

Biologie

**Untersuchungen zur Photosynthese und zum pflanzlichen
Kohlenhydratstoffwechsel in Tabakblättern während der Abwehr
des phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora nicotianae***

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

vorgelegt von

Hardy Schön

aus Hagen

2005

Dekan:	Prof. Dr. N. Sachser
Erster Gutachter:	Prof. Dr. E. Weis
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. B. Moerschbacher
Tag der mündlichen Prüfung:	25.11.2005
Tag der Promotion:	16.12.2005

Meinen Eltern
Erika und Siegfried Schön

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Wirtspflanze <i>Nicotiana tabacum</i> L.	1
1.2	Das Pathogen <i>Phytophthora nicotianae</i> van Breda de Haan	2
1.3	Grundlagen der pflanzlichen Pathogenabwehr	4
1.4	Pflanzliche Abwehrmechanismen	5
1.4.1	Die hypersensitive Reaktion	5
1.4.2	Reaktive Sauerstoff-Spezies	5
1.4.3	Zellwandverstärkung	6
1.4.4	Phytoalexine	8
1.5	Zusammenhang von pflanzlichem Primärstoffwechsel und Abwehr	9
1.5.1	Kohlenhydratstoffwechsel und pflanzliche Abwehr	9
1.5.2	Photosynthese und pflanzliche Abwehr	13
1.6	Ziele und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Organismen	17
2.1.1	Tabakpflanzen (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	17
2.1.2	Das Pathogen (<i>Phytophthora nicotianae</i> van Breda de Haan)	17
2.2	Geräte	17
2.2.1	Chlorophyll- <i>a</i> -Fluoreszenz Imaging	17
2.2.2	Computergesteuerte Gaswechselanlage	19
2.2.3	Mikroskope	21
2.2.4	PAM-Fluorimeter	22
2.2.5	P ₇₀₀ -Messplatz	22
2.2.6	Weitere Geräte	22
2.2.7	Chemikalien	23
2.3	Methoden	23
2.3.1	Produktion von Zoosporen	23
2.3.2	Infektion von Tabakblättern	24
2.4	Biophysikalische Untersuchungen	24
2.4.1	Imaging-Fluoreszenzanalyse der Photosynthese	24
2.4.2	Aufnahme des pflanzlichen Gaswechsels	29
2.4.3	Messungen der P ₇₀₀ Reduktionskinetik	30
2.5	Biochemische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen	30
2.5.1	Bestimmung des Chlorophyllgehalts und des Chlorophyll <i>a/b</i> Verhältnisses	30

2.5.2	RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels Northern-Blot	31
2.5.3	Nachweis der H ₂ O ₂ -Akkumulation	31
2.5.4	Präparation der Epidermis zur Analyse der stomatären Apertur	31
2.5.5	Nachweis der Callosebildung	32
2.5.6	Extraktion der apoplastidären Waschflüssigkeit	32
2.5.6.1	Bestimmung der G6PDH- und Invertase-Aktivität, des Kohlenhydrat-Gehalts und des Saccharose-Efflux	32
2.5.7	Vitalitätstest	33
3	Methodenentwicklung	34
3.1	Einführung	35
3.2	Aufbau des Mikro-Imaging-Systems	36
3.2.1	Lichtstärkenmessung	37
3.2.2	Kalibrierung der CCD-Kamera	40
3.2.3	Bildaufnahme	41
3.2.4	Kalibrierung des Mikro-Imaging-Systems	41
3.2.5	Berechnung von PET-Bildern aus Mikroskopbildern	43
3.2.6	Optimierung der Bildauflösung	47
3.2.7	Anwendungsbeispiele	49
3.2.8	Schlussfolgerungen und Ausblick	53
4	Ergebnisse und Schlussfolgerungen	55
4.1	Vorversuche	56
4.1.1	Umsteuerung des pflanzlichen Primärstoffwechsels nach Infektion mit <i>Phytophthora nicotianae</i>	57
4.1.2	Auswirkungen der G6PDH-Hemmung auf die pflanzliche Abwehr	80
4.1.3	Untersuchungen von Tabak mit veränderter G6PDH-Aktivität	83
5	Diskussion	85
5.1	Die Rolle der Photosynthese während der Pathogenabwehr	85
5.2	Metabolische Versiegelung des Infektionsorts	93
5.3	Die Rolle des OPPP während der Abwehr	99
6	Zusammenfassung	104
7	Ausblick	108
	Literaturverzeichnis	110

Abkürzungsverzeichnis I.

Φ_{PSII}	Quantenausbeute von Photosystem II
Δ	Differenz
μE	mikroEinstein (μmol photosynthetisch nutzbare Lichtquanten $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
3-PGA	3-Phosphoglycerat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
<i>Ca</i>	CO_2 -Konzentration außerhalb des Blattes [ppm]
<i>Cab</i>	Chlorophyll a/b Bindeprotein
<i>Ci</i>	CO_2 -Konzentration im Blatt [ppm]
cLSM	confokales Laser Scanning Mikroskop
DAB	3,3-Diaminobenzidin
Ery-4-P	Erythrose-4-Phosphat
et al.	et altera
F_0	Grundfluoreszenz
Fru2,6BP	Fructose-2,6-Bisphosphat
F_M	maximale Fluoreszenzausbeute nach Dunkeladaptation
F_M'	temporäre maximale Fluoreszenzausbeute während der Photosynthese
F_s	apparente Fluoreszenzausbeute während der Photosynthese
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
hpi	Hours post infection
HR	hypersensitive Reaktion
IBBP	Institut für Biotechnologie und Biochemie der Pflanzen
IfB	Institut für Botanik
IRGA	Infrarot Gasanalysator
L.	Linné
N-Glc6P	N-Acetyl-Glucosamin-6-Phosphat
<i>N. tabacum</i> L.	<i>Nicotiana tabacum</i> L.
NADP/NADPH	oxidiertes / reduziertes Nicotinadenindinukleotid
NPP1	Nekrosen-auslösendes <i>Phytophthora</i> Protein 1
OPPP	oxidativer Pentose Phosphat Weg
<i>P. nicotianae</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i> van Breda de Haan
P	Phosphat
P_{700}	Chlorophyll-a-Dimer im Reaktionszentrum von PS I
PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
PAM	Pulsamplituden-moduliertes Fluorimeter
PAR	Photosynthetisch aktive Lichtstrahlung [μE]
PC	Plastocyanin

Abkürzungsverzeichnis II.

PEP	Phosphoenolpyruvat
PET	photosynthetischer Elektronentransport
PFK	Phosphofruktokinase
PPi	Pyrophosphat
ppm	parts per million
PR	Pathogen-bezogen (pathogenesis related)
PS I / II	Photosystem I / II
q _N	nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung
q _P	photochemische Fluoreszenzlöschung
RbcS	kleine Untereinheit der RubisCO
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase / Oxygenase
SA	Salicylsäure
SLP	sättigender Lichtpuls
SNN	<i>Nicotiana tabacum</i> L. SamsunNN
SuSy	Saccharose-Synthase
WWU	Westfälische Wilhelms-Universität

Tatsächlich beginnen alle Dinge ihre Natur und ihre Erscheinung zu verändern; unsere ganze Erfahrung von der Welt ist radikal anders... Es gibt eine neue, gewaltige und tiefe Art, die Dinge zu erfahren, zu sehen, zu kennen und zu berühren.

Sri Aurobindo

1 Einleitung

Seit den Anfängen des Nutzpflanzenanbaus, der die Grundlage der menschlichen Ernährung darstellt, ist der Befall durch mikrobielle Pathogene eine Hauptursache für große Ernteverluste. Bis heute werden durch Pflanzenkrankheiten große Schäden bei der Kultivierung von Nutzpflanzen verursacht. In den meisten Fällen werden die Pflanzen durch Resistenzzüchtung oder den Einsatz von Fungiziden, Insektiziden und Pestiziden gegen Pathogenbefall geschützt. Jedoch ist der Einsatz chemischer Pflanzenschutzmittel mit vielen Risiken behaftet und es scheint daher geboten die Grundlagen der pflanzlichen Abwehr besser zu verstehen, um die Züchtung pathogenresistenter Pflanzen zu optimieren.

Neben der Erforschung des pflanzlichen Abwehrstoffwechsels und der Aufklärung abwehrrelevanter Signaltransduktionswege könnte der Untersuchung des pflanzlichen Primärstoffwechsels während der Abwehr eine ebenfalls nicht unbedeutende Rolle zukommen. Viele Prozesse des Primärstoffwechsels liefern die energetische und metabolische Grundlage für die Reaktionen der pflanzlichen Abwehr und können daher auch als Grundlage der pflanzlichen Pathogenresistenz betrachtet oder, wie im Folgenden beschrieben, möglicherweise sogar als integraler Bestandteil der Abwehrreaktionen angesehen werden. Ein besseres Verständnis dieser Prozesse könnte bei der Züchtung neuer Pflanzenlinien dazu beitragen, dass das Anlaufen pflanzlicher Abwehrprozesse unterstützt und die Effizienz der Abwehr von Pathogenen optimiert werden könnte. Daher stehen Untersuchungen der Photosynthese und des Kohlenhydrat- und Primärstoffwechsels von Tabakblättern während der Abwehr des phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora nicotianae* im Zentrum der vorliegenden Arbeit.

1.1 Die Wirtspflanze *Nicotiana tabacum* L.

Die Solanaceae *Nicotiana tabacum* L. ist eine der am häufigsten angebauten 'non-food'-Nutzpflanzen weltweit. Neben der – wenn auch zu Recht umstrittenen – wirtschaftlichen Bedeutung von Tabak als Genussmittel, könnte dieser Pflanze zukünftig auch eine wichtige Rolle in der Biotechnologie und Pharmaindustrie zukommen [Arnst (2000)]. Da die Genetik von Tabakpflanzen bereits gut untersucht und verstanden ist, ist Tabak als Produzent vieler Proteinbasierter Medikamente, Impfstoffe und verschiedener Komponenten des menschlichen Blutes sehr gut geeignet. Beispielsweise kann das Wachstumshormon Somatotropin, welches zur Behandlung von Zwergwuchspatienten dient und bislang extrem kostenintensiv produziert werden musste, in Tabakpflanzen kostengünstig hergestellt werden [Staub *et al.* (2000)]. Auch die Produktion des Spinnen Seiden Proteins ('spider silk proteins'), welches sich aufgrund seiner bemerkenswerten mechanischen Eigenschaften für viele technische Anwendungen eignet, jedoch aus Spinnen nur in geringsten Mengen zu isolieren ist, wird bereits mit gutem Erfolg in Tabakpflanzen durchgeführt [Scheller *et al.* (2001)]. Zukünftig könnte der Tabakanbau für das sog.

'drug-farming' die heutigen Anbaumengen um ein vielfaches übertreffen. Daher ist das bessere Verständnis der Interaktion dieser Nutzpflanze mit Pathogenen ein wichtiger Beitrag um einen effektiven Schutz dieser Pflanzen zu gewährleisten und Verluste möglichst gering zu halten.

Die Nutzung von Tabakpflanzen für die Untersuchungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels bei der Pathogenabwehr ist allerdings nicht nur aus wirtschaftlichen Gründen interessant. Es existieren mittlerweile etliche Tabak-Transformanten, die gezielt in ihrem Kohlenhydrat- oder Primär-Stoffwechsel verändert sind. Solche Transformanten eignen sich sehr gut um zu einem besseren Verständnis der Rolle des Primärstoffwechsels für eine erfolgreiche pflanzliche Abwehr beizutragen. Außerdem ist Tabak einfach und stabil transformierbar, so dass eine gezielte Herstellung von Transformanten möglich ist, um die Bedeutung einzelner Stoffwechselwege während der pflanzlichen Abwehr genauer zu untersuchen. Des Weiteren ist Tabak eng mit anderen wirtschaftlich bedeutsamen Nutzpflanzen, wie Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) oder Tomate (*Solanum lycopersicum* L.), verwandt. Die an dem hier untersuchten System gewonnenen Erkenntnisse könnten daher auch auf andere Interaktionen zwischen anderen Solanaceae und ihren Pathogenen übertragbar sein.

1.2 Das Pathogen *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan

Der bodenbürtige Oomycet *Phytophthora nicotianae* (*P. nicotianae*, ehem. *P. parasitica* var. *nicotiana*) ist ein weltweit verbreitetes, hemibiotrophes Pathogen von Tabak und löst die sog. Blattflecken-Krankheit ('black-shank-disease') von Tabak aus. Diese Krankheit verursacht bislang noch durchschnittliche jährliche Ertragsausfälle von ca. 2,5%, wobei einzelne Pflanzenbestände in Folge dieser Infektion sogar vollständig zerstört werden können [Tisdale & Kelley (1926)]. Neben seinem Hauptwirt kann *P. nicotianae* über 70 weitere Pflanzen, darunter viele Solanaceen der tropischen und gemäßigten Klimazonen, befallen [Erwin & Ribeiro (1996)]. Abbildung 1-1 A zeigt den Entwicklungszyklus des Oomyceten *P. nicotianae*. Dieses Pathogen produziert asexuell mobile Zoosporen, die sich, angezogen durch Signalstoffe, die am Wurzelmeristem oder an Verletzungen der Wurzel freigesetzt werden, aktiv zu ihrer Wirtspflanze bewegen können. Unter günstigen Witterungsbedingungen kann alle 72 Stunden eine neue Zoosporengeneration freigesetzt werden und zu einer epidemischen Ausbreitung des Pathogens innerhalb eines Tabakbestands führen. Sind die Umweltbedingungen ungünstig für das Überleben der Zoosporen, bildet *P. nicotianae* sexuell dickwandige Oosporen aus, welche jahrelang im Boden überdauern können. Bei erneut günstigen Wachstumsbedingungen keimen diese Sporen aus und bilden ein diploides Sporangium, aus welchem eine neue Zoosporengeneration entlassen wird. Günstige Bedingungen für die Infektion mit Zoosporen von *P. nicotianae* sind warmes, feuchtes Wetter. Typische Symptome der Blattflecken-Krankheit sind das Verrotten der Wurzeln und des Stängel-Marks sowie das schnelle Vergilben und Verwelken der Blätter durch

Wassermangel. Auch wenn die Infektion üblicherweise über die Wurzeln stattfindet, ist eine direkte Infektion der Blätter über Regentropfen möglich.

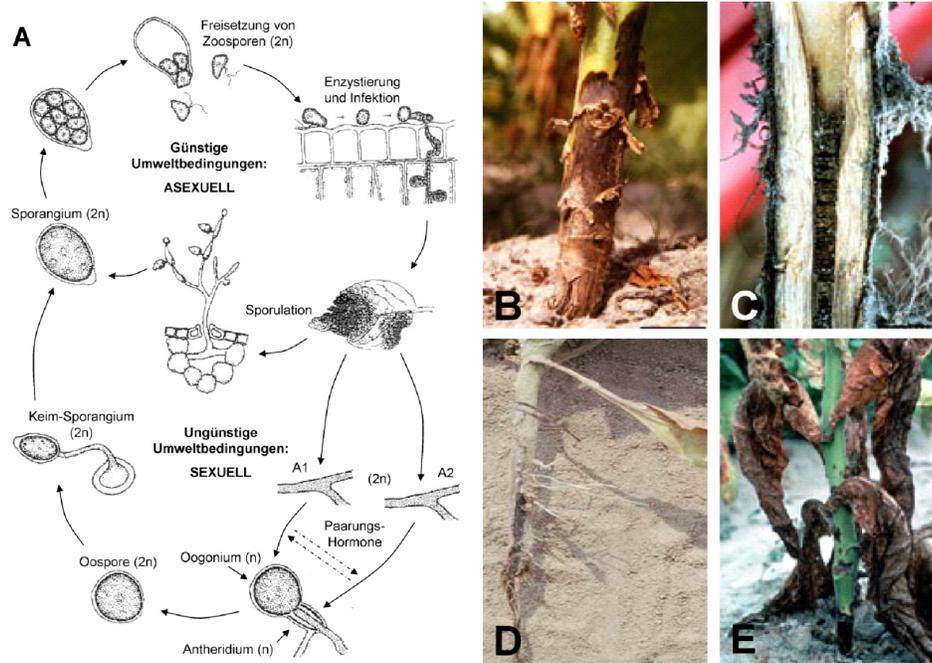


Abbildung 1-1 Entwicklung des Oomyceten *P. nicotianae* auf Tabak. (A) Schema des Lebenszyklus von *P. nicotianae* (modifiziert nach Agrios (1978)). Durch *P. nicotianae* hervorgerufene Krankheitssymptome an (B) Stängel, (C) Leitbahnen, (D) Wurzeln und (E) Blättern befallener Tabakpflanzen. Nähere Erklärungen im Text.

Viele wirtschaftlich bedeutende Pathogene von Kulturpflanzen sind Oomyceten. Alleine die durch *Phytophthora infestans* verursachte Kraut- und Knollenfäule der Kartoffel kann in feuchten Sommern Ertragsausfälle von 20 – 30% der weltweiten Kartoffelernte ausmachen [ProfilOnline N.N. (2005)]. Oomyceten wurden über viele Jahre hinweg zu den echten Pilzen (Reich: Fungi) gezählt, da ihr mycelartiger Habitus dem echter Pilze sehr ähnlich ist. Allerdings weist die Zellwand der Oomyceten Cellulose und ihre Zellmembran nur wenige oder keine Sterole auf [Judelson (1997)]. Diese Komponenten sind jedoch das Angriffsziel vieler Fungizide und toxischer Saponine bei der Abwehr pilzlicher Pathogene [Osbourn (1996)], weshalb eine effektive Bekämpfung von Oomyceten schwierig ist. Im Gegensatz zu den echten Pilzen weisen Oomyceten außerdem ein mobiles Lebensstadium – die Zoosporen – auf. Aufgrund dieser Unterschiede und phylogenetischer Untersuchungen werden die Oomyceten inzwischen dem Reich der Chromista zugerechnet, sind also näher mit den Braunalgen und Diatomeen verwandt, als mit den echten Pilzen. Die genannten Unterschiede deuten darauf hin, dass Pflanzen spezifische genetische und metabolische Mechanismen zur Abwehr von Oomyceten aufweisen müssen. Allerdings gibt es bislang nur unzureichende Informationen über Abwehr-induzierte Veränderungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels während der Abwehr von Oomyceten

1.3 Grundlagen der pflanzlichen Pathogenabwehr

Natürlicherweise sind Pflanzen ständig den Angriffen mikrobieller Pathogene ausgesetzt. Gegenüber den meisten der potentiell pathogenen Organismen sind die Pflanzen jedoch resistent, ein Phänomen welches als **Basis-** oder **Nichtwirts-Resistenz** bezeichnet wird [Prell (1996)]. Diese Pflanzen bleiben frei vom Befall solcher Pathogene und stellen daher für diese Pathogene sog. **Nicht-Wirts-Pflanzen** dar. Die Basisresistenz kann auf verschiedenen Eigenschaften der Pflanze beruhen. So können sowohl präformierte Abwehrmechanismen, wie z.B. eine besonders widerstandsfähige Kutikula oder andere strukturelle Barrieren, und verschiedene induzierbare pflanzliche Abwehrmechanismen (z.B. Phytoalexinbildung oder die hypersensitive Reaktion) zu dieser Form der Resistenz beitragen. Allerdings kann eine solche Basisresistenz auch auf eine beim Pathogen nicht vorhandene, für die erfolgreiche Parasitierung jedoch notwendige, metabolische Anpassung zurückzuführen sein. Daher führen also die Auswirkungen aller Umstände, welche eine Parasitierung einer Pflanze durch ein Pathogen unterbinden zur Ausprägung der Basisresistenz, welche daher auch als **Basis-Inkompatibilität** bezeichnet wird. Gelingt es einem Pathogen diese ersten, unspezifischen Barrieren zu überwinden wird die Pflanze zu einer **Wirtspflanze** für das entsprechende Pathogen und es besteht eine sog. **Basis-Kompatibilität** zwischen Pflanze und Pathogen.

Die Begriffe 'kompatibel' und 'inkompatibel' werden jedoch auch für Pflanze-Pathogen-Interaktionen verwendet bei denen eine Basis-Kompatibilität zwischen Pflanze und Pathogen besteht. In diesem Fall spricht man von einer **inkompatiblen Interaktion** wenn das Pathogen durch kultivar- oder rasse-spezifische Abwehrmechanismen am weiteren Befall einer resistenten Wirtspflanze gehindert wird. Das Pathogen ist in diesem Fall **avirulent**, die Pflanze **resistent**. Bei einer **kompatiblen Interaktion** erkennt die Wirtspflanze ein angreifendes Pathogen nicht oder zu spät und das Pathogen breitet sich im Gewebe der Pflanze aus. Hier kann es seinen Lebenszyklus vollenden und eine neue Sporengeneration ausbilden – das Pathogen ist **virulent**, die Pflanze **suszeptibel**. Neben hochresistenten und suszeptiblen Pflanzenkultivaren gibt es jedoch i.d.R. noch mäßig resistente Pflanzenlinien mit unterschiedlichen Abwehrstrategien. In diesen Kultivaren wird die Ausbreitung eines Pathogens häufig nicht so effizient unterbunden, wie es in hochresistenten Kultivaren der Fall ist. Daher ist es insbesondere bei mäßiger Resistenz schwierig zwischen Abwehr- und Pathogen-induzierten Änderungen im pflanzlichen Stoffwechsel zu differenzieren.

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Interaktion zwischen Tabak und *P. nicotianae* ist eine **basis-kompatible** Interaktion von Pflanze und Pathogen. Tabak ist eine **Wirtspflanze** für *P. nicotianae*, welches die Basisresistenz dieser Pflanze überwinden kann. Die hier zu beobachtenden Abwehrreaktionen der Pflanze sind also **Parasit-**, möglicherweise sogar **Kultivar-spezifisch**.

1.4 Pflanzliche Abwehrmechanismen

Bei der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen kann die pflanzliche Resistenz – egal ob Basis- oder Kultivar-, bzw. Parasit-spezifische Resistenz – durch eine Vielzahl an Abwehrreaktionen ausgelöst werden. Zu diesen Reaktionen zählen u.a. die hypersensitive Reaktion (HR), mechanische Verstärkungen der pflanzlichen Zellwand durch Einlagerung von z.B. Lignin [als Review siehe Lamb & Dixon (1997)] oder Callose [z.B. Rodriguez-Gálvez & Mendgen (1995)], die Bildung toxischer Phytoalexine [als Review siehe Hammerschmidt (1999)], die Expression verschiedener Pathogen-induzierter Proteine (pathogenesis-related = PR-Proteine) [van Loon & van Strien (1999)] sowie der 'oxidative burst', d.h. die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (reactive oxygen species = ROS), wie z.B. das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$) oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2) [Apel & Hirth (2004)].

1.4.1 Die hypersensitive Reaktion

Als HR bezeichnet man das schnelle (bis maximal 20 hpi) und lokale Absterben möglichst weniger infizierter Pflanzenzellen am Ort eines Pathogenangriffs oder auch einer abiotisch gesetzten Verwundung, das mit der Ausbildung nekrotischer Läsionen, in welchen das angreifende Pathogen eingeschlossen wird, endet [Klement (1982), Goodman and Novacky (1994), Prell (1996)]. Dieses Absterben, eine Form des programmierten Zelltods [Greenberg (1997)], welches mit einer Amputation des befallenen Gewebes verglichen werden kann, hindert ein Pathogen an der weiteren Ausbreitung in der Pflanze und führt somit zur Resistenz gegenüber dem Erreger [Dixon *et al.* (1994)]. Die genauen biochemischen Grundlagen der HR sind noch nicht zweifelsfrei geklärt, jedoch konnten Veränderungen im Membranpotential, Ionentransport und der Aktivität der Lipidperoxidasen während der HR beobachtet werden [Keppler & Baker (1989), Atkinson *et al.* (1990)]. Die HR ist bei Rasse-spezifischer Resistenz gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene die am häufigsten zu beobachtende Abwehrreaktion von Wirtspflanzen [Prell (1996)], stellt allerdings auch bei der Nichtwirts- oder Basis-Resistenz eine wichtige pflanzliche Abwehrreaktion dar [Vleeshouwers *et al.* (2000)]. So lösen z.B. von der Gattung *Phytophthora* produzierte Proteine, sog. Elicatine, die HR auch in Nichtwirts-Pflanzen der Gattung *Nicotiana* aus [Kamoun *et al.* (1993)]. Diese Form der HR wird als heterologe HR bezeichnet [Prell (1996)]. Während einer kompatiblen Interaktion wird die HR nicht oder nur schwach ausgelöst und es kann sich eine stabile Beziehung zwischen Pathogen und Pflanze ausbilden, was wiederum zur Krankheit der Pflanze führt.

1.4.2 Reaktive Sauerstoff-Spezies

ROS, wie z.B. H_2O_2 , Superoxid ($O_2^{\bullet-}$) oder Hydroxyl-Radikale (OH^{\bullet}) sind als frühe Signalmoleküle in Signalkaskaden involviert, die durch verschiedene externe und entwicklungsabhängige Stimuli aktiviert werden [Lamb & Dixon (1997), Bolwell (1999)]. H_2O_2 gilt als wichtiges Sig-

nalmolekül bei der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen und spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion Abwehr-korrelierter Gene, wie z.B. für PR-Proteine, Enzyme des Phenylpropa-
noid-Stoffwechsels oder auch für ROS-entgiftende Enzyme [Levine *et al.* (1994), Mittler *et al.*
(1999), Schenk *et al.* (2000)]. Außerdem spielt die Bildung extrazellulärer ROS, der sog. 'oxida-
tive burst', eine wichtige Rolle bei Regulation und Ablauf des hypersensitiven Zelltod-
Programms [Bolwell & Wojtaszek (1997)]. H_2O_2 ist das stabilste aller ROS-Moleküle und kann
sich durch die pflanzliche Zellwand auf benachbarte Zellen ausbreiten. Neben seiner Signal-
funktion wird H_2O_2 außerdem die Beteiligung an der verstärkten Expression des PR-1 Proteins
[Chamnongpol *et al.* (1998)], am Abwehr-induzierten Zelltod [Levine *et al.* (1994)] und beim
Abtöten eingedrungener Pathogene zugesprochen [Peng & Kuc (1992), Medhy *et al.* (1996),
Lamb & Dixon (1997)]. Außerdem fungiert H_2O_2 als Oxidationsmittel der Peroxidasen bei der
radikalische Quervernetzung von Phenylpropanen zu Lignin und ist an der Quervernetzung von
Zellwand-Proteinen beteiligt [Bradley *et al.* (1992), Heldt (1999)]. Beide Maßnahmen dienen
der Zellwandverstärkung und verhindern so die Ausbreitung von Pathogenen in der Pflanze.

Während H_2O_2 als 'second-messenger' in Pflanze-Pathogen-Interaktionen weitestgehend aner-
kannt ist [Levine *et al.* (1994)], ist seine Rolle als primäres Signalmolekül bis dato umstritten.
Während einige Untersuchungen Hinweise auf eine zentrale Rolle von H_2O_2 bei der Induktion
der HR liefern [Alvarez *et al.* (1998), Pellinen *et al.* (2002)], schließen andere Arbeitsgruppen
eine Funktion von H_2O_2 als primäres Signal bei der HR-Induktion aus. Ihren Beobachtungen
zufolge wird der abwehr-induzierte hypersensitive Zelltod nicht immer von einem starken 'oxi-
dative burst' begleitet und es gibt Elicitoren, welche zwar den hypersensitiven Zelltod, jedoch
keinen 'oxidative burst' auslösen [Yu *et al.* (1998), Dorey *et al.* (1999), Jabs (1999)].

1.4.3 Zellwandverstärkung

Die Verstärkung der pflanzlichen Zellwand ist eine häufig auftretende Maßnahme bei der Ab-
wehr mikrobieller Pathogene und bei abiotischer Verwundung. Eine Verstärkung der Zellwände
kann das weitere Ausbreiten des Pathogens auf nicht-infizierte Zellen verhindern und schützt
attackierte Zellen vor der Penetration durch Infektionsstrukturen des Pathogens, wodurch das
Pathogen an der Nährstoffaufnahme gehindert wird. Bei mechanischer Verwundung des pflanz-
lichen Gewebes kann eine Verstärkung der Zellwände die Pflanze wirkungsvoll vor Pathoge-
nangriffen an der Verletzungsregion schützen. Zu den Zellwand-verstärkenden Maßnahmen
zählen u.A. die Bildung und Einlagerung von Callose, Lignin, Suberin und anderen Polypheno-
len.

1.4.3.1 Callose

Eine schnelle und häufig zu beobachtende pflanzliche Reaktion auf Pathogenbefall ist die Bil-
dung von Papillen. Papillen sind Verdickungen der Zellwand, die ausgebildet werden um das

Eindringen von Penetrationshyphen in pflanzliche Zellen und somit den Zugang des Pathogens zu den Nährstoffen zu unterbinden [Schlösser (1983)]. Papillen bestehen größtenteils aus Callose und Lignin und werden an den Kontaktzonen pilzlicher Pathogene und der Pflanzenzelle gebildet [Schlösser (1983), Rodriguez-Gálvez & Mendgen (1995)]. Zur erfolgreichen Pathogenabwehr muss die Papillenbildung genau dann erfolgen wenn pilzliche Infektionsstrukturen in Kontakt mit der pflanzlichen Zellwand treten und versuchen diese zu durchdringen. Erkennt die Pflanze den Pathogenangriff zu spät oder bildet die Papille zu langsam aus ist diese Abwehrmaßnahme erfolglos.

Neben der Papillenbildung hat Callose jedoch noch weitere Funktionen bei der Abwehr verschiedener mikrobieller Pathogene inne, jedoch wird über die genaue Bedeutung der Callose bei der Pathogenabwehr noch kontrovers diskutiert. Während Hohl & Stossel (1976) Unterschiede in der Callosebildung resistenter und suszeptibler Kartoffel-Kultivare feststellten zeigten andere Arbeitsgruppen, dass die Callosebildung in Blättern resistenter und suszeptibler Pflanzen auftritt [Aist (1976), Cuypers & Hahlbrock (1988), Vleeshouwers *et al.* (2000)]. Während der hypersensitiven Abwehrantwort bei der Interaktion von Kartoffel und *P. infestans* wurde Callosebildung ausschließlich in der Zellwand umgebender Zellen, nicht aber in HR-Zellen beobachtet. Das gesunde Gewebe wird durch die Callosebildung vom Infektionsbereich abgeschottet und vor dem Pathogen geschützt. Bleibt die HR aus findet sich Callose nur in Papillen und sog. Krägen ('Collars') in der Nähe des sich ausbreitenden Mycel [Vleeshouwers *et al.* (2000)]. Diese Callose-Krägen sind wahrscheinlich unfertige Papillen, die vom angreifenden Pathogen durchdrungen werden konnten und sich wie ein Kragen um die Eintrittsstelle legen, das Pathogen aber nicht an der Nährstoffaufnahme und am Wachstum hindern. Es gibt jedoch auch Hinweise die darauf hindeuten, dass es durch die Ausbildung von Papillen zu einer Unterdrückung von Signalkaskaden kommen könnte, die für das Anlaufen weiterer Abwehrmaßnahmen notwendig sind [Jacobs *et al.* (2003)].

Die Bildung von Callose spielt auch eine wichtige Rolle bei der Regulation der Plasmodesmata. Es ist bereits bekannt, dass die Einlagerung von Callose in der plasmodesmalen Halsregion ('neck region') den interzellulären Transport kleiner Moleküle, Ionen und auch Kohlenhydraten drastisch einschränken kann [Olesen & Robards (1990)]. Wolf *et al.* (1991) konnten zeigen, dass die Anlagerung von Callose an den Plasmodesmata eine entscheidende Funktion in der Regulation der plasmodesmalen Ausschlussgröße hat. Auch ist die Bewegung von Farbstoffen zwischen benachbarten Zellen im Infektionsbereich TMV-infizierter Tabakpflanzen, wo Callosebildung an den Plasmodesmata auftritt, stark eingeschränkt [Susi (2000)]. Callose kann also auch die Ausbreitung von Pflanzenviren über die Plasmodesmata einschränken und scheint daher eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr inne zu haben.

1.4.3.2 Lignin und Phenole

Lignin ist nach Cellulose der zweit häufigste Naturstoff der Erde und auch in gesundem Pflanzengewebe ein wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Zellwand. Die Synthese von Phenolen und Lignin ist ein aufwendiger Prozess und erfordert die Bereitstellung großer Mengen an Reduktionsäquivalenten, eine Aktivierung des Shikimatweges und der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL) sowie von Laccase und Peroxidase.

Häufig tritt eine verstärkte Einlagerung von Lignin und anderen Polyphenolen – wie z.B. Suberin – in die pflanzliche Zellwand nach Verwundung und Infektion auf [Nicholson & Hammerschmidt (1992), Díaz und Merino (1997)]. Diese Verstärkung der Zellwand stellt für die meisten phytopathogenen Mikroorganismen eine unüberwindbare Barriere dar, die sie an der weiteren Ausbreitung im Pflanzengewebe hindert. Nur wenige Bakterien und einige Waldfülepilze sind in der Lage Lignin abzubauen [Heldt (1999)]. Hervorgerufen durch die Phenolbiosynthese geht der eigentlichen Lignifizierung und der HR eine gut zu detektierende Chemilumineszenz der betroffenen Zellen voraus [Moerschbacher *et al.* (1990), Tiburzy & Reisener (1990)].

1.4.4 Phytoalexine

Phytoalexine sind niedermolekulare, lipophile Substanzen mit antibiotischer Wirkung, welche den Abwehr-bezogenen Proteinen ('defence related proteins') zugerechnet werden. Zu den Phytoalexinen zählen Substanzen verschiedener Stoffklassen, wie Phenole, Tannine, Flavonoide, Terpenoide oder cyanogene Glucoside und ihre Synthese ist häufig schon innerhalb weniger Stunden nach Infektion nachweisbar [Prell (1996)]. In vielen Fällen stammen die Phytoalexine aus dem Phenylpropanoid-Stoffwechsel und werden als Reaktion auf Stress, Verwundung und Infektionen gebildet. Die Wirkung dieser Substanzen beruht i.d.R. auf Wechselwirkungen der Phytoalexine mit der Membran des Pathogens. Es gibt eindeutige Korrelationen zwischen der Aktivierung von Enzymen des Phenylpropanoid-Stoffwechsels – wie z.B. der PAL –, der Akkumulation von Phytoalexinen und pflanzlicher Resistenz [Rogers *et al.* (1996), Smith (1996), Barz (1997), Hammerschmidt (1999)]. Eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche Pathogenabwehr ist ein frühzeitiger und ausreichend hoher Anstieg von Phytoalexinen [Hahn *et al.* (1985)]. Auch bei einigen kompatiblen Wirt-Parasit Interaktionen konnte die Bildung von Phytoalexinen beobachtet werden, jedoch ist der Anstieg langsamer und schwächer, so dass das Pathogen nicht an der Besiedlung der Wirtspflanze gehindert wird [Prell (1996)]. Wie so oft entscheiden Geschwindigkeit und Intensität mit der eine Abwehrreaktion ausgeführt wird über Abwehr des Pathogens oder Befall der Pflanze.

1.5 Zusammenhang von pflanzlichem Primärstoffwechsel und Abwehr

Der Abwehr- und Sekundärstoffwechsel bei der pflanzlichen Abwehr ist gut beschrieben und war bereits Schwerpunkt vieler Untersuchungen [z.B. Lamb & Dixon (1997), van Loon & van Strien (1999), Bolwell (1999)]. Auch die Beteiligung des pflanzlichen Primärstoffwechsels an der Abwehr wurde bereits gut untersucht, jedoch fehlt nach wie vor ein passendes Konzept, welches die Beteiligung des pflanzlichen Primärstoffwechsels an der Pathogenabwehr befriedigend beschreibt [Conrath *et al.* (2003)]. Ein Grund für dieses Problem könnte darin liegen, dass die Änderungen des Primärstoffwechsels an verschiedenen Pathosystemen untersucht worden sind und die Grenzen von Pathogen-bedingten und Abwehr-induzierten Stoffwechseländerungen, je nach Resistenztyp, fließend und oftmals nur schwer auszumachen sind. Die vielen diskrepanten Ergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass Pflanzen verschiedene Strategien zur Abwehr unterschiedlicher Pathogene verfolgen. So könnte das hypersensitive Absterben befallener Gewebereiche zwar hinreichenden Schutz vor biotrophen Pathogenen bieten, welche auf die Versorgung durch intakte Pflanzenzellen angewiesen sind, jedoch verschiedene nekro- oder peritrophe Pathogene nicht an einer weiteren Besiedlung der Pflanze hindern oder diesen Pathogenen sogar von Nutzen sein [Govrin & Levine (2000)].

Wie bereits ausführlich geschildert ist die HR eine weit verbreitete, radikale Abwehrreaktion infizierter Pflanzenzellen. Durch das gezielte Abschotten und Abtöten infizierter Gewebereiche kann eine Pflanze das Ausbreiten eines Pathogens oftmals unterbinden und so das restliche Gewebe vor Befall bewahren. In der Regel führt die HR zum Tod der betroffenen Pflanzenzellen oder -gewebe. Die HR und die assoziiert ablaufenden Abwehrprozesse benötigen viel Energie sowie große Mengen an Reduktionsäquivalenten und Kohlenhydrat-Grundgerüsten. Allein die Biosynthese von Lignin, zur Verstärkung der pflanzlichen Zellwand, erfordert neben der Bereitstellung von Phenylalanin aus dem Shikimatweg, große Mengen an Reduktionsäquivalenten und Energie (vgl. Kapitel 1.4). Auch die abwehr-induzierte Bildung von ROS – insbesondere H_2O_2 – steigert den Bedarf an NADPH zusätzlich. Der cytosolische oxidative Pentose Phosphat Weg ('oxidative Pentose Phosphate Pathway' = OPPP) spielt daher vermutlich eine zentrale Rolle bei der Abwehr von Pathogenen, da über diesen Weg Reduktionsäquivalente für die genannten Abwehrreaktionen bereitgestellt werden könnten. Außerdem stellt der stromale OPPP Erythrose-4-P (Ery-4-P) für den Shikimatweg zur Verfügung. Das hierfür außerdem benötigte Phosphoenolpyruvat (PEP) entstammt der Glykolyse, die ebenfalls eine Voraussetzung für die respiratorische Bereitstellung von ATP darstellt.

1.5.1 Kohlenhydratstoffwechsel und pflanzliche Abwehr

In einem ausgewachsenen 'Source'-Blatt spielt der respiratorische Stoffwechsel (OPPP, Glykolyse, Citrat-Zyklus, Endoxidation), welcher die benötigten Substrate für die pflanzliche Abwehr

bereitstellen könnte, jedoch eine untergeordnete Rolle und läuft auf einem für die Eigenversorgung der Zellen nötigen Grundniveau ab [Scheideler *et al.* (2002)] (Abbildung 1-2). Der Stoffwechsel dieser Zellen ist optimal auf die Gewinnung von Kohlenhydraten aus der Photosynthese und deren Export ausgerichtet. Die Expression von Genen des respiratorischen Stoffwechsels ist in diesen Geweben stark reprimiert, während Gene des assimilatorischen Stoffwechsels stark exprimiert sind [Turgeon (1989), Topping & Leaver (1990)]. Die Regulation der Expressionsmuster erfolgt über verschiedene Faktoren, wie z.B. Licht [Thompson & White (1991)] und Metabolite, vor allem Kohlenhydrate ('sugar-sensing') [z.B. Koch (1996), Rolland *et al.* (2002)]. Übersteigt die Produktion den Eigenbedarf an Kohlenhydraten werden nicht benötigte Photoassimilate als Saccharose exportiert [Hawker (1985)] und über das Phloem zu den Verbrauchs- und Speicherorganen ('Sink'-Gewebe) transportiert. Dieses können sowohl pflanzliche Speicherorgane, wie Wurzelknollen und Samen (Speicher-'Sink'), als auch metabolisch aktive Gewebe, wie junge Blätter, Meristeme oder Reproduktionsorgane (Verbrauchs-'Sink') sein [Hawker *et al.* (1991)].

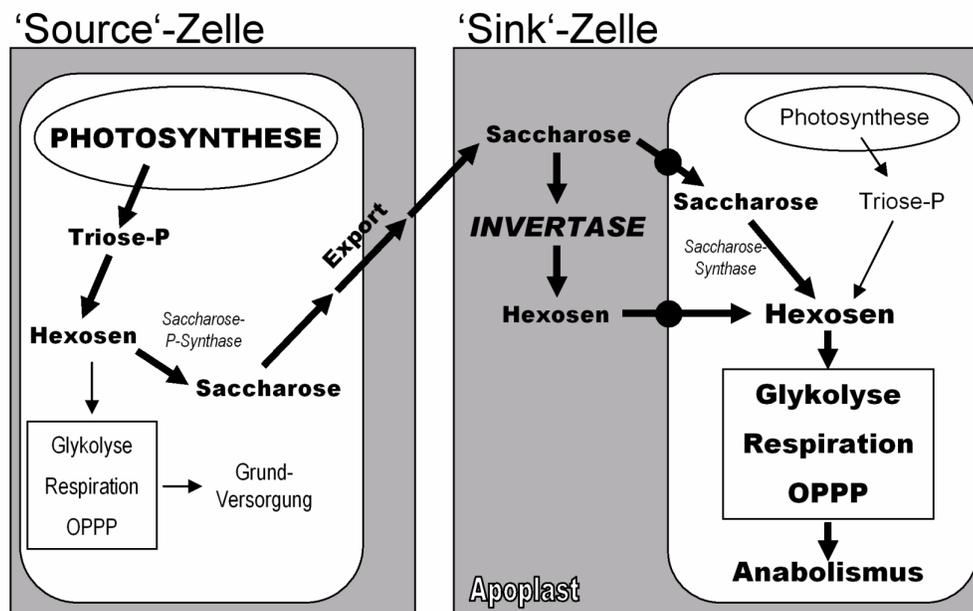


Abbildung 1-2 Schematische Darstellung des Primärstoffwechsels in ausdifferenzierten, photoautotrophen 'Source'-Zellen und heterotrophen 'Sink'-Gewebe. Modifiziert nach Esfeld (2000).

Kohlenhydrate sind in Pflanzen nicht nur Substrat für das Wachstum von 'Sink'-Gewebe, sondern haben eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Expression vieler Gene inne [z.B. Koch (1996)]. Viele 'Sink'-spezifische Gene, wie z.B. die Saccharose-Synthase ('Sucrose Synthase' = SuSy) [Salanoubat & Belliard (1989)] und die apoplastidäre Invertase [Roitsch *et al.* (1995)], können durch Glucose oder Saccharose induziert werden. Es konnte ebenfalls bereits gezeigt werden, dass Pathogen- und Stress-korrelierte Gene, wie die Chalkon-Synthase [Tsukaya *et al.* (1991)] oder den Proteinase Inhibitor II in Kartoffel [Johnson & Ryan (1990)], durch Zucker

induzierbar sind. Genau gegensätzlich erfolgt die Regulation vieler Kern-codierter photosynthetischer Gene, wie z.B. der kleinen Untereinheit der RubisCO (RbcS) und des Chlorophyll-*a* Bindeproteins (Cab), deren Expression durch Kohlenhydrate reprimiert wird [Sheen (1990), Krapp *et al.* (1993)]. Jang & Scheen (1994) haben ein Modell vorgestellt in welchem sie einen Zucker-regulierten Mechanismus postulieren, welcher als ein Schalter für die Genexpression fungiert um zelluläre Abwehrprozesse zu unterstützen. Dieses Modell wurde durch die Arbeiten von Herbers *et al.* (1996 a) an Zucker-akkumulierenden transgenen Tabakpflanzen mit überexprimierten Hefe-Invertasen unterstützt. Die Essenz dieses Modells ist, dass die Induktion der apoplastidären Invertase, z.B. durch Verwundung oder einen Pathogenangriff, in einem erhöhten Zuckergehalt und gesteigerter Pathogen-Resistenz resultiert. Gleichzeitig wird die Transkription photosynthetischer Gene reprimiert und 'Sink'-korrelierte Gene stark exprimiert.

Die extrazelluläre Invertase ist das Schlüsselenzym der apoplastidären Phloemladung und katalysiert die irreversible, hydrolytische Spaltung der Saccharose zu Glucose und Fructose [als Review siehe Roitsch *et al.* (2003)]. Die Bedeutung dieses Enzyms für die pflanzliche 'Sink-Source'-Regulation konnte an transgenen Tabakpflanzen aufgezeigt werden, die konstitutiv eine Hefe-Invertase im Apoplasten des 'Source'-Gewebes exprimieren [von Schaewen *et al.* (1990), Sonnwald *et al.* (1991)]. Bei diesen Pflanzen kommt es durch die Störung der Phloembeladung, d.h. des Saccharose-Exports, zu einer massiven Anreicherung von Photoassimilaten und zu einer Inhibition der Photosynthese in den 'Source'-Blättern [von Schaewen *et al.* (1990), Sonnwald *et al.* (1991)]. Weiterhin kommt es in diesen Pflanzen zu Störungen im ROS- und Antioxidant-Haushalt [Polle (1996)], zu einer Anreicherung von Salicylsäure ('salicylic acid' = SA), einer gesteigerten Expression abwehr-induzierter Gene (PR-Proteine) und einer erhöhten Resistenz gegenüber der Infektion mit Potato Virus Y [Herbers *et al.* (1996 a)]. Die Beteiligung der apoplastidären Invertase während der Interaktion von Pflanzen mit mikrobiellen Pathogenen konnte bereits häufig beobachtet werden [Sturm and Chrispeels (1990), Benhamou *et al.* (1991), Heisterüber (1993), Heisterüber *et al.* (1994), Scholes *et al.* (1994), Hall and Williams (2000), Herbers *et al.* (2000)]. Roitsch *et al.* (2003) postulieren darüber hinaus sogar, dass die apoplastidäre Invertase ein PR-Protein ist. Die aus der Invertasereaktion stammenden Hexosen verändern die Expressionsmuster vieler Gene [als Review siehe Smeekens (2000), Rolland *et al.* (2002)], welche wiederum Abwehr-korrelierte Gene, wie die Peroxidase und andere PR-Proteine aktivieren [Herbers *et al.* (1996 a, b)]. Interessanterweise hat sich ergeben, dass der Schwellenwert an Hexosen für die Induktion Abwehr-korrelierter Gene identisch mit dem Schwellenwert zur Repression photosynthetischer Gene ist [Herbers *et al.* (1996 b)]. Durch Zuckerfütterung zu Blattscheiben konnte unabhängig von SA eine Induktion Abwehr-korrelierter Gene ausgelöst werden [Herbers *et al.* (1996 b)]. Die aufgeführten Arbeiten sind Teil einer Beweiskette die in den 1990er Jahren entstanden ist und unter Anderem aussagt, dass es durch eine Anreicherung von

Zuckern zur Verminderung der Expression photosynthetischer Gene und einer Verstärkung des 'Sink'-Stoffwechsels kommt [Paul & Foyer (2001)]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Vorgänge in den transgenen Tabakpflanzen von hochkomplexer Natur sind und wahrscheinlich viele unabhängige Signalwege die pflanzliche Abwehr aktivieren [Herbers *et al.* (1996 a)]. Möglicherweise hat die Hefe-Invertase eine Doppelrolle inne. Zum einen verhindert sie durch ihre enzymatische Aktivität die Phloembeladung im 'Source'-Gewebe und löst einen Zuckerrückstau aus, der über das 'sugar-sensing' zu den beschriebenen Änderungen im Stoffwechsel der Pflanze, bis hin zur HR führt. Andererseits könnte die Hefe-Invertase aufgrund ihrer pilzlichen Herkunft als Elicitor wirken und über SA-abhängige Signalwege pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen.

Ehness *et al.* (1997) konnten bereits zeigen, dass die Elicitor-ausgelöste Induktion der apoplastidären Invertase der Regulation von PAL oder RbcS nicht vorhergeht, sondern in etwa zeitgleich ausgelöst wird. Nach Verwundung geht die PAL-Induktion der Induktion der apoplastidären Invertase sogar zeitlich voraus [Sturm & Chrispeels (1990), Ehness *et al.* (1997)]. Diese Daten sind gute Hinweise darauf, dass die Erhöhung des apoplastidären Glukose-Levels möglicherweise nicht das alleinige extrazelluläre Signal darstellt, welches nach einem Pathogen-Angriff die Abwehrreaktionen induziert und die Expression photosynthetischer Gene reprimiert, wie es von Jang & Sheen (1994) vorgeschlagen wurde. Es konnte gezeigt werden, dass es neben der Regulation durch Zucker noch weitere Stress-, bzw. Pathogen-induzierte Signalwege geben muss [Ehness *et al.* (1997)]. Nach Pathogenbefall konnte oftmals ein Absinken des Saccharose-Exports aus dem infizierten Gewebe, bisweilen sogar ein gesteigerter Kohlenhydrat-Import in den Infektionsbereich, beobachtet werden [Farrar (1992), Ayres *et al.* (1996)]. Die Induktion der apoplastidären Invertase und von Hexose-Transportern sind wichtige Voraussetzungen für den erhöhten Zuckertransport in diesen neuen, Abwehr-induzierten 'Sink'-Bereich (Tang *et al.* 1996).

Alle genannten Beobachtungen zeigen, dass eine enge Verknüpfung zwischen dem Kohlenhydrat-Status in infiziertem Gewebe und einer erfolgreichen pflanzlichen Abwehr besteht. Hierfür spricht auch das Phänomen der sog. pflanzlichen 'Hoch-Zucker-Resistenz' [Horsfall & Dimond (1957)] und die Tatsache, dass viele PR-Gene durch Kohlenhydrate induzierbar sind [Herbers *et al.* (1996 a, b)]. Das Zurückhalten von Kohlenhydraten am Infektionsort ist daher vermutlich eine wichtige unterstützende Maßnahme für eine erfolgreiche pflanzliche Abwehr, welche allerdings auch von eindringenden Pathogenen genutzt werden könnte [Ayres *et al.* (1996)].

Neben den beschriebenen Änderungen im pflanzlichen Kohlenhydrathaushalt kommt es während kompatiblen und inkompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen zu weiteren Umstellungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels. Neben Änderungen in der Photosynthese, die in Kapitel 1.5.2 ausführlicher betrachtet werden, treten während dieser Interaktionen drastische Änderun-

gen in Glykolyse, respiratorischer Aktivität und der stomatären Leitfähigkeit auf [als Review siehe Lucas (1998)]. In vielen Fällen konnte eine Steigerung in der Atmungsrate nach Infektion festgestellt werden, die bei vielen Interaktionen auf eine erhöhte metabolische Aktivität infizierter Zellen zurückzuführen ist [Daly *et al.* (1961), Raggi (1978), Owera *et al.* (1981), Esfeld (2000), Schön (2001), Bassanezi *et al.* (2002), als Review siehe: MacKenzie & McIntosh (1999)]. Bei Untersuchungen an kompatiblen Interaktionssystemen muss jedoch beachtet werden, dass auch ein sich ausbreitendes, stoffwechselaktives Pathogen einen erheblichen Beitrag zu einer gesteigerten Gesamt-Atmung beitragen kann.

1.5.2 Photosynthese und pflanzliche Abwehr

Die Etablierung eines heterotrophen Zell-Stoffwechsels scheint eine Grundvoraussetzung für das erfolgreiche Ablaufen der pflanzlichen Pathogenabwehr zu sein. Die Hemmung der Photosynthese könnte daher ebenfalls eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung eines heterotrophen Zellstoffwechsels im Licht sein, da einige Stoffwechselwege, wie Dunkelatmung, Glykolyse und OPPP, in direktem Konflikt mit den metabolischen Bedingungen in photoautotrophen Gewebe stehen. Beispielsweise werden Calvin-Zyklus und stromaler OPPP über das Thioredoxinsystem komplementär reguliert, um das Ablaufen eines energieverbrauchenden, unnützen Stoffwechsels ('futile cycling') zu vermeiden [Scheibe (1991)]. Zwar konnte ein Absinken der Photosynthese während der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen schon öfters beobachtet werden (s.u.), jedoch wurde die potentielle Funktion einer solchen Hemmung während der Abwehr bislang nur unzureichend diskutiert und es ist noch weitestgehend unklar über welche Mechanismen eine solche schnelle Hemmung der Photosynthese im Licht ausgelöst wird.

Sowohl bei inkompatiblen als auch bei kompatiblen Pflanze-Pathogen-Interaktionen können sehr häufig strikt begrenzte oder sich ausbreitende Chlorosen oder Nekrosen im Blattgewebe beobachtet werden. Dieses ist ein guter Hinweis darauf, dass Störungen in den Lichtsammelkomplexen und somit auch der Photosynthese eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Symptome spielen könnten [Bechtold *et al.* (2005)]. Änderungen im Level von Phytohormonen, wie Cytokinin oder auch Auxin, können in infizierten Blättern zur Beschleunigung oder Verlangsamung des Zelltods beitragen und führen unweigerlich zu Änderungen der photosynthetischen Aktivität [Pennazio & Roggero (1998), Jameson (2002)]. Daher sind die Änderungen der Photosynthese und hiermit assoziierten Prozessen während der Interaktion von Pflanzen mit Pathogenen stärker in den Focus der aktuellen Forschung gerückt. An infizierten Blättern oder Elicitor-behandelten Mesophyllzellen konnte ein Absinken des photosynthetischen Elektronentransports (PET), bei gleichzeitiger Steigerung der nicht-photochemischen und photochemischen Fluoreszenzlöschung ('quenching' = q_N und q_P), beobachtet werden [Bechtold *et al.* (2005)]. Auch in vielen andere Arbeiten konnten ähnliche Änderungen der Photosynthese nach Pathogenbefall beobachtet werden [Livne (1964); Raggi (1978); Boote *et al.* (1980); Bastiaans

(1991); Shtienberg (1992); Tang *et al.* (1996), Scholes & Rolfe (1996); Esfeld (2000), Schön (2001), Meyer *et al.* (2001); Bassanezi *et al.* (2002)]. Allerdings ist zu beachten, dass eine Hemmung der Photosynthese in fast allen Fällen erst zu sehr späten Zeitpunkten von kompatiblen Interaktionen beobachtet wurde, wenn Chlorosen oder Nekrosen sichtbar wurden. In diesen Fällen ist eine Hemmung der Photosynthese wahrscheinlich eine Folge des Absterbens infizierter Zellen. Einige Studien konnten zeigen, dass die Photosyntheserepression nicht nur auf die primäre Infektionsstelle, bzw. die Region in der sich nekrotische Läsionen ausbilden, beschränkt ist, sondern auch im umgebenden, nicht-infizierten Gewebe auftritt [Luque *et al.* (1999), Allen *et al.* (1999), El-Omari *et al.* (2001), Arias *et al.* (2003), Roloff *et al.* (2004)]. In einigen Fällen konnte auch eine Stimulation der Photosynthese nach Infektion beobachtet werden [Schmittmann (1991), Tesci *et al.* (1994), Esfeld (2000), Schön (2001), Berger *et al.* (2004)], welche sowohl anlaufende Abwehrreaktionen im infizierten Gewebe unterstützen oder auch der Versorgung eines biotrophen Pathogens während einer kompatiblen Interaktion dienen könnten. Sowohl bei kompatiblen, wie auch bei inkompatiblen Interaktionen konnte ein Absinken der photosynthetischen Aktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion beobachtet werden [z.B. Schmittmann (1991), Esfeld (2000), Schön (2001)]. Diese Effekte treten zwar zu unterschiedlichen Zeiten nach Infektion und mit unterschiedlicher Intensität auf, jedoch kann auch bei kompatiblen Interaktionen nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der verminderten PS-Aktivität auf abwehr-korrelierte Umstellungen des pflanzlichen Stoffwechsels zurückzuführen und nicht nur eine Folge des sich ausbreitenden Pathogens ist. Diese Problematik gilt natürlich auch für viele andere Abwehr- oder Pathogen-induzierte Stoffwechseländerungen. Die Änderungen der photosynthetischen Aktivität könnten daher möglicherweise auch von der Ernährungsweise und der Infektionsstrategie des jeweiligen Pathogens abhängen.

