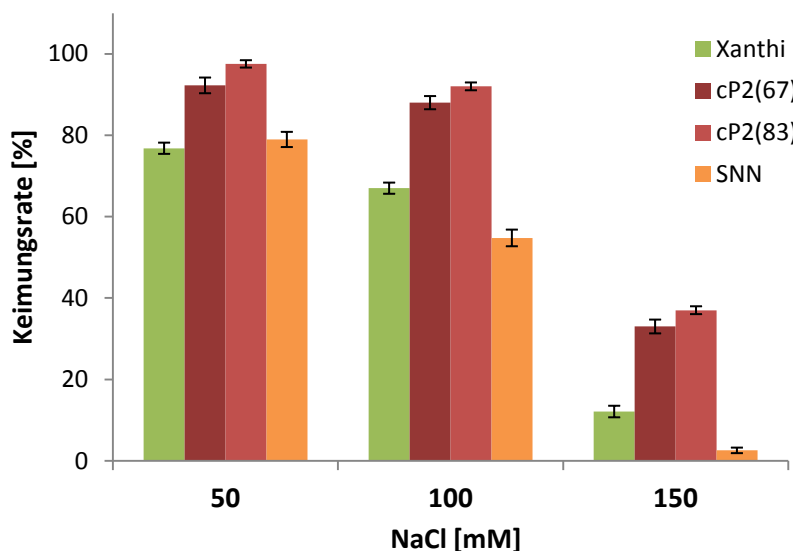


Abbildung 15: Steigerung der NaCl-Toleranz des Saatgutes nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol. Der Einfluss verschiedener NaCl-Konzentrationen (50 mM, 100 mM, 150 mM) auf die Keimung der Linien cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN wurde untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Keimung der Samen in Abhängigkeit zur der aufgebrauchten Gesamtsamenzahl. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n = 4; +/- SE).

Auch erhöhte Konzentrationen von Mannitol – zur Simulation von Trockenstress – haben Einfluss auf das Keimungsverhalten der Tabaksamen (Abb. 16). Während die Wildtypen, insbesondere SNN, bei 150 mM eine dramatisch erniedrigte Keimungsrate aufwiesen (SNN = 50%, Xanthi = 60%), sank die Keimungsrate bei den cP2-Linien bis zu einer Konzentration von 250 mM Mannitol nur unwesentlich auf ca. 82%. Im Vergleich dazu betrug bei dieser Konzentration die Keimungsrate von SNN 15% und Xanthi 35%.

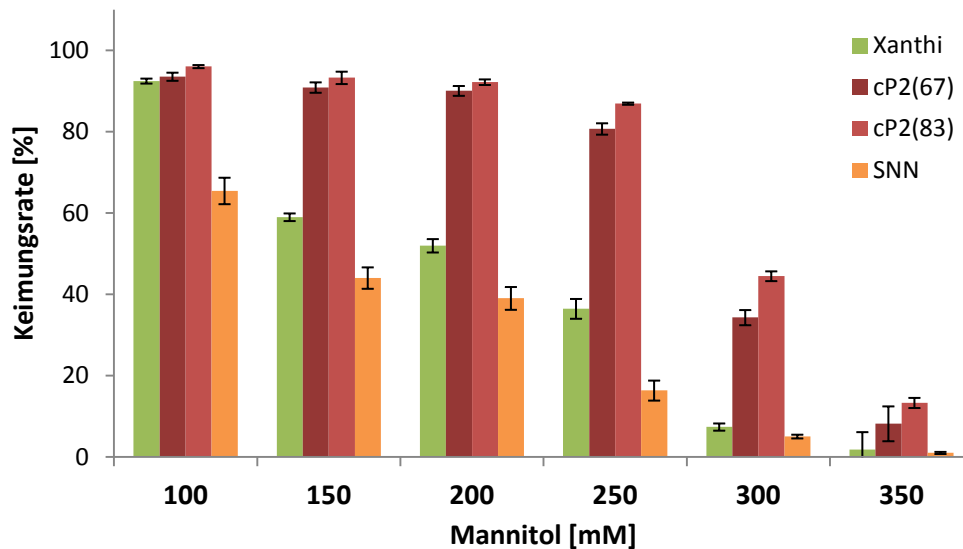


Abbildung 16: Steigerung der Trockentoleranz des Saatgutes nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol. Der Einfluss verschiedener Konzentrationen von Mannitol (100 bis 350 mM) auf die Keimung der Linien cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN wurde untersucht. Dargestellt ist die prozentuale Keimung der Samen in Abhängigkeit zur der aufgetragenen Gesamtsamenzahl. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen ($n = 4$; \pm SE).

Zusammenfassung:

Steigerung der abiotischen und biotischen Stresstoleranz nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol wurde die abiotische Stresstoleranz gegenüber NaCl- und Trockenstress in *source*-Blättern (Kapitel 3.1.2.1) und beim Auskeimen des Saatgutes (Kapitel 3.1.2.2) deutlich verbessert. Auch die biotische Stresstoleranz gegenüber dem hemibiotrophen Pathogen *P. nicotianae* wurde deutlich verstärkt. Sowohl ROS-Bildung (Kapitel 3.1.1.3), Kallosebildung (Kapitel 3.1.1.2) wie Zelltodrate (Kapitel 3.2.1.1) verdoppelten sich in den Transformanten im Vergleich zum suszeptiblen Wildtyp Xanthi und nähern sich dem resistenten SNN an.

3.1.3 Charakterisierung des Primärstoffwechsels der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

3.1.3.1 Anreicherung von Kohlenhydraten in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Durch den Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol kam es *per se* zu einer Anreicherung von löslichen Kohlenhydraten (Abb. 17). Besonders signifikant waren dabei die Unterschiede in den Glucose- und Saccharosegehalten. In den cP2-Linien waren sie etwa um 60% bzw. 35% im Vergleich zum Wildtyp Xanthi erhöht und mit den Konzentrationen des Wildtyps SNN vergleichbar.

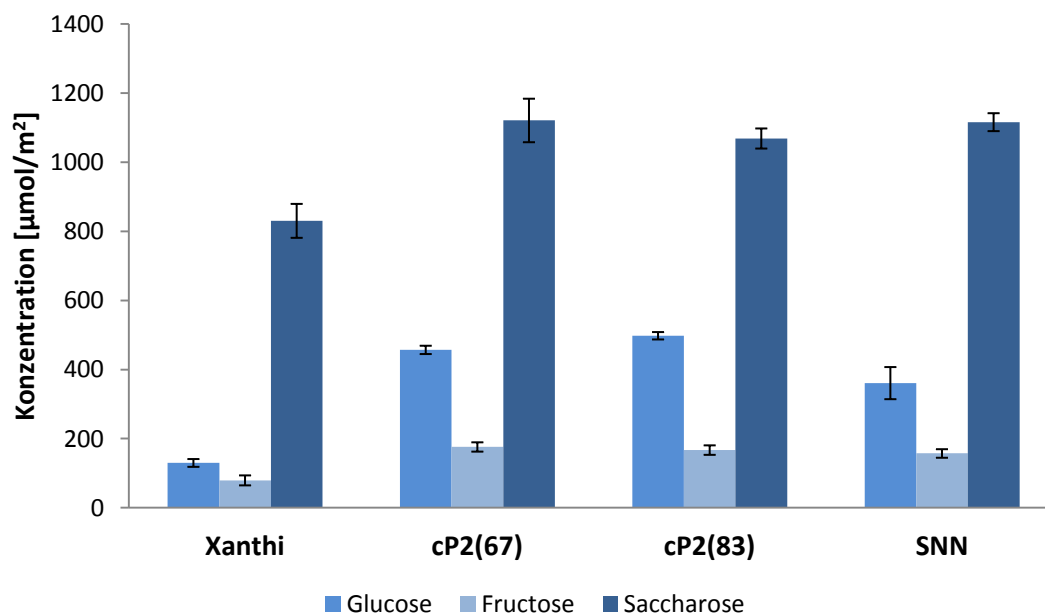


Abbildung 17: Konzentration an löslichen Kohlenhydraten in *source*-Blättern. Untersucht wurden der Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalt pro Blattfläche der Linien cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN. Angegeben ist das Mittel über den Tag. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Durchgängen ($n = 6$; \pm SE).

Die Konzentration an Stärke war in den cP2-Linien nach Isoenzymaustausch um ca. 10% gegenüber dem Wildtyp Xanthi und um 20% gegenüber dem Wildtyp SNN erhöht (Abb. 18).

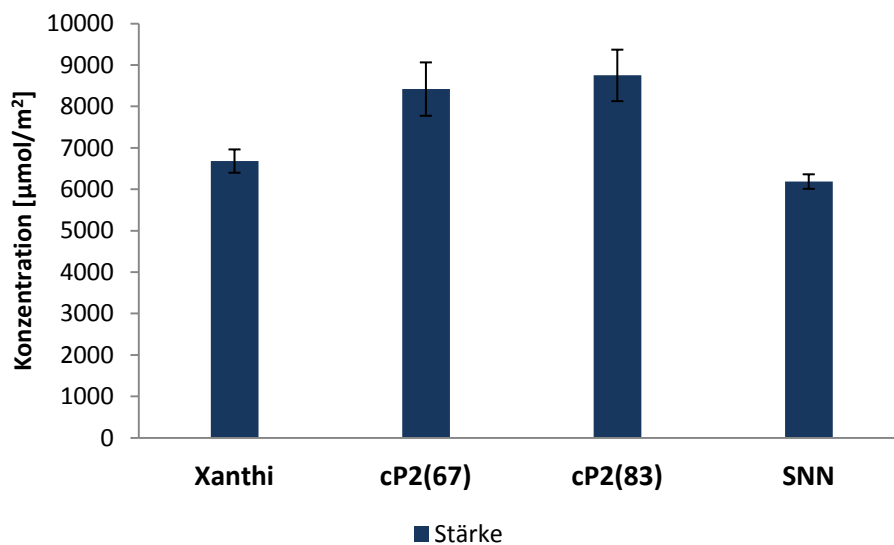


Abbildung 18: Konzentration an Stärke in *source*-Blättern. Untersucht wurde die Stärkekonzentration pro Blattfläche der Linien cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN. Angegeben ist das Mittel über den Tag. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Durchgängen ($n = 6$; \pm SE).

3.1.3.2 Reduktion des Saccharoseexportes in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Die Anhäufung von löslichen Kohlenhydraten und Stärke in *source*-Blättern wies auf eine mögliche Reduzierung des Assimilationstransportes hin. Um zu testen, ob die Kohlenhydratakkumulation mit einer Drosslung des Saccharoseexportes einhergeht, wurden Exportexperimente an Xanthi, cP2(67) und cP2(83) durchgeführt. Abbildung 19 zeigt die Saccharoseexportbilanz der *source*-Blätter. Die Exportdaten wurden für eine Lichtphase (11-17 Uhr) und eine Nachtphase (17-9 Uhr) bestimmt und daraus eine Gesamtbilanz berechnet (Abb. 18 A). Der Saccharoseexport in der 6-stündigen Lichtphase war beim Xanthi-Wildtyp gegenüber den Transformanten leicht erhöht (Abb. 18 B). Die Linie cP2(67) exportierte am wenigsten Saccharose. Dieses wird in der stündlichen Transportrate noch ersichtlicher (Abb. 18 C). Pro Stunde wurden $15 \mu\text{mol m}^{-2}$ Saccharose aus dem Blatt der Linie cP2(67) exportiert. Während der Nachtphase wurde bei allen Pflanzen am meisten Saccharose exportiert. Wie in der Tagphase war die exportierte Saccharosemenge bei Xanthi am höchsten. Durch den Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol kam es insgesamt zu einer Reduktion des Saccharoseexportes aus den *source*-Blättern um etwa 15%. Diese Reduktion war während der Lichtphase deutlich höher als während der Dunkelphase (Abb. 19).

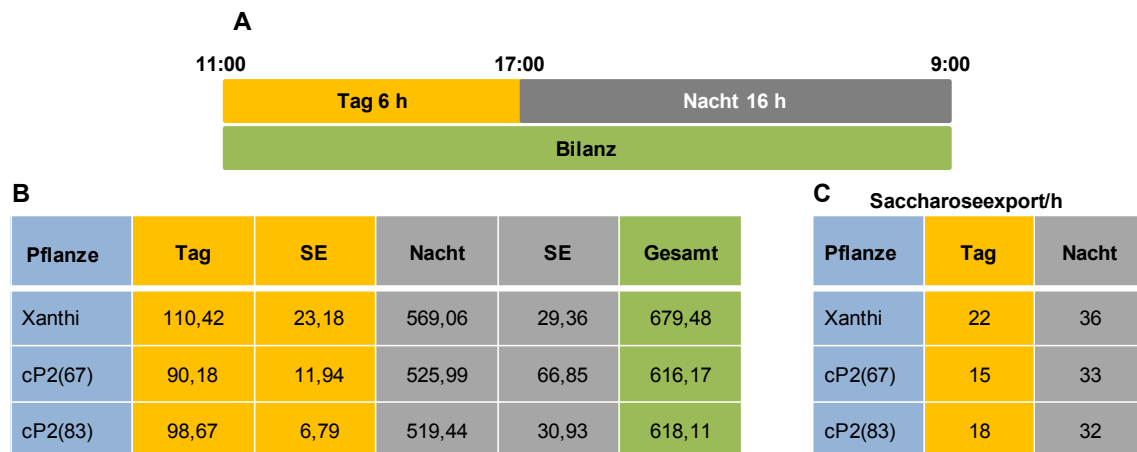


Abbildung 19: Zeitverlauf des Saccharoseexportes aus *source*-Blättern der untersuchten Tabakpflanzen. A) Schematische Übersicht des Untersuchungszeitraumes. Die Exportraten wurden für eine Lichtphase (11-17 Uhr) und eine Nachtphase (17-9 Uhr) bestimmt und daraus eine Gesamtbilanz berechnet. B) Saccharoseexportbilanz der Tag- und Nachtphase sowie Gesamtbilanz der Tabaklinien. C) Stündlicher Saccharoseexport (in $\mu\text{mol mm}^{-2}$) der Tabaklinien berechnet aus den Exportbilanzen (B). Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen ($n = 4$; +/- SE).

3.1.3.3 Erhöhung der *sink*-Aktivität in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

In der Literatur wird das Verhältnis von Hexosen zu Saccharose als ein besserer Indikator für die sogenannte *sink*-Aktivität von Blättern beschrieben als der reine Vergleich der Kohlenhydratkonzentrationen (Moore *et al.*, 1999). Die anhand der bestimmten Kohlenhydrate (Kapitel 3.1.3.1) ermittelten Werte zeigten, dass sich durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol die *sink*-Stärke von *source*-Blättern mehr als verdoppelt hat. Sie war zudem auch um ca. 30% im Vergleich zum resistenten Wildtyp SNN erhöht (Tabelle 16).

Tabelle 16: Berechnung der *sink*-Stärke von *source*-Blättern der untersuchten Tabakpflanzen. Angegeben ist die *sink*-Stärke für cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN. Diese wurde aus dem Verhältnis von Hexosen und Saccharose (siehe Abb. 17) bestimmt. Je höher der Wert, desto höher die *sink*-Aktivität.

Pflanze	Hexosen/Saccharose-Verhältnis
Xanthi	0,25
cP2(67)	0,57
cP2(83)	0,62
SNN	0,43

3.1.3.4 Erhöhung der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Fructose-2,6-bisphosphat (F2,6P₂) ist ein Signalmolekül bei Eukaryoten und reguliert den primären Kohlenhydratmetabolismus, indem es die Balance zwischen Glykolyse und Glukoneogenese im Cytosol steuert (Stitt *et al.*, 1987). In Pflanzen koordiniert F2,6P₂ den photosynthetischen Kohlenstofffluss zwischen Saccharosebiosynthese und Glykolyse (siehe Kapitel 1.4.2). Durch den Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol lag der F2,6P₂ Gehalt in *source*-Blättern nahezu doppelt so hoch wie im Xanthi-Wildtyp. Im Vergleich zum SNN-Wildtyp wiesen die cP2-Linien eine Steigerung um ca. 30% auf (Abb. 20).

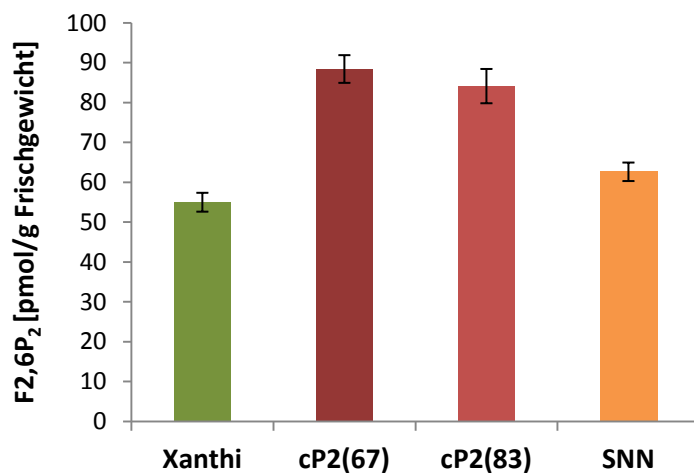


Abbildung 20: Messung der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte in nicht-infizierten Tabak *source*-Blättern. Die Messungen erfolgten für SNN, Xanthi, cP2(67) und cP2(83) 6 Stunden nach Belichtung. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n = 4; +/- SE). (Messungen durchgeführt von J. Scharte).

3.1.3.5 Veränderungen von Photosyntheseparametern in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Die Induktionsgeschwindigkeit der Photosynthese nach einer Dunkelphase kann über die Aktivität des OPPs und die Verfügbarkeit von stromalen OPP-Metaboliten Aufschluss geben (vgl. Scharte *et al.*, 2009). Die Induktionsgeschwindigkeit wurde in dieser Arbeit mit Hilfe eines tragbaren Puls-Amplituden-Modulations-Chlorophyll-Fluorometers (PAM-Fluorometer) aufgenommen. Nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol war die Induktion des PETs bei den Transformanten cP2(67) und cP2(83) vergleichbar und gegenüber Xanthi in den ersten 180 Sekunden signifikant beschleunigt (Abb. 21). Diese Daten lassen sich mit Ergebnissen aus Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Messungen korrelieren

(Scharte *et al.*, 2009) und sind ein weiteres Indiz für eine *per se* gesteigerte OPP-Aktivität nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol. Zudem belegen sie die Anwendbarkeit von photosynthetischen Induktionsmessungen anhand des Elektronentransportes (ETR) nach Dunkeladaptation mittels eines tragbaren PAM-Fluorometers als schnelle Hochdurchsatz-Methode für die Bestimmung der OPP-Aktivität in Pflanzen.

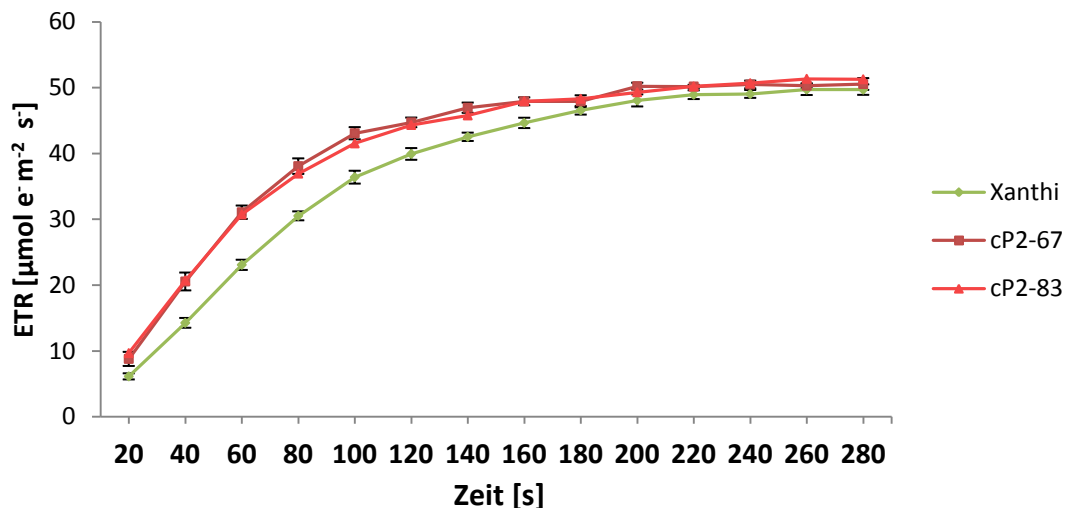


Abbildung 21: Messung der induktion des photosynthetischen Elektronentransportes (ETR) nach einstündiger Vorverdunklung der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi in nicht-infizierten *source*-Blättern. Die Messung erfolgte nach einstündiger Vorverdunklung bei ambienten Bedingungen (für O₂, CO₂) und einer aktinischen Lichtintensität von 280 μE mittels eines PAM-Fluorometers. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 9 unabhängigen Durchgängen (n= 9; +/- SE).

Neben den photosynthetischen Induktionsraten wurde auch die Gesamtkapazität des photosynthetischen Elektronentransportes (PET) ermittelt. Der PET war in *source*-Blättern nach Isoenzymaustausch der G6PDH um ca. 5 % im Vergleich zum Xanthi erhöht (Abb. 22).

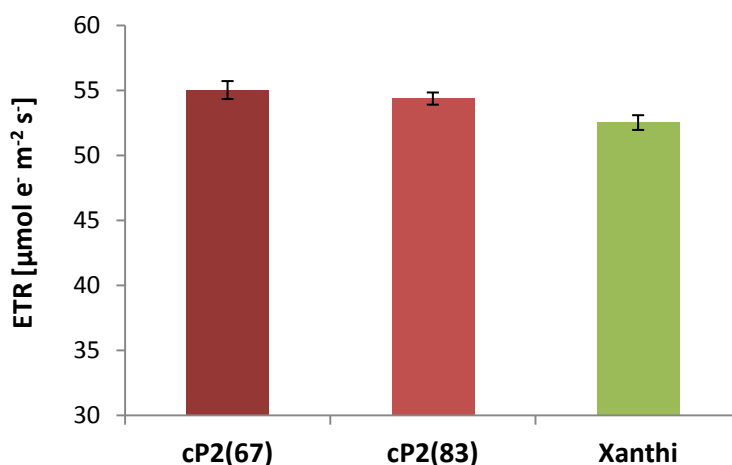


Abbildung 22: Messung der Gesamtkapazität des photosynthetischen Elektronentransportes (ETR) der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi in *source*-Blättern. Bei ambienten Bedingungen (für O₂, CO₂) und einer Lichtintensität von 280 μE wurde die Messung 6 Stunden nach Beichtung durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 9 unabhängigen Durchgängen (n = 9; +/- SE).

3.1.3.6 Veränderungen von Hormongehalten in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol waren die Gehalte aller gemessenen Hormone tendenziell geringer. Hoch signifikant war diese Erniedrigung allerdings nur bei zyklischen Jasmonsäurevorstufe Oxophytodiensäure (OPDA). Hier war der Gehalt in den cP2-Linien etwa um die Hälfte niedriger und vergleichbar mit dem Wildtyp SNN (Abb. 23). Die Messwerte der Hormone Salicylsäure (SA), Auxin (*indole acetic acid*, IAA) und OPDA befanden sich in den cP2-Linien dabei allerdings an der Nachweisgrenze.

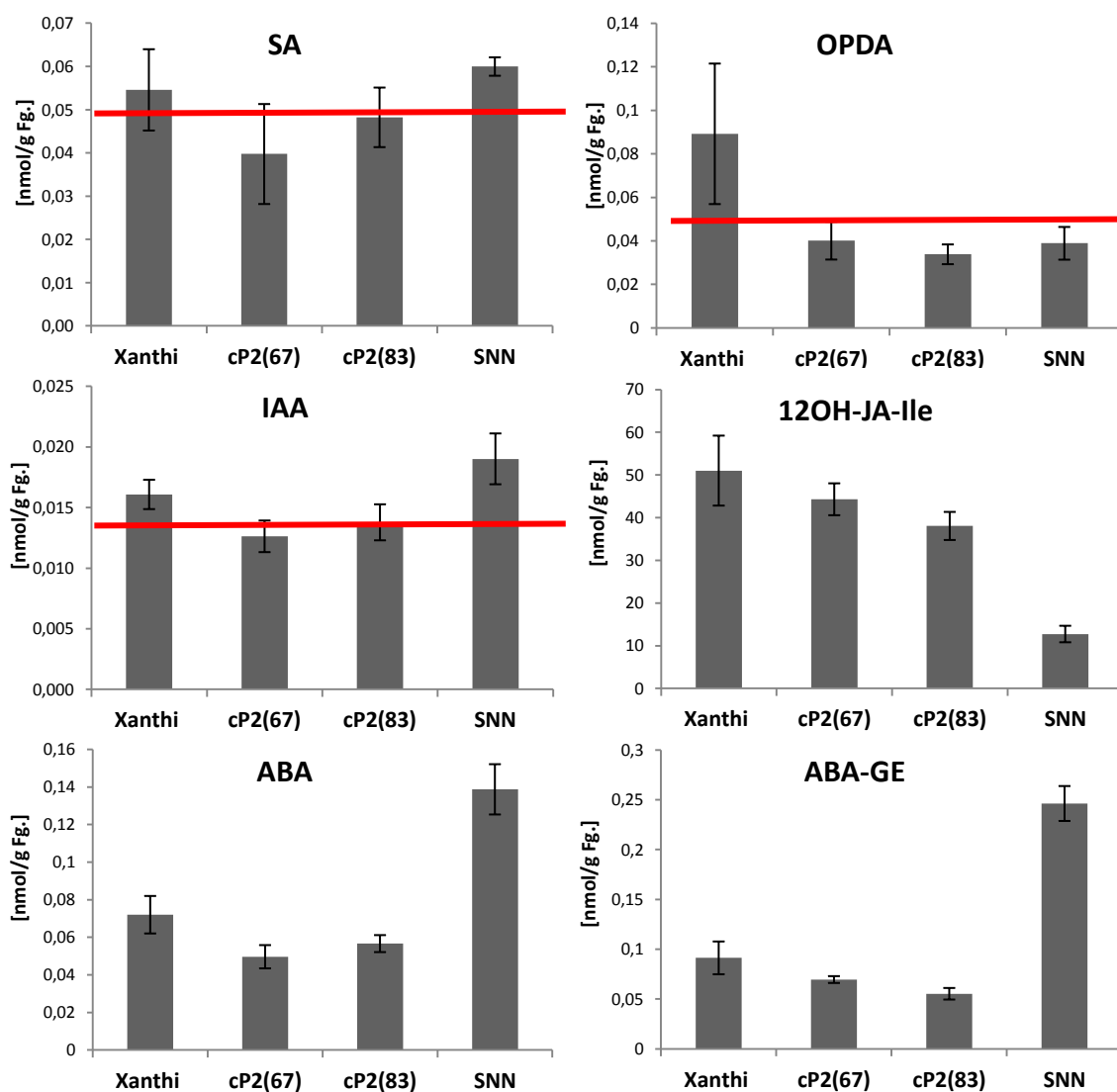


Abbildung 23: Messung von Hormongehalten in *source*-Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi- und SNN-Wildtyp. Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Prof. Dr. Ivo Feussner und wurden mittels HPLC-Tandem-Massenspektrometrie nach Ralhan *et al.* (2012) bestimmt. SA (Salicylsäure); IAA (*indole-3-acetic acid*, Auxin); OPDA (Oxophytodiensäure); 12OH-Ja-Ile [Derivat der Jasmonsäure (JA)]; ABA (Abscisinsäure); ABA-GE (Abscisinsäure-Glucoseester). Die Nachweisgrenzen für die einzelnen Hormonmessungen sind durch eine rote Linie gekennzeichnet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n = 4; +/- SE).

3.1.3.7 Anstieg der Prolingehalte in *source*-Blättern der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Als Schutzmechanismus gegen Trocken- und Salzstress akkumulieren einige pflanzliche Organismen kompatible gelöste Substanzen wie u.a. Mannit, Sorbit und Prolin, um die osmotische Balance der Zelle aufrechtzuerhalten (Shabala & Pottosin, 2014). Prolin agiert nicht nur als Osmotikum, sondern ist ein vielseitiges Molekül in der abiotischen Stressantwort und seine Akkumulation korreliert generell mit pflanzlicher Stresstoleranz (siehe Einleitung, Kapitel 1.3). In Kooperation mit Prof. Dr. Forlani von der Universität Ferrara in Italien wurde daher der Prolingehalt in Keimlingen nach NaCl-Behandlung, wie bei Bates *et al.* (1998) beschrieben, gemessen. Nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol war der Gehalt an Prolin signifikant um das doppelte im Vergleich zum Xanthi erhöht (Abb. 24). Nach NaCl-Behandlung stieg die Konzentration von Prolin auf mehr als das dreißig bzw. fünfzehnfache an (Abb. 25). Allerdings war der Unterschied zwischen den cP2-Linien zum Xanthi-Wildtyp nicht mehr signifikant.

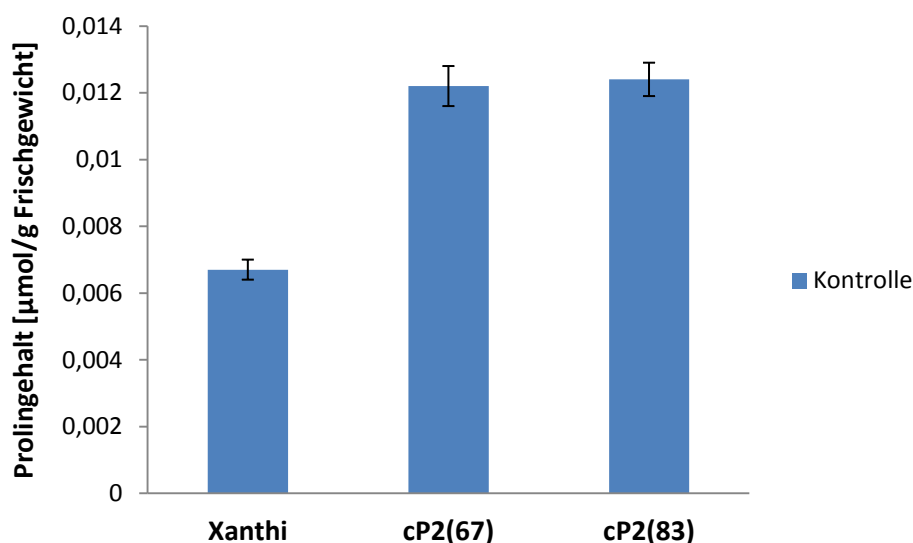


Abbildung 24: Messung der Prolingehalte in *source*-Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi. Die Prolinmessungen erfolgten an 45 Tage alten Keimlingen (14 h Licht bei $300 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus insgesamt 12 getesteten Pflanzen, angegeben ist der Standardfehler. Die Messungen erfolgten von Prof. Dr. Forlani von der Universität Ferrara in Italien ($n = 12$; +/- SE).

