

Molekulargenetische Untersuchungen zur Reblausresistenz bei der Unterlagsrebe Börner

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Livia Andrea Blank
geb. am 04.08.1980 in Düren

Mainz, 2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einführung	1
1.1 Rolle der Reblaus im Weinbau.....	1
1.2 Reblausbefall	4
1.2.1 Anfällige und tolerante Rebsorten.....	4
1.2.2 Resistente Unterlagsrebsorte Börner	6
1.3 Reblausspeichel und seine cecidogene Wirkung.....	8
1.4 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen	10
1.5 Pflanzliche Hypersensitivitätsreaktion	12
1.5.1 Charakteristika der HR	12
1.5.2 Auslösung und Ablauf der HR	13
1.6 Methoden zur Genexpressionsanalyse	15
1.6.1 RT-PCR	15
1.6.2 Microarray-Analyse mittels der <i>Geniom one</i> Technik	18
1.7 Zielsetzung der Arbeit	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Labortechnik und Verbrauchsmaterialien	21
2.1.2 Biochemika.....	22
2.1.3 Kits und Vorschriften	25
2.1.4 Puffer und Lösungen	25
2.1.5 Software und Datenbanken	28
2.2 Pflanzenmaterial	28
2.2.1 Seitenwurzelbildung in einem unsterilen Wurzelkultursystem.....	28
2.2.2 Seitenwurzelbildung durch Kultivierung in Flüssigkultur in RITA-Gefäßen...	29
2.2.3 Induktion der Nekrosen- bzw. Gallenbildung durch Applikation von IES und Separation des Wurzelgewebes	31
2.3 Total-RNA Isolierung nach Baiges und Mas [2003].....	31
2.4 RNA-Proben und deren weitere Verwendung.....	32
2.5 cDNA Subtraktion.....	32
2.5.1 Vorbereitungen für die cDNA Subtraktion	32
2.5.2 cDNA Subtraktion	34
2.6 Microarrayanalyse der 90min Probe mittels Arabidopsis Chips.....	35
2.6.1 Präparation der Proben und Markierung mit Cy3 und Cy5.....	35
2.6.2 Hybridisierung der markierten Proben auf dem Microarraychip	36
2.6.3 Waschen und Scannen der Microarraychips	37
2.6.4 Datenauswertung der Microarraychips	37
2.7 cDNA-Synthese nach dem iScript™ cDNA Synthese Kit von BioRad	38
2.8 Design RT-PCR tauglicher Primer.....	38
2.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte.....	40
2.10 Sequenzierung von Börner, SO4 und Riesling-cDNA	41
2.10.1 Extraktion von cDNA Fragmenten aus elektrophoretischem Gel.....	41
2.10.2 Klonierung	41

2.10.3	Plasmidpräparation	42
2.10.4	Sequenzierung	43
2.10.5	Annotierung der Börner-Sequenzen	43
2.11	DNA-Amplifikation mittels Real-Time-PCR im iQ TM 5	43
2.11.1	Validierung interner Kontrollen zur quantitativen Genexpressionsanalyse	44
2.11.2	Ermittlung der Effizienzen von Zielgen und HK	44
2.11.3	Berechnung der normalisierten Expression	44
2.12	Microarrayanalyse mittels der <i>Geniom one</i> Technik	45
2.12.1	Verwendete ESTs	45
2.12.2	Versuchsaufbau der <i>Geniom one</i> Analysen	45
2.12.3	Färbung, Fragmentierung und Hybridisierung	47
2.12.4	Datenauswertung	47
3	Ergebnisse.....	49
3.1	Sammlung von Wurzelmaterial aus Börner-, SO4- und Rieslingreben	49
3.1.1	Seitenwurzelbildung in einem unsterilen Wurzelkultursystem	49
3.1.2	Seitenwurzelbildung in RITAs	49
3.2	Experimentelle Induktion der Nekrosenbildung an Seitenwurzeln von Börner durch IES	49
3.3	Kultursystem	49
3.3.1	RITA	49
3.4	RNA-Extraktion	50
3.5	cDNA-Synthese	50
3.6	cDNA-Subtraktion	50
3.7	Microarrayanalyse der 90min Börner Probe	52
3.8	<i>Geniom one</i> Analysen	54
3.8.1	,Chip a': Börner / Riesling, 90min IES Inkubationszeit	54
3.8.2	,Chip b': Börner / SO4, 90min IES Inkubationszeit	55
3.8.3	,Chip c': Börner / Riesling, 60min IES Inkubationszeit	57
3.8.4	,Chip d': Börner / Riesling, 30min IES Inkubationszeit	58
3.8.5	,Chip e': Börner / Riesling, 15min IES Inkubationszeit	59
3.8.6	,Chip f': Börner / Riesling, 7min IES Inkubationszeit	60
3.8.7	Zusammenfassung ,Chip a' - ,Chip f'	61
3.8.8	Vergleich der Kontrollproben von Börner und Riesling	64
3.9	Sequenzierungen	65
3.9.1	Börner ESTs	65
3.9.2	Vergleich der Sequenzen von Börner, SO4 und Riesling	67
3.10	Quantitative Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR / Validierung der <i>Geniom one</i> Ergebnisse	69
3.10.1	Effizienzen der Zielgene und HK	69
3.10.2	HK-Ermittlung	70
3.10.3	RT-PCR Analyse	71
3.10.3.1	Disease resistance protein (DRP)	71
3.10.3.2	Ethylene receptor (ETR)	72
3.10.3.3	Universal stress protein (USP)	73
3.10.3.4	P-Glykoprotein 1 (PGP1)	74
3.10.3.5	P-Glykoprotein 4 (PGP4)	75
3.10.3.6	Alcohol dehydrogenase (ADH)	75
3.10.3.7	Beta-1,3-glucanase	76
3.10.3.8	Chitinase	77
3.10.3.9	Ethylene response factor (ERF)	78

3.10.3.10	Glutathione S-transferase (GST)	79
3.10.3.11	Lipid transfer protein (LTP)	80
3.10.3.12	Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)	81
3.10.3.13	Proline-rich protein (PRP)	82
3.10.3.14	Ripening-related protein (Grip)	83
3.10.3.15	Stilbene synthase	83
3.10.3.16	Thaumatococcus-like protein (TLP)	84
3.10.3.17	Transcription factor, putative (TF)	85
3.10.3.18	Adventitious rooting related oxygenase (ARRO)	86
3.10.3.19	Alanine acetyl transferase	87
3.10.3.20	Chalcone synthase (CHS)	88
3.10.3.21	Lipoxygenase (LOX)	89
3.10.3.22	Methionine synthase (MS)	89
3.10.3.23	Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP)	90
3.10.3.24	Polyphenol oxidase (PPO)	91
3.10.3.25	Pathogenesis-related protein (PR)	92
3.10.3.26	Sucrose responsive element binding protein (SREBP)	93
3.10.3.27	Xyloglucan-transglycosylase (XT)	94
4	Diskussion	96
4.1	Verwendete Genexpressionsanalysen	96
4.1.1	cDNA Subtraktion und Microarray Analyse mittels Arabidopsis Chips	96
4.1.2	Genom one Analyse	97
4.1.3	RT-PCR	99
4.1.4	Vergleich der Methoden	101
4.2	Funktionen der Gene bei der HR in Börner	102
4.2.1	Auxintransport und P-Glykoproteine	102
4.2.2	Ethylen in der Pathogenabwehr	106
4.2.3	Phenylpropanoide und die Enzyme ihrer Biosynthese	113
4.2.4	Transkriptionsfaktoren	123
4.2.5	PR-Gene	129
4.2.6	Zellwandproteine	133
4.2.7	DRP und Hitzeschockproteine	137
4.2.8	Allgemein Stress-assoziierte Gene	140
4.3	Zusammenspiel der durch IES regulierten Gene im Resistenzmechanismus in Börner	145
5	Ausblick	149
6	Zusammenfassung	151
7	Abstract	152
8	Literatur	153
9	Anhang	165