In der jüngeren Vergangenheit konnte einem Absinken der photosynthetischen Aktivität, insbesondere der Reduktion in der CO₂-Assimilationsrate, eine mögliche Rolle während der Pathogenabwehr zugeschrieben werden. Ein Verschließen der Stomata könnte in infizierten Blattbereichen dazu führen, dass die Anregungsenergie den Lichtbedarf der CO₂-Fixierung übersteigt ('excess excitation energy' = EEE) und es hierdurch zu einer verstärkten Produktion von ROS kommen könnte [Mateo *et al.* (2004)]. So könnte z.B. Singulett-Sauerstoff (¹O₂) als Nebenprodukt einer Überenergetisierung im Reaktionszentrum von PS II oder den Antennensystemen entstehen. Superoxid (O₂) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) könnten als Nebenprodukt der Photo-Reduktion von molekularem Sauerstoff am PS I gebildet werden (Mehler-Reaktion). Indirekt könnte auch die Produktion von H₂O₂ durch die Reaktion der Glycolat-Oxidase in den Peroxisomen, als Folge verstärkter Photorespiration ansteigen [Asada (1999), Niyogi (1999), Fufezan *et al.* (2002), Bechtold *et al.* (2005)]. Eine weitere mögliche Funktion einer Photosynthese-Hemmung und der daraus resultierenden Störung im Kohlenhydrathaushalt betroffener Zellen,

könnte die Induktion Abwehr-induzierter Gene durch lösliche Zucker sein (vgl. Kapitel 1.5.1). Es wurde auch bei verschiedenen Pathosystemen Veränderungen der Transpirationsrate nach Infektion beobachtet [Owera *et al.* (1981), Ephrath *et al.* (1989), McGrath & Pennypacker (1990), Shtienberg (1992), Bassanezi *et al.* (2002)]. Ein Absinken der Transpirationsrate ist in vielen Fällen die Folge von verminderter stomatärer Leitfähigkeit. Bei kompatiblen Interaktionen ist ein solches Absinken häufig auf eine Störung des Wassertransports durch das sich ausbreitende Pathogen zurückzuführen. Während der Abwehr von Pathogenen könnte ein Verschließen der Stomata das Eindringen von Pathogenen durch die Spaltöffnungen unterbinden und somit die Pflanze vor weiterem Befall schützen.

1.6 Ziele und Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit

Obwohl bereits einige Aspekte des pflanzlichen Primärstoffwechsels während der Interaktion von Pflanzen und Pathogenen untersucht worden sind, sind Interpretationen und Vergleiche der Reaktionen aufgrund der Vielfalt der untersuchten Interaktionen, Infektionsstrategien und Abwehrantworten nur bedingt möglich. So ist es bei vielen Untersuchungen schwierig zwischen Abwehr- und Pathogen-induzierten Stoffwechseländerungen während einer Interaktion zu differenzieren.

In der vorliegenden Arbeit soll daher zunächst ein Pathosystem verwendet werden (*P. nicotianae* und das hochresistente Tabakkultivar *N. tabacum* L. cv SNN) bei welchem die Wirtspflanze bereits kurze Zeit nach Infektion die Induktion von Abwehrreaktionen zeigt und die Abwehr i.d.R. bereits nach ca. 24 hpi mit dem hypersensitiven Zelltod abgeschlossen ist. Da bei diesem System die Entwicklung des Pathogens bereits frühzeitig unterbunden wird und es nicht zur Ausbreitung des Pathogens über den primären Infektionsort hinaus kommt, können viele Änderungen im pflanzlichen Primärstoffwechsel eindeutig auf die pflanzliche Abwehr zurückgeführt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit soll überprüft werden, ob einige der bereits beobachteten Umstellungen des Primärstoffwechsels – insbesondere der Photosynthese – die Abwehr nicht nur begleiten, sondern dazu dienen, die anlaufenden Abwehrprozesse metabolisch zu unterstützen und so die notwendigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Abwehrantwort schaffen. Die zentrale Frage dieser Arbeit ist also: Welche Rolle spielt die Photosynthese im Konzert der Stoffwechseländerungen und Abwehrreaktionen?

Ein besonderes Augenmerk soll bei diesen Untersuchungen auf der frühen Phase der anlaufenden pflanzlichen Abwehrprozesse liegen, da insbesondere während dieser Phase ein autotropher Zellstoffwechsel und somit auch die Photosynthese, den Erfordernissen der anlaufenden Abwehr entgegenstehen. Konkret stellen sich also die Fragen, ob und wie es zu einer schnellen und effizienten Hemmung der Photosynthese in infizierten 'Source'-Zellen kommen kann, wodurch die

Voraussetzungen zur Etablierung eines heterotrophen Abwehr-Stoffwechsels im Licht geschaffen werden.

Die hypersensitive Reaktion ist in der Regel ein hochlokalisierter Abwehrprozess und häufig auf Zellen oder Gewebsbereiche beschränkt, die direkt vom Pathogen angegriffen werden oder mit Elicitoren in Kontakt kommen. Mit dem bildgebenden Chlorophyll-*a*-Imaging soll makro- und mikroskopisch überprüft werden, ob Veränderungen der photosynthetischen Aktivität ebenso lokal auftreten wie einzelne Abwehrreaktionen (z.B. hypersensitiver Zelltod oder ROS-Produktion), oder ob es systemische Reaktionen in der Umgebung infizierter Zellen gibt, die die Abwehrprozesse unterstützen. Ferner soll überprüft werden, welche Prozesse für die strikte Lokalisation von Abwehrreaktionen und abwehr-korrelierten Änderungen des Primärstoffwechsels verantwortlich sein könnten.

Während der pflanzlichen Abwehr wird oftmals ein 'Sink'-artiger Metabolismus in infizierten Zellen etabliert. Daher soll untersucht werden, ob es auch bei der inkompatiblen Interaktion von *P. nicotianae* und SNN zu derartigen abwehr-induzierten Stoffwechselumstellungen kommt (z.B. Atmung, OPPP). Allerdings erfordert das Anlaufen dieser Prozesse im Licht vermutlich eine Hemmung der Photosynthese in und des Kohlenhydrat-Exports aus den betroffenen Zellen. Ein 'Hoch-Zucker-Status' infizierter Zellen oder die Versorgung infizierter Zellen mit Kohlenhydraten zur Unterstützung der Abwehr könnte allerdings nicht nur den Abwehrprozessen, sondern auch einem angreifenden Pathogen zugute kommen, da der Transport von Kohlenhydraten in der Regel über den Apoplasten erfolgt und diese einem angreifenden Pathogen hier zugänglich wären. Es soll daher überprüft werden, ob eine effektive metabolische Abschottung infizierter Zellen, in Verbindung mit einer Umstellung des Stoffwechsels möglicherweise ausreichend ist um autonom Energie, Reduktionsäquivalente und Metabolite für die Abwehrprozesse bereitzustellen. Untersuchungen an verschiedenen resistenten Tabaklinien und Tabaktransformanten mit Störungen im Kohlenhydrat- und Primärstoffwechsel, könnten zudem weitere Einblicke in die Bedeutung einzelner Stoffwechselwege für eine erfolgreiche Abwehrantwort geben.

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein breites Spektrum verschiedener Methoden eingesetzt werden. Hierzu zählen z.B. bildgebendes Chlorophyll-*a*-Imaging (seit dieser Arbeit auch auf zellulärer Ebene, siehe Kapitel 3), Messungen der P_{700} -Reduktionskinetik und des pflanzlichen Gaswechsels, Expressionsanalytik mittels Northern-Blot, biochemischen Untersuchungen von Enzymaktivitäten und Metaboliten sowie histochemische Untersuchungen (Fluoreszenzmikroskopie und confokale Laser-Scanning-Mikroskopie). Durch die Kombination dieser Methoden sollte es möglich sein, eine grundlegende Charakterisierung von pflanzlichem Primärstoffwechsel und Abwehrprozessen durchzuführen. Hierdurch sollte eine Aufklärung der zeitlichen Abfolge und räumlichen Korrelation vieler Abwehr-induzierter Prozesse und ihrer Bedeutung für die Abwehr ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

2.1.1 Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.)

Für die Versuche wurden folgende Tabaklinien verwendet: Das hochresistente Kultivar *Nicotiana tabacum* L. cv SamsunNN (SNN; Vereinigte Saatzuchten e.G., Ebstorf), das suszeptible Kultivar *N. tabacum* L. cv Xanthi (Xanthi) und eine Xanthi-Transformante welche eine NADPH-tolerante P2-Isoform (plastidär) der G-6-PDH konstitutiv im Cytosol exprimiert (cP2-Pflanzen). Der Xanthi-Wildtyp und die Transformanten wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Antje von Schaewen (IfB, WWU Münster) zur Verfügung gestellt. Alle Pflanzen wurden im institutseigenen Gewächshaus angezogen und mindestens drei Wochen vor Versuchsbeginn in Klimakammern überführt. Die Pflanzen wurden in Einheitserde Typ ED 73 (Gebr. Patzer GmbH & Co KG, Sinnetal-Jossa, Deutschland) angezogen und regelmäßig mit Hackaphos gelb (7,6% Nitratstickstoff, 12,4% Ammoniumstickstoff, 16% wasserlösliches Kaliumoxid) gedüngt. Die kontrollierte Anzucht in den Klimakammern erfolgte bei einem Licht-/Dunkel-Rhythmus von 14/10 h und einer Temperatur von 24°C (Tag), bzw. 22°C (Nacht). Die Anzucht-Lichtintensität betrug ca. 350 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Für die Untersuchungen wurden sechs bis acht Wochen alte Tabakpflanzen, mit ca. fünf ausgewachsenen source-Blättern verwendet.

2.1.2 Das Pathogen (*Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan)

Die Stammhaltung des Oomyceten *Phytophthora nicotianae* van Breda de Haan (*P. nicotianae*) Isolat 1828 (DSMZ GmbH, Braunschweig, Deutschland) erfolgte auf geklärtem Tomatensaft-Agar bei 24°C [v. Broembsen & Deacon (1996)]. Der Oomycet wurde alle zwei Wochen von dicht bewachsenen Platten aus auf neue V8-Platten überimpft und die Petrischalen wurden anschließend mit Parafilm luftdurchlässig verschlossen.

2.2 Geräte

2.2.1 Chlorophyll-a-Fluoreszenz Imaging

Das in dieser Arbeit eingesetzte Imaging-System basiert grundsätzlich auf dem von Dr. Katharina Siebke entwickelten und beschriebenen System [Siebke & Weis (1995 a)]. In Abbildung 2-1 ist der Aufbau des hier verwendeten, leicht modifizierten Imaging-Systems schematisch dargestellt und wird im Folgenden detailliert beschrieben.

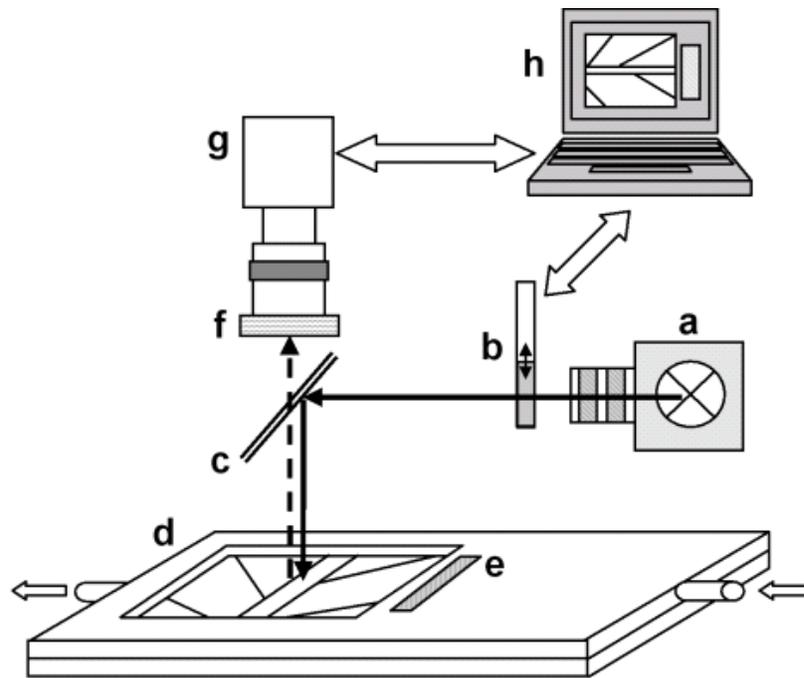


Abbildung 2-1 Schematische Darstellung des Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz Imaging-Systems (modifiziert nach Siebke & Weis (1995 a)). (a) Diaprojektor mit HMI-Lampe, (b) Shutter mit NG-Filtern zur Einstellung der Lichtintensität (0-3000 μE), (c) halbdurchlässiger Teilerspiegel, (d) Sandwich-Blattkuvette, (e) Fluoreszenzstandard, (f) Schott RG 665-Filter, (g) CCD-Videokamera, (h) Computersteuerung und Datenerfassung. Nähere Erläuterungen im Text.

- a) Die Anregung von Photosynthese und Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz erfolgte mit einem Hochleistungs-Diaprojektor (Götschmann Diaprojektoren, München, Deutschland) mit 1200 W HMI-Lampe (Osram, München, Deutschland). In den Anregungs-Strahlengang sind Wärmeschutzfilter Schott KG1, OCLI-Hitzeschutzfilter sowie Blaufilter Corning 9782 und Schott BG18 eingebaut (alle Fa. Schott, Mainz, Deutschland).
- b) Die Einstellung verschiedener Lichtintensitäten erfolgte über verschiedene Neutral-Graufilter des Typs Schott NG (Fa. Schott, Mainz, Deutschland). Der Schiebeverschluss ('Shutter') vor dem Strahlengang des Projektors kann über den Bildverarbeitungsrechner angesteuert und pneumatisch geöffnet und geschlossen werden (Eigenbau der Werkstatt des IfB; Herr Werner Rolf und Herr Harald Pohlmann). Die Bestimmung der Lichtintensitäten erfolgte mit einem LI-COR Quantum-Radiometer / Photometer LI 189 mit Quantum-Sensor LI 190 SZ (LI-COR, Lincoln, NE, USA).
- c) Ein halbdurchlässiger Teilerspiegel lenkt das Anregungslicht ($\lambda < 630 \text{ nm}$) auf das zu untersuchenden Blattstücks in der Blattkuvette. Vom Blatt emittiertes, längerwelliges Chlorophyll-*a*-Fluoreszenzlicht ($\lambda > 660 \text{ nm}$) kann den Teilerspiegel passieren und zur CCD-Kamera gelangen.

- d) Die Sandwich-Küvetten (Eigenbau der Werkstatt des IfB; Herr Werner Rolf) bieten etliche Vorteile gegenüber käuflich zu erwerbenden Küvetten-Systemen. Die eingebaute Kühlung ermöglicht es auch bei verschiedenen Lichtintensitäten eine konstante Messgas- und Blatt-Temperatur aufrecht zu erhalten. Die laminare Luftströmung in der Küvette sowie das kleine Innenvolumen sorgen für einen schnellen und vollständigen Gasaustausch und erlauben daher eine schnelle und genaue Gaswechsellmessung. Die Temperierung von Messgas und Blattküvette erfolgte mit einem Kryostaten Lauda RM6 (Lauda, Königshofen, Deutschland).
- e) Auf der Küvette ist ein Fluoreszenzstandard (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) angebracht. Die Intensität des von diesem Standard emittierten Fluoreszenzlichts hängt streng linear von der Anregungslichtintensität ab, wodurch eine Normierung der aufgenommenen Chlorophyll-*a*-Fluoreszenzbilder vor den nachfolgenden Berechnungsschritten erfolgen kann.
- f und g) Zur Aufnahme der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz des PSII wurde ein aus mehreren Einzelkomponenten bestehendes Videokamerasystem verwendet. Eine hochempfindliche 8-bit CCD-Kamera KP M1E/K (Hitachi Denishi Ltd., Tokio, Japan) ist mit einer lichtstarken, manuellen 18-108 mm Zoom-Optik und einem vorgeschalteten Rotfilter Schott RG 665 (Schott, Mainz, Deutschland) ausgerüstet. Der RG 665 soll für einen möglichst vollständigen Ausschluss von langwelligem Streulicht sorgen.
- h) Für die Erfassung der von der CCD-Kamera aufgenommenen Bilder ist der Messrechner mit einem „Overlay Frame Grabber“ ITI OFG-KIT-C2-AT (Stemmer PC-Systeme, Puchheim, Deutschland) mit einer Auflösung von 256 Graustufen ausgerüstet. Dieser Rechner steuert außerdem die Belichtung während der Bildaufnahme. Die Steuer- und Aufnahmesoftware „Mess99“ und die Bild-Analysesoftware wurden von Frau Dr. Katharina Siebke (ehem. IfB, WWU Münster) programmiert und fortwährenden Verbesserungen unterzogen. Die Beschriftung der Fluoreszenzaufnahmen, weiterführende Berechnungen und die Erstellung einer Falschfarbenskala für die 256 Graustufen erfolgten mit dem Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS® V. 6.51 (MediaCybernetics, Silver Spring, MD, USA).

2.2.2 Computergesteuerte Gaswechselanlage

Zur simultanen Analyse von Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz und des pflanzlichen Gaswechsels wurde das Imaging-System so konzipiert, dass eine gleichzeitige Aufnahme von Fluoreszenzdaten und dem Gasaustausch des Blattes ermöglicht wird. Hierzu wurde von Frau Dr. Katharina Siebke (ehem. IfB, WWU Münster) ein Zweistrom-Gaswechselsystem in das oben beschriebene System integriert (Abbildung 2-2).

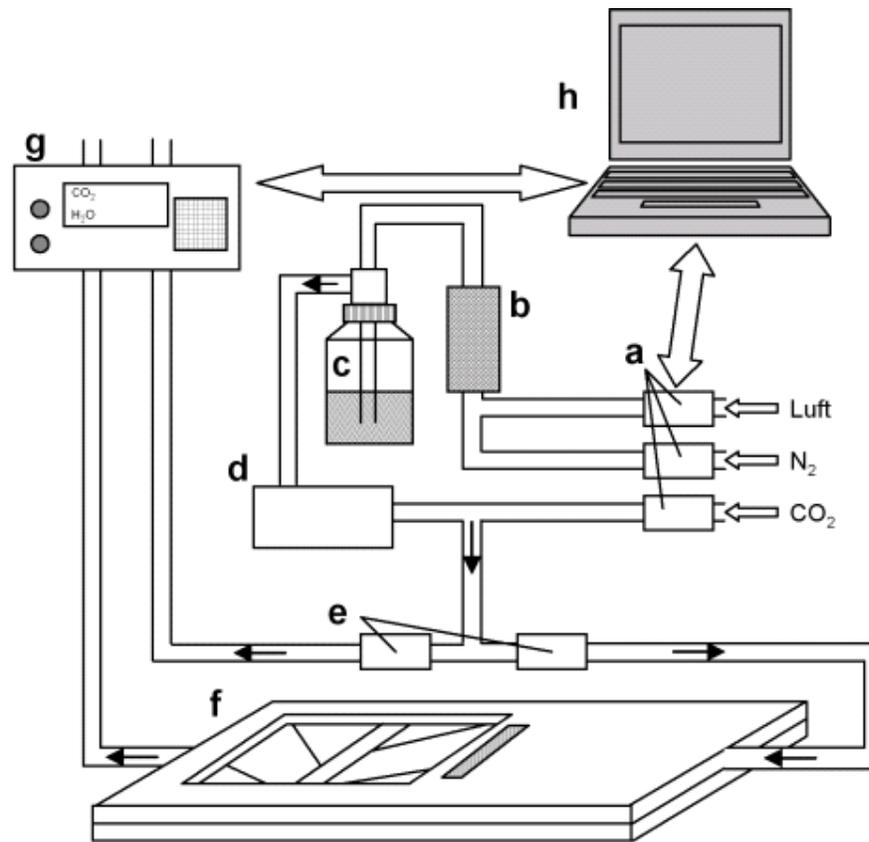


Abbildung 2-2 Schematische Darstellung des Zweikanal-Gaswechsellmess-Systems. (a) Gasflusskontrollelemente, (b) CO₂-Adsorber, (c) Gasbefeuchtung, (d) Kältefalle, (e) Gasflussmesselemente, (f) klimatisierte Blattkuvette, (g) Infrarot-Gasanalysator (IRGA), (h) Computersteuerung und Datenerfassung. Nähere Informationen im Text.

- a und b) Das Messgas wird, zur genauen Reproduzierbarkeit der Gaszusammensetzung, aus CO₂-freier Druckluft, Stickstoff und CO₂ zusammengemischt. Die Gasmischung erfolgte computergestützt über Gasflusselemente ('mass flow controller'; Tylan General GmbH, Eiching, Deutschland). Somit kann die O₂-Konzentration zwischen 2 und 21%, der CO₂-Partialdruck zwischen 0 und 1000 ppm stufenlos reguliert werden.
- c und d) Das Messgas wird durch eine Gaswaschflasche geleitet und mit Wasser gesättigt. Anschließend wird die relative Feuchte des Messgases über eine Kältefalle mit Taupunktspiegel (Typ: KF 18/2 mit Temperaturregler KR-KW 12/2; Heinz Walz GmbH, Eifeltrich, Deutschland) eingestellt.
- e bis g) Das Messgas wird gleichmäßig auf zwei Gaswege (Messgasstrom und Referenzgasstrom) verteilt. Die Aufteilung wird mittels zweier Gasflussmesselemente ('mass flow meter'; Tylan General GmbH, Eiching, Deutschland) permanent überwacht und vor Messbeginn exakt justiert. Die Gasflussmesselemente dienen außerdem dazu die Dichtigkeit des Systems fortwährend zu überwachen. Das Messgas fließt durch die Blattkuvette zu einem Infrarot-Gas-Analysator (IRGA) LI-COR CO₂/H₂O Analyzer LI 6262

(LI-COR, Lincoln, NE, USA), während der Referenzgasstrom über ein Ausgleichsgefäß gleichen Volumens zum Gasanalysator geleitet wird. Somit ist sichergestellt, dass Referenz- und Analysegas (vormals Messgas) zeitgleich am IRGA ankommen und die CO₂- und H₂O-Differenz korrekt bestimmt werden. Die verwendeten Blattküvetten wurden von Herrn Werner Rolf (ehem. Werkstatt des IfB, WWU Münster) angefertigt und bieten neben einem kleinen Innenvolumen, das für schnelle und genaue Gaswechselfmessungen von Vorteil ist, ein effektives Kühlsystem, welches selbst bei hohen Lichtstärken eine konstante Temperierung des Messgases gewährleistet. Die Temperierung von Messgas und Blattküvette erfolgt mit einem Kryostaten Lauda RM6 (Lauda, Königshofen, Deutschland).

- h) Die Steuerung des Systems sowie die Aufnahme der Messdaten erfolgte computergestützt, über A/D- und D/A-Konverter DT2814 (Data Translation, Biethem-Bissingen, Deutschland) und PCI20093W-1 (Intelligent Instrumentation GmbH, Leinfeld-Echterdingen, Deutschland) mit DiaDago-Software (Gesellschaft für Strukturanalyse mbH, Aachen, Deutschland).

2.2.3 Mikroskope

Als Basis für das Mirko-Fluoreszenz-Imaging-System (siehe Kapitel 3) und für histologische Untersuchungen diene ein Hochleistungs-**Fluoreszenzmikroskop vom Typ Leica DMRBE** (Leica, Wetzlar, Deutschland). Der grundsätzliche Aufbau dieses Mikroskops ist in Abbildung 3-1 dargestellt und beschrieben. Zusätzlich zu den dort aufgeführten Komponenten zur Messung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz stehen für fluoreszenzmikroskopische Anwendungen noch drei weitere Filtersets mit folgenden Spezifikationen zur Verfügung:

A: Anregung BP 340 – 380 nm, Teilerspiegel RKP 400 nm, Sperrfilter LP 425 nm

L5: Anregung BP 450 – 490 nm, Teilerspiegel RKP 510 nm, Sperrfilter BP 515 – 560 nm

I3: Anregung BP 450 – 490 nm, Teilerspiegel RKP 510 nm, Sperrfilter LP 515 nm

Zur Aufnahme der Mikroskop-Bilder stehen zwei Kamera-Systeme zur Verfügung. Eine hochempfindliche 12 bit, s/w CCD-Kamera (Typ: SensiCam; PCO AG, Kelheim, Deutschland) dient vorwiegend zur Aufnahme der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz und zur Erfassung sehr schwacher Fluoreszenzsignale. Des Weiteren ist eine Farb-CCD-Kamera (Typ: PixelFly; PCO AG, Kelheim, Deutschland) am Mikroskop angeschlossen. Diese Kamera ermöglicht die farbgetreue Aufnahme verschiedener Chomophore und Fluoreszenz-Farbstoffe.

Außerdem stand für die genaue Lokalisation der frühen Callosebildung während der Abwehr ein **confokales Laser-Scanning-Mikroskop (cLSM)** vom Typ Leica TCS SP2 (mit inversem Leica DM IRB-Mikroskop) zur Verfügung (alles Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Anregung der Anilin-Blau gefärbten Callose erfolgte mit einem blauen Dioden Laser ('blue diode Laser'; Leica,

Wetzlar, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 405 nm. Die Detektionsbandbreite für die emittierte Anilin-Blau-Fluoreszenz lag zwischen 510-520 nm. Die Beobachtungen erfolgten mit einem 63x Wasserimmersions-Objektiv (HCX APO L U-V-I 0.90 W 63x 2,2 nm (Leica, Wetzlar, Deutschland).

2.2.4 PAM-Fluorimeter

Für einige Kontrollexperimente und Kalibrationsmessungen wurden neben den bildgebenden Methoden auch spektroskopische Messungen der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz eingesetzt. Diese Analysen wurden mit einem PAM 101 Spektroskop mit ED-101 Emitter-Detektor-Einheit durchgeführt (alles Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland). Die aktinische und sättigende Beleuchtung erfolgte mit Wolfram-Halogenlampen des Typs Schott KL 1500 electronic (Schott, Mainz, Deutschland).

2.2.5 P₇₀₀-Messplatz

Zur Messung der P₇₀₀-Reduktionskinetiken wurde folgender experimenteller Aufbau verwendet. Ein PAM 101 Spektroskop (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) welches mit einem Computer zur Steuerung und Datenerfassung verbunden ist. Das P₇₀₀-Absorptionssignal wurde mit dem Zweiwellenlängen- ($\Delta\lambda$ 810-860 nm) puls-modulierten Detektorkopf P700DW erfasst (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland).

2.2.6 Weitere Geräte

2.2.6.1 Zentrifugen

- Eppendorf Centrifuge 5810 R mit Rotor A-4-62 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
- Eppendorf Centrifuge 5417 R mit Rotor F45-30-11 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2.6.2 Photometer

- Hitachi U-2810 Spectrophotometer und U-3010 Spectrophotometer mit 'Headon'-Photomultiplier (Hitachi, Tokio, Japan)
- Eppendorf Photometer 1101 M mit Kompensationsschreiber 6521 (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)

2.2.6.3 pH-Elektrode

Knick Digital pH-Meter 646 (Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland)

2.2.6.4 Blattscheibenelektrode

Blattscheibenküvette LD 2 mit Gasphasen O₂-Elektrode (Clark-Typ) (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, England), mit Schreiber BD 111-40 /-41 (Kipp & Zonen, Delft, Niederlande).

2.2.6.5 Scanner

Epson Perfection 1260 / 1660 Photo (Seiko Epson Corporation, Nagano, Japan).

2.2.6.6 Infiltrationszange

Zur Injektion von Soprensuspensionen oder anderen Wirkstoffen in das Blattmesophyll wurden (nach einem von Prof. Dr. B. Moerschbacher (IBBP, WWU Münster) freundlicherweise zur Verfügung gestellten Modell) in der institutseigenen Werkstatt hergestellte, modifizierte Chirurgenzangen verwendet (Abbildung 2-3). Um das Blattgewebe nicht zu stark zu verletzen und sicherzustellen, dass die zu injizierende Lösung vollständig ins Blatt gelangt sind auf beiden Seiten Silikonpolster angebracht.

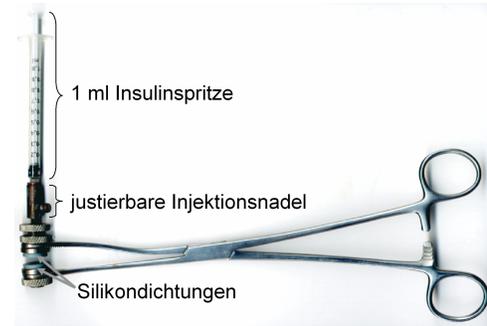


Abbildung 2-3 Modifizierte Chirurgenzange zur Injektion von Zoosporen ins Blattgewebe.

2.2.6.7 Digitalkamera

Zur Dokumentation der Infiltrationsbereiche und zur Aufnahme Abwehr- oder Infektionsbedingter Veränderungen wurde eine digitale Spiegelreflexkamera vom Typ Nikon D 100 (Nikon Corporation, Tokio, Japan) verwendet.

2.2.7 Chemikalien

Alle Chemikalien, Enzyme und Gase für die hier beschriebenen Untersuchungen wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), J.T. Baker B.V. (Deventer, Niederlande), Sigma-Aldrich (St- Louis, MO, USA), Biomol Feinchemikalien GmbH (Hamburg, Deutschland), Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Deutschland), Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim, Deutschland), F. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Schweiz), Serva (Heidelberg, Deutschland), Westfalen AG (Münster, Deutschland).

2.3 Methoden

2.3.1 Produktion von Zoosporen

Die Produktion der Zoosporen erfolgte unter sterilen Bedingungen nach der von v. Broembsen & Deacon (1996) beschriebenen Methode. Die Freisetzung der Sporen erfolgt in sterilem Leitungswasser. Nach Auszählung der intakten (= mobilen) Sporen mit einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer und deren Einstellung des gewünschten Sporentiters (i.d.R. 1000 Zoosporen ml⁻¹) kann diese Suspension direkt zur Infektion von Tabakpflanzen genutzt werden. Zur Aufbewahrung der Sporen werden diese aliquotiert, in Eppendorf-Gefäßen schock-gefroren und bei -20°C gelagert. Die eingefrorene Sporensuspension kann noch ca. drei Wochen nach Produktion verwendet werden.

2.3.2 Infektion von Tabakblättern

Die Infektion von Tabakblättern erfolgte nach der Methode von Colas *et al.* (2001). Hierbei werden kleine Blattbereiche ausgewachsener source-Blätter mit der Sporensuspension infiltriert. Der Sporentiter dieser Suspension beträgt ca. 1000 Zoosporen ml^{-1} . Diese Infektionsmethode bietet den Vorteil, dass eine gleichmäßige Infektion aller Zellen und ein synchronisierter Infektionsbeginn im Infiltrationsbereich ermöglicht werden. Mit dieser Methode ist es möglich den Infektionsbereich exakt auf die jeweiligen Versuchsanforderungen abzustimmen. In das Kontrollgewebe wurde anstelle der Sporensuspension steriles Leitungswasser injiziert, um Infiltrationsbedingte Effekte auszuschließen. Die Infiltration der Tabakblätter erfolgte i.d.R. eine Stunde nach Beginn der Lichtperiode. Alle Lösungen und Suspensionen wurden mittels einer Infiltrationszange (modifizierte Chirugenzange, Abbildung 2-3) in den Apoplasten des Tabakmesophylls injiziert.

2.4 Biophysikalische Untersuchungen

2.4.1 Imaging-Fluoreszenzanalyse der Photosynthese

Die bildgebende Analyse photosynthetischer Parameter von lokal infizierten Tabakblättern erfolgte durch die Aufnahme der von Photosystem II (PS II) emittierten Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz mittels eines computergesteuerten Kamerasystems und angeschlossener Bildverarbeitung (Abbildung 2-1). Alle Fluoreszenzmessungen wurden unter genau kontrollierten Bedingungen (Lichtstärke, Temperatur, relative Feuchte und Gaszusammensetzung) parallel zu den Gaswechsellmessungen durchgeführt.

Zur bildgebenden Analyse der Photosynthese wurde die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz sowohl während der aktinischen Belichtung (stationäre Fluoreszenz, F_S), als auch während des kurzzeitigen sättigenden Lichtpulses (temporäre Maximal-Fluoreszenz, F_M') aufgenommen. Sowohl für die aktinische, wie auch die sättigende Belichtung wurde ein Hochleistungs-Diaprojektor mit HMI-Lampe verwendet, der durch einen Blaufilter nur Licht einer Wellenlänge kleiner 630 nm emittiert und dessen Lichtintensität über Neutral-Grau Filter reguliert wurde. Die Intensität der sättigenden Lichtpulse (SLP) (Shutter „offen“, ohne Filter) lag, abhängig vom genauen Aufbau des Messsystems, zwischen 2400 und 3000 μE (μE : MikroEinstein = μmol photosynthetisch nutzbare Lichtquanten $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Die Intensität der aktinischen Belichtung (Shutter 'geschlossen', mit NG-Filtern) lag, je nach Messverfahren, zwischen 270 μE (Anzuchtsbedingungen) und 820 μE (nahezu sättigende Lichtstärke). Durch den pneumatisch betriebenen „Shutter“ ist es möglich schnell zwischen den verschiedenen Lichtintensitäten umzuschalten. Das kurzzeitige Öffnen des Shutters während der Messung, zur Aufnahme eines F_M - oder F_M' -Bildes erfolgte computergesteuert, um einheitliche Öffnungszeiten zu gewährleisten. Über einen halbdurchlässigen Teilerspiegel (Transmission > 650 nm, Reflexion < 650 nm) wurde das Anregungslicht auf das in die

Küvette eingespannte Tabakblatt umgeleitet. Angeregtes Chlorophyll *a* emittiert bei Raumtemperatur Fluoreszenzlicht einer Wellenlänge von ca. 680 nm [Krause & Weis (1984)], welches den Teilerspiegel passiert und mit der CCD-Kamera detektiert werden kann. Ein vor die Kamera-Optik montierter Schott RG 665 Filter stellt zudem sicher, dass die Kamera nur das vom Blatt emittierte Fluoreszenzlicht und nicht eventuell vorhandenes Streulicht detektiert.

2.4.1.1 Aufnahmen der Chlorophyll *a*-Fluoreszenz

Das Imaging-System erlaubt die bildgebende Darstellung verschiedener aus der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz abgeleiteter Photosyntheseparameter. So können z.B. die Quanteneffizienz von PS II [Genty *et al.* (1989)], welche proportional zur Photosyntheserate und zum Elektronentransport durch PS II ist, und die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (q_N) bildgebend dargestellt werden. Als Grundlage für die Berechnung dieser Daten dienen folgende mit der CCD-Kamera aufgenommene Bilder der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz:

M: *Bild der Maximalfluoreszenz eines dunkeladaptierten Blattes*

Wird ein kurzer SLP auf ein dunkeladaptiertes Blatt eingestrahlt kann man ein Bild der maximal möglichen Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz (F_M) aufnehmen. Nach etwa zehnminütiger Dunkeladaptation sind alle PS II-Reaktionszentren oxidiert (= 'offen'), werden bei Einstrahlung eines SLP vollständig reduziert (= 'geschlossen') und können die Ladungstrennung vollziehen. Alle primären Elektronenakzeptoren (Q_A) werden reduziert, weshalb die überschüssige Anregungsenergie in Form von Fluoreszenz und zu einem geringen Teil auch als Wärme abgegeben wird.

M': *Bild der temporären Maximalfluoreszenz während der Photosynthese*

Wird während der aktinischen Belichtung des Blattes, d.h. bei laufender Photosynthese, ein kurzer SLP eingestrahlt, werden kurzzeitig alle aktiven PS II-Zentren geschlossen. Hierdurch steigt die Fluoreszenz zwar auf ein temporäres Maximum (F_M') an, erreicht aber nicht das maximale Fluoreszenzniveau (F_M) des dunkeladaptierten Blattes. Die Differenz zwischen dem temporären Maximum F_M' und dem absoluten Maximum F_M des dunkeladaptierten Blattes ist etwa proportional zu den PS II-Zentren die während der Photosynthese inaktiv waren, d.h. keine Ladungstrennung vollziehen und nicht geschlossen werden können.

S: *Bild der stationären Fluoreszenz während der Photosynthese*

Durch verschiedene Mechanismen wird während der stationären Photosynthese, d.h. bei aktinischer Belichtung eines Blattes, ein großer Teil der maximal möglichen Fluoreszenz gelöscht (= 'quenching'). Diese Fluoreszenzlöschung wird durch die Ableitung der Anregungsenergie in den photosynthetischen Elektronentransport (photochemische Fluoreszenzlöschung, q_P), sowie durch verschiedene nicht-photochemische Lösungsmechanismen (q_N), wie z.B. Antennenverkleinerung, Photoinhibition von PS II und der Ansäuerung des Thylakoidlumens, verursacht [Krause & Weis (1991)].

2.4.1.2 Kalibrierung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenzbilder

Abhängig von der Intensität des Anregungslichts bei den Aufnahmen der Bilder verschiedener Fluoreszenzparameter (aktinisches Licht für F_S oder sättigendes Licht für F_M und F_M'), musste die Blendenöffnung der CCD-Kamera-Optik von Aufnahme zu Aufnahme angepasst werden. Daher war es notwendig die M-, M' - und S-Bilder für die weiteren Berechnungen zu kalibrieren. Neben dem zu untersuchenden Blatt war ein Fluoreszenzstandard montiert (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland), dessen Fluoreszenz mit jedem Bild aufgenommen wurde. Da die Fluoreszenz des Standards streng proportional zur Anregungslichtintensität ist kann diese zur Kalibrierung der Fluoreszenzbilder dienen. Die Fluoreszenzbilder wurden Bildpunkt für Bildpunkt durch den Fluoreszenzwert dividiert, den der Standard unter den jeweiligen Lichtverhältnissen emittierte. Zu Beginn jeder Messung wurde das nicht aus der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz des Untersuchungsobjekts stammende Streulicht im Dunkeln bestimmt (= 'Offset'), welches trotz vorgeschalteter Filter von der CCD-Kamera detektiert wurde. Der 'Offset' betrug in der Regel weniger als 2% des maximalen Helligkeitswerts und wurde vor der eigentlichen Verrechnung von den gemessenen Fluoreszenzintensitäten subtrahiert. Nach Kalibrierung erhält man folgende Bilder:

Formel 1 F_M - Kalibriertes Bild der Maximal-Fluoreszenz

$$F_M = \frac{(M - \text{Offset})}{(\text{Ref}_M - \text{Offset})}$$

mit M = Maximal-Fluoreszenz des dunkeladaptierten Blattes beim SLP
 Offset = aus Streulicht herrührende Resthelligkeit
 Ref_M = Referenz; Fluoreszenzintensität des Standards während der Aufnahme

Formel 2 F_M' - Kalibriertes Bild der temporären Maximal-Fluoreszenz

$$F_M' = \frac{(M' - \text{Offset})}{(\text{Ref}_M' - \text{Offset})}$$

mit M' = temporäre Maximal-Fluoreszenz beim SLP während der Photosynthese
 Offset = aus Streulicht herrührende Resthelligkeit
 Ref_M' = Referenz; Fluoreszenzintensität des Standards während der Aufnahme

Formel 3 F_S - Kalibriertes Bild der stationären Fluoreszenz

$$F_S = \frac{(S - \text{Offset})}{(\text{Ref}_S - \text{Offset})}$$

mit S = Fluoreszenz während der stationären Photosynthese
 Offset = aus Streulicht herrührende Resthelligkeit
 Ref_S = Referenz; Fluoreszenzintensität des Standards während der Aufnahme

2.4.1.3 Verrechnung der kalibrierten Fluoreszenzbilder

Mit den kalibrierten und korrigierten Fluoreszenzbildern F_M , F_M' und F_S konnten weitere Berechnungen durchgeführt werden um Aussagen über den Aktivitätszustand des Photosyntheseapparates zu treffen. Bei allen beschriebenen Berechnungen wurde eine 8bit-Graustufenskala von 0-255 ausgenutzt.

Berechnung der Quantenausbeute von PS II

Nach Genty *et al.* (1989) ist es möglich nur durch die Messung von F_M' und F_S die Quantenausbeute des Elektronentransports von PS II (Φ_{PSII}) zu berechnen. Grundlage für die Berechnung von Φ_{PSII} ist die Formel $\Phi_{PSII} = (F_M' - F_S) / F_M'$. Diese Berechnung kann auch mit den Fluoreszenzbildern durchgeführt werden, um die räumliche Verteilung der Quantenausbeute bildgebend darzustellen. Die Berechnungen wurden, wie bereits die Kalibrierung, Bildpunkt für Bildpunkt durchgeführt. Für die Berechnung von Φ_{PSII} -Bildern gilt:

Formel 4

$$\Phi_{PSII} = \frac{(F_M' - F_S)}{F_M'} * \frac{255}{0,8}$$

mit F_M' = Kalibriertes Bild der temporären Maximal-Fluoreszenz

F_S = Kalibriertes Bild der stationären Fluoreszenz

255/0,8 = Umrechnungsfaktor, da nur ca. 80% der Maximal-Fluoreszenz löschar sind.

Die Quantenausbeute von PS II kann Werte zwischen 0 und 0,8 annehmen. In den Φ_{PSII} -Bildern entspricht ein Grauwert von 0 auch einer Quantenausbeute von 0, ein Grauwert von 255 der maximalen Quantenausbeute von 0,8. Die Darstellung der Φ_{PSII} -Bilder erfolgt entweder in Graustufen oder, zur besseren Übersicht, in Falschfarben.

Berechnung der Elektronentransportrate aus der Quantenausbeute

Da ein linearer Zusammenhang zwischen Φ_{PSII} und dem linearen PET besteht, kann die Rate des linearen PET, bei bekannter Intensität des photosynthetisch nutzbaren Lichts, aus der Quantenausbeute von PS II direkt berechnet werden [Genty *et al.* (1989)]. Zur Berechnung wurde die von Schreiber (1997) entwickelte Formel genutzt:

Formel 5

$$PET = \Phi_{PSII} * PAR * 0,84 * 0,5$$

mit PET Rate des linearen PET durch PS II [$\mu\text{mol Elektronen} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1}$]

Φ_{PSII} = Quantenausbeute von PS II

PAR = photosynthetisch nutzbare Lichtenergie [$\mu\text{mol Lichtquanten} * \text{m}^{-2} * \text{s}^{-1} = \mu\text{E}$]

Der Faktor 0,84 berücksichtigt, dass in einem durchschnittlichen C3-Blatt nur etwa 84% der eingestrahlten, theoretisch nutzbaren Lichtquanten, absorbiert werden. Dieser Absorptionsfaktor wurde auch an Blättern von *N. tabacum* L. cv SNN ermittelt, die unter ähnlichen Bedingungen wie die hier verwendeten Pflanzen angezogen wurden [Pörs (1999)]. Der Faktor 0,5 berücksichtigt, dass nur ca. 50% der theoretisch nutzbaren Lichtquanten vom PS II absorbiert werden, während die andere Hälfte dem PS I zur Verfügung steht. Da sich die PET-Rate proportional zur Quantenausbeute von PS II ändert kann man die PET-Rate direkt aus den Φ_{PSII} -Bildern ablesen. Hierzu ist lediglich eine korrekte Skala erforderlich, die über die gezeigte PET-Formel erstellt werden kann.

Berechnung der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (q_N)

Die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (q_N) gibt Aufschluss über lichtinduzierte Regulationsmechanismen am PS II [Weis & Berry (1987)]. Basierend auf der Formel $q_N = (F_M - F_M') / F_M$ kann ein q_N -Bild berechnet werden:

Formel 6

$$q_N = \frac{(F_M - F_M')}{F_M} * \frac{255}{0,8}$$

mit F_M' = Kalibriertes Bild der temporären Maximal-Fluoreszenz beim SLP
 F_M = Kalibriertes Bild der Maximal-Fluoreszenz eines dunkeladaptierten Blattes
 255/0,8 = Umrechnungsfaktor, da maximal ca. 80% der Maximal-Fluoreszenz löschar sind.

Berechnung von Integralbildern der photosynthetischen Induktion

Um das Anlaufen des photosynthetischen Elektronentransports nach einer Dunkelphase zu analysieren wurden sog. Induktionsbilder aus den Φ_{PSII} -Bildern berechnet. Dieses Verfahren erlaubt die Darstellung der photosynthetischen Induktion über einen definierten Zeitraum in einem einzigen Bild. Zu diesem Zweck wurden die Einzelbilder von Φ_{PSII} über die erste Zeit nach Belichtungsbeginn (i.d.R. 2 min) nach dem 'Euler'schen Verfahren' integriert:

Formel 7

$$I_{\Phi_{\text{PSII}}} = \left(\sum_{n=1}^n \left(\frac{|\Phi_{\text{PSII}n}| + |\Phi_{\text{PSII}n+1}|}{2} * \frac{t_{X_{n+1}} - t_{X_n}}{t} \right) - \text{Schwarz} \right) * \left(\frac{250}{\text{Weiß} - \text{Schwarz}} \right)$$

mit $I_{\Phi_{\text{PSII}}}$ = Bild des integrierten Elektronentransports über den Zeitraum t
 Φ_{PSII} = Bild der Quanteneffizienz von PS II, mit n = Bildnummer
 t_X = Aufnahmezeitpunkt des jeweiligen Bildes
 t = Zeitintervall vom ersten bis zum letzten Bild [s]

Das Resultat dieser Berechnung ist ein Integralbild, welches die Summe der während der Induktionszeit transportierten Elektronen durch PS II repräsentiert. Mit diesem Rechenverfahren ist es möglich die Induktionsgeschwindigkeit des PET bildgebend darzustellen und die Topographie der photosynthetischen Induktion von benachbarten infizierten und nicht-infizierten Blattbereichen zu analysieren. Unter exakt gleichen Bedingungen kann mit diesem Verfahren auch die 'Induktionsleistung' verschiedener Blätter miteinander verglichen werden.

2.4.2 Aufnahme des pflanzlichen Gaswechsels

Parallel zur Aufnahme der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz wurde der Gaswechsel infizierter und nicht-infizierter Tabakblätter aufgenommen und abgeleitete Größen berechnet. Während der Messung der Topographie photosynthetischer Parameter dienten die Messungen des pflanzlichen Gaswechsels in erster Linie der Einstellung der Messgasparameter und der Überwachung des pflanzlichen Gaswechsels. Jedoch konnten bei diesen Messungen keine genauen Aussagen über infektionsbedingte Änderungen der CO₂-Assimilation oder der Dunkelatmung getroffen werden, da immer nur kleine infizierte Blattbereiche neben gesunden Regionen in die Blattkuvette eingespannt waren.

Zur exakten Aufnahme des Gaswechsels wurden vollständig infizierte Regionen oder uninfizierte Kontrollbereiche eines Tabakblattes in eine kleinere Blattkuvette (Gasraum 26,5 cm³) eingespannt, ohne das Blatt von der Pflanze abzutrennen oder zu verletzen. Die Kuvettenränder wurden mit Moosgummidichtungen versehen welche einen gasdichten Verschluss der Kuvette ermöglichen und gleichzeitig das eingespannte Blatt abpolstern. Beim Einspannen des Blatts in die Kuvette wurde außerdem darauf geachtet, dass das Blatt plan und unbeweglich im laminaren Luftstrom der Kuvette positioniert war, um unscharfe Fluoreszenzaufnahmen und die Bildung von Taufall im Kuvettenraum zu vermeiden.

An der unteren Epidermis wurde ein Temperaturfühler angelegt, um die Blatt-Temperatur während des Versuchs aufzunehmen. Die Temperatur des Messgases wurde kurz vor Eintritt in den Kuvettenraum gemessen und über einen vorgeschalteten Kryostaten auf ca. 23°C eingestellt. Die relative Feuchte des Messgases wurde über eine vorgeschaltete Kältefalle auf 55 – 57% eingestellt.

Über die Gasflusskontrollelemente wurde die exakte Zusammensetzung des Messgases computergesteuert eingestellt. Durch die Einstellung verschiedener Flussraten von CO₂-freier Druckluft, Stickstoff (N₂) und 10 %igem CO₂, konnten der Kohlendioxid- (CO₂) und der Sauerstoffgehalt (O₂) des Messgases in weiten Grenzen variiert werden. Die Beimischung des CO₂ erfolgte hinter der Kältefalle um zu vermeiden, dass CO₂ im Tauwasser der Kältefalle in Lösung geht und es hierdurch zu Schwankungen in der CO₂-Konzentration kommt.

Der Gesamtgasstrom (2000 ml/min) wurde anschließend zu gleichen Teilen in einen Mess- und einen Referenzgasstrom aufgeteilt und die gleichmäßige Aufteilung durch Gasflussmessen-

te überwacht. Das Messgas floss durch die Blattküvette und anschließend – jetzt als Analysegas bezeichnet – in den CO₂/H₂O-Analyser. In diesem wurde mittels eines IRGA die Differenz von CO₂- und H₂O-Gehalt im Vergleich zum Referenzgas gemessen. Aus den vom IRGA übermittelten Messdaten und anderen vorgegebenen Daten (z.B. Blattfläche, Blatt-Temperatur) konnten abgeleitete Gaswechselgrößen, wie Transpirations- und CO₂-Assimilationsrate, stomatare Leitfähigkeit, Dunkelatmung und die interne CO₂-Konzentration (ci), berechnet werden.

2.4.3 Messungen der P₇₀₀ Reduktionskinetik

Basierend auf der Methode von Klughammer & Schreiber (1998) erfolgte die Aufnahme der P₇₀₀ Reduktionskinetiken mit einem PAM 101 Spektroskop mit angeschlossener Emitter-Detektor-Einheit ED-P700-DW (810 bis 860 nm) (alles Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland). Die Messungen der P₇₀₀-Signale erfolgten repetitiv in 20 s Intervallen in einer lichtgeschützten, reflektierenden Messküvette. Vor der Probennahme für diese Messungen wurden die Rate des PET der zu untersuchenden Blattbereiche mit dem Imaging-System bestimmt, um infektionsbedingte Änderungen der PET-Rate und der P₇₀₀ Reduktionskinetik direkt miteinander korrelieren zu können. Außerdem konnte mit diesen Vorversuchen sichergestellt werden, dass nur vollständig infizierte Blattbereiche, bzw. uninfizierte Kontrollen für die P700-Messungen herangezogen wurden. Die zu untersuchenden Blattscheiben wurden vor Messbeginn mit ca. 0,5 ml einer 10 mM Methylviologen- (MV-) Lösung besprüht und vor Messbeginn für 5 min vorinkubiert. Das in der MV-Lösung enthaltene Tween 20 ist ein Detergenz, welches eine schnelle Passage des Herbizids in die Pflanzenzellen ermöglicht. MV (Handelsname Paraquat®) ist ein hocheffizienter Elektronenakzeptor an der Donorseite von PS I und kann im reduzierten Zustand Sauerstoff zu Superoxid reduzieren und unterbindet die Entgiftung von H₂O₂ durch die Ascorbat-Peroxidase. Daher führt die Applikation von MV im Licht zu schweren oxidativen Schädigungen von Mesophyllzellen. Daher mussten die MV-behandelten Blätter bis zu Beginn der eigentlichen Messung verdunkelt gehalten werden, um eine oxidative Schädigung der Proben zu vermeiden. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen diente das MV dazu die angeregten Elektronen während eines kurzen SLP an der Donorseite von PS I schnell und vollständig aufzunehmen und so für eine möglichst vollständige Photo-Oxidation des P₇₀₀ zu sorgen. Die folgende Reduktionskinetik des P₇₀₀₊ gibt Aufschluss über mögliche Störungen in der Elektronentransportkette oberhalb von PS I.

2.5 Biochemische, histologische und molekularbiologische Untersuchungen

2.5.1 Bestimmung des Chlorophyllgehalts und des Chlorophyll a/b Verhältnisses

Zur vollständigen Extraktion des Chlorophylls wurden Blattscheiben aus Infektions- oder Kontrollbereichen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Blattscheiben wurden in einem vorgekühlten Mörser mit etwas Quarzsand und CaCO₃ fein zermahlen und das Chlorophyll mit ei-

ner 80 %igen (v/v) Acetonlösung vollständig extrahiert. Die Suspension wurde in Reagenzgläser überführt, für 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde für die photometrische Bestimmung des Chlorophyllgehalts und des Chlorophyll *a/b*-Verhältnisses eingesetzt. Die Berechnung der Pigment-Konzentrationen erfolgte nach Porra *et al.* (1989):

$$\begin{aligned}\text{Chlorophyll } a \text{ (}\mu\text{g/ml)} &= 12.25 (A_{663.6}) - 2.55 (A_{646.6}) \\ \text{Chlorophyll } b \text{ (}\mu\text{g/ml)} &= 20.31 (A_{646.6}) - 4.91 (A_{663.6}) \\ \text{Chlorophyll } a + b \text{ (}\mu\text{g/ml)} &= 17.76 (A_{646.6}) + 7.34 (A_{663.6})\end{aligned}$$

2.5.2 RNA-Extraktion und Expressionsanalyse mittels Northern-Blot

Zur Extraktion der Gesamt-RNA aus infizierten und gesunden Blattstücken wurde das von Logemann *et al.* (1987) entwickelte Verfahren angewendet. Die isolierte RNA (7 μg Gesamt-RNA) wurde elektrophoretisch in einem 1 %igen Agarose-Formaldehyd Gel aufgetrennt. Im Anschluss erfolgte das Northern-Blotting der aufgetrennten RNA auf eine Hybond N+ Membran (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland). Die eingesetzten RNA-Sonden wurden über PCR mit Biotin markiert [L \ddot{u} w & Rausch (1996)]. Die Hybridisierung erfolgte in einem Reaktionsansatz mit 50% (v/v) Formamid, 1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS), 1 M NaCl, 6% (w/v) PEG 6000 und 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Heringssperm-DNA bei einer Temperatur von 42°C. Anschließend wurden die Membranen mit 0,2 SSC / 0,5% SDS (w/v) bei 65°C gewaschen, wie bei L \ddot{u} w & Rausch (1996) beschrieben entwickelt und auf Hyperfilm ECL übertragen (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland).