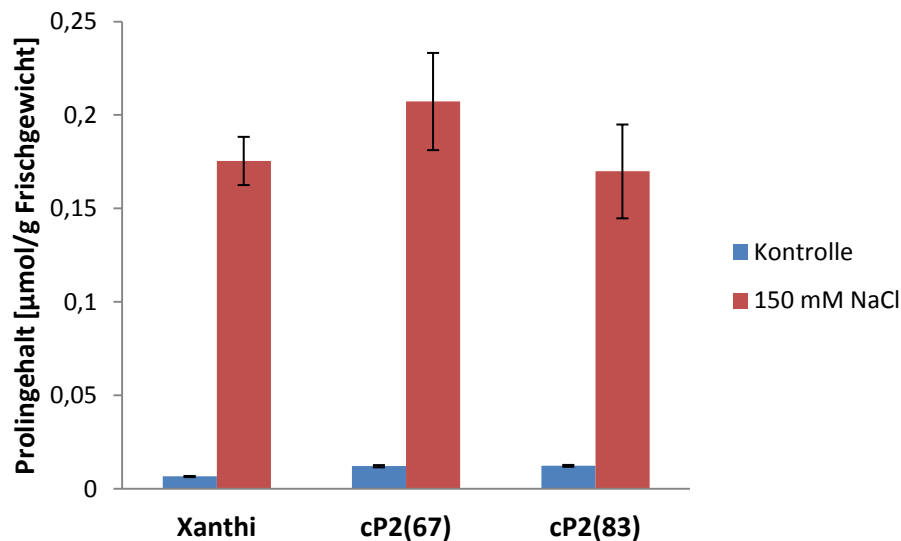


Abbildung 25: Messung der Prolingehalte in *source*-Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi. Die Prolinmessungen erfolgten an 45 Tage alten Keimlingen ohne NaCl-Behandlung (Kontrolle, Werte aus Abb. 24) und an Keimlingen mit NaCl-Behandlung (48 h mit 150 mM NaCl). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus insgesamt 12 getesteten Pflanzen, angegeben ist der Standardfehler. Die Messungen wurden von Prof. Dr. Forlani an der Universität Ferrara in Italien durchgeführt (n = 12; +/- SE).

3.1.3.8 Veränderungen der Biomasse, Samenkomposition und Samenqualität der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Alle bisherigen Daten deuteten auf eine Zuckerumverteilung in *source*-Blättern nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol hin. Anstelle eines bevorzugten Zuckerexportes akkumulieren Zucker in den Blättern und erhöhen die *sink*-Stärke – ohne dabei die Photosyntheseleistung zu beeinflussen. Zu klären war nun, ob und wie sich diese veränderte Versorgung mit Zuckern auf die gesamte Biomasseproduktion, die Qualität, die Quantität und die Komposition des Saatgutes auswirkt.

3.1.3.9 Steigerung der Biomasseproduktion der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Als Anhaltspunkt für die Biomasseproduktion der cP2-Pflanzen wurde das Frisch- und Trockengewicht der Pflanzen bestimmt. Hierzu wurden Pflanzen im Gewächshaus nach dreimonatigem Wachstum untersucht. Die oberirdischen Pflanzenbestandteile wie Blätter, Spross und Blütendolde wurden geerntet, gewogen (Frischgewicht) und drei Tage getrocknet (Trockengewicht). Die ermittelten Frisch- als auch Trockengewichte sind in Abbildung 26 zusammengefasst. Trotz vermindertem Zuckerexport (siehe Abb. 18, Kapitel 3.1.3.2) waren weder Frischgewicht noch Trockengewicht der cP2-Pflanzen gegenüber den

Wildtypsorten erniedrigt. Das Frischgewicht und das Trockengewicht waren bei den Supertransformanten sogar signifikant um ca. 15% im Vergleich zu Xanthi erhöht.

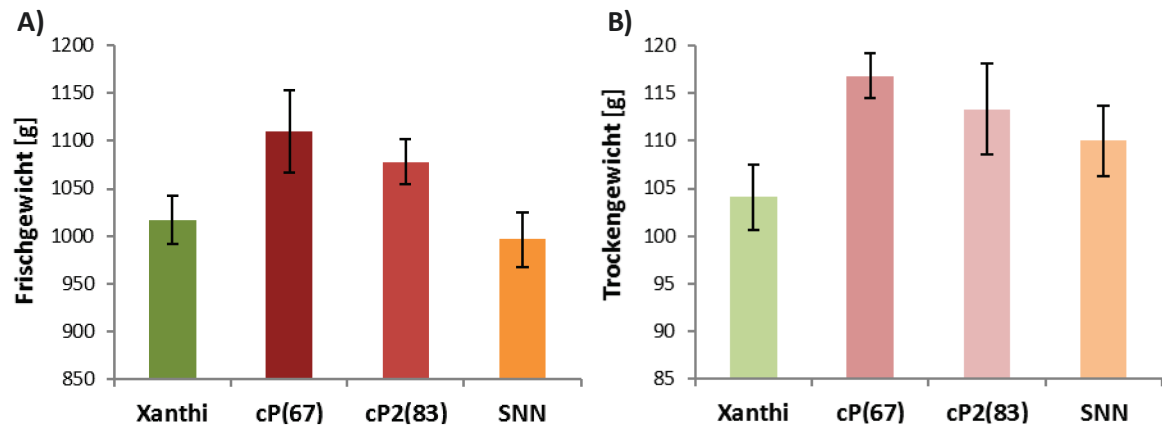


Abbildung 26: Bestimmung der oberirdischen Biomasse. A) Das oberirdische Pflanzengewebe wurde für die untersuchten Pflanzen nach dreimonatigem Wachstum im Gewächshaus geerntet, gewogen und das gesamte Frischgewicht bestimmt. B) Nach dreitägiger Trocknung des Gewebes im Wärmeschrank bei 80°C wurde das Trockengewicht der Pflanzen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte für jeweils 4 Pflanzen und der Standardfehler ($n = 4$; \pm SE).

3.1.3.10 Saatgutqualität der Tabaksorte Xanthi nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol

Das Tausendkorngewicht (TKG) ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal für die Pflanzenzüchtung und wurde mit Hilfe des Präzisionszählers Elmor C3 und integrierter elektronischer Waage bestimmt. Nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol war das TKG und somit die Qualität des Saatgutes im Vergleich zum Wildtyp Xanthi um ca. 10% erhöht (Abb. 27) und mit dem TKG der Sorte SNN vergleichbar.

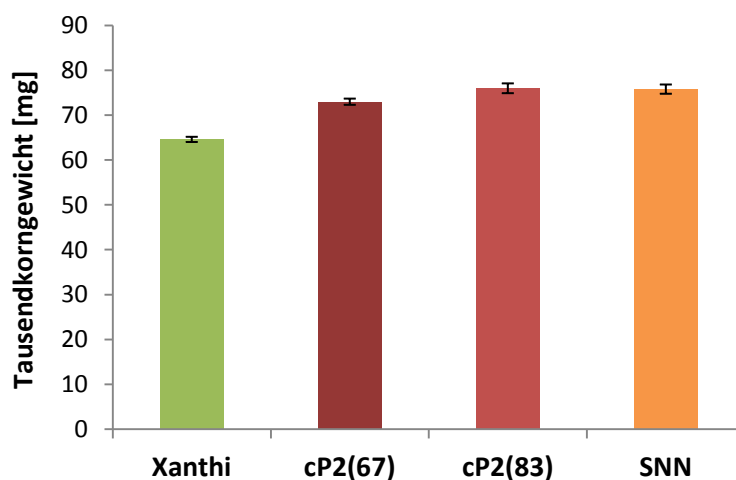


Abbildung 27: Bestimmung des Tausendkorngewichtes der Linien Xanthi, cP2(67), cP2(83) und SNN. Das TKG wurde mit Hilfe des Präzisionszählers Elmor C3, eines zusätzlichen Softwaremoduls und einer elektronischen Waage bestimmt. Aus der gezählten Stückzahl und dem Probengewicht wurde sofort das TKG angezeigt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 6 unabhängigen Durchgängen ($n = 6$; \pm SE).

3.1.3.11 Samenzusammensetzung

Um die veränderte Samenqualität zu untersuchen wurde die Samenzusammensetzung bei den Transformanten im Vergleich zu Xanthi bestimmt. Die Proteingehalte der Samen zeigten keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 28 sind die Ergebnisse der Lipidgehaltmessungen abgebildet. Die cP2-Transformanten hatten einen vergleichbaren Lipidgehalt und waren mit dem SNN vergleichbar. Xanthi hatte hingegen weniger Lipide je Gramm Trockengewicht im Samen gespeichert.

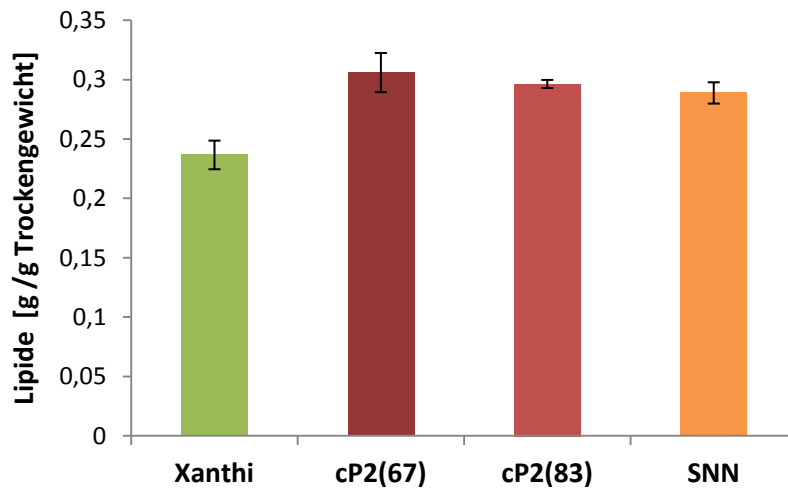


Abbildung 28: Bestimmung des Lipidgehaltes von Samen der untersuchten Pflanzen. Der Lipidgehalt von Samen der Pflanzen Xanthi, cP2(67), cP2(83) und SNN wurde nach einem optimierten Protokoll von Wingenter *et al.* (2010) gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 3 unabhängigen Durchgängen ($n = 3$; \pm SE).

3.1.3.12 Veränderung des Grundmetabolismus bei der Tabaksorte Xanthi nach Isoenzymaustausch G6PDH im Cytosol

Die Pflanzensorten cP2(67), cP2(83), SNN und Xanthi weisen nicht nur in der Stressantwort Unterschiede auf, sondern scheinen sich auch im Grundmetabolismus zu unterscheiden. Da der Stoffwechsel ein komplexes Netzwerk aus Biosynthesewegen mit weit über 100.000 Metaboliten ist, ist eine Identifizierung von Unterschieden komplex (vergleiche Ibanez *et al.*, 2010). Mit Hilfe der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und einem Massenspektrometer mit Flugzeitanalysator (*time of flight*, TOF) können metabolische Studien anhand von Massenanalysen chemischer Verbindungen durchgeführt werden. Mit der MALDI-TOF-Analyse sollte versucht werden, ein charakteristisches metabolisches Profil der Pflanzen zu erstellen und sie somit voneinander abzugrenzen. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Dreisewerd (Leiter der Forschungsabteilung Biomedizinische Massenspektrometrie am Institut für Hygiene der medizinischen Fakultät, WWU Münster) durchgeführt. Analysiert wurde das Massenprofil von nicht infizierten Blattproben aus *source*-Blättern 6 Stunden nach Belichtung. In Abbildung 29 sind die Ergebnisse der Hauptkomponentenanalyse (*principal component analysis*, PCA) für die Pflanzen SNN, Xanthi, cP2(67) und cP2(83) zusammengefasst. Die PCA ist ein mathematisches Verfahren, um die größtmögliche Varianz der Massenprofile zwischen Proben zu visualisieren und Datensätze nach Übereinstimmungen zu gruppieren (Ibanez *et al.*, 2010). Basierend auf der PCA-Analyse

wurden die Tabaksorten deutlich voneinander gruppiert. Die Gruppierung signalisiert signifikante metabolische Unterschiede und somit wahrscheinlich eine veränderte Metabolitverteilung in den Pflanzen. Interessanterweise werden die resistente Sorte SNN und die susceptible Sorte Xanthi sichtbar getrennt, wohingegen die Linien cP2(67) und cP2(83) nach G6PDH-Isoenzymaustausch nur ein leicht verändertes metabolisches Profil im Vergleich zu ihrer Mutterpflanze Xanthi zeigen.

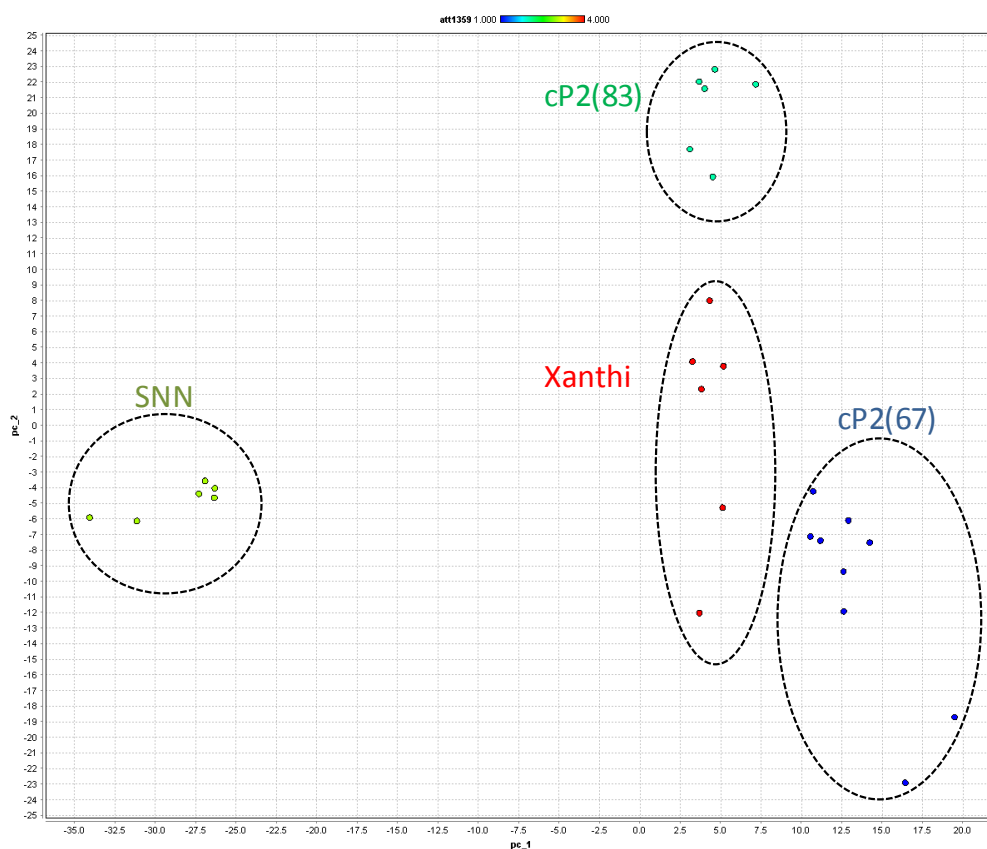


Abbildung 29: Hauptkomponentenanalyse der MALDI-TOF-Untersuchung. Hauptkomponentenanalyse (PCA) der Pflanzen SNN, Xanthi, cP2(67) und cP2(83). Dargestellt ist der PC1 vs. PC2 Ergebnisplot einer PCA-Analyse im Positiv-Modus von Kontrollproben der untersuchten Pflanzen. Jeder Punkt stellt die unabhängige Messung einer Probe dar. Anhand des Programmes *Rapidminer* war eine metabolische Gruppierung der Pflanzen möglich. Die Untersuchungen wurden in Kooperation mit Prof. Dr. Dreisewerd (Leiter der Forschungsabteilung Biomedizinische Massenspektrometrie am Institut für Hygiene der medizinischen Fakultät, WWU Münster) durchgeführt.

Die PCA analysiert und sortiert die detektierten Massen nach ihrer Varianz bzw. nach ihrer Abweichung. In ersten Versuchen sollten die Massen, die mit der größten Varianz zur Gruppierung beigetragen haben, identifiziert werden. Darüber hinaus den Metaboliten zugeordnet und teilweise in Stoffwechselwege eingegliedert werden. In einer ersten Analyse wurde Nikotin als Schlüsselmetabolit mit der größten Abweichung zwischen den

Pflanzensorten identifiziert. Die Abbildung 30 zeigt den vergrößerten Bereich der Massenspektren nach MALDI-TOF-Analyse für Nikotin (M/Z 164,11). Der Signalintensitätsvergleich zeigte Unterschiede zwischen den Pflanzen. Leider war es mit dem Analyseprogramm *MoverZ* nicht möglich die Y-Achsen der Graphen anzugleichen, deshalb sind die Werte und nicht die Höhen der Ausschläge relevant. Die Supertransformanten zeigten die höchste Signalintensität, die Wildtypen hingegen deutlich niedrigere Werte, wobei SNN die geringste Intensität zeigte. Anhand der Signalintensität können in diesem Fall quantitative Rückschlüsse auf den Nikotingehalt gezogen werden. Demnach scheinen die Transformanten, besonders cP2(67) am meisten Nikotin und SNN am wenigsten zu produzieren. Nikotin ist ein Intermediat des Sekundärstoffwechsels und eine verstärkte Akkumulation in den cP2-Pflanzen könnte ein Marker für eine erhöhte OPP-Aktivität sein.

M/Z: 164.11 Nikotin

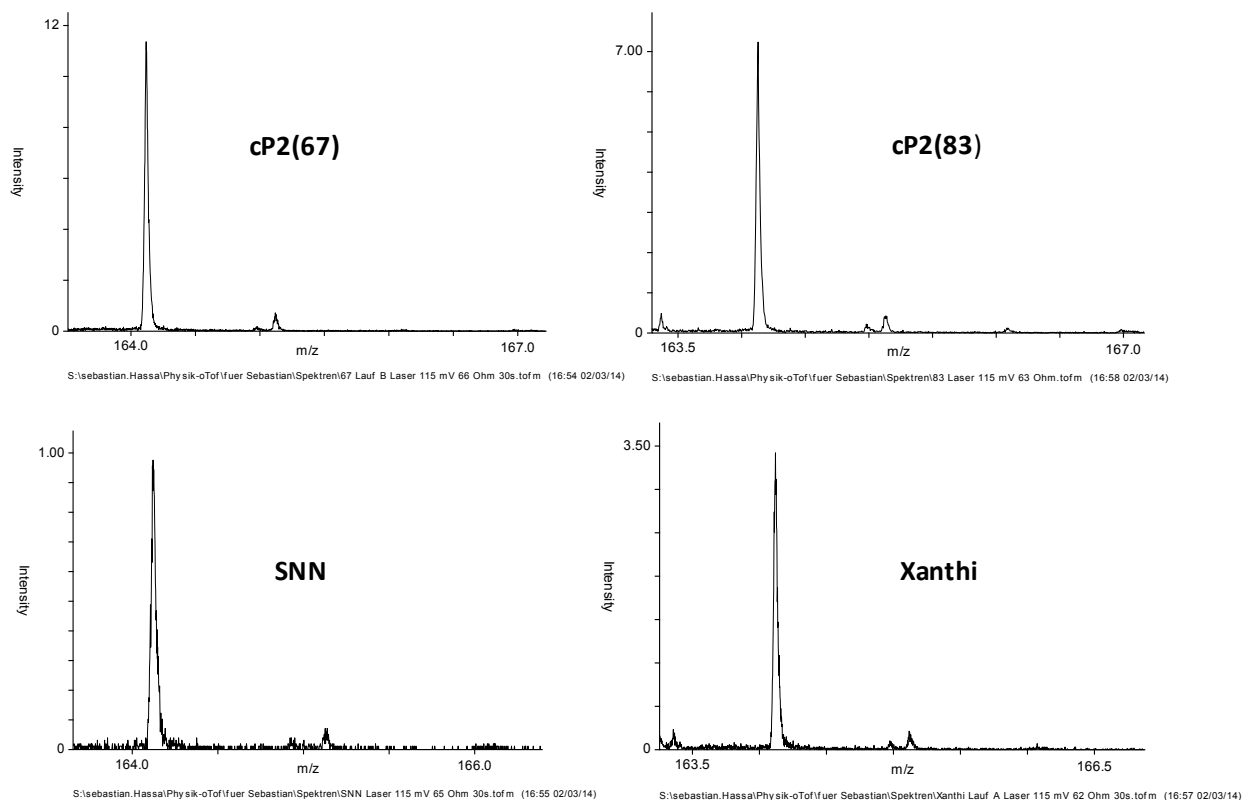


Abbildung 30: Repräsentative Darstellung der Massensignalintensität von Nikotin. Abgebildet ist das Masse-/Ladungsverhältnis (M/Z : 164,11) für die untersuchten Pflanzen cP2(67), cP2(83), Xanthi und SNN. Die Daten stammen aus der PCA-Analyse der Pflanzen aus Proben nicht infizierter *source*-Blätter. Die Abbildung wurde mit dem Programm *MoverZ* erzeugt.

3.2 Erstellung der Doppeltransformanten

Um den zeitlichen Aufwand für die Erstellung von Transformanten mit einem G6PDH-Isoenzymaustausch zu reduzieren und mehrere Pflanzensorten simultan transformieren zu können, sollten die beiden Konstrukte pZM5 und pBinAR-*cytG6PD*-RNAi aus Scharte *et al.* (2009) in einem binären Doppelkonstrukt vereint werden. Das erfolgreich erstellte binäre Doppelkonstrukt pZM6 wurde in die Wildtyppflanze Xanthi und in die transgene Tabakpflanze SNN::cwINV stabil transformiert (Masterarbeit Sebastian Hassa, 2011). Die erzeugten transgenen Blattscheiben bildeten das typische Kalluswachstum, jedoch stagnieren sie in ihrer Entwicklung und zeigten kein Streckungswachstum.

Ein Sequenzvergleich zwischen den beiden *G6PD*-basierenden Sequenzen deckte zum Teil homologe Sequenzbereiche zwischen dem *cytRNAi*- und *cP2*-Expressionskonstrukt auf (Abb. 31).

```

cP2          GTAAAGGTACTACGTTCAATGAGACCAATAAACTTGAAGATGTGGTGATAGGACAGTAC 1179
cytG6PDH    GTTAAGGTTCTTCAATCAATGCTTCCAATTAAGATGAAGAGGTTGTCTTGACAATAT 1032
**:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*

cP2          AAGAGCCACAGCATAGGAGGAGTCACTTATCCAAGCTATACTGATGATAAACTGTGCCA 1239
cytG6PDH    GAAG-----GCTATAAGGATGACCCACCGTTCCCT 1062
.*..                *****  ***** ..** * * **

cP2          AAAGGTAGTCTGACCCCGACATTTGCAGCTGCTGCACTCTTCATCGACAATGCAAGATGG 1299
cytG6PDH    GACAACCTCAAATACTCCTACTTTTGCAACTATGGTTTACGCATACACAATGAAAGATGG 1122
.:. . . : :.: ** * * **:*:*:*:*:*:* * : * . ** . ***** .*****

cP2          GATGGTGTACCTTTTCTAATGAAAGCTGGGAAAGCACTAAACACCCGAAGTGCGGAGATA 1359
cytG6PDH    GAAGGTGTGCCCTTTATAATGAAGGCTGGAAAAGCACTAAATCAAGAAAAGCAGAAATA 1182
**:*:*:*:* * * * .***** .***** .***** :*..**.*:*..**

cP2          AGAGTCCAGTTCAGGCATGTGCCTGGAAATTTATATAACCGGAATTCTGGTACTGATCGT 1419
cytG6PDH    CGAGTGCAGTTTAAGGATGTTCTCCTGGTATATATTAGATG-----TAAA 1227
.*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cP2          GATCAGACCACAAATGAGCTTGTCAATCCGCGTCCAACCTGATGAAGCTATCTATTTGAAA 1479
cytG6PDH    AAGCAGGGGAGAAATGAGTTTGTATACGCCTCCAGCCTCAGAAGCCATGTACATGAAG 1287
.* * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cP2          ATCAACAACAAGGTCCTGGTTTAGGAATGAGATTAGATCAGAGTAAGTAAATCTTCTC 1539
cytG6PDH    CTTACGGTCAAGAAGCCTGGGCTTGAATGTCAACTGTTCAAGTGAATTAGACCTG-TC 1346
.* * . : * * * . : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

cP2          TATTCAGCAAGGTATTCAAAGG---AGATTCCAGATGCATATGAGAGGCTTTTGTGTTAGA 1595
cytG6PDH    ATATAGGCAGCGTTATCAAGGGTTGTCTATCCAGAGGCTTATGAACGCTGATTCTCGA 1406
.:*..**.* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Abbildung 31: Sequenzausschnitt aus dem Alignment zwischen der cytosolischen G6PDH-Sequenz von *N. tabacum* (*cytG6PDH*) und der *cP2* G6PDH-Isoform *At1g24280* (*P2*) von *A. thaliana*. Die Sequenzen wurden zur Erstellung der Plasmide pZM5 und pBinAR-*cytG6PD*-RNAi verwendet (Scharte *et al.*, 2009). Die rot markierten Sequenzbereiche kennzeichnen die verwendeten Primerbindestellen, mit denen das cytosolische G6PDH-Fragment (324 bp) für das binäre RNAi-Konstrukt amplifiziert wurde (Scharte *et al.*, 2009).

Dies erklärt die Beobachtungen aus Scharte *et al.* (2009), denn die modifizierte plastidäre G6PDH-Isoform (*cP2*) aus *A. thaliana* wurde auf Proteinebene nach Expression des

RNAi-Konstruktes zur Reprimierung der endogenen cytosolischen G6PDH-Isoformen mit gedrosselt.

Im Gegensatz zu Scharte *et al.* (2009) ist im binären Doppelkonstrukt pZM6 das partiell homologe RNAi-Konstrukt in unmittelbarer Nähe zur modifizierten plastidären G6PDH-Isoform (cP2) platziert, womit eine vollständige Reprimierung der cP2 denkbar wäre (Matzke & Matzke, 1995). Es wurde vermutet, dass die Blattscheiben daher keinen oder nur noch einen sehr schwach aktiven cytosolischen OPP haben. Sie waren nicht entwicklungsfähig.

3.2.1 Erstellung eines neuen RNAi-Konstruktes zur selektiven Reprimierung der cytosolischen G6PDH

Um eine mögliche Drosslung der cP2-Expression durch das cytosolische G6PDH-RNAi-Konstruktes auszuschließen, sollte dieses im Zuge dieser Arbeit variiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass nur Sequenzbereiche mit geringerer Übereinstimmung zur cP2 die Grundlage des neuen RNAi-Konstruktes bilden und dadurch selektiv die endogenen cytosolischen G6PDH-Isoformen reprimiert werden. Potenzielle Sequenzbereiche wurden im 5'UTR-Bereich identifiziert (Abb. 32), so dass eine erneute Klonierung des RNAi-Konstruktes und dessen Einbringen in das neue Doppelkonstrukt möglich waren. Mit den Primern Nr. 1 und Nr. 2 (siehe Material und Methoden, Tabelle 6) wurde ein 200 bp Fragment von einem cytosolischen G6PDH cDNA-Klon (bereitgestellt von Prof. A. von Schaewen) amplifiziert.