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Reblausbefall anfälliger Weinreben.....	5
Abbildung 1.2:	Nekrosen an Blatt und Wurzel der Unterlagsrebe Börner	7
Abbildung 1.3:	Natürlich und künstlich induzierte Nekrosen bzw. Galle an Börner bzw. Riesling Wurzeln.....	9
Abbildung 1.4:	Beispiel von Schmelzkurven in der RT-PCR	16
Abbildung 1.5:	DNA-Prozessor des <i>Geniom one</i> Gerätes	18
Abbildung 1.6:	Ablauf der lichtaktivierten Oligonukleotidsynthese im <i>Geniom One</i>	19
Abbildung 2.1:	Unsteriles Wurzelkultursystem zum Austreiben von Seitenwurzeln nach El-Nady [2001]	29
Abbildung 2.2:	RITA-Gefäß zur Induktion des Seitenwurzelswachstums.....	30
Abbildung 2.3:	Probenbelegung auf dem DNA-Prozessor des <i>Geniom one</i>	46
Abbildung 3.1:	IES induzierte HR an Seitenwurzel von Börner	50
Abbildung 3.2:	cDNA-Subtraktion der 90min Börner Probe	51
Abbildung 3.3:	Wiederholung der cDNA-Subtraktion der 90min Börner Probe	52
Abbildung 3.4:	Microarray Chip_273, Subarray	53
Abbildung 3.5:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip a‘	54
Abbildung 3.6:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 90min IES Induktion	55
Abbildung 3.7:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip b‘	56
Abbildung 3.8:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und SO4 nach 90min IES Induktion	56
Abbildung 3.9:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip c‘	57
Abbildung 3.10:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 60min IES Induktion	58
Abbildung 3.11:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip d‘	58
Abbildung 3.12:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 30min IES Induktion	59
Abbildung 3.13:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip e‘	59
Abbildung 3.14:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 15min IES Induktion	60
Abbildung 3.15:	Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip f‘	60
Abbildung 3.16:	Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 7min IES Induktion	61
Abbildung 3.17:	Verteilung der Anzahl signifikant regulierter Gene über fünf IES	62
Abbildung 3.18:	<i>Condition Tree</i> der Kontrollproben von Börner und Riesling auf ‚Chip a‘ bis ‚Chip f‘	64
Abbildung 3.19:	Quantifizierungskurven des HK EF einer fünf-stufigen Verdünnungsreihe von unbehandelten Börner Wurzeln	69
Abbildung 3.20:	Effizienz der EF-Primer von Börner, SO4 und Riesling	70
Abbildung 3.21:	Durchschnittliche Expressionsstabilität (M) von vier HK im Probenpanel von Börner, SO4 und Riesling	71
Abbildung 3.22:	Quantitative Genexpressionsanalyse des DRP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln	72
Abbildung 3.23:	Quantitative Genexpressionsanalyse des ETR in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln	73
Abbildung 3.24:	Quantitative Genexpressionsanalyse des USP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln	73

Abbildung 3.25: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGP1 in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	74
Abbildung 3.26: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGP4 in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	75
Abbildung 3.27: Quantitative Genexpressionsanalyse der ADH in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	76
Abbildung 3.28: Quantitative Genexpressionsanalyse der beta-1,3-glucanase in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	77
Abbildung 3.29: Quantitative Genexpressionsanalyse der Chitinase in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	78
Abbildung 3.30: Quantitative Genexpressionsanalyse des ERF in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	78
Abbildung 3.31: Quantitative Genexpressionsanalyse des GST in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	79
Abbildung 3.32: Quantitative Genexpressionsanalyse des LTP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	80
Abbildung 3.33: Quantitative Genexpressionsanalyse der PAL in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	81
Abbildung 3.34: Quantitative Genexpressionsanalyse des PRP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	82
Abbildung 3.35: Quantitative Genexpressionsanalyse der Grip in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	83
Abbildung 3.36: Quantitative Genexpressionsanalyse der STS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	84
Abbildung 3.37: Quantitative Genexpressionsanalyse des TLP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	85
Abbildung 3.38: Quantitative Genexpressionsanalyse des putative TF in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	85
Abbildung 3.39: Quantitative Genexpressionsanalyse der ARRO in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	86
Abbildung 3.40: Quantitative Genexpressionsanalyse der AAT in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	87
Abbildung 3.41: Quantitative Genexpressionsanalyse der CHS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	88
Abbildung 3.42: Quantitative Genexpressionsanalyse der LOX in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	89
Abbildung 3.43: Quantitative Genexpressionsanalyse der MS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	90
Abbildung 3.44: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGIP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	91
Abbildung 3.45: Quantitative Genexpressionsanalyse der PPO in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	92
Abbildung 3.46: Quantitative Genexpressionsanalyse des PR in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	92
Abbildung 3.47: Quantitative Genexpressionsanalyse des SREBP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	93
Abbildung 3.48: Quantitative Genexpressionsanalyse des XT in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln.....	94
Abbildung 4.1: Zelluläres Modell des polaren.....	103

Abbildung 4.2:	Schema der Ethylenbiosynthese, Signal-transduktion und Pathogen bedingte Abwehrantwort.....	108
Abbildung 4.3:	Beteiligung wichtiger Enzyme in der Phenolpropanoid und Flavonoid Synthese	114
Abbildung 4.4:	Model des R-Protein abhängigen Krankheitsresistenz-Signalweges mit der Beteiligung des Hsp90	138
Abbildung 4.5:	Zelluläres Modell des Zusammenspiels der durch IES regulierten Gene und ihre mögliche Beteiligung in der HR bzw. bei der Reblausresistenz in Börner	146

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Beispiele für anfällig, tolerant und resistent reagierende <i>Vitis</i> -Arten und -Sorten auf einen Reblausbefall der Wurzeln	3
Tabelle 2.1:	RNA-Proben und deren weitere Verwendung in den Genexpressionsanalysen	32
Tabelle 2.2:	PCR-Ansatz zur Markierung der Proben mit Cy3 und Cy5.....	36
Tabelle 2.3:	Ansatz zur Hybridisierung der markierten Proben auf den Chips	36
Tabelle 2.4 :	Spezifische Primerpaare zur Amplifikation von Börner, SO4 und Riesling-cDNAs	38
Tabelle 2.5:	PCR-Ansatz zur Insertkontrolle	42
Tabelle 2.6:	PCR-Programm zur Insertkontrolle	42
Tabelle 2.7:	RT-PCR Programm zur quantitativen Expressionsanalyse	43
Tabelle 2.8:	Versuchsaufbau der <i>Geniom one</i> Analysen	46
Tabelle 3.1:	Microarrayergebnisse der 90min Börner Probe	53
Tabelle 3.2:	Signifikant differentiell exprimierte Gene in Börner und Riesling Wurzeln nach verschiedenen IES Induktionszeiten.....	63
Tabelle 3.3:	Isolierte und sequenzierte Börner-Sequenzen aus der 90min Probe zur Verifizierung der <i>Geniom one</i> Ergebnisse sowie als Grundlage für RT-PCR Analysen	66
Tabelle 3.4:	Prozentuale Übereinstimmung der Sequenzpaarungen der untersuchten Gene in Börner, SO4 und Riesling.....	68
Tabelle 9.1:	Fold change Werte der differentiell regulierte Gene in der <i>Geniom one</i> Analyse in IES behandelten Wurzeln von Börner und Riesling.....	165
Tabelle 9.2:	Gene mit signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Proben von Börner (B K) und vom Riesling (R K)	165
Tabelle 9.3:	RT-PCR Effizienzen der analysierten Gene in Börner, SO4 und Riesling	165
Tabelle 9.4:	<i>Relative Quantitiy</i> (QR) der verwendeten HK in Börner, SO4 und Riesling	165
Tabelle 9.5:	Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse in unbehandelten und IES behandelten Wurzeln von.....	165

Abkürzungsverzeichnis

AAT	<i>alanine acetyl transferase</i>
ABA	<i>abscisic acid</i>
Abb.	Abbildung
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACC	1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure
ADH	<i>alcohol dehydrogenase</i>
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methions
AP2/EREBP	<i>ethylene-responsive-element-binding protein</i>
ARRO	<i>adventitious rooting related oxygenase</i>
ASR	<i>abscisic stress ripening protein</i>
Avr	Avirulenz
bp	Basenpaar
C ₂ H ₄	Ethylen
Ca ²⁺	Calcium
CBF	<i>C-repeat-binding factor</i>
CC	<i>coiled-coil</i>
CHORD	<i>cystein and histidine-rich domain</i>
CS	<i>CHORD and SGT1 motif</i>
CSN	<i>COP9 signalosome</i>
CT	<i>Crossing Point</i>
CTR	<i>constitutive tripleresponse</i>
Cy3	Cyanin 3
Cy5	Cyanin 5
DEPC	Diethylpyrocarbonat
deion	deionisiert
dest	destilliert
DFCI	<i>Computational Biology and Functional Genomics Laborator</i>
DHN	<i>dehydrin-like protein</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxy ribonucleic acid</i>
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DRP	<i>disease resistance protein</i>
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF	Elongation Faktor 1-α
EIN	<i>ethylene insensitive</i>
ERF	<i>ethylene response factor</i>
ERS	<i>ethylene response sensor</i>
EtOH	Ethanol
ETR	Ethylenrezeptor
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GNAT	<i>GCN5-related N-acetyltransferase</i>
Grip	<i>ripening-related protein</i>
GSH	Glytathion
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
H ₂ O ₂	Hydrogenperoxid
HCL	Salzsäure