2.5.3 Nachweis der H₂O₂-Akkumulation

Infizierte und nicht-infizierte Blattbereiche wurden auf die Bildung und Akkumulation von Wasserstoff-Peroxid (H₂O₂) untersucht. Der Nachweis von H₂O₂ erfolgte durch eine *in situ*-Färbung mit 3,3-Diaminobenzidin (DAB), nach einer modifizierten Vorschrift von Thordal-Christensen *et al.* (1997). Die Blattstücke wurden zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten frisch von der Pflanze abgeschnitten und umgehend für 6 Stunden in die DAB-Lösung (1 mg ml⁻¹, pH 3.8) verbracht. Zum Abstoppen der DAB-Inkubation wurden die Blattstücke in kochendes Ethanol (96%, v/v) überführt und für ca. 10 min gekocht, bis die Blattpigmente möglichst vollständig extrahiert waren. Durch diese Prozedur blieb nur noch in den Bereichen der H₂O₂-Akkumulation die typische dunkelbraune Färbung des Polymerisierungsprodukts der Reaktion von DAB mit H₂O₂ übrig, während alle übrigen Blattbereiche nahezu farblos waren.

2.5.4 Präparation der Epidermis zur Analyse der stomatären Apertur

Von der Blattunterseite wurde die Epidermis mit einer feinen Pinzette (Inox No. 4, Dumont and Fils, Schweiz) abgezogen und auf einem Objektträger in destilliertem Wasser montiert. Von der so behandelten Epidermisprobe wurden innerhalb der nächsten zehn Minuten mindestens zehn

mikroskopische Aufnahmen angefertigt, welche im Anschluss ausgewertet werden konnten. Die Aufnahmen wurden an zufällig ausgewählten Orten des Präparats durchgeführt. Probennahme, Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgten in einem doppelten Blindtest. Das 'Epidermis-peel'-Verfahren wurde auch eingesetzt, um hochauflösende Mikroskopbilder des Schwammparenchyms zu erhalten.

2.5.5 Nachweis der Callosebildung

Zum Nachweis der Callosebildung wurden Blattstücke aus den Infektions- sowie den Kontrollbereichen zu definierten Zeitpunkten nach Infektion entnommen. Die untere Epidermis wurde sogleich mit einer feinen Pinzette möglichst vollständig entfernt (s.o.) und die Blattstücke umgehend in Farmer's Fluid entfärbt (25% (v/v) Essigsäure in Ethanol). Die entfärbten Blattstücke wurden im Anschluss, nach einer modifizierten Methode von Gómez-Gómez *et al.* (1999), für 15 min in Anilinblau (0,1% in 0,1M K₂HPO₄-Lösung, pH 7,0) gefärbt und anschließend 3-mal in Aqua bidest. gewaschen, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Blattstücke wurden in Aqua bidest. mit der Oberseite nach unten auf einem Objektträger montiert und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Diese Art der Präparation erlaubt es das Schwammparenchym mikroskopisch zu untersuchen, ohne dass Epidermis und Cuticula die Auflösung verschlechtern. Die mit Anilinblau angefärbte Callose emittiert unter UV-Anregung grün-blaues Fluoreszenzlicht, die am Fluoreszenzmikroskop mit dem Filterblock A (Spezifikationen siehe Kapitel 2.2.3) detektiert werden kann.

2.5.6 Extraktion der apoplastidären Waschflüssigkeit

Die Präparation der apoplastidären/ interzellulären Waschflüssigkeit (IWF) wurde nach einem modifizierten Protokoll von Lohaus *et al.* (2001) ausgeführt. Die Blattscheiben wurden mit 1 M NaCl-Lösung infiltriert und die Oberfläche mit einem sauberen Tuch getrocknet. Die Blattstücke wurden dann in zwei ineinandergesteckte Zentrifugenröhrchen verbracht von denen das innere einen Siebboden aufweist und anschließend für 10 min bei 2500g und 4°C zentrifugiert, wobei die Blattstücke nach 5 min umgedreht wurden. Das Volumen der im äußeren Zentrifugenröhrchen angesammelten IWF wurde bestimmt, die IWF anschließend in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Messung bei -70°C gelagert.

2.5.6.1 Bestimmung der G6PDH- und Invertase-Aktivität, des Kohlenhydrat-Gehalts und des Saccharose-Efflux

Frisch geerntete Blattscheiben wurden umgehend in flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend in flüssigem N₂ zu einem feinen Pulver zermörsert. Die Extraktion und Bestimmung der **G6PDH-Aktivität** wurde nach dem Protokoll von Fickenscher & Scheibe (1986) durchgeführt. Die Aktivität der **apoplastidären Invertase** im der IWF wurde nach dem Protokoll von Jones *et al.* (1977), der Gehalt **apoplastidärer Hexosen** nach Kunst *et al.* (1984) bestimmt. Für die Mes-

sungen des **Saccharose-Efflux** über das Phloem wurden Tabakblätter vollständig mit Zoosporen oder Wasser infiltriert, zu bestimmten Zeitpunkten von der Pflanze abgetrennt. Die Blattstiele wurden direkt in 2ml Eppendorf-Reaktionsgefäße mit einer definierten Menge 10 mM Na-P Puffer (pH 7,0) mit 20 mM EDTA überführt. Für die Dauer des Experiments standen die so präparierten Blätter in Kammern mit gesättigter Luftfeuchte, um die Transpiration und somit die Aufnahme des Puffers durch den Transpirationsstrom möglichst gering zu halten. Die Bestimmung des Saccharose-Efflux wurde nach Murillo *et al.* (2003) durchgeführt.

2.5.7 Vitalitätstest

Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt die Rate des PET an der Grenzregion eines Infektionsbereichs mit dem Mikro-Imaging-System aufgenommen (siehe Kapitel 3 und 4.1.2.11). Die Grenze wurde mit einem wasserfesten Stift markiert. Diese Markierungen wurden mit kleinstmöglicher Vergrößerung aufgenommen, um eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Region zu ermöglichen. Anschließend erfolgte eine Färbung des Blattstücks mit Fluorescein-Diacetat (FDA) und die erneute Untersuchung des Grenzbereichs unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Filterblock I3 (Spezifikationen siehe Kapitel 2.2.3). Vitale Zellen nehmen das FDA auf und weisen nach Färbung und Waschung eine grünlich-gelbe Fluoreszenz auf, während tote Zellen nicht fluoreszieren.

3 Methodenentwicklung

**Entwicklung fluoreszenzmikroskopischer Verfahren zur Erfassung der
Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz und zur Auflösung photosynthetischer Prozesse
auf zellulärer und subzellulärer Ebene**

Hardy Schön

3.1 Einführung

Die pflanzliche Photosynthese erschloss sich der Forschung über viele Jahre hinweg ausschließlich über die biochemische Analyse ihrer Metabolite oder über die Bestimmung des pflanzlichen Gaswechsels, wodurch viele physiologische Fragestellungen nur ansatzweise untersucht werden konnten. Einen entscheidenden Durchbruch in der Photosyntheseforschung stellte die Nutzbarmachung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz zur Determinierung photosynthetischer Elektronenflüsse dar. Erstmals wurde der, in erster Näherung reziproke, Zusammenhang zwischen Chlorophyllfluoreszenz und Photosynthese vor mehr als 70 Jahren von Kautsky & Hirsch (1931) untersucht und beschrieben. Seither bezeichnet man die charakteristische Induktionskinetik der Chlorophyllfluoreszenz eines Blattes beim Übergang vom Dunkeln ins Licht als 'Kautsky-Effekt'.

Mit der Entwicklung eines pulsamplitudenmodulierten Chlorophyll-Fluorimeters (PAM-Fluorimeter) durch Schreiber *et al.* (1986) stand eine schnelle und nicht-invasive Methode zur Erforschung der Photosynthese zur Verfügung, welche die moderne Pflanzenphysiologie und -ökophysiologie in den folgenden Jahren maßgeblich bestimmt hat und bis heute prägt. Genty *et al.* (1989) entwickelten eine einfache Formel mit der es möglich war, nur mit Hilfe der Fluoreszenzparameter F_M' und F_S , die Quanteneffizienz des linearen Elektronentransports durch PS II (Φ_{PSII}) routinemäßig zu berechnen. Somit konnte überaus einfach bestimmt werden, wie effizient Pflanzen das eingestrahlte aktinische Licht für die Photosynthese nutzen können. Bei Kenntnis der eingestrahlichten photosynthetisch nutzbaren Gesamtenergie und des Absorptionskoeffizienten des untersuchten Gewebes kann auch der lineare PET durch PS II mit Hilfe einer einfachen Formel berechnet werden [Schreiber (1997)]. Nähere Erläuterungen zu den Fluoreszenzparametern und ihrer Bedeutung, sowie zu den Berechnungen abgeleiteter Größen, sind in Kapitel 2.4.1 zu finden.

Das makroskopische Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Imaging hat bereits einen wertvollen Beitrag zum Verständnis der durch die Pathogenese bzw. Abwehr ausgelösten Änderungen der Photosynthese und des pflanzlichen Primärstoffwechsels geliefert [z.B. Esfeld (2000), Schön (2001)]. Daher war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auflösung des Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Imagings zu optimieren, um Veränderungen im Primärstoffwechsel der Pflanze mit mikroskopisch detektierbaren Parametern der pflanzlichen Abwehr korrelieren zu können. Hierdurch könnten möglicherweise weitere Einblicke in funktionelle Zusammenhänge von Photosynthese und Abwehr erlangt werden.

3.2 Aufbau des Mikro-Imaging-Systems

Grundlage der im Folgenden beschriebenen Arbeiten war die Entwicklung von Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Mikroskopen durch Oxborough & Baker (1997) und Küpper *et al.* (2000). Ziel der vorliegenden Arbeit war es sowohl das Messverfahren zu vereinfachen sowie die Messgenauigkeit und die räumliche Auflösung der Messungen zu optimieren. Das hier entwickelte Imaging-System basiert auf einem Hochleistungs-Forschungsmikroskop des Typs Leica DMRB (Leica, Wetzlar, Deutschland; Abbildung 3-1).

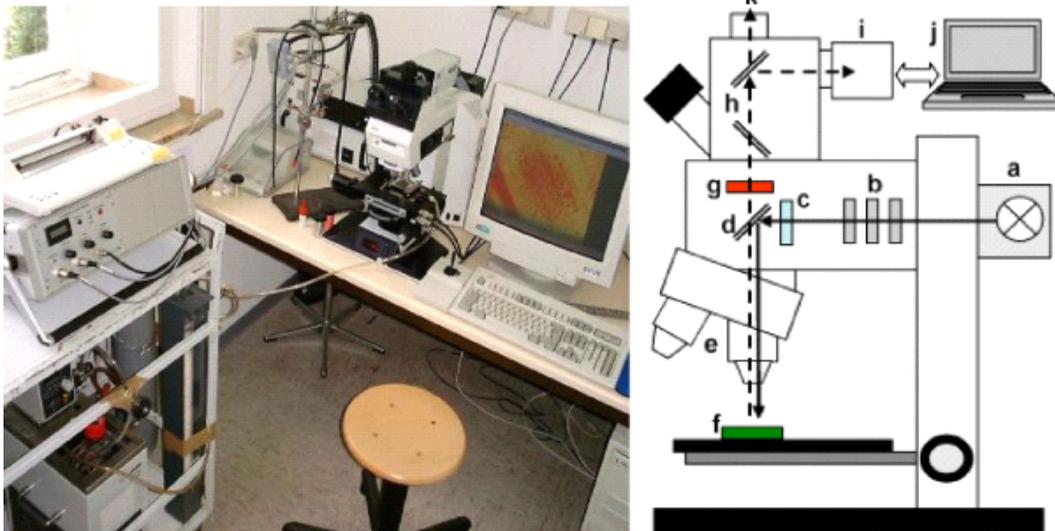


Abbildung 3-1 Aufbau des Mikro-Imaging-Systems. Die wichtigsten Komponenten des Messplatzes (Foto links) sind in der Schemazeichnung dargestellt. a) Lichtquelle für Anregungslicht, b) Set von Neutral-Grau-Filtern zur Regulierung der Lichtstärke, c) Anregungsfilter BG39, d) Teilerspiegel 585DCXR, e) Objektiv(e), f) Probe, g) Emissionsfilter RG645LP, h) Teilerspiegel, i) s/w CCD-Kamera zur Erfassung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz, j) Datenerfassung und Kamerasteuerung, k) Ausgang für PAM-Fluorimeter oder CCD-Farbkamera. Durchgezogene Pfeile kennzeichnen das Anregungslicht, gestrichelte Pfeile die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz. Nähere Erklärungen im Text.

Für die Messungen der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz ist das Mikroskop mit Leica PL FLUOTAR Objektiven 10 x /0.30 und 25 x/0.75 OIL, sowie einem Objektiv mit langem Arbeitsabstand PL FLUOTAR L 63x/0.70 ausgerüstet (Abbildung 3-1 e; alle Leica, Wetzlar, Deutschland). Die numerische Apertur dieser Objektive ergibt einen großen Öffnungswinkel, eine hohe Lichtstärke, eine hohe Auflösung und guten Z-Kontrast, d.h. eine sehr geringe Tiefenschärfe. Hierdurch wird eine quantitative Erfassung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz aus einer Zellebene (z.B. Palisadenparenchym) ermöglicht, ohne dass die Hintergrundfluoreszenz aus anderen Zellschichten die Messung signifikant stört. Als Lichtquellen für die aktinische und sättigende Belichtung dienen eine Leica 105z 50 W Quecksilber-Hochdrucklampe oder eine Leica 105 12V, 100W Nieder-volt-Halogenlampe (Abbildung 3-1 a; Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Lichtintensität kann

durch verschiedene Neutral-Grau-Filter (Typ: Schott NG; Schott AG, Mainz, Deutschland) im Anregungsstrahlengang reguliert werden (Abbildung 3-1 b). Für die Aufnahme der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz wurde ein von uns konzipiertes Chlorophyll-Filterset für das Mikroskop benutzt (Abbildung 3-1 c, d und g; AF Analystechnik, Tübingen, Deutschland). Das Anregungslicht (Abbildung 3-1, durchgezogene Pfeile) passiert einen Schott BG 39-Filter und wird durch einen halbdurchlässigen Teilerspiegel des Typs 585DCRX (Chroma, Irvine, USA) auf das zu untersuchende Blatt umgelenkt. Die emittierte Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz (Abbildung 3-1, gestrichelte Pfeile) kann den Teilerspiegel passieren und wird mit Hilfe eines Langpassfilters (Schott RG645 LP) von kurzwelligem Streu- und Anregungslicht befreit, welches den halbdurchlässigen Teilerspiegel zu einem geringen Anteil passieren kann. Die Spektraldaten dieses Filtersets (Abbildung 3-2) verdeutlichen, dass dieses Filterset Anregungs- und Streulicht nahezu vollständig eliminiert, die langwellige Chlorophyllfluoreszenz hingegen nahezu ungehindert zur Kamera gelangt.

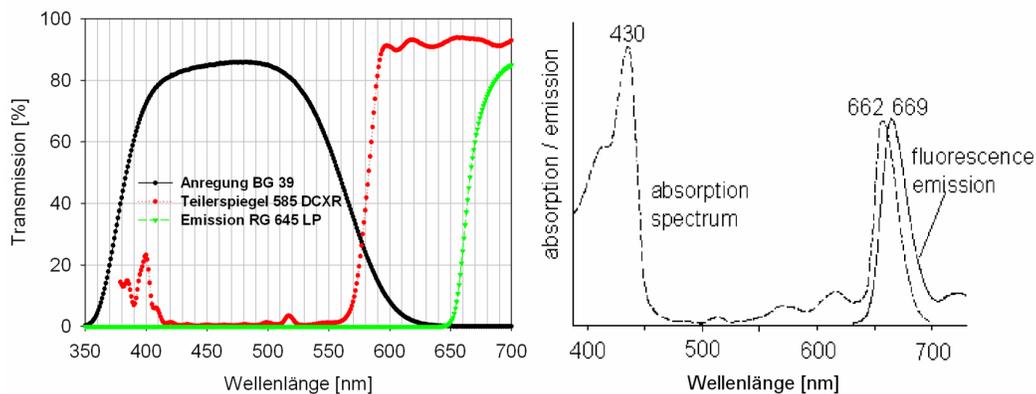


Abbildung 3-2 Spektraldaten des Chlorophyll-Filtersets für das Mikro-Imaging-System. B) Absorptions- und Emissionsspektrum von Chlorophyll.

Die bildgebende Aufnahme der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz erfolgte mit einer hochempfindlichen s/w CDD-Kamera, Typ PCO SensiCam, 12 bit, 'air-cooled' (PCO AG, Kelheim, Deutschland). Zur Kalibrierung des Imaging-Systems konnte zusätzlich ein PAM-Fluorimeter (Typ: PAM 101; Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) an das Mikroskop angeschlossen werden. Die Bildaufnahme und die Steuerung der Lichtintensitäten erfolgte manuell über die Steuer- und Bildaufnahmesoftware CamWare (PCO AG, Kelheim, Deutschland).

3.2.1 Lichtstärkenmessung

Die exakte Bestimmung und Einstellung der Anregungslicht-Intensität ist für die Interpretation der Fluoreszenzdaten und die Ableitung physiologischer Daten unerlässlich. Kann die Lichtstärke von größeren Lichtquellen ($> 1\text{cm}^2$) direkt mit Quantensensoren ermittelt werden, erfordert die Bestimmung der Lichtintensität im Fokus des Mikroskops spezielle Geräte oder Techniken, da der Durchmesser des Leuchtfelds im Fokus von Objektiven mit einer Objektivvergrößerung

$\geq 5x$ bedeutend kleiner ist, als die Sensorfläche vieler Quantensensoren, so auch des hier verwendeten LI-COR 189 (LI-COR, Lincoln, NE, USA). Daher sind im Rahmen dieser Arbeit zwei Verfahren entwickelt worden, die eine schnelle und exakte Bestimmung der Lichtintensität am Mikroskop ermöglichen.

3.2.1.1 Direkte Messung der Lichtintensität

Bei dieser Methode erfolgte die Messung der relativen Lichtintensität (LI_{mess}) direkt mit dem LI-COR Quantensensor, welche anschließend mittels einer Korrekturformel für das jeweilige Objektiv in die absolute Lichtintensität (LI_{korr}) umgerechnet werden kann. Für die Korrektur musste zunächst der exakte Durchmesser des Leuchtfelds eines Objektivs ermittelt werden ($\varnothing_{\text{LF Objektiv}}$). Hierzu wurde ein dünnes Tabakblatt unter dem zu vermessenden Objektiv für mehrere Minuten mit hoher Intensität belichtet, um Photoinhibition und -destruktion auszulösen. Anschließend wurde mit einem Objektiv schwächerer Vergrößerung ein Bild des photoinhibierten Bereichs aufgenommen, woraus der genaue Durchmesser und die Fläche (A_{LF}) des Leuchtfelds ermittelt werden konnte.

Tabelle 1 Leuchtfelddurchmesser und -flächen der verwendeten Objektive und des Quantensensors.

Objektiv	Durchmesser des Leuchtfelds (\varnothing_{LF}) [mm]	Leuchtfeld (A_{LF}) [mm ²]
5 x	6,2	30,19
10 x	3,38	8,97
25 x	1,35	1,42
40 x	0,84	0,56
63 x	0,58	0,26
100 x	1,06	0,88
LI-COR Quantensensor	7,7	46,57

Auf dem verwendeten Quantensensor befindet sich eine Streuscheibe, die einfallendes Licht gleichmäßig auf die darunter liegende Sensorfläche leitet und verteilt. Hierdurch wird die Messung unempfindlich gegen leichte Verschiebungen in der x- und y-Achse oder den Abstand des Sensors vom Objektiv (z-Achse). Für die Berechnung der korrigierten Lichtintensität (LI_{korr}) aus der gemessenen Lichtstärke (LI_{mess}), gilt:

Formel 8

$$LI_{\text{korr}} = LI_{\text{mess}} * \left(\frac{A_{\text{LF Sensor}}}{A_{\text{LF Objektiv}}} \right)$$

3.2.1.2 Messung der Lichtintensität mit einem 'Pin Hole'-Quantensensor

Parallel zur direkten Lichtstärkenmessung wurde eine zweite Methode zur Bestimmung der Lichtintensität am Mikroskop entwickelt. Hierzu wurde eine Lochblende ($\varnothing 0,5$ mm) auf dem

ursprünglichen Quantensensor montiert, wodurch die Sensorfläche unter die Größe der Leuchtfelder der Objektiv verkleinert wurde. Zunächst musste eine Kalibrierung mit bekannten Lichtintensitäten erfolgen. Für die unterschiedlichen Lichtintensitäten ergab sich eine streng lineare Abhängigkeit von gemessener (L_{mess}) und abgeleiteter Lichtstärke (L_{korr}) (Abbildung 3-3).

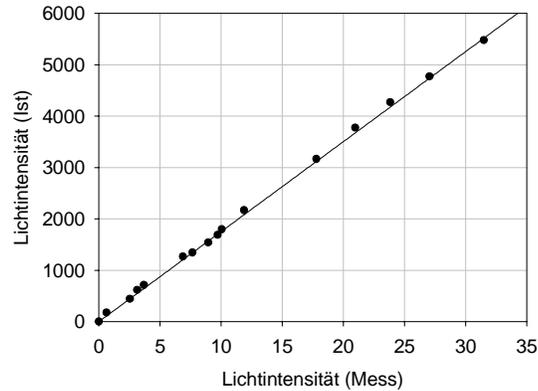


Abbildung 3-3 Kalibrierung des 'Pin-hole'-Quantensensors für das LI-COR 189 Lichtmessgerät. Die Kalibrierung wurde bei verschiedenen, mit Neutral-Grau Filtern eingestellten, Lichtintensitäten durchgeführt.

Aus dieser Messung ergab sich für die Bestimmung der Lichtintensität aus den gemessenen Lichtintensitäten:

Formel 9

$$L_{\text{korr}} = L_{\text{mess}} * 175,22 - 1,83^{-14}$$

Da gilt, $-1,83^{-14} \rightarrow 0$, ergibt sich hieraus die vereinfachte Formel:

Formel 10

$$L_{\text{korr}} = L_{\text{mess}} * 175,22$$

Der direkte Vergleich beider Methoden zeigte, dass beide Methoden geeignet sind, die Lichtintensitäten am Mikroskop zu determinieren (Abbildung 3-4).

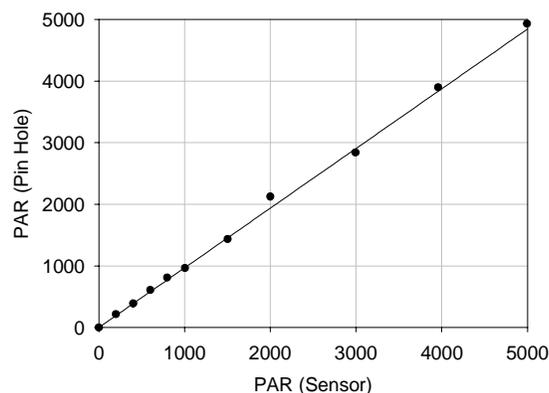


Abbildung 3-4 Vergleichende Messung der Lichtintensitäten am Mikroskop mit beiden entwickelten Methoden.

3.2.2 Kalibrierung der CCD-Kamera

Die genaue Kenntnis der Kameraempfindlichkeit ist eine unabdingbare Voraussetzung für die quantitative Analyse der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz aus den aufgenommenen Bildern. Daher wurde mit einem Fluoreszenzstandard (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) in Vorversuchen überprüft, wie der CCD-Chip bei verschiedenen Anregungslichtintensitäten die emittierte Fluoreszenz in 4095 Graustufen (12 bit) ausgibt.

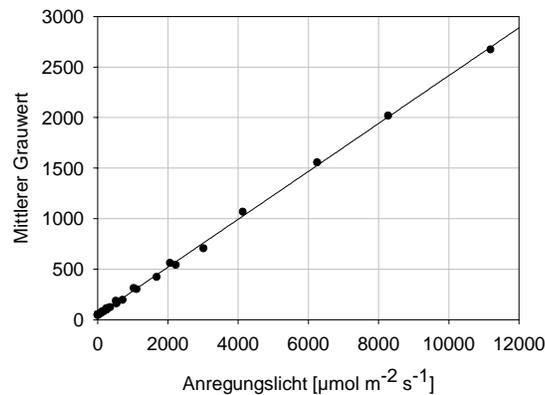


Abbildung 3-5 Empfindlichkeit der CCD-Kamera des Mikro-Imaging-Systems während der Kalibrierung mit einem Fluoreszenzstandard bei unterschiedlichen Lichtintensitäten.

Abbildung 3-5 zeigt, dass das Signal der CCD-Kamera linear mit dem Anregungslicht für den Fluoreszenzstandard ansteigt. Auch der CCD-Chip der hier verwendeten Kamera emittiert temperaturbedingt bei völliger Dunkelheit einige Elektronen, so dass selbst bei Unterbrechung des Anregungslichts der ausgegebene Grauwert nicht gleich Null ist. Durch ein Luftkühlsystem wird der CCD-Chips während der Messungen konstant auf -25°C temperiert, so dass dieses 'Grundrauschen' konstant niedrig gehalten wird. Der mittlere Grauwert ('mean grey' = *MG*) beträgt bei Dunkelheit 44,781 und liegt somit bei ca. 1,1% der ausgegebenen 4095 Grauwerte. Alle aufgenommenen Fluoreszenzbilder wurden vor der Berechnung abgeleiteter Größen, Pixel für Pixel, gegen das 'Grundrauschen' korrigiert:

Formel 11

$$MG_{\text{korr}} = MG_{\text{Fluoreszenzbild}} - MG_{\text{Dunkel}}$$

mit $MG_{\text{Dunkel}} = 44,781$

Weiterhin wurde mit Hilfe des Fluoreszenzstandards überprüft, ob die Verteilung des Anregungslichts über das Leuchtfeld homogen ist. Bei korrekter Justierung der Anregungslichtquelle wird eine sehr gleichmäßige Ausleuchtung des Objekts gewährleistet. Die prozentuale Abweichung vom mittleren Fluoreszenzwert beträgt maximal 5%.

3.2.3 Bildaufnahme

Ebenso wie die exakte Bestimmung der Anregungslichtstärke, ist ein genauer Abgleich der Aufnahmezeiten der CCD-Kamera für die korrekte Berechnung von PET-Bildern von großer Bedeutung. Maßgeblich für die Auswahl des anzuwendenden Verfahrens ist hierbei das Versuchsziel. Für die Bildaufnahme stehen folgende zwei Verfahren zur Auswahl.

3.2.3.1 Bildaufnahme mit variabler Belichtungszeit

Bei dieser häufig verwendeten Methode [Scholes & Rolfe (1996), Küpper *et al.* (2000)] erfolgt eine Anpassung der CCD-Belichtungszeit, je nach Lichtstärke, für jedes aufgenommene Fluoreszenzbild. Schwache Fluoreszenzen (F_0 , F_0' , F_S) werden wesentlich länger aufgenommen als starke Fluoreszenzen (F_M , F_M'), so dass die ausgegebenen mittleren Grauwerte aller Fluoreszenzbilder etwa gleich hoch liegen. Diese Vorgehensweise erleichtert die Aufnahme extrem schwacher Fluoreszenzen, allerdings müssen die Fluoreszenzbilder vor der Berechnung abgeleiteter Parameter gegen die jeweilige Belichtungszeit korrigiert werden. Durch diesen zusätzlichen Rechenschritt geht jedoch Qualität verloren. Mit zunehmender Messdauer – für F_0 -Bilder häufig mehrere Minuten – steigt außerdem die Gefahr, dass die aufgenommenen Bilder verwackeln oder unscharf werden. Diese Fehler fließen in jede weitere Berechnung ein, so dass Auflösung und Schärfe der abgeleiteten Bilder oftmals unbefriedigend sind.

3.2.3.2 Aufnahme aller Bilder mit einer Belichtungszeit

Neuere CCD-Kameras, wie z.B. die für diese Arbeiten eingesetzte 12 bit PCO SensiCam (PCO AG, Kelheim, Deutschland), weisen eine sehr hohe Lichtempfindlichkeit und gleichzeitig eine hohe Linearität über einen großen Intensitätsbereich auf (Abbildung 3-5). Dieses ermöglicht die Aufnahme der Chlorophyll-Fluoreszenzparameter F_M , F_M' und F_S , bei gleich bleibend kurzer Belichtungszeit (je nach Objekt und Lichtintensität zwischen 100 und 600 ms). Diese Methode bietet sich für die routinemäßige Analyse der photosynthetischen Aktivität in einzelnen Pflanzenzellen an, da die aufgenommenen Fluoreszenzbilder vor weiterführenden Berechnungen nicht mehr zeitlich aneinander angeglichen werden müssen und zudem ein Verwackeln der Bilder während der Belichtung weitestgehend vermieden wird.

3.2.4 Kalibrierung des Mikro-Imaging-Systems

Vor der routinemäßigen Aufnahme von Fluoreszenzbildern mit dem Mikro-Imaging-System und der Berechnung abgeleiteter Daten war es erforderlich die Messgenauigkeit des Systems zu überprüfen und gegebenenfalls Korrekturverfahren zu entwickeln. Hierfür kamen verschiedene Verfahren zur Anwendung, die im Folgenden kurz dargestellt werden sollen.

Ein einfaches Verfahren zur Überprüfung des Systems ist die vergleichende Messung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz an identisch vorbehandelten Blattstücken unter standardisierten Messbedingungen. Bei dieser Analyse werden die am Mikroskop aufgenommenen Fluoreszenzparame-

ter mit einer parallel durchgeführten Messung an einem kalibrierten PAM-Fluorimeter verglichen. Für die Messungen wurde eine Blattprobe (\varnothing 1,5 cm) aus einer Versuchspflanze ausgestanzt und mit einem Messpuffer infiltriert (20 mM TRIS-HCl, pH 7,3). Anschließend wurde das vorbehandelte Blattstück geteilt. Beide Hälften wurden in Messpuffer auf Objektträger montiert und luftblasenfrei mit einem Deckglas abgedeckt. Eine der so vorbereiteten Proben wurde unter dem Mikroskop für die Messung vorbereitet, während die Parallelprobe unter dem PAM-Messplatz montiert wurde. Die Intensitäten für aktinische und sättigende Belichtung wurden im Vorfeld der Messung an beiden Messplätzen identisch eingestellt. Nach einstündiger Dunkeladaptierung der Proben erfolgte zunächst die Aufnahme der Maximalfluoreszenz (F_M). Anschließend wurde die Kinetik der Fluoreszenzlöschung bei fortwährender Belichtung bis zum Erreichen eines konstanten Werts aufgenommen. Aus den erhaltenen Daten konnte direkt die Kinetik der Fluoreszenzlöschung bestimmt und die nichtphotochemische Fluoreszenzlöschung (q_N) berechnet werden.

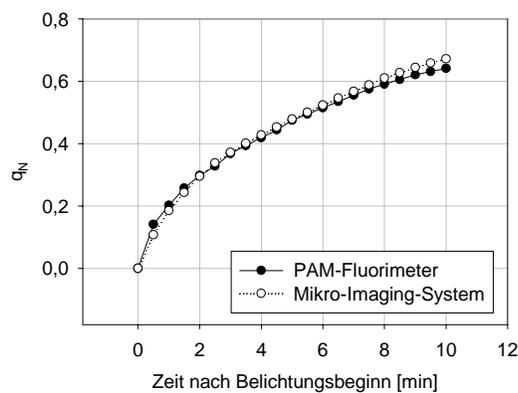


Abbildung 3-6 Exemplarischer Verlauf der nichtphotochemischen Fluoreszenzlöschung (q_N) eines Tabakblattes nach einstündiger Vorverdunkelung. Die Intensität der sättigenden Lichtpulse betrug $3030\mu\text{E}$, die der aktinischen Beleuchtung $820\mu\text{E}$. Nähere Erläuterungen im Text.

Abbildung 3-6 zeigt deutlich, dass der Verlauf von q_N mit beiden Messverfahren nahezu identisch aufgenommen werden kann. In weiteren, unabhängigen Messreihen wurde dieser Zusammenhang verifiziert und es ergab sich eine durchschnittliche prozentuale Abweichung der am Mikroskop erhaltenen Daten von den Daten des PAM-Fluorimeters von nur $-1,44\% \pm 4,92\%$ ($n=200$).

In ähnlicher Weise wurde die Berechnung von mikroskopischen Quanteneffizienz- (Φ_{PSII}) und PET-Bildern mit Hilfe des 'Makro-Imaging-Systems' und eines PAM-Fluorimeters verglichen. In Abbildung 3-7 ist zu erkennen, dass die mit der Mikro-Imaging Methode ermittelten PET-Raten um weniger als 2% von den mit dem PAM-Fluorimeter ermittelten Werten abweichen. Weitere Details und Informationen zur Berechnung PET-Bilder sind in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Die Ergebnisse der in Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7 gezeigten Experimente zeigen,

dass die hier entwickelte 'Mikro-Imaging-Methode' eine stabile Methode zur quantitativen, bildgebenden Analyse photosynthetischer Prozesse auf zellulärer und subzellulärer Ebene ist.

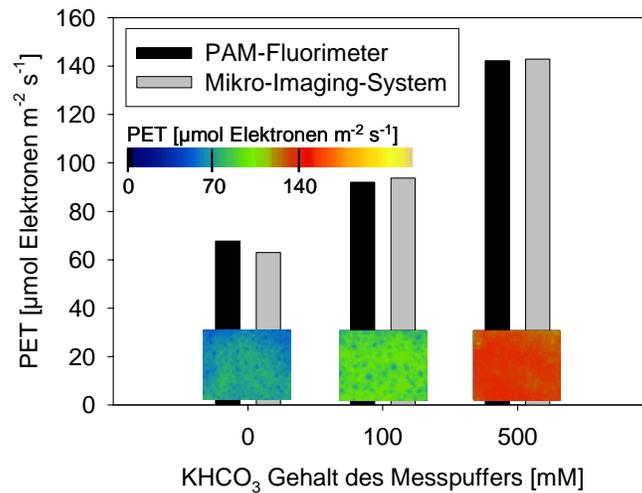


Abbildung 3-7 Exemplarische Kalibrationsreihe zur Überprüfung der Messgenauigkeit des Mikro-Imaging-Systems. Als Referenz diente die Messung einer identisch behandelten Parallelprobe mit dem PAM-Fluorimeter. Neben den Messwerten der zwei Methoden sind die mit dem Mikro-Imaging-System aufgenommenen PET-Bilder dargestellt.

3.2.5 Berechnung von PET-Bildern aus Mikroskopbildern

Für die Berechnung von PET- und q_N -Bildern aus den Mikro-Fluoreszenzdaten werden im Wesentlichen dieselben Rechenverfahren angewendet, die bereits im allgemeinen Material und Methoden Kapitel für das Makro-Imaging beschrieben wurden (vgl. Kapitel 2.4.1). Jedoch wurden mussten einige Berechnungen modifiziert werden, da im Gegensatz zum 'Makro-Imaging' die routinemäßige Verwendung eines Fluoreszenzstandards nicht möglich war. Beim 'Makro-Imaging' dient dieser Standard dazu die Intensität der aktinischen (LI_{akt}) und sättigenden (LI_{SLP}) Beleuchtung während der Messung zu bestimmen. Beim 'Mikro-Imaging' wurde LI_{SLP} vor der Messung eingestellt. Während der Messung konnte die Lichtintensität mit Neutral-Grau Filtern zwischen LI_{SLP} und verschiedenen LI_{akt} umgeschaltet werden (Abbildung 3-1). Exemplarisch sind die Einstellmöglichkeiten für eine sättigende Lichtintensität von $3046 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2 Während der Mikro-Imaging-Messung zu verwendende Einstellmöglichkeiten für die Intensität von aktinischem und sättigendem Licht

Filter (-Kombination)	Transmission [%]	PAR [$\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$]
ohne Filter	100	3046
NG 4	26,92	820,0
NG 16	8,63	262,9
NG 4 + NG 16	2,28	69,4

Während einer Messung stehen somit vier verschiedene Lichtintensitäten zur Verfügung, die durch manuelles Zuschalten der NG-Filter in den Anregungsstrahlengang angewählt werden können. Nimmt man z.B. $F_{M'}$ -Bilder bei einer sättigenden Lichtintensität von $3046 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ und F_S -Bilder bei einer aktinischen Lichtintensität von $820 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ auf, muss z.B. das F_S -Bild mit dem Faktor 3,71 multipliziert werden (s.u.), um es mit dem Bild bei sättigendem Licht vergleichbar zu machen. Um Informationsverluste zu vermeiden, wurden die am Mikro-Imaging-System aufgenommenen 12-bit Fluoreszenzbilder als 16-bit Tiff-Bilder abgespeichert. Das 16-bit Format der aufgenommenen Bilder bietet den Vorteil, dass die 12-bit Kamera die Fluoreszenzdaten auf nur 4096 der, bei 16-bit möglichen 65536 Graustufen, darstellt. Daher bietet dieses Bildformat einen deutlich größeren Spielraum für die Normierung der Bilder oder weitere Berechnungen, ohne dass es durch eine geringe Farbtiefe zu Informationsverlust kommt. Alle im Folgenden beschriebenen, weiterführenden Berechnungen wurden mit dem Programm OPTIMAS 6.51 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) durchgeführt und erfolgen 'Pixel für Pixel'. Die Berechnung von PET-Bildern aus je einem F_S - und $F_{M'}$ -Bild erfolgt grundsätzlich auf folgende Weise:

1. Korrektur des Grundrauschens aller zu verrechnenden Fluoreszenzbilder (siehe Formel 11).
2. Normierung der Bilder (Formel 12)
3. Berechnung von $\Phi_{\text{PS II}}$ -Bildern (Formel 13)

Formel 12

$$F_{M' \text{ norm}} = \frac{F_{M'}}{\left(\frac{L/\text{SLP}}{L/\text{akt}}\right)} \quad \text{bzw.} \quad F_{S \text{ norm}} = F_S \cdot \left(\frac{L/\text{SLP}}{L/\text{akt}}\right)$$

Formel 13

$$\Phi_{\text{PS II}} - \text{Bild} = \frac{F_{M' \text{ norm}} - F_S}{F_{M' \text{ norm}}} \quad \text{bzw.} \quad \Phi_{\text{PS II}} - \text{Bild} = \frac{F_{M'} - F_{S \text{ norm}}}{F_{M'}}$$

Aus den mit diesen Formeln berechneten $\Phi_{\text{PS II}}$ -Bildern kann, mit Hilfe einer geeigneten, linearen Skala der 4095 Graustufen, direkt der photosynthetische Elektronentransport ausgelesen werden. Für die Bestimmung der PET-Werte aus den 4096 Graustufen gilt:

Formel 14

$$\Phi_{\text{PS II}} = \frac{\text{ausgelesene Grauwerte aus } \Phi_{\text{PS II}} - \text{Bild}}{4096}$$

Für das Erstellen einer Graustufenskala zur einfachen Interpretation der Bilder wurde die von Schreiber (1997) entwickelte Formel zur Bestimmung des PET aus der Quanteneffizienz verwendet (Formel 5). Mit diesen Berechnungsschritten ist es möglich, eine schnelle, einfache Berechnung abgeleiteter Größen, wie z.B. qN , Φ_{PSII} und der PET-Rate aus den Fluoreszenzdaten durchzuführen (Abbildung 3-8). Somit steht ein einfaches Werkzeug zur Ermittlung photosynthetischer Parameter auf subzellulärer Ebene zur Verfügung.

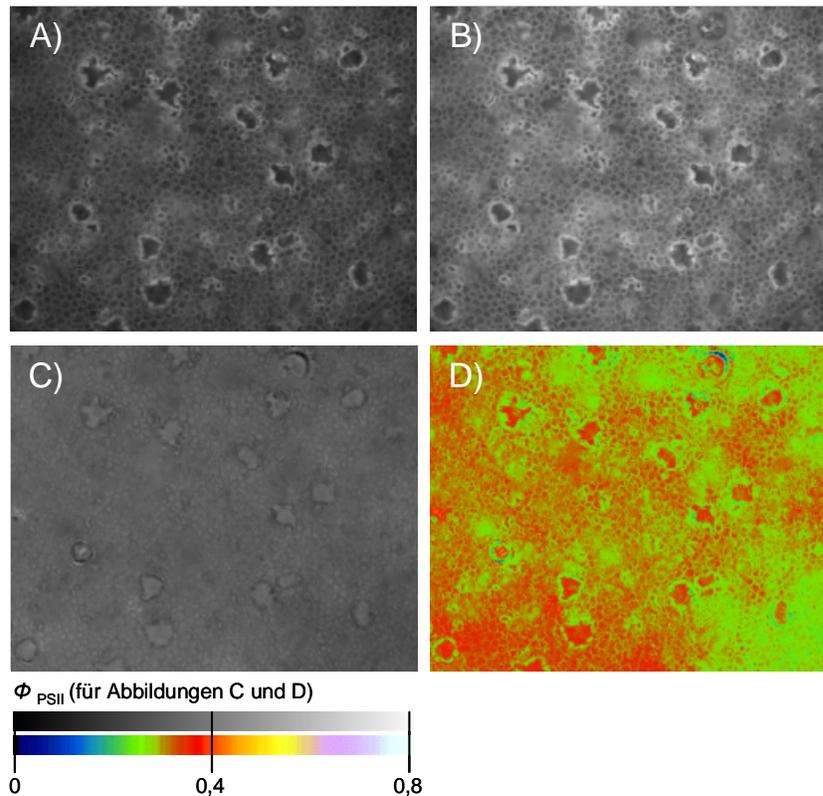


Abbildung 3-8 Chlorophyll-a-Fluoreszenzbilder und daraus berechnete Bilder der Quanteneffizienz. A) FM-Bild, B) FS-Bild, C und D) 12-bit-Graustufen- und Falschfarben-Bild der Quanteneffizienz von PS II.

Ein Problem bei der Berechnung hochauflösender Fluoreszenzbilder ist die, trotz geringer Tiefenschärfe der Objektivs, auftretende Streu-Fluoreszenz. Diese resultiert aus vielfach gestreuter Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz aus den Zellen, die unterhalb der Fokusebene im Blatt liegen (siehe Abbildung 3-8 A und B). Das Problem potenziert sich durch die Verrechnung und führt zu einem diffusen 'Photosyntheserausachen' auch in Bereichen ohne Chloroplasten oder Zellen (z.B. Interzellularräume oder substomatäre Höhlen; siehe Abbildung 3-8 C und D).

Um die Auflösung der berechneten Bilder zu optimieren, ohne relevante Fluoreszenzdaten zu verfälschen, sollte ein Verfahren zur Hintergrundkorrektur der Fluoreszenzbilder entwickelt werden. Die Nachbearbeitung und teilweise Korrektur der Streu-Fluoreszenz erfolgte manuell mit dem Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS 6.51 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

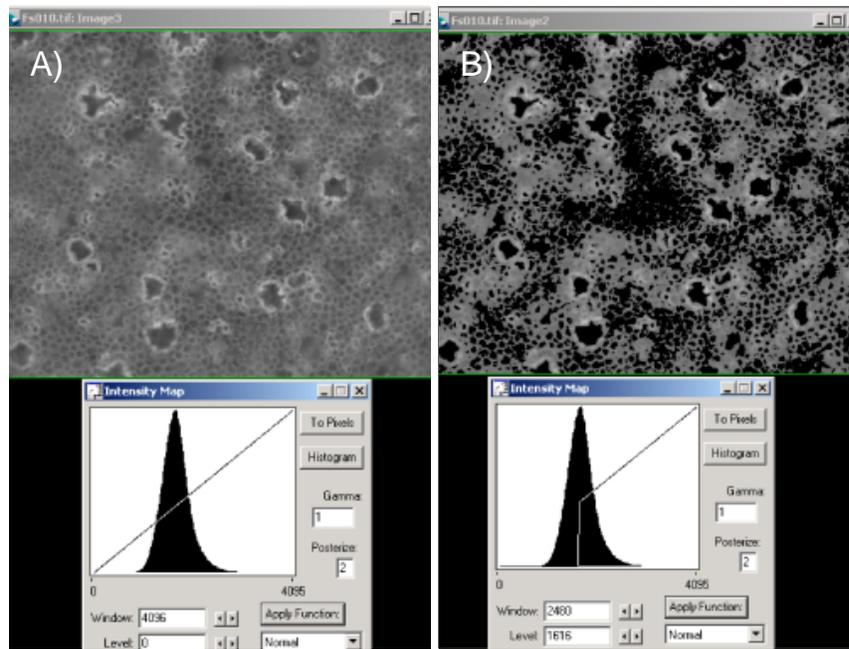


Abbildung 3-9 Hintergrundkorrektur von Fluoreszenzbildern am Beispiel des F_M -Bildes aus Abbildung 3-8. A) F_M -Bild mit linearer Grauwertskalierung. B) Hintergrundkorrigiertes F_M -Bild. Unter den Fluoreszenzbildern ist die jeweils zugehörige Intensitätsskala dargestellt.

Zunächst wird der durchschnittliche Grauwert der Hintergrundfluoreszenz ermittelt. Dieser Wert wird über mehrere Kalibrationsschritte auf Null gesetzt, während die Graustufen der helleren Bereiche unverändert bleiben (Abbildung 3-9). Nachdem dieses Korrekturverfahren auf die F_M - und F_S -Bilder angewendet wurde, kann die Berechnung der Quanteneffizienz- und PET-Bilder erfolgen.

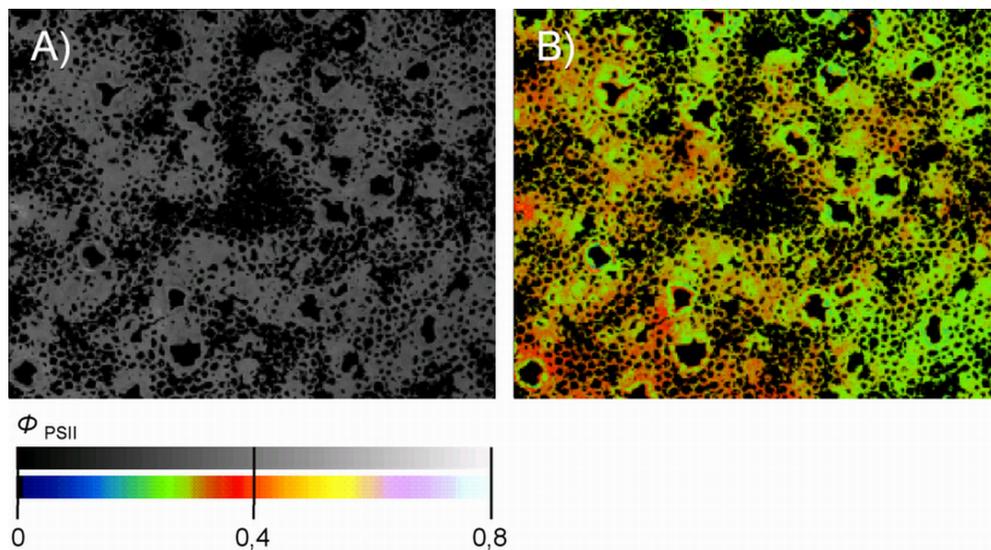


Abbildung 3-10 Korrigierte Bilder der Quanteneffizienz von PS II, dargestellt als (A) 12-bit-Graustufen- und (B) Falschfarben-Bild. Die Bilder wurden aus den korrigierten Fluoreszenzbildern (Abbildung 3-9) berechnet.

Vergleicht man die in Abbildung 3-8 und Abbildung 3-10 dargestellten Quanteneffizienzbilder kann man erkennen, dass das beschriebene Korrekturverfahren die störende Hintergrundfluoreszenz und die daraus resultierende fehlerhafte Quanteneffizienz nahezu vollständig eliminiert. Interzellularräume und Zellbereiche ohne Chloroplasten, wie z.B. die Zentralvakuole, weisen keine signifikante Quanteneffizienz auf. Da die Berechnung hochauflösender PET-Bilder jedoch sehr zeitaufwendig ist und durch die zusätzlichen Korrekturschritte auch Bildfehler erzeugt werden können, wird dieses Verfahren nur an ausgewählten Bildern angewendet. Besonders bei hochauflösenden Fluoreszenzbildern, ab einer Objektivvergrößerung von 25x aufwärts, ist das beschriebene Korrekturverfahren jedoch unerlässlich, um detailreiche Bilder photosynthetischer Prozesse zu erhalten. Zur schnellen, bildgebenden Analyse von räumlichen Veränderungen der Photosynthese ist, insbesondere bei schwacher Objektivvergrößerung (5 – 10x), ein Vergleich der unkorrigierten PET-Bilder mit den Fluoreszenzbildern aussagekräftig genug.

3.2.6 Optimierung der Bildauflösung

Das Mikro-Imaging-System wurde entwickelt um hochauflösende Bilder der photosynthetischen Aktivität im pflanzlichen Gewebe zu erhalten. Zur Begasung der Gewebeproben mit definierten Gasen wurde eine kleine Blattküvette entwickelt, die fest auf dem Objektisch des Mikroskops montiert werden kann. Ohne ein komplettes Gasmischsystem zu installieren, konnte jedoch nur eine sehr grobe Regulation des CO₂-Gehalts des Messgases durchgeführt werden. Erste Versuche mit Blättern von Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) und Weizen (*Triticum aestivum* L.) zeigten, dass es prinzipiell möglich ist Messungen unter verschiedenen Gasbedingungen am Mikro-Imaging System durchzuführen, jedoch ist die Auflösung der Bilder aus verschiedenen Gründen stark eingeschränkt. Im intakten Blatt passiert die Chlorophyll-Fluoreszenz vor Eintritt in das Objektiv viele Zellen und Interzellularen, wodurch eine unterschiedlich hohe Anzahl von Grenzflächen Luft-Wasser, bzw. Wasser-Luft, durchquert wird. Da Luft und Wasser unterschiedliche Brechungsindizes aufweisen (Luft=1,000292; Wasser=1,3329) wird das einfallende Fluoreszenzlicht an jeder dieser Grenzflächen gemäß dem Snelliusschen Brechungsgesetz gebrochen. Da außerdem auch Totalreflexion und Dispersion an den Grenzflächen auftreten, ist eine detailgetreue Abbildung der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz in intaktem Blattgewebe bei hoher Auflösung (> 5x Objektiv) nahezu unmöglich (siehe Abbildung 3-11 A und D).

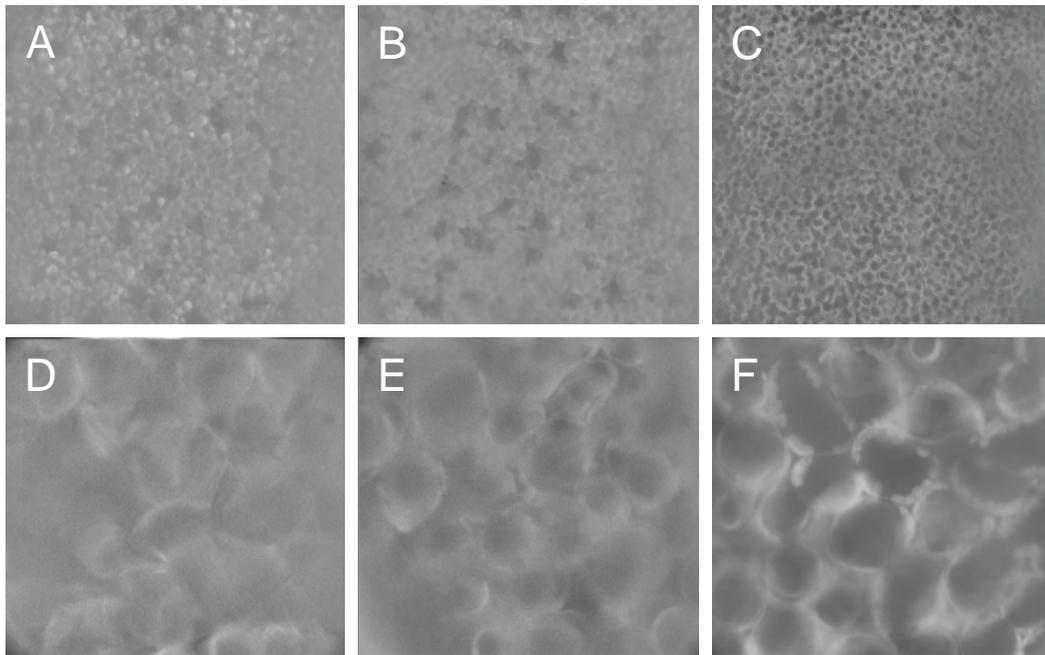


Abbildung 3-11 Chlorophyll-a-Fluoreszenzbilder von Tabakblättern nach unterschiedlicher Vorbehandlung. A) und D) Unbehandeltes Blatt in der Mikroskop-Küvette, B) und E) Blattoberseite mit Wasser beschichtet, C) und F) mit TRIS-HCl Puffer infiltriertes Blattstück. A-C) 10x Objektiv, D-F) 63x Objektiv.

Die Fluoreszenzbilder in Abbildung 3-11 zeigen deutlich, dass bereits ein Ausfüllen des Zwischenraumes von Blatt und Küvettendeckglas mit wässrigen Medien (B und E) zu einer deutlichen, jedoch nur kurzfristigen, Verbesserung der Bildauflösung führt. Eine wesentliche Optimierung der Auflösung konnte durch die Infiltration des zu untersuchenden Blattes mit wässrigem Puffer erzielt werden (Abbildung 3-11 C und F), wodurch die Grenzflächeneffekte reduziert und die Auflösung gesteigert werden kann.

Nach der Infiltration eines Blattes mit einem wässrigen Medium, ist es jedoch nicht mehr möglich über die Änderung des äußeren CO_2 -Partialdrucks (C_a) Einfluss auf die CO_2 -Verfügbarkeit für die RubisCO und somit auf die photosynthetische Aktivität zu nehmen, wodurch einige Messverfahren nicht durchführbar sind. Da in wässrigem Puffer wenig Carbonat enthalten ist, musste ein Infiltrationsmedium entwickelt werden, welches die CO_2 -Versorgung für den Messzeitraum sichert stellt und die Aufnahme der PET-Rate unter reproduzierbaren Bedingungen erlaubt. Hierzu wurden verschiedene Puffermedien mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3) hergestellt.

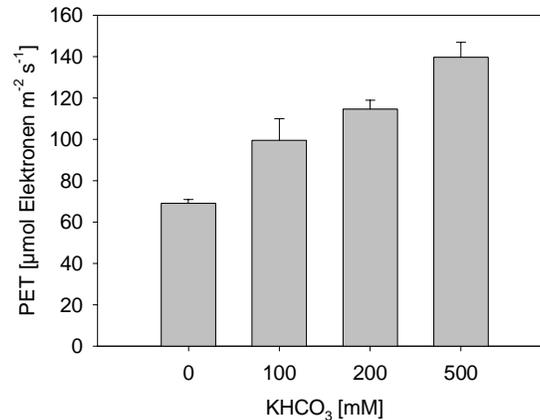


Abbildung 3-12 Abhängigkeit des maximalen photosynthetischen Elektronentransports von der KHCO₃-Konzentration im Messpuffer. Die Versuche wurden an infiltrierte Blattstücken von Tabak durchgeführt. Die Intensität der aktinischen Beleuchtung betrug 820 µE. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte aus jeweils 3 unabhängigen Messungen

Da andere Puffermedien den PET deutlich herabsetzten, wurden alle weiteren Versuche 20mM TRIS-HCl-Puffer (pH 7,1) durchgeführt. Abbildung 3-12 zeigt, dass bei einer KHCO₃-Konzentration von 500mM die maximale Kapazität des PET erreicht wird, weshalb für alle weiteren Messungen an Tabakblättern ein 20mM TRIS-HCl-Puffer mit 500mM KHCO₃ eingesetzt wurde. Ein mit diesem Puffer infiltrierte Tabakblatt kann unter sättigenden Lichtbedingungen mindestens 15 min lang untersucht werden, bevor es zu einem signifikanten Absinken des PET kommt.