```

cP2          GTTGTTCGTGCAAGATGGATCAGTAGCCACCGAG-----TCAAGCTCGTCCGAGGAG 51
cytG6PDH     GCGCTCTACAATTT-CTTCAGAAATCACAAGGTTGGATTGATCATACTTCGCTGAGTTG 59
              *  ***  .***  :*  :****:*.  ****..*  ****:.*  *  ***  :*

cP2          GCG-AAAGATG---TAGGGGTGTTAACGATTCCTTCA-CTTGAAGCTG-----ACAAGG 100
cytG6PDH     AGGGTGAGCTGGTTGTGAGGCCTTGAAGATGGCAGCATCATGGTGCATTGAAAAAGGGG 119
              .  *  :.***.*  :*.**  **.*.***  *:  **  *:*.:.**  :  *..**

cP2          TTGTAGCAGAGTC-----TGATGGCGGTGAACAACCTTCAACAG-----TTAG 143
cytG6PDH     TTCTATTCGGCTCGACTCTTTTAGAGATAATGATAATATACCTGAAACTGGGTGCTTTTC 179
              **  **  .*.  **  :****.  *.**.:.***  *  .***:*  **  :

cP2          TATCACGGTGGTGGGAGCTTCTGGTGATCTTGCCAAGAAGAAAATATCCAGCTCTTTT 203
cytG6PDH     CATTATGTTCTTGGTGCTTCTGGTGATCTTGCCAAGAAGAAAATTTCTCGGCTCTT 239
              **  *  **  *  **.******.*****.*****.***  :.*  **.*  **  **

```

Abbildung 32: Sequenzausschnitt aus dem Alignment zwischen der cytosolischen G6PDH-Sequenz von *N. tabacum* (cytG6PDH) und der cP2 G6PDH-Isoform At1g24280 (P2) von *A. thaliana*. Die rot markierten Sequenzbereiche kennzeichnen die verwendeten Primersequenzen (siehe Material und Methoden, Tab. 6 Primer:1/2), mit denen das cytosolische G6PDH-Fragment für das neue binäre RNAi-Konstrukt amplifiziert wurde.

Das amplifizierte Fragment wurde über *Bam*HI/*Sall* in den leeren pUC-RNAi-Vektor ligiert (Chen *et al.*, 2003). Zur Erlangung der für RNAi-Konstrukte charakteristischen gegenläufigen Orientierung der DNA-Fragmente wurde das *cytG6PDH*-Fragment (*cytG6PD*, 200 bp) mit *Bam*HI/*Sall* aus dem Ausgangsvektor geschnitten. Da *Bam*HI zu *Bgl*III und *Sall* zu *Xho*I kompatible Enden hat, konnte das Fragment anschließend in den *Xho*I/*Bgl*III geöffneten pUC-RNAi-1*cytG6PD*_200bp Vektor ligiert werden.

Mit einem *Pst*I-Testschnitt wurde die Aufnahme des zweiten cytosolischen G6PDH-Fragmentes bestätigt (Abb. 33 A). Bei erfolgreicher Ligation des zweiten DNA-Fragmentes sollte ein ca. 600 bp Fragment (dsRNAi-Kassette mit Intron) aus dem Vektor herausfallen. Dies war für die Klone Nr. 1 bis 6 und 8 der Fall. Der Klon 7 hatte das zweite 200 bp Fragment nicht aufgenommen und zeigte wie die Negativ-Kontrolle pUC-RNAi-1*cytG6PD*_200bp nur ein 400 bp Fragment. Der erstellte Vektor trägt die Bezeichnung pUC-RNAi-2*cytG6PD*_200bp. In Abbildung 33 B ist eine schematische Darstellung der RNAi-Kassette des pUC-RNAi-2*cytG6PD*_200bp gezeigt.

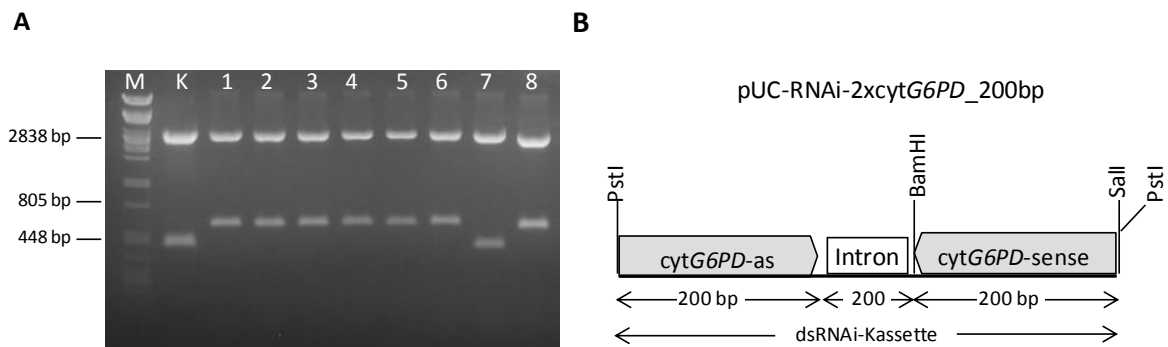


Abbildung 33: Testschnitt des Vektors pUC-RNAi-2*cytG6PD*_200bp mit *Pst*I. A) Bei erfolgreicher Ligation des zweiten cytosolischen G6PDH-Fragmentes muss ein ca. 600 bp Fragment (dsRNAi-Kassette mit Intron) aus dem Vektor herausfallen. Dies ist für die Klone Nr. 1 bis 6 und 8 der Fall. Der Klon Nr. 7 und die Negativ-Kontrolle (K) pUC-RNAi-1*cytG6PD*_200bp haben das Fragment nicht. Bei ihnen ist ein ca. 400 bp Fragment, bestehend aus Intron und dem 1. *cytG6PD*-Fragment sichtbar. Die obere Bande entspricht dem Vektorrückgrat pUC-RNAi (2692 bp). B) Schematische Darstellung der neuen dsRNAi-Kassette pUC-RNAi-2*cytG6PD*_200bp.

3.2.2 Das neue Doppelkonstrukt pZM8

Die weitere Klonierung des Doppelkonstruktes erfolgte wie in der Masterarbeit von Hassa (2011) beschrieben und ist schematisch in Abbildung 34 dargestellt. Über die *Pst*I-Schnittstelle wurde die dsRNAi-Kassette des pUC-RNAi-2*cytG6PD*_200bp in den pBSK-P-MAS_T-35S eingebracht. Mit *Hind*III/*Sac*I wurde das Fragment bestehend aus

MAS-Promotor (P-MAS), 35S-Terminator (T-35S) und dsRNAi-Kassette aus dem Vektor pBSK-cytRNAi-Kassette_200bp geschnitten und in den mit *HindIII/SacI* geöffneten pZM5_MutSacI ligiert. Der erstellte Vektor trägt die Bezeichnung pZM8 und repräsentiert das fertige, neue binäre Doppelkonstrukt. Der Vektor wurde mittels Sequenzierung überprüft (siehe Anhang).

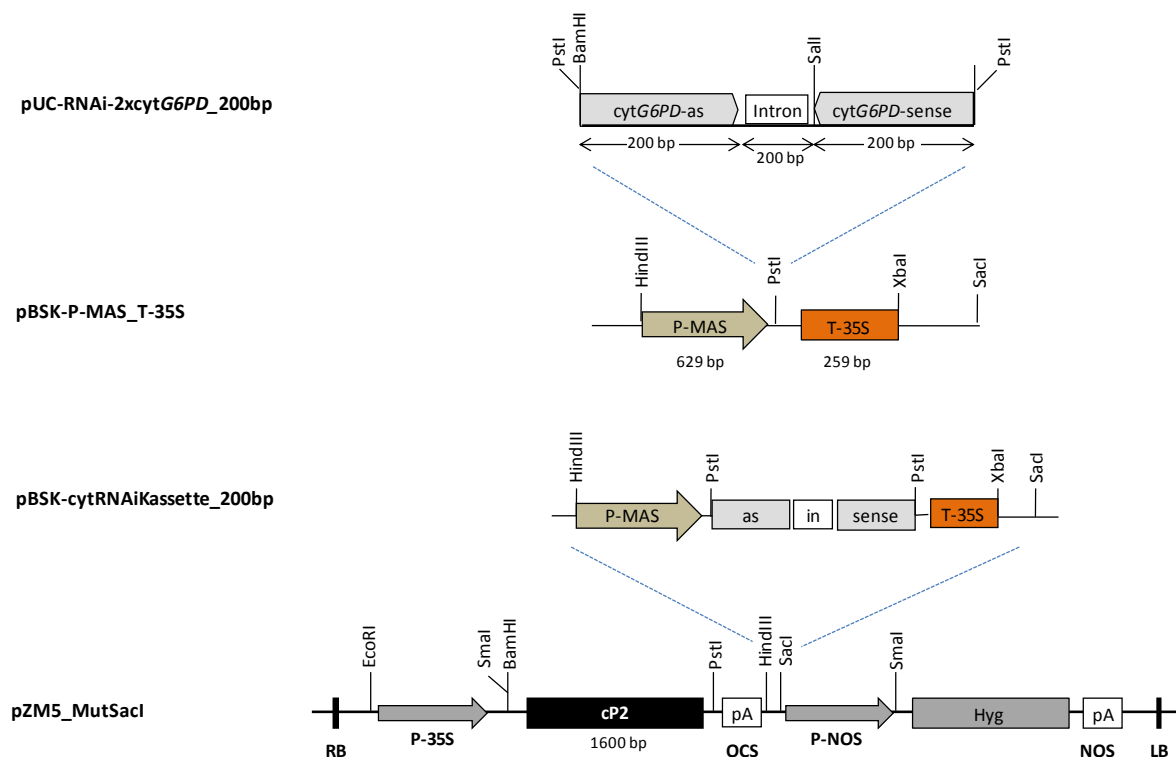


Abbildung 34: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erstellung eines neuen binären Doppelkonstruktes für *N. tabacum*. Aus dem Vektor pUC-RNAi-2xcytG6PD_200bp wurde die dsRNAi-Kassette (600 bp) über *PstI* in den pBSK-P-MAS_T-35S Vektor kloniert. Anschließend wurde die cytRNAi-Kassette (1488 bp), bestehend aus P-MAS, dsRNAi-Kassette und T-35S über *HindIII/SacI* in den pZM5_MutSacI-Vektor eingefügt (= pZM8). Abbildung verändert nach Prof. A. von Schaewen.

3.2.2.1 Transformation des neuen Doppelkonstruktes pZM8

Die Pflanzensorten Xanthi, SNN und SNN::cwINV wurden mit dem Doppelkonstrukt pZM8 transformiert und die erzeugten Blattscheiben auf festes mit Plasmid-spezifischen Antibiotika versetztes Murashige-Skoog-Medium (MS-Medium) mit 2% Saccharose ausgebracht. Zur Sprossbildung enthielt das Medium die Hormone BAP (6-Benzylaminpurin) sowie NAA (1-Naphtylelessigsäure). Nach Ausbildung von Primärblättern wurden die Pflanzen auf hormonfreiem MS-Medium (2% Saccharose) steril kultiviert und über Kopfstecklinge vereinzelt. Der Transformationserfolg wurde anhand

von Western-Blot-Analysen mit Antikörpern gegen das cP2-Protein (α -H3) und der cytosolischen G6PDH (α -cyt) analog zu Scharte *et al.* (2009) überprüft. Pflanzen mit einer hohen cP2-Expression bei gleichzeitiger Drosselung der endogenen cytosolischen G6PDH-Expression wurden als Träger des Doppelkonstruktes angesehen. Die Ergebnisse der genetischen Merkmalsverteilung sind in Abbildung 35 zusammengestellt.

Insgesamt konnten 91 Transformanten für Xanthi::cP2_cytRNAi_200bp, 58 für cwINV::cP2_cytRNAi_200bp und 63 für SNN::cP2_cytRNAi_200bp regeneriert werden, von denen etwa 40% das cP2-Konstrukt überexprimierten aber nur ca. 19% die cytosolische G6PDH-Isoform reprimierten. Träger eines funktionellen Doppelkonstruktes waren letztendlich 6 Xanthi::cP2_cytRNAi_200bp, 4 SNN::cwINV::cP2_cytRNAi_200bp und 12 SNN::cP2_cytRNAi_200bp Transformanten. Zur Vereinfachung werden die Doppeltransformanten wie in Tabelle 17 aufgelistet abgekürzt.

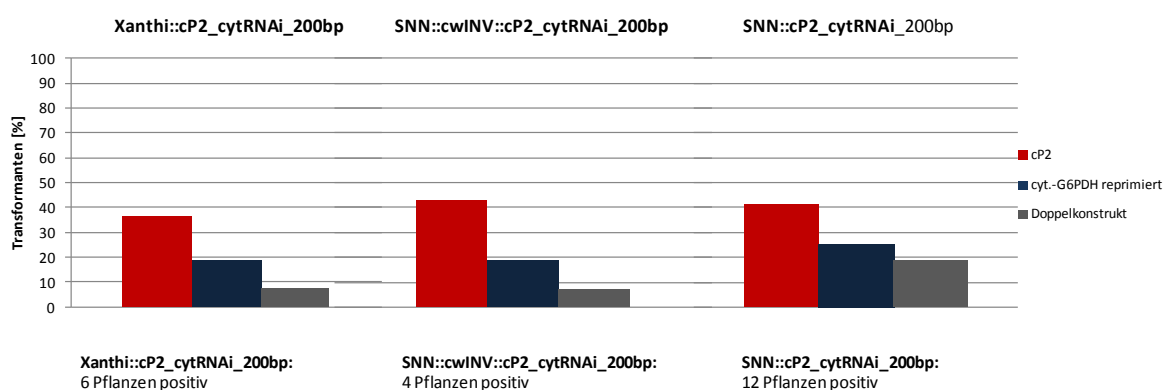


Abbildung 35: Merkmalsausprägung der Doppeltransformanten. Die regenerierten Blattscheiben der zuvor mit dem Doppelkonstrukt pZM8 transformierten Pflanzensorten SNN, Xanthi und SNN::cwINV wurden mittels Western-Blot-Analysen auf P2 und cytosolische G6PDH Signale getestet. Insgesamt wurden 91 Xanthi::cP2_cytRNAi, 58 SNN::cwINV::cP2_cytRNAi und 63 SNN::cP2_cytRNAi-Transformanten von denen 6 Xanthi::cP2_cytRNAi, 4 SNN::cwINV::cP2_cytRNAi und 12 SNN::cP2_cytRNAi das Doppelkonstrukt funktionell ausprägten. Angegeben ist die prozentuale Merkmalsausprägung bezogen auf die Gesamtanzahl regenerierter Sprosse je Pflanzensorte.

Tabelle 17: Übersicht über die Bezeichnung der erstellten Doppeltransformanten. Zur Vereinfachung werden die Doppeltransformanten abgekürzt.

Doppeltransformante	Abkürzung
Xanthi::cP2_cytRNAi_200bp	X::cP2
SNN::cP2_cytRNAi_200bp	SNN::cP2
SNN::cwINV::cP2_cytRNAi_200bp	cwINV::cP2

3.2.2.2 Charakterisierung der Doppeltransformanten X::cP2

Um die Expression des Doppelkonstruktes in den Gewebekulturpflanzen (T0) X::cP2 zu bestätigen, wurden diese mit Western-Blot-Analysen überprüft. Die Ergebnisse sind exemplarisch in Abbildung 36 zusammengefasst. Für die Analyse wurden 25 μ g Gesamt-Protein der Linien mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Zunächst wurde ein gegen die cytosolischen G6PDH-Isoformen gerichteter Antikörper (α -cyt) verwendet (Abb. 36 A). Als zweiter Antikörper wurde ein *goat-anti-rabbit* (HRP-Konjugat) der Firma Bio-Rad (München) verwendet und die Membran mit einer ECL-Lösung entwickelt. Nach Entfernung der gebundenen Antikörper erfolgte eine erneute Entwicklung der Membran mit einem Antikörper gegen die P2-Isoform (α -H3) (Abb. 36 C). Der gleichmäßig aufgetragene Proteingehalt konnte anhand der Proteinfärbung mit Ponceau S auf der Membran abgeschätzt werden (Abb. 36 B). Mit dem gegen die cytosolischen Isoformen gerichteten Antikörper konnte cytosolisches G6PDH-Protein bei den Linien #10, #13 und #17 nur sehr schwach nachgewiesen werden. Wohingegen bei der Positiv-Kontrolle Xanthi (Wt) und den anderen Linien eindeutige Signale bei 55 kDa und 110 kDa detektiert wurden.

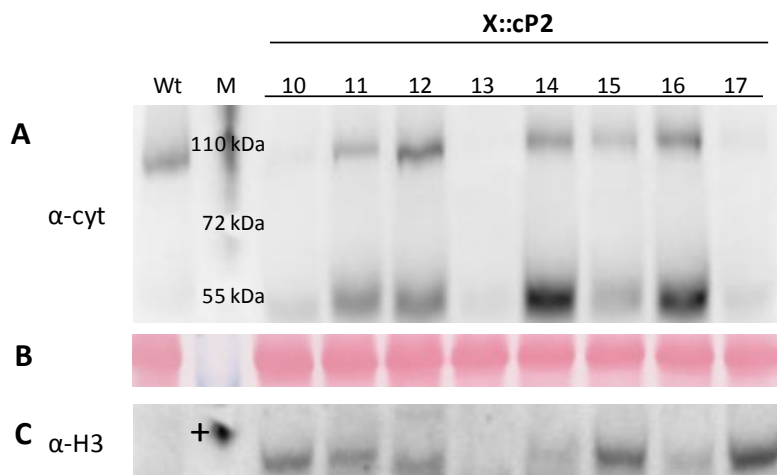


Abbildung 36: Test der funktionellen Expression des Doppelkonstruktes in den jeweiligen Transformanten durch Western-Blot-Analyse. Aufgetragen wurden je 25 μ g Gesamtprotein aus *source*-Blättern. **A** zeigt die ECL-Entwicklung des Blots mit einem spezifisch gegen die cytosolischen G6PDH-Isoformen gerichteten Antikörper (α -cyt; von Schaewen *et al.*, 1995). Cytosolisches G6PDH-Protein konnte bei den Linien #10, #13 und #17 nicht nachgewiesen werden. **B** zeigt die gleichmäßige Beladung des Gels durch Färbung der Proteine mit Ponceau S anhand der großen RubisCO-Untereinheit. **C** zeigt die ECL-Entwicklung des Blots mit einem spezifisch gegen P2-Isoformen gerichteten Antikörper (α -H3; Wendt *et al.*, 2000). Als Positiv-Kontrolle wurde dem Marker das zur Antikörperherstellung gereinigte H3-Protein beigemischt, welches einem Strep-Tag hat (+). Bis auf die Linien #13, #16 und der Negative-Kontrolle Xanthi Wt wurde cP2-Überexpression erkannt. Linien #10 und #17 zeigten sowohl cP2-Expression als auch eine gedrosselten cytosolische Proteinmenge und wurden deshalb weiter verwendet. M: Molekularmassenstandard; angegeben sind apparente Massen um 110 kDa, 72 kDa und 55 kDa (PageRuler Prestained Protein Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot).

Die cytosolische G6PDH hat ein Molekulargewicht von ca. 55 kDa, somit scheint die Bande bei 110 kDa ein Proteindimer zu sein (mündliche Mitteilung Prof. A. von Schaewen). Mit dem spezifisch gegen die P2-Isoform gerichteten Antikörper α -H3 wurde die cP2 bei fast allen Linien bis auf #13, #16 und der Negative-Kontrolle Xanthi (Wt) nicht erkannt (Abb. 36 C). Als Positiv-Kontrolle wurde dem Marker das zur Antikörperherstellung gereinigte H3-Protein, welches einem Strep-Tag hat, verwendet (Wendt *et al.*, 2000). Die X::cP2 Linien #10 und #17 zeigten sowohl cP2-Überexpression als auch gedrosselte cytosolische G6PDH-Proteinmengen und wurden deshalb als Träger eines funktionellen Doppelkonstruktes angesehen.

3.2.2.3 Interaktion zwischen *P. nicotianae* und den Doppeltransformanten X::cP2

Um die Funktionalität des Doppelkonstruktes pZM8 zu überprüfen wurden zunächst die Doppeltransformanten X::cP2 #10 und #17 auf Interaktion mit *P. nicotianae* untersucht. Zu diesem Zweck wurden Zoosporen von *P. nicotianae* in *source*-Blätter eingespritzt. Der Infektionsverlauf wurde zu dem Zeitpunkt 6 hpi mikroskopisch dokumentiert. Das Experiment sollte Aufschluss darüber geben, ob das Doppelkonstrukt die Toleranz ähnlich wie die zweifache Transformation der zuvor beschriebenen Xanthi-Pflanzen cP2(67) und cP2(83) verbessern kann. Der Zelltod wurde mit Hilfe von Propidium-Iodid am cLSM, wie in dem Kapitel 3.1.1.1 beschrieben, untersucht. Die quantitative Auswertung der Zelltodbilder ergab für den Wildtyp Xanthi die niedrigste Zelltodrate (Abb. 37). Im Vergleich dazu, war die Zelltodrate bei den Transformanten #10 und #17 ungefähr verdoppelt. Diese Beobachtung deutet indirekt auf eine schnellere und verstärkte pflanzliche Abwehr gegen das Pathogen hin.

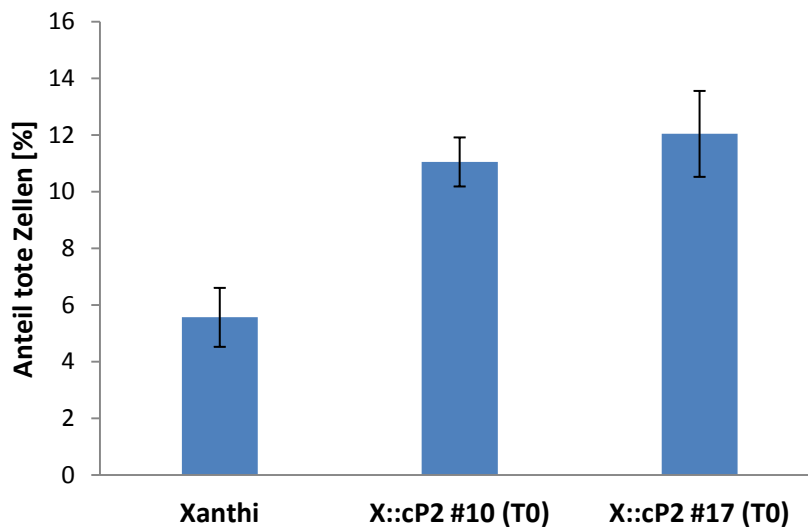


Abbildung 37: Quantitative Auswertung der cLSM-Bilder zur Bestimmung der Zelltodraten. Angegeben ist der prozentuale Anteil toter Zellen pro Bild für die Doppeltransformanten X::cP2 #10 und #17 sowie des Wildtyps (Xanthi) nach Infektion der *source*-Blätter mit *P. nicotianae* (6 hpi). Die lasermikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Anregung von 488 nm erstellt. Eine Färbung des Zellkerns oder der gesamten Zelle mit Propidium-Iodid (blaue Fluoreszenz, E: 590-650 nm) wurde als Indikation für Zelltod gewertet. Insgesamt wurden 7-12 Pflanzen je Sorte untersucht und je Pflanze 33 cLSM-Bilder aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte toter Zellen aus allen cLSM-Bildern und der Standardfehler (n = 7-12; +/- SE).

Die quantitativ verbesserte Abwehr bei den Doppeltransformanten X::cP2 der Linien #10 und #17 konnte auch makroskopisch 48 Stunden nach Interaktion zwischen *P. nicotianae* und den Transformanten beobachtet werden. Die HR-Läsionen waren am Infektionsort gut ausgeprägt, so dass das Ausmaß der Bildung von hypersensitiven Läsionen 48 Stunden nach Infektion im primären Infektionsbereich untersucht werden konnte (Abb. 38 A). Das Ausmaß der Läsionsausprägung in den Infektionsorten wurde in die Kategorien suszeptibel (keine Reaktion), intermediär (weniger als 35% nekrotisch) und resistent (35-80% nekrotisch) nach Referenzwerten eingeteilt. Die Doppeltransformanten zeigten vergleichbar starke Bildung von Läsionen. Dabei war die HR-Ausprägung stärker als bei der Mutterpflanze Xanthi.

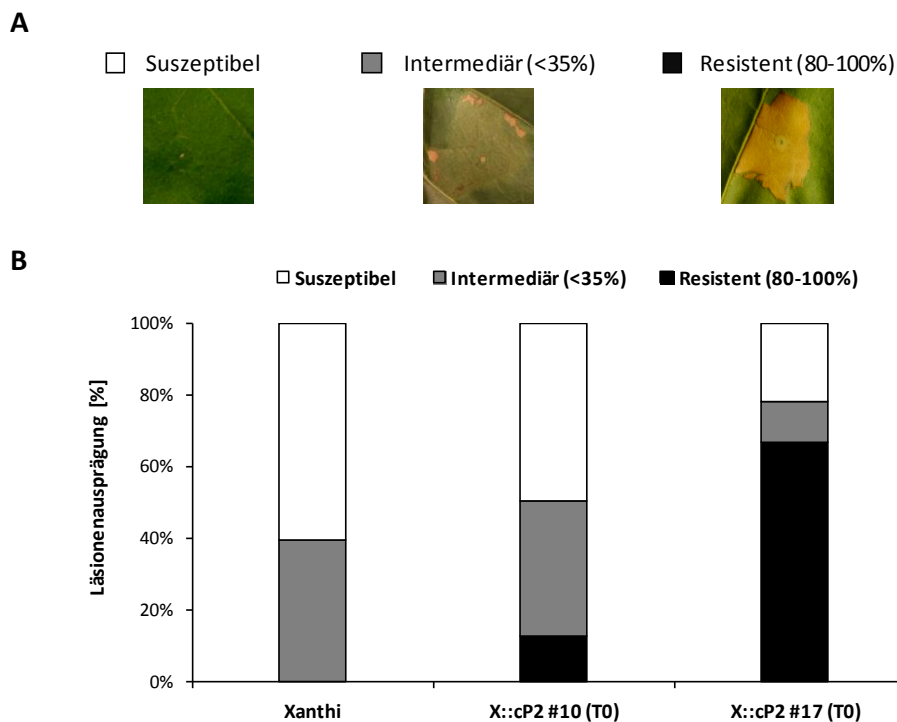


Abbildung 38: Interaktion zwischen *P. nicotianae* und den untersuchten Pflanzen. A, Referenzwerte zur vereinfachten Einteilung der HR in Kategorien nach 48 hpi. Die Qualität der Läsionen in den Infektionsorten wurde in die Kategorien suszeptibel (keine Reaktion), intermediär (weniger als 35% nekrotisch) und resistent (35-80% nekrotisch) nach Referenzwerten eingeteilt. B, HR-Läsionenausprägung bei den Transformanten X::cP2 #10 und #17 und Xanthi zum Zeitpunkt 48 hpi aus je drei unabhängigen Infektionsreihen.

Die Untersuchung zur Auswirkung der Infektion mit *P. nicotianae* an den neu erstellten Doppeltransformanten X::cP2 #10 und #17 und dem suszeptiblen Xanthi Wildtyp konnte einen signifikanten Unterschied in der Abwehrreaktion aufzeigen. Die neuen Doppeltransformanten zeigten wie die 2-fach Transformanten cP2(67) und cP2(83) eine höhere Zelltodrate und auch vollständige HR-Ausprägung im Gegensatz zu Xanthi (vergleiche mit Abb. 8). Diese Parameter sind Indizien für eine schnellere und effizientere Aktivierung der Abwehrprozesse bei den neuen Doppeltransformanten. Das Doppelkonstrukt pZM8 kombiniert somit die Eigenschaften der 2-fachen Transformation mit pZM5 und pBinAR-cytG6PD-RNAi.

3.2.3 Einfluss der zuckerhaltigen Anzucht auf den Kohlenhydratstatus bei SNN

Aus Voruntersuchungen an Tabakpflanzen wurde während dieser Arbeit bekannt, dass Saccharose-haltige Nährböden den Zuckerspiegel von Pflanzen beeinflussen. So hatte Philipp Lemke im Rahmen eines Forschungsmoduls (2013) Tabakpflanzen der Sorte SNN unterschiedlichen Anzuchtbedingungen unterzogen und die Kohlenhydratkonzentrationen

der *source*-Blätter bestimmt. Interessanterweise war der Glucosegehalt bei Pflanzen die nur auf Erde gewachsen waren am geringsten (Abb. 39). SNN-Pflanzen, die auf MS-Medium mit 2% Saccharose keimten, vier Wochen lang auf diesem Medium kultiviert wurden und dann auf Erde 6 Wochen weiterwuchsen, wiesen einen höheren Glucosegehalt auf. Diese Anzucht entsprach der laborgängigen Selektion von transgenen Tabaksamen, in diesem Fall allerdings ohne Antibiotika. Die höchste Glucosekonzentration zeigten Pflanzen, die dauerhaft (als Erhaltungskultur) bei 2% Saccharose auf MS-Medium wuchsen und bei Bedarf als Kopfsteckling in Erde übertragen wurden. Diese Pflanzen werden als Gewebekulturpflanzen bezeichnet und sind gängige Dauerkulturen in unserem Labor. Die Fructose- und Saccharosegehalte zeigten gleiche Tendenzen.

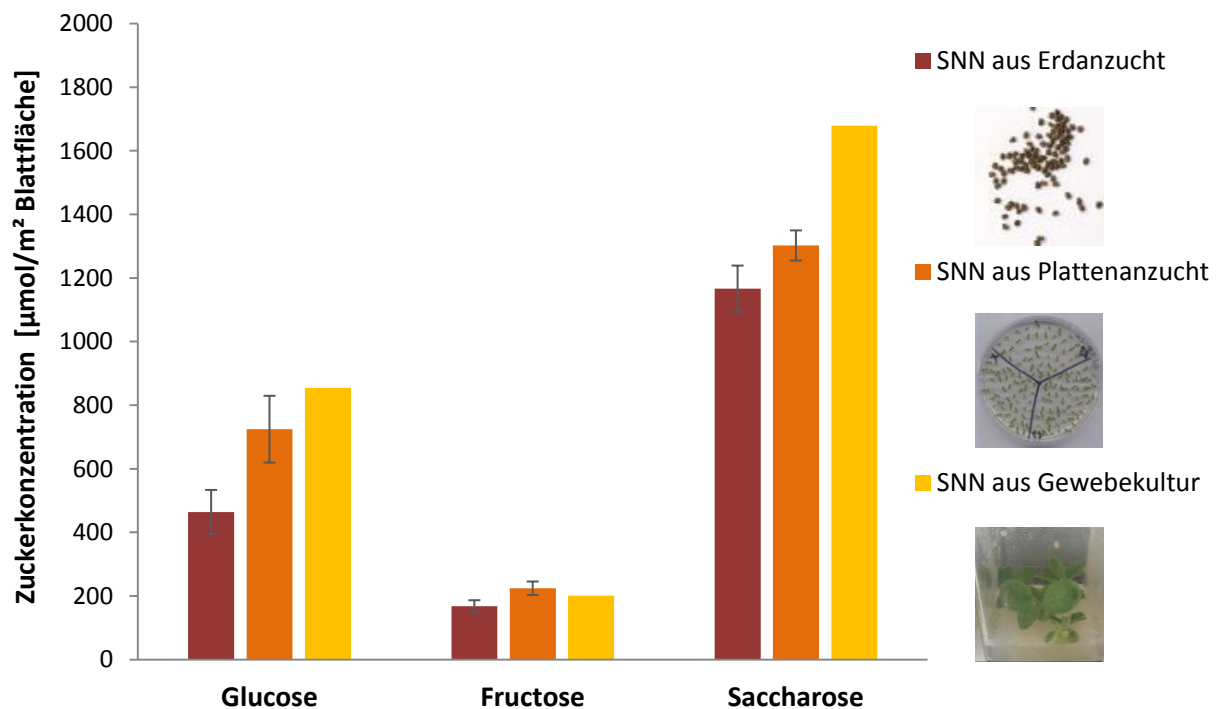


Abbildung 39: Kohlenhydratgehalte von SNN-Wildtyppflanzen aus verschiedener Anzucht. Bestimmt wurden die Konzentrationen ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) an Glucose, Fructose und Saccharose von SNN in Abhängigkeit zum Nährmedium. In rot sind SNN-Pflanzen aus Erdanzucht ($n = 5$), in orange SNN-Pflanzen ($n = 4$) aus Plattenanzucht und in gelb SNN-Pflanzen aus Gewebekultur ($n = 1$) aufgetragen. Abbildung verändert nach Philipp Lemke (2013).

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kultivierungsdauer auf zuckerhaltigem Nährmedium den Kohlenhydrathaushalt von Tabakpflanzen langfristig beeinflussen kann. Hierbei steigt die nachweisbare Kohlenhydratkonzentration der *source*-Blätter proportional zur Dauer mit der die Pflanze auf einem zuckerhaltigen Nährboden angezogen worden sind. Demzufolge

scheint es wichtig, die Anzuchtbedingung von zu vergleichenden Pflanzen aufeinander abzustimmen, um den Vergleich von Daten zu ermöglichen.

Da Zucker in einer Vielzahl von metabolischen und Signalwegen in Pflanzen beteiligt sind und als *priming*-Moleküle in der Immunantwort angesehen werden (Bolouri-Moghaddam & Van den Ende, 2012), muss die Pflanzenkultivierung auf die Fragestellung des Experimentes abgestimmt werden. Nur so können mögliche Effekte der Merkmalsausprägung in transgenen Pflanzen und nicht der Zuckerkultivierung zugeschrieben werden.

Da ein Zusammenhang zwischen Kohlenhydratstatus und Stressresistenz bekannt ist, sind auch Einflüsse der Anzuchtbedingung auf das Resistenzniveau einer Pflanze wahrscheinlich. Für die weiteren Charakterisierungen sollte der *priming*-Effekt durch Zucker minimiert werden, indem die Samen der T0-Generation nicht wie üblich auf MS-Medium mit 2% Saccharose selektioniert, sondern direkt auf Erde keimen gelassen wurden. Die Selektion erfolgte ausschließlich über Western-Blot-Analysen.

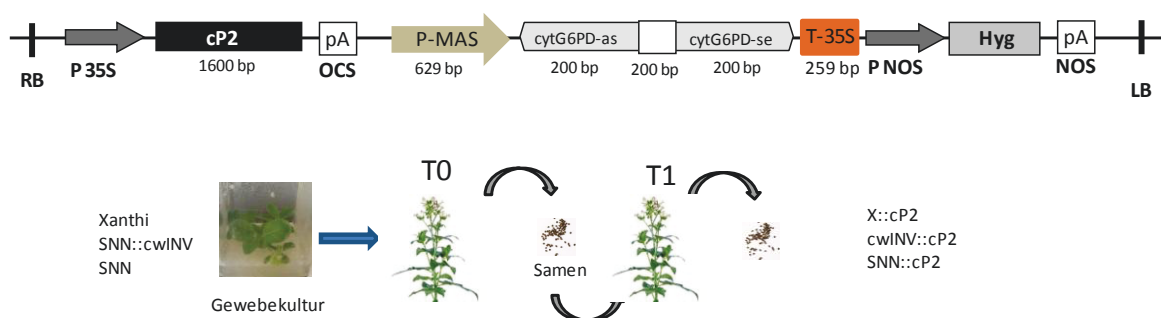


Abbildung 40: Transformation von Tabak mit dem Konstrukt pZM8. Über eine Blattscheibentransformation wurde das erstellte Doppelkonstrukt pZM8 in die Tabaksorten Xanthi und SNN stabil transformiert. Darüber hinaus wurde das Konstrukt pZM8 in die transgene Tabakpflanze SNN::cwINV transformiert. Nach erfolgter Transformation wurden die Blattscheiben auf festes mit Plasmid-spezifischen Antibiotika versetztes MS-Medium (2% Saccharose) ausgebracht. Zur Sprossbildung enthielt das Medium die Hormone BAP (6-Benzylaminpurin) sowie NAA (1-Naphtyllessigsäure). Nach Regeneration wurden die Pflanzen mit spezifischen Antikörpern anhand von Western-Blot-Analysen getestet, zur Saatgutbildung in Erde gepflanzt. Die Folgegenerationen wurden direkt auf Erde keimen gelassen und wiederum mittels Western-Blot-Analysen bonitiert.

3.3 Charakterisierung der cwINV::cP2-Doppeltransformanten

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Doppeltransformanten cwINV::cP2 der T1-Generation in Grundzügen analysiert und die Auswirkungen des Isoenzymaustausches auf den Metabolismus untersucht werden. Um zu überprüfen, ob die Pflanzen der T1-Generation das pZM8-Konstrukt tragen, wurden wie zuvor (siehe Kapitel 3.2.2.2) beschrieben Western-Blot-Analysen mit den Antikörpern gegen das cP2 und die cytosolische G6PDH durchgeführt. Abbildung 41 zeigt die Antikörperdetektion exemplarisch für einen Analysedurchgang. Die getesteten Pflanzen der Linie #1 und #11 exprimierten alle das cP2-Protein (Abb. 41 A). Mit dem spezifischen Antikörper gegen die cytosolische G6PDH-Isoformen war Protein nachweisbar, im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen cwINV und SNN war die Proteinmenge aber geringer (Abb. 41 B). Da die aufgetragene Gesamtproteinmenge (25 µg) bei allen Proben identisch war (siehe Färbung mit Ponceau S), sind die Pflanzen für cytosolische G6PDH gedrosselt. Die Pflanzen 2, 3, 4, 5, 7, 8, und 10 wurden als funktionale Träger des Doppelkonstruktes angesehen und für weitere Versuche verwendet.

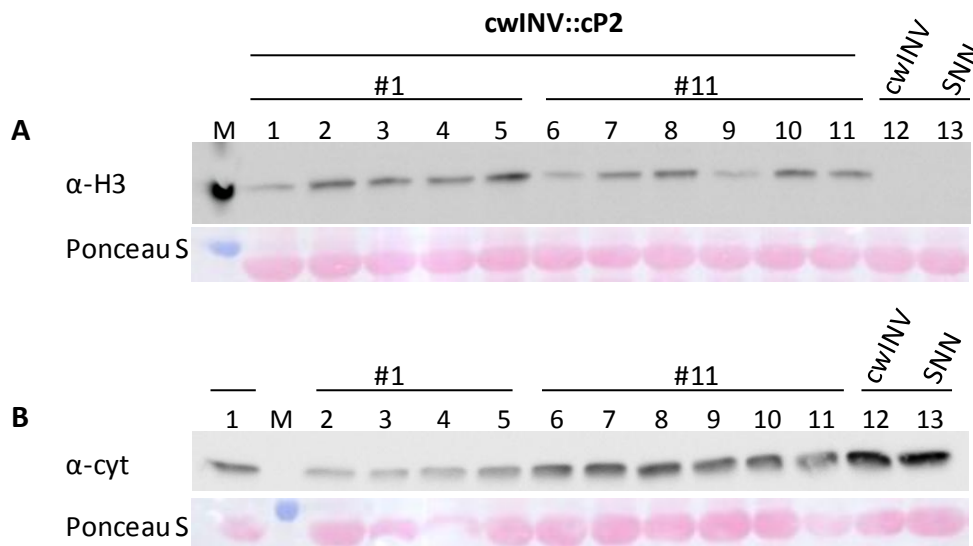


Abbildung 41: Bestätigung der Expression des Doppelkonstruktes pZM8 in den jeweiligen Transformanten durch Western-Blot-Analysen. Aufgetragen wurden je 25 µg Gesamtprotein aus *source*-Blättern. **A** zeigt die ECL-Entwicklung des Blots mit einem spezifisch gegen die P2-Isoform gerichteten Primärantikörpers (α -H3). Als Positiv-Kontrolle wurde dem Marker (M) das zur Antikörperherstellung gereinigte H3-Protein, welches einem Strep-Tag hat, zugefügt. Alle Pflanzen der Linien #1 und #11 exprimieren cP2. **B** zeigt die ECL-Entwicklung des Blots mit einem spezifisch gegen die cytosolischen G6PDH-Isoformen gerichteten Primärantikörper (α -cyt). Die cytosolische G6PDH ist im Vergleich zu den Positiv-Kontrollen SNN und cwINV in den Transformanten unterschiedlich stark gedrosselt. Die Pflanzen 2, 3, 4, 5, 7, 8, und 10 wurden als funktionelle Träger des Doppelkonstruktes angesehen und sind in weitere Versuche eingegangen. Die jeweiligen Färbungen mit Ponceau S der großen RubisCO-Untereinheit zeigen die gleichmäßige Beladung des Gels an.

3.3.1 Messung der cwINV-Aktivität

Die Zellwand-Invertase (*cell wall invertase*, cwINV) wurde in der Tabaksorte SNN reprimiert und die Enzymaktivität war in den *source*-Blättern der Transformanten SNN::cwINV bis zu 90% reduziert (Essmann *et al.*, 2008). Um zu überprüfen, ob die Transformation des Doppelkonstruktes pZM8 die cwINV-Aktivität der Pflanzen beeinflusst, sollte diese bestimmt werden. Wie aus Abbildung 42 ersichtlich, hat der Isoenzymaustausch die cwINV-Aktivität nicht signifikant beeinflusst. Die Doppeltransformanten cwINV-cP2 wiesen wie die Mutterpflanze eine gedrosselte Enzymaktivität auf.

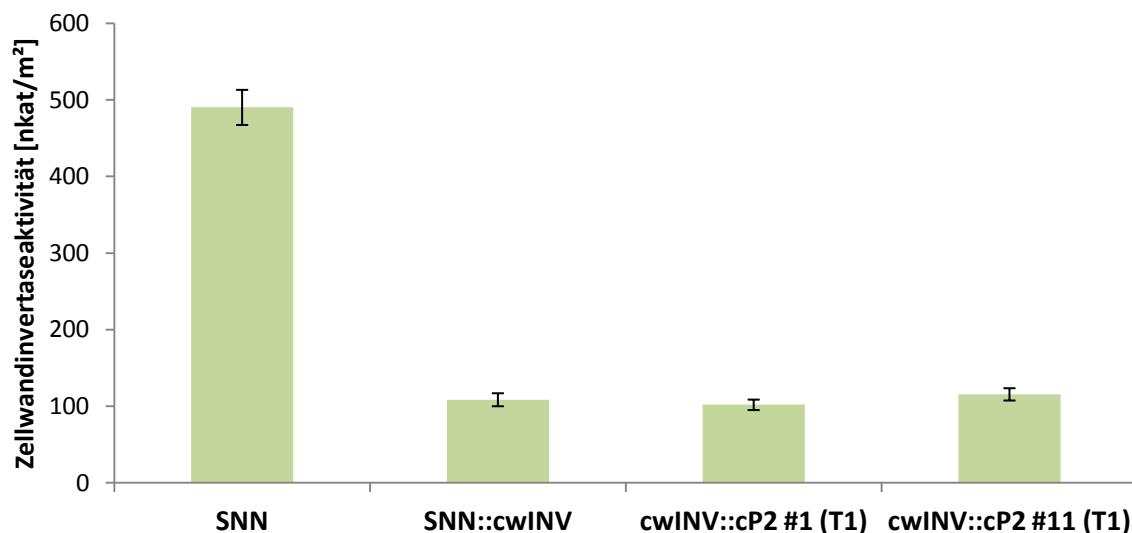


Abbildung 42: Aktivität der Zellwand-Invertase in *source*-Blättern der untersuchten Tabaksorten. Die Aktivität der cwINV in *source*-Blättern wurde bei den Transformanten cwINV::cP2 #1, cwINV::cP2 #11, SNN und SNN::cwINV bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardfehler aus 4 unabhängigen Durchgängen (n = 4; +/- SE).

3.3.2 Abwehrreaktion der cwINV-Doppeltransformanten

Die transgenen Tabakpflanzen SNN::cwINV, in denen mittels RNAi-Konstrukt die cwINV-Aktivität unterdrückt wurde, können die Infektion mit *P. nicotianae* nicht erfolgreich abwehren. Im Gegensatz zum Wildtyp SNN erfolgt die Abwehrinduktion bei SNN::cwINV verlangsamt und *P. nicotianae* bildet im Infektionsbereich Hyphen aus (Essmann *et al.*, 2008). Durch Reprimierung der cwINV wurde aus der hochresistenten Tabaksorte SNN eine suzeptible, tendenziell vergleichbar mit Xanthi. Der Isoenzymaustausch konnte die biotische und abiotische Stresstoleranz der suszeptiblen Sorte Xanthi

verbessern. Um zu überprüfen, ob der Isoenzymaustausch *per se* die Stresstoleranz erhöht, wurden erste Charakterisierungen an den cwINV-Doppeltransformanten vorgenommen. Abbildung 43 zeigt die Zelltoderate der cwINV::cP2 #11 und #1 zum Zeitpunkt 6 hpi. Die Doppeltransformanten wiesen eine deutlich erhöhte Zelltoderate als der SNN::cwINV auf. Wurden bei der Mutterlinie SNN::cwINV weniger als 15% der Zellen im Zuge der HR abgetötet, so waren es bei cwINV::cP2 #1 17% und bei cwINV::cP2 #11 22% der Zellen. Die ersten Untersuchungen zeigen somit, dass der Isoenzymaustausch nicht nur die Abwehr von Xanthi sondern auch die von SNN::cwINV gegenüber *P. nicotianae* erhöht. Weitere Abwehrparameter wie ROS-Freisetzung und Kallosebildung müssen jedoch noch folgen, um die Abwehrprozesses bei den cwINV::cP2-Linien vollständig zu dokumentieren und zu charakterisieren.

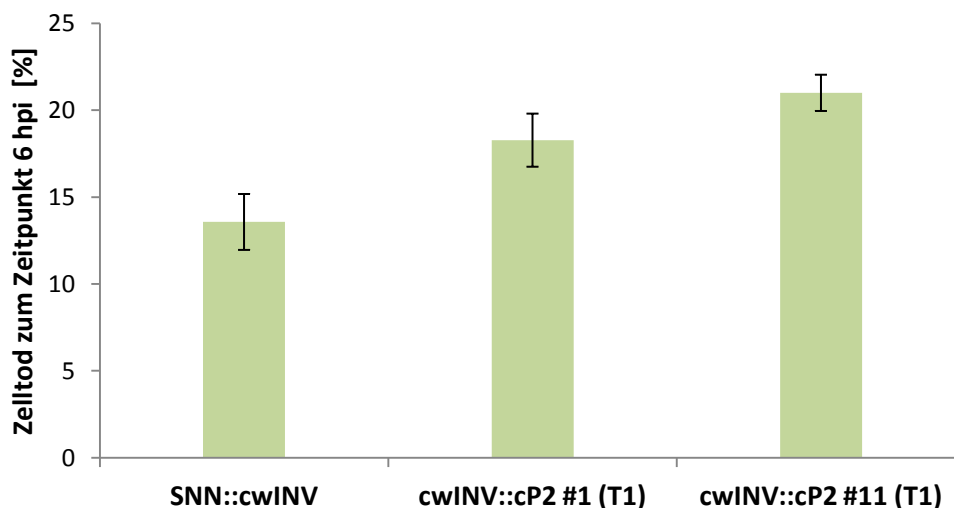


Abbildung 43: Quantitative Auswertung der cLSM-Bilder zur Bestimmung der Zelltoderate. Angegeben ist die prozentuale Anzahl toter Zellen pro cLSM-Bildausschnitt für die Transformanten SNN::cwINV, cwINV::cP2 #1 und cwINV::cP2 #11 nach Infektion der *source*-Blätter mit *P. nicotianae* (6 hpi). Die lasermikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer Anregung von 488 nm erstellt. Eine Färbung des Zellkerns oder der gesamten Zelle mit Propidium-Iodid (blaue Fluoreszenz, E: 590-650 nm) wurde als Indikation für Zelltod gewertet. Insgesamt wurden 13-30 Pflanzen je Sorte untersucht und je Pflanze 33 cLSM-Bilder aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte toter Zellen aus allen cLSM Bildern und der Standardfehler (+/- SE).

3.3.3 Anreicherung von Kohlenhydraten in den cwINV-Doppeltransformanten

Eine charakteristische Eigenschaft der cP2-Pflanzen [cP2(67), cP2(83)] war die metabolische Umsteuerung des Kohlenhydratgrundstoffwechsels (vergleiche Abb. 17). Die cP2-Pflanzen akkumulierten vor allem Glucose in ihren *source*-Blättern. Auch die Blätter der cwINV-Doppeltransformanten #1 und #11 wiesen eine hohe Glucose-

konzentration auf (Abb. 44). Sie lag bei den Linien #1 und #11 fast doppelt so hoch wie bei der Ausgangstransformante SNN::cwINV. Im Gegensatz dazu waren die Fructose- und Saccharosekonzentrationen tendenziell leicht erhöht. Die Ergebnisse festigten damit den Eindruck, dass der Zuckerstoffwechsel durch G6PDH-Isoenzymaustausch modifiziert wird. Diese Beobachtung wird besonders bei Betrachtung der Hexose/Saccharose-Verhältnisse deutlich (Abb. 45). Wie bei den ursprünglichen cP2-Pflanzen scheint die *sink*-Stärke bei den cwINV::cP2-Transformanten gegenüber der cwINV-Mutterpflanze erhöht. Leider war es bislang nicht möglich weitere Parameter wie Saccharoseexport und F2,6P₂-Gehalte zu bestimmen.

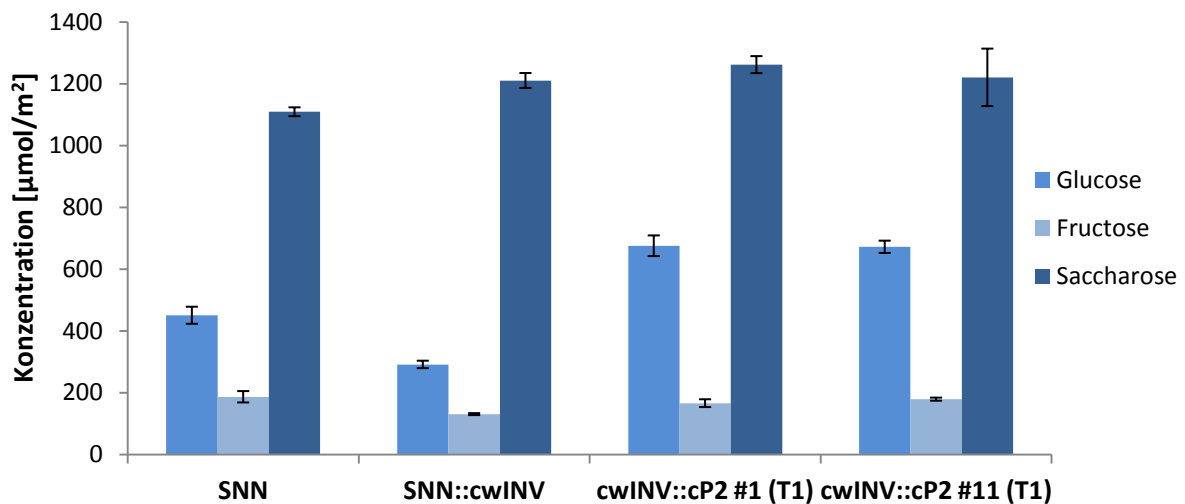


Abbildung 44: Kohlenhydratkonzentration in nicht-infizierten *source*-Blättern. Untersucht wurden der Glucose-, Fructose- und Saccharosegehalt pro Blattfläche der Linien cwINV::cP2 #1, cwINV::cP2 #11, SNN und SNN::cwINV. Angegeben ist das Mittel über den Tag aus 6 Messreihen und der Standardfehler ($n = 6$; \pm SE).

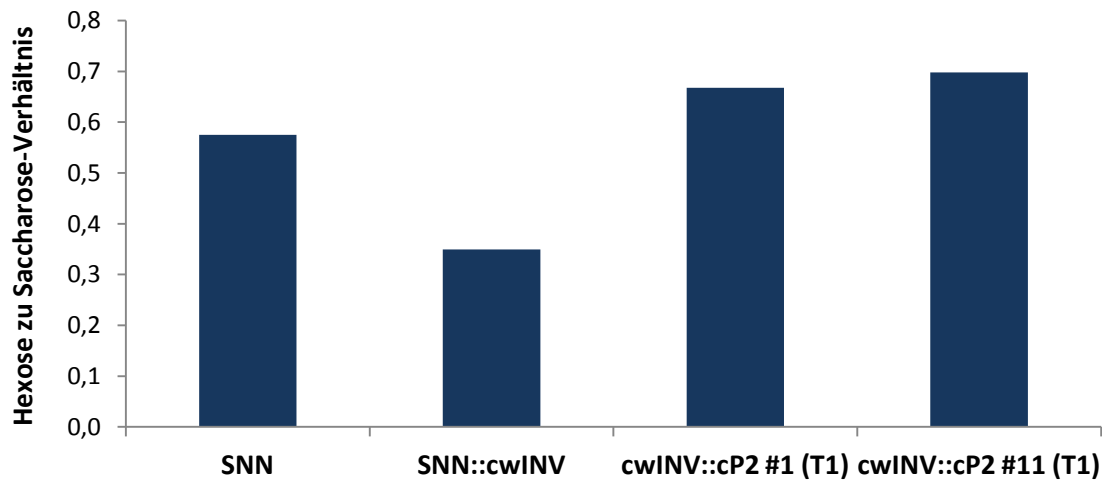


Abbildung 45: Berechnung der *sink*-Stärke von *source*-Blättern der untersuchten Tabakpflanzen. Angegeben ist die *sink*-Stärke für cwINV::cP2 #1, cwINV::cP2 #1 und SNN::cwINV. Diese wurde aus dem Verhältnis von Hexosen zu Saccharose (siehe Abb. 44) bestimmt. Je höher der Wert desto höher die *sink*-Aktivität.

3.4 Charakterisierung der SNN::cP2-Doppeltransformanten

Die Transformation der resistenten Wildtypsorte SNN mit dem neuen Doppelkonstrukt sollte Aufschluss darüber geben, ob die Resistenz der Pflanze durch den G6PDH-Isoenzymaustausch noch weiter erhöht werden kann. In Abbildung 46 sind die ermittelten Zelltodraten dargestellt. Der cytosolische G6PDH-Isoenzymaustausch in der Tabaksorte SNN führte sechs Stunden nach Infektion der transformierten Linie SNN::cP2 zu einer ca. 15%igen Erhöhung der Zelltodrate im Vergleich zum SNN (Abb. 46). Vergleicht man diese Steigerungsrate des SNN::cP2 mit der des Xanthi::cP2(67), so lässt sich ebenfalls eine 15%ige Erhöhung der Zelltodrate feststellen. Hierdurch kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol die biotische Stresstoleranz generell erhöhen kann.

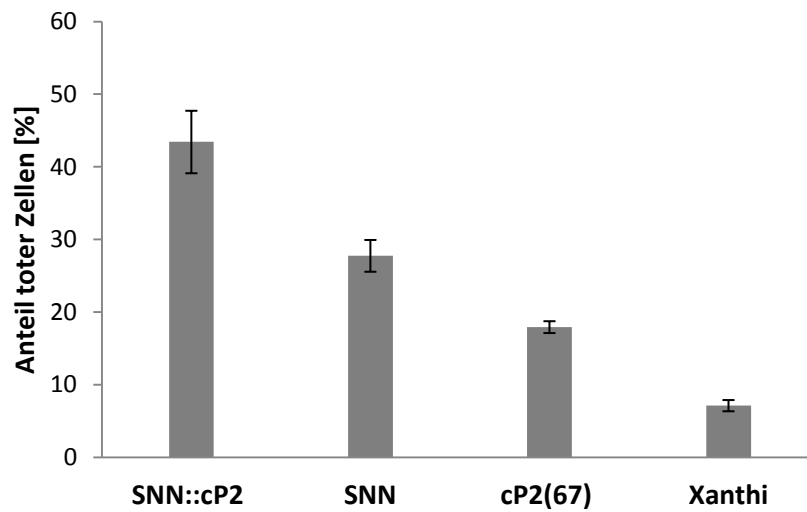


Abbildung 46: Bestimmung der hypersensitiven Zelltodrate der untersuchten Tabakpflanzen. Angegeben ist die prozentuale Anzahl toter Zellen pro cLSM-Bildausschnitt für die Transformanten SNN::cP2, cP2(67) und den Wildtypen SNN sowie Xanthi nach Infektion von *source*-Blättern mit *P. nicotianae*. Als Grundlage dienten wie in Abb. 6 exemplarische dargestellte lasermikroskopischen Aufnahmen. Insgesamt wurden 6 Pflanzen je Pflanzensorte untersucht und je Pflanze 33 cLSM-Bilder aufgenommen. Dargestellt sind die Mittelwerte toter Zellen aus 6 unabhängigen Messreihen aus allen cLSM-Bildern und der Standardfehler ($n = 6$; \pm SE).

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bekräftigten die Bedeutung der cytosolischen G6PDH-Aktivität und damit des cytosolischen OPPs für die pflanzliche Stresstoleranz. Durch einen Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol kam es zu einer Erhöhung der abiotischen sowie der biotischen Stresstoleranz in *source*-Blättern und keimenden Samen (siehe Ergebnisse). Diese erhöhte Stresstoleranz geht mit einem veränderten Grundstoffwechsel (konstitutiv aktivierten OPP, höhere Prolinkonzentration, Zucker- und Stärkegehalte, sowie erhöhte *sink*-Stärke etc.) einher. Im Folgenden sollen nun die Ursachen und Auswirkungen dieser Änderungen auf die Stresstoleranz und die Biomasseproduktion der Tabakpflanzen diskutiert werden.

4.1 Veränderungen im Grundstoffwechsel von Tabakblättern und Samen nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch kommt es im Cytosol der Pflanze zu einem konstitutiv aktivierten OPP, wie Messungen der photosynthetischen Induktion nach einer Dunkelphase zeigten (Scharte *et al.*, 2009 und Abb. 21). Diese Daten korrelieren mit Messungen der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz und der Metabolitkonzentrationen von G6P und 6PG an cP2-Pflanzen (Scharte *et al.*, 2009). Mit dieser Arbeit konnte somit gezeigt werden, dass diese Veränderungen über mehrere Generationen stabil bleiben. Durch diese konstitutive OPP-Steigerung sollte den Tabak-cP2-Linien *per se* mehr NADPH zur Verfügung stehen. NADPH ist ein wichtiger Co-Faktor für Elektronentransportwege und anabolische Biosyntheseprozesse (Potters *et al.*, 2010). Es fungiert u.a. als Elektronendonator für die Lipidsynthese und könnte somit die **erhöhte Lipidkonzentration** in den Samen der cP2-Linien (siehe Abb. 28) erklären. In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen OPP bzw. G6PDH, der NADPH-Konzentration und der pflanzlichen Fettsäuresynthese (Übersicht in Rawsthorne, 2002).

NADPH kann als wichtiger Co-Faktor das Redox-Gleichgewicht der pflanzlichen Zelle beeinflussen. Eine Verschiebung des NADP/NADPH-Verhältnisses in Richtung NADPH kann kritisch für die apoplastidäre ROS-Produktion, für das Redox-Gleichgewicht und für zahlreiche NADPH-abhängige Enzyme sein (Zhang *et al.*, 2009; Takahara *et al.*, 2010; Dietz & Pfannschmidt, 2011). Die Synthese von Prolin unter Verbrauch von NADPH in Chloroplasten oder im Cytosol kann das Ungleichgewicht des Redox-Gleichgewichtes