HK	<i>housekeeping gene</i>
HPLC	<i>high-performance-liquid-chromatography</i>
HR	Hypersensitivitätsreaktion
HRGP	Hydroxyprolin-reichen Glycoproteine
HRS	Hsp90-RAR1-SGT1
Hsp90	<i>Heat-shock protein 90</i>
IBA	Indol-3-Buttersäure
IES	Indol-3-Essigsäure
IPTG	Isopropyl-D-thiogalactosid
JA	<i>jasmonic acid</i>
K ⁺	Kalium
LB	Luria-Bertani
LiCl	Lithiumchlorid
LOX	<i>lipoxygenase</i>
LRR	<i>leucin rich repeats</i>
LTP	<i>Lipid transfer protein</i>
M	durchschnittliche Expression-Stabilität
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinasen
MAPKKS	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinases</i>
MeJA	Methyl-JA
MES	<i>morpholinoethansulfon acid, free acid monohydrate</i>
MgCl	Magnesiumchlorid
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS	<i>methionine synthase</i>
N ₂ EDTA	N2-Ethylendiamintetraessigsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NBS	Nukleotidbindungsstelle
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NE	<i>Normalized Expression</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NTD	N-terminales ATP-bindendes Modul
O ²⁻	Superoxid
PAL	<i>phenylalanine ammonia-lyase</i>
PCD	<i>programmed cell death</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PG	Polygalacturonase
PGIP	<i>polygalacturonase inhibiting protein</i>
PGP1	P-Glykoprotein 1
PGP4	P-Glykoprotein 4
PIN	<i>pin-formed</i>
ppGpp	<i>guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate</i>
PPO	<i>polyphenol oxidase</i>
PR	<i>pathogen related</i>
PRP	<i>rolin-rich protein</i>
QR	<i>quinone reductase</i>
QR	<i>Relative Quantity</i>
R	Resistenz
RAN	<i>responsive to antagonist</i>

RAR1	<i>required for Mla12 resistance</i>
RITA	<i>Récepteur à Immersion Temporaire Automatique</i>
RNA	<i>ribo nucleic acid</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	<i>Real-Time</i>
SA	<i>salicylic acid</i>
SAM	<i>S-Adenosyl-L-Methionin</i>
SAR	<i>systemic acquired resistance</i>
SCF	<i>stem-cell factor</i>
SD	<i>Standardabweichung</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
Ser/Thr	<i>Serin/Threonin</i>
SGT1	<i>suppressor of G-two allele of skp</i>
SGT1	<i>specific domain</i>
SO4	<i>Selektion Oppenheim</i>
SREBP	<i>sucrose responsive element binding protein</i>
SSC	<i>sodium saline citrate</i>
STS	<i>stilbene synthase</i>
TF	<i>Transkriptionsfaktor</i>
TIR	<i>toll/interleukin-1-receptor</i>
TLP	<i>thaumatin-like protein</i>
TMV	<i>Tabakmosaikvirus</i>
TRP	<i>tetratrico peptide repeat</i>
Ub	<i>Ubiquitin</i>
USP	<i>universal stress protein</i>
UV	<i>Ultraviolett</i>
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	<i>5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-b-D-Galactopyranosid</i>
XT	<i>xyloglucan-transglycosylase</i>

1 Einführung

1.1 Rolle der Reblaus im Weinbau

Die Reblaus (*Dactylosphaera vitifolii* FITCH), ein Insekt der Ordnung Pflanzenläuse (*Homoptera*), Unterordnung Blattläuse (*Aphidina*), gehört zur Familie der Zwerggläuse (*Phylloxeridae*). Sie wurde Mitte des 19. Jahrhunderts mit bewurzelten amerikanischen Weinreben nach Europa eingeführt und befiel Wurzeln europäischer Kulturreben (*Vitis vinifera*). In Deutschland wurde sie 1874 entdeckt. Nachdem sie knapp drei Viertel der gesamten Rebflächen Europas vernichtet hatte [Seeliger, 1933] wurde die Reblaus Anfang des 20. Jahrhunderts auch weltweit ein erstzunehmender Rebschädling.

Als oviparer, monözischer Parenchymsauger unterscheidet sich das Insekt von anderen Familien der Unterordnung Aphidina durch die Rückbildung des Afters sowie das Fehlen von Siphonen [Kellow, 2004]. Die Bildung von Honigtau ist daher ausgeschlossen. Der Entwicklungszyklus der Reblaus ist holozyklisch, wonach ein Wechsel zwischen parthenogenetisch fortpflanzenden Generationen und sexuellen Generationen mit einem Wirtswechsel zwischen Spross und Wurzel der Rebe statt findet. Im Frühjahr schlüpft aus dem so genannten Winteri die Maigallenlaus (Fundatrix) [vgl. hierzu und dem Folgendem Schirra, 1999 und Vogt und Schruft, 2000]. Durch den Anstich von jungen, noch nicht entfalteten Blättern von Reben mit amerikanischem Erbgut induziert die Fundatrix die Maigalle, in die sie mehrere hundert Eier ablegt, aus denen Blattrebläuse, die Gallicolen, schlüpfen. Diese wandern auf die jetzt jüngsten Blätter und bilden dort neue Gallen. Es folgen weitere drei bis fünf Generationen von Blattrebläusen, die teilweise durch Wind auf benachbarte Rebstöcke verfrachtet werden und dort neue Befallsherde bilden. Nach der zweiten Generation entwickelt sich ein morphologisch unterschiedlicher Teil der Läuse zu weiblichen Wurzelrebläusen (Radicicolen). Er wandert im Verlauf der Vegetationsperiode in den Wurzelbereich ab. Dort stechen sie Rebwurzeln an und saugen an ihnen. Beim Anstich in die Streckungszone junger Wurzelspitzen bilden sich Gewebewucherungen in Form von Gallen, die als Nodositäten bezeichnet werden. An älteren verholzten Wurzeln führt der Anstich zu Anschwellungen der Wurzel, sogenannten Tuberositäten. Dort pflanzen sie sich parthenogenetisch über vier bis sechs Generationen fort. Einige der Wurzelläuse entwickeln sich gegen Ende des Sommers zu geflügelten Weibchen (Sexuparen), die zwei verschiedene Eitypen auf die Rebstöcke legen, aus denen sich Männchen und Weibchen entwickeln. Diese überleben nur wenige Tage und dienen allein der geschlechtlichen Fortpflanzung. Nach der Paarung der Geschlechtstiere

(Sexuales) legt das Weibchen ein einziges befruchtetes Winterei unter die Rinde, aus dem dann die Maigallenlaus schlüpft. Dieser vollständige Zyklus der Reblaus kann auf Unterlagsreben und Amerikanerreben beobachtet werden. Der Lebenszyklus auf den Europäerreben ist einfacher, da die Rebläuse fast nur als Wurzelläuse im Wurzelbereich leben und überwintern. Trotz der Wintereiablage durch Geschlechtsstiere können sich die Blattrébläuse auf deren Blattwerk nicht richtig entwickeln und bilden keine Nachkommen.

Auf einen Reblausbefall reagieren die einzelnen Rebsorten unterschiedlich. Deswegen differiert man in anfällige, tolerante und resistente Sorten. Während die erste Gruppe sowohl Blatt- als auch Wurzelgallen bildet, kommt es bei den toleranten Sorten entweder zur Bildung von Wurzel- oder von Blattgallen. Die Gruppe der resistenten Rebarten bildet weder Blatt- noch Wurzelgallen [Wapshere und Helm, 1987]. Die Wortbedeutungen Resistenz und Toleranz werden in der Arbeit entsprechend den von Roy und Kirchner [2000] getroffenen Definitionen verwendet. Während die Toleranz die Fähigkeit beschreibt, den Befall mit der Reblaus ohne Beeinträchtigung ihrer Leistungsfähigkeit zu überstehen, verfügt die resistente Weinrebe über einen genetischen Anlagenkomplex, die Besiedlung mit dem Parasiten zu verhindern oder zu reduzieren. Die aus dem Ursprungsland der Reblaus kommenden Amerikanerreben zeigen eine hohe Anfälligkeit gegenüber Gallicolen. Bei einem Befall der Blätter kommt es zu einer ausgeprägten Gallenbildung, die die Vitalität der Pflanze aber kaum beeinträchtigt. Eine Infektion der Wurzeln führt meist nur zu einer Entwicklung von Nodositäten. Anders als Tuberositäten haben diese so kaum Folgen für die Rebe [Schmid et al., 1999]. Zu den toleranten Reben zählen die Wildarten *Vitis berlandieri*, *Vitis riparia* und *Vitis rupestris*. Zudem gibt es Amerikanerreben, wie z.B. die Wildtypen *Vitis rotundifolia* und *Vitis cinerea*, die eine vollständige Reblausresistenz aufweisen [Schmid et al., 1999]. Eine anfällige Art stellt die Europäerrebe *Vitis vinifera* dar. Ihr Blattwerk gilt als „feldresistent“ [Presser, 1993]. Trotzdem sind die Wurzeln stark anfällig gegenüber einem Befall mit Radicolen. Besonders die Bildung von Tuberositäten an älteren Wurzelbereichen führt zu einem erheblichen Vitalitätsverlust der Pflanze, die den Wurzelstock oft absterben lässt [Presser, 1993].