3.2.7 Anwendungsbeispiele

3.2.7.1 Messung der Photosynthese nach mechanischer Verletzung eines Blattes

Hauptziel bei der Entwicklung des Mikro-Imaging Systems war es eine hohe räumliche Auflösung bei der Messung photosynthetischer Parameter zu ermöglichen, um die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen von Pflanzen während der Interaktion mit pathogenen Mikroorganismen zu vertiefen. Eine kleine mechanische Verletzung eines intakten Blattes führt, ähnlich wie bei der Pathogenabwehr, zu einer hochlokalisierten Wundreaktion in deren Verlauf auch die photosynthetische Aktivität der angrenzenden Zellen beeinflusst wird. Hierzu wurden lichtadaptierte Sekundärblätter von Weizen (*Triticum aestivum* L.) mit einer feinen Nadel verletzt und in den folgenden Minuten die Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz der Verletzungsregion mit dem 'Mikro-Imaging-System' aufgenommen.

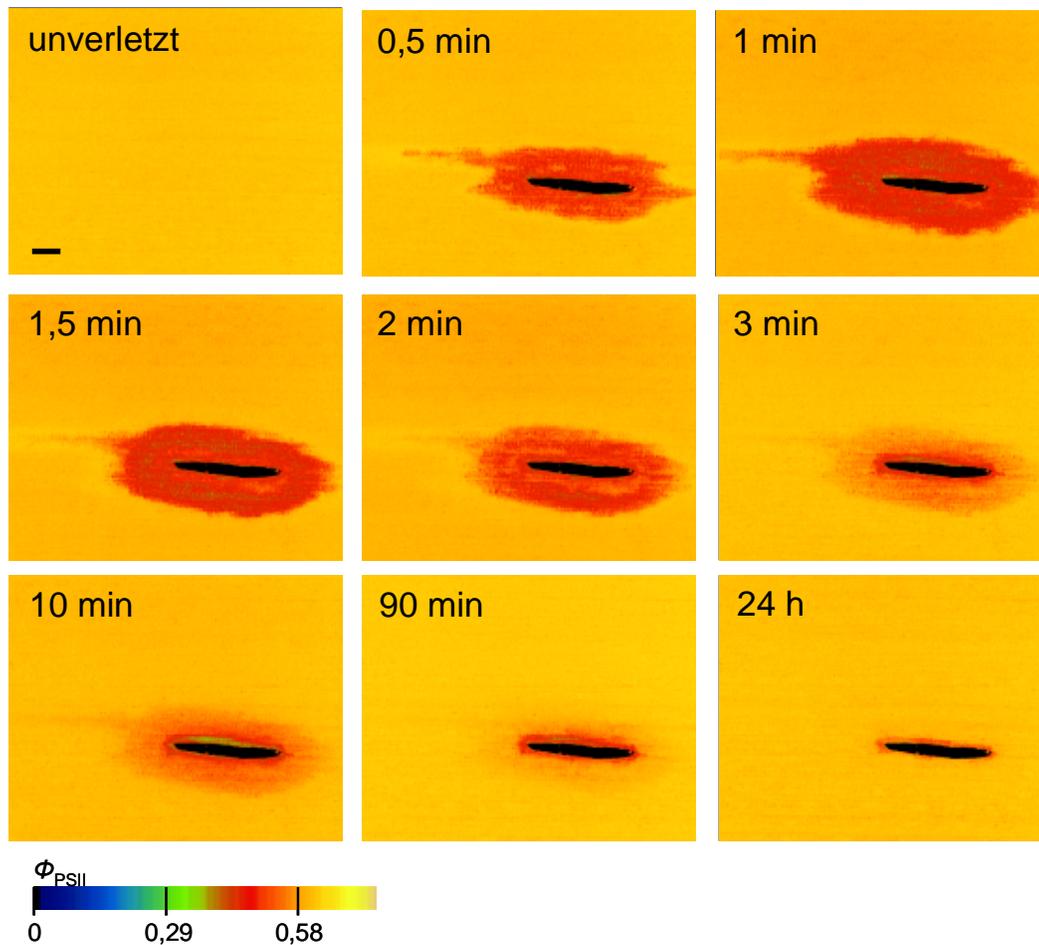


Abbildung 3-13 Änderungen in der Quanteneffizienz von PSII in einem Weizenblatt nach mechanischer Verletzung. Die Aufnahme der Fluoreszenzdaten erfolgte in der Mikro-Küvette unter definierten Gasbedingungen mit 350 ppm CO₂ 21% O₂ und 78% N₂. Die Intensität des aktinischen Lichts betrug 250 μE, die der sättigenden Lichtpulse 1900 μE. Der schwarze Balken in Bild A repräsentiert 1mm.

Abbildung 3-13 zeigt den Verlauf der Quanteneffizienz von PSII in einem Weizenblatt nach mechanischer Verletzung. Bereits 30 Sekunden nach der Verletzung sank die Quanteneffizienz im umgebenden Palisadenparenchym um ca. 33% ab. Nachdem sich der Bereich mit reduzierter Quanteneffizienz nach 1 min maximal, in einem Bereich von etwa 12 Parenchymzellen um die Verletzung ausgedehnt hatte, stieg die Quanteneffizienz innerhalb der folgenden 2 min wieder deutlich an. 90 min nach Verletzung war die photosynthetische Aktivität in den umgebenden Zellen wieder auf Ausgangsniveau. Nur in ca. 2 bis 3 Zellen, die direkt an die Verletzungsregion grenzen, blieb die Quanteneffizienz von PSII dauerhaft erniedrigt.

Es ist sehr wahrscheinlich, dass es sich hier um eine zelluläre Reaktion auf mechanische Verwundung handelt. Möglicherweise findet in der Umgebung einer Verletzung eine Umsteuerung des pflanzlichen Stoffwechsels statt, um die Wundstelle zu versiegeln. Typischerweise ist photoautotrophes 'Source'-Gewebe optimal für die Produktion und den Export von Kohlenhydraten eingestellt. Der heterotrophe Stoffwechsel läuft daher nur stark eingeschränkt ab. Beispielsweise

wird der stromale OPPP, ein zentraler Stoffwechselweg für die Versorgung von Biosyntheseprozessen mit Metaboliten, in photoautotrophem 'Source'-Gewebe über das Thioredoxin-System herabreguliert, um ein sog. 'futile-cycling' mit dem im Licht ablaufenden Calvin-Zyklus zu vermeiden [Scheibe (1991)]. Im Fall einer Verwundung ist jedoch eine schnelle Reaktion erforderlich, um den Wundbereich versiegeln zu können. Für das Anlaufen von Biosynthesereaktionen muss allerdings der autotrophe, assimilatorische Stoffwechsel, wie in dem Experiment zu sehen ist, herabreguliert werden. Diese Reaktionen laufen höchstwahrscheinlich in den 2 bis 3, die Verletzung direkt umgebenden Zellen ab. Jedoch kann hiermit nicht das schnelle, reversible Absinken der photosynthetischen Aktivität in der weiteren Umgebung der Verwundung erklärt werden. Die Daten zeigen, dass es mit dem Mikro-Imaging System möglich ist sowohl schnelle Änderungen der photosynthetischen Aktivität, mit stark erhöhter Auflösung gegenüber konventionellen Imaging-Systemen, zu erfassen und diese auch über einen Messzeitraum von vielen Stunden zu verfolgen.

3.2.7.2 Imaging-Mikroskopie von Stoma-Chloroplasten

Nachdem die Eignung des Mikro-Imaging-Systems zur Verfolgung von lokalen Änderungen der photosynthetischen Aktivität im Blatt nachgewiesen war, sollten weitere Versuche die Grenzen der räumlichen Auflösung des Systems definieren. Pflanzliche Schließzellen befinden sich unmittelbar an der Blattoberfläche (bzw. -unterseite) und erschließen sich optimal der mikroskopischen Untersuchung, ohne dass andere Zellschichten die Aufnahme durch Brechung oder Streuung verfälschen. Das in Abbildung 3-14 A gezeigte, unbearbeitete Fluoreszenzbild verdeutlicht diesen Vorteil gegenüber den in Abbildung 3-11 dargestellten Aufnahmen der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz im Palisadenparenchym von unbehandelten Tabakblättern.

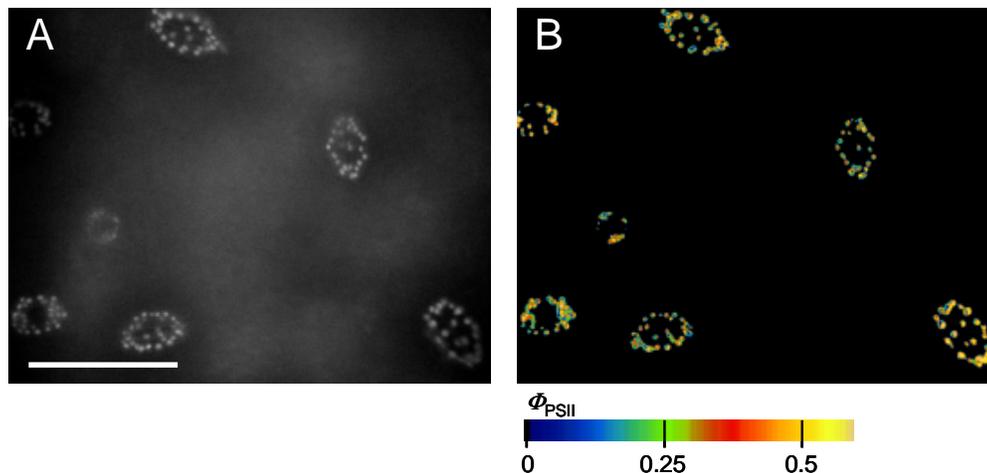


Abbildung 3-14 Hochoauflösende Bilder der photosynthetischen Aktivität in Chloroplasten der Schließzellen von Tabakblättern. (A) Bild der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz und (B) daraus abgeleitetes Bild der Quanteneffizienz von PSII in Schließzellen von *Nicotiana tabacum* L.. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte in der Mikro-Imaging-Küvette unter 350 ppm CO₂, 21% O₂, 78% N₂. Die Intensität der aktinischen Beleuchtung betrug 500 µE, die des sättigenden Lichtpulses 1900 µE. Der weiße Balken repräsentiert 100 µm.

Abbildung 3-14 B zeigt die Quanteneffizienz von Stoma-Chloroplasten unter Anzuchts-Licht- und Gasbedingungen. Bereits bei einer Objektivvergrößerung von 40x ist gut zu erkennen, dass die Quanteneffizienz von Zelle zu Zelle variiert und sogar Inhomogenitäten innerhalb der Chloroplasten einer Schließzelle auftreten können. Daher wurden weitere Versuche mit der maximal möglichen Mikroskop-Vergrößerung (100x) durchgeführt.

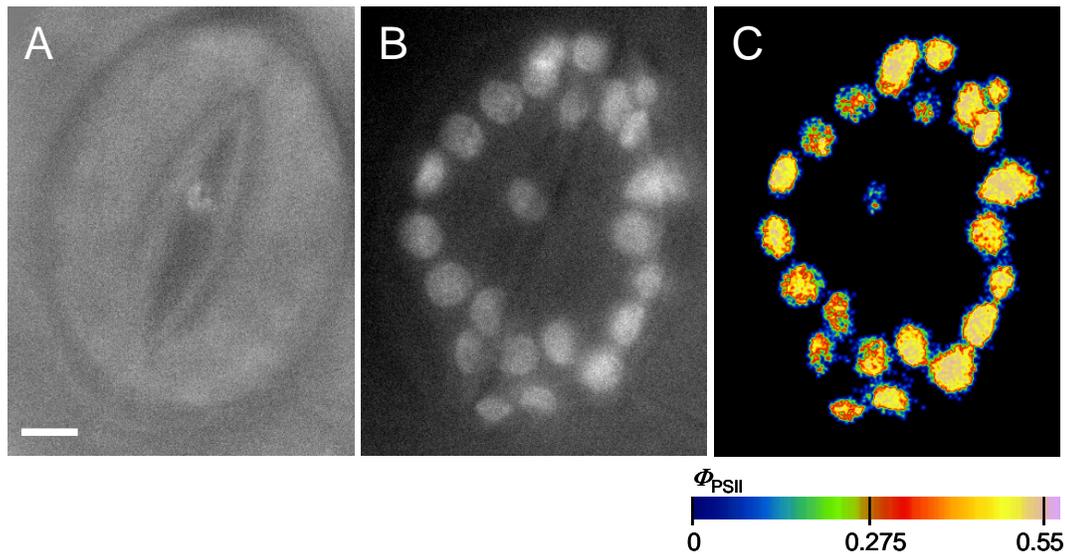


Abbildung 3-15 Bilder der photosynthetischen Aktivität einzelner Chloroplasten in Schließzellen von *N. tabacum* L. cv SNN. A) Durchlichtaufnahme einer Spaltöffnung, B) unbearbeitetes Chlorophyll-a-Fluoreszenzbild und C) Quanteneffizienzbild derselben Spaltöffnung. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte in der Mikro-Imaging-Küvette unter 350 ppm CO₂, 21% O₂, 78% N₂. Die Intensität der aktinischen Beleuchtung betrug 645 µE, die des sättigenden Lichtpulses 2440 µE. Der weiße Balken in (A) repräsentiert 10 µm.

Abbildung 3-15 C zeigt, dass nicht alle Chloroplasten innerhalb einer Schließzelle identisch hohe photosynthetische Aktivitäten aufweisen, sondern etwa $\frac{1}{4}$ aller Chloroplasten eine 35%ige Reduktion gegenüber der maximalen Quanteneffizienz von 0,55 zeigen. Dieses ist ein direkter Beweis, dass die photosynthetische Aktivität der Chloroplasten in einer Zelle sehr inhomogen sein kann. Einzelne Chloroplasten können mit hoher Effizienz Photosynthese betreiben, während die photosynthetische Aktivität eines direkt benachbarten Plastiden stark reduziert ist. Über die Ursachen dieser unterschiedlichen photosynthetischen Aktivität kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Möglicherweise liegen in einer Zelle Chloroplasten mit unterschiedlichen physiologischen Aufgaben oder in unterschiedlichen Entwicklungsstadien vor. Auch könnte die Photosynthese in einzelnen Chloroplasten unabhängig reguliert werden, um die Gesamtrate dem tatsächlichen Bedarf genau anzupassen.

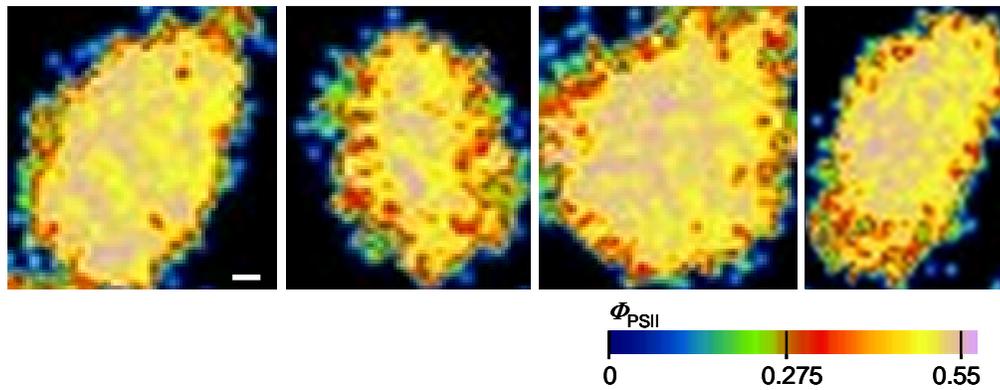


Abbildung 3-16 Quanteneffizienzbilder von Chloroplasten intakter Schließzellen von *N. tabacum* L. cv SNN. Die gezeigten Bilder sind Ausschnittsvergrößerungen aus Abbildung 3-15 C. Der weiße Balken entspricht 1 μm .

Bei genauerer Betrachtung der Mikroskopbilder fällt auf, dass die Quanteneffizienz von PS II der aufgenommenen Chloroplasten zur Mitte hin maximal hoch ist und zum Rand hin deutlich abfällt (siehe Abbildung 3-15 C und Abbildung 3-16). Diese Beobachtung ist in guter Übereinstimmung mit der bekannten Ultrastruktur der Chloroplasten, da im zentralen Bereich der Chloroplasten das Thylakoidmembransystem liegt welches die Komponenten des linearen PET, z.B. LHC II und PS II, enthält. Unter optimalen Bedingungen durchgeführte Mikro-Imaging-Messungen, z.B. an isolierten Chloroplasten, könnten daher weitere Erkenntnisse über die Heterogenität des linearen PET innerhalb des Chloroplasten und der Thylakoidmembran liefern. Die von Goh *et al.* (1999) mit einem Mikro-PAM-Fluorimeter durchgeführten Untersuchungen lieferten bereits Erkenntnisse über die photosynthetische Aktivität in Schließzellen bei künstlicher, irreversibler Öffnung der Stomata durch Fusicoccin. Das dort angewendete Messverfahren erlaubte, im Gegensatz zu der hier vorgestellten Methode, jedoch nur die Bestimmung integrierter photosynthetischer Parameter.

3.2.8 Schlussfolgerungen und Ausblick

Baker *et al.* (2001) zeigten, dass sich das Mikro-Imaging gut zur Unterscheidung der photosynthetischen Aktivität benachbarter Zellen eignet. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode bietet darüber hinaus die Möglichkeit zur subzellulären, unter geeigneten Bedingungen sogar subchloroplastidären, Auflösung photosynthetischer Prozesse in intaktem Blattgewebe. Die Reaktion einzelner Zellen auf veränderte Umweltbedingungen kann mit dieser Methode ebenso untersucht werden, wie die Umstellung des Stoffwechsels einzelner Zellen nach Pathogenbefall oder Verwundung. Darüber hinaus ist es nun auch möglich, die beobachteten physiologische Veränderungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels direkt mit histologisch detektierbaren Veränderungen einzelner Zellen zu korrelieren und funktionell miteinander in Beziehung zu setzen (vgl. Kapitel 4.1.1.10, 4.1.1.11 und Scharte *et al.* (2005)). Inzwischen sind erste Mikro-Imaging-Systeme bereits käuflich zu erwerben (z.B. Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutsch-

land). Jedoch basieren diese Systeme auf der Methode der pulsamplitudenmodulierten Fluoreszenzmessung und sind aufgrund dessen in ihrer räumlichen Auflösung dem hier entwickelten System nicht ebenbürtig. Das hier entwickelte Mikro-Imaging-System stellt ein wichtiges Werkzeug zum Verständnis der Regulation der Photosynthese dar, da es eine bisher nicht erreichte räumliche Auflösung photosynthetischer Prozesse, bei gleichzeitiger weitestgehender Unversehrtheit des untersuchten Blattes, unter physiologischen Bedingungen erlaubt.

4 Ergebnisse und Schlussfolgerungen

**Photosynthese und Kohlenhydrat-Stoffwechsel in Tabakblättern
während der Interaktion mit *Phytophthora nicotianae***

Hardy Schön, Judith Scharte

und

Jutta Essmann (Messungen von Kohlenhydraten und Invertase-Aktivität)

4.1 Vorversuche

Für die Messungen photosynthetischer Parameter, wie z.B. der PET-Rate oder der photosynthetischen Induktion zur indirekten Bestimmung des Dunkelstoffwechsels, mussten zunächst einige grundlegende physiologische Charakteristika der Versuchspflanzen ermittelt werden. Die standardisierte Anzucht der Pflanzen unter konstanten Umweltbedingungen trägt, wie im Folgenden gut zu erkennen ist, entscheidend zur Vergleichbarkeit der Analysedaten bei. Ein wichtiger Parameter bei der Messung des PET ist das Lichtsättigungsverhalten der Pflanzen. Die Lichtsättigungskurven wurden an ausdifferenzierten 'Source'-Blättern von Tabak aufgenommen. Die PET-Rate wurde mit dem Imaging-System mit angeschlossener Gasmischanlage bestimmt, welches die Aufnahme der Lichtsättigungskurve bei steigender aktinischer Lichtintensität, aber ansonsten konstanten Umgebungsbedingungen ermöglicht.

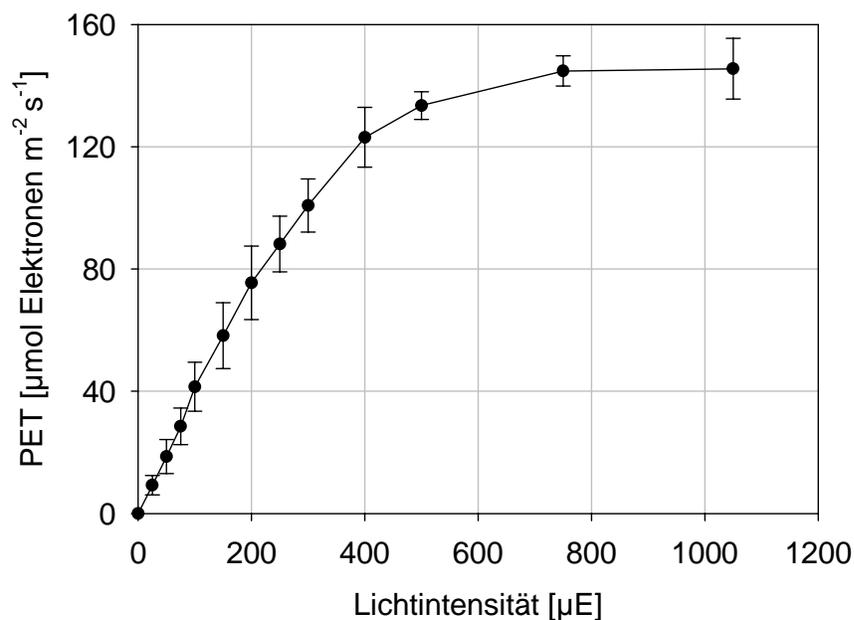


Abbildung 4-1 Lichtsättigungskurve von ausdifferenzierten Tabakblättern (*Nicotiana tabacum* L. cv. SNN). Alle Messungen wurden unter 700 ppm CO₂, 21% O₂, 78% N₂, einer Messgastemperatur von 22°C, bei einem Taupunkt von 12°C durchgeführt. Die dargestellten Messpunkte sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier unabhängigen Messreihen.

Abbildung 4-1 zeigt, dass die unter standardisierten Bedingungen angezogenen Tabakpflanzen ein sehr einheitliches Lichtsättigungsverhalten zeigen. Daher wurden alle weiteren Versuche zur Bestimmung der maximalen PET-Rate bei einer Lichtintensität von 820 μE durchgeführt. Bei dieser Lichtintensität ist die Photosynthese der Versuchspflanzen lichtgesättigt. Außerdem wurde diese Lichtstärke aus verschiedenen technischen Gründen ausgewählt. Des Weiteren war die Bestimmung des CO₂-Kompensationspunktes von Tabak für die Messung der photosyntheti-

schen Induktion notwendig. Dieses von Meng *et al.* (2001) entwickelte Messverfahren gibt indirekt, über die Messung photosynthetischer Parameter, Einblicke in den Metabolitzustand im Chloroplasten und somit in den Dunkelstoffwechsel einer vorverdunkelten Pflanze. Nähere Erläuterungen zu diesem Messverfahren sind in Kapitel 2 beschrieben. Die Induktionsmessung wird bei reduziertem CO₂-Partialdruck (etwa am CO₂-Kompensationspunkt) durchgeführt. Unter diesen Bedingungen ist die Induktion des Calvin-Zyklus nach einer Dunkelphase von der chloroplastidären Konzentration an Triosephosphaten abhängig. Ist diese bereits im Dunkeln hoch – dieser Zustand kann durch einen aktivierten OPPP erreicht werden –, wird auch der Calvin-Zyklus – und damit die Photosynthese – schnell induziert. Messungen an Tabakblättern ergaben, dass bei einer Lichtintensität von 250 µE der CO₂-Kompensationspunkt bei ca. 65 ppm lag. Daher wurden alle Induktionsmessungen mit einer Lichtintensität von 250 µE und einem CO₂-Partialdruck von 65 ppm durchgeführt.

4.1.1 Umsteuerung des pflanzlichen Primärstoffwechsels nach Infektion mit *Phytophthora nicotianae*

Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Analyse des pflanzlichen Primärstoffwechsels während der Abwehr des phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora nicotianae*. Diese Untersuchungen sollten aufzeigen, dass nicht nur die bereits umfassend untersuchten Änderungen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels, sondern auch Umstellungen des Primärstoffwechsels eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche pflanzliche Abwehrantwort sind. In der ersten Phase der Untersuchungen wurde daher das Tabakkultivar *Nicotiana tabacum* L. cv. SNN (SNN) ausgewählt. Zwar war bislang nicht bekannt, ob SNN das von uns verwendete Pathogen abwehrt, jedoch haben bereits eine Reihe von Untersuchungen gezeigt, dass dieses Kultivar hochresistent gegenüber anderen mikrobiellen Pathogenen, wie z.B. dem Tabak-Mosaik-Virus (TMV), ist [z.B. Seo *et al.* (2000) und Referenzen hierin]. Parallel zu den Untersuchungen an SNN wurden vergleichende Untersuchungen an dem Tabakkultivar *N. tabacum* L. cv. Xanthi (Xanthi) durchgeführt, welches als suszeptibel gegenüber dem Oomyceten *P. nicotianae* gilt [Way *et al.* (2000)]. Die an diesen Kultivaren gewonnenen Erkenntnisse könnten aufzeigen, welche bei einer inkompatiblen Interaktion auftretenden Umstellungen des Primärstoffwechsels typisch für eine resistente Pflanze sind und möglicherweise eine notwendige Voraussetzung für die Induktion einer erfolgreichen Abwehrantwort darstellen.

4.1.1.1 Die hypersensitive Reaktion (HR)

Da in der Literatur bislang keine Angaben über die Resistenz von SNN gegenüber dem Oomyceten *Phytophthora nicotianae* existieren, wurde zunächst überprüft wie diese Tabaklinie auf die Infektion reagiert. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Probeinfektionen an 'Source'-Blättern von SNN durchgeführt und die Reaktion auf das Pathogen analysiert. Die Infektion mit

den Zoosporen von *P. nicotianae* erfolgte nach der Methode von Colas *et al.* (2001). Die Zoosporenlösung wird bei diesem Ansatz direkt in das Mesophyll der zu untersuchenden Blätter eingespritzt (Abbildung 4-2 A; siehe auch Kapitel 2). Der Kontrollbereich wurde zeitgleich mit sterilem Leitungswasser infiltriert.

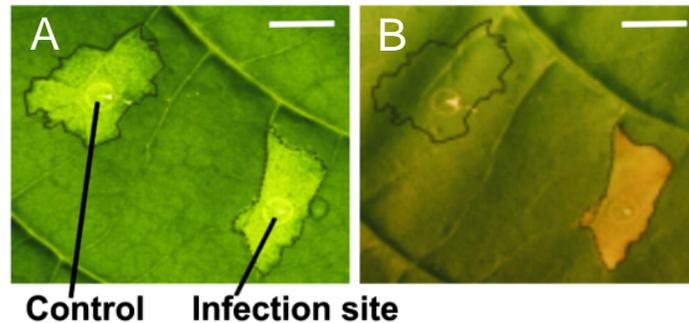


Abbildung 4-2 Infiltrationsbereiche von *P. nicotianae* Zoosporen ('Infection site') und sterilem Leitungswasser ('Control') in 'Source'-Blättern von SNN. A) Durchlichtbild unmittelbar nach Infiltration, B) Aufnahme desselben Blattbereichs 48 Stunden nach Infektion. Die weißen Balken repräsentieren 10mm.

Abbildung 4-2 zeigt, dass diese Methode für die hier durchgeführten Untersuchungen aus verschiedenen Gründen sehr gut geeignet ist. Es können exakt definierte Zoosporenmengen in das Blatt eingespritzt werden, wodurch die Infektionsfläche genau den Versuchsanforderungen angepasst werden kann. Daher können, je nach Versuchsdurchführung, die zu den Infektionsbereichen passenden Kontrollproben aus einem Blatt, z.T. sogar aus demselben Intercostalfeld, genommen werden. Beim direkten Vergleich von Kontrollen und infizierten Blattbereichen ist somit sichergestellt, dass keine Entwicklungs- oder Pflanzenspezifischen Unterschiede in die Analyse einfließen. Da die Sporen nach Injektion in den Interzellularraum weder Cuticula noch Epidermis passieren müssen ist außerdem ein synchronisierter Infektionsstart im gesamten infiltrierten Gewebe gewährleistet. Diese Faktoren stellen sicher, dass die Versuchsbedingungen über viele Messungen hinweg konstant gehalten werden können und eine hohe Reproduzierbarkeit der Messungen erzielt werden konnte.

Die ersten Infektionen gaben außerdem Aufschluss über den zeitlichen Verlauf der inkompatiblen Interaktion zwischen Pathogen und Pflanze. In den ersten neun Stunden nach Infektion ('Hours post infection' = hpi) waren keine makroskopischen Veränderungen des Blattgewebes am Infektionsort zu erkennen. Zwischen 9 und 12 hpi traten in einigen Fällen erste sichtbare Veränderungen des Gewebes auf der Blattunterseite auf. Nach 24 hpi war die Abwehrreaktion im Infektionsbereich weitestgehend abgeschlossen. Das Gewebe hat hypersensitiv reagiert und es hat sich eine gut zu erkennende hypersensitive Läsion am Infektionsort ausgebildet. In Abbildung 4-2 ist klar zu erkennen, dass die Abwehrreaktion auf den primären Infektionsbereich beschränkt bleibt. Das direkt umgebende Gewebe scheint von Infektion, bzw. Abwehr nicht beeinflusst zu werden. Beobachtet man das infizierte Blatt über einen Zeitraum von ca. vier Wo-

chen, kann man keine Anzeichen für ein weiteres Ausbreiten des Pathogens im infizierten Blatt erkennen und der Abwehrbereich bleibt in Form und Größe unverändert. Es kommt in keinem Fall zu weiterem nachweisbarem Wachstum des Oomyceten, noch zur Ausprägung von Symptomen der Blattflecken-Krankheit.

Während der ersten Stunden nach Infektion (0 – 12 hpi), deutlich vor der Ausbildung makroskopisch sichtbarer Läsionen am Infektionsort, konnten verschiedene weitere Belege für das schnelle Anlaufen der Abwehrreaktion festgestellt werden. So kann bereits nach 1 hpi die **Bildung reaktiver Sauerstoffspezies** ('reactive oxygen species' = ROS) in infizierten Blattbereichen nachgewiesen werden. Das Auftreten von H_2O_2 ist über den gesamten Untersuchungszeitraum (bis 12 hpi) hochlokalisiert am Infektionsort nachzuweisen (Abbildung 4-3 A). Auch die Expression von PR-Proteinen ('pathogenesis related' = PR), hier am Beispiel von PR-Q gezeigt, nahm wenige Stunden nach Infektion deutlich zu (Abbildung 4-3 B). PR-Q codiert für eine saure Chitinase [Payne *et al.* (1990)] und wurde als Salicylsäure-induzierbar beschrieben [Ward *et al.* (1991)]. Daher könnte die verstärkte Expression dieses Proteins als Indikator für eine systemische Reaktion einer infizierten Pflanze dienen. Allerdings kommt es in den benachbarten, nicht-infizierten Kontrollbereichen aus demselben Blatt weder zu einer Erhöhung der PR-Q Expression (Abbildung 4-3 B), noch zur Bildung von H_2O_2 (Abbildung 4-3 A). Beides deutet stark darauf hin, dass während dieser frühen Phase der Abwehr (1 – 12 hpi) keine signifikante systemische Reaktion auf die Infektion mit *P. nicotianae* erfolgt.

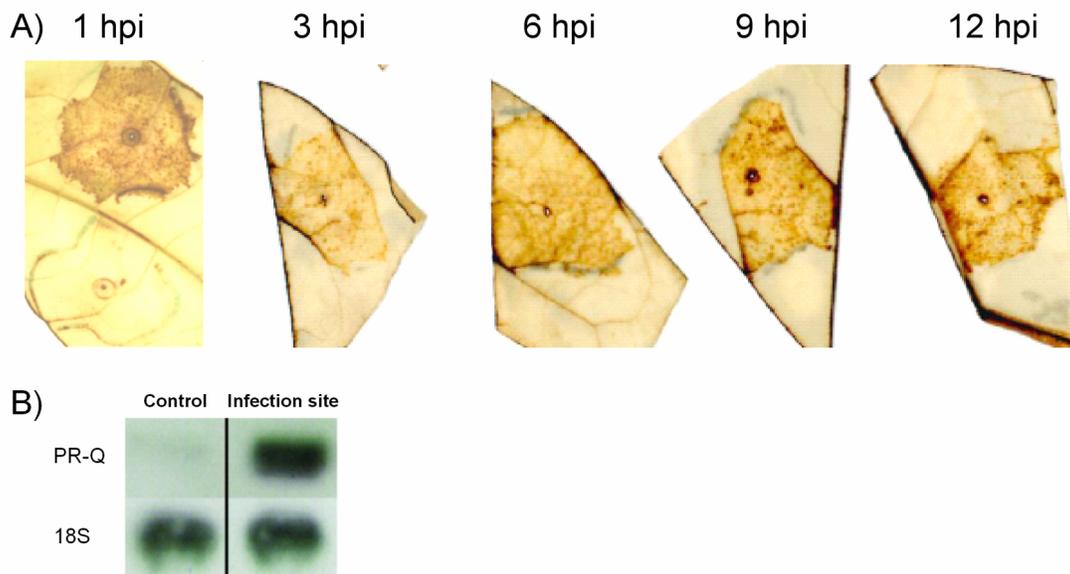


Abbildung 4-3 Frühe Abwehrreaktionen von *N. tabacum* L. cv SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*. (A) DAB-Färbung als Nachweis von H_2O_2 -Akkumulation am Infektionsort (1 – 12 hpi). (C) Genexpression des PR-Proteins PR-Q. Die Gesamt-RNA wurde aus Kontrollregionen ('Control') und Infektionsorten ('Infection site') von Tabak-source-Blättern isoliert (12 hpi). 18S cDNA diente als Beladungskontrolle.

Basierend auf diesen Beobachtungen, klassifizierten wir die Interaktion als inkompatibel. Das Tabakkultivar SNN reagiert hochresistent auf die Infektion mit *P. nicotianae*. Da die Abwehr nach ca. 24 Stunden vollständig abgelaufen ist und der Beginn der Bildung hypersensitiver Läsionen bereits nach 12 hpi manifest wird, müssen alle für eine erfolgreiche Abwehr notwendigen Umstellungen des pflanzlichen Stoffwechsels in einem kurzen Zeitraum nach Infektionsbeginn erfolgen. Der Hauptfokus aller weiteren Untersuchungen wurde daher auf die ersten 12 Stunden nach Infektionsbeginn gelegt.

Nach der Infektion von **Xanthi** mit Zoosporen von *P. nicotianae* beobachtet man eine gänzlich unterschiedliche Symptomatik als bei der inkompatiblen Interaktion von SNN und dem Pathogen. Bei SNN reagieren nahezu alle Zellen im Infektionsbereich hypersensitiv und es kommt zur Ausbildung einer hypersensitiven Läsion, die sich über den gesamten primären Infektionsbereich erstreckt (Abbildung 4-2).



Abbildung 4-4 'Source'-Blätter des suszeptiblen Kultivars *N. tabacum* L. cv. Xanthi zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *P. nicotianae*. (A) 24 hpi, (B) 48 hpi und (C) 120 hpi. Links der Mittelrippe liegt der Infektionsbereich. Auf der rechten Seite wurde als Kontrolle steriles Leitungswasser infiltriert.

24 h nach Infiltration des Pathogens sind bei Xanthi keine phänotypischen Veränderungen im Infektionsbereich zu beobachten (Abbildung 4-4 A). Frühestens nach 48 Stunden wird das betroffene Gewebe leicht chlorotisch, wobei zu diesem Zeitpunkt in keinem Fall vollständig ausgebleichte hypersensitive Läsionen auftreten (Abbildung 4-4 B). Erst 120 Stunden nach Infektion treten punktuelle Läsionen auf, wobei im größten Teil des Infektionsbereichs keine Anzeichen der HR zu erkennen sind (Abbildung 4-4 C).

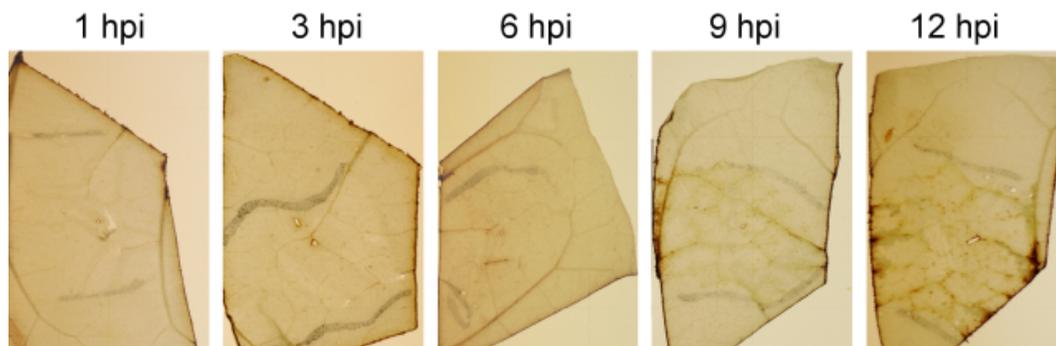


Abbildung 4-5 H_2O_2 -Akkumulation, nachgewiesen mittels DAB-Färbung, im Infektionsbereich von suszeptiblen Tabakpflanzen (Xanthi) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion. Die schwach erkennbaren Markierungen zeigen den primären Infektionsbereich an.

Abbildung 4-5 zeigt den Verlauf der ROS-Produktion in infizierten Blattbereichen des suszeptiblen Tabakkultivars Xanthi. Im Gegensatz zur schnellen ROS-Produktion im resistenten SNN (vergleiche Abbildung 4-3 A) tritt bei Xanthi in den ersten 6 hpi keine signifikante H_2O_2 -Akkumulation auf. Erst nach 9 hpi ist im primären Infektionsbereich eine schwache ROS-Akkumulation erkennbar, die in den folgenden 3 Stunden leicht zunimmt. Im Vergleich zur inkompatiblen Interaktion ist die ROS-Produktion bei Xanthi jedoch fast vernachlässigbar gering.

4.1.1.2 Stimulierung von mitochondrialer Atmung und OPPP

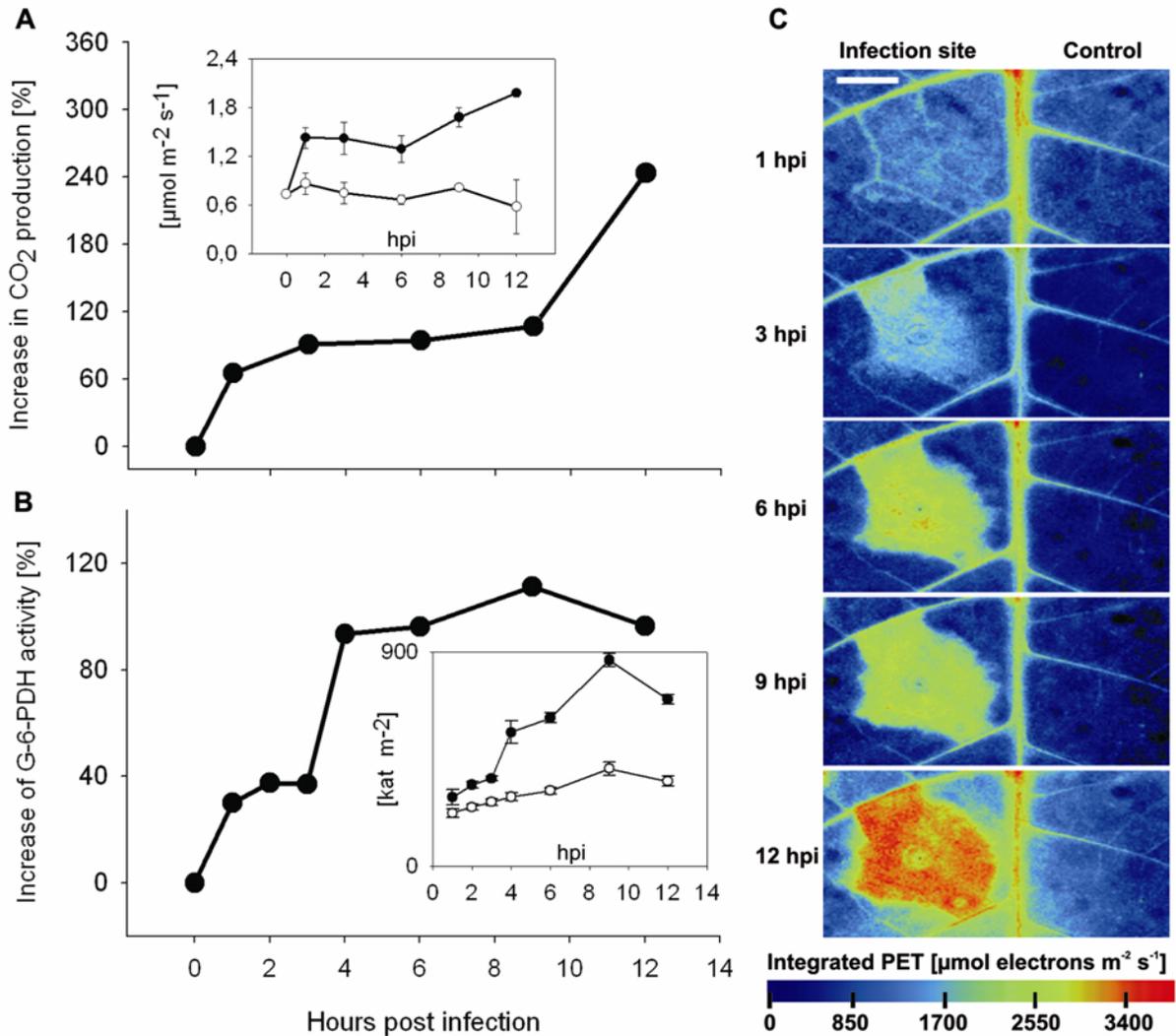


Abbildung 4-6 Abwehr-induzierte Änderungen des pflanzlichen Dunkelstoffwechsels. Anstieg der (A) Dunkelatmung und (B) der Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH) am Infektionsort, dargestellt als prozentualer Anstieg relativ zum Kontrollbereich (= 0%) in demselben Tabakblatt. Die eingefügten Graphen zeigen die Originaldaten der Infektionsorte (schwarze Punkte) und der Kontrollen (weiße Punkte). Die Mittelwerte stammen aus je vier unabhängigen Messreihen. (C) Bilder der photosynthetischen Induktion infizierter und gesunder Blattbereiche eines Tabakblattes. Die Bilder stellen den integrierten photosynthetischen Elektronenfluss in den ersten zwei Minuten nach einstündiger Vorverdunkelung dar. Der weiße Balken repräsentiert 10 mm.

Bereits eine Stunde nach Infiltration des Pathogens ins Blattgewebe steigt die **Dunkelatmungsrate**, gemessen als Netto-CO₂-Abgabe, im Infektionsbereich um ca. 70% gegenüber gesundem Kontrollgewebe an (Abbildung 4-6 A). Die Atmungsrate stagniert für etwa neun Stunden auf diesem Niveau und steigt daraufhin in einer zweiten Phase um ca. 250% im Vergleich zur Kontrolle an. Möglicherweise liegt die reale Atmungsrate sogar noch höher, da nicht auszuschließen ist, dass kleine, nicht-infizierte Blattbereiche in die Messung mit einbezogen wurden. Die Infiltration von Tabakblättern mit einem zellfreien Zoosporen-Filtrat, in dem keine intakten Strukturen des Pathogens vorliegen, löst eine ähnlich starke Zunahme der Atmungsrate aus (Daten nicht gezeigt). Dieses lässt den Schluss zu, dass der beobachtete Anstieg der CO₂-Freisetzung zu einem wesentlichen Teil pflanzlichen Ursprungs ist und nicht vom Pathogen verursacht wird.

Auch die **Aktivität der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PDH)**, dem Schlüsselenzym des OPPP, steigt kurz nach Infektionsbeginn deutlich an (Abbildung 4-6 B). Bereits zu 1 hpi ist die Aktivität um ca. 40% gegenüber der Kontrolle gesteigert. Nach 4 hpi ist ein weiterer Anstieg der Aktivität, mit einem Maximum von ca. 110% zwischen 6 und 12 hpi, zu verzeichnen. Der OPPP ist in verschiedenen Kompartimenten einer Pflanzenzelle lokalisiert. Ein Teil dieses Stoffwechselweges ist im Cytosol lokalisiert, während andere Reaktionen im Chloroplastenstroma ablaufen. Allerdings wurde in den Messungen keine Diskriminierung zwischen cytosolischer und stromaler G6PDH vorgenommen. Hierzu ist ein erheblich aufwendigeres Messverfahren notwendig, auf das im Rahmen dieser Arbeit verzichtet wurde.

Nach Infektion mit *P. nicotianae* wurde die **Induktion der Photosynthese** in den ersten zwei Minuten der aktinischen Belichtung analysiert. Die Messungen erfolgten nach einstündiger Vorverdunkelung, bei 21% O₂, einer aktinischen Lichtintensität von 250 µE und bei 65 ppm CO₂, d.h. am für Tabak ermittelten CO₂-Kompensationspunkt. Unter diesen experimentellen Bedingungen ist die Induktion der Photosynthese unabhängig von der stomatären Leitfähigkeit. Die bildgebende Analyse der Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz ermöglicht eine Visualisierung der photosynthetischen Induktion nach Infektion (Abbildung 4-6 C). Im primären Infektionsbereich – in denen auch die G6PDH-Aktivität stark erhöht ist (vgl. Abbildung 4-6 B) – läuft die Photosynthese beschleunigt an. In den Kontrollbereichen und der direkten Umgebung der infizierten Zonen ist die Induktion, im Vergleich zu vollkommen unbehandelten Tabak 'Source'-Blättern, unverändert langsam. Die Zonen der schnellen Induktion sind außerdem scharf begrenzt und exakt kongruent zu den primären Inokulationsbereichen.

Auch bei **Xanthi** wurde die Photosynthese-Induktion zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion aufgenommen, um Hinweise auf den Dunkelstoffwechsel-Status zu erhalten. Abbildung 4-7 zeigt den integrierten photosynthetischen Elektronentransport infizierter Xanthi-Blätter (rote Markierungen = Infektionsbereiche) während der ersten zwei Minuten nach Belichtungsbeginn. Die Bilder können direkt mit den SNN-Messungen (Abbildung 4-6 C) verglichen werden.

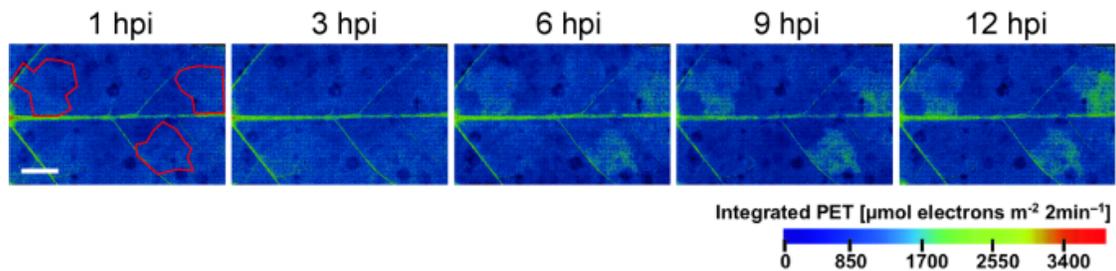


Abbildung 4-7 Abwehrinduzierte Änderungen der photosynthetischen Induktion von Xanthi nach Infektion mit *P. nicotianae*. Die Bilder stellen den integrierten photosynthetischen Elektronenfluss in den ersten zwei Minuten nach einstündiger Vorverdunkelung dar. Die roten Markierungen zeigen die primären Infektionsorte an. Der weiße Balken repräsentiert 20 mm.

In den nicht-infizierten Kontrollen bleibt die Induktion des PET, ähnlich wie bei SNN, auf konstant niedrigem Niveau. In den Infektionsbereichen ist bei Xanthi erst nach 6 hpi eine leicht beschleunigte PET-Induktion zu erkennen, welche bis 12 hpi annähernd konstant bleibt. Die stimulierte Induktion der Photosynthese tritt auch bei Xanthi ausschließlich im Bereich der primären Inokulation der Zoosporen auf und bleibt über den gesamten Untersuchungszeitraum auf diesen Bereich begrenzt. Bei Xanthi wird durch die Infektion eine – wenngleich gegenüber SNN verzögerte, schwächere und inhomogenere – leichte Beschleunigung der PET-Induktion ausgelöst. Ursächlich für diese Beschleunigung sollte, wie bei SNN, eine gesteigerte Aktivität des OPPC sein. Weitere Analysen G6PDH-Aktivität oder Messungen der Dunkelatmung, könnten genaueren Aufschluss über eine mögliche Infektions-bedingte Stimulation des Dunkelstoffwechsels bei Xanthi liefern.

4.1.1.3 Aktivierung von Abwehrreaktionen

Die beschriebene Aktivierung von Dunkelatmung und OPPP sind klare Indizien für eine Umstellung des Stoffwechsels infizierter SNN-Blätter. In den Chloroplasten stellt der OPPP Reduktionsäquivalente und Metabolite für den Shikimatweg, dem Hauptbiosyntheseweg pflanzlicher Phenole, zur Verfügung. Der Shikimatweg liefert u.A. die Substrate für die Lignin- oder Phytoalexinbiosynthese, die eine wichtige Rolle in der Abwehrantwort von Pflanzen spielen [Heldt (1999)]. Hingegen stellt die cytosolische G6PDH vermutlich die für die Abwehr-induzierte ROS-Bildung notwendigen Reduktionsäquivalente zur Verfügung. Das vom Shikimatweg gebildete Phenylalanin ist Ausgangsprodukt des Phenylpropanstoffwechsels in Pflanzenzellen, dessen Startreaktion von der PAL eingeleitet wird, welche die Desaminierung von Phenylalanin katalysiert. Durch die Abspaltung von Ammoniak (NH_3) kommt es zur Ausbildung einer C=C-Doppelbindung und es entsteht *trans*-Zimtsäure. Über weitere Reaktionsschritte werden hieraus *p*-Cumarsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure gebildet, welche Ausgangssubstanzen für die Ligninsynthese sind. Die PAL sollte daher in den Geweben aktiv sein, in denen Phytoalexine und zellwandverstärkendes Lignin für die Abwehrreaktionen benötigt werden.

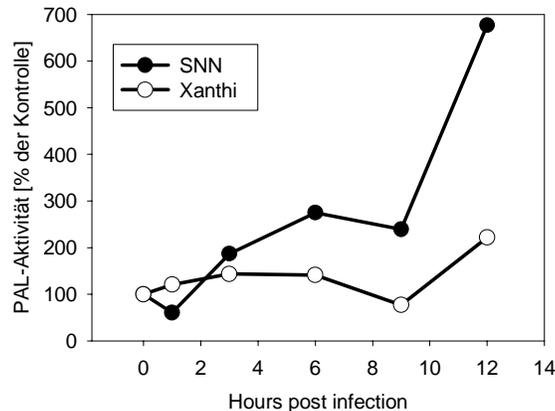


Abbildung 4-8 Abwehrinduzierte Änderungen der PAL-Aktivität in 'Source'-Blättern von SNN (schwarze Symbole) und Xanthi (weiße Symbole) nach Infektion mit *P. nicotianae*. Die angegebenen Änderungen sind prozentuale Werte bezogen auf die scheininfizierten Kontrollen (=100%). Die dargestellten Daten stammen aus zwei unabhängigen Messreihen.

In Abbildung 4-8 ist der relative, auf die blattspezifische Kontrolle bezogene Verlauf der PAL-Aktivität in 'Source'-Blättern von SNN und Xanthi nach Infektion mit *P. nicotianae* dargestellt. Ähnlich wie die Dunkelatmung und die G6PDH-Aktivität (vgl. Abbildung 4-6 A und B) steigt auch die Aktivität der PAL bei SNN in den ersten 12 hpi zweiphasig an. Nach einem moderaten Anstieg in den ersten 9 hpi steigt die Aktivität nach 12 hpi auf nahezu 700% der Kontrollwerte an. Ob die Erhöhung der PAL-Aktivität auf die Aktivierung vorhandener Enzyme oder auf eine abwehr-induzierte *de novo*-Synthese des Enzyms zurückzuführen ist, kann anhand dieser Daten nicht festgestellt werden.

Nach Infektion des suszeptiblen Tabakkultivars Xanthi ist im Gegensatz zu SNN nur eine schwache Stimulation der PET-Induktion und somit des OPPP zu beobachten. Daher sollten auch alle hiervon versorgten Stoffwechselwege, wie z.B. der Shikimatweg und der Phenylpropanoid-Stoffwechsel, ebenfalls nur schwach stimuliert werden. Dazu passt, dass bei Xanthi in den ersten 9 hpi keine wesentliche Stimulation der PAL-Aktivität im Infektionsort stattfindet. Erst 12 Stunden nach Infektion mit *P. nicotianae* ist bei Xanthi eine moderate Zunahme der PAL-Aktivität gegenüber scheininfizierten Kontrollen zu beobachten, während SNN eine ähnliche Stimulation bereits zu 3 hpi zeigt

4.1.1.4 Stomaschluss und Inhibition der Photosynthese

Neben den Veränderungen der photosynthetischen Induktion wurden auch weitere verschiedene photosynthetische Parameter nach Infektion mit *P. nicotianae* untersucht. Bei einem CO₂-Partialdruck von 700 ppm, 21% O₂ und einer sättigenden Lichtintensität von 820 μE wurde die Gesamtrate des photosynthetischen Elektronentransports ('Gesamt-PET') ermittelt. Unter diesen Bedingungen werden die Elektronen nicht nur durch CO₂-Fixierung, sondern auch durch Photo-

respiration verbraucht. In den ersten sechs Stunden nach Infektion sinkt der Gesamt-PET am Infektionsort im Vergleich zur Kontrolle nur leicht ab, bricht dann jedoch stark ein und erreicht bei 12 hpi nur noch etwa 30% des Kontrollwertes (Abbildung 4-9 A und C). In den meisten Fällen ist die 'Gesamt-PET' nach 24 hpi unter 10% des Ausgangswertes abgesunken (Daten nicht gezeigt).