ausgleichen und nimmt daher eine wichtige Komponente im Redox-Gleichgewicht ein (Verslues & Sharma, 2010). Die gemessene Prolinzunahme in den cP2-Transformanten (Abb. 24) ist deshalb wahrscheinlich nicht nur eine Konsequenz der gesteigerten NADPH-Verfügbarkeit, sondern auch ein Ventil für die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichtes der Pflanzen. Prolin hat für die Regulation des NADPH/NADP-Verhältnisses und somit für das Redox-Gleichgewicht in pflanzlichen Zellen eine wichtige Rolle (Sharma *et al.*, 2010).

Ein weiterer Mechanismus zur Steuerung der Redox-Homöostase könnten NADPH-Oxidasen an der Tonoplastenmembran sein. Zusätzlich zur Plasmamembran postulieren Proteomstudien auch NADPH-Oxidasen am Tonoplasten, die das cytosolische NADPH in der Vakuole zu Superoxid umsetzen und somit die NADPH-Konzentration im Cytosol regulieren können (Übersicht in Keunen *et al.*, 2013).

Doch nicht nur NADPH als Produkt des OPPs müsste in den cP2-Pflanzen konstitutiv erhöht sein, sondern auch das Substrat für diesen Reaktionsweg in Form von löslichen **Kohlenhydraten**, besonders Glc (siehe Abb. 17; Abb. 18; Abb. 44). Es konnte gezeigt werden, dass die *source*-Blätter der cP2-Pflanzen mehr lösliche Zucker wie Glc, Frc und Saccharose in ihren Blättern und Samen akkumulieren, als die entsprechenden Mutterpflanzen (Abb. 17, Abb. 44). Dies führte unter anderem zu einer Erhöhung der *sink*-Stärke (Hexose/Saccharose-Verhältnis). Mögliche Quellen für diese erhöhten Kohlenhydratkonzentrationen in den *source*-Blättern könnte die um ca. 5-10% gesteigerte Kapazität der **Photosynthese** (Abb. 22) in Verbindung mit einer **Reduktion der Saccharoseexportes** um ca. 15% (Abb. 19) sein. Eine Reduktion des Saccharoseexportes, z.B. durch sogenanntes *cold girdling* von Petiolen oder durch eine Verringerung der Anzahl an Saccharose-Transportern, korrelierte in der Regel mit einer Reduktion der Photosynthese (Riesmeier *et al.*, 1994; Krapp & Stitt, 1995; Bürkle *et al.*, 1998; Zhang & Turgeon, 2009). Zusätzlich reprimieren hohe Gehalte an löslichen Zuckern über das sogenannte *sugar sensing* die assimilatorische Genexpression, z.B. für die Photosynthese sowie das Wachstum der Pflanzen (Rolland *et al.*, 2006; Sheen, 1990; Paul & Pellny, 2003; Stitt *et al.*, 2010). Keines dieser Phänomene konnte in den cP2-Pflanzen nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass die Zucker an Orten gespeichert werden, von wo sie keinen Einfluss auf die Genregulation nehmen können. Eine Zucker-vermittelte Signalweiterleitung erfolgt über Hexokinasen (Rolland *et al.*, 2006). So sind z.B.

Hexokinase-Isoformen, die u.a. an der Weiterleitung von Zucker-induzierten Signalen beteiligt sind, im Cytosol, Kern, Chloroplastenstroma und an der Mitochondrienmembran lokalisiert (Olsson *et al.*, 2003; da Silva *et al.*, 2001; Giese *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2009). Damit scheiden diese Orte für die vermutete Zuckerspeicherung aus. Als Speicher oder Zwischenspeicher in photosynthetisch aktiven Blättern könnte noch die **Vakuole** dienen. So haben Tabakblätter das Potenzial bis zu 98% der Monosaccharide Glc und Frc temporär in die Vakuole einzulagern (Heineke *et al.*, 1994; Martinoia *et al.*, 2000). Dabei erfolgt der Import und Export über Tonoplast-Monosaccharid-Transporter (TMT) und vakuoläre Glucose-Transporter (VGT) (Wormit *et al.*, 2006; Aluri & Büttner, 2007). Über diese werden Monosaccharide wie Glc und Frc im Austausch mit Protonen in die Vakuole transportiert (Wingenter *et al.*, 2010). Neue Studien belegen auch einen Transport von Saccharose über den TMT. Interessanterweise konnte durch TMT-Überexpression in Arabidopsis die Transport-aktivität nachweislich gesteigert werden, was zu einem Zuckeranstieg in der Vakuole führte (Schulz *et al.*, 2011). Die Saccharose könnte dann innerhalb der Vakuole noch durch vakuoläre Invertasen in Hexosen gespalten werden. Hierzu gibt das gemessene Glc/Frc-Verhältnis von über 3 (Abb. 17) in den cP2-Linien einen weiteren Hinweis. Ein 1:1 Verhältnis würde auf die Aktivität von Zellwand-Invertasen hinweisen. Die Spaltung von Saccharose im Cytosol würde zu einer 5- bis 40-fachen Anhäufung von Frc und Glc führen. Bei der Aktivität von vakuolären Invertasen findet man aber nur eine 2- bis 4-fache Anreicherung von Glc (Sonnewald *et al.*, 1991). Das vorhandene Glc/Frc-Verhältnis in den *source*-Blättern der cP2-Linien von 3 deutet auf eine maßgebliche Beteiligung vakuolärer Invertasen hin. Somit scheint es bei den cP2-Transformanten zu einem verstärkten Import von Saccharose in die Vakuole und einer partiellen Spaltung von Saccharose mit anschließender Speicherung, auch in Form von Hexosen in der Vakuole zu kommen.

Die Akkumulation von **Fructose-2,6-bisphosphat (F2,6P₂)** (Abb. 20) ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol zu einer massiven Verschiebung im Kohlenhydrathaushalt und des *source/sink*-Verhältnis führt. F2,6P₂ ist ein zentraler Regulator des anabolischen und katabolischen Kohlenhydratstoffwechsels und nimmt eine regulatorische Schlüsselrolle im primären Kohlenhydrathaushalt aller eukaryotischer Lebewesen ein (Schaffingen, 1987). In Pflanzen koordiniert F2,6P₂ die Balance von Saccharosesynthese, Glykolyse und Stärkesynthese in photosynthetischen

Zellen, indem es regulatorischen Einfluss auf die Umwandlung von F1,6P₂ und F6P ausübt (Stitt *et al.*, 1987). Dabei können bereits geringe Konzentrationsänderungen dieses Metaboliten den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussen, um auf metabolische Schwankungen schnell reagieren zu können. (siehe Einleitung 1.4). In den cP2-Linien war die F2,6P₂-Konzentration in *source*-Blättern ungefähr verdoppelt (Abb. 20), was auf eine grundlegende Umsteuerung des Stoffwechsels hindeutete. Die Konzentration an F2,6P₂ wird vielfach reguliert. Unter anderem wird die Konzentration an F2,6P₂ über 6-Phosphogluconat (6PG) und über die Hemmung der F2,6BPase reguliert (siehe Einleitung 1.4.1). Eine Erhöhung des 6PG-Gehaltes nach G6PDH-Isoenzymaustausch wurde für die ursprünglichen Linien cP2(67) und cP2(83) bereits gezeigt (Scharte *et al.*, 2009). Somit könnte sich in den cP2-Linien der Kreis zwischen konstitutiv aktiviertem OPP im Cytosol und resultierenden Effekten im Kohlenhydratstoffwechsel (wie erhöhte *sink*-Stärke und Konzentration an Kohlenhydraten) schließen. Eine vergleichbare Erhöhung der F2,6P₂-Konzentration in *source*-Blättern der Tabaksorte SNN wurde auch während der erfolgreichen Pathogenabwehr von *P. nicotianae* gefunden (J. Scharte, unveröffentlichte Daten). Im Zuge dessen kam es auch zu einer *source/sink*-Umsteuerung (Scharte *et al.*, 2005; Scharte *et al.*, 2009).

4.2 Erhöhung der Stresstoleranz in Tabak nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol zu einer Erhöhung von sowohl abiotischer als auch biotischer Stresstoleranz in Blättern und Samen der Tabaksorte Xanthi führt (siehe Ergebnisse 3.1.1 und 3.1.2). Im Folgenden soll die zentrale Funktion des cytosolischen OPPs im komplexen Netzwerk aus Signalstoffen und Stoffwechselwegen während der pflanzlichen Stressantwort diskutiert werden. Dadurch soll deutlich werden, welche Vorteile der Isoenzymaustausch der cytosolischen G6PDH und die damit verbundenen Veränderungen im Grundstoffwechsel (u.a. erhöhte Kohlenhydrat-, Prolin-, NADPH-Konzentrationen, *sink*-Stärke; siehe auch 4.1) für die pflanzliche Stressantwort *per se* hat.

In Tabak korreliert eine erfolgreiche Abwehr gegen das hemibiotrophe Pathogen *P. nicotianae* mit einem zweiphasigen Anstieg der cytosolische G6PDH-Aktivität (Scharte *et al.*, 2005). Hemmt man entweder die NADPH-Oxidase oder die G6PDH, wird die Bildung

von ROS und die HR verhindert (Scharte *et al.*, 2009). Diese Befunde unterstreichen, dass die Oxidation von cytosolischen Hexosephosphaten eine maßgebliche Quelle zur NADPH-Bereitstellung für die NADPH-Oxidasen an der Plasmamembran ist (Pugin *et al.*, 1997), welche wiederum maßgeblich an der Produktion von ROS im Apoplasten beteiligt sind. Auch durch RNAi-Drosselung der NADPH-Oxidase in *Nicotiana benthamiana* wurden die transgenen Pflanzen suzeptibler gegenüber dem Oomyceten *Phytophthora infestans* und die HR blieb aufgrund der geringeren ROS-Produktion aus (Yoshioka *et al.*, 2003).

Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch wird die Verfügbarkeit an NADPH so erhöht, dass es in den cP2-Pflanzen zu einer verstärkten ROS-Produktion während des biotischen Stresses kam (Abb. 12; Abb. 13). Dabei ist der frühe Anstieg an ROS in den Xanthi::cP2-Linien während der Interaktion mit *P. nicotianae* vergleichbar mit dem ROS-Anstieg in der resistenten Tabaksorte SNN (Abb. 12). Die frühe ROS-Produktion wird u.a. für eine effektive und schnelle Signalweiterleitung verantwortlich gemacht (Levine *et al.*, 1994) und könnte einer der Gründe für die erhöhte biotische Resistenz der Pflanzen sein. Aber auch ein zweiter ROS-Anstieg im späteren Verlauf der Pathogeninteraktion ist nach G6PDH-Isoenzymaustausch verstärkt (Scharte *et al.*, 2009) und könnte unmittelbar mit der erhöhten Rate des hypersensitiven Zelltodes in den Xanthi::cP2-Linien korrelieren (Abb. 8).

ROS sind u.a. in die Redox-abhängige Koordination der SA-abhängigen Abwehrprozesse über den Transkriptionsfaktor NPR1 involviert (Dong, 2004). NPR1 wandert, in Abhängigkeit des Hormons SA und vom Redox-Status im Cytosol, in den Nukleus ein (Tada *et al.*, 2008; Despres *et al.*, 2003). NPR1 interagiert dort als Co-Faktor mit TGA-Transkriptionsfaktoren und induziert die PR-Genexpression bzw. die Expression von SAR-Genen (Despres *et al.*, 2003; Fu *et al.*, 2012). Die SA-Synthese kann in Pflanzen über zwei Wege erfolgen, den Isochorismat-Weg, vermittelt durch die Isochorismat-Synthase, und den Phenylpropanoid-Weg mit dem Enzym Benzoat-2-Hydroxylase (Wildermuth *et al.*, 2001; Strawn *et al.*, 2007). Beide Synthesewege benötigen Chorismat aus dem Shikimatweg, welcher wiederum von Ery-4-P aus dem OPP gespeist wird. Hier könnte ein weiterer Vorteil der cP2-Linien liegen, da der konstitutiv ablaufende OPP in den Transformanten den Shikimatweg effizienter mit Ery-4-P und NADPH versorgen kann. Somit steht mehr Chorismat für die SA-Synthese bereit. Ein Hinweis darauf ist, dass die Expression der Chitinase PR-Q, ein SA-induziertes PR-Protein der PR-3 Klasse, nach

Infektion in den Xanthi::cP2-Linien ansteigt (Scharte *et al.*, 2009). Die über den OPP regulierte Synthese des Hormons SA scheint eine wichtige Rolle bei der biotischen Abwehr im Tabak-Phytophthora-Pathosystem zu spielen, da die SA-Konzentration nach Infektion in der resistenten Sorte SNN steigt, nicht jedoch in der suszeptiblen Sorte Xanthi (J. Scharte, unveröffentlichte Daten). Die Konzentration an SA ist in den cP2-Linien aber nicht *per se* erhöht (Abb. 23).

SA wiederum steht in einem engen Zusammenspiel mit ROS (Vlot *et al.*, 2009). So aktiviert z.B. H₂O₂ die Benzoat-2-Hydroxylase, welche aus Benzoat-Intermediaten SA generiert (Leon *et al.*, 1995). Dies könnte bedeuten, dass der erste, frühe ROS-Anstieg in SNN und in den cP2-Linien (Abb. 12) zur Pathogen-induzierten Synthese von SA und somit zur Resistenz beitragen könnte. Auf der anderen Seite kann SA wiederum die ROS-Freisetzung durch eine Repression der ROS-Entgiftungsenzyme verstärken. So werden z.B. Katalase aus Tabakblättern (Chen *et al.*, 1993) und die cytosolische APX (Dempsey *et al.*, 1999) von SA inhibiert. Das könnte den zweiten, massiven ROS-Anstieg, nach Infektion von SNN und den Xanthi::cP2-Linien (Scharte *et al.*, 2009), erklären, der dann zum hypersensitiven Zelltod führt.

Die G6PDH spielt aber nicht nur während der biotischen, sondern auch während der abiotischen Stressantwort eine wichtige Rolle (siehe auch Einleitung 1.2.2). Zum einen haben auch hier ROS zentrale Funktionen im Signalnetzwerk (Golldack *et al.*, 2014) und dort enthaltene Zitierungen), so dass die cP2-Linien auch während abiotischem Stress von NADPH-abhängigen, verstärkt produzierten ROS profitieren können. Zusätzlich ist die cytosolische Isoforme G6PD6 *in vivo* Interaktionspartner von Stress-aktivierten Protein-kinasen (ASK α) und könnte somit ein wichtiger Regulator während oxidativem Stress in Arabidopsis sein (Dal Santo *et al.*, 2012).

Neben der Produktion von ROS spielt die G6PDH aber auch eine entscheidende Rolle bei der Entgiftung dieser reaktiven Stoffe, indem sie u.a. den Ascorbat-Glutathion-Zyklus in Chloroplasten und die cytosolische Glutathionbildung mit NADPH versorgt (Foyer *et al.*, 1991; May *et al.*, 1998). NADPH kann Glutathion (GSH) über die Glutathion-Reduktase (GR) reduzieren, so dass reduziertes GSH als Redox-Puffer in Pflanzen fungieren kann und die Redox-Homöostase in der Stressabwehr steuert (Noctor & Foyer, 1998; Foyer & Noctor, 2005). Die GR ist überwiegend im Chloroplastenstroma aber auch im Cytosol und in den Mitochondrien lokalisiert (Edwards *et al.*, 1990). Auch Wang *et al.* (2008)

postulierten einen Zusammenhang zwischen der G6PDH-Aktivität und dem GSH-Gehalt bei der Abwehr von oxidativem Stress. Die G6PDH-Aktivität erhöht dabei die intrazelluläre GSH-Konzentration, die wiederum den ROS-Gehalt verringert. Durch die vermehrte Bildung von NADPH könnte die Regeneration von GSH aus oxidiertem Gluthation (GSSG) in den cP2-Linien unter Stress beschleunigt sein (siehe Abb. 47). Bei Arabidopsis resultierte die Ausschaltung der cytosolischen G6PDH-Isoform G6PD6 in einer Verschiebung des GSSG/GSH-Verhältnisses nach Salzbehandlung. Die Transformanten konnten GSSG, wahrscheinlich aufgrund verringerter NADPH-Bildung, nicht mehr zu GSH reduzieren, so dass der intrazelluläre Redox-Status gestört wird (Dal Santo *et al.*, 2012).

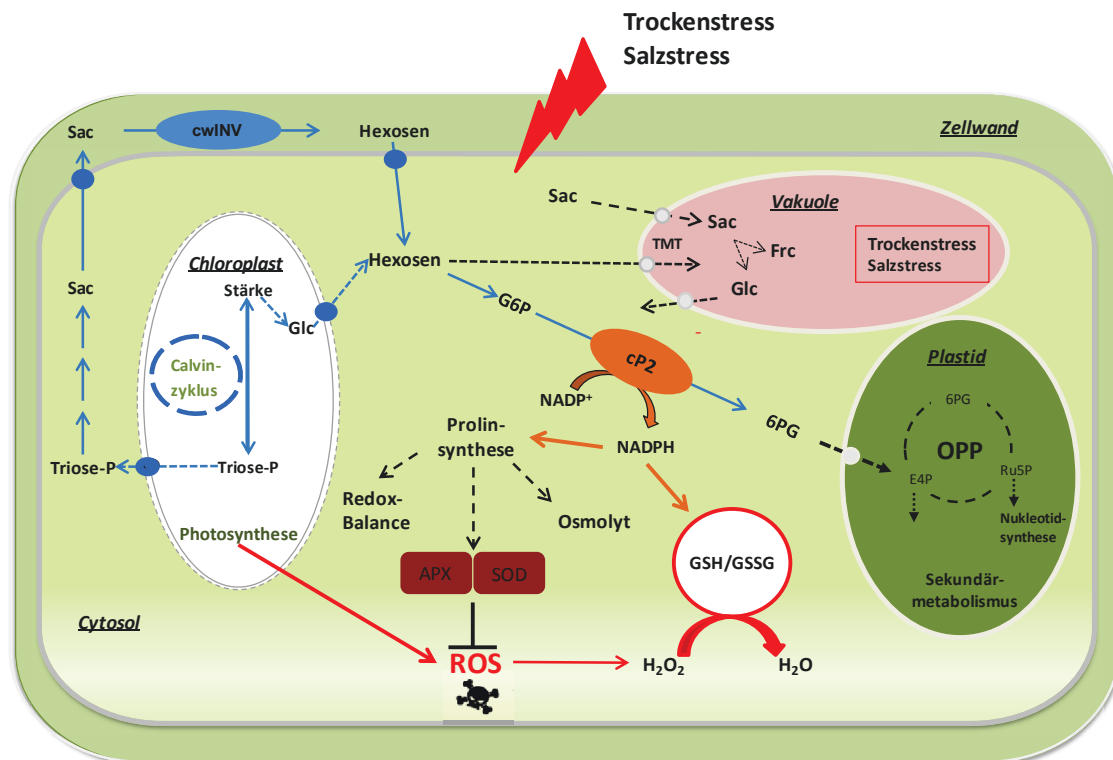


Abbildung 47: Modell zur Erhöhung der Trocken- und Salzstresstoleranz nach G6PDH-Isoenzym-austausch im Cytosol. In den cP2-Linien könnte durch die vermehrte Bildung von NADPH durch die cp2 zum einen die Regeneration von Gluthation (GSH) aus oxidiertem Gluthation (GSSG) unter Stress beschleunigt sein. Auch die im Grundzustand gesteigerte Prolinsynthese könnte zur gesteigert Stresstoleranz beitragen, indem der schädliche ROS-Gehalt verringert würde. Die *per se* erhöhten Prolin- und auch Zuckerkonzentrationen in den cP2-Transformanten könnten das Wasserpotential aufrecht erhalten, die ROS-Entgiftungsenzyme SOD und APX positiv stimulieren und somit einer Schädigung des Gewebes vorbeugen. Auch die Zucker [u.a Glucose (Glc), Fructose (Frc) und Saacharose (Sac)] in der Vakuole könnten als ROS-Fänger und Energiequelle für ROS-Entgiftungswege dienen sowie die Tonoplastenmembran stabilisieren. Erweiterung der Abb. 5, um die in der Arbeit vorliegenden Ergebnisse und Einordnung in die Literatur (F2,6P₂ hier nicht berücksichtigt).

Neben einer erhöhten abiotischen Stressresistenz der Blätter (Abb. 14) und der gesamten Pflanze (Scharte *et al.*, 2009), zeigt das Saatgut der cP2-Linien eine erhöhte Keimungsrate unter Stressbedingungen wie Trockenheit und erhöhten NaCl-Konzentrationen (Abb. 15; Abb. 16). Das deutet darauf hin, dass die G6PDH-abhängige Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase auch hier eine essentielle Rolle spielt und den cP2-Linien einen Vorteil verschaffen kann, zumal eine gestörte Redox-Homöostase in jungen Keimlingen das Wachstum begrenzt (Bailly *et al.*, 2008).

In einer neuen Studien von Kurotani *et al.* (2015) wurde gezeigt, dass eine Reduzierung der Jasmonsäurekonzentration (JA-Konzentration) die Salztoleranz von Reiskeimlingen erhöht. JA wird enzymatische durch Enzyme der Genfamilie Cyt P450 zum inaktiven 12OH-JA-Ille umgewandelt (Heitz *et al.*, 2012). Eine Überexpression dieser JA-degradierenden Enzyme erhöhte die 12OH-JA-Ille-Konzentration in den transgenen Reiskeimlingen und erhöhte deren abiotische Stressresistent. Diese Ergebnisse ließen den Rückschluss zu, dass bioaktive JA einen negativen Effekt auf die Vitalität der Keimlinge unter Salzstressbedingungen hat und die Manipulation des JA-Stoffwechsels Reis eine erhöhte Salztoleranz verleiht (Kurotani *et al.*, 2015). Interessanterweise war die Konzentration von inaktivem 12OH-Ja-Ille sowohl bei den Xanthi als auch bei den cP2-Pflanzen cP2(67) und cP2(83) in den Blättern erhöht und deren Keimungsrate bei Salzstress verbessert. Derzeit ist jedoch unklar, ob und wie JA-Signale mit Salz-abhängigen Signalwegen interagieren und ob Wechselwirkungen zwischen diesen Signalwegen bestehen (Kurotani *et al.*, 2015).

Neben einer erhöhten ROS-Freisetzung durch NADPH-Oxidasen könnten die erhöhten cytosolischen NADPH-Gehalte auch noch anderweitig zu Signalprozessen in den cP2-Linien beitragen. Obwohl der genaue Mechanismus von NAD(P)(H)-assoziierten Signalen in Pflanzen noch unklar ist (Noctor, 2006), korrelieren NAD(P)H-Status und pflanzliches Wachstum miteinander (Wallström *et al.*, 2014). Zusätzlich wurde sowohl in Tabak als auch in Arabidopsis ein Zusammenspiel von NADP(H)-Gehalt und Zuckermetabolismus beobachtet (Liu *et al.*, 2009; Wallström *et al.*, 2014), welches im Zusammenhang mit den konstitutiv erhöhten Kohlenhydratgehalten der cP2-Linien interessant sein könnte. Die Verbindung von Zuckern und oxidativem Stress scheint allerdings sehr komplex zu sein, da sowohl niedrige als auch hohe Zuckergehalte eine ROS-Bildung auslösen können (Übersicht in Couee *et al.*, 2006).

Der konstitutiv erhöhte Gehalt an löslichen Zuckern und die konstitutiv erhöhte *sink*-Stärke in den cP2-Linien (siehe Abb. 17; Tab. 16) könnten auf mehreren Wegen die pflanzliche Stressreaktionen und Stresstoleranz unterstützen. Zum einen können die Zucker im Sinne des *sugar sensing* am Stress-Signalnetzwerk beteiligt sein, zum anderen können sie ein hohes Maß an Energie bereitstellen, die für viele Stressreaktionen benötigt wird. So ist z.B. die Abwehr-induzierte Kallosebildung eine der größten zuckerverbrauchenden Reaktionen bei Pflanzen (Maor & Shirasu, 2005). Die cP2-Pflanzen sind in der Lage nach Infektion mit *P. nicotianae* signifikant mehr Kallose zu bilden als ihre Mutterpflanze Xanthi (Abb. 10). Neben dem OPP und der ROS-Produktion benötigt auch die SA-Bildung Zucker (Macheroux *et al.*, 1999). Bisher wurde postuliert, dass für eine schnelle Mobilisierung von Kohlenhydraten in *source*-Blättern die apoplastische cwINV unabdingbar ist. So wird die z.B. die Resistenz gegenüber *P. nicotianae* geringer, wenn die cwINV in Tabak reprimiert wird (Essmann *et al.*, 2008). Interessanterweise wurden diese cwINV-Linien nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol wieder resistenter (Abb. 43). Der G6PDH-Isoenzymaustausch und die damit verbundenen Änderungen scheinen das Defizit an Zuckermobilisierung in den cwINV-Transformanten kompensieren zu können. Das könnte daran liegen, dass auch in den cwINV::cP2-Linien der Gehalt an Kohlenhydraten konstitutiv erhöht ist (Abb. 44, Abb. 45). Interessanterweise spielt bei diesen Pflanzen ein apoplastidär generiertes Zuckersignal keine Rolle mehr für eine erfolgreiche Resistenz (vergleiche Essmann *et al.*, 2008).

Kohlenhydrate sind auch wichtige Bestandteile der abiotischen Stressabwehr bei Pflanzen (siehe Einleitung), so dass die erhöhten Zuckerkonzentrationen in den *source*-Blättern auch zu der erhöhten abiotischen Stresstoleranz in den cP2-Linien beitragen könnten (Abb. 14). Dabei gibt es auch hier wieder eine Korrelation zwischen vakuolären Zuckern und ROS, die nicht nur als Substrat für die ROS-Produktion sondern auch für die ROS-Entgiftung verwendet werden können. Zucker können dabei zum einen als ROS-Fänger und zum anderen als Energiequellen für ROS-Entgiftungswege fungieren. So können hohe Zuckerkonzentrationen in der Vakuole die Zellen vor ROS schützen, indem sie selbst als ROS-Fänger dienen (Bolouri-Moghaddam *et al.*, 2010; Übersicht in Van den Enden & Peshev, 2013), aber auch indem sie die Tonoplastenmembran stabilisieren (Vereyken *et al.*, 2003; Van den Enden & Valluru, 2009). Dieses Schutzsystem trägt zur Entgiftung der

ROS und zur Stabilität der Vakuole besonders unter ROS-generierenden Bedingungen wie abiotischem Stress bei (Li *et al.*, 2007; Kawakami *et al.*, 2008).

Neben einer direkten ROS-Entgiftungsfunktion fungieren Zucker auch, wie bereits erwähnt, als Energielieferanten und Substrate für ROS-Antioxidationswege. So dient Glc als Synthesebaustein für Karotinoide (Pallet & Young, 1993), für die Ascorbatsynthese (Foyer, 1993; Smirnoff *et al.*, 2001) und für Aminosäuren wie Cystein, Glutamat und Glycin. Diese Aminosäuren sind wiederum wichtige Bausteine für Glutathion und zeigen eine enge Verknüpfung zwischen Glc und dem Ascorbat-Glutathion-Zyklus (Noctor & Foyer, 1998; siehe auch 4.1). Neben der Substratfunktion wirkt Glc auch stimulierend auf den Ascorbat-Glutathion-Zyklus. Zuckerinkubations-Experimente konnten eine erhöhte Aktivierung des Ascorbat-Zyklus nach Zugabe von Glc und Saccharose in Blättern feststellen (Smirnoff *et al.*, 1996). Bei den cP2-Pflanzen könnte die vermehrt vorliegende Glc die Synthese von Glutathion fördern und gleichzeitig die Pufferkapazität des Ascorbat-Glutathion-Zyklus heraufsetzen.

Doch nicht nur lösliche Zucker, sondern auch **Prolin** liegt in den cP2-Pflanzen konstitutiv erhöht vor (Abb. 24). Prolin ist als klassisches Osmolyt bekannt und seine Konzentration korreliert mit der Stressresistenz, besonders bei abiotischen Stressbedingungen (Kishor *et al.*, 1995; Saradhi *et al.*, 1995; Kishor *et al.*, 2014). Die erhöhte abiotische Stresstoleranz der cP2-Linien (siehe Ergebnisse 3.1.2 und Scharte *et al.*, 2009) könnte somit mit der konstitutiv erhöhten Prolinkonzentration zusammenhängen. Zum einen könnten die *per se* erhöhten Prolin- und auch Zuckerkonzentrationen bei den cP2-Transformanten das Wasserpotential in den Pflanzen aufrecht erhalten und eine Schädigung des Gewebes reduzieren. Prolin beeinflusst aber nicht nur das osmotische Potential, sondern kann aufgrund seiner Metabolit-Chaperonfunktion ROS-Entgiftungsenzyme wie SOD und APX positiv stimulieren (Xu *et al.*, 2009) und trägt somit zum Schutz vor ROS bei (Szabados & Savoure, 2010; Natarajan *et al.*, 2012). Dies könnte z.B. erklären, warum Blattscheiben der cP2-Pflanzen eine verminderte Chlorophylldegradierung (Chlorose) nach NaCl-Inkubation aufweisen (Abb. 14). Chlorosen sind ein Indiz für destabilisierte Chloroplasten und für eine Störung der Elektronentransportkette zwischen den Photosystemen PSI und PSII. Besonders das PSII ist anfällig für oxidative Schäden und ist die Hauptquelle des reaktiven Singulett-Sauerstoffs $^1\text{O}_2$ (Arato *et al.*, 2004). Untersuchungen an isolierten Thylakoiden haben gezeigt, dass Prolin das PSII stabilisieren und somit die Bildung von ROS und die

Oxidation von Lipiden verhindern kann (Saradhi & Prasad, 1991). Darüber hinaus kann Prolin die Enzyme der ROS-Entgiftungsmaschinerie selbst stabilisieren. Hoque *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Aktivität von Antioxidationsenzymen wie Katalase (CAT), Peroxidase (POX) und SOD, sowie die der Enzyme des Ascorbat-Gluthation-Zyklus (APX, MDHAR und DHAR) durch die externe Gabe von Prolin zu Salz-gestressten Tabak-Zellsuspensionskulturen signifikant erhöht war.

Prolin kann die ROS-Produktion aber nicht nur unterbinden, sondern unter Umständen auch fördern. So zeigten Untersuchungen von Deutsche *et al.* (2004), dass externe Prolinzugabe in Pflanzenzellen HR-ähnliche Symptome wie ROS-Produktion, DNA-Fragmentierung und letztendlich den pflanzlichen Zelltod auslösen kann. Zusätzlich konnte eine Prolin-induzierte Aktivierung von SA über einen NPR1-vermittelten Signalweg gezeigt werden (Chen *et al.*, 2011). Somit könnte Prolin auch in den cP2-Linien durch einen Einfluss auf die Synthese von ROS und SA an der erhöhten biotischen Stressresistenz beteiligt sein. Neuere Untersuchungen zeigen, dass Prolin dabei speziell in den Mitochondrien wirkt (Cecchini *et al.*, 2011). Es wird dabei postuliert, dass während der Pathogeninteraktion vermehrt Prolin in die Mitochondrien eingeschleust wird, um dort von ProDH zu PC5 abgebaut zu werden (Prolin/P5C-Zyklus, Phang, 1985). Ein Überangebot von Prolin und Elektronen führt dann vermutlich zu einer Überreduktion der Elektronentransportkette, somit zur Bildung von ROS und letztendlich zum Zelltod (Cecchini *et al.*, 2011; Monteoliva *et al.*, 2014). Neben vermehrter Energie und Reduktionsäquivalenten werden während pflanzlichen Stressreaktionen auch zusätzliche Metabolite für Biosynthesewege benötigt (Übersicht in Bolton, 2009). Der OPP ist maßgeblich an der Bereitstellung dieser Metabolite beteiligt. Der stromale OPP speist dabei den Shikimatweg. So wird Ery-4-P aus dem zyklischen, reversiblen OPP zusammen mit Phosphoenolpyruvat aus der Glykolyse zu 3-Deoxy-D-Arabinohetulosensäure-7-Phosphat umgesetzt. Dieses wird anschließend unter NADPH-Verbrauch zu Shikimisäure und in weiteren enzymatischen Reaktionen zu Chorismat umgesetzt (Herrmann, 1995). Chorismat dient als Vorstufe für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Bentley & Haslam, 1990). Die über diesen Weg gebildeten Aminosäuren sind nicht nur für die Proteinbiosynthese von Nöten, sondern dienen auch als Ausgangsstoffe für die Bildung von wichtigen Sekundärmetaboliten der Stoffgruppen Alkaloide, Flavonoide und Phenole (Gilchrist & Kosuge, 1980). Aus diesem

Grund kann der Shikimatweg als Verbindungsglied zwischen Primärstoffwechsel und Sekundärstoffwechsel angesehen werden (Tzin *et al.*, 2010). Der konstitutiv aktivierte OPP könnte den cP2-Pflanzen also neben mehr NADPH und Kohlenhydraten auch mehr Bausteine für den Sekundärstoffwechsel bereitstellen. Eine Aktivierung des OPPs und des Shikimatweges während Stressreaktionen, z.B. der pflanzlichen Abwehr, wurde auch für Tabakpflanzen gezeigt (Scharte *et al.*, 2005; Somssich & Halbrock, 1998; Ferrari *et al.*, 2007). Der cytosolische OPP steht dabei via XPT mit dem stromalen OPP im Stoffaustausch (Eicks *et al.*, 2002). Daher könnte der konstitutiv aktive OPP im Cytosol der cP2-Pflanzen auch dem Shikimatweg in den Chloroplasten mehr Zuckerphosphate für die Abwehr bereitstellen und die Synthese der Sekundärmetabolite wie z.B. Phenole wäre erhöht. Phenolische Sekundärpflanzenstoffe entstehen durch die Umsetzung von Phenylalanin zu Zimtsäure. Katalysiert wird die Reaktion von der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) (Dorey *et al.*, 1997; Halbrock & Scheel, 1989). Hierbei werden Phenylpropane als Bausteine für weitere komplexe phenolische Verbindungen, wie Phytoalexine und Lignin, bereitgestellt. In der Resistenzausprägung scheint PAL, die interessanterweise über Kohlenhydrate induzierbar ist, eine wichtige Funktion einzunehmen (Mauch-Mani & Slusarenko, 1996). Nicht nur während induzierter Stressreaktionen könnten die cP2-Pflanzen von einer besseren Versorgung des Shikimatweges profitieren. Stress-relevante Sekundärmetabolite könnten *per se* im Gewebe akkumulieren, ähnlich wie NADPH, Prolin und Kohlenhydrate. Die cP2-Pflanzen wären somit generell für Stressreaktionen „geprimt“. Einen Hinweis darauf gibt der konstitutiv erhöhte **Nikotingehalt**, der mittels MALDI-TOF-Untersuchungen an *source*-Blättern der cP2-Transformanten gemessen wurde (Abb. 30). Nikotin spielt besonders in der Abwehr von Herbivoren eine Schlüsselrolle, da es mit den Acetylcholin-Rezeptoren des Nervensystems der Herbivoren interagiert und somit extrem toxisch sein kann (Steppuhn *et al.*, 2004). Der erhöhte Gehalt an diesem Sekundärmetabolit legt nahe, dass die cP2-Linien neben der untersuchten erhöhten Resistenz gegenüber Oomyzeten, auch eine höhere Resistenz gegenüber Herbivoren aufweisen.

Ein abschließend zusammenfassender Überblick über die Bedeutung des OPPs für die generelle Stresstoleranz in Pflanzen zeigt das Schema in Abbildung 48.

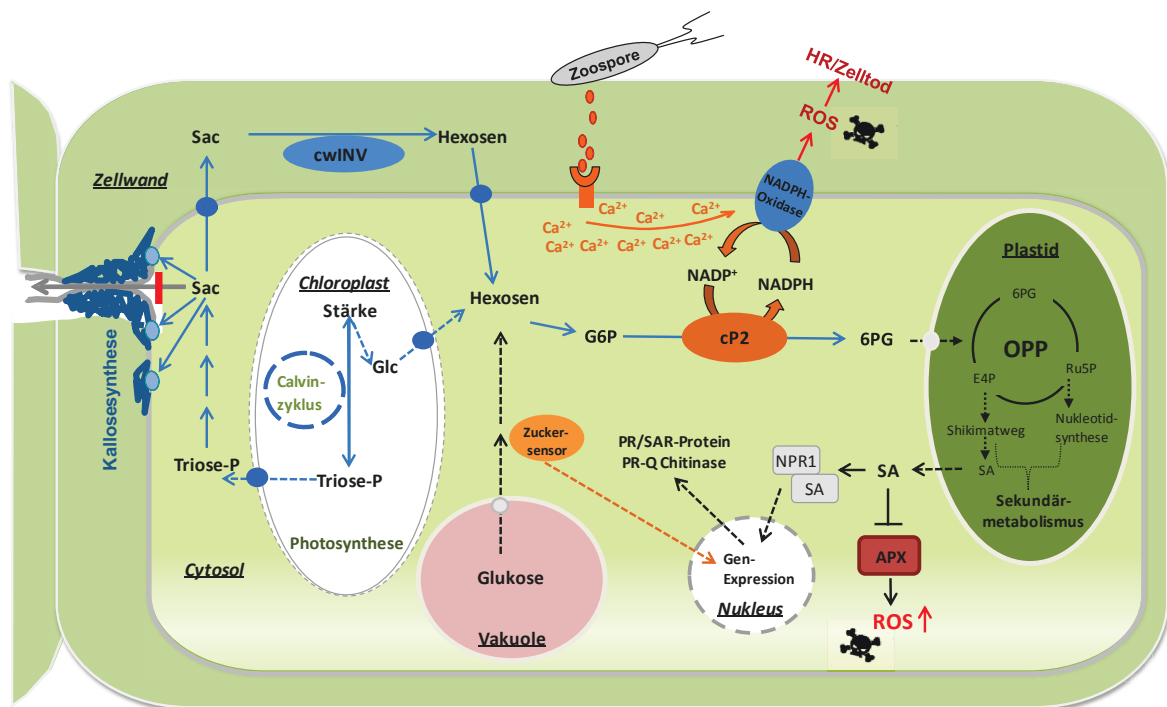


Abbildung 48: Modell zur Erhöhung der biotischen Stresstoleranz nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol. Durch den G6PDH-Isoenzymaustausch wird die Verfügbarkeit an NADPH so erhöht, dass es in den cP2-Pflanzen zu einer verstärkten ROS-Bildung während des biotischen Stresses durch die NADPH-Oxidase kommt. ROS ist u.a. in die Redox-abhängige Koordination der SA-abhängigen Abwehrprozesse mittels des Transkriptionsfaktors NPR1 involviert (Dong, 2004). NPR1 wandert, in Abhängigkeit des Hormons SA, Redox-abhängig in den Nucleus (Tada *et al.*, 2008; Despres *et al.*, 2003) und interagiert dort als Co-Faktor mit TGA-Transkriptionsfaktoren und induziert die PR-Gen-Expression bzw. die Expression von SAR-Genen. Die SA-Synthesewege benötigen Chorismat aus dem Shikimatweg, welcher wiederum von Ery-4-P aus dem OPP gespeist wird. Hier könnte ein weiterer Vorteil der cP2-Linien liegen, da der konstitutiv im Cytosol ablaufende OPP der Transformanten den Sekundärmetabolismus effizienter mit Zuckerphosphaten versorgen kann. Somit steht mehr Chorismat für die SA-Synthese bereit. SA kann wiederum die ROS-Freisetzung durch eine Repression der ROS-Entgiftungsenzyme verstärken. So werden z.B. Katalase in Tabakblättern (Chen *et al.*, 1993) und die cytosolische APX (Dempsey *et al.*, 1999) von SA inhibiert. Das könnte den zweiten, massiven ROS-Anstieg, nach Infektion der Xanthi::cP2-Linien (Scharte *et al.*, 2009) erklären, der dann zum hypersensitiven Zelltod führt. Erweiterung der Abb. 5, um die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse und Einordnung in die Literatur.