Eine Bekämpfung der Reblaus mit Pestiziden gestaltet sich als schwierig. Besonders die im Boden lebenden Reblausarten stellen eine große Gefahr für den Weinbau dar. Aus diesem Grund greift man auf die Rebenveredlung zurück. Mit dem Pfropfrebenanbau bietet sich die Möglichkeit, die Toleranz bzw. die Resistenz der *Vitis*-Arten und -Sorten im Kampf gegen die Reblaus zu nutzen. Pfropfreben werden durch Pfropfung von Rebholz zweier unterschiedlicher Genotypen gewonnen. Das Edelreis, das von einer *Vitis vinifera* Sorte stammt,

und eine Toleranz gegenüber den Gallicolen aufweist, bildet den Spross (Hyperbiont). Den Wurzelstock oder die Unterlage (Hypobiont) bilden Kreuzungen aus Amerikanerreben, die tolerant auf den Befall mit Radicicolen reagieren [Schmid et al., 1999].

In den letzten Jahrzehnten wurden in Deutschland vornehmlich Unterlagsrebsorten verwendet, welche aus der Selektion von Kreuzungen der Berlandieri x Riparia Gruppe abstammen, z.B. SO 4, 5 BB, 5 C, 125 AA, 8 B. Zu den wenigen hierzulande zugelassenen vollständig reblausresistenten Unterlagsreben zählt neben den Sorten „Rici“ und „Cina“ auch die Sorte „Börner“ [Porten und Hoffmann, 2004]. Sie ist eine Kreuzung zweier amerikanischer Wildreben, nämlich *Vitis riparia* 183 Geisenheim und *Vitis cinerea* Arnold [Schmid et al., 1999]. Auf einen Reblausanstich reagiert die Kreuzung mit der Bildung von lokalen Blatt- oder Wurzelnekrosen, Gewebewucherungen unterbleiben [El-Nady, 2001, Hopp, 1955]. Es handelt sich dabei um die sogenannte Hypersensitivitätsreaktion (HR). An diesen Nekrosen kann sich die Reblaus weder ernähren noch vermehren. Folglich wandert sie ab oder verhungert an der Einstichstellen [Anders, 1957; Börner, 1943, Niklowitz, 1955].

Tabelle 1.1 gibt Beispiele von Rebarten und Rebsorten, die anfällig, tolerant oder resistent auf einen Reblausbefall an Wurzeln reagieren. Damit fasst sie die für die Untersuchung relevanten Sorten zusammen und bringt sie in eine entsprechende Struktur.

<i>Resistenztyp</i>	<i>anfällig</i>	<i>resistent</i>	
		<i>tolerant</i>	<i>vollständig resistent</i>
<i>Nodositäten</i>	+	+	-
<i>Tuberostäten</i>	+	-	-
<i>Art/Bastard</i>	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Vitis berlandieri</i> x <i>Vitis riparia</i> x <i>Vitis rupestris</i>	<i>Vitis cinerea</i> Arnold x <i>Vitis rotundifolia</i>
<i>Sorte</i>	Riesling	SO4	Börner

Tabelle 1.1: Beispiele für anfällig, tolerant und resistent reagierende *Vitis*-Arten und -Sorten auf einen Reblausbefall der Wurzeln

Mit der Rebenveredelung gelang zunächst eine weitestgehende Eindämmung der Reblausinfektionen in Deutschland. In letzten Jahren ist aber wieder ein Anstieg beim Befall mit Rebläusen festzustellen [Schirra, 1999; Presser, 1993]. Zunehmend sind auch an Europäerreben

in großer Anzahl Blattgallen gefunden worden. Diese Blattgallen verursachen keinen unmittelbaren Schaden, doch weisen sie auf hohe Reblausdichten in den Böden der direkten Umgebung hin. Gründe für die Wiederausbreitung des Schädling sind vielfältig. Ihren Beitrag leisten veränderte Klimabedingungen, Bodenverdichtung durch Mechanisierung und unzureichende Weinbergspflege [Hermann, 1995; Schirra, 1999; Presser, 1993]. Auf unbewirtschafteten Flächen oder am Rande von Weinbergen kann es zudem zu Stockausschlägen der Amerikanerreben kommen, die durch ihre ausgeprägte Blattgallenbildung die Reblausverbreitung fördert. Ferner trägt der (in Deutschland zwar verbotene) Wiederaufbau wurzelreicher Europäerreben zu einer Verbreitung der Rebläuse bei. Schließlich sind diese Reben stark anfällig was den Befall mit Radicolen betrifft [Porten und Hoffmann, 2004]. Auch das Vorkommen von aggressiven Reblausbiotypen wird als ein Grund für die Zunahme der Reblausherde diskutiert [Presser, 1993; Schruft, 1992]. Die Unterlagsrebe Börner ist zwar resistent gegen Rebläuse, aber nicht kalktolerant und chloroseanfällig. Sie ist deshalb nicht für alle Standorte und Böden gleichermaßen geeignet [Schwab, 2006].

1.2 Reblausbefall

1.2.1 Anfällige und tolerante Rebsorten

Bei einem Befall der Blattoorgane wandern Blattrebläuse zu den Triebspitzen und stechen mit ihrem Stechorgan, dem Stechborstenbündel, in noch nicht ausdifferenzierte Blätter ein [vgl. hierzu und dem Folgendem Anders, 1957, Becker und Brückbauer, 1955, Niklowitz, 1955, Sterling, 1952]. Hierbei erfolgt der Einstich bevorzugt von der Blattoberseite und in der Nähe eines größeren Blattnerves. Das Stechborstenbündel erreicht meist die zweite oder die dritte Zellschicht, aus der sich regulär das Palisaden- bzw. das Schwammparenchym entwickelt. Bei fortschreitender Saugtätigkeit der Reblaus zeigt sich um das Reizfeld des Einstichs eine erhöhte perikline Zellteilung mit nachfolgender Hypertrophie des primär meristematischen Gewebes. In den Zellen in unmittelbarer Nähe des Einstichs hingegen kommt es zu keiner weiteren Zellteilung. Es bildet sich eine sogenannte Hemmzone aus. Im weiteren Verlauf der Gallenbildung kommt es zur Bildung eines zusätzlichen, sekundärem Meristem, das als Gallmeristem bezeichnet wird. Dieses hält den Prozess der Zellteilung aufrecht und verstärkt ihn sogar. Wegen der Wachstumshemmung im direkten Umfeld des Einstiches und der Wachstumsförderung im weiter entfernten Reizfeld beult sich das Gewebe ringförmig um die Reblaus herum. In der so entstehenden Larvenhöhle beginnt sich die Reblaus zu vermehren. Mit Abschluss des Wachstums der Galle nach etwa 14 Tagen beträgt ihr Umfang unge-

fähr 35 bis 50 Zellschichten. Abbildung 1.1 a) zeigt solche ausgereifte Gallen auf einem Weinrebenblatt. In dem Bereich, der unmittelbar an das Reizfeld angrenzt, sind stoffliche Veränderungen der Zellen zu beobachten. Es kommt schließlich zu einer Herausbildung einer nutritiven Zone, die eine hohe Einlagerung von Stärke zeigt. Nach Kellow et al. [2004] dient diese nutritive Zone dem Parasit als Nährstoffquelle.