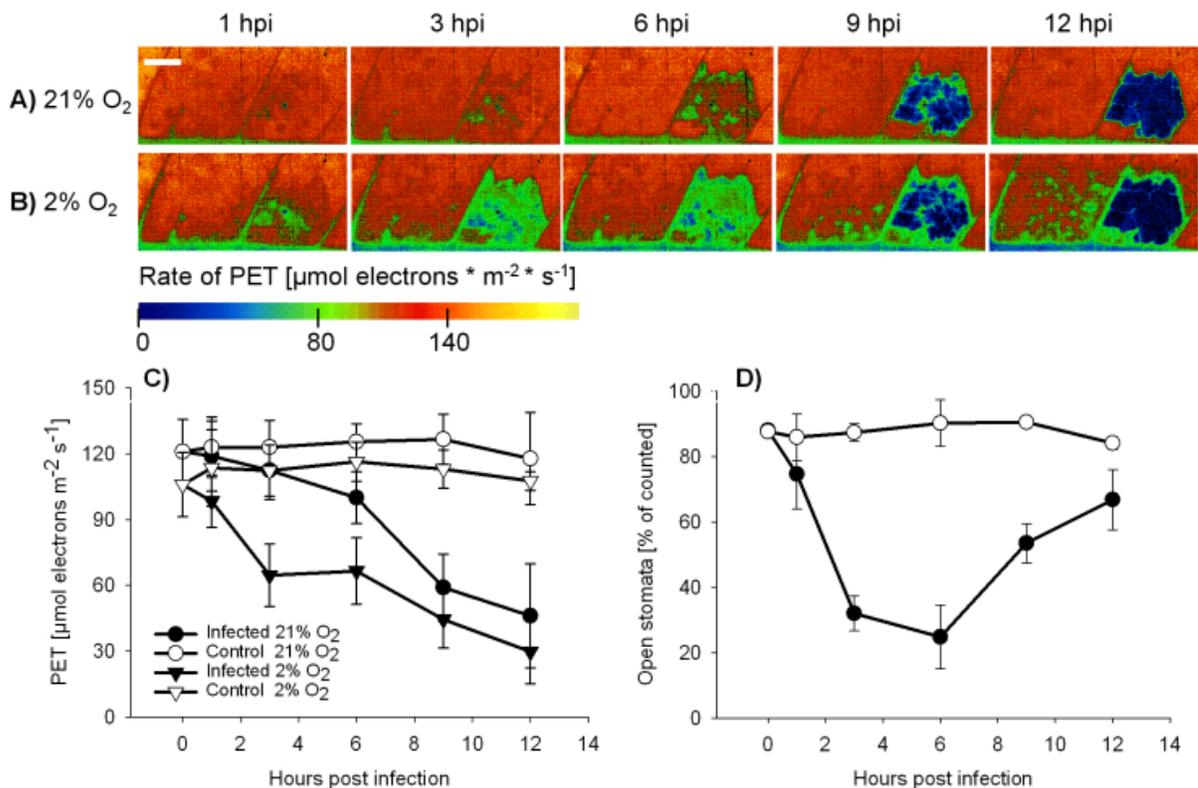


Abbildung 4-9 Abwehrinduzierte Veränderungen von Photosynthese und stomatärer Leitfähigkeit. (A und B) PET-Bilder bei stationärer Photosynthese zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion. (A) Gesamtkapazität des PET unter 21% O₂ und (B) Kapazität der CO₂-Fixierung unter 2% O₂. Der weiße Balken repräsentiert 10 mm. (C) Änderungen der PET-Kapazität, abhängig von Infektionszeit und der Zusammensetzung des Messgases ('Gesamt PET' – Kreise; 'Assimilatorische Kapazität' – Dreiecke). (D) Zeitverlauf des Stomaschlusses im Infektionsbereich, dargestellt als prozentualer Anteil der offenen Stomata, relativ zur Gesamtzahl im Untersuchungsbereich. (C und D) Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus je drei unabhängigen Messreihen.

Reduziert man den Sauerstoffpartialdruck im Messgas von 21% auf 2%, bei gleichzeitig erhöhter CO₂-Konzentration (700 ppm), wird die Oxygenasereaktion der RubisCO nahezu vollständig unterbunden [Sharkey (1988)]. Die mitochondriale Atmung bleibt von dieser Absenkung weitgehend unbeeinflusst, da die O₂-Affinität des Cytochrom-*a/a*₃-Komplexes in den Mitochondrien sehr hoch ist und bei 2% O₂ gesättigt bleibt. Unter sättigenden Lichtbedingungen (820 μE) ist der Elektronentransport allein von der CO₂-Fixierung begrenzt, so dass bei dieser Messung indirekt die Rate der CO₂-Fixierung bestimmt wird ('CO₂-Fixierung'; Abbildung 4-9 B und dreieckige Symbole in Abbildung 4-9 C). Im Infektionsbereich ist unter diesen Bedingungen bereits

zwischen 1 und 6 hpi - zu einem Zeitpunkt an dem der 'Gesamt-PET' unter 21% O₂ kaum verändert ist - eine deutliche Hemmung der 'CO₂-Fixierung' zu erkennen (vgl. Abbildung 4-9 A und B, und Abbildung 4-9 C). Zwischen 6 und 12 hpi gleichen sich die Flüsse in 21% und 2% O₂ wieder an und sinken auf ca. 30% des Kontrollniveaus ab.

Die Hemmung der 'CO₂-Fixierung' in den ersten Stunden nach Infektion geht bei SNN mit einem Verschluss der Stomata am Infektionsort einher. Im Infektionsbereich sinkt die Zahl geöffneter Stomata (alle Stomata mit einer Öffnungsweite $\geq 3\mu\text{m}$) während der ersten 6 hpi stark ab, steigt jedoch zwischen 6 und 12 hpi wieder deutlich an (Abbildung 4-9 D). In den Kontrollbereichen und der direkten Umgebung der Infektionsbereiche bleibt die Anzahl der offenen Stomata über die gesamte Messdauer unverändert.

Die mikroskopischen Messungen der Stomaöffnung konnten durch Gaswechsellmessungen bestätigt werden, die einen Einbruch der stomatären Leitfähigkeit von Wasserdampf (g H₂O) und ein Absinken der CO₂-Konzentration im Mesophyll (C_i) zeigen (Tabelle 3). Möglicherweise sind die hier angegebenen Änderungen sogar noch unterbestimmt, da bei den Gaswechsellmessungen eine Beteiligung von kleinen, nicht-infizierten Blattbereichen nicht ausgeschlossen werden konnte.

Tabelle 3 Stomatäre Leitfähigkeit für Wasser (g H₂O) und interner CO₂-Partialdruck (C_i) von Kontrollen und infizierten SNN-Blättern nach 6 hpi. Die Daten sind Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4, bzw. 3 unabhängigen Messreihen.

	Kontrolle	Infektionsort	Änderung [%]
g H ₂ O [mmol m ⁻² s ⁻¹]	111,2 ± 23,0	64,4 ± 14,8	-42,1
C_i [μl CO ₂ l ⁻¹]	251,4 ± 28,6	119,7 ± 21,2	-52,4

Als Konsequenz des Stomaschlusses sinkt der interne CO₂-Partialdruck (C_i) im Infektionsbereich und damit auch die Rate der CO₂-Fixierung (Abbildung 4-9 B und C).

Die Infektion mit *P. nicotianae* löst bei SNN **eine zweiphasige Hemmung der Photosynthese** aus. In der ersten Phase (1 – 6 hpi) wird die CO₂-Aufnahme durch den Verschluss der Stomata gehemmt, während der 'Gesamt-PET' und Calvin-Zyklus nur schwach gehemmt werden. Nach etwa 6 hpi sinkt die Rate des 'Gesamt-PET' ab. Dieses Absinken könnte durch eine Hemmung des Calvin-Zyklus oder eine Störung in der Elektronentransportkette verursacht werden. Die Stoma-abhängige Reduktion der 'CO₂-Fixierung' unter 2% O₂ ist weniger scharf begrenzt, als die Inhibition des 'Gesamt-PET' bei 21% O₂ (vgl. Abbildung 4-9 A und B). Diese Beobachtung steht in gutem Einklang mit der Annahme, dass die unter 2% O₂ beobachtete Reduktion des photosynthetischen Flusses auf eine reduzierte stomatäre Leitfähigkeit zurückzuführen ist. Die Zone mit niedrigem C_i kann sich durch lateralen Gasaustausch mit angrenzenden, nicht-infizierten Mesophyllbereichen vermischen.

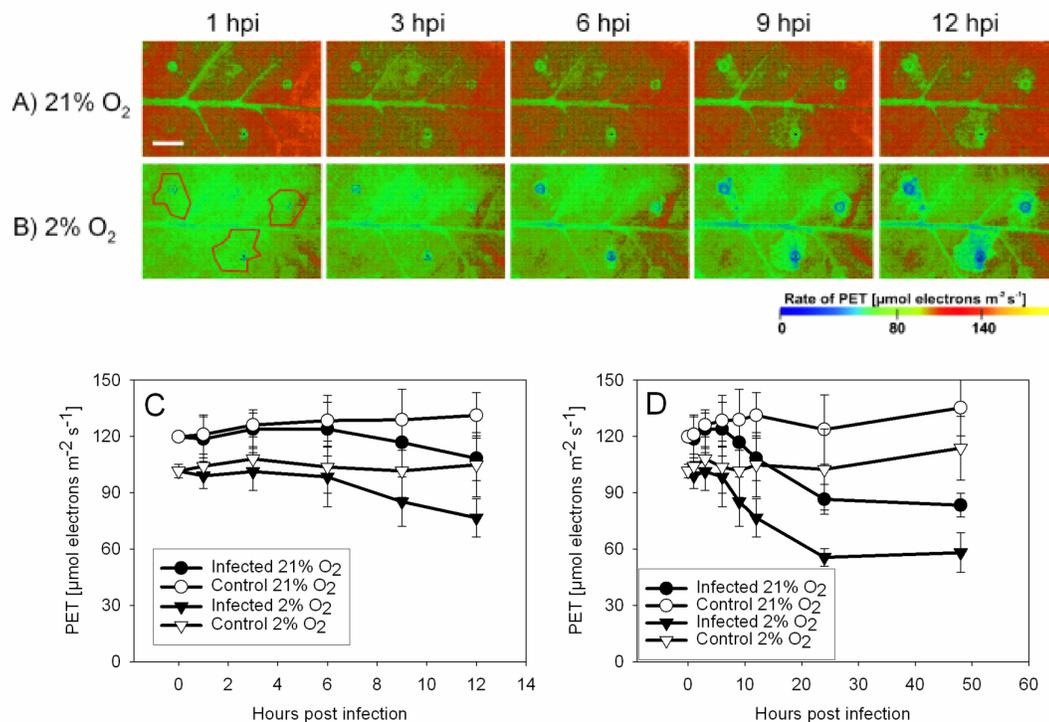


Abbildung 4-10 Infektionsbedingte Änderungen des photosynthetischen Elektronentransports im susceptible Tabakkultivar Xanthi. (A) 'Gesamt-PET' unter 21% O₂ und (B) 'CO₂-Fixierung' unter 2% O₂. Der weiße Balken repräsentiert 20 mm. (C und D) Änderungen der PET-Rate, abhängig von Infektionszeit und der Zusammensetzung des Messgases ('Gesamt-PET' – Kreise; 'Assimilatorische Kapazität' – Dreiecke). In Graph (C) sind zur besseren Vergleichbarkeit mit den Daten von SNN (Abbildung 4-2) nur die ersten 12 hpi dargestellt. Graph (D) zeigt den PET im weiteren Infektionsverlauf bis 48 hpi. Die in (C) und (D) dargestellten Daten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen. Die roten Markierungen in (B) zeigen die primären Infektionsorte an.

Im Unterschied zu SNN (Abbildung 4-9 B und C) zeigt das susceptible Kultivar Xanthi keine Reduktion der 'CO₂-Fixierung' in den ersten 6 hpi (Abbildung 4-10 B und C). Bei Xanthi tritt offensichtlich kein Stomaverschluss am Infektionsort und somit auch keine stoma-abhängige Repression der 'CO₂-Fixierung' in der frühen Infektionsphase auf. Auch das Absinken des 'Gesamt-PET' erfolgt bei Xanthi wesentlich später und schwächer als bei SNN. Erst nach 9 hpi ist eine schwache Hemmung des 'Gesamt-PET' zu erkennen, die zu 12 hpi maximal 30 % gegenüber den Kontrollen beträgt (Abbildung 4-10 A und C). Zu diesem Zeitpunkt ist bei SNN bereits eine etwa 70%ige Hemmung des 'Gesamt-PET' festzustellen (Abbildung 4-9 A und C). Während die Photosynthese bei SNN nach 24 hpi nahezu vollständig inhibiert ist, konnte bei Xanthi zu 24 und 48 hpi eine maximale Hemmung von ca. 50 % des Kontroll-Niveaus beobachtet werden (Abbildung 4-10 D). Es fällt jedoch auf, dass auch bei Xanthi die Hemmung der Photosynthese auf den primären Infektionsort beschränkt bleibt und es zu keiner infektionsbedingten Umsteuerung der Photosynthese im umgebenden, gesunden Gewebe kommt (Abbildung 4-10 A und B).

4.1.1.5 Inhibierung des photosynthetischen Elektronentransports

Zu dem Zeitpunkt an dem bei SNN die Hemmung des 'Gesamt-PET' einsetzt (>6 hpi) ist die Atmung stark aktiviert, das Gewebe noch völlig turgeszent und zeigt noch keine sichtbaren Symptome der HR. Weder der Chlorophyllgehalt (Abbildung 4-11 A), noch das Chlorophyll *a/b*-Verhältnis sind signifikant gegenüber den Kontrollen verändert. Erst zu wesentlich späteren Zeitpunkten nach Infektion (> 12 hpi) tritt ein erheblicher Verlust an Chlorophyll – hauptsächlich Chlorophyll *a* – auf. Auch die Expression des Chlorophyll *a/b* Bindeproteins (*Cab*) bleibt in den ersten 12 hpi relativ stabil (Abbildung 4-11 B). Hingegen ist bereits nach 4 hpi die Expression der kleinen Untereinheit der RubisCO (*RbcS*) vollständig unterbunden (Abbildung 4-11 B). Beachtet man jedoch die relativ hohe Stabilität dieses Enzyms [Mehta *et al.* (1992)], ist eine Beteiligung dieses Expressionsstopps an der Hemmung der Photosynthese eher gering, wenngleich nicht gänzlich auszuschließen. Die RubisCO kann zwar bis zu 35% des Gesamtproteins von Pflanzen ausmachen, ist jedoch bei hohen Lichtintensitäten der limitierende Faktor der Photosynthese [Ishida *et al.* (1999)]. Jedoch wurde diese Frage im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend behandelt.

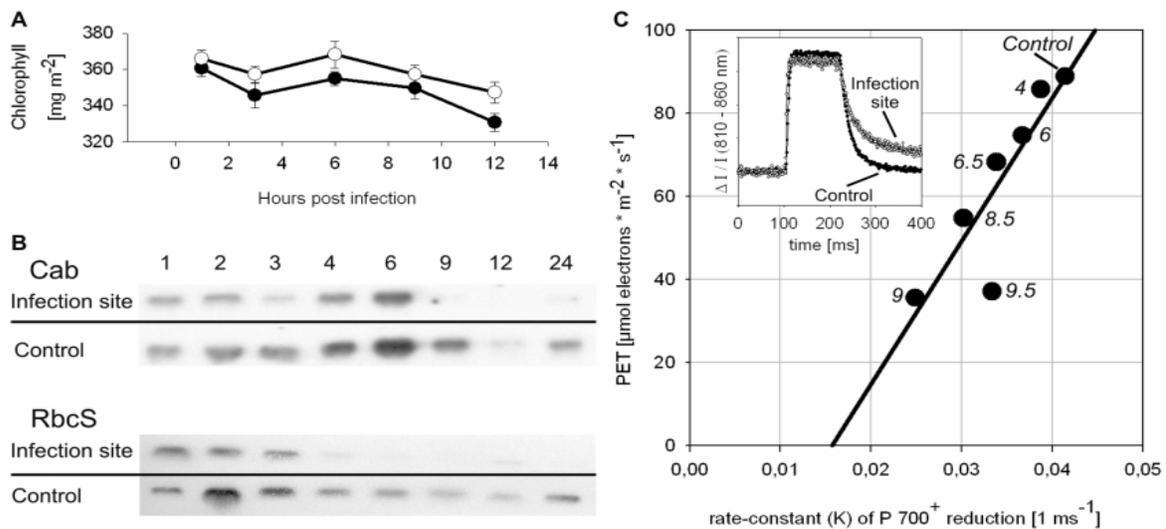


Abbildung 4-11 Abwehrinduzierte Änderungen verschiedener Komponenten des PET bei SNN. (A) Chlorophyllgehalt (*a + b*) in Kontrollen (weiße Punkte) und im Infektionsbereich (schwarze Punkte). Die Daten sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen. (B) Expressionsanalyse (Northern Blot) des Chlorophyll *a/b* Bindeproteins (*Cab*) und der kleinen Untereinheit der RubisCO (*RbcS*) in den ersten 24 hpi. (C) Rate des 'Gesamt-PET' aufgetragen gegen die Ratenkonstante der P₇₀₀⁺ Reduktion nach sättigendem Lichtpuls. Die Messung der 'Gesamt-PET' erfolgte an infizierten Blattbereichen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion unter 21% O₂, 700 ppm CO₂ und sättigendem Licht (vgl. Abbildung 4-9 C). Die Zahlen hinter den einzelnen Datenpunkten geben den Zeitpunkt nach Infektion (hpi) an. Die P₇₀₀ Reduktionskinetiken dieser Blattbereiche wurden in Anwesenheit von Methylviologen (MV) bestimmt. Der eingefügte Graph zeigt zwei originale P₇₀₀ Reduktionskinetiken – beginnend mit einem 120 ms dauernden sättigendem Lichtpuls, gefolgt von der Reduktion im Dunkeln – für ein Kontrollblatt und ein infiziertes Blatt (8 hpi).

Um die Aktivität der photosynthetischen Elektronentransportkette zu überprüfen wurden Blätter mit dem künstlichen Elektronenakzeptor Methylviologen (MV) behandelt und die Reduktionskinetik von P_{700}^+ nach einem SLP analysiert. In Anwesenheit von Methylviologen wird die Gesamtheit aller P_{700} – dem Chlorophyll- a -Dimer im Reaktionszentrum von PS I – durch einen 120 ms dauernden SLP zum oxidierten P_{700}^+ umgewandelt. Bei 8 hpi ist die Amplitude des P_{700} Signals im Infektionsbereich nur leicht gegenüber der Kontrolle verändert (Abbildung 4-11 C, Einschub). Die Amplitude dieses Signals gibt Information über die relative Anzahl photoaktiver PSI Reaktionszentren. Weitere Informationen kann man der Kinetik der P_{700}^+ Reduktion nach dem SLP entnehmen. Im Einschub von Abbildung 4-11 C kann man deutlich erkennen, dass die Dunkel-Relaxation des P_{700} Signals im infizierten Gewebe deutlich gegenüber der Kontrolle verzögert ist. Diese Verzögerung weist auf eine Störung in der Elektronentransportkette aufwärts von PS I hin. Die Raten-Konstante der Elektronen-Donation an P_{700} sank von $0,041 \text{ [ms}^{-1}\text{]}$ in Kontrollbereichen auf Werte unter $0,025 \text{ [ms}^{-1}\text{]}$ in infiziertem Mesophyll bei 8 hpi (Abbildung 4-11 C). Dieses Absinken legt die Vermutung nahe, dass eine Störung im photosynthetischen Elektronentransport zu dem beobachteten, Stoma-unabhängigen Absinken der Photosynthese beiträgt (vgl. Abbildung 4-9 A und C). Es kann natürlich nicht völlig ausgeschlossen werden, dass auch andere Reaktionen der Photosynthese – wie zum Beispiel die RubisCO-Aktivität – gedrosselt sind und auch zu dem Absinken des 'Gesamt-PET' beitragen. Wie bereits erwähnt, ist im Verlauf der Infektion eine frühe und deutliche Abnahme des Transkriptlevels der kleinen Untereinheit der RubisCO zu erkennen (Abbildung 4-11 B).

4.1.1.6 Bildung von Callose

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die zelluläre Auflösung physiologischer Umstellungen in Tabakblättern während der Abwehr von *P. nicotianae*. Um die Bedeutung solcher Veränderungen für die Abwehr zu verstehen und mögliche funktionelle Zusammenhänge aufzuklären, wurden typische abwehr-induzierte Veränderungen, wie z.B. die Synthese und Einlagerung von Callose und die Bildung von ROS in infiziertem Blattgewebe, auf zellulärer Ebene untersucht. Bereits zu 1 hpi konnte eine deutliche Zunahme der Callosebildung in infizierten Blattbereichen festgestellt werden, welche sich im weiteren Verlauf der Abwehr deutlich verstärkt (Abbildung 4-12 A und B). In den Kontrollen ist eine solche Reaktion nicht zu beobachten. Lediglich an einzelnen Zell-Zell-Kontakten oder im Leitgewebe ist manchmal eine schwache Callose-Fluoreszenz zu erkennen. Vermutlich kommt es in Einzelfällen zu Verletzungs-bedingter Callosebildung, da bei der Präparation der Blattstücke die untere Epidermis entfernt wird und dabei die Verletzung einzelner Schwammparenchymzellen nicht gänzlich auszuschließen ist.

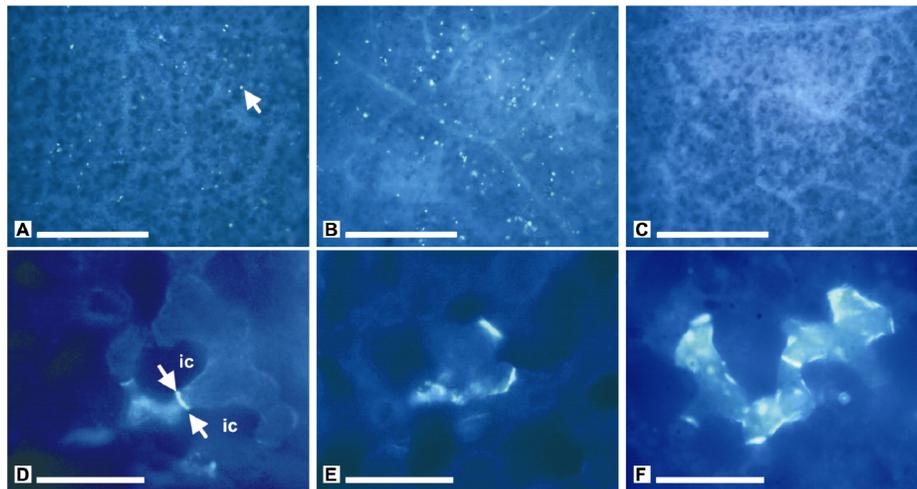


Abbildung 4-12 Abwehrinduzierte Bildung von Callose bei SNN. Die grün-blaue Anilin-Blau-Fluoreszenz zeigt Calloseeinlagerungen an. (A) Infektionsort, 1 hpi; (B) Infektionsort, 6 hpi und (C) Kontrolle, 3 hpi. (D bis F) Lokalisierung der Callosebildung im Mesophyll zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion: (D) 1 hpi, (E) 3 hpi und (F) 6 hpi. Die weißen Balken repräsentieren: (A bis C) 500 μm , (D bis F) 100 μm . Die weißen Pfeile zeigen exemplarisch Calloseeinlagerungen an den Zell-Zell-Kontakten infizierter Zellen. ic = Interzellularraum. Abbildungen (C) ist repräsentativ für alle Kontrollen ($n > 20$).

In Abbildung 4-12 D und E ist klar zu erkennen, dass die Calloseeinlagerung zu frühen Zeitpunkten nach Infektion ausschließlich an den Kontaktstellen einzelner Mesophyllzellen auftritt. Mit Hilfe des cLSM war es möglich hochauflösende Bilder dieser Region, zu frühen Infektionszeitpunkten zu erhalten (Abbildung 4-13, 4-14 und 4-15). Bereits nach 0,5 hpi sind erste Calloseeinlagerungen innerhalb der Kontaktregion infizierter Mesophyllzellen zu erkennen (Abbildung 4-13 A und 4-14 A).

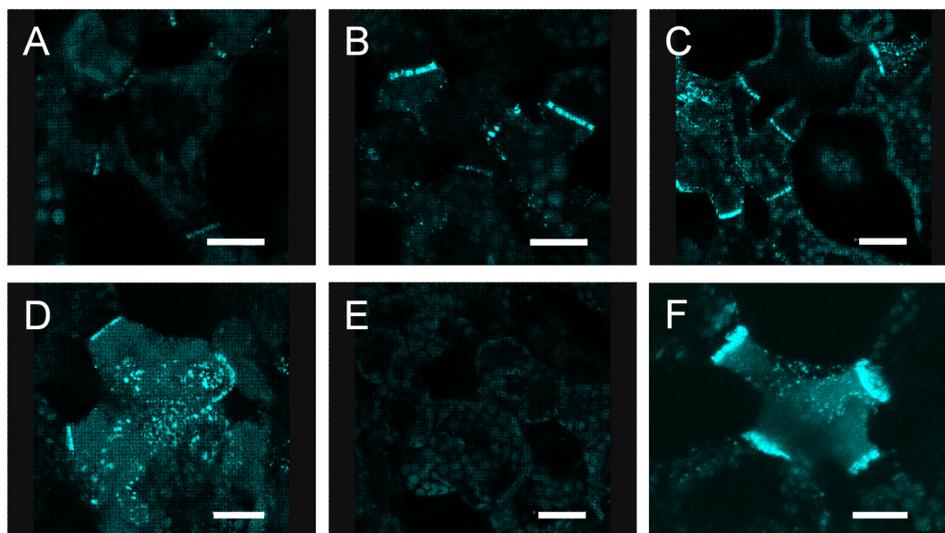


Abbildung 4-13 Callosebildung im Schwammparenchym von SNN zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion mit *P. nicotianae*. Callose ist mit Anilin-Blau gefärbt und erscheint unter UV-Anregung als helle, grün-blaue Fluoreszenz. (A) 0,5 hpi, (B) 1 hpi, (C) 2 hpi, (D) 3 hpi und (E) Kontrolle (3 hpi). (F) Callosebildung nach Elicitierung mit soprenfreiem Kulturfiltrat von *P. nicotianae* (3 hpi). Die weißen Balken repräsentieren 20 μm .

Die cLSM- Bilder zeigen klar, dass die Bildung von Callose in distinkten Bereichen infizierter Mesophyllzellen beginnt (Abbildung 4-14). In Abbildung 4-14 ist zu erkennen, dass die an den Zellplatten gebildete Callose von der Mittellamelle unterbrochen ist (weiße Pfeile). Dieses ist ein guter Hinweis, dass die erste abwehr-induzierte Bildung von Callose in der Halsregion der Plasmodesmata infizierter Mesophyllzellen stattfindet. Würde sich die Callose im cytoplasmatischen Bereich der Plasmodesmata einlagern und einen Pfropfen ausbilden, könnte man eine solch klare Trennung durch die Mittellamelle nicht erkennen.

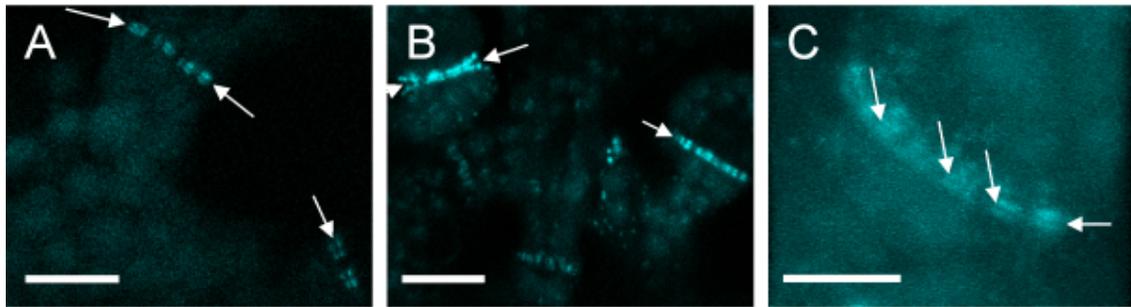


Abbildung 4-14 Callosebildung an Zell-Zell-Kontakten infizierter Tabak-Mesophyllzellen. (A) 0,5 hpi, (B und C) 1 hpi. Die weißen Pfeile zeigen die ungefärbte Mittellamelle zwischen den benachbarten Zellen an. Die weißen Balken repräsentieren (A und B) 20 µm, bzw. (C) 10 µm.

Anschließend breitet sich die Calloseeinlagerung über den gesamten Apoplasten der Kontaktzone aus (Abbildung 4-12 D und E, Abbildung 4-13 B und C, Abbildung 4-15). Im weiteren Infektionsverlauf bleibt die Callosebildung nicht auf die Zell-Zell-Kontakte beschränkt, sondern breitet sich in der gesamten Zellwand infizierter Zellen aus (Abbildung 4-12 F und Abbildung 4-13 D). Da eine ebensolche Callosebildung auch nach Elicitierung von Tabak mit sporenfreiem Kulturfiltrat von *P. nicotianae* auftritt (Abbildung 4-13 F) ist kein direkter Bezug zu Infektionsstrukturen des Pathogens gegeben und es ist unwahrscheinlich, dass es sich um Papillen handelt. Die Bildung von Callose beginnt immer an den Zellplatten infizierter Zellen, also an Orten die für das Pathogen unzugänglich sind. In den Kontrollregionen ist zu keinem Zeitpunkt eine Akkumulation von Callose zu beobachten (Abbildung 4-13 G und Abbildung 4-16).

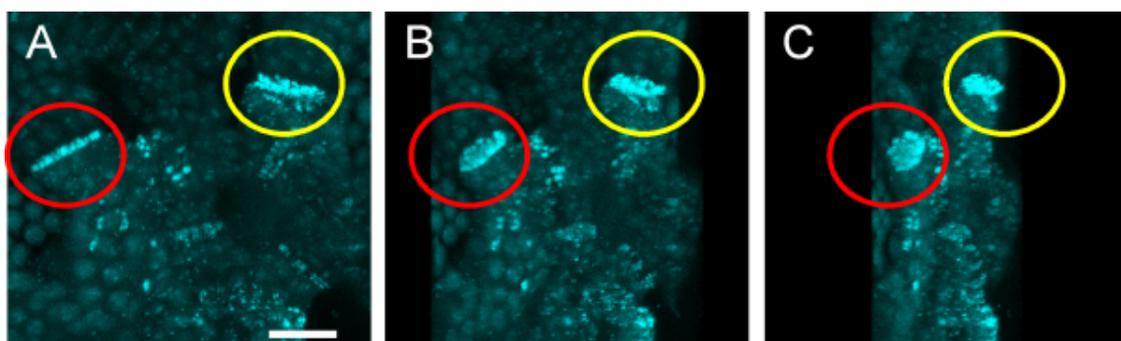


Abbildung 4-15 Dreidimensionale Darstellung der Callosebildung in infizierten Tabak-Mesophyllzellen (1 hpi). (A) Aufsicht, (B) um 30° und (C) um 60° nach links gedreht. Zur besseren Übersicht sind zwei Kontaktbereiche farblich gekennzeichnet. Der weiße Balken repräsentiert 20 µm.

Auch bei der Interaktion von **Xanthi** und *P. nicotianae* tritt nach Infektion Callosebildung an den Zell-Zell-Kontakten im Infektionsbereich auf, während in den Kontrollen keine signifikante Callosebildung zu verzeichnen ist (Abbildung 4-16).

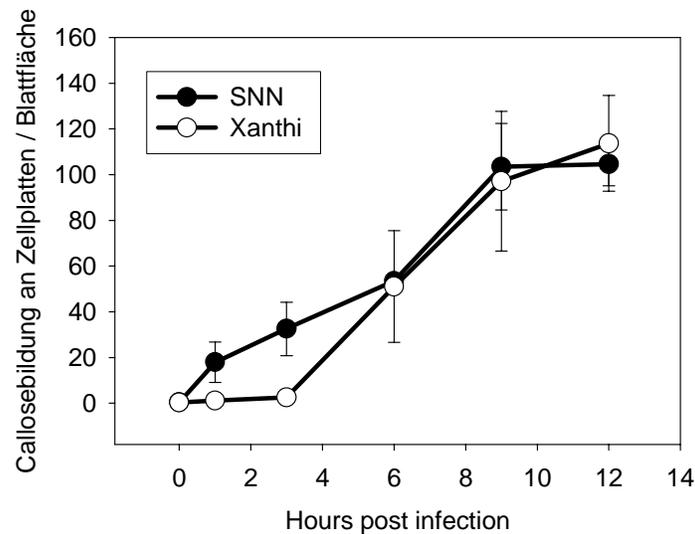


Abbildung 4-16 Abwehrinduzierte Änderungen der Callosedeposition in Blättern von SNN (schwarze Punkte) und Xanthi (weiße Punkte). Dargestellt ist die Anzahl an Calloseeinlagerungen an Zell-Zell-Kontakten im Schwammparenchym pro 1,48 mm² Blattfläche. Für jeden Messpunkt wurden 10 Mikroskopaufnahmen aus je drei unabhängigen Infektionsreihen ausgewertet.

Die Callosebildung beginnt bei Xanthi ebenfalls an den Zellplatten einzelner infizierter Zellen und breitet sich im weiteren Verlauf über die gesamte Zellwand aus (Daten nicht gezeigt). Beim quantitativen Vergleich zu SNN fällt jedoch auf, dass die Callosebildung an den Zell-Zell-Kontakten bei Xanthi um ca. fünf Stunden verzögert einsetzt (Abbildung 4-16). Bei Xanthi tritt erst nach 6 hpi eine signifikante Zunahme der Callosedeposition an den Kontaktbereichen auf, die nach 9 Stunden auf ähnlich hohem Niveau stagniert wie bei SNN. In den ersten 3 hpi konnte bei Xanthi nahezu keine Callosebildung detektiert werden.

4.1.1.7 Räumliche Begrenzung der ROS-Bildung

Erste Untersuchungen an Diaminobenzidin- (DAB) behandelten Blättern von SNN zeigten, dass bereits kurz nach Infektionsbeginn eine starke Akkumulation von H₂O₂ im Infektionsbereich festzustellen ist (Abbildung 4-3 A). Um zu überprüfen ob zwischen Callosedeposition und dem lokalen Auftreten von ROS ein Zusammenhang besteht, wurde ein Verfahren zur Kolkalisierung von Callose und H₂O₂ am Fluoreszenzmikroskop entwickelt.

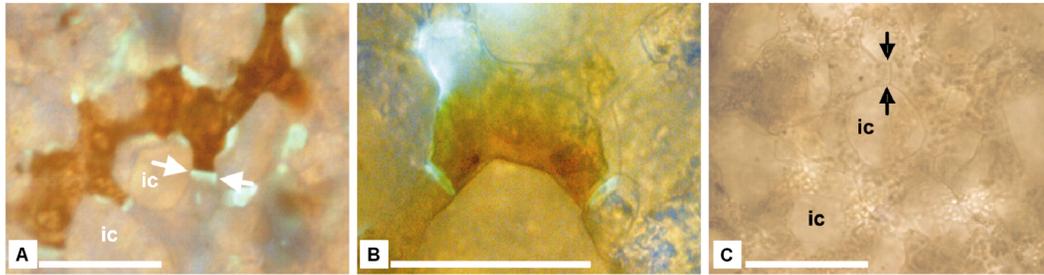


Abbildung 4-17 Kolokalisierung von Calloseeinlagerung (grün-blaue Fluoreszenz; weiße Pfeile) und H_2O_2 -Akkumulation (braune DAB-Färbung) im Schwammparenchym von SNN zu 3 hpi. (A und B) Infektionsort, (C) Kontrolle. Die weißen Balken repräsentieren 100 μm . Schwarze Pfeile zeigen Zell-Zell-Kontakte im Kontrollgewebe. ic = Interzellularraum. (C) ist repräsentativ für alle untersuchten Kontrollen ($n > 20$).

Abbildung 4-17 A und B zeigen, dass in allen Zellen in denen H_2O_2 akkumuliert auch Calloseeinlagerungen im Apoplasten an den Zell-Zell-Kontakten auftreten. Es fällt außerdem auf, dass sich die DAB-Färbung in keinem Fall signifikant über die Callose-Barrieren auf benachbarte Zellen ausbreitet. Möglicherweise verhindert die Callose die Ausbreitung von ROS im Apoplasten infizierter Zellen um eine unkontrollierte Ausbreitung der HR im pflanzlichen Gewebe zu unterbinden. Da H_2O_2 auch nach mechanischer Verwundung auftreten kann wurde eine große Anzahl an Kontrollexperimenten durchgeführt, um auszuschließen, dass präparationsbedingte Artefakte die infektionsbedingte Reaktion verfälschen. Es zeigte sich jedoch, dass in keiner Kontrolle ROS-Akkumulation auftritt (Abbildung 4-17 C).

4.1.1.8 Saccharose-Efflux bei SNN

Die frühe Callosebildung an den Plasmodesmata infizierter SNN-Zellen verweist auf eine mögliche Störung des interzellulären Assimilattransports. Um zu überprüfen ob die frühe Callosebildung mit einer Drosselung des Saccharose-Exports aus dem infizierten Gewebe einhergeht, wurden Efflux-Experimente an SNN-Blättern durchgeführt. Abbildung 4-18 A zeigt die Repression des Saccharose-Exports nach Infektion. Während der ersten Stunden nach Infektion nimmt der Export der Saccharose aus den infizierten Blattbereichen um etwa 70% ab und bleibt, relativ zur Kontrolle, während des gesamten Messzeitraums auf konstant niedrigem Niveau. Eine dermaßen drastische Hemmung des Exports muss Auswirkung auf den Saccharose-Gehalt im Apoplasten der Infektionsstelle haben. Daher wurden die erhobenen Daten mit Messungen zum Kohlenhydrat-Haushalt infizierter Tabakpflanzen verglichen, die Jutta Essmann (AG Weis, IfB, WWU Münster) im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt hat. Es zeigte sich, dass zeitgleich zur Reduktion des Saccharose-Exports ein etwa 50%iger Anstieg im apoplastidären Saccharose-Gehalt in infiziertem Gewebe auftritt (Abbildung 4-18 B). Im weiteren Verlauf der Infektion (> 6 hpi) steigt der Saccharose-Gehalt im Apoplasten auf bis zu 250% im Vergleich zu gesunden Kontrollblättern an (Abbildung 4-18 B).

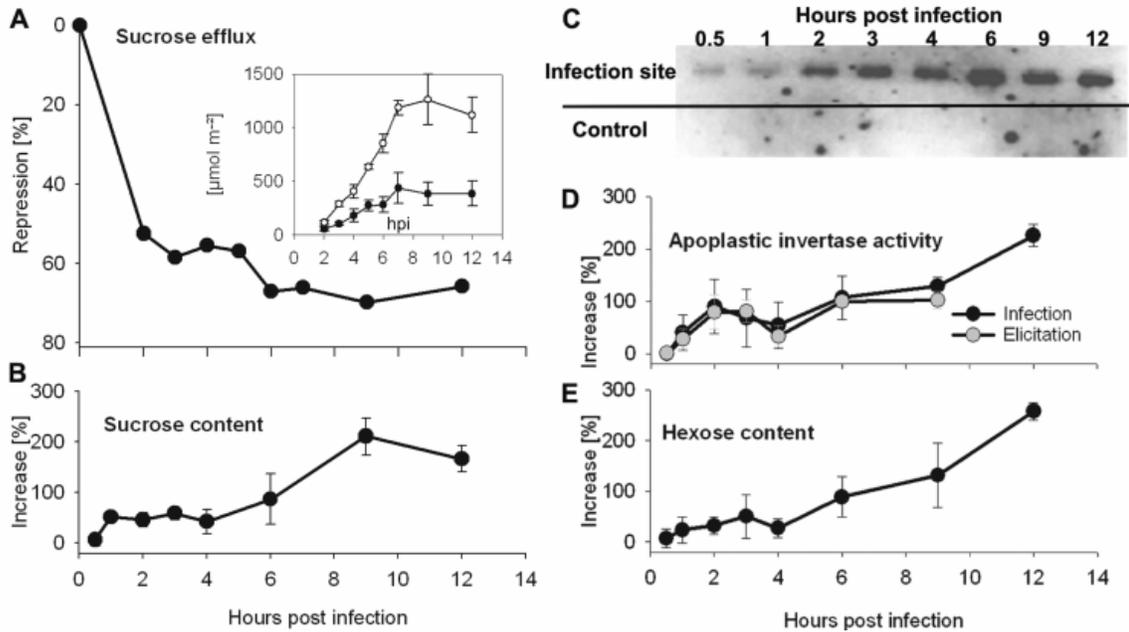


Abbildung 4-18 Zeitverlauf von Abwehr-induzierten Änderungen im Kohlenhydrat-Stoffwechsel von SNN-Blättern. (A) Verminderung des Saccharose-Efflux aus infizierten Blattbereichen. Der eingefügte Graph zeigt die zugrunde liegenden Exportdaten der Saccharose (weiße Punkte – Kontrolle; schwarze Punkte – Infektionsbereich). (B) Anstieg des apoplastidären Saccharose-Gehalts im Infektionsbereich. Der Mittelwert in Kontrollen beträgt 135 $\mu\text{mol m}^{-2}$ Blattfläche. (C) Genexpression der apoplastidären Invertase. (D) Anstieg der Aktivität der apoplastidären Invertase nach Infektion mit *P. nicotianae* und nach Elicitierung mit einem zellfreien Filtrat der Zoosporen. Der Mittelwert in Kontrollen beträgt 394 nKat m^{-2} Blattfläche. (E) Anstieg der Hexosen im Apoplasten des Infektionsbereichs. Der Mittelwert in Kontrollen beträgt 63 $\mu\text{mol m}^{-2}$ Blattfläche. Alle hier gezeigten prozentualen Änderungen sind relative Änderungen basierend auf den Kontrollen (= 0%). Die gezeigten Daten sind Mittelwerte aus jeweils vier unabhängigen Messreihen. Die Daten der Abbildungen A, B, D und E wurden von Dipl. Biol. Jutta Essmann in der AG Weis, IfB, WWU Münster erhoben.

4.1.1.9 Apoplastidäre Invertase und Hexosen bei SNN

Der Anstieg im Gehalt von apoplastidärer Saccharose nach Infektion wird von einem Anstieg der Genexpression (Abbildung 4-18 C) und der Aktivität (Abbildung 4-18 D) der apoplastidären Invertase im Infektionsbereich begleitet. Im Kontrollgewebe sind sowohl Expression, als auch Aktivität dieses 'Sink'-typischen Enzyms erwartungsgemäß niedrig. Bereits zu 0,5 hpi ist ein leichter Anstieg des Transkriptlevels in infizierten Blattbereichen zu verzeichnen. Bis 6 hpi steigt die Expression dieses Gens weiter an und nimmt zu späteren Zeitpunkten wieder leicht ab (Abbildung 4-18 C). Auch die Aktivität der apoplastidären Invertase steigt nach Infektion schnell an und erreicht bei 2 hpi ein erstes, temporäres Maximum. Von 4 hpi an ist ein sekundärer Aktivitätsanstieg dieses Enzyms zu verzeichnen. Die Aktivität ist nach 12 Stunden um etwa 250% gegenüber den Kontrollen erhöht (Abbildung 4-18 D). Ein vergleichbares Bild ergab sich nach Elicitierung von Tabakblättern mit einem zellfreien Filtrat von *P. nicotianae* Zoosporen (Abbildung 4-18 D). Dieser Kontrollversuch bestätigt die Annahme, dass der zu verzeichnende

Anstieg der Invertase-Aktivität vorwiegend auf eine Reaktion der Pflanze zurückzuführen ist und nicht vom Pathogen stammt. Die Daten legen nahe, dass die, eigentlich für den Export bestimmte, Saccharose durch die apoplastidäre Invertase in Glukose und Fruktose gespalten wird und somit die Beladung des Phloems und der Kohlenhydrat-Export unterbunden werden. Die Hexosen können von membranständigen Hexose-Transportern hocheffizient in die Mesophyllzellen zurück transportiert werden und hier die Abwehrreaktionen unterstützen. Abbildung 4-18 E zeigt, dass zunächst (1 – 4 hpi) nur ein moderater Anstieg des Hexosegehalts im Apoplasten zu verzeichnen ist. In einer zweiten Phase (4 – 12 hpi) steigt der Gehalt jedoch, ähnlich wie die Invertase-Aktivität, deutlich an und liegt zu 12 hpi etwa 250% über den Kontrollwerten. Möglicherweise übersteigt zu diesen Zeitpunkten die Saccharosespaltung im Apoplasten die Aktivität der Hexose-Transporter und verursacht dort eine Akkumulation von Hexosen. Ein identischer Effekt kann durch die Elicitierung mit zellfreiem *P. nicotianae* Kulturfiltrat erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

4.1.1.10 Räumliche Kongruenz von metabolischen Umstellungen und Abwehrreaktionen

Alle bisher vorgestellten Daten des resistenten SNN deuten auf eine schnelle und koordinierte Umstellung des pflanzlichen Stoffwechsels während der Abwehr von *P. nicotianae* hin. Mit den hier vorhandenen und neu entwickelten Methoden sollte weiterhin überprüft werden, inwieweit eine räumliche Korrelation zwischen den beschriebenen Stoffwechselumstellungen und der pflanzlichen Abwehr besteht. Zu diesem Zweck wurden Versuchsreihen durchgeführt die es erlauben verschiedene Stoffwechselfparameter und Abwehrreaktionen bildgebend miteinander zu vergleichen.

Abbildung 4-19 A zeigt die primären Infiltrationsbereiche in Blättern von SNN mit der Zoosporensuspension des Pathogens (obere Blatthälfte) und Leitungswasser (untere Blatthälfte). In Abbildung 4-19 B bis E ist zum Vergleich die räumliche Verteilung verschiedener Stoffwechselfparameter zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion dargestellt. Abbildung 4-19 B zeigt die lokale Stimulierung des OPPC im Infektionsbereich (3 hpi), erkennbar an der beschleunigten PET-Induktion. In den darauf folgenden Abbildungen sind die Stoma-abhängige (Abbildung 4-19 C, 3 hpi) sowie die Stoma-unabhängige (Abbildung 4-19 D, 6 hpi) Repression der Photosynthese und die H₂O₂-Akkumulation (Abbildung 4-19 E, 9 hpi) dargestellt.

Diese Bildfolge zeigt, dass alle metabolischen Änderungen und die Akkumulation von H₂O₂ exakt kongruent zum primären Infektionsbereich auftreten. Offenkundig ist auch die abschließende hypersensitive Läsion deckungsgleich mit dem primären Infektionsort (Abbildung 4-2). Die untersuchten Änderungen des Primärstoffwechsels, Abwehrreaktionen und die HR treten demnach hoch lokalisiert auf. Keine der bislang untersuchten Veränderungen scheint sich systemisch über die Infektionsstelle hinaus auszubreiten

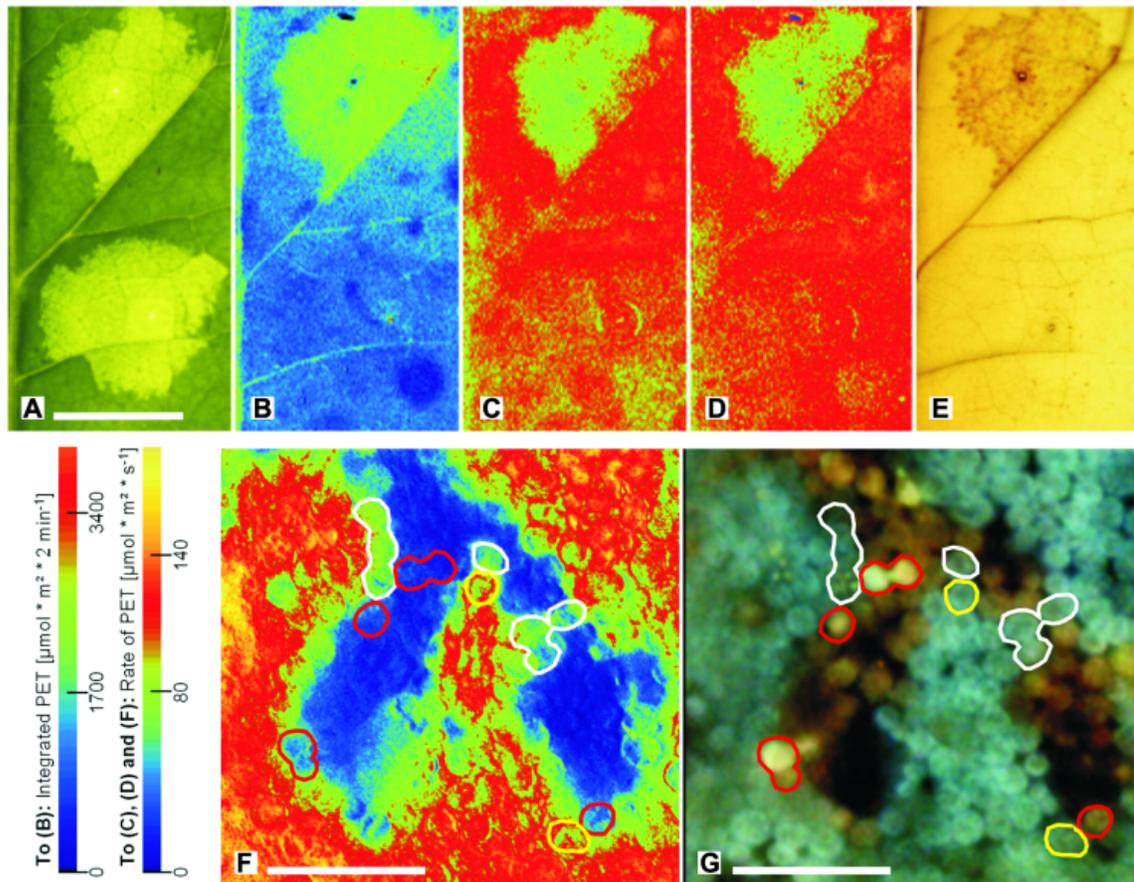


Abbildung 4-19 Kongruenz von Infektionsort, Veränderungen im pflanzlichen Primärstoffwechsel und der pflanzlichen Abwehr bei SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*. (A) Primärer Infektionsbereich nach Infiltration der Sporensuspension (Infektionsort – oben) bzw. sterilem Leitungswasser (Kontrolle – unten). (B) Stimulation der photosynthetischen Induktion zu 3 hpi (vergleiche mit Abbildung 4-6 C). (C) Stoma-abhängige Abnahme der photosynthetischen 'CO₂-Fixierung' zu 3 hpi (vergleiche Abbildung 4-9 B). (D) Stoma-unabhängige Reduktion des 'Gesamt-PET' zu 6 hpi (vergleiche Abbildung 4-9 A). (E) Akkumulation von H₂O₂ am Infektionsort (9 hpi). (A bis E) Der weiße Balken repräsentiert 10mm. (F) Mikroskopische Aufnahme des 'Gesamt-PET' im Randbereich einer infizierten Blattregion (7 hpi, vergleiche Abbildung 4-9 A). (G) UV-angeregte Fluoreszenzaufnahme desselben Blattbereichs wie in (F) nach Elution der Blattpigmente. Die hellgelbe Fluoreszenz stammt wahrscheinlich aus lignifizierten Zellen und indiziert den hypersensitiven Zelltod. Die rotbraune Fluoreszenz wird vermutlich von Zellen emittiert, die beginnende Zellwandverstärkungen und die Synthese phenolischer Komponenten aufweisen und sich daher in einem Übergangsstadium zwischen intakt und hypersensitivem Zelltod befinden. Die blaue Fluoreszenz ist wird ausschließlich von uninfizierten Zellen emittiert, die keine Veränderungen im 'Gesamt-PET' aufweisen. Gelbe Markierungen: Zellen mit unverändert hohem PET und ohne Anzeichen für Lignifizierung oder Zelltod. Rote Markierungen: Tote, lignifizierte Zellen mit hoher Autofluoreszenz und stark reduziertem PET. Weiße Markierungen: Zellen mit reduziertem PET und Anzeichen beginnender Lignifizierung. Die weißen Balken in (F) und (G) repräsentieren 100 µm.

Die strikte Lokalisierung von HR und der Abnahme der 'Gesamt-PET' bei SNN konnten außerdem mit mikroskopischer Auflösung untersucht werden (Abbildung 4-19 F und G). Abbildung 4-19 F zeigt die photosynthetische Aktivität einzelner Mesophyllzellen im Randbereich eines

Infektionsorts zu 7 hpi. Photosynthetisch hoch aktive Zellen können offenbar direkt an Zellen mit stark reprimierter Photosynthese angrenzen. Abbildung 4-19 G zeigt denselben Bildausschnitt nach Extraktion der Blattpigmente unter UV-Anregung. Es fällt auf, dass Zellen mit hoher photosynthetischer Aktivität unter UV-Anregung eine hellblaue Fluoreszenz zeigen, welche vermutlich phenolischen Komponenten emittiert wird (gelbe Markierungen in Abbildung 4-19 F und G). Etwas schwächer Blau-fluoreszierende Zellen zeigen bereits eine deutliche Reduktion der photosynthetischen Aktivität (weiße Markierungen in Abbildung 4-19 F und G). Zellen deren Photosynthese nahezu vollständig inhibiert ist emittieren hingegen eine starke, gelblich-weiße Autofluoreszenz (rote Markierungen in Abbildung 4-19 F und G). Zu späteren Zeitpunkten der Infektion dominiert diese Autofluoreszenz in allen infizierten Zellen. Diese Autofluoreszenz spiegelt wahrscheinlich die Abwehr-induzierte Zellwandverstärkung und den hypersensitiven Zelltod wider [Tiwari *et al.* (2002)]. Dieser gelblich-weißen Fluoreszenz geht offenbar eine schwächere, rotbraune Fluoreszenz voraus (Abbildung 4-19 G). Bislang ist der Ursprung dieser Fluoreszenz nicht schlussendlich aufgeklärt, jedoch könnte es sich um einen Zwischenzustand der beginnenden Zellwandverstärkung und der hypersensitiven Reaktion handeln. Ein Vergleich des PET-Bildes mit dem UV-angeregtem Bild (Abbildung 4-19 F und G) zeigt deutlich, dass autofluoreszierende und daher wahrscheinlich tote Zellen direkt an intakte, photosynthetisch aktive 'Source'-Zellen angrenzen können. Offensichtlich sind in diesem Pathosystem sowohl hypersensitiver Zelltod, wie auch die beschriebenen metabolischen Umstellungen „Alles oder Nichts“-Reaktionen, die in einzelnen, infizierten Mesophyllzellen auftreten und keinen signifikanten systemischen Einfluss auf benachbarte, nicht-infizierte Zellen ausüben.