Aus diesem Schema wird die enge Verknüpfung der Primärstoffwechselwege mit dem Signalnetzwerk, aber auch mit dem Sekundärstoffwechsel erkennbar. Interessanterweise sind viele dieser Reaktionen zudem eng mit einer Freisetzung von Calcium (Ca^{2+}) verknüpft. Der Einstrom von Ca^{2+} -Ionen nach Pathogenerkennung ist eine der frühesten zellulären Antworten der Pflanze. Eine Maskierung dieses Ca^{2+} -Signales, z.B. durch den Einsatz von Ca^{2+} -Inhibitoren wie EDTA verhinderte u.a. die massive ROS-Bildung (Blume *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2000). ROS wiederum können Ca^{2+} -Kanäle aktivieren und damit den Ca^{2+} -Einstrom in das Cytosol beschleunigen und somit wiederum die ROS-Produktion verstärken (Pei *et al.*, 2000; Coelho *et al.*, 2002). Diese positive Rückkopplung zwischen

NADPH-Oxidase, ROS-Produktion und Ca^{2+} -Einstrom könnte somit auf zwei Arten bei den cP2-Pflanzen stimuliert bzw. gesteigert werden. Zum einen durch eine verbesserte cytosolische Ca^{2+} -Verfügbarkeit und zum anderen durch eine schnellere ROS-Produktion durch den konstitutiv erhöhten OPP. Die Ca^{2+} -stimulierende Wirkung auf NADPH-Oxidasen zeigten Studien von Kurusu *et al.* (2005). Durch Überexpression eines spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanals in der Plasmamembran konnte die Elizitor-induzierte ROS-Bildung in Reis verstärkt werden.

Die cP2 Überexpression und damit verbesserte NADPH-Verfügbarkeit könnte die frühe ROS-Produktion der aktivierten NADPH-Oxidase aufgrund konstitutiv erhöhter Substratverfügbarkeit beschleunigen. Dadurch könnte die Rückkopplung mit Ca^{2+} verstärkt und die ROS-Produktion wie gezeigt (Abb. 48) begünstigt werden.

4.3 Erhöhung von Biomasse und Ertrag nach Isoenzymaustausch der G6PDH im Cytosol

Eine Verbesserung der Stresstoleranz, sei es durch Züchtung oder transgene Modifikationen, korreliert oft mit einer Minderung des Wachstums sowie des Ertrages und begrenzt somit den wirtschaftlichen Erfolg (Purrington, 2000; Brown, 2002). Die hier untersuchten Tabaksorten weisen hingegen nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol nicht nur eine erhöhte abiotische und biotische Stresstoleranz auf, sondern auch einen etwa 10%igen Anstieg der **Biomasse** und des **Tausendkorngewichts** (TKG) (Abb. 27). Das TKG ist ein wichtiges Qualitätsmerkmal für die Pflanzenzüchtung (Gross *et al.*, 2003) und ist in den cP2-Linien nun mit dem TKG der Sorte SNN vergleichbar (Abb. 27). Der Anstieg des TKG könnte dabei auf den höheren Anteil von Kohlenhydraten und Lipiden im Samen der cP2-Linien zurückzuführen sein (Abb. 28). Auch für Arabidopsis konnte gezeigt werden, dass ein hoher vakuolärer Glucosegehalt mit einem Anstieg im TKG und höherem Lipidgehalt einhergeht (Wingenter *et al.*, 2010; Poschet *et al.*, 2011). Das erhöhte TKG korrelierte auch mit einer besseren Keimung des cP2-Saatguts unter Stressbedingungen (Abb. 15 und Abb. 16) und mit einer Ertragserhöhung von 10-20%, sowohl unter Standardbedingungen, als auch unter Trockenstress (Prof. A. von Schaewen, unveröffentlichte Daten). Vergleichbare Ergebnisse wiesen auch Pflanzen mit einer erhöhten TMT-Transporterdichte auf. Diese Pflanzen hatten höhere vakuoläre Zuckerwerte und eine erhöhte Biomasse sowie einen gesteigerten Samenertrag (Schulz *et al.*, 2012).

Darüber hinaus konnte ein positiver Zusammenhang zwischen der verstärkten Photosyntheserate in Reis und Arabidopsis, sowie erhöhten Kohlenhydratwerten und einer zunehmenden Biomasse verzeichnet werden (Karaba *et al.*, 2007; Kebeish *et al.*, 2007). Aktuell wird postuliert, dass ein Transkriptionsfaktor HYR (*higher yield rice*) Photosynthese gene aktiviert, wodurch die Photosyntheseleistung bei Reispflanzen erhöht wird, was zu einer gesteigerten Biomasse und einer verstärkten Trockenresistenz führt (Ambavaram *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen auch, dass der geringfügig reduzierte Saccharoseexport in den cP2-Linien keine negativen Auswirkungen auf die Versorgung der oberirdischen *sink*-Organe hat.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass es durch gezielte Änderungen im Grundstoffwechsel – hier im OPP – möglich ist, die pflanzliche Stresstoleranz zu steigern, ohne dabei Energie in Form von Biomasse und Ertrag einzubüßen. Im Idealfall könnten diese Parameter sogar gesteigert werden. Dieses könnte ein „Ausweg“ aus dem Dilemma der wachsenden Weltbevölkerung bei gleichzeitiger Abnahme der verfügbaren Anbauflächen sein (siehe Einleitung 1.1).

Ermöglicht wurde dies durch abweichende Lokalisation eines Isoenzym mit „besseren“ kinetischen Eigenschaften. Waren dazu bisher mindestens zwei Transformationsschritte notwendig (siehe Scharte *et al.*, 2009) konnte nun auch gezeigt werden, dass der G6PDH-Isoenzymaustausch auch durch nur einen Schritt unter Beibehaltung der positiven Effekte durchführbar ist (siehe Ergebnisse 3.3). Dies bedeutet eine nicht unerhebliche Zeit- und Kosteneinsparung. Erste Untersuchungen mit der Tabaksorte SNN zeigten auch, dass es unabhängig von der gewählten Tabaksorte möglich ist, durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol die biotische Resistenz noch zu steigern (Abb. 46). Möglicherweise wird hier die *sink*-Stärke des SNNs, die im Vergleich zum Xanthi bereits *per se* erhöht ist, noch weiter gesteigert. Zukünftige Untersuchungen werden zeigen, ob es dadurch auch zu einer erhöhten abiotischen Stresstoleranz und zu vergleichbaren Ergebnissen bei der Biomasseproduktion sowie dem Saatgutertrag kommt. Zudem gibt es weiteren Forschungsbedarf hinsichtlich eines möglichen *trade-offs* des G6PDH-Isoenzym-

austausches. So müssen künftig auch Effekte auf die unterirdischen *sink*-Organe und die Biomasse untersucht werden.

Ein weiteres spannendes Forschungsfeld sind die hier beschriebenen Wechselwirkungen zwischen dem OPP und dem Kohlenhydratstoffwechsel. So konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, die biotische Resistenz gegenüber *P. nicotianae* in SNN::cwINV-Transformanten durch den G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol der Mutterpflanze SNN wiederherzustellen. In den SNN::cwINV::cP2-Linien kam es ebenfalls zu einer Akkumulation von Zuckern (Abb. 44), vergleichbar mit den Xanthi::cP2-Linien (Abb. 17). Defizite der cwINV-Pflanzen in der apoplastischen Zuckermobilisation und im *sugar sensing* (Essmann *et al.*, 2008) scheinen kompensiert zu werden, so dass die Pflanzen wieder resistenter gegenüber dem biotrophen Pathogen *P. nicotianae* wurden (Abb. 43). Ausstehend sind hier noch Untersuchungen zur abiotischen Stresstoleranz und der Biomasse bzw. den Ertragsdaten der SNN::cwINV::cP2.

Geklärt werden müsste künftig auch die postulierte Lokalisation der vermehrten Kohlenhydrate in den Vakuolen der cP2-Linien. Dazu könnten Untersuchungen an isolierten Vakuolen durchgeführt werden oder nicht invasive Methoden zur Visualisierung der Kohlenhydratverteilung, wie z.B. NMR *micro-imaging* angewandt werden (Kröckenberger, 2001).

Schlussendlich müsste geklärt werden, ob der G6PDH-Isoenzymaustausch auch in anderen Pflanzen zu ähnlichen Effekten wie in Tabak führt. Erste Untersuchungen an Tomate (unveröffentlichte Daten) zeigen eine Zunahme der biotischen Resistenz in cP2-Tomaten-Linien. Allerdings sind Tabak und Tomate verwandte Arten, so dass die Untersuchungen auch auf andere Pflanzen wie z.B. auf die Ölsaatpflanze *Arabidopsis thaliana* übertragen werden müssten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die G6PDH eine Schlüsselrolle in der pflanzlichen Stresstoleranz einnimmt. Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen, dass – wie bereits von Scharte *et al.* (2009) postuliert – die G6PDH ein weiteres Beispiel eines sogenannten enzymatischen Resistenzgens ist. Diese Gene, wie z.B. auch die peroxisomale Glyoxylat-Aminotransferase aus Melone (Taler *et al.*, 2004) vermitteln eine sogenannte enzymatische Resistenz, und gelten als Alternative bzw. Ergänzung zu den klassischen pflanzlichen R-Genen (siehe Gururani *et al.*, 2012 und dortige Zitierungen).

Der G6PDH-Isoenzymaustausch hatte bei den Tabak cP2-Linien auch zahlreiche Änderungen von Metaboliten des Grundstoffwechsels zur Folge (höhere Zucker-, NADPH-, Nikotin-, Prolinkonzentrationen) die als sogenannte *priming*-Moleküle fungieren könnten. *Priming* kann bei Pflanzen durch Hormone, ROS, Metabolite und/oder DNA-Methylierung vermittelt werden (Pastor *et al.*, 2013). Ein metabolisches *priming* hat den Vorteil, dass es nicht zu Lasten des Ertrags geht, einer häufigen Konsequenz von pflanzlichen Abwehrreaktionen (Bolouri-Moghaddam & van den Ende, 2012).

Zusätzlich zu der Steigerung der generellen pflanzlichen Stresstoleranz deuten die Ergebnisse auf ein großes Potential für ein sogenanntes *metabolic engineering* von Tabak durch G6PDH-Isoenzymaustausch hin. Mit Hilfe der Nicht-Nahrungspflanze Tabak lassen sich große Mengen an billiger Biomasse produzieren, effizienter als mit irgendeiner anderen Nutzpflanze (Andrianov *et al.*, 2010). Diese Biomasse könnte man dann z.B. – auch aufgrund des erhöhten Lipidgehaltes – als alternative Energiequelle, z.B. zur Produktion von Biotreibstoff nutzen. Nach der Extraktion des Öls wären die verbliebenen Kohlenhydrate zusätzlich für die Produktion von Biotreibstoff nutzbar.

Eine genauere Kenntnis der Beteiligung des Primärstoffwechsels an der pflanzlichen Stresstoleranz unter besonderer Berücksichtigung der Biomasse könnte somit entscheidend für zukünftige pflanzliche Zuchtprogramme im Hinblick auf Nahrungsmittelproduktion und deren Nachhaltigkeit aber auch erneuerbarer Energie sein.

6 Literatur

- Abramovitch, R. B., Anderson, J. C., & Martin, G. B. (2006). Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(8), 601-611.
- Alia, Mohanty, P., & Matysik, J. (2001). Effect of proline on the production of singlet oxygen. *Amino Acids*, 21(2), 195-200.
- Allen, D., McKee, I., Farage, P., & Baker, N. (1997). Analysis of limitations to CO₂ assimilation on exposure of leaves of two Brassica napus cultivars to UV-B. *Plant, Cell & Environment*, 20(5), 633-640.
- Aluri, S., & Büttner, M. (2007). Identification and functional expression of the Arabidopsis thaliana vacuolar glucose transporter 1 and its role in seed germination and flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2537-2542.
- Ambavaram, M. M., Basu, S., Krishnan, A., Ramegowda, V., Batlang, U., Rahman, L., (2014). Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. *Nature Communications*, 5.
- Anderson, C. M., Wagner, T. A., Perret, M., He, Z., He, D., & Kohorn, B. D. (2001). WAKs: Cell wall-associated kinases linking the cytoplasm to the extracellular matrix. *Plant Molecular Biology*, 47(1-2), 197-206.
- Andrianov, V., Borisjuk, N., Pogrebnyak, N., Brinker, A., Dixon, J., Spitsin, S., (2010). Tobacco as a production platform for biofuel: Overexpression of Arabidopsis DGAT and LEC2 genes increases accumulation and shifts the composition of lipids in green biomass. *Plant Biotechnology Journal*, 8(3), 277-287.
- Arató, A., Bondarava, N., & Krieger-Liszkay, A. (2004). Production of reactive oxygen species in chloride- and calcium-depleted photosystem II and their involvement in photoinhibition. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1608(2), 171-180.
- Arakaki, A. K., Ceccarelli, E. A., & Carrillo, N. (1997). Plant-type ferredoxin-NADP⁺ reductases: A basal structural framework and a multiplicity of functions. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 11(2), 133-140.
- Arnold, W. (1968). The selection of sucrose as the translocate of higher plants. *Journal of Theoretical Biology*, 21(1), 13-20.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639.
- Asada, K. (2006). Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant Physiology*, 141(2), 391-396.
- Asai, S., Yoshioka, M., Nomura, H., Tone, C., Nakajima, K., Nakane, E., (2011). A plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase is responsible for hypersensitive response cell death and reactive oxygen species production. *Journal of General Plant Pathology*, 77(3), 152-162.
- Atkinson, H. J., Lilley, C. J., & Urwin, P. E. (2012). Strategies for transgenic nematode control in developed and developing world crops. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 251-6.

- Baena-González, E., Rolland, F., Thevelein, J. M., & Sheen, J. (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature*, *448*(7156), 938-942.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H., & Corbineau, F. (2008). From intracellular signaling networks to cell death: The dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies*, *331*(10), 806-814.
- Banzai, T., Hanagata, N., Dubinsky, Z., & Karube, I. (2003). Fructose-2, 6-bisphosphate contents were increased in response to salt, water and osmotic stress in leaves of *Bruguiera gymnorrhiza* by differential changes in the activity of the bifunctional enzyme 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphate 2-phosphatase. *Plant Molecular Biology*, *53*(1-2), 51-59.
- Barratt, D. H., Derbyshire, P., Findlay, K., Pike, M., Wellner, N., Lunn, J., Simpson, C., Maule, A.J., Smith, A. M. (2009). Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(31), 13124-13129.
- Barrett-Lennard, E., & Setter, T. (2010). Developing saline agriculture: Moving from traits and genes to systems. *Functional Plant Biology*, *37*(7), iii-iv.
- Bassi, R., & Sharma, S. S. (1993). Changes in proline content accompanying the uptake of zinc and copper by *Lemna minor*. *Annals of Botany*, *72*(2), 151-154.
- Bates, P. A., Dokurno, P., Freemont, P. S., & Sternberg, M. J. (1998). Conformational analysis of the first observed non-proline cis-peptide bond occurring within the complementarity determining region (CDR) of an antibody. *Journal of Molecular Biology*, *284*(3), 549-555.
- Bel, A., & Gamalei, Y. V. (1992). Ecophysiology of phloem loading in source leaves. *Plant, Cell & Environment*, *15*(3), 265-270.
- Ben Ahmed, C., Ben Rouina, B., Sensoy, S., Boukhriss, M., & Ben Abdullah, F. (2010). Exogenous proline effects on photosynthetic performance and antioxidant defense system of young olive tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58* (7), 4216-4222.
- Bentley, R., & Haslam, E. (1990). The shikimate pathway-A metabolic tree with many branches. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *25*(5), 307-384.
- Berger, S., Sinha, A. K., & Roitsch, T. (2007). Plant physiology meets phytopathology: Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. *Journal of Experimental Botany*, *58*(15-16), 4019-4026.
- Bethke, G., Grundman, R. E., Sreekanta, S., Truman, W., Katagiri, F., & Glazebrook, J. (2014). *Arabidopsis* PECTIN METHYLESTERASEs contribute to immunity against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, *164*(2), 1093-1107.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513-1523.
- Bittel, P., & Robatzek, S. (2007). Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *10*(4), 335-341.
- Black, S. D., & Mould, D. R. (1991). Development of hydrophobicity parameters to analyze proteins which bear post-or cotranslational modifications. *Analytical Biochemistry*, *193*(1), 72-82.
- Blume, B., Nurnberger, T., Nass, N., & Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in Parsley. *The Plant Cell*, *12*(8), 1425-1440.

- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379-406.
- Bolouri Moghaddam, M. R., & Van den Ende, W. (2012). Sugars and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3989-3998.
- Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., & Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *FEBS Journal*, 277(9), 2022-2037.
- Bolton, M. D. (2009). Primary metabolism and plant defense-fuel for the fire. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(5), 487-497.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brill, E., van Thournout, M., White, R. G., Llewellyn, D., Campbell, P. M., Engelen, S., Ruan, Y. L., Arioli, T., Furbank, R. T. (2011). A novel isoform of sucrose synthase is targeted to the cell wall during secondary cell wall synthesis in cotton fiber. *Plant Physiology*, 157(1), 40-54.
- Brown, J. K. (2002). Yield penalties of disease resistance in crops. *Current Opinion in Plant Biology*, 5(4), 339-344.
- Brown, M. E., & Funk, C. C. (2008). Food security under climate change. *Science*, Vol. 319 no. 5863 pp. 580-581
- Brown, J. K. (2002). Yield penalties of disease resistance in crops. *Curr Opin Plant Biol.* 5(4), 339-444.
- Buchanan, B. B., & Balmer, Y. (2005). Redox regulation: A broadening horizon. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 187-220.
- Bürkle, L., Hibberd, J. M., Quick, W. P., Kuhn, C., Hirner, B., & Frommer, W. B. (1998). The H⁺-sucrose cotransporter NtSUT1 is essential for sugar export from tobacco leaves. *Plant Physiology*, 118(1), 59-68.
- Büttner, M., & Sauer, N. (2000). Monosaccharide transporters in plants: Structure, function and physiology. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1465(1), 263-274.
- Caillaud, M., & Quick, W. (2005). New insights into plant transaldolase. *The Plant Journal*, 43(1), 1-16.
- Cecchini, N. M., Monteoliva, M. I., & Alvarez, M. E. (2011). Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in arabidopsis. *Plant Physiology*, 155(4), 1947-1959.
- Chen S, Hofius D, Sonnewald U, Börnke F, (2003) Temporal and spatial control of gene silencing in transgenic plants by inducible expression of double-stranded RNA. *The Plant Journal* 36, 731–740.
- Chen, J., Zhang, Y., Wang, C., Lü, W., Jin, J. B., & Hua, X. (2011). Proline induces calcium-mediated oxidative burst and salicylic acid signaling. *Amino Acids*, 40(5), 1473-1484.
- Chen, L. Q., Qu, X. Q., Hou, B. H., Sosso, D., Osorio, S., Fernie, A. R., & Frommer, W. B. (2012). Sucrose efflux mediated by SWEET proteins as a key step for phloem transport. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6065), 207-211.

- Chen, Z., Silva, H., & Klessig, D. F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science (New York, N.Y.)*, 262(5141), 1883-1886.
- Cho, J. I., Ryoo, N., Eom, J. S., Lee, D. W., Kim, H. B., Jeong, S. W. (2009). Role of the rice hexokinases OsHXK5 and OsHXK6 as glucose sensors. *Plant Physiology*, 149(2), 745-759.
- Chourey, P., Taliercio, E., Carlson, S., & Ruan, Y. (1998). Genetic evidence that the two isozymes of sucrose synthase present in developing maize endosperm are critical, one for cell wall integrity and the other for starch biosynthesis. *Molecular and General Genetics MGG*, 259(1), 88-96.
- Coelho, S. M., Taylor, A. R., Ryan, K. P., Sousa-Pinto, I., Brown, M. T., & Brownlee, C. (2002). Spatiotemporal patterning of reactive oxygen production and Ca²⁺ wave propagation in Fucus rhizoid cells. *The Plant Cell*, 14(10), 2369-2381.
- Colosia, A. D., Marker, A. J., Lange, A. J., el-Maghrabi, M. R., Granner, D. K., Tauler, A. (1988). Induction of rat liver 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase mRNA by refeeding and insulin. *The Journal of Biological Chemistry*, 263(35), 18669-18677.
- Couee, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., & El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 449-459.
- Cross, J. M., Clancy, M., Shaw, J. R., Greene, T. W., Schmidt, R. R., Okita, T. W., Hannah, L. C. (2004). Both subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase are regulatory. *Plant Physiology*, 135(1), 137-144.
- Cseke, C., Weeden, N. F., Buchanan, B. B., & Uyeda, K. (1982). A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(14), 4322-4326.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology*, 45, 569-606.
- Curtis, M. J., & Hays, J. B. (2007). Tolerance of dividing cells to replication stress in UVB-irradiated Arabidopsis roots: Requirements for DNA translesion polymerases. *DNA Repair*, 6(9), 1341-1358.
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-833.
- Dal Santo, S., Stampfl, H., Krasensky, J., Kempa, S., Gibon, Y., Petutschnig, E., Clausen T., Jonak C. (2012). Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 24(8), 3380-3392.
- da Silva, W. S., Rezende, G. L., & Galina, A. (2001). Subcellular distribution and kinetic properties of cytosolic and non-cytosolic hexokinases in maize seedling roots: Implications for hexose phosphorylation. *Journal of Experimental Botany*, 52(359), 1191-1201.
- Day, I. S., Reddy, V. S., Shad Ali, G., & Reddy, A. (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in Arabidopsis. *Genome Biol*, 3(10), 1-0056.24.
- Deblaere R, Bytebier B, De Greve H, Deboeck F, Schell J, Van Montagu M, Leemans J, (1985) Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for Agrobacterium-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Res.* 11;13 (13): 4777-4788.

- de Campos, Marília Kaphan Freitas, de Carvalho, K., de Souza, F. S., Marur, C. J., Pereira, L. F. P., Bespalhok & Filho, J. C. (2011). Drought tolerance and antioxidant enzymatic activity in transgenic 'Swingle'citrumelo plants over-accumulating proline. *Environmental and Experimental Botany*, 72(2), 242-250.
- de Carvalho, Maria Helena Cruz. (2008). Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal Behav*, 3(3), 156-165.
- de Falco, T., Bender, K., & Snedden, W. (2010). Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochemical Journal*, 425(1), 27-40.
- Dempsey, D. A., Shah, J., & Klessig, D. F. (1999). Salicylic acid and disease resistance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 18(4), 547-575.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., & De Lorenzo, G. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular Plant*, 1(3), 423-445.
- Despres, C., Chubak, C., Rochon, A., Clark, R., Bethune, T., & Desveaux, D. (2003). The Arabidopsis NPR1 disease resistance protein is a novel cofactor that confers redox regulation of DNA binding activity to the basic domain/leucine zipper transcription factor TGA1. *The Plant Cell*, 15(9), 2181-2191.
- Deuschle, K., Funck, D., Forlani, G., Stransky, H., Biehl, A., & Leister, D. (2004). The role of [delta]1-pyrroline-5-Carboxylate dehydrogenase in proline degradation. *The Plant Cell*, 16(12), 3413-3425.
- di Martino, C., Pizzuto, R., Pallotta, M. L., De Santis, A., & Passarella, S. (2006). Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: The existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. *Planta*, 223(6), 1123-1133.
- Dietz, K. J., & Pfannschmidt, T. (2011). Novel regulators in photosynthetic redox control of plant metabolism and gene expression. *Plant Physiology*, 155(4), 1477-1485.
- Ding, B., Haudenschild, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N., & Lucas, W. J. (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *The Plant Cell*, 4(8), 915-928.
- Dodd, A. N., Kudla, J., & Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 593-620.
- Dong, X. (2004). NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(5), 547-552.
- Dorey, S., Baillieul, F., Pierrel, M., Saindrenan, P., Fritig, B., & Kauffmann, S. (1997). Spatial and temporal induction of cell death, defense genes, and accumulation of salicylic acid in tobacco leaves reacting hypersensitively to a fungal glycoprotein elicitor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 10(5), 646-655.
- Doudican, N. A., Song, B., Shadel, G. S., & Doetsch, P. W. (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 25(12), 5196-5204.
- Drerup, M. M., Schlucking, K., Hashimoto, K., Manishankar, P., Steinhorst, L., & Kuchitsu, K. (2013). The calcineurin B-like calcium sensors CBL1 and CBL9 together with their interacting protein kinase CIPK26 regulate the Arabidopsis NADPH oxidase RBOHF. *Molecular Plant*, 6(2), 559-569.

- Durrant, W., & Dong, X. (2004). Systemic acquired resistance. *Annual Review Phytopathology*, 42, 185-209.
- Ebel, J. (1986). Phytoalexin synthesis: The biochemical analysis of the induction process. *Annual Review of Phytopathology*, 24(1), 235-264.
- Edwards, E. A., Rawsthorne, S., & Mullineaux, P. M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 180(2), 278-284.
- Eicks, M., Maurino, V., Knappe, S., Flugge, U. I., & Fischer, K. (2002). The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiology*, 128(2), 512-522.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Emes, M., & Neuhaus, H. (1997). Metabolism and transport in non-photosynthetic plastids. *Journal of Experimental Botany*, 48(12), 1995-2005.
- Esposito, S., Massaro, G., Vona, V., Di Martino Rigano, V., & Carfagna, S. (2003). Glutamate synthesis in barley roots: The role of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Planta*, 216(4), 639-647.
- Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schon, H., Sonnewald, S., Weis, E., & Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant Physiology*, 147(3), 1288-1299.
- Fan, W., & Dong, X. (2002). In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 14(6), 1377-1389.
- Fensom, D. S. (1981). Problems arising from a münch-type pressure flow mechanism of sugar transport in phloem. *Canadian Journal of Botany*, 59(4), 425-432.
- Ferrari, S., Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F. M., & Dewdney, J. (2007). Resistance to botrytis cinerea induced in Arabidopsis by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology*, 144(1), 367-379.
- Fickenscher, K., & Scheibe, R. (1986). Purification and properties of the cytoplasmic glucose-6-phosphate dehydrogenase from pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 247(2), 393-402.
- Fisher, D. B., & Oparka, K. J. (1996). Post-phloem transport: Principles and problems. *Journal of Experimental Botany*, 47 Spec No, 1141-1154.
- Fliege, R., Flügge, U., Werdan, K., & Heldt, H. W. (1978). Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 502(2), 232-247.
- Flor, H. H. (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, 9(1), 275-296.
- Flowers, T. J., Galal, H. K., & Bromham, L. (2010). Evolution of halophytes: Multiple origins of salt tolerance in land plants. *Functional Plant Biology*, 37(7), 604-612.
- Flügge, U. (1995). Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 46(special issue), 1317-1323.

- Flugge, U. I., Fischer, K., Gross, A., Sebald, W., Lottspeich, F., & Eckerskorn, C. (1989). The triose phosphate-3-phosphoglycerate-phosphate translocator from spinach chloroplasts: Nucleotide sequence of a full-length cDNA clone and import of the in vitro synthesized precursor protein into chloroplasts. *The EMBO Journal*, 8(1), 39-46.
- Fobert, P. R., & Després, C. (2005). Redox control of systemic acquired resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(4), 378-382.
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona, P., Miedema, H., & Torres, M. A. (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature*, 422(6930), 442-446.
- Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., & Sauer, N. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atbetafruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *erysiphe cichoracearum*. *Plant Physiology*, 132(2), 821-829.
- Fourquet, S., Huang, M., D'Autreaux, B., & Toledano, M. B. (2008). The dual functions of thiol-based peroxidases in H₂O₂ scavenging and signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(9), 1565-1576.
- Foyer, C., Lelandais, M., Galap, C., & Kunert, K. J. (1991). Effects of elevated cytosolic glutathione reductase activity on the cellular glutathione pool and photosynthesis in leaves under normal and stress conditions. *Plant Physiology*, 97(3), 863-872.
- Foyer, C. H., & Halliwell, B. (1976). The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: A proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta*, 133(1), 21-25.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub. *Plant Physiology*, 155(1), 2-18.
- Fu, Z. Q., Yan, S., Saleh, A., Wang, W., Ruble, J., & Oka, N. (2012). NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. *Nature*, 486(7402), 228-232.
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhaze, C., Lugan, R., Larher, F. R., & Bouchereau, A. (2007). A reassessment of the function of the so-called compatible solutes in the halophytic plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *Plant Physiology*, 144(3), 1598-1611.