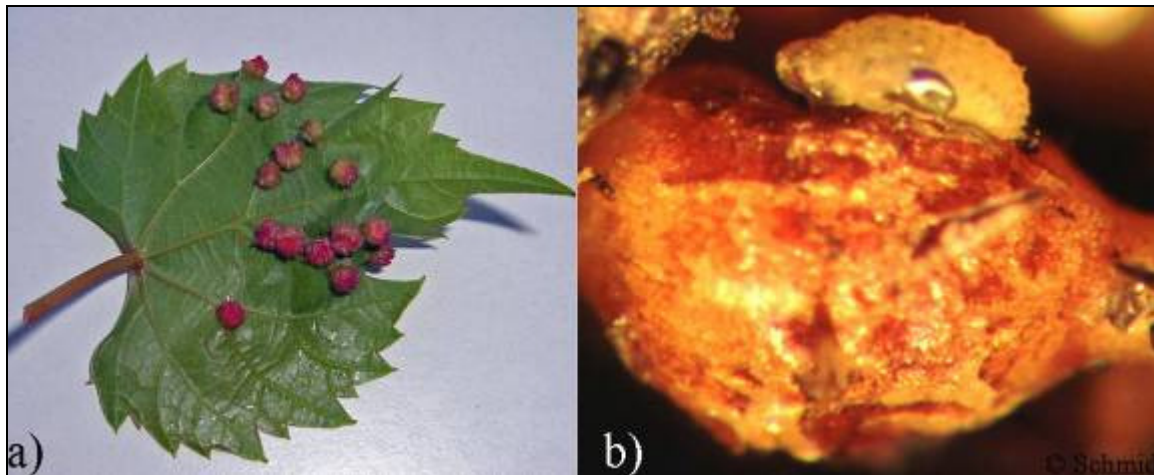


Abbildung 1.1: Reblausbefall anfälliger Weinreben

a) Gallen an Rebblatt, b) Galle an Rebwurzel

(Quelle: Abb. a) eigene Abbildung., Abb b) Dr. J. Schmid, Forschungsanstalt Geisenheim)

Anders als beim Befall von Blättern sticht die Wurzelreblaus bei einem Befall junger Wurzeln mit ihrem Stechborstenbündel nicht in die zweite bis dritte, sondern meist in die dritte bis vierte Zellschicht meristematischen Gewebes der Wurzelspitze ein. Besonders häufig ist der Einstich in dem Übergangsbereich vom Meristem zum Bereich der Streckungszone zu beobachten. Ähnlich wie bei der beschriebenen Gallenbildung an Blättern bildet sich im näheren Umfeld des Einstichs eine Hemmzone aus. Entfernt von dem Reizfeld liegende hingegen durchlaufen ein Streckungswachstum. Durch das Anschwellen des Wurzelgewebes (vgl. Abb. 1.1 b) auf der gegenüberliegenden Seite des Einstichs und der Hemmung der Zellteilung im unmittelbaren Reizfeld kommt es zu einer Krümmung der Wurzelspitze. In dieser Krümmung eingeschlossen befindet sich die Reblaus. Anders als bei den Blattgallen kommt es im Nodositätengewebe nicht zu einer Ausbildung eines sekundären Meristems. Auch bleibt die Anzahl der Zellschichten hier konstant. Dahingegen kann wie bei den Blattgallen die Entwicklung einer mit Stärke angereicherten nutritiven Zone im nahen Umkreis der Anstichstelle beobachtet werden. Ungefähr nach zwei Wochen ist die Nodosität komplett ausgebildet. Meistens erliegt sie jedoch nach weiteren drei bis vier Wochen dem Fäulnisprozess

durch sekundäre Infektionen. Das Absterben der betroffenen Wurzelspitzen führt in den meisten Fällen nicht zur wesentlichen Beeinträchtigungen der Pflanze, da sich über die restlichen Wurzelbereich ausreichend mit Wasser und Nährstoffen versorgen kann.

Ältere, bereits verholzte Wurzeln werden nicht von einzelnen Rebläusen, sondern von einer ganzen Kolonie befallen. Die Reblaus dringt mit ihrem Stechborstenbündels in die vierte bis sechste Zellschicht des Rindenparenchyms ein. Unter Wirkung des Reblausstiches reagiert das interfazikuläre sowie zu Teilen das faszikuläre Kambium mit einer Hyperplasie und nachfolgender Hypertrophie. Ähnlich wie bei der Entstehung von Blattgallen kommt es zur Bildung eines sekundären Gallmeristems. Dieses hält die Zellenneubildung aufrecht und fördert sie zudem. In Folge des starken Zellwachstums kommt es zu einer Hervorwölbung des Rindeparenchyms, das im weiteren Verlauf der Tuberositätenbildung zum Aufplatzen des äußeren Korkmantels führt. Es kommt schließlich zur Bildung einer tumorösen, offenen Galle. Analog zu den Blattgallen und Nodositäten bildet sich eine stärkehaltige, nutritive Zone im engeren Reizfeld der Einstichstelle aus. Die Tuberositäten unterliegen nach einiger Zeit Sekundärinfektionen. Daraufhin setzen Fäulnisprozesse ein, die zum Absterben größerer Wurzelbereiche führen. Die Folge ist eine beeinträchtigte Wasser- und Nährstoffaufnahme, die bis hin zum Absterben des Rebstockes führen kann.

Die Ausprägungen der Reaktionen auf den Reblausbefall unterscheiden sich bei anfälligen und toleranten Reben. Tolerante Sorten bilden an Blättern lediglich unterentwickelter Zwerggallen aus, deren Entwicklung in einem frühen Stadium unterbrochen wird [Anders 1957]. Auch die Tuberositätenbildung verkraften tolerante Unterlagen wesentlich besser. Im Gegensatz zu anfälligen Reben bilden sie unterhalb einer Tuberosität mehrere Lagen eines verkorkten Wundperiderms aus [Sopp et al., 1997]. Damit wird das Eindringen der Fäulnis in das zentrale Gefäßsystem der Wurzel unterbunden.

1.2.2 Resistente Unterlagsrebsorte Börner

Im Gegensatz zu den anfälligen und toleranten Reben reagiert die reblausresistente Unterlagsrebe Börner auf einen Reblausbefall mit der Ausbildung von Nekrosen an der Einstichstelle [Anders 1957; Börner, 1943; Niklowitz, 1954; Schäller, 1960]. El-Nady [2001] untersuchte die Nekrosenbildung an Blättern und Wurzeln von Börner eingehender. Er fand heraus, dass verschiedene Nekrosetypen nach der Gewebedifferenzierung unterschieden werden müssen. Bei einer Nekrose vom Typ I sticht die Reblaus in wenig ausdifferenziertes Wurzelgewebe oder in junge, noch nicht entfaltete Blätter. Nach fünf Stunden kam es zu plasmolysierten Zellen im Einstichbereich. Anschließend konnte er die Einlagerung von phenoli-

schen Substanzen beobachten. Etwa 12 bis 24 Stunden nach dem Reblauseinstich starben die Zellen im Einstichbereich ab und bildeten eine Nekrose (vgl. Abb. 1.2).

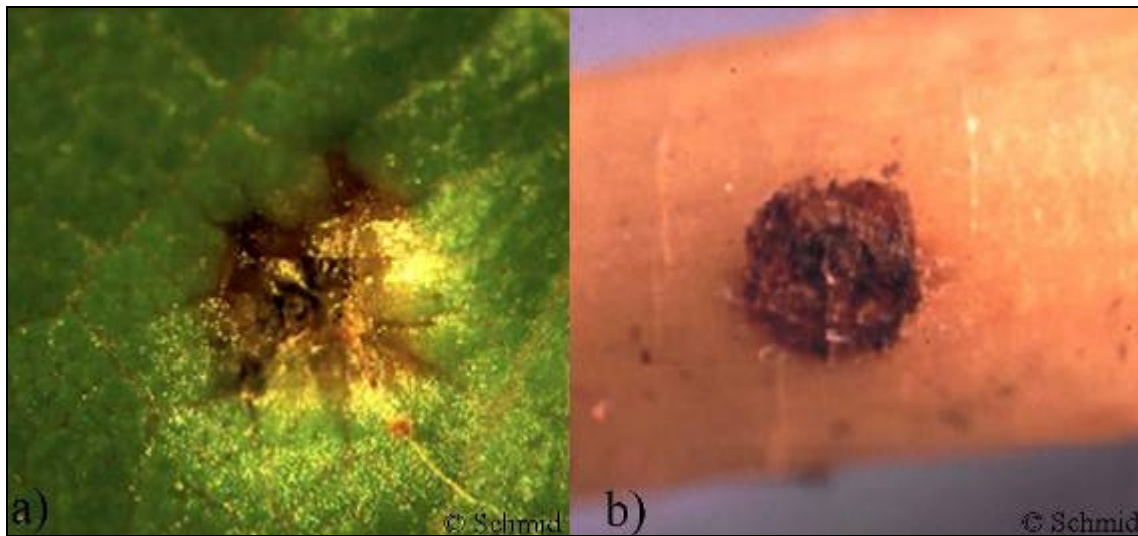


Abbildung 1.2: Nekrosen an Blatt und Wurzel der Unterlagsrebe Börner
a) Blattnekrose, b) Wurzelnekrose
(Quelle: Abb. a) eigene Abb., b) Dr. J. Schmid, Forschungsanstalt Geisenheim)

Stechen die Rebläuse im Streckungszonenbereich stärker differenzierter Wurzeln ein, bildet sich eine Nekrose des Typs II. Durch die Rüsselspitze der Reblaus wurden die Zellwände, die Cytoplasmen sowie die Plasmamembranen der durchstochenen Zellen zerstört. Die Zellen starben ab und bildeten einen Einstichkanal. Etwa 12 Stunden nach dem Reblausanstich kam es zur Braunfärbung um die Einstichstelle. Die Zellreihe im direkten Umfeld des Anstichs starb ab. Die Zellen der daran angrenzenden Zone blieben zunächst lebensfähig, plasmolysierten aber und zeigten die typischen Symptome, die beim *programmed cell death* (PCD) auftreten. Dazu zählte ein fragmentierter Nukleus, granulöse Strukturen des Cyto- und Kernplasmas sowie Blasenbildung an der inneren Kernmembran. Die Einlagerung von phenolischen Substanzen in die plasmolysierten Zellen konnte El-Nady [2001] nach etwa 24 Stunden beobachten. Daraufhin starben die Zellen ab. Im Kontaktbereich zwischen den abgestorbenen Zellen und dem gesunden Gewebe kam es zur Verdickung der Zellwände durch Einlagerung von Suberin. Diese Zellwandmodifikationen scheinen eine Isolierung des gesunden Gewebes von dem infizierten, nekrotisierten Gewebe darzustellen. Das Absterben aller Zellen im Nekrosebereich zwei bis fünf Tage nach dem Reblausanstich ist daher vermutlich auf eine Wasser- und Nährstoffunterversorgung im Nekrosebereich aufgrund der Isolation zum gesunden Gewebe zurückzuführen.