4.1.1.11 Überprüfung der Vitalität infizierter Zellen

Um sicherzustellen, dass das Absinken der photosynthetischen Aktivität infizierter SNN-Zellen nicht nur auf deren Abwehr-induzierten Tod zurückzuführen ist, wurde die Vitalität infizierter Zellen im Infektionsverlauf überprüft. Die hohen Atmungsraten in infiziertem Gewebe (Abbildung 4-6 A) erbrachten erste Hinweise, dass die Photosynthese hier zwar stark herab reguliert wird, das Gewebe aber noch vital ist. Auch die Aktivitäten verschiedener Enzyme, wie der Invertase oder der G6PDH (Abbildung 4-18 D und Abbildung 4-6 B), legen die Vermutung nahe, dass die Zellen im Infektionsbereich noch metabolisch aktiv und somit lebendig sind. Um diese Hinweise zu verifizieren, wurden verschiedene Methoden zur mikroskopischen Visualisierung der Vitalität getestet. Aufgrund der hohen Sensitivität und einfachen Anwendbarkeit wurde die Vitalfärbung mit Fluorescein-Diacetat (FDA) routinemäßig angewendet.

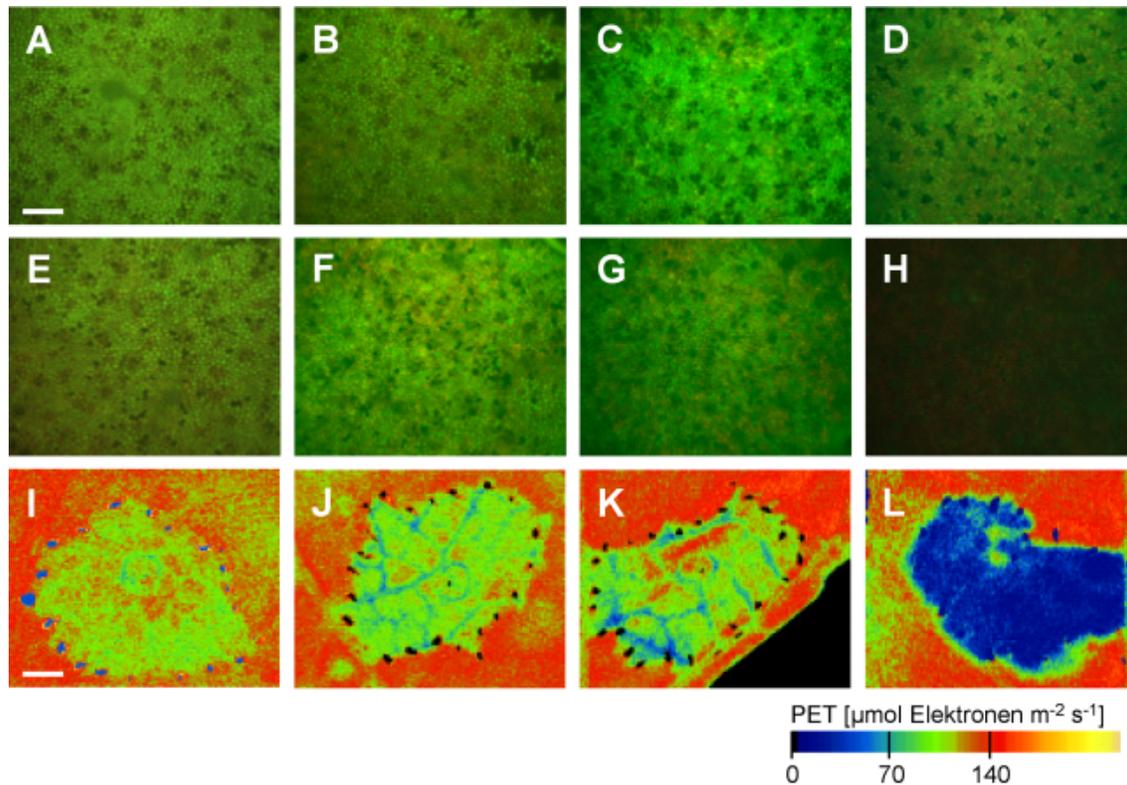


Abbildung 4-20 Vitalitätstest mit FDA und Messung der photosynthetischen Aktivität an Blättern von SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*. (A – D) Kontrollen nach (A) 6 hpi, (B) 9 hpi, (C) 12 hpi und (D) 24 hpi. (E – H) Infektionsbereiche nach (E) 6 hpi, (F) 9 hpi, (G) 12 hpi und (H) 24 hpi. (I – L). Bilder des 'Gesamt-PET' infizierter Blattbereiche nach (I) 6hpi, (J) 9 hpi, (K) 12 hpi und (L) 24 hpi vor der Probennahme für den Vitalitätstest (A-H). Der weiße Balken repräsentiert (A-H) 200 µm und (I – L) 7 mm.

In Abbildung 4-20 A bis D sind Kontrollbereiche aus Tabakblättern nach FDA-Färbung zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Wasserinfiltration abgebildet (6 – 24 hpi). Neben der roten Chlorophyll-Fluoreszenz ist deutlich die grüne FDA-Fluoreszenz zu erkennen, welche nur von lebenden Zellen, die den Farbstoff aufnehmen können, emittiert wird. Färbt man infizierte Blätter mit FDA ist während der ersten 12 hpi kein signifikanter Unterschied zu den jeweiligen Kontrollen zu erkennen (Abbildung 4-20 E – G). Nach 24 Stunden (Abbildung 4-20 H) ist im Infektionsbereich keine FDA-Färbung mehr erkennbar. Vor der Vitalitätsbestimmung wurde der 'Gesamt-PET' in diesen Blattbereichen bestimmt (Abbildung 4-20 I – L). Ein Vergleich der Abbildungen zeigt, dass zu Zeitpunkten an denen bereits eine signifikante Verminderung der Photosynthese zu verzeichnen ist (6-12 hpi, Abbildung 4-20 I – K) die Zellen nach FDA-Behandlung noch stark fluoreszieren, also noch vital sind. Erst nach 24 hpi, wenn die Photosynthese im Infektionsbereich nahezu vollständig ausgeschaltet ist (Abbildung 4-20 K), ist keine Anfärbung mit FDA mehr möglich (Abbildung 4-20 H) – die Zellen sind tot.

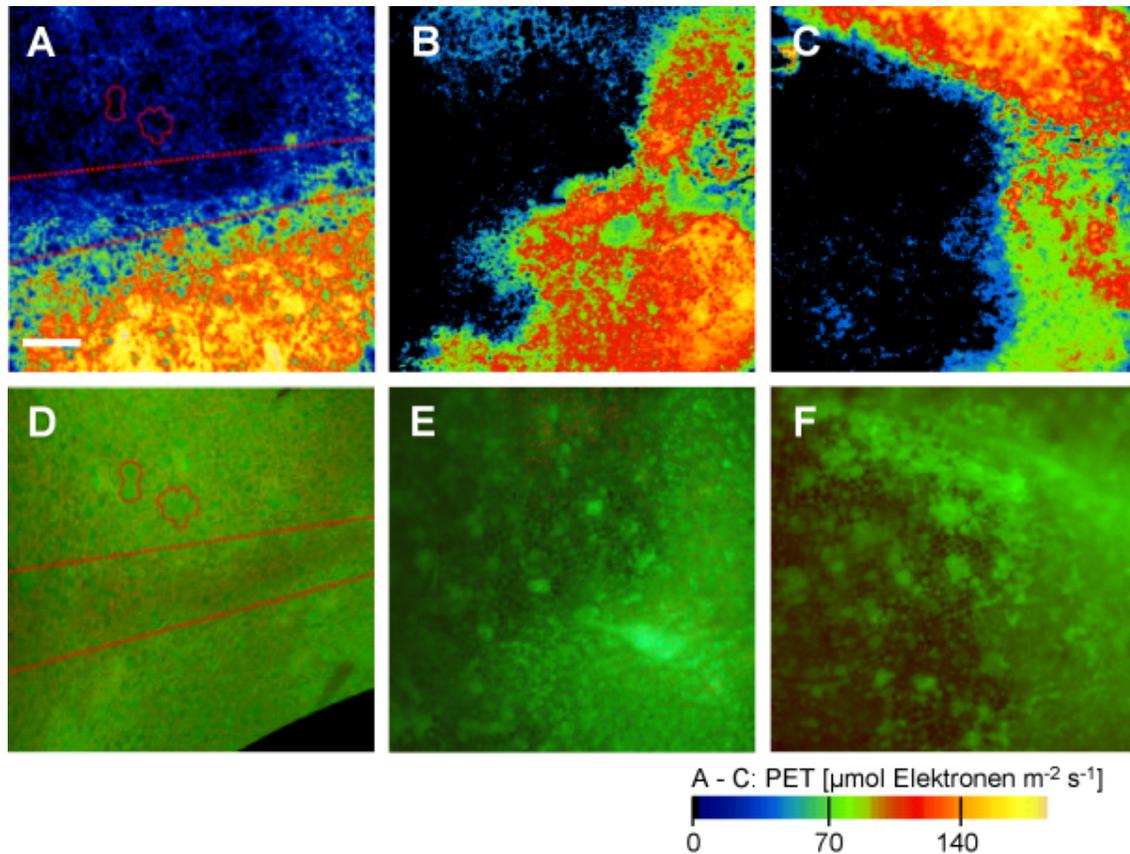


Abbildung 4-21 Kolokalisation der photosynthetischen Aktivität und Zellvitalität in SNN-Blättern nach Infektion mit *P. nicotianae*. (A – C) PET-Kapazität an Infektionsgrenzen im Tabakmesophyll nach (A) 9 hpi und (B und C) 24 hpi. (D – F) Fluoreszenzbilder derselben Blattbereiche nach Färbung mit FDA, nach (D) 9 hpi und (E und F) 24 hpi. Grün fluoreszierende Zellen sind lebendig, ungefärbte, dunkle Regionen zeigen tote Zellen an. Der weiße Balken repräsentiert 200 µm.

Des Weiteren wurde überprüft, ob dieser Vitalitätstest auch geeignet ist den Zelltod einzelner Mesophyllzellen nach Infektion nachzuweisen. In Abbildung 4-21 A bis C ist die Repression des 'Gesamt-PET' in Blättern von SNN während der Abwehr von *P. nicotianae* zu erkennen. Bereits nach 9 hpi ist die Photosynthese im Infektionsbereich stark reprimiert, während die betroffenen Zellen noch vital sind und eine deutliche FDA-Fluoreszenz aufweisen (Abbildung 4-21 A und D). Im Randbereich des Infektionsorts wird außerdem deutlich, dass photosynthetisch aktive Zellen direkt neben inaktiven Zellen existieren können. Nach 24 hpi weisen die Zellen im Infektionsbereich keine signifikante photosynthetische Aktivität mehr auf und zeigen auch keine FDA-Fluoreszenz mehr – die Zellen sind tot (vergleiche Abbildung 4-21 B und C mit E und F). Die Vitalitätstests sind ein direkter Beweis, dass die während der Abwehrreaktion von SNN ausgelöste Hemmung der Photosynthese keine Folge des hypersensitiven Zelltods ist, sondern dass die Hemmung der Photosynthese der HR vorausgeht. Die Repression der Photosynthese ist demnach ein kontrollierter Prozess vitaler Zellen und kein trivialer Nebeneffekt des Abwehr-induzierten Zelltods.

4.1.1.12 Unterschiede zwischen inkompatibler (SNN) und kompatibler (Xanthi) Interaktion
Bereits wenige gezielte Untersuchungen zur Auswirkung einer Infektion mit *P. nicotianae* am suszeptiblen Tabakkultivar Xanthi konnten einige signifikante Unterschiede zur Reaktion der resistenten Tabaklinie aufzeigen.

- Verglichen mit der drastischen Hemmung der Photosynthese bei SNN bleibt die photosynthetische Aktivität bei Xanthi über mehrere Tage nach Infektion erhalten und sinkt auf maximal 50% der Kontrollen ab.
- Die bei SNN zwischen 1 und 6 hpi auftretende Stoma-abhängige Abnahme der CO₂-Fixierung unterbleibt bei Xanthi gänzlich.
- Die bei SNN unmittelbar nach Infektion einsetzende Callosebildung, beginnt bei Xanthi deutlich verzögert, erreicht jedoch nach 6 – 9 hpi ein vergleichbar hohes Niveau
- Atmung, OPPP-, G6PDH- und PAL-Aktivität werden bei SNN bereits kurz nach Infektion deutlich stimuliert, wohingegen bei Xanthi eine wesentlich schwächere Aktivierung von OPPP und PAL zu verzeichnen ist.
- Die Akkumulation von H₂O₂ am Infektionsort tritt bei Xanthi erst ab 9 hpi auf und ist sehr schwach ausgeprägt, während bei SNN bereits nach 1 hpi eine signifikante ROS-Produktion zu detektieren ist.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass viele der bei SNN auftretenden Abwehrkorrelierten Reaktionen offensichtlich auch während der kompatiblen Interaktion in Xanthi auftreten. Allerdings ist das Auftreten der metabolischen Umstellungen in allen Fällen deutlich (ca. 4 bis 9 h) gegenüber dem resistenten Tabakkultivar verzögert. Außerdem ist die Ausprägung der bei Xanthi auftretenden Stoffwechseländerungen i.d.R. schwächer als bei SNN. Daher liegt die Schlussfolgerung nahe, dass eine schnelle und vollständige Umstellung zu einem heterotrophen, 'Sink'-artigen Abwehrstoffwechsel eine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche Pathogenabwehr von 'Source'-Zellen im Licht darstellen könnte.

4.1.2 Auswirkungen der G6PDH-Hemmung auf die pflanzliche Abwehr

Die vergleichenden Untersuchungen einer inkompatiblen und einer kompatiblen Interaktion zeigten deutliche Unterschiede in den eigentlichen Abwehrreaktionen, wie auch in den begleitenden Umsteuerungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels. So tritt bei SNN eine schnelle Hemmung der Photosynthese auf, während gleichzeitig eine Aktivierung des OPPP zu verzeichnen ist.

Das Glucose-6-Phosphat (G6P)-Analog N-Acetyl-Glucosamin-6-phosphat (N-Glc6P) ist ein kompetitiver Inhibitor der G6PDH [Glaser & Brown (1955)]. Pugin *et al.* (1997) konnten zeigen, dass eine Hemmung des OPPP durch N-Glc6P die Bildung von ROS verringert und die

pflanzliche Abwehr in Tabakzellkulturen vermindert. Um mögliche Auswirkungen der OPPP-Hemmung auf die Abwehr von SNN zu untersuchen wurden eine Stunde nach Infektion von SNN mit *P. nicotianae* Zoosporen verschieden konzentrierte N-Glc6P-Lösungen vom Rand her in die primäre Infektionszone eingespritzt. So war gewährleistet, dass jeweils nur ein Teilbereich des Infektionsorts mit dem Hemmstoff infiltriert wurde und der übrige Infektionsbereich als Referenz der Infektion dienen konnte.



Abbildung 4-22 Hypersensitive Läsionen in SNN-Blättern 30 Stunden nach Infektion mit *P. nicotianae*. Beide Infektionsbereiche (schwarze Linie) wurden nach 1 hpi zur Hälfte mit sterilem Leitungswasser

Um auszuschließen, dass es durch eine nachträgliche Infiltration zu einem Ausschwemmen des Pathogens aus dem Infektionsbereich kommt, wodurch die Abwehrreaktion beeinflusst werden könnte, wurde eine Stunde nach Infektion steriles Leitungswasser in den primären Infektionsbereich infiltriert. Nach 30 hpi waren in den Infektionsorten jedoch keine Auswirkung dieser zweiten Infiltration zu beobachten (Abbildung 4-22). Die hypersensitive Läsion trat im gesamten primären Infektionsbereich auf, ohne dass Unterschiede in der Geschwindigkeit dieser Reaktion zu beobachten sind.

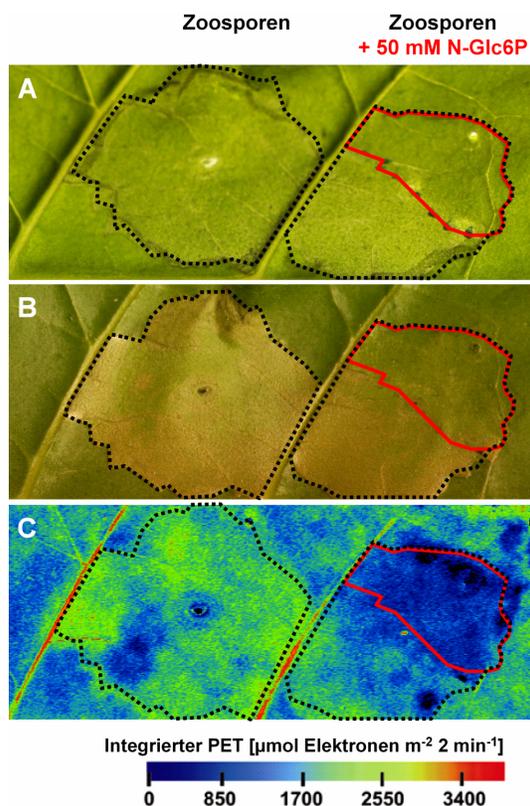


Abbildung 4-23 Einfluss von N-Acetyl-Glucosamin-6-phosphat auf die Abwehrreaktion von SNN. (A) Infiltrationsbereiche von Zoosporen (schwarze gepunktete Linien) und N-Glc6P (rote Markierungen). (B) Hypersensitive Läsionen nach 30 hpi. (C) Integralbild der photosynthetischen Induktion während der ersten 2 min nach Vorverdunkelung (6 hpi).

Abbildung 4-23 C zeigt, dass im N-Glc6P-infiltrierten Bereich (rote Markierungen) die typische Beschleunigung der Photosyntheseinduktion (grüner Bereich links; Indikator für erhöhte OPPP-Intermediate) unterbleibt. Auch der Kollaps des infizierten Gewebes und die Ausbildung der hypersensitiven Läsion, welche in den nur mit Zoosporen infizierten Regionen deutlich ausgeprägt sind, wird durch die Applikation von N-Glc6P fast vollständig unterbunden (Abbildung 4-23 B). Diese Beobachtungen zeigen, dass der OPPP durch die Applikation von N-Glc6P drastisch gehemmt wird und es hierdurch nicht mehr zu einer Abwehr-induzierten Stimulation des pflanzlichen Dunkelstoffwechsels kommt. Diese Daten sind zwar nur erste Hinweise, zeigen jedoch deutlich die Notwendigkeit einer Stimulation des Dunkelstoffwechsels, speziell des OPPP, für eine erfolgreiche Pathogenabwehr auf.

Weitere Kontrollversuche sollten klären, ob durch die Applikation von N-Glc6P die Abwehrreaktionen von SNN vollständig unterbunden werden oder es nur zu einer zeitlichen Verzögerung der Abwehr kommt. Zu diesem Zweck wurden verschiedene N-Glc6P-Konzentrationen nach Infektion appliziert, die Infektionsorte über mehrere Tage nach Infektion beobachtet und die Abwehrreaktionen dokumentiert.

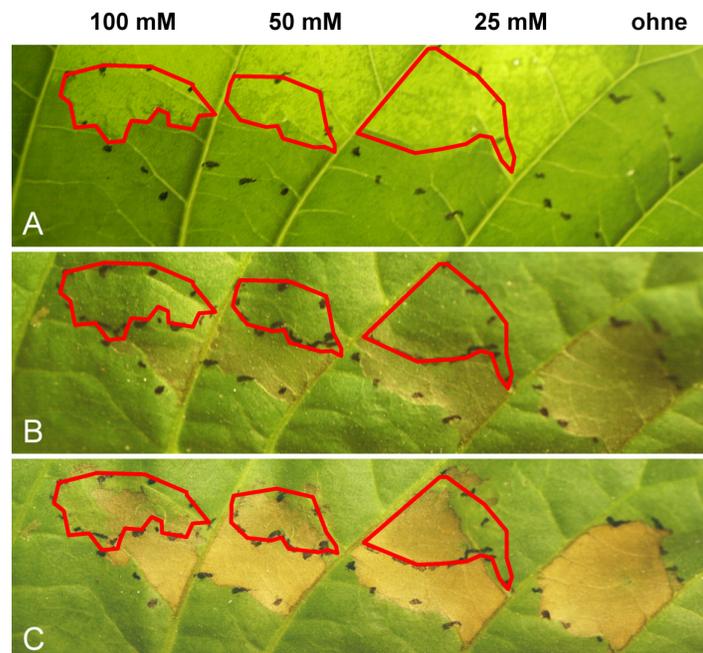


Abbildung 4-24 Ausbildung von hypersensitiven Läsionen und Verzögerung der Abwehr in SNN durch Applikation von N-Acetyl-Glucosamin-6-phosphat. (A) Infiltrationsbereiche der N-Glc6P-Lösung (rote Markierungen). Die schwarzen, punktförmigen Markierungen zeigen die primären Infektionsorte an. (B) Abwehrbereiche nach 24 hpi. (C) Abwehrbereiche nach 48 hpi.

Das in Abbildung 4-24 dargestellte Experiment zeigt deutlich, dass sich zu 24 hpi die hypersensitiven Läsionen im gesamten Infektionsbereich ausbilden (Abbildung 4-24 B: 'ohne'). In den mit N-Glc6P behandelten Infektionsbereichen war zu diesem Zeitpunkt das Gewebe noch intakt und es sind nur schwache Anzeichen für eine Abwehrreaktion zu verzeichnen. Nach 48 Stunden

war jedoch auch in den N-Glc6P-Regionen die HR weitestgehend abgeschlossen (Abbildung 4-24 C). Es zeigte sich eine deutliche Dosisabhängigkeit der OPPP-Hemmung. Während die mit 25, bzw. 50 mM N-Glc6P-Lösung behandelten Bereiche nahezu vollständig hypersensitiv reagiert haben, war die Abwehr bei 100 mM N-Glc6P nach 48 hpi noch immer behindert. Auch dieses Experiment bestätigt, dass es durch die Infiltration der N-Glc6P-Lösung nicht zu einem Ausschwemmen der Zoosporen kommt. Nach spätestens 48 hpi kann das N-Glc6P die G6PDH nicht mehr hemmen, die Abwehrreaktionen laufen verzögert an und es kommt zur Ausbildung hypersensitiver Läsionen. Da der cytosolische OPPP an der Versorgung der Peroxidasen mit Reduktionsäquivalenten maßgeblich beteiligt ist, sollte eine Hemmung dieses Stoffwechselweges auch zu einer Reprimierung der Abwehr-induzierten Bildung von H_2O_2 im Infektionsbereich führen.

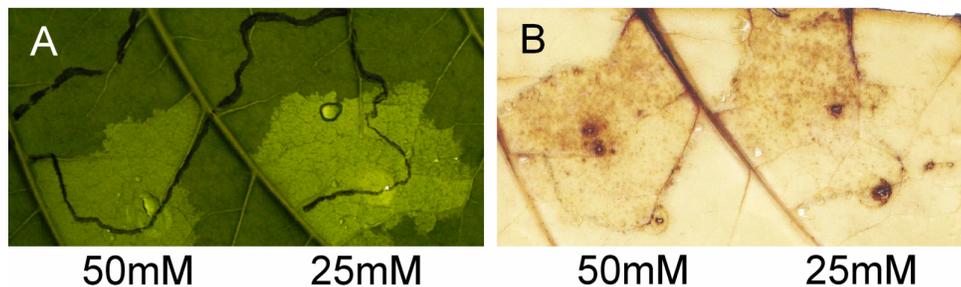


Abbildung 4-25 Repression der Abwehr-induzierten H_2O_2 -Akkumulation durch N-Acetyl-Glucosamin-6-phosphat. (A) Primäre Infektionsorte (schwarze Linien) und Infiltrationsbereiche der N-Glc6P-Lösung (durchscheinende Bereiche). (B) H_2O_2 -Akkumulation (dunkelbraune DAB-Färbung) in den Infektionsorten (4 hpi).

In Abbildung 4-25 sind die Auswirkungen der OPPP-Hemmung auf die Akkumulation von ROS dargestellt. Vier Stunden nach Infektionsbeginn zeigte sich eine signifikante Anreicherung von H_2O_2 am Infektionsort (Abbildung 4-25 B). In den N-Glc6P-behandelten Zonen (Abbildung 4-25 A) war die H_2O_2 -Bildung deutlich reduziert, was durch die wesentlich schwächere DAB-Färbung in diesen Bereichen erkennbar ist (Abbildung 4-25 B).

4.1.3 Untersuchungen von Tabak mit veränderter G6PDH-Aktivität

Ein weiterer Ansatz zur Untersuchung der Bedeutung des OPPP für die pflanzliche Abwehr wurde an Xanthi-Transformanten durchgeführt, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. Antje von Schaewen (IfB, WWU Münster) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Pflanzen exprimieren konstitutiv eine NADPH-tolerante P2-Isoform der G-6-PDH im Cytosol (cP2-Pflanzen) und sollten daher über eine erhöhte Reduktionskraft im Cytosol verfügen. Die Frage war, ob sich die Expression der plastidären G6PDH-Isoform im Cytosol auf die Stress-Toleranz der Pflanzen auswirkt und es hierdurch möglicherweise zu Änderungen während der Interaktion der eigentlich suszeptiblen Tabaklinie Xanthi mit *P. nicotianae* kommt.

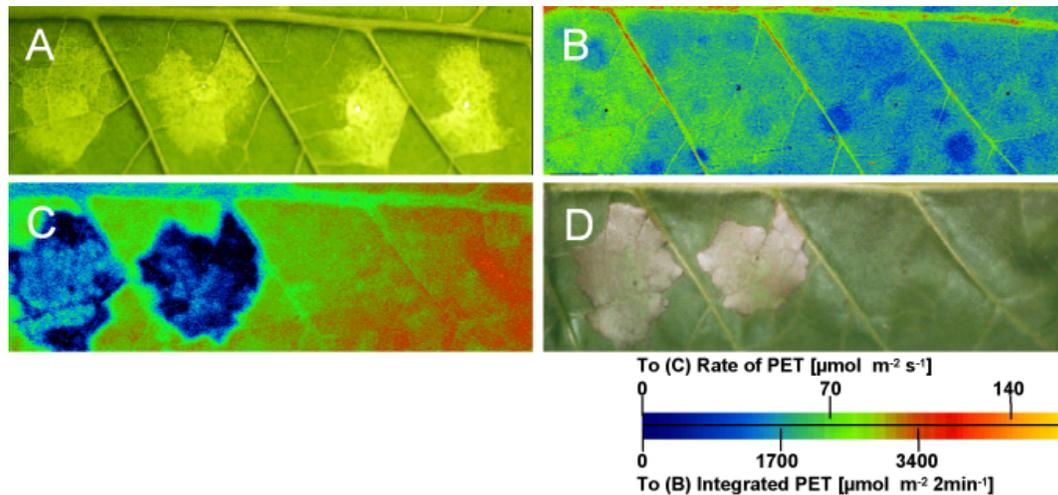


Abbildung 4-26 Auswirkungen der Infektion der cP2-Transformante mit *P. nicotianae*. (A) Primäre Infektionssorte (links 2x Zoosporen; rechts 2x steriles Leitungswasser). (B) Integralbild der Induktion des PET (6 hpi). (C) Rate des 'Gesamt-PET' (12 hpi). (D) Ausbildung hypersensitiver Läsionen im Infektionsbereich (24 hpi).

Erste Untersuchungen der cP2-Transformanten zeigten deutliche Unterschiede zu den bei Xanthi beobachteten Reaktionen nach Infektion mit *P. nicotianae*. Die Induktion des PET nach Vorverdunkelung der Pflanze ist bei cP2-Pflanzen gegenüber Xanthi erhöht (vergleiche Abbildung 4-26 B und Abbildung 4-7). Es ist allerdings zu beachten, dass die Induktion im Kontrollgewebe von cP2 bereits leicht gegenüber dem Xanthi-Wildtyp erhöht ist. Diese Infektions-unabhängige Induktionsbeschleunigung ist ein eleganter Nachweis für die konstitutiv erhöhte G6PDH-Aktivität in der Transformante und bestätigen die Eignung des Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Imagings zur bildgebenden Analyse des Dunkelstoffwechsels, insbesondere der OPPP-Aktivität. Der 'Gesamt-PET' sinkt in den Infektionsorten von cP2-Pflanzen bereits zu 6 hpi deutlich ab und ist nach 12 hpi bereits um ca. 70% gegenüber den Kontrollen erniedrigt (Abbildung 4-26 C). Eine ähnliche Hemmung konnte auch bei SNN nach Infektion mit *P. nicotianae* festgestellt werden (Abbildung 4-9 A und C). Nach 24 hpi ist in den Infektionsbereichen von cP2 keine signifikante photosynthetische Aktivität mehr detektierbar. Zu diesem Zeitpunkt haben sich im gesamten Infektionsbereich hypersensitive Läsionen ausgebildet (Abbildung 4-26 D). Da sich auch nach mehreren Tagen keine weiteren Veränderungen der Abwehrbereiche zeigten und keine Krankheitssymptome auftraten, kann man die Interaktion der Xanthi-Transformante cP2 mit *P. nicotianae* als inkompatibel betrachten. Die Expression der plastidären P2-Isoform der G6PDH im Cytosol führt möglicherweise zu einer deutlichen Steigerung der pflanzlichen Resistenz. Allerdings ist zu beachten, dass nicht alle getesteten cP2-Linien solch deutliche Abwehrreaktionen nach Infektion zeigen. Während die hier untersuchte Linie 103 eine in Geschwindigkeit, Symptomatik und Effizienz ähnliche Reaktion wie das hochresistente Tabakkultivar SNN zeigte (Abbildung 4-26), ist die Abwehrreaktion anderer Linien langsamer oder schwächer und zum Teil – wie bei Xanthi-Wildtypen – nicht effizient genug für eine erfolgreiche Pathogenabwehr.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle der Photosynthese während der Pathogenabwehr

Die metabolische Situation von photoautotrophen 'Source'-Gewebe ist für die Abwehr von Pathogenen denkbar ungeeignet. Ein 'Source'-Blatt ist optimal auf die effiziente Produktion von Kohlenhydraten eingestellt, welche schnell in die Verbrauchsorgane ('Sink') exportiert werden. Hingegen sind andere, 'Sink'-typische Stoffwechselwege wie Glykolyse, Atmung, OPPP und Shikimatweg, welche eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Abwehr spielen, auf ein für die Eigenversorgung ausreichendes Niveau herab reguliert [Scheideler *et al.* (2002)] (vgl. Abbildung 1-2). Wird ein belichtetes 'Source'-Blatt von einem Pathogen angegriffen, befinden sich die attackierten Zellen in einem metabolischen Dilemma. Die ablaufende Photosynthese und der damit verbundene rasche Export der produzierten Kohlenhydrate verhindern das Anlaufen vieler für die Abwehr notwendiger Prozesse, wie z.B. Glykolyse, Atmung, OPPP und Shikimatweg (siehe Einleitung). Jedoch können belichtete 'Source'-Zellen die Photosynthese nicht ohne weiteres herabregulieren oder gar vollständig abschalten. Hierfür sind komplexe Änderungen im Zellstoffwechsel und der Genexpression nötig.

Die Infektion mit Pathogenen führt in vielen Fällen zu Änderungen in der photosynthetischen Aktivität betroffener Blattregionen [Livne (1964), Raggi (1978), Boote *et al.* (1980), Bastiaans (1991), Schmittmann (1991), Shtienberg (1992), Tang *et al.* (1996), Scholes & Rolfe (1996), Esfeld (2000), Meyer *et al.* (2001), Schön (2001), Bassanezi *et al.* (2002)]. In der Regel ist eine Abnahme der Photosynthese erst zu späten Zeitpunkten nach Infektion zu verzeichnen, wenn sich das Pathogen in der Wirtspflanze etabliert hat und es zum Auftreten von Chlorosen oder Nekrosen kommt. Jedoch treten die Reaktionen der Photosynthese bei verschiedenen Pathosystemen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Infektion auf, sind z.T. auch gegensätzlich und daher schwierig zu interpretieren (siehe Einleitung).

Bei der hier untersuchten Interaktion von SNN und *P. nicotianae* ist bereits in der ersten 12 hpi eine drastische Abnahme der photosynthetischen Aktivität im Infektionsbereich zu beobachten. Nach etwa 24 hpi ist i.d.R. keine signifikante photosynthetische Aktivität mehr detektierbar (Abbildung 4-9 A und B, Abbildung 4-19 C und D). Dabei erfolgt die **Inhibition der Photosynthese in zwei Schritten**. In der frühen Infektionsphase (1-6 hpi; Abbildung 4-9 B) ist zunächst eine **Stoma-abhängige Reduktion der CO₂-Fixierung** zu erkennen, während zu späteren Zeitpunkten (≥ 6 hpi; Abbildung 4-9 A) die Photosynthese wahrscheinlich vorwiegend durch eine **Störung der Elektronentransportkette** inhibiert wird.

Die Infektion mit *P. nicotianae* löst bei SNN eine schnelles **Schließen der Stomata** im gesamten Infektionsbereich aus (Abbildung 4-9 D). Mittels des Chlorophyll-*a*-Fluoreszenz-Imagings konnte zudem eindeutig gezeigt werden, dass die Region mit geschlossenen Stomata exakt kon-

gruent mit dem primären Infektionsort der Zoosporen ist (Abbildung 4-9 B und Abbildung 4-19 A und C). Ein Schließen der Spaltöffnungen nach einer Infektion von Pflanzen mit Pathogenen ist bereits mehrfach beschrieben worden. Die Stomata suszeptibler Pflanzen schließen häufig erst zu späten Zeitpunkten nach Infektion, oftmals ausgelöst durch eine Störung des pflanzlichen Wasserhaushalts durch das sich ausbreitende Pathogen [z.B. Nogués *et al.* (2002)]. Während einer inkompatiblen Interaktion könnte der Stomaschluss eine frühe Abwehrmaßnahme der Pflanze darstellen, um ein weiteres Eindringen von Pathogenen durch die Spaltöffnungen zu verhindern. Gindro *et al.* (2003) konnten bei der inkompatiblen Interaktion von *Vitis vinifera* L. und *Plasmopara viticola* Calloseeinlagerungen in den Schließzellen beobachten, die in Kontrollen oder suszeptiblen Kultivaren nicht auftraten und somit ebenfalls ein Abwehr-korreliertes, jedoch nicht reversiblen Verschließen der Stomata darstellen. Ein frühes Verschließen der Spaltöffnungen, wie bei SNN und *P. nicotianae* (Abbildung 4-9 A und D), wurde auch bei der inkompatiblen Interaktion von Sojabohne und *P. sojae* beobachtet [McDonald & Cahill (1999)]. Jedoch war hier der Stomaschluss nicht nur auf den Infektionsbereich beschränkt, sondern trat in einem Umkreis von ca. 20 mm um den primären Infektionsort herum auf. Daher postulierten McDonald & Cahill (1999), dass es eine Signalkomponente ('transmissible factor') geben muss, die für die Ausbreitung des Stomaschlusses um die Infektionsstelle herum verantwortlich ist. Bei der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* bleibt der Bereich geschlossener Stomata hingegen exakt auf den primären Infektionsbereich beschränkt (Abbildung 4-9 B, Abbildung 4-19 A und C) und folgt zeitlich einer Akkumulation von H_2O_2 am Infektionsort (Abbildung 4-3 A). H_2O_2 kann die Aktivierung von Calcium-Kanälen in den Membranen der Schließzellen auslösen, ist somit direkt in die osmotische Regulation dieser Zellen involviert [Pei *et al.* (2000)] und könnte den Stomaschluss auslösen. H_2O_2 könnte somit eine wichtige Signalfunktion beim Schließen der Stomata innehaben. Da die Diffusions-Strecke von H_2O_2 , vermutlich durch die Calloseeinlagerungen an den Zell-Zell-Kontakten infizierter Zellen, begrenzt wird (Abbildung 4-17 A und B), ließe sich die klare Begrenzung des Stomaschlusses in unserem Pathosystem hierüber erklären.

Während der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* führt der Stomaschluss zu einer **drastischen Reduktion der photosynthetischen CO_2 -Aufnahme** am Infektionsort (Abbildung 4-9 B und C), ohne dass die photosynthetische Gesamt-Aktivität signifikant vermindert ist (Abbildung 4-9 A und C). In dieser Phase steht der RubisCO zwar wenig CO_2 , jedoch ausreichend O_2 zur Verfügung, wodurch der PET-Gesamtfluss in die Photorespiration, nicht jedoch in die CO_2 -Assimilierung fließen kann. Diese Verschiebung erlaubt, dass selbst im Licht ein Anstieg der OPPP-Metabolite und des Glutamin-Synthetase (GS) Weges möglich ist, während die Carboxylierungsreaktion der RubisCO herabgesetzt ist. Als Folge hiervon sollte der Export von Triosephosphaten aus den Chloroplasten ins Cytosol sinken. Erste Versuche konnten bereits zeigen,

dass der Gehalt von 3-Phosphoglycerat (dem ersten stabilen Zwischenprodukt der CO₂-Fixierung) im Infektionsbereich von SNN drastisch abnimmt (mündl. Mitteilung Dipl. Biol. Jutta Essmann). Eine solche Abnahme deutet ebenfalls auf eine Verminderung der CO₂-Assimilation hin und lässt daher einen verminderten Triosephosphat-Export erwarten. Durch ein Absinken des Triosephosphat-Exports im Licht, in Verbindung mit einem Anstieg löslicher Zucker (vgl. Abbildung 4-18 E), wird der cytosolische Stoffwechsel zugunsten glykolytischer Reaktionen und des OPPP verschoben. Ein Exportstopp würde außerdem dazu führen, dass sich Phosphat im Cytosol anreichert und die Aktivität der Saccharosephosphat-Synthase (SPS) deutlich verringern würde [Heldt (1999)]. Dieses würde die Synthese von Saccharose und somit den Export von Kohlenhydraten aus infizierten Zellen zusätzlich vermindern. Eine solche Umstellung des Stoffwechsels ist in den hier untersuchten photoautotrophen Tabakzellen vermutlich nur möglich, nachdem die photosynthetische CO₂-Fixierung durch das Verschließen der Stomata drastisch reprimiert wurde.

Die GS erfüllt in infizierten Pflanzenzellen eine doppelte Funktion. Einerseits wird durch die GS das im Photorespirationsweg freigesetzte Ammonium-Ion (NH₄⁺) wieder re-fixiert. Diese Reaktion spielt eine wichtige Rolle für die Ökonomie des pflanzlichen Stoffwechsels, weshalb die Rate der Refixierung auch fünf- bis zehnmal höher ist als die Rate der NH₄⁺-Fixierung bei der Nitratassimilation [Heldt (1999)]. Andererseits kann die GS-Aktivität auch dazu beitragen das bei der PAL-Reaktion, welche bei SNN infektionsbedingt stark ansteigt (Abbildung 4-8), entstehende NH₃ wieder zu fixieren und in den Stickstoffkreislauf zurückzuführen.

Neben der beschriebenen möglichen Auswirkungen eines Abwehr-induzierten Schließens der Stomata auf die Photosynthese und damit auf die Stoffwechselsituation der Zelle, wird diesem Vorgang in neuester Zeit noch eine andere Rolle während der pflanzlichen Abwehr zugesprochen. Durch eine gesteigerte Photorespiration würde die peroxisomale Produktion von H₂O₂ stark ansteigen, was die Entwicklung der HR vermutlich stark begünstigt [Mateo *et al.* (2004), Bechtold *et al.* (2005)]. Interessanterweise kann ein schneller Stomaschluss und ein Anstieg des H₂O₂-Gehalts auch durch eine Salicylsäurebehandlung (SA) von Blättern ausgelöst werden [Manthe *et al.* (1992), Chen *et al.* (1993), Rao *et al.* (1997), Lee (1998), Mori *et al.* (2001)]. Dieser Anstieg könnte mit einer SA-abhängigen Inhibierung der Katalase in Verbindung stehen, da dieses Enzym maßgeblich für die Detoxifizierung von H₂O₂ in Peroxisomen verantwortlich ist [Sanchez-Casas & Klessig (1994), Conrath *et al.* (1995), Durner & Klessig (1996)]. Da SA auch eine wichtige Signalkomponente bei der Abwehrreaktion von Tabak ist, könnte durch den hier beschriebenen Stomaschluss bei gleichzeitiger Inhibierung der Katalase, die peroxisomale H₂O₂-Produktion durch eine gesteigerte photorespiratorische Aktivität zu einer Beschleunigung der Abwehr beitragen.

In zukünftigen Arbeiten sollte die Rolle der Stoma-abhängigen Hemmung der CO₂-Fixierung

während der Abwehr jedoch weitergehend untersucht werden. Es ist bislang unklar, ob der frühe Stomaschluss und die damit verbundene Photosynthesehemmung nur ein günstiger Nebeneffekt der Abwehr-induzierten H_2O_2 -Produktion ist, oder ob dieser Hemmung eine wichtige Funktion bei der Pathogenabwehr zukommt. Meiner Ansicht nach begünstigt die frühe Hemmung der CO_2 -Fixierung die Umstellung des Stoffwechsels infizierter 'Source'-Zellen zu einem eher heterotrophen, 'Sink'-ähnlichen Abwehrmetabolismus. Eine Verzögerung dieser Reaktion könnte sich in einer verspätet anlaufenden Abwehr äußern und, im ungünstigsten Falle, zur erfolgreichen Besiedlung der Wirtspflanze durch das Pathogen führen.

Die **Stoma-unabhängige Repression** der Photosynthese beginnt bei SNN zwischen 4 und 6 hpi. Nach 12 hpi ist die Gesamtkapazität der Photosynthese im Infektionsort um etwa 80% gegenüber gesundem Gewebe reduziert (Abbildung 4-9 A und C). Die Stomata sind zu diesem Zeitpunkt wieder weitestgehend geöffnet (Abbildung 4-9 D) und können daher nur noch untergeordnet an der Hemmung der Photosynthese beteiligt sein. Die Reduktion der Photosynthese kann zu diesem Zeitpunkt nicht auf das Absterben der infizierten Zellen zurückzuführen sein, da das infizierte Gewebe zu diesem Zeitpunkt noch turgeszent ist und hohe Atmungsraten sowie Enzymaktivitäten aufweist (Abbildung 4-6 A und B, Abbildung 4-16, Abbildung 4-18 D). Diese Vermutung konnte auch mit dem Vitalfarbstoff Fluorescein-Diacetat (FDA) bestätigt werden (Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21 A und D). Die Abnahme der photosynthetischen Aktivität während der ersten 12 hpi ist somit keine Folge des Abwehr-induzierten Zelltods. Vielmehr scheint diese Hemmung ein kontrollierter Prozess, möglicherweise sogar ein integrierender Bestandteil der Abwehr, während der inkompatiblen Interaktion von SNN und *P. nicotianae* zu sein, der dem hypersensitiven Zelltod vorausgeht.

Wie für Zellen mit hohem Zuckergehalt [als Review siehe Rolland *et al.* (2002)] oder gesteigertem ROS-Level [Pfannschmidt (2003), Mittler *et al.* (2004)] zu erwarten, geht die Expression der kleinen Untereinheit der RubisCO (RbcS) während der ersten Stunden nach Infektion deutlich zurück. Bereits nach 4 hpi sind am Infektionsort keine RbcS-Transkripte mehr nachweisbar (Abbildung 4-11 B). Jedoch ist das schnelle Absinken der Photosynthese kaum alleine über den beobachteten Expressions-Rückgang zu erklären. Die RubisCO ist *in vivo* jedoch sehr anfällig für oxidativen Stress (ROS), welcher schlussendlich zur Degradation des Enzyms führt [Metha *et al.* (1992)]. In Verbindung mit einer stark reprimierten Neusynthese der RubisCO könnte eine solche Degradation durch die Abwehr-induzierte ROS-Bildung zu einer Verminderung der photosynthetischen Aktivität beitragen. Auch die Expression des Chlorophyll a/b-Bindeproteins (Cab) sinkt infektionsbedingtes leicht ab (Abbildung 4-11 B), jedoch bleiben Chlorophyll-Gehalt (Abbildung 4-11 A) und Chlorophyll a/b-Verhältnis (Daten nicht gezeigt) am Infektionsort stabil, während der PET bereits stark reduziert ist (Abbildung 4-9 A bis C). Messungen der P_{700} -Reduktionskinetik konnten Hinweise auf eine Ursache für die Abnahme der photosyntheti-

schen Aktivität in infizierten Blattbereichen geben. Der Elektronentransfer vom Cytochrom b_6f -Komplex zu den oxidierten PSI Reaktionszentren P_{700}^+ ist bereits wenige Stunden nach Infektion drastisch gestört (Abbildung 4-11 C), während der Gehalt an photoaktivem P_{700} (relativ zum Chlorophyll) kaum beeinflusst wird. Dies bedeutet, dass der PSI-Gehalt stabil bleibt, während die Elektronenzufuhr zum PSI-Reaktionszentrum deutlich vermindert ist. Die beobachtete leichte Photoinhibition am Infektionsort (Abnahme der variablen Fluoreszenz; nicht gezeigt) ist wahrscheinlich eher eine Folge als der Auslöser des gehemmten Elektronentransports. Neuere Untersuchungen haben ergeben, dass in Blättern transgener Tabaklinien, die große Mengen löslicher Zucker in den Blättern anreichern, die Hochpotentialkette (Cytochrom $b_6f \rightarrow$ Plastocyanin \rightarrow PS I) stark reprimiert wird. Diese Abnahme konnte im Wesentlichen auf einen deutlich verringerten Plastocyanin-Gehalt (PC) zurückgeführt werden, welcher eine wichtige Kontrollfunktion im photosynthetischen Elektronentransport innezuhaben scheint [Schöttler *et al.* (2004)]. Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine ähnliche Repression der Hochpotentialkette zu der Stoma-unabhängigen Abnahme des PET während der pflanzlichen Abwehr führen könnte (Abbildung 4-9 A und C, Abbildung 4-11 C).

Eine Reduktion der Elektronenzufuhr zum PSI würde die Mehler-Reaktion und somit die H_2O_2 -Freisetzung am PS I vermindern und dazu beitragen, dass das Chloroplastenstroma selbst im Licht in einem oxidierten Status gehalten wird. Dieses wäre eine wichtige Voraussetzung für das Anlaufen des pflanzlichen Dunkel- und Abwehrstoffwechsels. Ein eher oxidiertes Zustand des chloroplastidären NADPH/NADP⁺-Systems und des Thioredoxin-Systems würde zu einer Inaktivierung des Calvin-Zyklus im Licht führen und die stromale G6PDH, das Schlüsselenzym des plastidären OPPP, aktivieren [als Review siehe Scheibe (1991)]. Ein solcher Anstieg der G6PDH-Aktivität nach Infektion konnte bei der inkompatiblen Interaktion von *P. nicotianae* und SNN beobachtet werden (Abbildung 4-6 B und C, Abbildung 4-19 B). Das schnelle Anlaufen des OPPP (cytosolisch und stromal) stellt nicht nur Reduktionsäquivalente für die Bildung von H_2O_2 zur Verfügung (siehe Einleitung), sondern liefert auch viele Metabolite, welche für Abwehr-korrelierte Biosynthesewege, wie z.B. dem Shikimatweg, zur Verfügung stehen. Es ist bereits gut beschrieben, dass der Shikimatweg während der pflanzlichen Abwehr aktiviert wird [z.B. Herrmann & Weaver (1999); Somssich & Hahlbrock (1998)] und mit Phosphoenolpyruvat (PEP) aus der Glykolyse und Erythrose-4-Phosphat aus dem stromalen OPPP versorgt wird. Der Shikimatweg stellt neben Tyrosin und Tryptophan auch Phenylalanin bereit, welches das Ausgangsprodukt für den Phenylpropanoid-Stoffwechsel ist. Bei SNN steigt die Aktivität der Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL), dem Eingangsenzym des Phenylpropanoid-Stoffwechsels, bereits nach 3 hpi um 100% gegenüber den Kontrollen an und erreicht nach 12 hpi 500% des Kontrollwerts (Abbildung 4-8). Eine Aktivierung der PAL sollte zu einem Absinken des Phenylalanin-Levels in den betroffenen Zellen führen, wodurch wiederum die Produkthemmung der

Phenylalanin-Synthese aufgehoben wird. Es ist daher höchstwahrscheinlich, dass auch bei der Abwehr von SNN eine Aktivierung des Shikimatweges stattfindet.

Dass eine Hemmung der Photosynthese möglicherweise eine wichtige Rolle für die Induktion der HR und somit für die Pathogenabwehr spielt, konnten auch Versuche an TMV-infizierten Tabakpflanzen zeigen [Seo *et al.* (2000)]. Während der Abwehr von TMV sinkt der PET bei *N. tabacum* L. cv SNN bereits nach 4 hpi signifikant gegenüber den Kontrollen ab. Der durch die PET-Hemmung entstehende Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) kann das D1-Protein oxidativ schädigen. Gleichzeitig sinkt die Expression des DS9-Proteins, welches vermutlich eine wichtige Rolle im Reparaturzyklus von oxidativ geschädigten D1-Proteinen spielt. Somit kann die PS II-Aktivität in Chloroplasten nicht wiederhergestellt werden und es wird vermutet, dass hierdurch die für das Überleben der Zellen notwendige Homöostase gestört wird und es hierdurch zu einer Beschleunigung der HR kommt. Während der Interaktion von TMV mit dem suszeptiblen Kultivar *N. tabacum* L. cv Xanthi konnte keine Abnahme der DS9-Transkripte und auch keine HR beobachtet werden.

Eine deutliche Reduktion der Photosynthese (Stoma-abhängig und -unabhängig) wie sie bei SNN zu verzeichnen ist (Abbildung 4-9 A-C) vermindert den Export von Triosephosphaten aus den Chloroplasten (s.o.). Diese Export-Reduktion hat drastische Auswirkungen auf die metabolische Balance im Cytosol. Im Cytosol ist Fructose-2,6-bisphosphat (Fru2,6BP) während der Lichtperiode ein Signal für die Verfügbarkeit von Photoassimilaten. Der Gehalt an Fru2,6BP steigt an, wenn weniger Triosephosphate aus dem Chloroplasten ins Cytosol exportiert werden und umgekehrt. Verantwortlich hierfür ist die Fructose-6-phosphat-2-Kinase, welche durch Dihydroxyacetonphosphat gehemmt wird und die Umsetzung von Fructose-6-Phosphat zu Fru2,6BP katalysiert. Auch eine gesteigerte respiratorische Aktivität führt zur Erhöhung des Fru2,6BP-Gehaltes im Cytosol. Ein solcher Anstieg konnte unter anderem während einer verletzungsbedingten Stimulierung der Atmung beobachtet werden [Stitt (1990)] und ist vermutlich auch bei der infektionsbedingten Steigerung der Respiration bei SNN zu erwarten (Abbildung 4-6 A). Hohe Fru2,6BP-Gehalte inaktivieren die cytosolische Fructose-1,6-bisphosphatase, einem Enzym welches an der Saccharosesynthese beteiligt ist, und aktivieren die Pyrophosphat-abhängige (PPi) Phosphofruktokinase (PFK). Dieses Enzym spielt im pflanzlichen Stoffwechsel eine besondere Rolle, da es den Kohlenstoff-Fluss zwischen den cytosolischen Triose-P- und Hexose-P-Pools ermöglicht [Hatzfeld *et al.* (1990)]. Da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion immer nahezu im Gleichgewicht ist, werden sowohl Geschwindigkeit als auch Richtung der Stoffflüsse, dem jeweiligen Bedarf der Zelle genau angepasst. Ein erhöhter Bedarf des cytosolischen OPPP an Glucose-6-P aus dem Hexose-P-Pool könnte also auch durch eine aktivierte PFK aus dem Triose-P-Pool gedeckt werden. Der cytosolische OPPP ist, wie im Folgenden diskutiert, von entscheidender Bedeutung für die Abwehr-induzierte Produktion von H_2O_2 .

Mit Hilfe des Mikro-Imaging-Systems (vgl. Kapitel 3) konnten außerdem Einblicke in die **zelluläre Lokalisation der Photosynthesehemmung** während der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* gewonnen werden. Es zeigte sich, dass nicht nur die pflanzlichen Abwehrreaktionen, sondern auch die vorhergehende Hemmung der Photosynthese hochlokalisiert auftreten und sich nicht auf direkt benachbarte Zellen ausbreiten (Abbildung 4-19 F). Nicht-infizierte Zellen mit hoher Photosyntheserate können direkt an infizierte Zellen, die bereits eine deutliche Reduktion der photosynthetischen Aktivität zeigen, angrenzen. Diese Beobachtung zeigt, dass sowohl die Induktion von Abwehrprozessen (Abbildung 4-19 G), als auch das Abwehr-induzierte Abschalten der Photosynthese (Abbildung 4-19 F) in einzelnen infizierten Zellen stattfindet und der Stoffwechsel nicht-infizierter Nachbarzellen von diesen Umstellungen nicht beeinflusst wird. Voraussetzung für diese klare Trennung infizierter und nicht-infizierter Zellen ist eine radikale metabolische Versiegelung des Abwehrbereichs, wodurch eine Versorgung der Abwehr-Zellen durch gesunde Zellen zwar erschwert, jedoch eine ressourcenschonende Abwehr ermöglicht wird. Ein koordiniertes Zusammenspiel von Abwehr-induzierter Callosebildung und apoplastischer Invertase könnte für eine solche metabolische Abschottung der Abwehr-Zellen verantwortlich sein (siehe Kapitel 5.2).

Zu späteren Infektionszeitpunkten, wenn die Photosynthese bereits deutlich reduziert ist, zeigen infizierte Zellen unter UV-Anregung eine hellgelbe Fluoreszenzemission (Abbildung 4-19 F und G). Diese Autofluoreszenz stammt wahrscheinlich von Lignin und Lignin-artigen Strukturen in infizierten Zellen stammen und ist ein guter Indikator für den beginnenden hypersensitiven Zelltod [Moerschbacher *et al.* (1990), Tiburzy & Reisener (1990)]. Andere Zellen in denen zu diesem Zeitpunkt die Photosynthese erst leicht reduziert ist weisen diese Fluoreszenz jedoch (noch) nicht auf. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Photosynthese während der Abwehrreaktion von SNN vollständig unterdrückt werden muss, bevor die abschließenden Schritte der Abwehrreaktion anlaufen und der Zelltod ausgelöst werden kann. Offenbar sind photoautotrophe Mesophyllzellen während der Abwehr so reguliert, dass sowohl die Initiation der Zellwandverstärkung durch Lignin und Lignin-artige Stoffe, wie auch der abschließende hypersensitive Zelltod einen heterotrophen Zellstoffwechsel erfordern.

Die Bedeutung der Photosynthesehemmung für die Initiierung einer erfolgreichen Abwehr wird besonders im Vergleich zu dem **suszeptibleren Tabakkultivar Xanthi** deutlich. Während der ersten 12 hpi ist bei Xanthi nur ein leichtes, maximal 30 %iges, infektionsbedingtes Absinken der photosynthetischen Aktivität zu beobachten (Abbildung 4-10 A und C). Die genaue Ursache für diese Hemmung konnte bei diesem Tabakkultivar jedoch noch nicht genauer eingegrenzt werden. Eine Stoma-abhängige Depression der CO₂-Fixierung bleibt bei diesem Kultivar völlig aus (Abbildung 4-10 B und C). Selbst nach 24 bzw. 48 hpi ist der 'Gesamt-PET' zwar um ca. 50% erniedrigt, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt nach Infektion eine vollständiges Abschalt-

ten der Photosynthese wie bei SNN beobachtet werden (Abbildung 4-10 D). Das Aufrechterhalten einer konstanten, wenngleich häufig geschwächten Photosynthese über einen längeren Zeitraum nach erfolgter Infektion konnte bereits an verschiedenen anderen kompatiblen Wirt-Pathogen-Interaktionen beobachtet werden [Coghlan & Walters (1992); Lorenzini *et al.* (1997); Niederleitner & Knoppik (1997); Wright *et al.* (1995)]. Vor allem bei biotrophen Interaktionen ist es für das Pathogen lebensnotwendig, die Eigenversorgung mit Photoassimilaten aufrecht zu erhalten, um seinen Lebenszyklus abschließen zu können. Das Pathogen stellt in diesen Fällen ein zusätzliches Kohlenhydrat-’Sink’ dar welches mit der Pflanze um die Photoassimilate konkurriert. Bei kompatibel-biotrophen Interaktionen kann es daher im umgebenden Gewebe sogar zu einer Stimulation der Photosynthese kommen und es bilden sich sog. ’grüne Inseln’ um die Infektionsstelle herum, die die Versorgung des Pathogens sicherstellen [Coghlan & Walters (1992)].