- Galletti, R., Denoux, C., Gambetta, S., Dewdney, J., Ausubel, F. M., & De Lorenzo, G. (2008). The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in Arabidopsis is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, 148(3), 1695-1706.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., & Poinssot, B. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 711-724.
- Giese, J., Herbers, K., Hoffmann, M., Klösgen, R. B., & Sonnewald, U. (2005). Isolation and functional characterization of a novel plastidic hexokinase from *Nicotiana tabacum*. *FEBS Letters*, 579(3), 827-831.
- Gilchrist, D., & Kosuge, T. (1980). Aromatic amino acid biosynthesis and its regulation. *The Biochemistry of Plants*, 5, 507-531.

- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review Phytopathology*, 43, 205-227.
- Godt, D., & Roitsch, T. (2006). The developmental and organ specific expression of sucrose cleaving enzymes in sugar beet suggests a transition between apoplasmic and symplasmic phloem unloading in the tap roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(11), 656-665.
- Golldack, D., Li, C., Mohan, H., & Probst, N. (2014). Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science*, 151(5)
- Gómez-Gómez, L., Felix, G., & Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 18, 277-284.
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, 5(6), 1003-1011.
- Gottwald, J. R., Krysan, P. J., Young, J. C., Evert, R. F., & Sussman, M. R. (2000). Genetic evidence for the in planta role of phloem-specific plasma membrane sucrose transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13979-13984.
- Grant, J. J., Yun, B., & Loake, G. J. (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: Identification of a signal network that functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *The Plant Journal*, 24(5), 569-582.
- Grigston, J. C., Osuna, D., Scheible, W., Liu, C., Stitt, M., & Jones, A. M. (2008). D-glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein. *FEBS Letters*, 582(25), 3577-3584.
- Groos, C., Robert, N., Bervas, E., & Charmet, G. (2003). Genetic analysis of grain protein-content, grain yield and thousand-kernel weight in bread wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 106(6), 1032-1040.
- Gururani, M. A., Venkatesh, J., Upadhyaya, C. P., Nookaraju, A., Pandey, S. K., & Park, S. W. (2012). Plant disease resistance genes: Current status and future directions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 51-65.
- Hahlbrock, K., & Scheel, D. (1989). Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 40(1), 347-369.
- Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiology*, 141(2), 312-322.
- Hamid Badawi, G., Yamauchi, Y., Shimada, E., Sasaki, R., Kawano, N., Tanaka, K. (2004). Enhanced tolerance to salt stress and water deficit by overexpressing superoxide dismutase in tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts. *Plant Science*, 166(4), 919-928.
- Hamilton, E. W., 3rd, & Heckathorn, S. A. (2001). Mitochondrial adaptations to NaCl. complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology*, 126(3), 1266-1274.
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annual Review of Phytopathology*, 37(1), 285-306.
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773-1791.

- Hardin, S., Larue, C., Oh, M., Jain, V., & Huber, S. (2009). Coupling oxidative signals to protein phosphorylation via methionine oxidation in Arabidopsis. *Biochemistry Journal*, 422(2), 305-312.
- Hare, P., Cress, W., & Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell & Environment*, 21(6), 535-553.
- Harmon, A. C., Gribskov, M., Gubrium, E., & Harper, J. F. (2001). The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist*, 151(1), 175-183.
- Haupt, S., Duncan, G. H., Holzberg, S., & Oparka, K. J. (2001). Evidence for symplastic phloem unloading in sink leaves of barley. *Plant Physiology*, 125(1), 209-218.
- Hauschild, R., & von Schaewen, A. (2003). Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant Physiology*, 133(1), 47-62.
- Hawker, J., Jenner, C., & Niemietz, C. (1991). Sugar metabolism and compartmentation. *Functional Plant Biology*, 18(3), 227-237.
- Hayat, S., Hayat, Q., Alyemeni, M. N., Wani, A. S., Pichtel, J., & Ahmad, A. (2012). Role of proline under changing environments: A review. *Plant Signaling & Behavior*, 7(11), 1456-1466.
- Hayes, M. A., Davies, C., & Dry, I. B. (2007). Isolation, functional characterization, and expression analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) hexose transporters: Differential roles in sink and source tissues. *Journal of Experimental Botany*, 58(8), 1985-1997.
- Haywood, V., Kragler, F., & Lucas, W. J. (2002). Plasmodesmata: Pathways for protein and ribonucleoprotein signaling. *The Plant Cell*, 14 Suppl, S303-25.
- Heil, M., & Baldwin, I. T. (2002). Fitness costs of induced resistance: Emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*, 7(2), 61-67.
- Heitz, T., Widemann, E., Lugan, R., Miesch, L., Ullmann, P., Desaubry, L. (2012). Cytochromes P450 CYP94C1 and CYP94B3 catalyze two successive oxidation steps of plant hormone jasmonoyl-isoleucine for catabolic turnover. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(9), 6296-6306.
- Hendriks, J. H., Kolbe, A., Gibon, Y., Stitt, M., & Geigenberger, P. (2003). ADP-glucose pyrophosphorylase is activated by posttranslational redox-modification in response to light and to sugars in leaves of Arabidopsis and other plant species. *Plant Physiology*, 133(2), 838-849.
- Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H., Hajirezaei, M., & Sonnewald, U. (2000). Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Molecular Plant Pathology*, 1(1), 51-59.
- Herbers, K., & Sonnewald, U. (1998). Molecular determinants of sink strength. *Current Opinion in Plant Biology*, 1(3), 207-216.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W. B., Metraux, J. P., & Sonnewald, U. (1996). Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: Possible hexose sensing in the secretory pathway. *The Plant Cell*, 8(5), 793-803.
- Herrmann, K. M. (1995). The shikimate pathway: Early steps in the biosynthesis of aromatic compounds. *The Plant Cell*, 7(7), 907-919.

- Hodges, M., Flesch, V., Gálvez, S., & Bismuth, E. (2003). Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(6), 577-585.
- Hölscher, C., Meyer, T., & von Schaewen, A. (2014). Dual-targeting of Arabidopsis 6-phosphogluconolactonase 3 (PGL3) to chloroplasts and peroxisomes involves interaction with Trx m2 in the cytosol. *Molecular Plant*, 7(1), 252-255.
- Hoque, M. A., Banu, M. N. A., Okuma, E., Amako, K., Nakamura, Y., & Shimoishi, Y. (2007). Exogenous proline and glycinebetaine increase NaCl-induced ascorbate–glutathione cycle enzyme activities, and proline improves salt tolerance more than glycinebetaine in tobacco bright yellow-2 suspension-cultured cells. *Journal of Plant Physiology*, 164(11), 1457-1468.
- Hothorn, M., Van den Ende, W., Lammens, W., Rybin, V., & Scheffzek, K. (2010). Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(40), 17427-17432.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., & Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-Carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9354-9358.
- Huber, S. C., & Huber, J. L. (1996). Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47(1), 431-444.
- Hwang, S., Salamone, P. R., & Okita, T. W. (2005). Allosteric regulation of the higher plant ADP-glucose pyrophosphorylase is a product of synergy between the two subunits. *FEBS Letters*, 579(5), 983-990.
- Ibanez, A. J., Scharte, J., Bones, P., Pirkl, A., Meldau, S., & Baldwin, I. T. (2010). Rapid metabolic profiling of *Nicotiana tabacum* defence responses against *Phytophthora nicotianae* using direct infrared laser desorption ionization mass spectrometry and principal component analysis. *Plant Methods*, 6, 14-4811-6-14.
- Ichimura, K., Shinozaki, K., Tena, G., Sheen, J., Henry, Y., & Champion, A. (2002). Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: A new nomenclature. *Trends in Plant Science*, 7(7), 301-308.
- Jang, J. C., Leon, P., Zhou, L., & Sheen, J. (1997). Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *The Plant Cell*, 9(1), 5-19.
- Jia, L., Zhang, B., Mao, C., Li, J., Wu, Y., & Wu, P. (2008). OsCYT-INV1 for alkaline/neutral invertase is involved in root cell development and reproductivity in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 228(1), 51-59.
- Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Karaba, A., Dixit, S., Greco, R., Aharoni, A., Trijatmiko, K. R., & Marsch-Martinez, N. (2007). Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an Arabidopsis drought and salt tolerance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15270-15275.
- Kawakami, A., Sato, Y., & Yoshida, M. (2008). Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 793-802.
- Kebeish, R., Niessen, M., Thiruveedhi, K., Bari, R., Hirsch, H., & Rosenkranz, R. (2007). Chloroplastic photorespiratory bypass increases photosynthesis and biomass production in Arabidopsis thaliana. *Nature Biotechnology*, 25(5), 593-599.

- Keller, T., Damude, H. G., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R. A., & Lamb, C. (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91phox subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca²⁺ binding motifs. *The Plant Cell*, *10*(2), 255-266.
- Keunen, E., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van den Ende, W., & Cuypers, A. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: Extending the traditional concept. *Plant, Cell & Environment*, *36*(7), 1242-1255.
- Kim, H., & Gladyshev, V. (2007). Methionine sulfoxide reductases: Selenoprotein forms and roles in antioxidant protein repair in mammals. *Biochem.J*, *407*, 321-329.
- Kishor, K., Polavarapu, B., & Sreenivasulu, N. (2014). Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? *Plant, Cell & Environment*, *37*(2), 300-311.
- Kishor, P., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C., & Verma, D. (1995). Overexpression of [delta]-pyrroline-5-Carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology*, *108*(4), 1387-1394.
- Kocal, N., Sonnewald, U., & Sonnewald, S. (2008). Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*. *Plant Physiology*, *148*(3), 1523-1536.
- Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, *7*(3), 235-246.
- Koch, K. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *47*(1), 509-540.
- Kockenberger, W. (2001). Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *Journal of Experimental Botany*, *52*(356), 641-652.
- Kragler, F. (2013). Plasmodesmata: Intercellular tunnels facilitating transport of macromolecules in plants. *Cell and Tissue Research*, *352*(1), 49-58.
- Krapp, A., Hofmann, B., Schäfer, C., & Stitt, M. (1993). Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the 'sink regulation' of photosynthesis? *The Plant Journal*, *3*(6), 817-828.
- Krapp, A., & Stitt, M. (1995). An evaluation of direct and indirect mechanisms for the "sink-regulation" of photosynthesis in spinach: Changes in gas exchange, carbohydrates, metabolites, enzyme activities and steady-state transcript levels after cold-girdling source leaves. *Planta*, *195*(3), 313-323.
- Kruger, N. J., & von Schaewen, A. (2003). The oxidative pentose phosphate pathway: Structure and organization. *Current Opinion in Plant Biology*, *6*(3), 236-246.
- Kunst, A., Draeger, B., & Ziegenhorn, J. (1984). Methods of enzymatic analysis. vol. 6. *Verlag Chemie, Weinheim*, 163-172.
- Kurusu, T., Yagala, T., Miyao, A., Hirochika, H., & Kuchitsu, K. (2005). Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *The Plant Journal*, *42*(6), 798-809.

- Kurotani, K., Hayashi, K., Hatanaka, S., Toda, Y., Ogawa, D., Ichikawa, H. (2015). Elevated levels of CYP94 family gene expression alleviate the jasmonate response and enhance salt tolerance in rice. *Plant & Cell Physiology*, 56(4), 779-789.
- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H. Y., & He, Z. H. (2001). Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *The Plant Cell*, 13(6), 1317-1331.
- Lamb, C., & Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 251-275.
- Lara-Ortiz, T., Riveros-Rosas, H., & Aguirre, J. (2003). Reactive oxygen species generated by microbial NADPH oxidase NoxA regulate sexual development in aspergillus nidulans. *Molecular Microbiology*, 50(4), 1241-1255.
- Leloir, L. F., & Cardini, C. E. (1955). The biosynthesis of sucrose phosphate. *The Journal of Biological Chemistry*, 214(1), 157-165.
- Lendzian, K., & Bassham, J. A. (1975). Regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in spinach chloroplasts by ribulose 1,5-diphosphate and NADPH/NADP+ ratios. *Biochimica et Biophysica Acta*, 396(2), 260-275.
- Leon, J., Lawton, M. A., & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 108(4), 1673-1678.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., & Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
- Li, J., Chen, G., Wang, X., Zhang, Y., Jia, H., & Bi, Y. (2011). Glucose-6-phosphate dehydrogenase-dependent hydrogen peroxide production is involved in the regulation of plasma membrane H-ATPase and Na⁺/H⁺ antiporter protein in salt-stressed callus from *Carex moorcroftii*. *Physiologia Plantarum*, 141(3), 239-250.
- Li, M., Feng, F., & Cheng, L. (2012). Expression patterns of genes involved in sugar metabolism and accumulation during apple fruit development. *PloS One*, 7(3), e33055.
- Li, J., Jia, H., Wang, J., Cao, Q., & Wen, Z. (2014). Hydrogen sulfide is involved in maintaining ion homeostasis via regulating plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter system in the hydrogen peroxide-dependent manner in salt-stress *Arabidopsis thaliana* root. *Protoplasma*, 251(4), 899-912.
- Li, H., Yang, A., Zhang, X., Gao, F., & Zhang, J. (2007). Improving freezing tolerance of transgenic tobacco expressing sucrose: Sucrose 1-fructosyltransferase gene from *lactuca sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 89(1), 37-48.
- Li, W., Zhao, Y., Liu, C., Yao, G., Wu, S., Hou, C., et al. (2012). Callose deposition at plasmodesmata is a critical factor in restricting the cell-to-cell movement of soybean mosaic virus. *Plant Cell Reports*, 31(5), 905-916.
- Liu, Y. J., Nunes-Nesi, A., Wallstrom, S. V., Lager, I., Michalecka, A. M., Norberg, F. E., et al. (2009). A redox-mediated modulation of stem bolting in transgenic *Nicotiana sylvestris* differentially expressing the external mitochondrial NADPH dehydrogenase. *Plant Physiology*, 150(3), 1248-1259.
- Liu, J., Wang, X., Hu, Y., Hu, W., & Bi, Y. (2013). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in tolerance to drought stress in soybean roots. *Plant Cell Reports*, 32(3), 415-429.

- Liu, Y., Wu, R., Wan, Q., Xie, G., & Bi, Y. (2007). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a pivotal role in nitric oxide-involved defense against oxidative stress under salt stress in red kidney bean roots. *Plant & Cell Physiology*, 48(3), 511-522.
- Lohaus, G., Winter, H., Riens, B., & Heldt, H. (1995). Further studies of the phloem loading process in leaves of barley and spinach. the comparison of metabolite concentrations in the apoplasmic compartment with those in the cytosolic compartment and in the sieve Tubes1. *Botanica Acta*, 108(3), 270-275.
- Lotze, M. T., Zeh, H. J., Rubartelli, A., Sparvero, L. J., Amoscato, A. A., & Washburn, N. R. (2007). The grateful dead: Damage-associated molecular pattern molecules and reduction/oxidation regulate immunity. *Immunological Reviews*, 220(1), 60-81.
- Lunn, J., Feil, R., Hendriks, J., Gibon, Y., Morcuende, R., & Osuna, D. (2006). Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 397(1), 139-148.
- Macheroux, P., Schmid, J., Amrhein, N., & Schaller, A. (1999). A unique reaction in a common pathway: Mechanism and function of chorismate synthase in the shikimate pathway. *Planta*, 207(3), 325-334.
- Madgwick, J. W., West, J. S., White, R. P., Semenov, M. A., Townsend, J. A., & Turner, J. A. (2011). Impacts of climate change on wheat anthesis and fusarium ear blight in the UK. *European Journal of Plant Pathology*, 130(1), 117-131.
- Maher, E. A., Bate, N. J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. A., & Lamb, C. J. (1994). Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7802-7806.
- Mansour, M. M. F. (1998). Protection of plasma membrane of onion epidermal cells by glycinebetaine and proline against NaCl stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(10), 767-772.
- Maor, R., & Shirasu, K. (2005). The arms race continues: Battle strategies between plants and fungal pathogens. *Current Opinion in Microbiology*, 8(4), 399-404.
- Markham, J. E., & Kruger, N. J. (2002). Kinetic properties of bifunctional 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase from spinach leaves. *European Journal of Biochemistry*, 269(4), 1267-1277.
- Martinoia, E., Massonneau, A., & Frangne, N. (2000). Transport processes of solutes across the vacuolar membrane of higher plants. *Plant & Cell Physiology*, 41(11), 1175-1186.
- Mateos, R. M., Bonilla-Valverde, D., Del Río, L. A., Palma, J. M., & Corpas, F. J. (2009). NADP-dehydrogenases from pepper fruits: Effect of maturation. *Physiologia Plantarum*, 135(2), 130-139.
- Matzke MA, and Matzke AJM, (1995) How and why do plants inactivate homologous (trans)genes?
Plant Physiology 107: 679-685
- Mauch-Mani, B., & Slusarenko, A. J. (1996). Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *peronospora parasitica*. *The Plant Cell*, 8(2), 203-212.
- May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Van Montagu, M., & Inzé, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: Implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 649-667.

- Mazars, C., Thuleau, P., Lamotte, O., & Bourque, S. (2010). Cross-talk between ROS and calcium in regulation of nuclear activities. *Molecular Plant*, 3(4), 706-718.
- Meyer, T., Hölscher, C., Schwoppe, C., & von Schaewen, A. (2011). Alternative targeting of Arabidopsis plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD1 involves cysteine-dependent interaction with G6PD4 in the cytosol. *Plant Journal*, 66(5), 45-758.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W., & Molina, A. (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, 5:358
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., & Shirasu, K. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(49), 19613-19618.
- Millar, J., & Roots, J. (2012). Changes in australian agriculture and land use: Implications for future food security. *International Journal of Agricultural Sustainability*, 10(1), 25-39.
- Miller, G., Suzuki, N., CIFTCI-YILMAZ, S., & Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 453-467.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V. B., & Vandepoele, K. (2011). ROS signaling: The new wave? *Trends in Plant Science*, 16(6), 300-309.
- Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: Electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 561-591.
- Monteoliva, M. I., Rizzi, Y. S., Cecchini, N. M., Hajirezaei, M. R., & Alvarez, M. E. (2014). Context of action of proline dehydrogenase (ProDH) in the hypersensitive response of arabidopsis. *BMC Plant Biology*, 14, 21-2229-14-21.
- Moore, B., Cheng, S., Sims, D., & Seemann, J. (1999). The biochemical and molecular basis for photosynthetic acclimation to elevated atmospheric CO₂. *Plant, Cell & Environment*, 22(6), 567-582.
- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: Bringing them together. *New Phytologist*, 167, 645-663.
- Naidu, B., Paleg, L., Aspinall, D., Jennings, A., & Jones, G. (1991). Amino acid and glycine betaine accumulation in cold-stressed wheat seedlings. *Phytochemistry*, 30(2), 407-409.
- Natarajan, S. K., Zhu, W., Liang, X., Zhang, L., Demers, A. J., & Zimmerman, M. C. (2012). Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(5), 1181-1191.
- Neill, S. J., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. D., & Hancock, J. T. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53(372), 1237-1247.
- Nemoto, Y., & Sasakuma, T. (2000). Specific expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) gene by salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science*, 158(1-2), 53-60.
- Nielsen, T. H., Rung, J. H., & Villadsen, D. (2004). Fructose-2, 6-bisphosphate: A traffic signal in plant metabolism. *Trends in Plant Science*, 9(11), 556-563.

- Niittylä, T., Messerli, G., Trevisan, M., Chen, J., Smith, A. M., & Zeeman, S. C. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), 87-89.
- Noctor, G. (2006). Metabolic signalling in defence and stress: The central roles of soluble redox couples. *Plant, Cell & Environment*, 29(3), 409-425.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology*, 49(1), 249-279.
- Nunes, C., O'Hara, L. E., Primavesi, L. F., Delatte, T. L., Schluepmann, H., & Somsen, G. W. (2013). The trehalose 6-phosphate/SnRK1 signaling pathway primes growth recovery following relief of sink limitation. *Plant Physiology*, 162(3), 1720-1732.
- Nürnberger, T., & Scheel, D. (2001). Signal transmission in the plant immune response. *Trends in Plant Science*, 6(8), 372-379.
- Olsson, T., Thelander, M., & Ronne, H. (2003). A novel type of chloroplast stromal hexokinase is the major glucose-phosphorylating enzyme in the moss *Physcomitrella patens*. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(45), 44439-44447.
- Oparka, K. J., & Wright, K. M. (1988). Osmotic regulation of starch synthesis in potato tubers? *Planta*, 174(1), 123-126.
- Oparka, K., Duckett, C., Prior, D., & Fisher, D. (1994). Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 6(5), 759-766.
- Pallet, K.E., Young, A.J. (1993). Carotenoids. In *Antioxidants in Higher Plants*, R.G. Alscher, J.L. Hess. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 59-89.
- Panstruga, R., & Dodds, P. N. (2009). Terrific protein traffic: The mystery of effector protein delivery by filamentous plant pathogens. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 748-750.
- Pardha Saradhi, P., & Mohanty, P. (1997). Involvement of proline in protecting thylakoid membranes against free radical-induced photodamage. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 38(2), 253-257.
- Pastor, V., Luna, E., Mauch-Mani, B., Ton, J., & Flors, V. (2013). Primed plants do not forget. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 46-56.
- Patrick, J. (1997). Phloem unloading: Sieve element unloading and post-sieve element transport. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 191-222.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu.Rev.Plant Biol.*, 59, 417-441.
- Paul, M. J., & Pellny, T. K. (2003). Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany*, 54(382), 539-547.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., & Allen, G. J. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731-734.
- Phang, J. M. (1985). The regulatory functions of proline and pyrroline-5-carboxylic acid. *Current Topics in Cellular Regulation*, 25, 91-132.

- Poschet, G., Hannich, B., Raab, S., Jungkunz, I., Klemens, P. A. & Krueger, S. (2011). A novel arabidopsis vacuolar glucose exporter is involved in cellular sugar homeostasis and affects the composition of seed storage compounds. *Plant Physiology*, 157(4), 1664-1676.
- Potters, G., Horemans, N., & Jansen, M. A. (2010). The cellular redox state in plant stress biology—a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(5), 292-300.
- Pugin, A., Frachisse, J. M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., & Douce, R. (1997). Early events induced by the elicitor cryptogein in tobacco cells: Involvement of a plasma membrane NADPH oxidase and activation of glycolysis and the pentose phosphate pathway. *The Plant Cell*, 9(11), 2077-2091.
- Purrington, C. B. (2000). Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, 3(4), 305-308.
- Qadir, M., Quillérou, E., Nangia, V., Murtaza, G., Singh, M., & Thomas, R. J. (2014). Economics of salt-induced land degradation and restoration. Paper presented at the *Natural Resources Forum*, 38. (4) pp. 282-295.
- Qadir, M., Tubeileh, A., Akhtar, J., Larbi, A., Minhas, P., & Khan, M. (2008). Productivity enhancement of salt-affected environments through crop diversification. *Land Degradation & Development*, 19(4), 429-453.
- Ralhan, A., Schottle, S., Thurow, C., Iven, T., Feussner, I., & Polle, A. (2012). The vascular pathogen *verticillium longisporum* requires a jasmonic acid-independent COI1 function in roots to elicit disease symptoms in Arabidopsis shoots. *Plant Physiology*, 159(3), 1192-1203.
- Rausch, T., & Greiner, S. (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(2), 253-261.
- Rawsthorne, S. (2002). Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*, 41(2), 182-196.
- Rennie, E. A., & Turgeon, R. (2009). A comprehensive picture of phloem loading strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(33), 14162-14167.
- Rentsch, D., Hirner, B., Schmelzer, E., & Frommer, W. B. (1996). Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell*, 8(8), 1437-1446.
- Reumann, S., Ma, C., Lemke, S., & Babujee, L. (2004). AraPeroX. A database of putative Arabidopsis proteins from plant peroxisomes. *Plant Physiology*, 136(1), 2587-2608.
- Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., & Rich, P. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. *Salinity: Environment-plants-molecules* (pp. 181-204) Springer.
- Riadh, K., Wided, M., Hans-Werner, K., & Chedly, A. (2010). Responses of halophytes to environmental stresses with special emphasis to salinity. *Advances in Botanical Research*, 53, 117-145.
- Riesmeier, J. W., Willmitzer, L., & Frommer, W. B. (1994). Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning. *The EMBO Journal*, 13(1), 1-7.
- Rodriguez-Galvez, E., & Mendgen, K. (1995). Cell wall synthesis in cotton roots after infection with *Fusarium oxysporum*. *Planta*, 197(3), 535-545.

- Roitsch, T. (1999). Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 2(3), 198-206.
- Roitsch, T., & González, M. (2004). Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations. *Trends in Plant Science*, 9(12), 606-613.
- Roitsch, T., Bittner, M., & Godt, D. E. (1995). Induction of apoplastic invertase of chenopodium rubrum by D-glucose and a glucose analog and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation. *Plant Physiology*, 108(1), 285-294.
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Plant Science*, 5, 17
- Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., & Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms. *Annual Review Plant Biology*, 57, 675-709.
- Roosens, N. H., Thu, T. T., Iskandar, H. M., & Jacobs, M. (1998). Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiology* 117(1), 263-271.
- Rosenzweig, C., Iglesias, A., Yang, X., Epstein, P. R., & Chivian, E. (2001). Climate change and extreme weather events; implications for food production, plant diseases, and pests. *Global Change & Human Health*, 2(2), 90-104.
- Ruan, Y. (2014). Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual Review of Plant Biology*, 65, 33-67.
- Ruan, Y. L., Jin, Y., Yang, Y. J., Li, G. J., & Boyer, J. S. (2010). Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: Roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant*, 3(6), 942-55.
- Sabularse, D. C., & Anderson, R. L. (1981). D-fructose 2, 6-bisphosphate: A naturally occurring activator for inorganic pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase in plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 103(3), 848-855.
- Salanoubat, M., & Belliard, G. (1989). The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene*, 84(1), 181-185.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). Extraction and purification of plasmid DNA. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 1(1), 21-152.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology (Reading, Mass.)*, 24, 104-108.
- Saradhi, P. P., AliaArora, S., & Prasad, K. (1995). Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV-induced peroxidation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 209(1), 1-5.
- Saradhi, P. P., & Mohanty, P. (1991). Proline enhances primary photochemical activities in isolated thylakoid membranes of brassica juncea by arresting photoinhibitory damage. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 181(3), 1238-1244.
- Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X., Ardiles, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the delta 1-pyrroline-5-Carboxylate synthetase in Arabidopsis thaliana. *FEBS Letters*, 372(1), 13-19.

- Schaftingen, E. V. (1987). Fructose 2, 6-Bisphosphate. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Volume 59*, 315-395.
- Scharte, J., SCHÖN, H., & Weis, E. (2005). Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell & Environment*, 28(11), 1421-1435.
- Scharte, J., Schön, H., Tjaden, Z., Weis, E., & von Schaewen, A. (2009). Isoenzyme replacement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in the cytosol improves stress tolerance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(19), 8061-8066.