Bei der Entwicklung von Blattnekrosen vom Typ II konnte El-Nady [2001] ähnliche Beobachtungen machen. Ausgangspunkt war der Einstich der Rüsselspitze der Reblaus in gerade entfaltete Blätter. Das Zellwachstum der Zellen im Einstichbereich wurde aktiviert und die Einstichstelle verdickt. Je nach Ausmaß der Differenzierung des Blattgewebes konnte er unterschiedliche Entwicklungen feststellen. Bei sehr jungen Blättern wurden phenolische Substanzen in die gesunden Zellen unmittelbar neben dem Einstichbereich eingelagert und die Zellen starben aufgrund einer Wasser- und Nährstoffunterversorgung ab. Bei etwas älteren Blättern konnte er im Ansatz ähnliche Entwicklungen wie bei den anfälligen und toleranten Reben beobachten. So kam es zur Bildung einer Hemmzone in angrenzenden Zellzonen. Gleichzeitig wurde das Teilungs- und Streckungswachstum in weiter entfernten Bereichen aktiviert, wodurch eine Verdickung des betroffenen Gewebes hervorgerufen wurde. El-Nady [2001] konnte hier außerdem eine Bildung von rudimentären Gallen verzeichnen. Da es aber außerhalb der Gallen zur Plasmolysierung der Zellen, zur Einlagerung von phenolischen Substanzen und schließlich zum Absterben der Zellen kam, wurde die Galle nicht mit Nährstoffen und Wasser versorgt. Eine Eiablage des Schädling blieb demnach aus. Im Kontaktbereich zu dem gesunden Gewebe stellte er eine Einlagerung von Lignin fest, so dass ähnlich wie die Einlagerung von Suberin in den Wurzeln eine Nähr- und Wasserversorgung in dem betroffenen Bereich unterbunden wurde. Nach zwei bis 20 Tagen starben die Zellen ab und es bildeten sich Blattnekrosen vom Typ II aus. El-Nady [2001] schloss aus seinen Analysen, dass die Unterlagsrebsorte Börner in den Wurzeln ein höheres Abwehrpotential aufweist als in den Blättern.

1.3 Reblausspeichel und seine cecidogene Wirkung

Untersuchungen zu den Inhaltsstoffen des Reblausspeichels wurden schon in den 1950iger Jahren unternommen. Zunächst wurde durch Papierchromatographie herausgefunden, dass eine Reihe von Aminosäuren, phenolischen Substanzen, proteolytische Enzyme sowie das Pflanzenwachstumshormon IES im Speichel der Reblaus vorhanden ist [Anders, 1958; Schäller, 1960, 1963, 1965, 1968a, b]. Dazu wurden die Insekten auf ein angefeuchtetes Filterpapier gesetzt, in das sie ihren Speichel abgaben. Aminosäuren konnten auch Madhusudan und Miles [1998] in einer wässrigen Probe des Reblausspeichels nachweisen. Versuche, bei denen Gemische dieser Aminosäuren auf Weinreben appliziert wurden, zeigten eine Gallenbildung, die mit der nach einem Reblausbefall vergleichbar, aber wesentlich kleiner war [Anders, 1957, 1958; Schäller, 1960, 1963, 1968a]. Schäller [1963, 1968a] fand des Weiteren heraus, dass die Gesamtkonzentration der Aminosäuren im Speichel der Reblaus vergli-

chen mit anderen Aphidenarten am höchsten ist. Als Begründung dafür nannte er die andersartige Anatomie der Reblaus. Im Verlauf der Entwicklung zum erwachsenen Tier wird die Afteröffnung verschlossen. So kommt es nicht wie bei anderen Aphiden zur Bildung von Honigtau, mit dem sonst die Aminosäuren ausgeschieden werden. Eine direkte Beziehung zwischen dem Aminosäuregehalt und der Phytopathogenität schloss er daher aus. Neben den Aminosäuren konnte man phenolische Substanzen und proteolytische Enzyme im Reblaus-speichel nachweisen. Anders [1959] und Schäller [1968a] schlossen aber eine cecidogene Beteiligung dieser Substanzen aus, da sie vermutlich eher der Ernährung der Reblaus an der Pflanze dienen.

Die bedeutendste cecidogene Komponente im Speichel der Reblaus ist die IES [Schäller, 1965, 1968a, b]. Erst mit einem Gemisch aus Aminosäuren und IES konnten Gallen an Reben erzeugt werden, die in ihrer Größe und Umfangs denen nach einem Reblausbefall entsprachen. Wie er weiter herausfand kommt IES nicht bei allen Aphiden im Speichel vor. Eine von Schäller [1968a] durchgeführte Bestimmung des IES Gehaltes im Speichel des Schädling ergab eine Konzentration, die im optimalen Wachstum fördernden Bereich des Hormons von 10^{-5} Mol/l lag. In diesem Zusammenhang konnte er zeigen, dass es eine positive Korrelation zwischen dem IES Gehalt im Speichel und der Wachstumsveränderung an der Pflanze gibt. Aphiden mit einem höheren Gehalt an IES im Speichel verursachten demnach größere Gallen an Pflanzen.

El-Nady [2001] führte entsprechende Versuche mit der reblausresistenten Sorte Börner und den tolerant oder anfalligen Sorten SO4 und Riesling durch. Er konnte zeigen, dass eine Behandlung mit 0,001 bis 0,1 % IES alleine ausreicht, um Nekrosen an Börner Wurzeln bzw. Gallen an Wurzeln von SO4 und vom Riesling zu erzeugen, die denen nach einem natürlichen Reblausbefall entsprachen (Abb. 1.3).



Abbildung 1.3: Natürlich und künstlich induzierte Nekrosen bzw. Galle an Börner bzw. Riesling Wurzeln

a) Reblaus induzierte Nekrose an Börner Wurzel; b) IES induzierte Nekrose an Börner Wurzel; c) IES induzierte Galle an Riesling Wurzel

(Quelle: El-Nady [2001])

Unterschiede zwischen einer Behandlung mit IES und einer Behandlung mit einer Kombination aus IES und Aminosäuren konnte El-Nady [2001] besonders bei Börner nicht erkennen. Aminosäuren alleine führten in seinen Versuchen weder zur Bildung von Nekrosen noch zur Bildung von Gallen. Aufgrund dieser Beobachtungen schloss er eine cecidogene Beteiligung von Aminosäuren aus.

IES ist ein in Pflanzen natürlich vorkommendes Phytohormon aus der Gruppe der Auxine. Es handelt sich dabei um ein Tryptophanderivat, das in Zellen in Konzentrationen von 10^{-10} - 10^{-5} Mol/l vorliegt. In niedriger Konzentration fördert es unter anderem das Streckungswachstum von Koleoptilen, der Sprossachsen und der Wurzel, die Zelldifferenzierung und die Zellteilung sowie den licht und schwerkraft gesteuerten Tropismus [Buchanan et al., 2000]. In hohen Konzentrationen werden Wurzel- und Sprosswachstum gehemmt [Burg und Burg, 1966].

Die Reblaus gibt ihren Speichel nicht wie viele andere Aphiden in das Phloem, sondern in das Parenchym der Wirtspflanze ab. Die Verteilung der Speichelinhaltsstoffe erfolgt in parenchymatischem Gewebe wesentlich langsamer als es in den Leitgeweben der Fall ist [Kloft 1960; Schäller 1968a]. Durch den langsamen Abtransport von IES aus dem Einstichbereich im Parenchym kommt es nach Meinung dieser Autoren zu einer auf engem Raum lokalisierten Reaktion. Schäller [1968a] sieht hier auch den Zusammenhang zwischen der Konzentrationsabhängigkeit des Hormons und der Gallenbildung. Bei der Entfernung von IES von der Einstichstelle, so vermutete er, sinkt dessen Konzentration, wodurch die wachstumsfördernde Eigenschaft zu Tage kommt. Dies wiederum verursacht die Entstehung von Gallen. Der Autor erkannte zudem, dass resistente Rebsorten eine höhere IES Sensibilität zeigen als anfällige oder tolerante Sorten.