Bei Xanthi findet zu frühen Zeitpunkten nach Infektion mit *P. nicotianae* keine Akkumulation von H_2O_2 am Infektionsort statt (Abbildung 4-5). Da bei dieser Interaktion auch kein Verschließen der Stomata am Infektionsort zu beobachten ist (Abbildung 4-10 B), ist ein kausaler Zusammenhang zwischen H_2O_2 -Bildung und Stomaschluss denkbar (s.o.). Erste Beobachtungen an N-Acetyl-Glucosamin-6-Phosphat (N-Glc6P) -behandelten Infektionsorten von SNN zeigen, dass der Stomaschluss bei einer Hemmung des OPPP abgeschwächt wird. N-Glc6P ist ein kompetitiver Hemmstoff der G6PDH und führt nach Applikation zu pflanzlichen Zellen dazu, dass cytosolische wie auch stromale G6PDH und somit die Eingangsreaktion des OPPP gehemmt wird [Glaser & Brown (1955)]. Dies erhärtet die Annahme, dass ein Zusammenhang zwischen H_2O_2 -Bildung und Stomaschluss bestehen könnte, jedoch müssen weitere Versuche diese Hypothese experimentell bestätigen.

In der jüngeren Vergangenheit haben sich verschiedene Arbeiten mit der Rolle des Lichts während der pflanzlichen Pathogenabwehr befasst. Jedoch sind die Daten noch nicht eindeutig, zum Teil sogar widersprüchlich. Während Zeier *et al.* (2004) eine Schwächung vieler Abwehrreaktionen – so auch der Ausbildung hypersensitiver Läsionen – bei Dunkelheit beobachten konnten, postulieren Mateo *et al.* (2004), dass weder die pflanzliche Pathogenabwehr, noch die hypersensitive Reaktion Licht benötigen. Auch die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten sprechen dafür, dass bei Licht und optimal ablaufenden photosynthetischen Prozessen das Anlaufen der pflanzlichen Abwehr erschwert wird, möglicherweise sogar vollkommen unterbunden würde. Erste Experimente in denen die Infektion von SNN mit *P. nicotianae* während der Dunkelperiode durchgeführt wurde deuten darauf hin, dass die Abwehrreaktion, insbesondere das Auftreten hypersensitiver Läsionen deutlich schneller erfolgt als im Licht (Daten nicht gezeigt). Eine solche Beschleunigung der pflanzlichen Abwehr in der Dunkelperiode würde das hier beschriebene Konzept stützen, in dem der erfolgreichen Abwehr eine Umstellung des autotrophen pflanzli-

chen 'Source'-Stoffwechsels, insbesondere eine Hemmung der Photosynthese, vorausgehen muss.

Die vorgestellten Ergebnisse deuten stark darauf hin, dass das Abschalten der Photosynthese die pflanzliche Abwehr nicht nur begleitet oder gar nur eine Folge des hypersensitiven Zelltods ist, sondern möglicherweise eine wichtige Voraussetzung für die Etablierung des Abwehrstoffwechsels darstellt. Erst durch die reduzierte photosynthetische Aktivität in infizierten 'Source'-Zellen kann ein heterotropher Zellstoffwechsel etabliert werden, welcher eine zentrale Rolle bei der Pathogenabwehr spielt.

5.2 Metabolische Versiegelung des Infektionsorts

Wie bereits im vorhergehenden Kapitel diskutiert, ist der Rückgang der Photosynthese ein hoch-lokaler Prozess, der in einzelnen infizierten Mesophyllzellen stattfindet. Diese Umstellung wird vermutlich durch die Schaffung eines 'Hoch-Zucker-Status' in infizierten Zellen begünstigt. Um diese Situation zu etablieren und den Abfluss von Kohlenhydraten zu unterbinden ist eine effiziente metabolische Versiegelung dieser Zellen eine notwendige Voraussetzung.

Ausdifferenzierte 'Source'-Zellen sind in hohem Maße über Plasmodesmata miteinander vernetzt und bilden ein symplastisches Kontinuum [Ding *et al.* (1992)] in dem ein hocheffizienter symplastischer Stofftransport gewährleistet ist. In ausdifferenzierten 'Source'-Blättern kommen häufig verzweigte Plasmodesmata vor, welche während der Blattentwicklung durch die Bildung von Brücken aus einfachen Plasmodesmata entstanden sind [Oparka *et al.* (1999); Roberts *et al.* (2001)]. Viele endogene cytoplasmatische Moleküle und Pflanzenviren nutzen den cytoplasmatischen Raum zwischen Desmotubulus und Plasmamembran, die sog. cytoplasmatischen Röhre [Esau & Thorsch (1985)], um sich von einer Zelle zur nächsten zu bewegen [Lucas & Wolf (1993); Epel (1994); Kragler *et al.* (1998)]. Es wurde jedoch auch bereits von einem Stoffaustausch über den Desmotubulus berichtet wurde [Cantrill *et al.* (1999)]. Aus Studien über die Ausbreitung verschiedener mikroinjizierter Farbstoffe und Fluoreszenzsonden konnte abgeleitet werden, dass der Stofftransport über die Plasmodesmata wahrscheinlich vorwiegend über Diffusion erfolgt und unabhängig von cytoplasmatischen Strömungen ist [Barclay *et al.* (1982), Tucker *et al.* (1989)]. Plasmodesmata sind keine einfachen Poren die die Zellwände benachbarter Zellen durchqueren, sondern Kanäle deren Architektur als Antwort auf eine Reihe externer und interner Stimuli dynamisch reguliert werden kann [Van Bel & Oparka (1995), Radford *et al.* (1998), Lucas (1999), Lee *et al.* (2000)]. Daher kann eine Blockade des apoplastischen Transportwegs durch eine aktivierte apoplastidäre Invertase den Saccharose-Export aus infizierten 'Source'-Zellen zwar reduzieren, jedoch nicht völlig unterbinden.

Eine der frühesten Reaktionen von SNN auf die Infektion mit *P. nicotianae* ist die **Bildung von Callose im Infektionsbereich**. Die erste detektierbare Callosebildung (ab 0,5 hpi) tritt bei SNN

ausschließlich an distinkten Bereichen der Kontaktzonen infizierter Zellen, den sog. Zellplatten, auf (Abbildung 4-13 A und Abbildung 4-14). Die deutliche Trennung zwischen den Calloseeinlagerungen der Nachbarzellen (weiße Pfeile in Abbildung 4-14) spricht stark dafür, dass es in dem hier vorgestellten Untersuchungssystem zu einer Calloseeinlagerung in der Halsregion der Plasmodesmata und hierdurch zu einer Verringerung der plasmodesmalen Ausschlussgröße kommt (siehe Abbildung 5-1). Durch den Verschluss der Plasmodesmata kommt es zu drastischen Einschränkungen im interzellulären Transport von niedermolekularen Stoffen, Ionen und Kohlenhydraten [Olesen & Robards (1990)]. Die Öffnungsweite der Plasmodesmata ist unter anderem von der Aktivität 1-3- β -Glucan Synthetase und der 1-3- β -D-Glucanase abhängig, welche beide um die Plasmodesmata herum lokalisiert sind und für die Callose-Synthese bzw. -Degradation verantwortlich sind [Robards & Lucas (1990), Lucas *et al.* (1993)]. Vermutlich kommt es bei dem hier untersuchten Pathosystem bereits kurz nach Infektionsbeginn zu einem Verschluss der Plasmodesmata über die in der Umgebung vorhandene 1-3- β -Glucan Synthetase und somit zu einer Abtrennung infizierter Zellen vom restlichen pflanzlichen Symplasten.

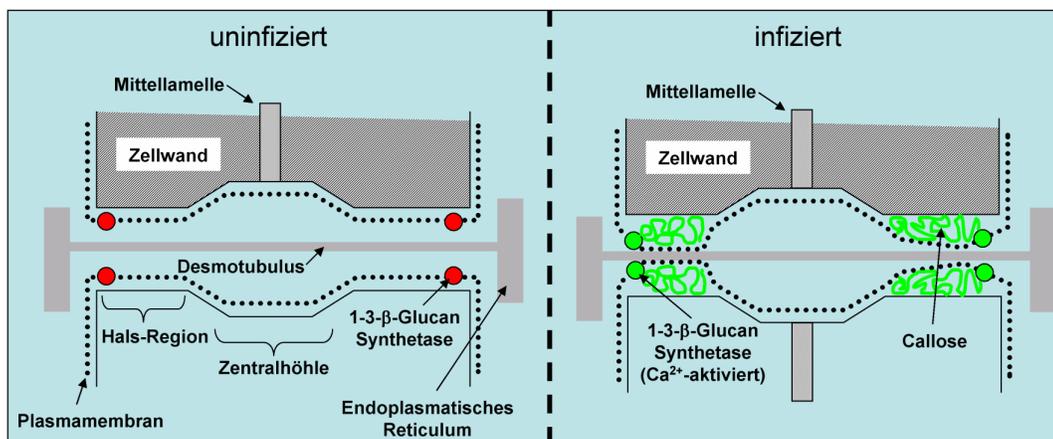


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung eines Callose-bedingten Verschlusses von Plasmodesmata in Tabakblättern nach Infektion mit *P. nicotianae*. Aufbau eines Plasmodesmos vor ('uninfiziert'); und nach dem Verschluss durch Ca^{2+} -induzierte Bildung von Callose ('infiziert').

Es ist bekannt, dass ein Anstieg des intrazellulären Calcium-Levels ein Signal für die Aktivierung der Plasmamembran-ständigen 1-3- β -Glucan Synthetase an den Plasmodesmata darstellt [Kauss (1996)]. Durch Injektion von IP_3 , einem 'second messenger' welcher direkt den intrazellulären Calcium-Level aus endogenen Calcium-Vorräten erhöht, kann ein Verschluss der Plasmodesmata hervorgerufen werden [Tucker (1988, 1990), Clarke (1996); Tucker and Boss (1996)]. Die frühzeitige Synthese von Callose ist also eine zelluläre Abwehrreaktion die durch eine Störung der interzellulären Calcium-Homöostase verursacht wird [Kartusch (2003)]. Eine solche Störung kann durch die Applikation des *Phytophthora*-Elicitors Cryptogein in Tabakzellen auch artifiziell ausgelöst werden [Tavernier *et al.* (1995)]. Neben der Callosebildung in

der Halsregion sind auch Ca^{2+} -sensitive, kontraktile Elemente am schnellen Verschluss der Plasmodesmata beteiligt [Sivaguru et al (2000)], so dass eine Abwehr-induzierte Abschottung infizierter Zellen über zwei unabhängige Maßnahmen gesichert werden könnte. Die Annahme, dass der Verschluss der Plasmodesmata als Antwort auf abiotischen und biotischen Stress in Zusammenhang mit der Bildung von Callose erfolgt, konnte bereits durch Experimente mit spezifischen Inhibitoren bestätigt werden [Radford *et al.* (1998)].

In einer Reihe von Untersuchungen wurde die Rolle der Callose beim Unterbinden der systemischen Ausbreitung phytopathogener Viren, welche zur Verbreitung häufig die Plasmodesmata nutzen, näher betrachtet [Botha & Cross (2000)]. Außerdem blockiert Callose die Plasmodesmata in Wurzeln von Sojabohnen während der Infektion mit *P. sojae* [Enkerli *et al.* (1997)]. Die Bildung von Callose konnte auch an Kontaktstellen pflanzlicher Zellen mit Strukturen pilzlicher Pathogene beobachtet werden [Rodriguez-Gálvez & Mendgen (1995)]. Gezielte Callosebildung kann ein Eindringen Pathogen-spezifischer Infektionsstrukturen in die pflanzliche Zellewand und somit die Nährstoffaufnahme des Pathogens verhindern. Hierzu bilden sich in der pflanzlichen Zellwand callosehaltige Papillen unter eindringenden pilzlichen Infektionsstrukturen (Appressorien oder Haustorien) und verhindern die Penetration der Wirtszelle [Schlösser (1983)]. Calloseeinlagerungen können jedoch in manchen Pathosystemen die Nährstoffaufnahme des Pathogens verbessern und möglicherweise auch die Erkennung des Pathogens durch die Wirtspflanze verhindern [Jacobs *et al.* (2003)]. Zudem konnten Nishimura *et al.* (2003) zeigen, dass Arabidopsis-Transformanten mit einem Defekt in der Callose-Synthese nicht, wie zunächst angenommen erniedrigte, sondern eine höhere Pathogenresistenz aufwiesen, als der Wildtyp.

Die in dem hier untersuchten Pathosystem beobachteten Reaktionen deuten stark auf eine weitere, bislang noch nicht diskutierte Rolle der Callose während der frühen Phase der pflanzlichen Abwehr hin. Es scheint, dass die frühe Synthese von Callose an den Plasmodesmata infizierter Zellen eine wichtige Rolle als symplastische Transportbarriere in infizierten Mesophyllzellen spielen könnte. Eine schnelle Versiegelung des symplastischen Transportwegs für Kohlenhydrate könnte in infiziertem 'Source'-Gewebe notwendig sein, um für die Abwehr benötigte Metabolite zurückzuhalten und schnell verfügbar zu machen. Andererseits kommt es durch diese metabolische Abschottung zu einer massiven Anreicherung von Kohlenhydraten in infizierten Zellen, welche auch einem erfolgreich eingedrungenen Pathogen zur Verfügung stünden. Für eine erfolgreiche Pathogenabwehr muss daher das Eindringen des Pathogens in die ‚Abwehrzellen‘ unter allen Umständen verhindert werden. Ein solcher unspezifischer Schutz vor eindringenden Infektionsstrukturen könnte durch die später gebildete Callose, welche nahezu die gesamte Abwehrzelle umgibt, gewährleistet werden (s.u.).

Neben dem symplastischen Transport von Photoassimilaten spielt bei Tabak der apoplastische Transportweg eine zentrale Rolle beim Export von Kohlenhydraten [Gottwald *et al.* (2000)]. Für

ein Unterbinden des Kohlenhydrat-Exports aus den infizierten Zellen muss also auch dieser Transportweg effizient versiegelt werden. Auch hier könnte die schnelle Callosebildung an den Zellplatten eine zentrale Rolle spielen. Bereits nach 1 hpi ist der Apoplast an den Kontaktbereichen infizierter Zellen nahezu vollständig mit Callose versiegelt (Abbildung 4-12 D, Abbildung 4-13 B, Abbildung 4-14 B, Abbildung 4-15). Selbst das kleine und relativ stabile H_2O_2 -Molekül, welches im Apoplasten infizierter Zellen gebildet wird, kann diese Callose-Barriere an den Zellplatten offensichtlich nicht passieren (Abbildung 4-17 A und B). Dieses ist ein weiterer guter Hinweis für die metabolische Versiegelung des Infektionsbereichs und unterstreicht die Rolle der Callose bei der Begrenzung des Abwehrbereichs. Ein apoplastidärer Transport größerer Moleküle, wie Saccharose, ist daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls auszuschließen. Bereits Sivaguru *et al.* (2000) konnten zeigen, dass durch eine Al-induzierte Callosebildung sowohl der symplastische wie auch der apoplastidäre Transport in Maiswurzeln effizient blockiert wird. Bei SNN ist nach ca. 2-3 hpi auch im übrigen Apoplasten infizierter Zellen eine zunächst diskrete, sich jedoch von den primären Bildungsorten immer stärker ausdehnende, Callosebildung zu erkennen, welche sich diffus über die gesamte Zellwand ausbreitet (Abbildung 4-12 E und F, Abbildung 4-13 C und D). Dieses Phänomen konnte auch nach der Elicitierung von SNN mit zellfreiem Kulturfiltrat von *P. nicotianae* beobachtet werden (Abbildung 4-13 F), so dass ausgeschlossen werden kann, dass es sich hierbei alleinig um die Abwehrbedingte Bildung von Papillen handelt. Vielmehr könnte diese Calloseeinlagerung eine generelle Zellwandverstärkung darstellen, welche ein Eindringen von Pathogenen in die Bereiche mit hohem Kohlenhydratgehalt verhindern könnte.

Auch im suszeptiblen Tabakkultivar **Xanthi** kommt es zu einer infektionsbedingten **Bildung von Callose** im Infektionsbereich, jedoch setzt die Callosebildung (Abbildung 4-16) etwa 3 – 6 Stunden später ein als beim hochresistenten SNN. Diese führt möglicherweise zu einem verzögerten Zurückhalten der Photoassimilate am Infektionsort und somit zu einem verspäteten Anlaufen zellulärer Abwehrreaktionen. Hierdurch könnte es dem Pathogen möglich sein die Wirtszellwand vor Abschluss dieser Abwehrreaktion zu durchdringen, Nährstoffe aufzunehmen und seine Entwicklung fortzusetzen [Schlösser (1983)].

Die hier präsentierten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass die frühe Abwehrinduzierte Callosebildung bei SNN den symplastischen Export von Molekülen aus einzelnen infizierten Mesophyllzellen unterbindet. Darüber hinaus wird auch der apoplastische, und somit auch der Gesamtexport von Saccharose aus infizierten Blättern drastisch reduziert (Abbildung 4-18 A). Der später einsetzenden Akkumulation von Callose in der gesamten Zellwand infizierter Zellen könnte eine generelle Schutzfunktion zukommen, welche die abwehrbereiten und kohlenhydratreichen Zellen vor dem Eindringen des Pathogens schützen sollen.

Der beobachtete Anstieg des apoplastischen Saccharose-Gehalts bei SNN (Abbildung 4-18 B)

wird von einer Stimulation der Aktivität der **apoplastidären Invertase** begleitet (Abbildung 4-18 D). Ein ähnlicher Aktivitätsanstieg konnte auch nach Elicitierung von SNN-source-Blättern mit NPP1 (mündl. Mitteilung Dipl. Biol. Jutta Essmann) oder einem sporenfreien Kulturfiltrat von *P. nicotianae* (Abbildung 4-18 D) beobachtet werden. NPP1 ist ein Nekrosen-auslösendes Phytophthora Protein mit strukturellen Homologen in Pilzen und Bakterien [Fellbrich *et al.* (2002)]. Auch nach viraler Infektion von Tabak [Herbers *et al.* (2000)], nach Infektion von Weizen mit Weizenschwarzrost (*Puccinia graminis*) [Heisterüber (1993), Heisterüber *et al.* (1994)] oder nach Infektion von Kichererbse mit *Ascochyta rabiei* [Esfeld (2000)], konnte ein Anstieg der apoplastischen Invertase-Aktivität beobachtet werden. Eine Steigerung der Invertase-Aktivität scheint daher eine weit verbreitete pflanzliche Reaktion auf Pathogenbefall darzustellen. Die hier durchgeführten Elicitorstudien legen außerdem nahe, dass der größte Teil der Aktivitätssteigerung in dem hier untersuchten Pathosystem auf pflanzliche Invertasen zurückzuführen ist.

Während der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* ist bereits nach 0,5 hpi ein Anstieg des Transkriptlevels der apoplastidären Invertase (apoINV) zu beobachten (Abbildung 4-18 C), jedoch ist der zu beobachtende frühe Anstieg der Invertase-Aktivität (Abbildung 4-18 D) vermutlich nicht ausschließlich hierüber zu erklären. Möglicherweise wird der erste Anstieg der Invertase-Aktivität auch von einer Saccharose-abhängigen Aktivierung konstitutiv vorhandener, jedoch deaktivierten, Invertase hervorgerufen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass im Apoplasten von Tabak ein Inhibitorprotein vorliegt welches in Abwesenheit von Saccharose feste Komplexe mit der apoINV bildet [Weil *et al.* (1994), Krausgrill *et al.* (1996)]. Sander *et al.* (1996) konnten darüber hinaus zeigen, dass die apoINV in Tabak durch die Zugabe von Saccharose vor der Deaktivierung durch dieses Inhibitorprotein geschützt wird und die Aktivität der apoINV durch 20 mM Saccharose um etwa 100% gesteigert werden kann.

Die vorgestellten Daten der Callosebildung und der Invertase-Aktivität bei SNN deuten auf ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Stoffwechselwege, um eine effiziente metabolische Versiegelung des Abwehrbereichs zu etablieren. In der frühen Abwehrphase (0 – 0,5 hpi) **blockiert Callose die Plasmodesmata** und unterbindet hierdurch vermutlich den symplastischen Export von Kohlenhydraten aus infizierten Zellen. Im Folgenden (0,5 – 2 hpi) breiten sich die **Calloseeinlagerungen in den Zellplatten** aus und vermindern wahrscheinlich auch den apoplastidären Stofftransport aus dem Infektionsbereich. Hierdurch kommt es zu einem **Anstieg des Saccharose-Gehalts** im Apoplasten infizierter Zellen, wodurch sich möglicherweise ein Inhibitorprotein von der **apoplastidären Invertase** ablöst [Sander *et al.* (1996)] und die **Aktivität der Invertase ansteigt**. Die aus der Saccharosespaltung entstehenden Hexosen können in die infizierten Zellen zurücktransportiert werden und dienen hier als Brennstoff für die anlaufenden Abwehrreaktionen und könnten über das 'sugar-sensing' wiederum eine verstärkte **Ex-**

pression der apoplastidären Invertase (Abbildung 4-18 C) und anderer PR-Proteine induzieren (Abbildung 4-3 B). Es ist auch vorstellbar, dass ein Teil der exportierten Saccharose aufgrund der einsetzenden Callosebildung nicht bis in den Apoplasten gelangt, sondern direkt in der infizierten Zelle verbleibt. Hier könnte sie über die Saccharose-Synthase und UDP-Glucose-Phosphorylase in Fructose und Glucose-1-Phosphat umgewandelt werden. Glucose-1-Phosphat könnte wiederum durch Phosphoglucomutase in Glucose-6-Phosphat umgesetzt werden, welches dem OPPP und somit der pflanzlichen Abwehr zur Verfügung stünde. Der apoplastidären Invertase könnte eine wichtige Rolle für das Zurückhalten jener Saccharosemoleküle zukommen, welche nicht durch die Callose-Barriere gestoppt werden und bis in den Apoplasten gelangen. Die genannten Änderungen und ihre möglichen Folgen sind in Abbildung 5-2 schematisch dargestellt.

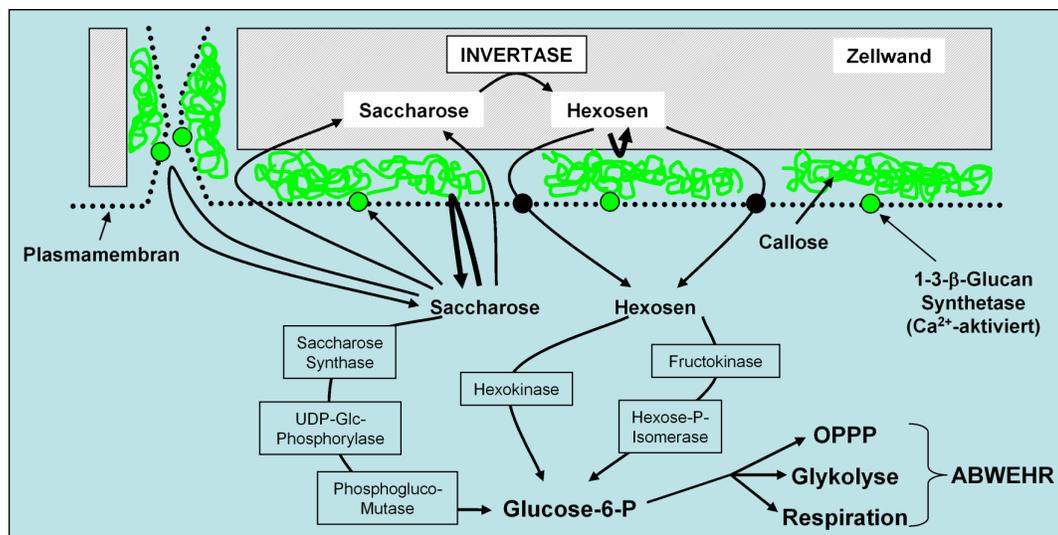


Abbildung 5-2 Hypothetisches Schema der späteren (ca.2 – 6 hpi), Abwehr-induzierten Callosebildung während der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* und der daraus resultierenden metabolische Abschottung einer Abwehrzelle im Zusammenspiel mit der apoplastischen Invertase.

Die verstärkte Anreicherung von Kohlenhydraten an der Infektionsstelle dient aber nicht ausschließlich als Brennstoff für die Zucker-verbrauchenden Reaktionen wie Glykolyse oder OPPP. Es ist gut untersucht, dass Kohlenhydrate ebenfalls die Expression von 'Sink'- und 'Source'-spezifischen, sowie abwehr-induzierbaren Genen reguliert. Hohe Zucker-Konzentrationen unterdrücken die Expression 'Source'-spezifischer Gene – wie z.B. Photosynthesegenen – und verstärken gleichzeitig die Transkription vieler 'Sink'-typischer Gene [Rolland *et al.* (2002)]. Daher könnte eine frühe Akkumulation von Kohlenhydraten am Infektionsort für eine selbstverstärkende Stimulierung der metabolischen Umsteuerung sorgen. Eine solche positive, vorwärts gerichtete Stimulation spiegelt sich gut in der Zweiphasigkeit der Abwehr-induzierten Invertase-Aktivität und der apoplastidären Hexosegehalte wieder (Abbildung 4-18 B, D und E). Wie bereits erwähnt, führt die Anreicherung von löslichen Hexosen zu einer gesteigerten Ex-

pression von PR-Proteinen und erhöht die pflanzliche Resistenz gegenüber Pathogenen [Herbers *et al.* (1996a), Herbers *et al.* (1996b), Herbers *et al.* (2000)]. Auch in dem hier untersuchten Pathosystem zeigte SNN einen deutlichen Anstieg im Transkriptlevel des PR-Proteins PR-Q (Abbildung 4-3 B). Das Tabakkultivar SNN zeigt daher zwei grundsätzliche Reaktionen auf die Abwehr-induzierte Akkumulation von löslichen Kohlenhydraten am Infektionsort. Zum einen wird eine schnelle metabolische Umstellung des Zellstoffwechsels ausgelöst, zum anderen wird eine längerfristige Anpassung der Stoffwechselsituation über Änderungen der Genexpression vorgenommen, wobei einer langfristigen Anpassung, in Anbetracht des nahenden Zelltods, wahrscheinlich eine untergeordnete Rolle zukommt.

5.3 Die Rolle des OPPP während der Abwehr

Üblicherweise führt das Anlaufen der hypersensitiven Reaktion zum Absterben der betroffenen Pflanzenzellen. Die Prozesse der HR sind mit einem hohen Bedarf an Energie, Reduktionsäquivalenten und Vorstufen für Biosynthesen verbunden, weshalb OPPP, Atmung und Shikimatweg in infiziertem Gewebe oftmals stimuliert sind [z.B. Scheideler *et al.* (2002)]. Die Reaktionen des cytosolischen OPPP, im speziellen die Oxidation von cytosolischen Hexose-Phosphaten durch die cytosolische G6PDH, versorgen die Plasmamembran-Oxidasen, welche für die Produktion Abwehr-induzierter ROS zuständig sind, mit Reduktionsäquivalenten [Pugin *et al.* (1997)]. Hingegen stellt der stromale OPPP Erythrose-4-P (Ery-4-P) für den Shikimatweg zur Verfügung. Das hierfür außerdem benötigte Phosphoenolpyruvat (PEP) entstammt der Glykolyse, deren Ablauf ebenfalls eine Voraussetzung für die respiratorische Bereitstellung von ATP darstellt. Die Aktivierung von stromalem und cytosolischem OPPP ist demnach eine wichtige Voraussetzung für viele Abwehr-induzierte Prozesse, wie z.B. der ROS-Produktion und der Synthese von Abwehrsubstanzen, wie Lignin oder anderen Phenylpropanoiden (z.B. Flavonoide, Stilbene). Eine unabdingbare Voraussetzung für das Anlaufen eines solchen heterotrophen Abwehrstoffwechsels in ausdifferenzierten 'Source'-Zellen im Licht ist das Abschalten der Photosynthese. Eine solche Hemmung der Photosynthese wird bei SNN in zwei Phasen realisiert (siehe Kapitel 5.1).

Die im vorigen Abschnitt diskutierte metabolische Versiegelung des Infektionsorts führt zu einem Rückstau von Kohlenhydraten in den betroffenen Zellen. Die aus der Invertasereaktion stammenden löslichen Hexosen im Apoplasten können über zellmembranständige Hexose-Transporter effizient in die infizierten Zellen re-importiert werden und dienen hier zur Versorgung verschiedener Stoffwechselwege wie Glykolyse, Atmung und OPPP (vgl. Abbildung 1-2 und Abbildung 5-2). In 'Source'-Zellen sind diese Stoffwechselwege jedoch normalerweise herabreguliert, um ein sog. 'futile-cycling' der Photoassimilate zu verhindern [Scheibe (1991)]. Während der beginnenden pflanzlichen Abwehr wird diese Regulation jedoch vollständig um-

gekehrt. Die Photosyntheserate infizierter 'Source'-Blätter sinkt deutlich ab (Abbildung 4-9 A bis C), während 'Sink'-typische Stoffwechselwege wie die Respiration (Abbildung 4-6 A) und die Aktivität der G6PDH (Abbildung 4-6 B), verstärkt sind. Besonders anschaulich wird diese gegenläufige Regulation von Photosynthese und der Aktivität des OPPP bei einem Vergleich der Induktionsbilder (Abbildung 4-6 C) und den Bildern der PET-Aktivität (Abbildung 4-9 A und B). Die massive Steigerung der photosynthetischen Induktion im Infektionsbereich (Abbildung 4-6 C und Abbildung 4-19 B) ist ein sehr guter Indikator für eine Zunahme der stromalen OPPP-Metabolite, welche beim Anlaufen der Photosynthese in den Calvin-Zyklus eingespeist werden. Es ist jedoch zu beachten, dass mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht zwischen cytosolischem und stromalen OPPP differenziert werden kann. Eine genauere Unterscheidung von stromalem und cytosolischem OPPP ist Gegenstand aktueller Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe. Die Metabolite des OPPP können über Triose-Phosphat Carrier, die in der inneren Hüllmembran der Chloroplasten lokalisiert sind, zwischen Cytosol und Stroma ausgetauscht werden, wodurch ein Äquilibrieren zwischen diesen Kompartimenten ermöglicht wird [Flügge (1999)]. Im Chloroplastenstroma teilen sich OPPP und Calvin-Zyklus eine Reihe von Metaboliten [Schnarrenberger *et al.* (1995)]. Daher sollte eine Steigerung der OPPP-Aktivität im Dunkeln zu einer Erhöhung des stromatären Gehalts von OPPP-Metaboliten führen. Zu Beginn der Lichtperiode stehen diese Metabolite dem Calvin-Zyklus direkt zur Verfügung und die Induktion der Photosynthese nach einer Dunkelperiode kann beschleunigt erfolgen. Eine schnelle photosynthetische Induktion wurde in Wachstumszonen junger Tabakblätter beobachtet, wo sie die Kohlenhydrat-verbrauchenden 'Sink'-Zonen markieren, die einen hohen Gehalt an OPPP-Metaboliten aufweisen [Meng *et al.* (2001)].

Einen weiteren Hinweis auf eine gesteigerte Aktivität des cytosolischen OPPP am Infektionsort gibt die Abwehr-induzierte Bildung von H_2O_2 (Abbildung 4-3 A), da die hierfür notwendigen Plasmamembran-Oxidasen über diesen Stoffwechselweg mit Reduktionsäquivalenten versorgt werden [Pugin *et al.* (1997)]. Möglicherweise spielt diese Versorgung eine zentrale Rolle in der pflanzlichen Pathogenabwehr, da dieser Prozess z.B. die Zellwandverstärkung und möglicherweise den hypersensitiven Zelltod initiiert. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die ROS-Akkumulation eine der ersten zu beobachtenden Abwehr-korrelierten Reaktionen in dem hier untersuchten Pathosystem ist und bis zum Abschluss der HR auf hohem Niveau gehalten wird (Abbildung 4-3 A). Ein solches Aufrechterhalten der ROS-Produktion über einen Zeitraum von mindestens 12 Stunden erfordert von der Pflanze die Bereitstellung großer Mengen von Reduktionsäquivalenten und Kohlenhydraten. Ein schneller Verbrauch der Reduktionsäquivalente würde wiederum den cytosolischen OPPP aktivieren, um, in Verbindung mit der F-2,6-BP-kontrollierten und PP_i -abhängigen PFK, die NADPH-generierenden Reaktionen aufrecht zu erhalten. Auch in anderen Kompartimenten infizierter Pflanzenzellen findet eine Anreicherung

von ROS statt, die für die Abwehrreaktion eine wichtige Rolle spielen könnten. So können z.B. die Mitochondrien eine vollkommen unabhängige Quelle von H_2O_2 sein [Tiwari *et al.* (2002)], insbesondere durch eine stimulierte Respiration, wie sie auch in dem hier untersuchten Pathosystem zu finden ist (Abbildung 4-6 A).

Diese Bedeutung der OPPP-Aktivierung für die pflanzliche Abwehr konnte außerdem durch weitere Experimente gestützt werden. Durch die Zugabe von N-Glc6P und der hierdurch verursachten Hemmung der G6PDH [Glaser & Brown (1955)] in Infektionsorte von SNN konnte das Anlaufen der Abwehrreaktionen bei diesem hochresistenten Tabak um mehrere Stunden verzögert werden, abhängig von der applizierten N-Glc6P-Dosis (Abbildung 4-23 A und B, Abbildung 4-24 A und B). Diese Verzögerung beruht wahrscheinlich direkt auf einer unspezifischen Inhibierung der verschiedenen G6PDH-Isoformen und somit des cytosolischen und stromalen OPPP. Diese Hemmung spiegelt sich auch in der Induktion des photosynthetischen Elektronentransports wider (Abbildung 4-23 C). Die Applikation von N-Glc6P unterbindet offenbar die erforderliche Umstellung des Primärstoffwechsels zu einem heterotrophen Metabolismus, vermindert die Bildung und Akkumulation von H_2O_2 (Abbildung 4-25) und verzögert Abwehrreaktionen, wie z.B. die Bildung hypersensitiver Läsionen, so lange, bis die Wirkung des Hemmstoffes nachlässt. Durch die Hemmung des OPPP kann also – wenn auch nur zeitweilig – die Abwehrreaktionen eines hochresistenten Tabakkultivars unterdrückt werden, wodurch die zentrale Bedeutung der bei SNN stattfindenden Stoffwechselumstellungen untermauert wird.

Überdies konnte durch diese Experimente die Bedeutung des cytosolischen OPPP für die Abwehr-induzierte Bildung und Akkumulation von H_2O_2 in infizierten Pflanzenzellen bestätigt werden. Daher kann die von Levine *et al.* (1994) und Pellinen *et al.* (2002) postulierte Rolle von H_2O_2 bei der HR-Induktion nach Pathogenbefall auch für das hier untersuchte Pathosystem bestätigt werden. Ferner deutet sich an, dass H_2O_2 eine zentrale Rolle in der Abwehrinduktion von Pflanzen inne hat, wenngleich es bislang noch sehr umstritten ist, ob H_2O_2 eine primäre Signalfunktion besitzt, oder als 'second messenger' fungiert.

Pellinen *et al.* (2002) konnten durch die Applikation des H_2O_2 -produzierenden Glucose (Glc)/Glc-Oxidase Systems (G/GO) in Birkenblättern Zelltod und die Ausbildung HR-ähnlicher Läsionen auslösen. Dieses Ergebnis zeigt, dass H_2O_2 ein hinreichendes Signal für das Auslösen eines programmierten Zelltods darstellen könnte. Wenn H_2O_2 diese Funktion auch in dem hier untersuchten Tabakkultivar SNN innehaben sollte, wäre die schnelle Versiegelung der interzellulären Transportwege durch Callose eine notwendige Voraussetzung für eine erfolgreiche und ressourcenschonende Abwehr von Pathogenen. Das im Apoplasten infizierter Zellen akkumulierende H_2O_2 könnte sich ohne die Callose-Barriere auf nicht-infizierte Nachbarzellen ausbreiten und auch hier zu einer Induktion des HR-Programms führen. Dieser effektive Schutz gesunder Zellen vor dem H_2O_2 -Signal ist geboten, da sich ohne eine solche Diffusionsbarriere das ROS-

Signal über die Zellwand ausbreiten könnte und möglicherweise zu einer „kettenreaktionsartigen“ Initiierung der HR in intaktem Pflanzengewebe führen würde. In diesem Fall bestünde die Gefahr, dass große uninfizierte Regionen pflanzlichen Gewebes oder gar die gesamte Pflanze absterben würden.

Die an dem suszeptiblen Tabakkultivar **Xanthi** durchgeführten Messungen der PET-Induktion zeigen hingegen nur eine spät einsetzende und im Vergleich zu SNN schwache Aktivierung des OPPP (Abbildung 4-7). Hierdurch können wesentliche für eine erfolgreiche Abwehr notwendige Reaktionen, wie z.B. die H₂O₂-Bildung oder der Shikimatweg nur unzureichend mit Reduktionsäquivalenten oder Erythrose-4-Phosphat versorgt werden. Auch die Aktivität der PAL bleibt bei Xanthi während der ersten 9 hpi auf Kontrollniveau und steigt erst nach 12 hpi um ca. 100% an (Abbildung 4-8). Insbesondere eine Aktivierung des stromalen OPPP kann bei Xanthi nicht erfolgen, da bei diesem Kultivar nur eine moderate Störung der Photosynthese zu späten Infektionszeitpunkten erfolgt und die frühe Stoma-abhängige Hemmung gänzlich unterbleibt (Abbildung 4-10). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass nur bei einer rechtzeitigen Umstellung des pflanzlichen Primärstoffwechsels eine erfolgreiche Pathogenabwehr möglich ist. Die rechtzeitige Deaktivierung der Photosynthese ist wahrscheinlich eine notwendige Voraussetzung für diese Umstellungen. Die nur schwache Aktivierung des OPPP spiegelt sich bei Xanthi auch in der spät einsetzenden und nur schwach ausgeprägten Bildung und Akkumulation von H₂O₂ wider (Abbildung 4-5), da das aus dem cytosolischen OPPP stammende NADPH als Substrat für die Plasmamembran-Oxidase dient. Die möglichen Folgen des unterbundenen H₂O₂-Signals sind das nahezu vollständige Ausbleiben der Bildung hypersensitiver Läsionen (Abbildung 4-4) und eine stark abgeschwächte Aktivierung der PAL (Abbildung 4-8). Man kann bei Xanthi also nur eine wesentlich später einsetzende und bedeutend schwächere Stoffwechselumstellung von 'Source' zu 'Abwehr' beobachten, als es beim hochresistenten SNN der Fall ist. Hierdurch scheinen notwendige Voraussetzungen für eine erfolgreiche Pathogenabwehr bei diesem Tabakkultivar nicht gegeben zu sein, was sich auf die Kompatibilität bei der Interaktion mit *P. nicotianae* auswirkt.

Weitere Hinweise für die Bedeutung der OPPP-Aktivierung für die pflanzliche Abwehr konnten durch Infektionsversuche an **Xanthi-Transformanten** (cP2-Pflanzen, s.o.) gewonnen werden. Im Gegensatz zum Xanthi-Wildtyp kommt es bei diesen Pflanzen bereits nach 6 hpi zu einer deutlichen Beschleunigung der PET-Induktion am Infektionsort, was auf ein erhöhtes Vorkommen von OPPP-Metaboliten hindeutet (Abbildung 4-26 B). Auch die photosynthetische Aktivität ist nach 12 hpi bereits um mindestens 70% gegenüber den Kontrollen erniedrigt (Abbildung 4-26 C). Nach 24 hpi haben sich bereits – wie bei SNN – flächige hypersensitive Läsionen am primären Infektionsort ausgebildet (Abbildung 4-26 D). Auch nach mehreren Tagen sind keine Anzeichen zu erkennen, die bei den cP2-Pflanzen auf ein Ausbreiten des Pathogens über den

primären Infektionsort schließen lassen. Die vermutlich erhöhte Reduktionskraft im Cytosol, hervorgerufen durch die konstitutive Expression der G6PDH im Cytosol, kann ein susceptibles Tabakkultivar möglicherweise zur erfolgreichen Pathogenabwehr befähigen. Die bei den cP2-Pflanzen zu beobachteten Abwehrreaktionen ähneln stark denen des hochresistenten SNN-Kultivars. An dieser Stelle muss jedoch ausdrücklich darauf hingewiesen werden, dass für die Vorversuche an den cP2-Transformanten nur wenige Pflanzen zur Verfügung standen, so dass die gezeigten und diskutierten Ergebnisse ausschließlich erste Hinweise für die Bedeutung der cytosolischen G6PDH während der pflanzlichen Abwehr darstellen. Der genaue zeitliche Ablauf der hier auftretenden Abwehrreaktionen und der Photosynthese-Inhibition müssen in zukünftigen Experimenten ebenso überprüft werden, wie auch die Bildung von ROS und Callose. Wahrscheinlich verfügen diese Pflanzen, aufgrund der nicht vorhandenen Produkt-Hemmung der cP2, über eine höhere Reduktionskraft im Cytosol als der Xanthi-Wildtyp und könnten in zukünftigen Untersuchungen wertvolle Hinweise für die Bedeutung des OPPP während der erfolgreichen pflanzlichen Abwehr liefern.

Alle hier durchgeführten Versuche deuten stark darauf hin, dass eine Aktivierung des OPPP und somit die Umstellung zu einem heterotrophen 'Sink'-artigen Abwehrstoffwechsel in infiziertem 'Source'-Gewebe, wichtige Voraussetzungen für die schnelle und erfolgreiche Abwehrantwort von Tabak darstellen. Einerseits ist es möglich die Abwehr resistenter Tabakkultivare durch die Hemmung von cytosolischem und stromalem OPPP zeitweilig zu unterdrücken. Andererseits scheint auch die Aktivierung der G6PDH zu einer erhöhten Resistenz in eigentlich susceptiblen Pflanzen zu führen. Die Tatsache, dass der OPPP eine zentrale Rolle in der Unterstützung der pflanzlichen Abwehr spielt, bestätigt die Vermutung, dass der nach Infektion von SNN mit *P. nicotianae* beobachtete, schnelle metabolische shift von auto- zu heterotroph eine notwendige Voraussetzung für die erfolgreiche Etablierung von Abwehrreaktionen darstellt.

Eine notwendige und grundlegende Voraussetzung für die Etablierung eines heterotrophen Abwehrstoffwechsels ist die Suppression der Photosynthese in infizierten Zellen. Allerdings ist die Bedeutung der frühen, Stoma-abhängigen Photosynthesehemmung noch weitestgehend unklar. Bei SNN ist die Stoma-abhängige Photosynthese-Depression jedoch vermutlich eine wichtige Voraussetzung für eine frühzeitige Umsteuerung des autotrophen Stoffwechsels und für die Etablierung eines heterotrophen Abwehrstoffwechsels.

6 Zusammenfassung

Die Abwehr des phytopathogenen Oomyceten *Phytophthora nicotianae* erfordert – insbesondere während der Lichtphase – eine Vielzahl von metabolischen Umstellungen in infizierten 'Source'-Zellen von Tabakblättern. Grundsätzlich scheint die Umstellung des autotrophen Zellstoffwechsels zu einem eher heterotrophen Metabolismus die Abwehr des hochresistenten Tabakkultivars SNN zu begünstigen, eventuell sogar erst zu ermöglichen.

Die im Folgenden gezeigten Schemata sollen einen Überblick über die metabolische Situation in infizierten 'Source'-Blättern von SNN geben. Abbildung 6-1 gibt einen Überblick über die zeitliche Sequenz der Abwehr-induzierten Änderungen im Primärstoffwechsel von SNN, die dem hypersensitiven Zelltod vorausgehen und die anlaufenden Abwehrreaktionen unterstützen. Abbildung 6-2 zeigt die metabolische Versiegelung einzelner infizierter Zellen im Tabakmesophyll und soll die lokale Abgrenzung der Abwehr-induzierten Stoffwechseländerungen verdeutlichen. Um die Übersicht und Verständlichkeit zu erhöhen und die Aufmerksamkeit auf neue Daten und Zusammenhänge zu richten wurde in beiden Schemata bewusst auf einige Details verzichtet.

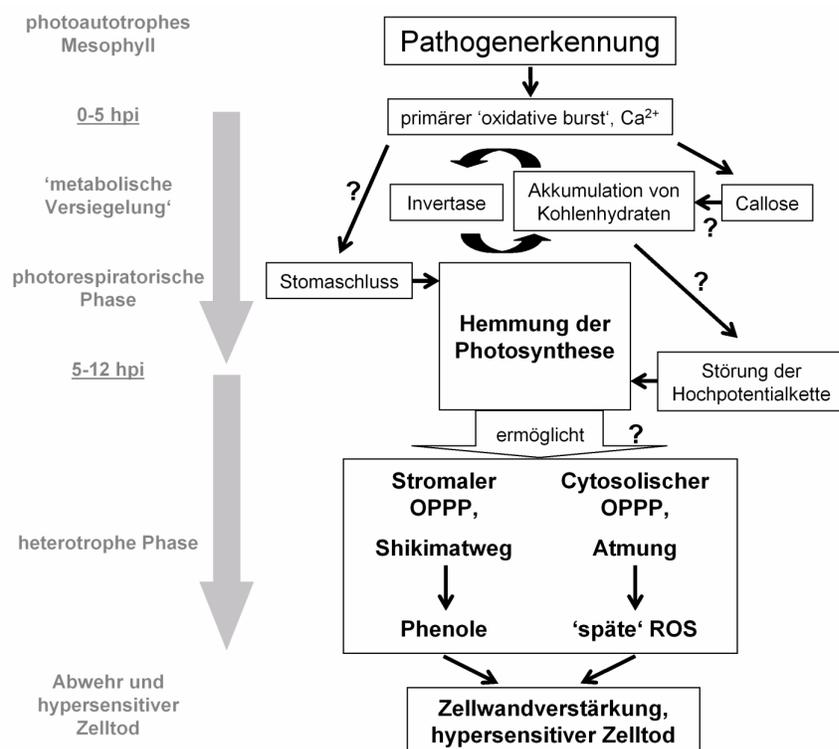


Abbildung 6-1 Zeitverlauf metabolischer und zellulärer Änderungen in infizierten Tabakzellen, die der Zellwandverstärkung und dem hypersensitiven Zelltod während der Abwehr von *P. nicotianae* vorausgehen und diese vermutlich unterstützen. Weitere Erklärungen im Text. Modifiziert nach Scharte *et al.* (2005).

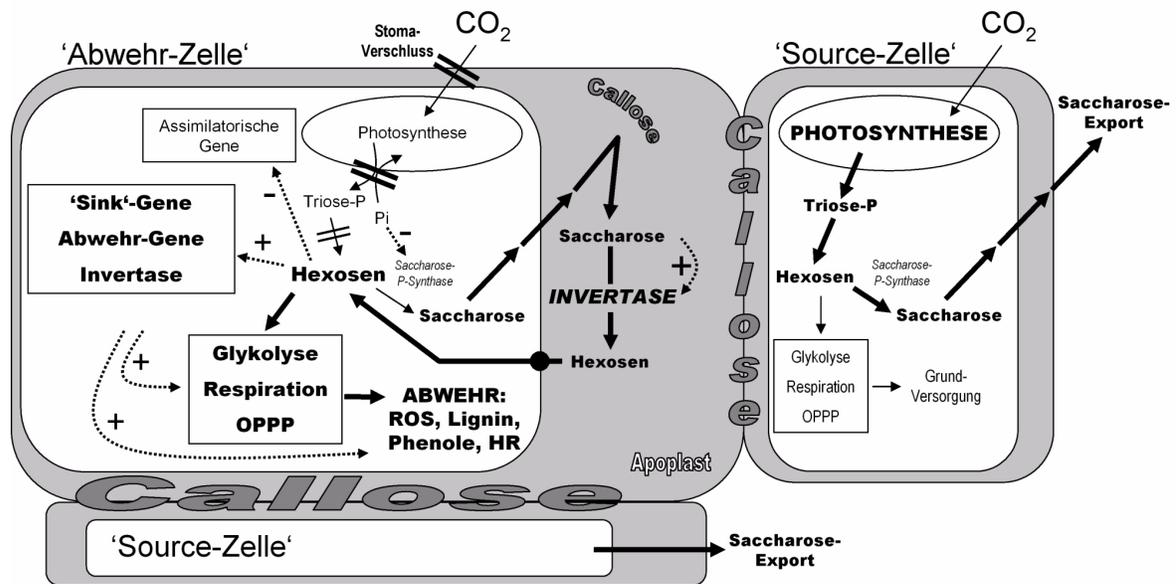


Abbildung 6-2 Schema der räumlichen Abgrenzung von Abwehr-induzierten metabolischen und zellulären Änderungen des Primärstoffwechsels in 'Source'-Zellen von SNN nach Infektion mit *P. nicotianae*, die dem hypersensitiven Zelltod vorausgehen und diesen unterstützen (ca. 1 - 6 hpi). Durchgezogene Pfeile zeigen Metabolitflüsse an, während gepunktete Pfeile die Stimulation (+) oder Hemmung (-) von Genexpression, Enzymaktivität oder einzelnen Stoffwechselwegen anzeigen. Weitere Erklärungen im Text.

Das in dieser Arbeit erstmals dokumentierte schnelle und effiziente Abschalten der Photosynthese bei SNN – erst über den schnellen Stomaverschluss und später über eine Störung des PET – ist wahrscheinlich eine grundlegende Voraussetzung für eine Verschiebung des Stoffwechsels infizierter Zellen von 'Source' zu 'Abwehr' während der Lichtperiode (Abbildung 6-1). Eine solche Hemmung der Photosynthese ist bei dem suszeptiblen Kultivar Xanthi nur verspätet und zudem in schwächerer Ausprägung zu beobachten. Erst das Abschalten der Photosynthese ermöglicht bei SNN, dass Glykolyse, Atmung und OPPP auch im Licht verstärkt ablaufen können. Die Photosynthese-Hemmung scheint somit eine notwendige Voraussetzung für die Etablierung eines 'Abwehr-Stoffwechsels' und die Abwehr des Pathogens zu sein. Bei Xanthi wird hingegen die Induktion des heterotrophen Stoffwechsels durch das weitere Ablaufen der Photosynthese und den fortwährenden Export der Photoassimilate unterbunden. Somit können bei Xanthi viele der für die Abwehr in 'Source'-Gewebe notwendigen Stoffwechselwege nicht oder nur schwach induziert werden und eine erfolgreiche Pathogenabwehr bleibt aus.

Die frühzeitige Bildung von Callose an den Kontaktzonen infizierter Mesophyllzellen kann auch für die Unterbrechung des symplastischen und apoplastischen Assimilattransports sorgen und spielt daher vermutlich eine ebenso wichtige Rolle bei der Induktion eines „Hoch-Zucker-Bereichs“, wie die Aktivierung der apoplastidären Invertase. Vermutlich sorgt ein gut koordiniertes Zusammenspiel von Callose und apoplastidärer Invertase für die schnelle und effiziente me-

tabolische Abschottung des Infektionsbereichs und schafft optimale Bedingungen für eine erfolgreiche Pathogenabwehr (Abbildung 6-2). Die Bedeutung der schnellen Callosebildung für eine erfolgreiche Abwehr wird auch durch die Beobachtungen am suszeptiblen Tabakkultivar Xanthi unterstützt, bei welchem die metabolische Versiegelung des Infektionsbereichs durch Calloseeinlagerungen erst wesentlich später einsetzt als bei SNN. Hierdurch werden wahrscheinlich die für die erfolgreiche Abwehr nötigen und gut dokumentierten Stoffwechsellumstellungen, nicht, bzw. zu spät ermöglicht.

Die Akkumulation von H_2O_2 ist eine ausschließlich lokal an der primären Infektionsstelle auftretende pflanzliche Abwehrmaßnahme. Die frühzeitig nach Infektion einsetzende Bildung von Callose an den Zell-Zell-Kontakten infizierter Zellen unterbindet sehr effektiv die Diffusion von H_2O_2 von einer infizierten zu nicht-infizierten Nachbarzellen. Jedoch bleiben nicht nur die direkt mit der Abwehr korrelierten Reaktionen genau auf den Infektionsort beschränkt. Auch die vorhergehenden metabolischen Änderungen wie die frühe Aktivierung des OPPP und die Stomaabhängige und -unabhängige Reduktion der Photosynthese bei SNN sind hochlokalisiert auftretende Prozesse und finden ausschließlich in infizierten Zellen statt. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit entwickelten „Mikro-Imaging-Systems“ konnte erstmals gezeigt werden, dass einzelne infizierte und photosynthetisch nahezu vollkommen inaktive Mesophyllzellen direkt neben Zellen liegen können, die von der Infektion nicht betroffen sind und eine hohe photosynthetische Aktivität aufweisen.

Die Bedeutung eines aktivierten OPPP für die erfolgreiche Abwehr konnte des Weiteren durch die Hemmung dieses Stoffwechselweges bei SNN demonstriert werden. Die Applikation von N-Glc6P führt bei SNN zu einer zeitweiligen Unterdrückung der Abwehrreaktion. Auch lassen erste Ergebnisse an der cP2-Transformante von Xanthi, welche konstitutiv eine plastidäre G6PDH-Isoform im Cytosol exprimiert und auf eine Infektion mit *P. nicotianae* ähnlich wie SNN reagiert, auf die zentrale Bedeutung des OPPP und somit auf die Umstellung von 'Source'-Zellen zu heterotrophen Abwehr-Zellen schließen.