- Scheibe, R. (1990). Light/dark modulation: Regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Botanica Acta*, 103(4), 327-334.
- Scheideler, M., Schlaich, N. L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N. C., Vingron, M., *et al.* (2002). Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defense metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(12), 10555-10561.
- Schnarrenberger, C., Flechner, A., & Martin, W. (1995). Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiology* 108(2), 609-614.
- Scholes, J., Bundock, N., Wilde, R., & Rolfe, S. (1996). The impact of reduced vacuolar invertase activity on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of tomato. *Planta*, 200(2), 265-272.
- Schroeder JI, Delhaize E, Frommer WB, Guerinot ML, Harrison MJ, Herrera-Estrella L, Horie T, Kochian LV, Munns R, Nishizawa NK, Tsay YF, Sanders D (2013). Using membrane transporters to improve crops for sustainable food production. *Nature*. May 2;497(7447):60-6. doi: 10.1038/nature11909.
- Schulz, A., Beyhl, D., Marten, I., Wormit, A., Neuhaus, E. & Poschet, G. (2011). Proton-driven sucrose symport and antiport are provided by the vacuolar transporters SUC4 and TMT1/2. *The Plant Journal*, 68(1), 129-136.
- Schulze, W. X., Schneider, T., Starck, S., Martinoia, E., & Trentmann, O. (2012). Cold acclimation induces changes in arabidopsis tonoplast protein abundance and activity and alters phosphorylation of tonoplast monosaccharide transporters. *The Plant Journal*, 69(3), 529-541.
- Schwacke, R., Grallath, S., Breitzkreuz, K. E., Stransky, E., Stransky, H., Frommer, W. B. (1999). LeProT1, a transporter for proline, glycine betaine, and gamma-amino butyric acid in tomato pollen. *Plant Cell*, 11(3), 377-92.
- Sekhar, P. N., Amrutha, R. N., Sangam, S., Verma, D. P., & Kishor, P. B. (2007). Biochemical characterization, homology modeling and docking studies of ornithine delta-aminotransferase an important enzyme in proline biosynthesis of plants. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26 (4), 709-719.
- Seo, Y., Cho, J., Lee, S., Ryu, H., Han, M., Hahn, T., *et al.* (2007). Current insights into the primary carbon metabolic flux that occurs in plants undergoing a defense response. *Plant Stress*, 1, 42-49.
- Sergeeva, L. I., Keurentjes, J. J., Bentsink, L., Vonk, J., van der Plas, L. H., Koornneef, M., *et al.* (2006). Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2994-2999.

- Seth, C., Remans, T., Keunen, E., Jozefczak, M., Gielen, H., Opdenakker, K. (2012). Phytoextraction of toxic metals: A central role for glutathione. *Plant, Cell & Environment*, 35(2), 334-346.
- Shabala, S., & Pottosin, I. (2014). Regulation of potassium transport in plants under hostile conditions: Implications for abiotic and biotic stress tolerance. *Physiologia Plantarum*, 151(3):257-79.
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: Physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of Botany*, 112(7), 1209-1221.
- Sharkey, T. D. (1985). Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: Physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review*, 51(1), 53-105.
- Sharma, S., Villamor, J. G., & Verslues, P. E. (2011). Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiology*, 157(1), 292-304.
- Sharma, S. S., & Dietz, K. J. (2006). The significance of amino acids and amino acid-derived molecules in plant responses and adaptation to heavy metal stress. *Journal of Experimental Botany*, 57(4), 711-726.
- Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *The Plant Cell*, 2(10), 1027-1038.
- Shiu, S. H., & Bleecker, A. B. (2001). Plant receptor-like kinase gene family: Diversity, function, and signaling. *Science's STKE : Signal Transduction Knowledge Environment*, 2001(113).
- Ślaski, J. J., Zhang, G., Basu, U., Stephens, J. L., & Taylor, G. J. (1996). Aluminum resistance in wheat (*Triticum aestivum*) is associated with rapid, Al-induced changes in activities of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in root apices. *Physiologia Plantarum*, 98(3), 477-484.
- Smirnoff, N. (1996). Botanical briefing: The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany*, 78(6), 661-669.
- Smirnoff, N., Conklin, P. L., & Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A renaissance. *Annual Review of Plant Biology*, 52(1), 437-467.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Somssich, I. E., & Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science*, 3(3), 86-90.
- Sonnewald, U., Brauer, M., Schaewen, A., Stitt, M., & Willmitzer, L. (1991). Transgenic tobacco plants expressing yeast-derived invertase in either the cytosol, vacuole or apoplast: A powerful tool for studying sucrose metabolism and sink/source interactions. *The Plant Journal*, 1(1), 95-106.
- Sperdoui, I., & Moustakas, M. (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 577-585.
- Steppuhn, A., Gase, K., Krock, B., Halitschke, R., & Baldwin, I. T. (2004). Nicotine's defensive function in nature. *PLoS Biology*, 2(8), e217.
- Stitt, M. (1991). Rising CO2 levels and their potential significance for carbon flow in photosynthetic cells. *Plant, Cell & Environment*, 14(8), 741-762.

- Stitt, M. (1990). Fructose-2, 6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 41(1), 153-185.
- Stitt, M., Lunn, J., & Usadel, B. (2010). Arabidopsis and primary photosynthetic metabolism—more than the icing on the cake. *The Plant Journal*, 61(6), 1067-1091.
- Stitt, M. (1987). Fructose 2,6-bisphosphate and plant carbohydrate metabolism. *Plant Physiology*, 84(2), 201-204.
- Strawn, M. A., Marr, S. K., Inoue, K., Inada, N., Zubieta, C., & Wildermuth, M. C. (2007). Arabidopsis isochorismate synthase functional in pathogen-induced salicylate biosynthesis exhibits properties consistent with a role in diverse stress responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(8), 5919-5933.
- Sturm, A., & Tang, G. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in Plant Science*, 4(10), 401-407.
- Sun, L., Yang, D., Kong, Y., Chen, Y., Li, X., Zeng, L. (2014). Sugar homeostasis mediated by cell wall invertase GRAIN INCOMPLETE FILLING 1 (GIF1) plays a role in pre-existing and induced defence in rice. *Molecular Plant Pathology*, 15(2), 161-173.
- Swarbrick, P. J., SCHULZE-LEFERT, P., & Scholes, J. D. (2006). Metabolic consequences of susceptibility and resistance (race-specific and broad-spectrum) in barley leaves challenged with powdery mildew. *Plant, Cell & Environment*, 29(6), 1061-1076.
- Szabados, L., & Savouré, A. (2010). Proline: A multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, 15(2), 89-97.
- Tada, Y., Spoel, S. H., Pajeroska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J. & Wang, C. (2008). Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5891), 952-956.
- Takahara, K., Kasajima, I., Takahashi, H., Hashida, S. N., Itami, T. & Onodera, H. (2010). Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiology*, 152(4), 1863-1873.
- Takahashi, S., & Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in Plant Science*, 13(4), 178-182.
- Takeda, S., Gapper, C., Kaya, H., Bell, E., Kuchitsu, K., & Dolan, L. (2008). Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), 1241-1244.
- Takemoto, D., & Hardham, A. R. (2004). The cytoskeleton as a regulator and target of biotic interactions in plants. *Plant Physiology*, 136(4), 3864-3876.
- Taler, D., Galperin, M., Benjamin, I., Cohen, Y., & Kenigsbuch, D. (2004). Plant eR genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease. *The Plant Cell*, 16(1), 172-184.
- Tarrago, L., Laugier, E., & Rey, P. (2009). Protein-repairing methionine sulfoxide reductases in photosynthetic organisms: Gene organization, reduction mechanisms, and physiological roles. *Molecular Plant*, 2(2), 202-217.
- Tauzin, A. S., & Giardina, T. (2014). Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. *Plant Science*, 5, 293.

- Tedone, L., Hancock, R. D., Alberino, S., Haupt, S., & Viola, R. (2004). Long-distance transport of L-ascorbic acid in potato. *BMC Plant Biology*, 4(1), 16.
- Thom, E., Möhlmann, T., Quick, W. P., Camara, B., & Neuhaus, H. (1998). Sweet pepper plastids: Enzymic equipment, characterisation of the plastidic oxidative pentose-phosphate pathway, and transport of phosphorylated intermediates across the envelope membrane. *Planta*, 204(2), 226-233.
- Thomma, B. P., Nurnberger, T., & Joosten, M. H. (2011). Of PAMPs and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 23(1), 4-15.
- Tzin, V., & Galili, G. (2010). The biosynthetic pathways for shikimate and aromatic amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8
- Tsuda, K., & Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4), 459-465.
- Tognetti, J. A., Pontis, H. G., & Martínez-Noël, G. M. (2013). Sucrose signaling in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 23316, 1.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2005). Pathogen-induced, NADPH oxidase-derived reactive oxygen intermediates suppress spread of cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics*, 37(10), 1130-1134.
- Torres, M. A., Dangl, J. L., & Jones, J. D. (2002). *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 517-522.
- Torres, M. A., Jones, J. D., & Dangl, J. L. (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiology*, 141(2), 373-378.
- Van Bel, A. J., & Knoblauch, M. (2000). Sieve element and companion cell: The story of the comatose patient and the hyperactive nurse. *Functional Plant Biology*, 27(6), 477-487.
- Van Bel, A. J. (1996). Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *Journal of Experimental Botany*, 47 Spec No, 1129-1140.
- Van den Ende, W., & Peshev, D. (2013). Sugars as antioxidants in plants. *Crop improvement under adverse conditions* (pp. 285-307) Springer.
- Van den Ende, W., & Valluru, R. (2009). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: Scavenging and salvaging? *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 9-18.
- Van Loon, L., & Van Strien, E. (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.
- Vargas, W. A., & Salerno, G. L. (2010). The cinderella story of sucrose hydrolysis: Alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. *Plant Science*, 178(1), 1-8.
- Verbruggen, N., & Hermans, C. (2008). Proline accumulation in plants: A review. *Amino Acids*, 35, 753-759.

- Verbruggen, N., Villarroel, R., & Van Montagu, M. (1993). Osmoregulation of a pyrroline-5-Carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *103*(3), 771-781.
- Vereyken, I. J., Chupin, V., Islamov, A., Kuklin, A., Hinch, D. K., & Kruijff, B. d. (2003). The effect of fructan on the phospholipid organization in the dry state. *Biophysical Journal*, *85*(5), 3058-3065.
- Verslues, P. E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *8*, e0140.
- Villadsen, D., & Nielsen, T. (2001). N-terminal truncation affects the kinetics and structure of fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem.J.*, *359*, 591-597.
- Vlot, A. C., Dempsey, D. A., & Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*, *47*, 177-206.
- Voigt, C. A. (2014). Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae. *Frontiers in Plant Science*, *5*
- Vogt, W. (1995). Oxidation of methionyl residues in proteins: Tools, targets, and reversal. *Free Radical Biology and Medicine*, *18*(1), 93-105.
- von Broembsen, S. L., & Deacon, J. (1996). Effects of calcium on germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. *Mycological Research*, *100*(12), 1498-1504.
- von Schaewen, A., Stitt, M., Schmidt, R., Sonnewald, U., & Willmitzer, L. (1990). Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *The EMBO Journal*, *9*(10), 3033-3044.
- Wakao, S., & Benning, C. (2005). Genome-wide analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenases in *Arabidopsis*. *Plant Journal* *41*(2), 243-256.
- Wallström, S. V., Florez-Sarasa, I., Araujo, W. L., Aidemark, M., Fernandez-Fernandez, M. & Fernie, A. R. (2014). Suppression of the external mitochondrial NADPH dehydrogenase, NDB1, in *Arabidopsis thaliana* affects central metabolism and vegetative growth. *Molecular Plant*, *7*(2), 356-368.
- Wang, L., Li, X. R., Lian, H., Ni, D. A., He, Y. K., Chen, X. Y., et al. (2010). Evidence that high activity of vacuolar invertase is required for cotton fiber and *arabidopsis* root elongation through osmotic dependent and independent pathways, respectively. *Plant Physiology*, *154*(2), 744-756.
- Wang, X., Ma, Y., Huang, C., Wan, Q., Li, N., & Bi, Y. (2008). Glucose-6-phosphate dehydrogenase plays a central role in modulating reduced glutathione levels in reed callus under salt stress. *Planta*, *227*(3), 611-623.
- Wang, X., Ma, Y., Huang, C., Li, J., Wan, Q., & Bi, Y. (2008). Involvement of glucose-6-phosphate dehydrogenase in reduced glutathione maintenance and hydrogen peroxide signal under salt stress. *Plant Signal Behaviour* *3*(6), 394-395.
- Wang, L., & Ruan, Y. (2013). Regulation of cell division and expansion by sugar and auxin signaling. *Frontiers in Plant Science*, *4*.
- Weber, A. P., & Linka, N. (2011). Connecting the plastid: Transporters of the plastid envelope and their role in linking plastidial with cytosolic metabolism. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 53-77.

- Welham, T., Pike, J., Horst, I., Flegmetakis, E., Katinakis, P., Kaneko, T., *et al.* (2009). A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, lotus japonicus. *Journal of Experimental Botany*, 60(12), 3353-3365.
- Wenderoth, I., Scheibe, R., & von Schaewen, A. (1997). Identification of the cysteine residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem*, 272, 26985-26990.
- Wendt, U. K., Wenderoth, I., Tegeler, A., & von Schaewen, A. (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*solanum tuberosum* L.). *The Plant Journal*, 23(6), 723-733.
- Wendt, U. K., Wenderoth, I., Tegeler, A., & von Schaewen, A. (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* 23, 723-733.
- Wildermuth, M. C., Dewdney, J., Wu, G., & Ausubel, F. M. (2001). Isochorismate synthase is required to synthesize salicylic acid for plant defence. *Nature*, 414(6863), 562-565.
- Wind, J., Smeeckens, S., & Hanson, J. (2010). Sucrose: Metabolite and signaling molecule. *Phytochemistry*, 71(14), 1610-1614.
- Wingenter, K., Schulz, A., Wormit, A., Wic, S., Trentmann, O., & Hoermiller, I. I. (2010). Increased activity of the vacuolar monosaccharide transporter TMT1 alters cellular sugar partitioning, sugar signaling, and seed yield in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 154(2), 665-677.
- Wojtaszek, P. (1997). Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochemical Journal*, 322, 681-692.
- Wormit, A., Trentmann, O., Feifer, I., Lohr, C., Tjaden, J., Meyer, S. (2006). Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from Arabidopsis involved in vacuolar sugar transport. *The Plant Cell*, 18(12), 3476-3490.
- Wurzinger, B., Mair, A., Pfister, B., & Teige, M. (2011). Cross-talk of calcium-dependent protein kinase and MAP kinase signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 6(1), 8-12.
- Xiang, L., Le Roy, K., Bolouri-Moghaddam, M. R., Vanhaecke, M., Lammens, W., Rolland, F. (2011). Exploring the neutral invertase-oxidative stress defence connection in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3849-3862.
- Xue, X., Liu, A., & Hua, X. (2009). Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in brassica napus. *BMB reports*, 42(1), 28-34.
- Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O. (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs NbrbohA and NbrbohB participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 15(3), 706-718.
- Yu, C., Claybrook, D. L., & Huang, A. H. (1983). Transport of glycine, serine, and proline into spinach leaf mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 227(1), 180-187.
- Zhang, S., & Klessig, D. F. (2001). MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science*, 6(11), 520-527.

- Zhang, C., & Turgeon, R. (2009). Downregulating the sucrose transporter VpSUT1 in verbascum phoeniceum does not inhibit phloem loading. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(44), 18849-18854.
- Zhang, X. Y., Wang, X. L., Wang, X. F., Xia, G. H., Pan, Q. H. & Fan, R. C. (2006). A shift of phloem unloading from symplasmic to apoplasmic pathway is involved in developmental onset of ripening in grape berry. *Plant Physiology*, 142(1), 220-232.
- Zhang, Y., Zhu, H., Zhang, Q., Li, M., Yan, M. & Wang, R. (2009). Phospholipase dalpha1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 21(8), 2357-2377.
- Zhifang, G., & Loescher, W. (2003). Expression of a celery mannose 6-phosphate reductase in Arabidopsis thaliana enhances salt tolerance and induces biosynthesis of both mannitol and a glucosyl-mannitol dimer. *Plant, Cell & Environment*, 26(2), 275-283.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(4), 414-420.
- Zwergler, K., & Hirt, H. (2001). Recent advances in plant MAP kinase signalling. *Biological Chemistry*, 382(8), 1123-1131.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
3-PGA	3-Phosphoglycerat
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
6PGL	6-Phosphogluconolactonase
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Abb	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AGPase	ADP-Glucose-Pyrophosphorylase
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
APX	Ascorbat-Peroxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BAP	6-Benzylaminpurin
bp	Basenpaar
BSA	Rinderderumalbumin
CAT	Katalase
CBL-Proteine	<i>calcineurin B-like proteins</i>
CBP	<i>calcium-binding protein</i> Ca^{2+} -Bindeproteinen
cDNA	komplementäre DNA
CDPK	<i>Ca²⁺-dependent protein kinase</i>
cLSM	confokales Laser-Scanning-Mikroskop
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cP2	modifizierte ATG6PD3-Isoform (P2) im Cytosol
cwINV	<i>cell-wall Invertase</i> , Zellwand-Invertase
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DAMPs	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery-4-P	Erythrose-4-Phosphat
Et	Ethylen
ETI	<i>effektor-triggered immunity</i>
F1,6P ₂	Fructose-1,6-bisphosphat
F2,6P ₂	Fructose-2,6-bisphosphat
F6P	Fructose-6-Phosphat
FBase	Fructose-1,6-bisphosphatase
Fruc	Fructose
g	Erdbeschleunigung

G/P	Prolin/Glutamat-Antiporter
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
<i>gif1</i>	<i>grain-incomplete filling</i>
Glc	Glucose
GlcT	Glucose-Transporter
GSA	Glutamat-Semialdehyd
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
His	L-Histidin
HKX	Hexokinase
HR	hypersensitiven Reaktion
HRP	<i>Horse Raddish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Hyg	Hygromycin
JA	Jasmonsäure
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
Ki	Dissoziationskonstante
Km	Michaelis-Konstanten
l	Liter
m	Meter oder milli
M	Molar
Mal	Maltose
MalT	Maltose-Transporter
MAMPs	<i>microbe-associated molecular patterns</i>
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
min	Minute
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
MS	Murashige & Skoog-Medium
MW	Molekulargewicht
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
NAA	1-Naphtylelessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamiddinukleotid
NADP	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NO	Stickstoffmonoxid
NPRI	<i>non-expressor of PRI</i>
O ₂ ⁻	Superoxid-Anionen
OAT	Ornithin-delta-Aminotransferase
OD	optische Dichte
OH·	Hydroxyl-Radikale
OPP	Oxidativer Pentosephosphat-Weg
P	Prolin-Uniporter

P1	<i>A. thaliana</i> G6PDH-Isoform AT5G35790
P2	<i>A. thaliana</i> G6PDH-Isoformen AT5G13110 und AT1G24280
P5C	Pyrrolin-5-Carboxylat
P5CDH	P5C-Dehydrogenase
P5CR	Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase
P5CS	Pyrrolin-5-Carboxylat-Synthase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMPs	<i>pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	<i>polymerase-chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDH	Prolin-Dehydrogenase
PEG	Polythylenglycol
PFK	Phosphofruktokinase
P-Formen	Plastidäre Formen
PFP	Fructose-6-phosphat-1-Phosphotransferase
Pi	<i>inorganic phosphate</i> , anorganisches Phosphat
POX	Prolin-Oxidase
PR	<i>pathogenesis-related</i> , Pathogen-induzierte
PRRs	<i>pattern-recognition receptors</i>
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
R-Gene	Resistenz-Gene
Rib-5-P	Ribose-5-Phosphat
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
Ru-5-P	Ribulose-5-Phosphat
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphate-Carboxylase/Oxygenase
SA	<i>salicylic acid</i> , Salicylsäure,
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Standardfehler
SE/GZ-Komplex	Siebelement-Geleitzellen-Komplex
Snf	<i>sucrose non-fermenting</i>
SNN	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv SamsunNN
SnRK1	<i>suc non fermenting related kinase 1</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD	Superoxid-Dismutase
SPP	Saccharosephosphat-Phosphatase
SPS	Saccharosephosphat-Synthase
Suc	<i>sucrose</i> , Saccharose
SUC2	<i>Suc-transport protein</i>
SURE	<i>sugar-regulated plant genes</i>
SuSy	<i>sucrose synthase</i> , Saccharose-Synthase
SUT1	Saccharose/H ⁺ -Symporter
T6P	Trehalose-6-Phosphat

Tab	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Saline
TBST	Tris-gepufferte Saline mit Tween-20
TE	Tris-HCl-EDTA-Puffer
TEMED	NNNN-Tetramethylethyldiamin
Tet	Tetracyclin
Thr-467	Threonin
TPS	Trehalose-6-Phosphat-Synthase
Triose-P	Triose-Phosphat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
TRX	Thioredoxin
U	Unit
ÜN	über Nacht
UV	Ultra-violett
v/v	Volumen pro Volume
Vol	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactopyranosid
XPT	Xylulose-5-Phosphat/Phosphat Translokator
YT	Hefe-Tris-Medium
μ	mikro

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des irreversiblen oxidativen Teils des OPPs.	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung des Prolinmetabolismus in Pflanzen.....	8
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Saccharosesynthese und Phloembelastung in Mesophyllzellen von <i>source</i> -Blättern.....	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der regulatorischen Schlüsselrolle von Fructose-2,6-bisphosphat im primären Kohlenhydrathaushalt von <i>source</i> -Blättern.....	16
Abbildung 5:	Einfluss der cwINV und der G6PDH auf die Pathogenabwehr in <i>source</i> -Blättern von Tabak.....	26
Abbildung 6:	Schematische Übersicht zur Erzeugung und Selektion der cP2::cytRNAi-Supertransformanten.....	61
Abbildung 7:	Abwehr-induzierte Bildung von hypersensitiven Zelltod im Schwammparenchym der Tabaksorte SNN nach Infektion mit <i>P. nicotianae</i>	62
Abbildung 8:	Bestimmung der hypersensitiven Zelltodrate der untersuchten Tabakpflanzen.	63
Abbildung 9:	Kallosebildung im Schwammparenchym von SNN nach Infektion mit <i>P. nicotianae</i>	64
Abbildung 10:	Abwehr-induzierte Kallosebildung der untersuchten Tabaklinien.	65
Abbildung 11:	Repräsentative cLSM-Aufnahmen der Bildungsorte von Abwehr-induzierten ROS in <i>source</i> -Blättern von Tabakpflanzen (hier: SNN).....	66
Abbildung 12:	Abwehr-induzierte ROS-Bildung im Schwammparenchym.....	66

Abbildung 13: Abwehr-induzierte ROS-Bildung in der Epidermis.....	67
Abbildung 14: Steigerung der NaCl-Toleranz von <i>source</i> -Blättern durch G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	68
Abbildung 15: Steigerung der NaCl-Toleranz des Saatgutes nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.....	69
Abbildung 16: Steigerung der Trockentoleranz des Saatgutes nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.	70
Abbildung 17: Konzentration an löslichen Kohlenhydraten in <i>source</i> -Blättern.....	71
Abbildung 18: Konzentration an Stärke in <i>source</i> -Blättern.....	72
Abbildung 19: Zeitverlauf des Saccharoseexportes aus <i>source</i> -Blättern der untersuchten Tabakpflanzen.	73
Abbildung 20: Messung der Fructose-2,6-bisphosphat-Gehalte in nicht infizierten Tabak <i>source</i> -Blättern.	74
Abbildung 21: Messung der induktion des photosynthetischen Elektronentransportes (ETR) nach einstündiger Vorverdunklung der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi in nicht-infizierten <i>source</i> -Blättern.	75
Abbildung 22: Messung der Gesamtkapazität des photo-synthetischen Elektronentransportes (ETR) der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi in <i>source</i> -Blättern.	75
Abbildung 23: Messung von Hormongehalten in <i>source</i> -Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi und SNN Wildtyp.	76
Abbildung 24: Messung der Prolingehalte in <i>source</i> -Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi.	77
Abbildung 25: Messung der Prolingehalte in <i>source</i> -Blättern der Linien cP2(67), cP2(83) und Xanthi.	78
Abbildung 26: Bestimmung der oberirdischen Biomasse.....	79
Abbildung 27: Bestimmung des Tausendkorngewichtes der Linien Xanthi, cP2(67), cP2(83) und SNN.....	80
Abbildung 28: Bestimmung des Lipidgehaltes von Samen der untersuchten Pflanzen.....	81
Abbildung 29: Hauptkomponentenanalyse der MALDI-TOF-Untersuchung.	82
Abbildung 30: Repräsentative Darstellung der Massensignalintensität von Nikotin.....	83
Abbildung 31: Sequenzausschnitt aus dem <i>Alignment</i> zwischen der cytosolischen G6PDH-Sequenz von <i>N. tabacum</i> (cytG6PDH) und der cP2 G6PDH-Isoform At1g24280 (P2) von <i>A. thaliana</i>	84
Abbildung 32: Sequenzausschnitt aus dem <i>Alignment</i> zwischen der cytosolischen G6PDH-Sequenz von <i>N. tabacum</i> (cytG6PDH) und der cP2 G6PDH-Isoform At1g24280 (P2) von <i>A. thaliana</i>	85
Abbildung 33: Testschnitt des Vektors pUC-RNAi-2xcytG6PD_200bp mit <i>Pst</i> I.....	86
Abbildung 34: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie zur Erstellung eines neuen binären Doppelkonstruktes für <i>N. tabacum</i>	87
Abbildung 35: Merkmalsausprägung der Doppeltransformanten.	88
Abbildung 36: Test der funktionellen Expression des Doppelkonstruktes in den jeweiligen Transformanten durch Western-Blot-Analyse.....	89
Abbildung 37: Quantitative Auswertung der cLSM-Bilder zur Bestimmung der Zelltodraten.	91
Abbildung 38: Interaktion zwischen <i>P. nicotianae</i> und den untersuchten Pflanzen.....	92
Abbildung 39: Kohlenhydratgehalte von SNN-Wildtyppflanzen aus verschiedener Anzucht.	93

Abbildung 40: Transformation von Tabak mit dem Konstrukt pZM8.	94
Abbildung 41: Bestätigung der Expression des Doppelkonstruktes pZM8 in den jeweiligen Transformanten durch Western-Blot-Analysen.	95
Abbildung 42: Aktivität der Zellwand-Invertase in <i>source</i> -Blättern der untersuchten Tabaksorten.	96
Abbildung 43: Quantitative Auswertung der cLSM-Bilder zur Bestimmung der Zelltodrate.	97
Abbildung 44: Kohlenhydratkonzentration in nicht-infizierten <i>source</i> -Blättern.	98
Abbildung 45: Berechnung der <i>sink</i> -Stärke von <i>source</i> -Blättern der untersuchten Tabakpflanzen.	99
Abbildung 46: Bestimmung der hypersensitiven Zelltodrate der untersuchten Tabakpflanzen.	100
Abbildung 47: Modell zur Erhöhung der Trocken- und Salzstresstoleranz nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.	107
Abbildung 48: Modell zur Erhöhung der biotische Stresstoleranz nach G6PDH-Isoenzymaustausch im Cytosol.	113

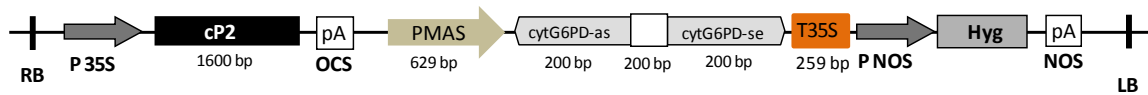
7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme.	29
Tabelle 2: Folgende Kits wurden eingesetzt und nach Herstellerangaben verwendet.	30
Tabelle 3: Verwendeter <i>E. coli</i> -Stamm.	30
Tabelle 4: Verwendeter <i>A. tumefaciens</i> -Stamm.	30
Tabelle 5: Liste der verwendeten Vektoren.	31
Tabelle 6: Im Rahmen dieser Arbeit für PCR und ortsgerichteter Mutagenese verwendete Oligonukleotidprimer; s: sense, as: antisense.	32
Tabelle 7: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im Medium für <i>E. coli</i> und <i>A. tumefaciens</i>	33
Tabelle 8: Verwendete Antibiotika und deren Endkonzentration im festen MS-Medium mit 2% (w/v) Saccharose für stabile Transformation von <i>Nicotiana tabacum</i>	47
Tabelle 9: Messpuffer.	48
Tabelle 10: Enzymextraktionspuffer.	48
Tabelle 11: Inkubationspuffer.	49
Tabelle 12: Invertase-Reaktionspuffer.	49
Tabelle 13: Extraktionspuffer.	53
Tabelle 14: Zusammensetzung von Trenngel (10%) und Sammelgel (4%).	54
Tabelle 15: Extraktionspuffer.	57
Tabelle 16: Berechnung der <i>sink</i> -Stärke von <i>source</i> -Blättern der untersuchten Tabakpflanzen.	72
Tabelle 17: Übersicht über die Bezeichnung der erstellten Doppeltransformanten.	86

7.4 Vektore

7.4.1 pZM8

Erstelltes binäres Doppelkonstrukt für *N. tabacum* [Spec^R].



7.5 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Klonierungen wurden Sequenzierungen von der Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt, anschließend erfolgten *Alignments* mit Hilfe des Programmes *ClustalW*, deren Ergebnisse hier dargestellt sind.

7.5.1 pZM8_Tabak

Alignment der Sequenzierung des Konstruktes pZM8_Tabak gegen die Sequenzen der cytosolischen RNAi-Kassette_Tab bestehend aus MAS-Promotor (pMAS), der cytosolischen G6PDH-Fragmente und dem 35S-Terminator (T35S). Die Sequenzierung erfolgte mit den Primern 11/5.