1.4 Interaktionen zwischen Pflanzen und Pathogenen

Pflanzen sind neben einer Reihe von abiotischen Faktoren, wie Licht, Temperatur und Feuchtigkeit, kontinuierlich einer großen Anzahl von möglichen Pathogenen ausgesetzt. In Folge dessen haben sie komplexe Abwehrmechanismen entwickelt, um die Pathogene zu erkennen und sich dagegen zu schützen. Pflanzen besitzen nicht wie Menschen und Tiere spezialisierte Abwehrzellen, die sie durch die Bildung von Antikörpern vor Krankheiten schützen. Dennoch steht ihnen ein Abwehrsystem zur Verfügung, dass auf eine Vielzahl von Angriffen spezialisiert ist. In der pflanzlichen Pathogenabwehr kann zwischen der passiven und aktiven Abwehr unterschieden werden [Hartmann, 1985]. So wird das Eindringen eines Krankheitserregers in das Pflanzengewebe oft passiv durch präformierte, passive Schutzme-

chanismen, wie z.B. die Zellwand selbst oder die Kutikula, verhindert [Buchanan et al., 2000]. Dabei können Kutikula und Epidermis durch Biopolymere wie Kutin, Suberin und Lignin zusätzlich verstärkt werden [Hartmann, 1985]. Neben diesen morphologisch-anatomischen Barrieren gibt es chemische Abwehrstoffe mit toxischer oder abschreckender Wirkung, die eine Penetration des Pathogens in die Pflanzenzelle verhindern [Williams et al., 1980; Hartmann, 1985]. Dazu zählen unter anderem konstitutiv vorliegende Sekundärmetabolite, wie z.B. Glucosinolate und Saponine [Mysore und Ryu, 2004; Buchanan et al., 2000]. Wenn das Pathogen an der Penetration in die Pflanze gehindert wird, spricht man auch von der *nonhost resistance* vom Typ I [Mysore und Ryu, 2004]. Die aktive bzw. auch induzierte Abwehr oder *nonhost resistance* vom Typ II tritt ein, wenn das Pathogen trotz Primärschutz der Pflanze in sie eingedrungen ist [Mysore und Ryu, 2004]. Es handelt sich dabei um flexible, meist dosierte Antwortreaktionen, die über drei Stufen verlaufen. (1) Im ersten Schritt werden Erkennungssubstanzen (Elicitoren) des Pathogens freigesetzt. Elicitoren als Signale zur Auslösung pflanzlicher Abwehrreaktionen umfassen ein breit gefächertes Spektrum an Verbindungen. Dazu zählen unter anderem Glycoproteine, Polysaccharide (Heptaglucan, Glucane, Chitosan), Lipopolysaccharide, Fettsäuren (Arachidonsäure, Eicosa-pentaensäure) [Boller, 1995]. (2) Im zweiten Schritt der Antwortreaktion werden die Elicitorstrukturen von der Pflanze erkannt und eine Reihe von Abwehrreaktionen in Gang gesetzt. Neben der Bildung reaktiver Sauerstoffformen (ROS – *reactive oxygen species*), strukturellen Modifikation der Zellwand, der Aktivierung von Signalkaskaden, der Änderungen des zellulären Ionenflusses sowie der Akkumulation von Abwehrgenen [Heath, 2000b; Mysore und Ryu, 2004] kommt es hierbei meist zur Ausbildung erkennbarer Symptome in Form einer HR, auf die in Kapitel 1.5 näher eingegangen wird. Dem unspezifischen Erkennungsmechanismus der *nonhost resistance* steht der spezifische Mechanismus der *host resistance* gegenüber. Es handelt sich dabei um eine Gen-für-Gen-Interaktion zwischen einem Avirulenz- (avr-) Gen des Pathogens und dem passenden Resistenz- (R-) Gen der Pflanze. Die Mechanismen werden ebenfalls in Abschnitt 1.5 beschrieben. (3) Neben der Vielzahl an lokalen Reaktionen wird im dritten Schritt der Antwortreaktion der Pflanze auf das Pathogen in vielen Fällen eine systemische Resistenz induziert, die als *systemic acquired resistance* (SAR) bezeichnet wird. Sie erstreckt sich auf vom Infektionsort entfernte Pflanzenteile und "immunisiert" die Pflanze gegen nachfolgende Infektionen mit verschiedenen Pathogenen. Auslöser für die SAR ist wahrscheinlich die verstärkte Akkumulation bestimmter Signalmoleküle, wie Salicylsäure (SA - *salicylic acid*), die zur Induktion von SAR-Genen, wie β -1,3-Glucanasen, Chitinasen oder PR-Proteine führen [Buchanan et al., 2000; Cameron, 1994].

1.5 Pflanzliche Hypersensitivitätsreaktion

1.5.1 Charakteristika der HR

Der Begriff der HR wurden von Stakmann [1915], und in jüngerer Zeit von Goodman und Novacky [1994] als einen raschen Tod von Pflanzenzellen in Verbindung mit einer Krankheitsresistenz definiert. Die HR erscheint in resistenten Pflanzen als Antwort auf den Befall mit pathogenen Viren, Bakterien, Pilzen, Nematoden und Insekten. Demnach erliegt die Pflanze der Pathogeninfektion nicht, sondern sie begrenzt den Schaden auf den Verlust weniger Zellen [Heath, 2000a]. Der Schaderreger kann sich auf den abgestorbenen Zellen weder vermehren noch ernähren. Eine weitere Ausbreitung in angrenzendes gesundes Gewebe wird somit verhindert. Erkennbar wird die HR durch braune, tote Zellen an der Infektionsstelle, deren Anzahl je nach Pathogen von einer bis viele variieren kann. Die HR kann, muss sich aber nicht auf die Zellen beschränken, die in direktem Kontakt mit dem Pathogen standen [Heath, 2000a].

Die HR ist ein aktiver Prozess des Wirtes und das mit ihr verbundene Absterben der Zellen läuft nach dem Muster des PCD ab [Greenberg, 1997; Greenberg und Yao, 2004; He et al., 1994, 2000]. Unter PCD versteht man den durch bestimmte Faktoren von der Zelle selbst eingeleiteten Zelltod. In Tieren stellt der PCD, hier auch Apoptose genannt, einen Weg dar, unerwünschte Zellen zu beseitigen. Die Mechanismen sind hier wesentlich genauer untersucht als bei Pflanzen. Typische apoptotische Merkmale sind die Fragmentierung der DNA-Stränge durch Endonukleasen, nukleäre und cytoplasmatische Kondensation, die Blasenbildung an der Plasmamembran, die Kondensierung und die Fragmentierung des Nukleus sowie die Bildung sogenannter *apoptotic bodies* [Greenberg 1997; Greenberg und Yao, 2004; Mittler et al., 1997; van Doorn und Woltering, 2005]. Auch bei Pflanzen lässt sich im Rahmen der HR einige dieser Merkmale wiederfinden [Greenberg, 1997; Greenberg und Yao, 2004]. Wie in Kapitel 1.2.2 beschrieben konnte auch El-Nady [2001] im Verlauf der Nekrosenbildung in Bönern nach einem Reblausan Stich ähnliche Anzeichen einer PCD finden. Nach Heath [2000a] gehört zum einen nicht nur der rasche Zelltod zur HR, sondern auch die Auslösung anderer Resistenzmechanismen, die die Pathogenausbreitung hemmen. Zum anderen ist der PCD nicht zwangsläufig mit einer HR verknüpft. Die HR ist seiner Meinung nach der mit der Auslösung von Pathogenabwehrprozessen eng verknüpfte PCD.

1.5.2 Auslösung und Ablauf der HR

Die Resistenz wird in der Regel, aber nicht immer [Heath, 1998], durch ein einzelnes, pathogen-spezifisches Resistenzgen (R-Gen) der Pflanze bestimmt. Für die Auslösung einer HR muss der Schaderreger das korrespondierende avr-Gen besitzen. Flor [1955] hat in diesem Zusammenhang am Beispiel des Befalls von Lein mit dem Rostpilz *Melampsora lini* den Begriff der Gen-für-Gen Hypothese (*host resistance*, vgl. Kapitel 1.4) definiert. Eine Pflanze ist demnach gegen ein bestimmtes Pathogen resistent, wenn R-Gen und avr-Gen dominant im jeweiligen Organismus vorliegen. Diese Gen-für-Gen Interaktionen werden in der Regel als Rezeptor-Liganden Modell interpretiert, in dem sich ein avr-Gen als Ligand direkt an ein korrespondierendes R Protein, das als Rezeptor fungiert, bindet und die pflanzliche Abwehr initiiert [Bogdanove, 2002; Bonas und Lahaye, 2002]. Viele avr-Gene von Viren, Bakterien und Pilzen konnten bislang identifiziert werden. Sie weisen jedoch kaum Homologien auf. Einzige Gemeinsamkeit zwischen avr-Genen von diesen Organismen ist, dass sie Proteasen kodieren. Es wird deswegen vermutet, dass das avr-Gen eine proteolytischen Entwicklung von Proteinen im Wirt induziert [Bonas und Lahaye, 2002]. Avr-Gene aus Nematoden und Insekten konnten bislang nicht nachgewiesen werden.