Durch die Anreicherung von Zuckern in infizierten Zellen kommt es zu einer metabolischen Umstellung der 'Source'-Zellen hin zu einem nicht-assimilatorischen, Kohlenhydratverbrauchenden, heterotrophen Stoffwechsel. In direkt angrenzenden, nicht-infizierten Zellen bleibt die photosynthetische Kapazität unverändert hoch (Abbildung 6-2). Es konnte in keinem Fall beobachtet werden, dass das Absinken der photosynthetischen Aktivität reversibel ist. Das infektionsbedingte Absinken der Photosynthese in einer betroffenen Zelle ist demnach eine „Alles oder Nichts“-Reaktion, welche bei der hier untersuchten inkompatiblen Interaktion immer im

hypersensitiven Zelltod endet. Vermutlich ist die beobachtete Verschiebung des 'Source'-Stoffwechsels hin zu einem nicht-assimilatorischen, Zucker-verbrauchenden Abwehr-Metabolismus wenigstens eine wichtige Voraussetzung, wenn nicht sogar ein unabdingbarer Teil der HR und des hypersensitiven Zelltods. Eine genaue Definition ist an diesem Punkt durch den Umstand erschwert, dass es zurzeit noch keinen Konsens darüber gibt an welchem Punkt der Abwehr die HR beginnt und welche Reaktionen sie genau umfasst. Die hier vorgestellten Untersuchungen legen nahe, dass die beschriebenen metabolischen Umstellungen ein notwendiger Teil der Abwehrreaktion und unabdingbar für eine schnelle und effiziente pflanzliche Abwehr sind. Für diese Annahme sprechen auch die an dem suszeptiblen Xanthi und dessen Transformanten durchgeführten Versuche, wie auch die Hemmstoff-Experimente mit N-Glc6P bei SNN. Daher könnte man diese Umstellungen als Teil eines hypersensitiven Abwehrnetzwerks betrachten und sollte einer weiteren Untersuchung des Primärstoffwechsel während der Pathogenabwehr einen höheren Stellenwert einräumen [vergleiche hierzu auch Conrath *et al.* (2003)]. Die hier gezeigten und für SNN gültigen Schemata Abwehr-induzierter Stoffwechseländerungen sind sehr gut mit einzelnen, an anderen Pathosystemen gemachten Beobachtungen in Einklang zu bringen [z.B. Herbers *et al.* (2000)] und passt gut in das zurzeit gültige Konzept der zellulären Kontrolle von Kohlenhydrat- und Primär-Stoffwechsel. Natürlich stellt sich auch bei den hier durchgeführten Untersuchungen die Frage, ob die beobachteten Reaktionen spezifisch für die inkompatible Interaktion von SNN und *P. nicotianae* sind. Allerdings stehen die Daten in gutem Einklang mit einzelnen Beobachtungen an anderen Pathosystemen. Daher kann man annehmen, dass viele der hier beschriebenen Reaktionen typische Abwehr-vorbereitende Maßnahmen sind, die nach der Infektion von 'Source'-Zellen in vielen Pflanzen zu finden sein müssen, um eine effiziente Pathogenabwehr sicherzustellen. Bereits Baron & Zambryski (1995) verglichen die pflanzlichen Reaktionen auf Pathogenbefall, Symbiosen und Verwundung und kamen zu der Schlussfolgerung, dass es sich bei allen Reaktionen um Variationen ein und desselben Themas handelt.

7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein komplexes metabolisches Szenario zur Beteiligung des Primärstoffwechsels von Tabak an der Abwehr des phytopathogenen Oomyceten *P. nicotianae* entwickelt. Ein Teil dieser Hypothesen sowie einige neu aufgeworfene Fragestellungen sollen zukünftig mit weiteren Experimenten überprüft und untermauert werden.

- Nachdem die hier gezeigten Ergebnisse stark auf eine Abwehr-induzierte Störung der photosynthetischen Hochpotentialkette hinweisen, sollte in zukünftigen Arbeiten überprüft werden, welche Komponenten der Elektronentransportkette Grundlage dieser Hemmung sind. Vorhergehende Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe an Blättern transgener Tabaklinien, die große Mengen löslicher Zucker in den Blättern anreichern, konnten zeigen, dass dem Plastocyanin-Gehalt eine wichtige Kontrollfunktion im photosynthetischen Elektronentransport zukommt [Schöttler *et al.* (2004)]. Da es auch während der Interaktion von SNN und *P. nicotianae* zur Ausbildung eines 'Hoch-Zucker-Status' im Infektionsbereich kommt, erscheinen Untersuchungen zur Beteiligung von Plastocyanin an der Abwehr-induzierten PS-Hemmung sinnvoll.
- Die hier gezeigten Ergebnisse legen nahe, dass eine Hemmung der Photosynthese die grundlegende metabolische Voraussetzung für die Etablierung eines 'Abwehr-Stoffwechsels' in infizierten 'Source'-Zellen darstellt. Möglicherweise ist die durch den Stomaschluss verursachte Steigerung photorespiratorischer Prozesse auch ein wichtiger Bestandteil der pflanzlichen Abwehrreaktionen im Licht, da es hierdurch zu einer stark erhöhten H₂O₂-Produktion in den Peroxisomen kommt, die durch die konstitutiv vorhandene Katalase – welche möglicherweise durch SA gehemmt werden könnte – nicht entgiftet werden kann. Zukünftige Arbeiten sollten sich daher auch mit der Rolle der frühen, Stoma-abhängigen PS-Hemmung während der Abwehr befassen.
- Es stehen direkte Beweise für die postulierte Rolle der Callose in der Blockade des Kohlenhydrat-Exports aus. Zur Klärung dieser Fragestellung könnten SNN-Transformanten verwendet werden, bei denen die Callose-Synthese konstitutiv unterbunden ist. Auch könnten Versuche mit 2-desoxy-D-Glucose, einem Analog der UDP-Glucose, mit dem die Cellulose-/Callose-Synthase gehemmt werden kann, die Bedeutung der Abwehr-induzierten Callosebildung bei der metabolischen Abschottung des Infektionsbereichs aufzeigen. Saccharose-Efflux-Versuche an dem suszeptiblen Xanthi-Kultivar könnten weitere Hinweise hierfür erbringen, da bei Xanthi während der ersten 3 hpi keine signifikante Callosebildung am Infektionsort auftritt. Zu diesem Zeitpunkt ist der Saccharose-Export bei SNN bereits um ca. 60% gegenüber den Kontrollen gesenkt.

- Ein weiterer Fokus sollte in Zukunft auf die Rolle der Umsteuerung des pflanzlichen Primärstoffwechsels gelegt werden. Insbesondere die Bedeutung der OPPP-Aktivierung und der hierfür notwendigen Photosynthese-Repression und die Bedeutung für die erfolgreiche Abwehr müssen detaillierter analysiert werden. Hierfür stehen bereits verschiedene experimentelle Ansätze zur Verfügung. Zum einen können detailliertere Analysen der Abwehrantwort von SNN nach Applikation des G6PDH-Hemmstoffs N-Glc6P die generelle Bedeutung der OPPP-Aktivierung für die erfolgreiche pflanzliche Abwehr liefern. Außerdem stehen Xanthi-Transformanten zur Verfügung, welche konstitutiv eine plastidäre G6PDH-Isoform im Cytosol exprimieren und aufgrund dessen, eine deutlich verstärkte Abwehrantwort nach Infektion mit *P. nicotianae* zeigen. Für die Analyse der genauen Bedeutung der verschiedenen G6PDH-Isoformen während der Abwehr bei SNN könnten SNN-Transformanten dienen, in denen durch RNAi-Technik einzelne Isoformen der G6PDH inhibiert werden können.
- Die angenommene Rolle der ROS – speziell von H_2O_2 – beim Abwehr-induzierten Schließen der Stomata könnte möglicherweise über die Inhibition der ROS-Produktion (z.B. mit Diphenylen Iodid – DPI) aufgeklärt werden. DPI hemmt die membrangebundene NADP(H) Oxidase pflanzlicher Zellen und inhibiert die Bildung und Akkumulation von H_2O_2 im Apoplasten [Sasabe *et al.* (2000)]. Außerdem könnten mit Hilfe der cLS-Mikroskopie und neueren Fluoreszenzfarbstoffen (H_2DAFDA) die genauen Bildungsorte und -Zeitpunkte verschiedener ROS aufgeklärt werden, wodurch möglicherweise weitere Erkenntnisse über die Funktion der ROS während der Abwehr gewonnen werden könnten.

Literaturverzeichnis

- Agrios, G.N.** (1978) Plant Pathology, 2nd Ed., Academic Press, New York
- Aist, J.** (1976) Papillae and related wound plugs of plant cells. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **14**, 145-163.
- Allen, L.J., MacGregor, K.B., Koop, R.S., Bruce, D.H., Karner, J. & Bown, A.W.** (1999) The relationship between photosynthesis and a mastoparan-induced hypersensitive response in isolated mesophyll cells. *Plant Physiol.*, **119**, 1233-1241.
- Alvarez, M.E., Pennell, R.I., Meijer P.-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. & Lamb, C.** (1998) Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell*, **92**, 773-784.
- Apel, K. & Hirt, H.** (2004) REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **55**, 373-399.
- Arias, M.C., Lenardon, S. & Taleisnik, E.** (2003) Carbon metabolism alterations in sunflower plants infected with the sunflower chlorotic mottle virus. *Phytopathologische Zeitschrift*, **151**, 267-273.
- Arnst, C.** (2000) Tobacco Turns over a New Leaf: The killer weed may have a benign side after all -- as a factory for bioengineered drugs. *Business Week Online*, April 10, 2000, **Website:** <http://www.businessweek.com/archives/2000/b3676121.arc.htm>
- Asada, K.** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 601-639.
- Atkinson, M.M., Keppler, L.D., Orlandi, E.W., Baker, C.J. & Mischke, C.F.** (1990). Involvement of plasma membrane calcium influx in bacterial induction of the K^+/H^+ and hypersensitive responses in tobacco. *Plant Physiol.*, **92**, 215-221.
- Ayres, P.G., Press, M.C. & Spencer-Phillips, P.T.N.** (1996) Effect of pathogens and parasitic plants on source/sink relationships. In: Zamski, E. & Schaffer, A.A., eds., *Photoassimilate distribution in plants and crops*. New York: Marcel Dekker, pp 479-499.
- Baker, N.R., Oxborough, K., Lawson, T. & Morison, J.I.L.** (2001) High resolution imaging of photosynthetic activities of tissues, cells and chloroplasts in leaves. *J. Exp. Bot.*, **52** (356), 615-621.
- Barber, J., Malkin, S., Telfer, A.** (1989) The origin of chlorophyll fluorescence in vivo and its quenching by the photosystem II reaction centre. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **323**, 227-239.
- Barclay, G.F., Peterson, C.A. & Tyree, M.T.** (1982) Transport of fluorescein in trichomes of *Lycopersicon esculentum*. *Canadian Journal of Botany*, **60**, 397-402.
- Baron, C. & Zambryski, P.C.** (1995) The plant response in pathogenesis, symbiosis and wounding: Variations on a common theme? *Annu. Rev. Genetics*, **29**, 107-129.

- Barz, W.** (1997) Phytoalexins. In: *Resistance of crop plants against fungi*, pp 183-201. Hartleb, H. Heitefuss, R., Hoppe, H.H., eds., Gustav Fischer Verlag (Jena, Stuttgart, Lübeck, Ulm).
- Bassanezi, R.B., Amorim, L., Bergamin Filoh, A. & Berger, R.D.** (2002) Gas Exchange and Emission of Chlorophyll Fluorescence during the Monocycle of Rust, Angular Leaf Spot and Anthracnose on Bean Leaves as a Function of their Trophic Characteristics. *J. Phytopathol.*, **150**, 37-47.
- Bastiaans, L.** (1991) Ratio between virtual and visual lesion size as a measure to describe reduction in leaf photosynthesis of rice due to leaf blast. *Phytopathology*, **81**, 611-615
- Bechtold, U., Karpinski, S. & Mullineaux, P.M.** (2005) The influence of the light environment and photosynthesis on oxidative signalling responses in plant-biotrophic pathogen interactions. *Plant, Cell and Environment*, **28**, 1046-1055.
- Benhamou, N., Grenier, J. & Chrispeels, M.J.** (1991) Accumulation of beta fructosidase in the cell walls of tomato roots following infection by a fungal wilt pathogen. *Plant Physiol.*, **97**, 739-750.
- Berger, S., Papadopoulos, M, Schreiber, U., Kaiser, W. & Roitsch, T.** (2004) Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. *Physiologia Plantarum*, **122**, 419-428.
- Björkmann, O. & Demmig, B.** (1987) Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, **170**, 489-504.
- Bolwell, G.P.** (1999) Role of active oxygen species and NO in plant defense responses. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **2**, 287-294.
- Bolwell, G.P. & Wojtaszek, P.** (1997) Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence: a broad perspective. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **51**, 347-366.
- Boote, K.J., Jones, J.W., Smerage, G.H., Barfield, C.S. & Berger, R.D.** (1980) Photosynthesis of peanut canopies as affected by leafspot and artificial defoliation. *Agron. J.*, **72**, 247-252.
- Bothaa, C.E.J. & Cross, R.H.M.** (2000) Towards reconciliation of structure with function in plasmodesmata—who is the gatekeeper? *Micron*, **31** (6), 713-721.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P. & Lamb, C.J.** (1992) Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein : a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21-30.
- Bro, E., Meyer, S. & Genty, B.** (1996) Heterogeneity of leaf CO₂ assimilation during photosynthetic induction. *Plant, Cell and Environment*, **19**, 1349-1358.
- Cantrill, L.C., Overall, R.L. & Goodwin, P.B.** (1999) Cell-to-cell communication via plant endomembranes. *Cell Biology International*, **23**, 653-661.
- Chamngpol, S., Willkens, H., Moeder, W., Langebartels, C., Sandermann, H., Montagu, M.V., Inze, D. & Camp, W.V.** (1998) Defense activation and enhanced pathogen tolerance in-

duced by H₂O₂ in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5818-5823.

Chen, Z., Silva, S. & Klessig, D.F. (1993) Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired-resistance by salicylic acid. *Science*, **262**, 1883–1886.

Chou, H.-M., Bundock, N., Rolfe, S.A. & Scholes, J.D. (2000) Infection of *Arabidopsis thaliana* leaves with *Albugo candida* (white blister rust) causes a reprogramming of host metabolism. *Mol. Plant Pathol.*, **1**(2), 99-113.

Clarke, S.E. (1996) Plant cell communication: the world outside the plasma membrane. *Trends in Plant Science*, **1**, 406–407.

Coghlan, S.E., & Walters, D.R. (1992) Photosynthesis in green-islands on powdery mildew-infected barley leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **40**, 31-38.

Colas, V., Conrod, S., Venard, P., Keller, H., Ricci, P. & Panabieres, F. (2001) Elicitor genes expressed in vitro by certain tobacco isolates of *Phytophthora parasitica* are down regulated during compatible interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **14**, 326-335.

Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R. & Klessig, D.F. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6-dichloroisonicotinic acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 7143–7147.

Conrath, U., Linke, C., Jeblick, W., Geigenberger, P., Quick, W.P. & Neuhaus, H.E. (2003) Enhanced resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani* in leaves and tubers, respectively, of potato plants with decreased activity of the plastidic ATP/ADP transporter. *Planta*, **217**, 75-83.

Cuypers, B. & Hahlbrock, K. (1988) Immunohistochemical studies of compatible and incompatible interactions of potato leaves with *Phytophthora infestans* and of the nonhost response to *Phytophthora megasperma*. *Can. J. Bot.*, **66**, 700-705.

Daley, P.F., Raschke, K., Ball, J.T. and Berry, J.A. (1989) Topography of Photosynthetic Activity of Leaves Obtained from Video Images of Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiol.*, **90**, 1233-1238.

Daly, J.M., Bell, A.A. & Krupka, L.R. (1961) Respiratory changes during development of rust diseases. *Phytopathology*, **51**, 461-471.

Díaz, J. & Merino, F. (1997) Wound-induced shikimate dehydrogenase and peroxidase related to lignification in pepper (*Capsicum annuum* L.) leaves. *J. Plant Physiol.*, **152**, 51-57.

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. *Plant Cell*, **4**, 915-928.

Dixon, R.A., Harrison, M.J. & Lamb, C.J. (1994) Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **32**, 479-501.

Dorey, S., Kopp, M., Geoffroy, P., Fritig, B. & Kauffmann, S. (1999) Hydrogen peroxide

from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.*, **121**, 163-171.

Durner, J., Klessig, D.F. (1996) Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases. *J. Biol. Chem.*, **271**, 28492–28501.

Eckstein, J., Beyschlag, W., Mott, K.A. & Ryel, R.J. (1996) Changes in photon flux can induce stomatal patchiness. *Plant, Cell and Environment*, **19**, 1066-1074.

Ehness, R., Ecker, M., Godt, D. & Roitsch, T. (1997) Glucose and stress independently regulate source/sink relations and defence mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell*, **9**, 1825-1841.

El-Omari, B., Fleck, I., Aranda, X., Moret, A. & Nadal, M. (2001) Effect of fungal infection on leaf gas-exchange and chlorophyll fluorescence in *Quercus ilex*. *Annals of Forest Science*, **58**, 165-174.

Enkerli, K., Hahn, M.G. & Mims, C.W. (1997) Immunogold localization of callose and other plant cell wall components in soybean roots infected with the plant pathogenic oomycete *Phytophthora sojae*. *Can. J. Bot.*, **75**, 1509-1517.

Epel, B.L. (1994) Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Mol. Biol.*, **26**, 1343-1356.

Ephrath, J.E., Shtienberg, D., Drieshpoun, J., Dinooor, A. & Marani, A. (1989) *Alternaria alternata* in cotton (*Gossypium hirsutum*) cv. Acala: effects on gas exchange, yield components and yield accumulation. *Neth. J. Plant Pathol.*, **95**, 157-166.

Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. Minnesota, St Paul: APS Press.

Esau, K. & Thorsch, J. (1985) Sieve plate pores and plasmodesmata, the communication channels of the symplast – ultrastructural aspects and developmental relations. *American Journal of Botany*, **72**, 1641-1653.

Esfeld, P. (2000) Umsteuerung des Primärstoffwechsels der Kichererbse (*Cicer arietinum* L.) nach Elicitierung und Infektion mit dem phytopathogenen Pilz *Ascochyta rabiei*. Dissertationsschrift, WWU Münster.

Esfeld, P., Siebke, K., Wacker, I. & Weis, E. (1995) Local defense-related shift in the carbon metabolism in chickpea leaves induced by a fungal pathogen. In: P. Mathis (ed.), *Photosynthesis: from light to Biosphere*, Vol. V, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 663-666.

Farrar, J.F. (1992) The whole plant: carbon partitioning during development. In: Pollock, C.J., Farrar, J.F., Gordon, A.J., eds. *Carbon partitioning within and between organisms*. Oxford: Bios. Scientific Publishers Ltd., 163-179.

Fellbrich, G., Romanski, A., Varet, A., Blume, B., Brunner, F., Engelhardt, S., Felix, G.,

- Kemmerling, B., Krzymowska, M. & Nürnberger, T.** (2002) NPP1, a *Phytophthora*-associated trigger of plant defence in parsley and *Arabidopsis*. *Plant J.*, **32**, 375-390.
- Fickenscher, K. & Scheibe, R.** (1986) Purification and properties of the cytoplasmatic glucose-6-P dehydrogenase from pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **247**, 393-402.
- Flügge, U.I.** (1999) PHOSPHATE TRANSLOCATORS IN PLASTIDS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 27-45.
- Fufezan, C., Rutherford, A.W. & Krieger-Liszak, A.** (2002) Singlet oxygen production in herbicide-treated photosystem II. *FEBS Letters*, **532**, 407-410.
- Genty, B. & Meyer, S.** (1994) Quantitative Mapping of Leaf Photosynthesis using Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 277-84.
- Genty, B., Briantais, J.-M. & Baker, N.** (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **990**, 87-92.
- Gindro, K., Pezet, R. & Viret, O.** (2003) Histological study of the responses of two *Vitis vinifera* cultivars (resistant and susceptible) to *Plasmopara viticola* infections. *Plant Physiol. Biochem.*, **41**, 846-853.
- Glaser, B.L. & Brown, D.H.** (1955) Purification and properties of D-glucose 6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **216**, 67-79.
- Goodman, R.N., and Novacky, A.J.** (1994). The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens: A Resistance Phenomenon. (St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press).
- Goh, C.-H., Schreiber, U. & Hedrich, R.** (1999) New approach of monitoring changes in chlorophyll a fluorescence of single guard cells and protoplasts in response to physiological stimuli. *Plant, Cell and Environment*, **22**, 1057-1070.
- Gómez-Gómez, L., Felix, G. & Boller, T.** (1999) A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, **18**, 277-284.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97** (25), 13979-13984.
- Govrin, E.M. & Levine, A.** (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Curr. Biol.*, **10**, 751-757.
- Greenberg, J.T.** (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **48**, 525-545.
- Hahn, M.G., Bonhoff, A. & Griesebach, H.** (1985) Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Plant Physiol.*, **77**, 591-601.
- Hall, J.L., Williams, L.E.** (2000) Assimilate transport and partitioning in fungal biotrophic in-

teractions. *Aust. J. Plant Physiol.*, **27**, 549-560.

Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? *Annu. Rev. Phytopathol.*, **37**, 285-306.

Hatzfeld, W.D., Dancer, J. & Stitt, M. (1990) Fructose-2,6-bisphosphate: metabolism and control of pyrophosphate: fructose 6-phosphate phosphotransferase during triose phosphate cycling in heterotrophic cell-suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Planta*, **180**, 205-211.

Hawker, J.S. (1985) Sucrose. In: *Biochemistry of Storage Carbohydrates in Green Plants*, pp. 1-51. Dey, P.M., Dixon, R.A., eds., Academic Press (New York).

Hawker, J.S., Jenner, C.F. & Niemietz, C.M. (1991) Sugar metabolism and compartmentation. *Aust. J. Plant Physiol.*, **18**, 227-237.

Heisterüber, D. (1993) Untersuchungen zum Metabolismus von Speicherkohlenhydraten in der Wirt/Parasit-Interaktion von Weizen und Weizenschwarzrost. Dissertationsschrift, RWTH-Aachen.

Heisterüber, D, Schulte, P. & Moerschbacher, B.M. (1994) Soluble carbohydrates and invertase activity in stem rust-infected, resistant and susceptible near-isogenic wheat leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **44**, 111-123.

Heldt, H.-W. (1999) Pflanzenbiochemie. 2 Aufl., Heidelberg; Berlin; Spektrum, Akad. Verl.

Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W., Metraux, J. & Sonnewald, U. (1996 a) Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway. *Plant Cell*, **8**, 793-803.

Herbers, K., Meuwly, P., Metraux, J. & Sonnewald U. (1996 b) Salicylic acid-dependent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage. *FEBS Lett.*, **397**, 239-244.

Herbers, K., Takahata, Y., Melzer, M., Mock, H.P., Hajirezaei, M. & Sonnewald, U. (2000) Regulation of carbohydrate partitioning during the interaction of potato virus Y with tobacco. *Mol. Plant Pathol.*, **1**, 51-59.

Herrmann, K.M. & Weaver, L.M. (1999) The shikimate pathway. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **50**, 473-503.

Hohl, H.R. & Stossel, P. (1976) Host-parasite interfaces in a resistant and a susceptible cultivar of *Solanum tuberosum* inoculated with *Phytophthora infestans*: tuber tissue. *Can. J. Bot.*, **54**, 900-912.

Horsfall, J. & Dimond, A. (1957) Interactions of tissue sugar, growth substances and disease susceptibility. *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, **64**, 415-421.

Ishida, H., Makino, A. & Mae, T. (1999) Fragmentation of the Large Subunit of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase by Reactive Oxygen Species occurs near Gly-329. *J. Biol. Chem.*, **274**, 5222-5226.

- Jabs, T.** (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 231-245.
- Jacobs, A.K., Lipka, V., Burton, R.A., Panstruga, R., Strizhov, N., Schulze-Lefer, P. & Finchera, G.B.** (2003) An Arabidopsis Callose Synthase, GSL5, Is Required for Wound and Papillary Callose Formation. *The Plant Cell*, **15**, 2503–2513.
- Jameson, P.E.** (2002) Cytokinins and auxins in plant–pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation*, **32**, 369-380.
- Jang, J.-C. & Sheen, J.** (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell*, **6**, 1665-1679.
- Jensen, M. & Siebke, K.** (1997) Fluorescence Imaging of Lichens in the Macro Scale. *Symbiosis*, **23**, 183-196.
- Jones, M.G.K., Outlaw, W.H. & Lowry, O.H.** (1977) Enzymatic assay of 10⁻⁷–10⁻¹⁴ moles of sucrose in plant tissues. *Plant Physiol.*, **60**, 379–383.
- Johnson, R. & Ryan, C.A.** (1990). Wound-inducible potato inhibitor II genes: Enhancement of expression by sucrose. *Plant Mol. Biol.*, **14**, 527-536.
- Judelson, H.S.** (1997) The genetics and biology of *Phytophthora infestans*: modern approaches to a historical challenge. *Fungal Gen. Biol.*, **22**, 65-76.
- Kamoun, S., Young, M., Glascock, C.B. & Tyler, B.M.** (1993) Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **6**, 15-25.
- Kartusch, R.** (2003) On the mechanism of callose synthesis induction by metal ions in onion epidermal cells. *Protoplasma*, **220**, 219-225.
- Kauss, H.** (1996) Callose synthesis. In: M Smallwood, JP Knox, DJ Bowles, eds., *Membranes: Specialized Functions in Plants*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, pp 77–92
- Kautsky, H. & Hirsch, A.** (1931) Neue Versuche zur Kohlenstoffassimilation. *Naturwissenschaften*, **19**, 964.
- Keppler, L.D. & Baker, C.J.** (1989) O₂⁻-initiated lipid peroxidation in a bacteria-induced hypersensitive reaction in tobacco cell suspensions. *Physiol. Biochem.*, **79**, 555-562.
- Klement, Z.** (1982). Hypersensitivity. In: *Phytopathogenic Prokaryotes*, Vol. 2, M.S. Mount and G.H. Lacy, eds. (New York: Academic Press), pp 149-177.
- Klughammer, C. & Schreiber, U.** (1998) Measuring P₇₀₀ absorbance changes in the near infrared spectral region with a dual wavelength pulse modulation system. In: *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*. Vol. V (Garab, G. ed.). Dordrecht: Kluwer, pp. 4357-4360.
- Koch, K.E.** (1996) Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **47**, 509-540.
- Kragler, F., Lucas, W.J. & Monzer, J.** (1998) Plasmodesmata: dynamics, domains and patterning. *Annals of Botany*, **81**, 1-10.

- Krapp, A., Hofmann, B., Schafer, C. & Stitt, M.** (1993) Regulation of the expression of *rbcS* and other photosynthetic genes by carbohydrates: A mechanism for the “sink regulation” of photosynthesis? *Plant J.*, **3**, 817-828.
- Krause, G.H. & Weis, E.** (1984) Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II Interpretation of fluorescence signals. *Photosynth. Res.*, **5**, 139-157.
- Krause, G.H. & Weis E.** (1991) Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis: The Basics. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**, 313-49.
- Krausgrill, S., Sander, A., Greiner, S., Weil, M. & Rausch, T.** (1996) Regulation of cell-wall invertase by a proteinaceous inhibitor. *J. Exp. Bot.*, **47**, 1193-1198.
- Küpper, H., Šetlík, I., Trtílek, M. & Nedbal, L.** (2000) A microscope for two-dimensional measurements of in vivo chlorophyll fluorescence kinetics using pulsed measuring light, continuous actinic light and saturating flashes. *Photosynthetica*, **38**, 553-570.
- Kunst, A., Draeger, B. & Ziegenhorn, J.** (1984) D-Glucose. In: *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd edn., Vol. 4 (eds. H.U. Bergmeyer, J. Bergmeyer & M. Graßl) pp. 1469–1473. Verlag Chemie, Weinheim.
- Lamb, C. & Dixon, R.A.** (1997) The oxidative burst in plant disease. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 251-275.
- Lee, J.S.** (1998) The mechanism of stomatal closing by salicylic acid in *Commelina communis* L. *J. Plant Biol.*, **41**, 97–102.
- Lee, J.-Y., Yoo, B.-C. & Lucas, W.J.** (2000) Parallels between nuclear-pore and plasmodesmal trafficking of informational molecules. *Planta*, **210**, 177–187.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R & Lamb, C.** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, **79**, 583-593.
- Livne A.** (1964) Photosynthesis in healthy and rust affected plants. *Plant Physiol.*, **39**, 614-621.
- Logemann, J., Schell, J. & Willmitzer, L.** (1987) Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal. Biochem.* **163**, 16-20.
- Lohaus, G., Pennewiss, K., Sattelmacher, B., Hussmann, M. & Muehling, K.** (2001) Is the infiltration-centrifugation technique appropriate for the isolation of apoplastic fluid? A critical evaluation with different plant species. *Physiologia Plantarum*, **111**, 457–465.
- Lorenzini, G., Guidi, L., Nali, C., Ciompi, S. & Soldatini, G.F.** (1997) Photosynthetic response of tomato plants to vascular wilt diseases. *Plant Science*, **124**, 143-152.
- Löw, R., & Rausch, T.** (1996) Nonradioactive detection of nucleic acids with biotinylated probes. *Biomethods*, **7**, 201-213.
- Lucas, J.A.** (1998) *Plant Pathology and Plant Pathogens*. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Lucas, W.J.** (1999) Plasmodesmata and the cell-to-cell transport of proteins and nucleoprotein complexes. *J. Exp. Bot.*, **50**, 979–987.

- Lucas, W.J. & Wolf, S.** (1993) Plasmodesmata: the intercellular organelles of green plants. *Trends in Cell Biology*, **3**, 308-315.
- Lucas, W.J., Ding, B. & van der Schoot, C.** (1993) Plasmodesmata and the supracellular nature of plants. *New Phytol.*, **125**, 435-476.
- Luque, J. Cohen, M. Save, R., Biel, C. & Alvarez, I.F.** (1999) Effects of three fungal pathogens on water relations, chlorophyll fluorescence and growth of *Quercus suber* L. *Annales of Forest Science*, **56**, 19-26.
- MacKenzie, S. & McIntosh, L.** (1999) Higher plant mitochondria. *Plant Cell*, **11**, 571-585.
- Maddes, T., Rascher, U., Siebke, K., Lüttge, U. & Osmond, B.** (2002) Definition and Evaluation of the Spatio-Temporal Variations in Chlorophyll Fluorescence during the Phases of CAM and during Endogenous Rhythms in Continuous Light, in thick Leaves of *Kalanchoe daigremontiana*. *Plant Biol.*, **4**, 446-455.
- Manthe, B., Schulz, M. & Schnable, H.** (1992) Effects of salicylic acid on growth and stomatal movements on *Vicia faba* L: evidence for salicylic acid metabolism. *J. Chem. Ecol.*, **18**, 1525-1539
- Mateo, A., Muhlenbock, P., Rusterucci, C., Chang, C.C., Miszalski, Z., Karpinska, B., Parker, J.E., Mullineaux, P.M. & Karpinski, S.** (2004) LESION SIMULATING DISEASE 1 Is Required for Acclimation to Conditions That Promote Excess Excitation Energy. *Plant Physiol.*, **136**, 2818-2830.
- McDonald, K. & Cahill, D.** (1999) Evidence for a transmissible factor that causes rapid stomatal closure in soybean at sites adjacent to and remote from hypersensitive cell death induced by *Phytophthora sojae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **55**, 197-203.
- McGrath, M.T. & Pennypacker, S.P.** (1990) Alteration of physiological processes in wheat flag leaves caused by stem rust and leaf rust. *Phytopathol.*, **80**, 677-686.
- Medhy, M.C., Sharma, Y.K., Sathasivan, K. & Bays, N.W.** (1996) The role of oxygen species in plant disease resistance. *Physiol. Plantarum*, **99**, 365-374.
- Mehta, R.A., Fawcett, T.W., Porath, D. & Mattoo, A.K.** (1992) Oxidative Stress Causes Rapid Membrane Translocation and in Vivo Degradation of Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 2810-2816.
- Meng, Q., Siebke, K., Lippert, P., Baur, B., Mukherjee, U. & Weis, E.** (2001) Sink-source transition in tobacco leaves visualized using chlorophyll fluorescence imaging. *New Phytologist*, **151**, 585-595.
- Meyer, S. & Genty, B.** (1998) Mapping intercellular CO₂ Mole Fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* Leaves fed with Abscisic Acid by using Chlorophyll Fluorescence Imaging. *Plant Physiol.*, **116**, 947-957.
- Meyer, S., Saccardy-Adji, K., Rizza, F. & Genty, B.** (2001) Inhibition of photosynthesis by

Colletotrichum lindemuthianum in bean leaves determined by chlorophyll fluorescence imaging. *Plant, Cell and Environment*, **24**: 947-956.

Mittler, R., Lam, E., Shulaev, V. & Cohen, M. (1999) Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen-induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol. Biol.*, **39**, 1025-1035.

Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F. (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, **9** (10), 490-498.

Moerschbacher, B.M. Noll, U., Ocampo, C.A., Flott, B.E., Gotthardt, U., Wüstenfeld, A. & Reisener, H.-J. (1990) Hypersensitive lignification response as the mechanism of non-host resistance of wheat against oat crown rust. *Physiol. Plant.*, **78**, 609-615.

Mori, I.C., Pinontoan, R., Kawano, T. & Muto, S. (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.*, **42**, 1383-1388.

Mott, K. A. (1995) Effects of patchy stomatal closure on gas exchange measurements following abscisic acid treatment. *Plant, Cell and Environment*, **18**, 1291-1300.

Murillo, I., Roca, R., Bortolotti, C. & Segundo, B.S. (2003) Engineering photoassimilate partitioning in tobacco plants improves growth and productivity and provides pathogen resistance. *Plant Journal*, **36**, 330-341.

Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992) Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **30**, 369-389.

Niederleitner, S. & Knoppik, D. (1997) Effects of the cherry leaf spot pathogen *Blumeria jaapii* on gas exchange before and after expression of symptoms on cherry leaves. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **51**, 145-153.

Nishimura, M.T., Stein, M., Hou, B.H., Vogel, J.P., Edwards, H. & Somerville, S.C. (2003) Loss of a callose synthase results in salicylic acid-dependent disease resistance. *Science*, **301**, 969-972.

Nogués, S., Cotxarrera, L., Alegre, L. & Trillas, M.I. (2002) Limitations to photosynthesis in tomato leaves induced by *Fusarium* wilt. *New Phytol.*, **154**, 461-470.

Niyogi, K.K. (1999) Photoprotection revisited: Genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **50**, 333-359.

Olesen, P. & Robards, A.W. (1990) The neck region of plasmodesmata: general architecture and some functional aspects. In: *Parallels in Cell to Cell Junctions in Plants and Animals* (Robards, A.W., Lucas, W.J., Pitts, J.D., Jongasma, H.J. & Spray, D.C.). Berlin: Springer, pp. 145-170.

Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boeing, P., Santa Cruz, S., Roberts, I.M., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N. & Epel, B. (1999) Simple, but not branched, plasmodesmata allow the non-specific trafficking of proteins in developing tobacco leaves. *Cell*, **97**, 743-754.

- Osbourn, A.** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defence against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Owera, S.A.P., Farrar, J.F. & Whitbread, R.** (1981) Growth and photosynthesis in barley infected with brown rust. *Physiol. Plant Pathol.*, **18**, 79-90.
- Oxborough, K. & Baker, N.R.** (1997) An instrument capable of imaging chlorophyll a fluorescence from intact leaves at very low irradiance and at cellular and subcellular levels of organization. *Plant, Cell and Environment*, **20**, 1473-1483.
- Paul, M.J. & Foyer, C.H.** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *J. Exp. Botany*, **52**, 1383-1400.
- Payne, G., Ahl, P., Moyer, M., Harper, A., Beck, J., Meins, F. Jr. & Ryals, J.** (1990) Isolation of complementary DNA clones encoding pathogenesis-related proteins P and Q, two acidic chitinases from tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 98-102.
- Pei, Z.M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G.J., Grill, E. & Schroeder, J.I.** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, **406**, 731-734.
- Pellinen, R.I., Korhonen, M.-S., Tauriainen, A.A., Palve, E.T. & Kangasjärvi, J.** (2002) Hydrogen Peroxide Activates Cell Death and Defense Gene Expression in Birch. *Plant Physiol.*, **130**, 549-560.
- Peng, M. & Kuc, J.** (1992) Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, **82**, 696-699.
- Pennazio, S. & Roggero, P.** (1998) Endogenous changes in cytokinin activity in systemically virus-infected plants. *Microbiologica*, **21**, 419-426.
- Pfannschmidt, T.** (2003) Chloroplast redox signals: how photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science*, **8** (1), 33-41.
- Polle, A.** (1996) Developmental changes of antioxidative systems in tobacco leaves as affected by limited sucrose export in transgenic plants expressing yeast-invertase in the apoplastic space. *Planta*, **198**, 253-262.
- Porra, R.J., Thompson, W.A. & Kriedermann, P.E.** (1989) Determination of accurate extinction coefficient and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solutions: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384-394.
- Pörs, Y.** (1999) Anpassung von Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum* L.) an Licht- und Chlorophyllmangel. Dissertationsschrift, Humboldt-Universität zu Berlin.
- Prell, H.H.** (1996) Interaktionen von Pflanzen und phytopathogenen Pilzen. Jena, Stuttgart: G. Fischer.
- ProfilOnline (N.N.)** (2005) Die Kraut- und Knollenfäule – Kartoffelkrankheit Nr. 1: Die wirt-

schaftlich bedeutendste Pilzerkrankung dieser Hackfrucht., 25.Mai 2005, **Website:** <http://www.profil.iva.de/html/text.php-?id=381>.

Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R. & Guern, J. (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. *Plant Cell*, **9**, 2077-2091.

Radford, J.E., Vesk, M. & Overall, R.L. (1998) Callose deposition at plasmodesmata. *Protoplasma*, **201**, 30–37.

Raggi V. (1978) The CO₂ compensation point, photosynthesis and respiration in rust infected bean leaves. *Physiol. Plant. Pathol.*, **13**: 135-139.

Rao, M.V., Paliyath, G., Ormrod, D.P., Murr, D.P. & Watkins, C.B. (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes. Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂. *Plant Physiol.*, **115**, 137–149.

Robards, A.W. & Lucas, W.J. (1990) Plasmodesmata. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.*, **41**, 369–419.

Roberts, I.M., Boevink, P., Roberts, A.G., Sauer, N., Reichel, C. & Oparka, K.J. (2001) Dynamic changes in the frequency and architecture of plasmodesmata during the sink-source transition in tobacco leaves. *Protoplasma*, **218**, 31-44.

Rodriguez-Gálvez, E. & Mendgen, K. (1995) Cell wall synthesis in cotton roots after infection with *Fusarium oxysporum*: the deposition of callose, arabinogalactans, xyloglucans, and pectic components into walls, wall appositions, cell plates and plasmodesmata. *Planta*, **197**, 535-545.

Rogers, E.E., Glazebrook, J. & Ausubel F.M. (1996) Mode of action of the *Arabidopsis thaliana* phytoalexin camalexin and its role in *Arabidopsis*-pathogen interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.*, **9**, 748-757.

Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A.K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *J. Exp. Bot.*, **54**, 513-524.

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 Physiol.*, **108**, 285-294.

Rolfe, S.A. & Scholes, J.D. (1995) Quantitative Imaging of chlorophyll fluorescence. *New Phytol.*, **131**, 69-79.

Rolland, F., Moore, B. & Sheen, J. (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *Plant Cell*, **14**, 185-205.

Roloff, I., Sherm, H. & van Iersel, M.W. (2004) Photosynthesis of blueberry leaves as affected by *Septoria* leaf spot and abiotic leaf damage. *Plant Disease*, **88**, 397-401.

Salanoubat, M. & Belliard, G. (1989) The steady-state level of potato sucrose synthase mRNA

is dependent on wounding, anaerobiosis and sucrose concentration. *Gene*, **84**, 181-185.

Sanchez-Casas, P. & Klessig, D.F. (1994) A salicylic acid-binding activity and a salicylic acid-inhibitable catalase activity are present in a variety of plant species. *Plant Physiol.*, **106**, 1675–1679.

Sander, A., Krausgrill, S., Greiner, S., Weil, M. & Rausch, T. (1996) Sucrose protects cell wall invertase but not vacuolar invertase against proteinaceous inhibitors. *FEBS Letters*, **385** (3), 171-175.

Sasabe, M., Takeuchi, K., Kamoun, S., Ichinose, Y., Govers, F., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Yamada, T. (2000) Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitor in tobacco cell suspension culture. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 5005-5013.

Scharte, J., Schön, H. & Weis, E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell and Environment*, **28** (11), 1421-1435.

Scheibe, R. (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiol.*, **96**, 1-3.

Scheideler, M., Schlaich, N.L., Fellenberg, K., Beissbarth, T., Hauser, N.C., Vingron, M., Slusarenko, A.J., & Hoheisel, J.D. (2002) Monitoring the switch from housekeeping to pathogen defence metabolism in *Arabidopsis thaliana* using cDNA arrays. *J. Biol. Chem.*, **277**, 10555-10561.

Scheller, J., Gührs K.-H., Grosse, F. & Conrad, U. (2001) Production of spider silk proteins in tobacco and potato. <http://biotech.nature.com>; June 2001, **19**, 573-577.

Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. & Manners, J.M. (2000) Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **97**, 11655-11660.

Schlösser, E. (1983) *Allgemeine Phytopathologie*. Stuttgart; New York: Thieme, **1**. Aufl.

Schmittmann, G. (1991) Lokalisation der Schadensregion in der Photosynthese schwarzrostinfizierter Weizenpflanzen. Dissertationsschrift, RWTH Aachen.

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 Physiol.*, **108**, 609-614.

Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P. & Lewis, D.H. (1994) Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytol.*, **126**, 213-222.

Scholes, J.D. & Rolfe, S.A. (1996) Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence. *Planta*,

199, 573–582.

Schön, H. (2001) Darstellung der Dynamik von Abwehr in Blättern höherer Pflanzen nach Infektion mit pathogenen Mikroorganismen mit Hilfe bildgebender Chlorophyll-Fluoreszenzanalyse. Diplomarbeit, WWU Münster.

Schöttler, M.A., Kirchoff, H. & Weis, E. (2004) The role of plastocyanin in the adjustment of the photosynthetic electron transport to the carbon metabolism in tobacco. *Plant Physiol.*, **136**, 4265-4274.

Schreiber, U. (1997) Chlorophyll fluorescence and photosynthetic energy conversion: Simple introductory experiments with the TEACHING-PAM Chlorophyll Fluorometer, (H. Walz GmbH, ed.) Effeltrich, Germany.

Schreiber, U., Schliwa, U. & Bilger, W. (1989) Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, **10**, 51-62.

Seo, S., Okamoto, M., Iwai, T., Iwano, M., Fukui, K., Isogai, A., Nakajima, N. & Ohash, Y. (2000) Reduced Levels of Chloroplast FtsH Protein in Tobacco Mosaic Virus-Infected Tobacco Leaves Accelerate the Hypersensitive Reaction. *The Plant Cell*, **12**, 917–932.

Sharkey, T.D. (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiol. Plant.*, **73**, 147-152.

Sheen, J. (1990). Metabolic repression of transcription in higher plants. *Plant Cell*, **2**, 1027-1038.

Shtienberg, D. (1992) Effects of foliar diseases on gas exchange processes: a comparative study. *Phytopathol.*, **82**, 760-765

Siebke, K. & Weis E. (1995 a) Assimilation Images of leaves of *Glechoma hederacea*: Analysis of non-synchronous stomata related oscillations. *Planta*, **196**, 155-165.

Siebke, K. & Weis, E. (1995 b) Spatial distribution of assimilation control in leaves visualized by quantitative chlorophyll-a-fluorescence imaging. In: P. Mathis (ed.), *Photosynthesis: from Light to Biosphere*, Vol. V, , Kluwer Academic Publishers, 699-702.

Sivaguru M., Fujiwara T., Samaj J., Baluska F., Yang Z., Osawa H., Maeda T., Mori T., Volkmann D. & Matsumoto H. (2000) Aluminium-induced $\rightarrow 3\text{-}\beta\text{-D}$ -Glucan inhibits cell-to-cell trafficking of molecules through plasmodesmata. A new mechanism of aluminium toxicity in plants. *Plant Physiol.*, **124**, 991–1005.

Smeekens, J.C.M. (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **51**, 49-81.

Smith, C.J. (1996) Transley Review No. 86. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *New Phytol.*, **132**, 1-45.

Somssich, I.E. & Hahlbrock, K. (1998) Pathogen defence in plants - a paradigm of biological

complexity. *Trends in Plant Science*, **3**, 86-90.

Sonnewald, U., Brauer, M., von 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. *Plant J.*, **1**(1), 95-106.

Staub, J.M., Garcia, B., Graves, J., Hajdukiewicz, P.T.J., Hunter, P., Nehra, N., Paradkar, V., Schlittler, M., Carroll, J.A., Spatola, L., Ward, D., Ye, G. & Russell, D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotech.*, **18**, 333-338.

Stitt, M. (1990) Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **41**, 153-185.

Sturm, A. & Chrispeels, M.J. (1990) cDNA cloning of carrot extracellular β -fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection. *Plant Cell*, **2**, 1107-1119.

Susi, P. (2000) Dye-coupling in tobacco mesophyll cells surrounding growing tobacco mosaic tobamovirus-induced local lesions. *J. Phytopathol.*, **148**, 379-382.

Tang, X., Rolfe, S.A. & Scholes, J.D. (1996) The effect of *Albugo candida* (white blister rust) on the photosynthetic and carbohydrate metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment*, **19**, 967-975

Tavernier, E., Wendehenne, D., Blein, J.P. & Pugin, A. (1995) Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol.*, **109**, 1025-1031.

Técsi, L.I., Maule, A.J., Smith, A.M. & Leegood, R.C. (1994) Complex, localized changes in CO₂ assimilation and starch content associated with the susceptible interaction between cucumber mosaic virus and a cucurbit host. *Plant J.*, **5**, 837-847.

Thompson, W.F. & White, M.J. (1991) Physiological and molecular studies of light-regulated nuclear genes in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **42**, 423-466.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z.G., Wei, Y.D. & Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H₂O₂ in plants: H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J.*, **11**, 1187-1194.

Tiburzy, R. & Reisener, H.J. (1990) Resistance of wheat to *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*: association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin-like material and callose. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **36**, 109-120.

Tisdale, W.B. & Kelley, J.G. (1926) A *Phytophthora* disease of tobacco. *Fla. Agric. Exp. Stn. Bull.*, **179**, 159-219.

Tiwari, B.S., Belenghi B. & Levine A. (2002) Oxidative stress increased respiration and generation of reactive oxygen species, resulting in ATP depletion, opening of mitochondrial perme-

ability transition, and programmed cell death. *Plant Physiol.*, **128**, 1271-1281.

Topping, J.F. & Leaver, C.J. (1990) Mitochondrial gene expression during wheat leaf development. *Planta*, **182**, 399-407.

Tsukaya, H., Ohshima, T., Naito, S., Chino, M. & Komeda, Y. (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, **97**, 1414-1421.

Tucker, E.B. (1988) Inositol bisphosphate and inositol trisphosphate inhibit cell-to-cell passage of carboxyfluorescein in staminal hair cells of *Setcreasea purpurea*. *Planta*, **174**, 358-363.

Tucker, E.B. (1990) Calcium loaded 1,2-bis (2-aminophenoxy) ethane-*N N, N', N'*-tetra acetic acid blocks cell-cell diffusion of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea*. *Planta*, **182**, 34-38

Tucker, E.B. & Boss, W.F. (1996) Mastoparan-induced Ca²⁺ fluxes regulate cell-cell communication. *Plant Physiol.*, **111**, 459-467

Tucker, J.E., Mauzerall, D. & Tucker, E.B. (1989) Symplastic transport of carboxyfluorescein in staminal hairs of *Setcreasea purpurea* is diffusive and includes loss to the vacuole. *Plant Physiol.*, **90**, 1143-1147.

Turgeon, R. (1989) The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, **40**, 119-138.

Van Bel, A.J.E. & Oparka, K.J. (1995) On the validity of plasmodesmograms. *Bot. Acta.*, **108**, 174-182.

van Loon, L.C. & van Strien, E.A. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **55**, 85-97.

Vleeshouwers, V.G.A.A., van Dooijeweert, W., Govers, F., Kamoun, S. & Colon, L.T. (2000) The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta*, **210**, 853-864.

von Broembsen, S.L. & Deacon, J.W. (1996) Germination and further zoospore release from zoospore cysts of *Phytophthora parasitica*. *Mycol. Res.*, **100**, 1498-1504.

von Schaewen; A., Stitt, M., Schmidt, R. & Sonnewald, U. (1990) Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and *Arabidopsis* plants lead to inhibition of sucrose export, accumulation of carbohydrates and inhibition of photosynthesis, and strongly influences growth and habitus of transgenic tobacco plants. *EMBO Journal*, **9**, 3033-3044.

Ward, E.R., Uknes, S.J., Williams, S.C., Dincher, S.S., Wiederhold, D.L., Alexander, D.C., Ahl-Goy, P., Metraux, J.P. & Ryals, J.A. (1991) Coordinate Gene Activity in Response to Agents That Induce Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell*, **3**, 1085-1094.

Way, H.M., Kazan, K., Goulter, K.C. Birch, R.G. & Manners, J.M. (2000) Expression of

the Shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. *Mol. Plant Pathol.*, **1**(4), 223-232.

Weil, M., Krausgrill, S., Schuster, A. & Rausch, T. (1994) A 17-kDa *Nicotiana tabacum* cell-wall peptide acts as an in-vitro inhibitor of the cell-wall isoform of acid invertase. *Planta*, **193**, 438-445.

Weis, E. & Berry, J.A. (1987) Quantum efficiency of photosystem II in relation to 'energy'-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, **894**, 198-208.

Wright, D.P., Baldwin, B.C., Shepard, M.C. & Scholes, J.D. (1995) Source-sink relationships in wheat leaves infected with powdery mildew. II. Changes in the regulation of the Calvin cycle. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **47**, 255-267

Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R. & Lucas, W.J. (1991) Plasmodesmatal function is probed using transgenic tobacco plants that express a virus MP. *Plant Cell*, **3**, 593-604.

Yu, I.C., Parker, J. & Bent, A.F. (1998) Gene-for-gene disease resistance without the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* dnd1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 7819-7824.

Zeier, J., Pink, B., Mueller, M.J. & Berger, S. (2004) Light conditions influence specific defence responses in incompatible plant-pathogen interactions: uncoupling systemic resistance from salicylic acid and PR-1 accumulation. *Planta*, **219**, 673-683.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all den Menschen danken, deren fachliche und persönliche Unterstützung mir die Möglichkeit gegeben haben diese Arbeit durchzuführen und zu vollenden.

Herrn Prof. Dr. Engelbert Weis für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu können, seine stete Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen, die zahlreichen Ideen und Anregungen für diese Arbeit und besonders für den nötigen Freiraum den ich während meiner Arbeit hatte – wenngleich ich anmerken muss, dass ich diesen oftmals erst rückblickend zu schätzen gelernt habe.

Herrn Prof. Dr. Bruno Moerschbacher für die Übernahme des Koreferats, die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe den Umgang mit dem confokalen Laser Scanning Mikroskop zu erlernen und die gute Kooperation während meiner Diplomarbeit, die mein Interesse für phytopathologische Fragestellungen maßgeblich geprägt hat.

Frau Dr. Judith Scharte für die Zusammenarbeit bei der Entwicklung, Etablierung und Durchführung des Forschungsprojekts, welches einen Hauptteil dieser Arbeit darstellt, für zweieinhalb arbeits- und erfolgreiche Forschungsjahre mit vielen – oft hitzigen, aber immer produktiven – Diskussionen rund um das *Phytophthora*-Projekt, für die unermüdliche Arbeit an diesem gemeinsamen Projekt und für viele Ratschläge und Ideen für diese Arbeit.

Judith Scharte für viele lustige, lange Messtage, für die Motivation auch Durststrecken überwinden zu können – irgendwann gab es schließlich wieder Messbier –, für die kritische und kompetente Lektorenarbeit und die vielen erholsamen Pausen vom Laboralltag.

Ina Schmitz-Thom für die hervorragende Arbeit bei der Callose-Lokalisation am confokalen Laser Scanning Mikroskop, für die Messungen der G6PDH-Aktivität, die akribische Fehlersuche beim Manuskript und für viele erholsame Zigarettenpausen.

Jutta Essmann für ihre Mühen bei der Kohlenhydrat- und Invertase-Bestimmung, für einige leckere Kuchen – wenngleich der Apfelkuchen bis dato überfällig ist – und für den Kaffee, der oft genau zu Arbeitsbeginn fertig war.

Helmut Kirchhoff für seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft, viele nützliche Ratschläge, für sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für den vielen Kaffee, den er nie trank.

Marlene in der Stroth und Katja Pieper-Koners für viele schöne Gespräche und für die Gewissheit, dass, selbst wenn das Institut Kopf steht, man im Sekretariat immer freundlich empfangen wird.

Vielen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Weis und des Instituts für Botanik für eine zumeist tolle Arbeitsatmosphäre. Hier gilt mein besonderer Dank Silvia Haferkamp, Ute Mukherjee, Karin Topp, Werner Lamkemeyer, Mark-Aurel Schöttler, Julia Maurer, Sandra Wegner und Anette Wiedon.

Ulrike, Wilhelm, Karine, Philipp und Matthias Saure (bzw. Saure-Gustot) für Zuspruch, Rückhalt, Freundschaft und vieles, vieles mehr.

Meinen Freund(inn)en Antonia, Mike, Wolfgang, Pit, Nadine, Daniela, Twelle, Roland, Michael, Telle, Stilli, und Michaela für die schönen Stunden jenseits des Laboralltags und für viel Verständnis.

Der Frau, die es schon so lange mit einem konfusen Doktoranten wie mir ausgehalten hat und es hoffentlich auch nach der Promotion noch länger aushalten kann und will. Danke Annelie!

Lebenslauf

Name: Hardy Schön
Geboren am: 18.11.1973, in Hagen
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Name des Vaters: Siegfried Schön
Name der Mutter: Erika Schön, geb. Pfeiffer

Schulbildung: 1980-1984 Funcke-Grundschule, Hagen
1984-1993 Fichte Gymnasium, Hagen

Hochschulreife: 26.05.1993

Zivildienst: 01.06.1993 – 31.08.1994
Johanniter Unfall-Hilfe, Hagen

Studium: 15.09.1994 – 19.02.2001, Biologie
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Prüfungen: Diplom im Fach Biologie, 19.02.2001
Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Tätigkeiten: 01.03.2001 – 31.03.2005
Wissenschaftlicher Mitarbeiter/ wissenschaftliche Hilfskraft im Institut
für Botanik, AG Weis, Westfälische Wilhelms-Universität Münster

Dissertation: seit 01.03.2001, Institut für Botanik, Prof. Dr. Engelbert Weis

Einzelne Teile der vorliegenden Arbeit sind bereits in folgenden Publikationen veröffentlicht worden:

Schön, H., Scharte, J., Weis, E. (2004) Metabolic source – to – sink transition precedes defence during an incompatible interaction between *Phytophthora nicotianae* and source leaves of tobacco. I. Highly localized changes in plant primary metabolism. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig.

Scharte, J., Schön, H., Essmann, J., Weis, E. (2004) Metabolic source – to – sink transition precedes defence during an incompatible interaction between *Phytophthora nicotianae* and source leaves of tobacco. II. Changes in plant carbohydrate metabolism. Posterpräsentation, Tagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Braunschweig.

Scharte, J., Schön, H. & Weis, E. (2005) Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant, Cell and Environment*, **28** (11), 1421-1435.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Münster, 20. Oktober 2005

Hardy Schön