```

NtcytG6PD_RNAi      -----
pZM8_Tabak          NNNNNNCCNATANAGGTANCCANNAANNATCTGAANCTTTNNGAGATTNNNATNNGANNC 60

NtcytG6PD_RNAi      -----
pZM8_Tabak          NTTGNGAAACATNCNGGCAAACAAGNTANTGNNNNNAAGANAGATTNAAAAGNTNNNNNG 120

NtcytG6PD_RNAi      -----
pZM8_Tabak          AGAGNANGANNANATAGTNCCTNANNANTTNAANTNNNGTNNCACNNNANNNCNATNA 180

NtcytG6PD_RNAi      -----
pZM8_Tabak          NNANTNANATNNGGAGNCNCNATANATATACANNTTNTCGATTATATATGTAAATGAGTT 240

NtcytG6PD_RNAi      -----
pZM8_Tabak          -----AAGAACAATAATGGAAAGACACCCA 25
3'                  AACCWTWTNNTNNANNTAANTKNNAWAGNGGATCCAAGAACAATAATGGAAAGACACCCA 300 BamHI

*****

NtcytG6PD_RNAi      GTTTCAGGTATATTATCATTATCTCTAAAAGAGTCGAGCCGAATAGAACCCCTTTTTC 85
pZM8_Tabak          GTTTCAGGTATATTATCATTATCTCTAAAAGAGTCGAGCCGAAGAGAACCCCTTTTTC 360
*****

NtcytG6PD_RNAi      ATGCACCATGATGCTGCCATCTTCAAGGCCTCACACCAGCTCACCTCAACTCAGCGAA 145
pZM8_Tabak          ATGCACCATGATGCTGCCACTTCAAGGCCTCACACCAGCTCACCTCAACTCAGCGAA 419 atg
*****

NtcytG6PD_RNAi      GTATGATCAATCCAACCTTGTGATTTCTGAAGAAATTGTGAGACGCC----- 192

```

```
pZM8_Tabak      GTATGATCAATCCAACCTTGTGATTTCTGAAGAAATTGTGAGACGCCGTCGCACCTGCAG 479 PstI
SalI 5'
*****

T35S            CCCATCCCGCGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATC 252
pZM8_Tabak     CCCATCCCGCGGCCATGCTAGAGTCCGCAAAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATC 539
*****

T35S            TCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTC-312
pZM8_Tabak     TCTCTCTATTTTTCTCCAGAATAATGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTTC 599 T35S
*****

T35S            TTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGTGTGAGTAGTCCCAGATAAGGGAATTAGGGTT--372
pZM8_Tabak     TTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTGTATTTG 659
*****
```

Lebenslauf

Danksagung