R-Gene haben die Aufgabe, Signale vom Pathogen zu erkennen und daraufhin Abwehrreaktionen auszulösen. Die von ihnen codierten Proteine weisen daher eine entsprechende Molekularstruktur auf. Viele besitzen C-terminal eine Aminosäuresequenz mit leucinreichen Wiederholungen, die sog. *leucin rich repeats* (LRR) [Dangl und Jones, 2001]. Den LRR wird die Rezeptorfunktion bei der Elicitorerkennung zugeschrieben. Im zentralen Bereich des Proteins ist eine Nukleotidbindungsstelle (NBS) zu finden, an die hauptsächlich ATP und GTP binden können [ebda.]. Einige Proteine besitzen zusätzlich eine NBS-Subdomäne mit einer Serin/Threonin (Ser/Thr)-Kinaseaktivität [Dangl und Jones, 2001]. Die größte Gruppe der R-Gene kodiert Proteine mit der NBS-LRR Struktur. Bei einer Vielzahl von R-Genen ist eine dritte, N-terminale Domäne nachgewiesen worden. Es handelt sich dabei um den *Toll/interleukin-1-receptor* (TIR) oder die *coiled-coil* (CC)-Domäne. Diese sind vermutlich für die Signalweiterleitung und für die Aktivierung von Abwehrgenen verantwortlich [Dangl und Jones, 2001].

Nach der Erkennung des Elicitors (in der Regel des avr-Gens) durch den Rezeptor (in der Regel das R-Gen) kommt es im Verlauf der HR zu einer Vielzahl von Antwortreaktionen und Signalkaskaden. Dazu zählt beispielsweise die Bildung von ROS wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Superoxidanionen (O_2^-) [Wojtaszek, 1997]. Nach einer ersten schwachen

Erhöhung von ROS in den Zellen kommt es in einer zweiten Phase zu einer massiven ROS-Produktion, weshalb der Prozess auch *oxidative burst* genannt wird. ROS werden wahrscheinlich durch die Aktivierung einer membrangebundenen NADPH-Oxidase gebildet [Doke, 2005]. Sie wirken in der frühen Phase der HR als toxische Substanzen gegen das Pathogen sowie als Glied in der Kette der Signaltransduktion [Delledonne, 2001; Lamb und Dixon, 1997; Mittler, 2002]. In der späten Phase der HR stehen sie in unmittelbarem Zusammenhang mit einer Veränderung der Membranpermeabilität und mit dem Verlust der Kompartimentierung der Zelle, die letztlich zum Zelltod führt [Jabs, 1999]. Neben den ROS kommt es im Verlauf der HR zur Aktivierung von Signalsubstanzen. Dazu zählen unter anderem Ethylen, Jasmonsäure (JA - *jasmonic acid*), Methyl-JA (MeJA) und SA [Dong, 1996; Greenberg, 1997; Heath, 2000a; Wan et al., 2002]. Auch Ca^{2+} und K^{+} Ionen spielen eine zentrale Rolle in der Signaltransduktion während der HR [Xu und Heath, 1998]. Calcium agiert dabei als sekundärer Bote, der Signale aufnimmt und verstärkt, die von Rezeptoren auf der Zelloberfläche empfangen werden. Eingeschlossen sind direkte Signale von Pathogenen, die in das Cytosol weitergeleitet werden und so die HR aktivieren. Daneben wirkt Calcium auch als Beschleuniger des chronologisch später ablaufenden PCD [Nemchinov et al., 2008]. Wichtig für die Signalweiterleitung in der pflanzlichen Pathogenabwehr sind auch Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK). Sie sind den Rezeptoren nachgeschaltete Komponenten, die extrazelluläre Stimuli in intrazelluläre Antworten umwandeln [zusammengefasst in Zhang und Klessig, 2001]. Im Verlauf der Signalkaskaden kommt es zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (TF), die weitere Abwehrgene regulieren. In der pflanzlichen Pathogenabwehr sind TF aus den Familien der Zinkfinger-Proteine [Takatsuji, 1998], der WRKY [Eulgem et al., 2000], der *ethylene-responsive-element-binding protein* (AP2/EREBP) [Hao et al., 1998], der *basic-domain leucine-zipper* [Jakoby et al. 2002], der *C-repeat-binding factor* (CBF) [Gao et al., 2002], der MYB [Stracke et al., 2001] und der Whirly [Desveaux et al., 2005] bekannt.

Durch TF regulierte Gene sind unter anderem die *pathogen related* (PR)-Proteine und die Phytoalexine. Sie liegen oft extrazellulär vor und inhibieren durch ihre toxische Wirkung das Wachstum, die Vermehrung und somit auch die Ausbreitung von Pathogenen [van Loon und van Strien, 1999]. PR-Proteine werden nicht nur lokal an der Infektionsstelle, sondern auch systemisch induziert und spielen daher auch eine wichtige Rolle in der SAR.

Das Zusammenspiel der oben genannten Abwehrkomponenten im Verlauf einer HR ist äußerst komplex. Insofern steht die HR in einem vielschichtigen Netzwerk. Anhand der Ergeb-

nisse der vorliegenden Arbeit werden die einzelnen Komponenten der HR im Diskussionsteil eingehender beschrieben.

1.6 Methoden zur Genexpressionsanalyse

Mit Hilfe der Genexpressionsanalyse kann die Umsetzung der genetischen Information, also die Genexpression, untersucht werden. Sie ermöglicht Aussagen über die Aktivität verschiedener Gene. So kann erforscht werden, unter welchen Umweltbedingungen ein Gen aktiv ist und wie sehr dessen Aktivierungsstärke bei wechselnden exogenen Konditionen abweicht. Das erlaubt Aussagen darüber, wie ein Organismus auf Krankheitserreger oder abiotischen Stress reagiert. Zudem lässt sich die Funktionen einzelner Gene bestimmen. In der Praxis wird mit verschiedenen Verfahren zur Genexpressionsanalyse gearbeitet. Streng genommen aber werden zwei Kategorien, qualitative und quantitative Methoden, unterschieden. Während Erstere lediglich überprüfen, ob eine Genexpression stattfindet, sollen die quantitativen Methoden die Stärke der Genexpression nachweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich zwei Methoden zur Genexpressionsanalyse eingesetzt, um Unterschiede zwischen IES behandeltem Gewebe und Normalgewebe von Börner, SO4 und Riesling sowie mögliche Differenzen zwischen den Sorten zu determinieren. Zum einen diente die Microarrayanalyse mittels einer neuartigen Technik der Febit biomed GmbH zur simultanen qualitativen sowie quantitativen Untersuchung einer Vielzahl von Genen in den entsprechenden Geweben. Die Real-Time-PCR (RT-PCR) wurde als Möglichkeit hinzugezogen, einzelne Gene spezifisch auf ihre quantitative Genexpression hin zu untersuchen.

1.6.1 RT-PCR

Die RT-PCR ist eine exakte Methode zur quantitativen Erfassung der Genexpression in einem einzigen Reaktionsansatz. Grundsätzlich liegt hier das Prinzip der Block-PCR zugrunde. Da eine Quantifizierung der amplifizierten PCR-Produkte nach 25 bis 35 Zyklen fast unmöglich wird, haben sich optische PCR-Systeme zur Online-Beobachtung des Amplifikationsstatus etabliert. RT-PCR steht daher für die Möglichkeit, die Quantität der amplifizierten Matrize direkt abzulesen [Freemann et al., 1999]. Als Detektionshilfsmittel für die Amplifikationsmenge werden fluoreszierende Moleküle, sog. Fluorophore, eingesetzt. Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde SYBR Green verwendet, das sich während der PCR in die *Minor Groove* von doppelsträngiger DNA interkaliert und unter Anregung von kurzwelligem Ultraviolett- (UV) -Licht längerwelliges Licht emittiert [Mellington, 2001]. Man erhält ein Signal, dessen Intensität direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen

Doppelstränge ist. Die emittierte Fluoreszenz wird nach jedem Zyklus, also nach jedem Vorgang der Verdoppelung der Menge an doppelsträngiger DNA, gemessen. Nach einer von der Zahl der Ausgangskopien abhängigen Zyklenanzahl wird die Fluoreszenz berechenbar. Zur Analyse des PCR-Produkts nach der PCR Reaktion eine Schmelzkurven-Analyse zur Verifizierung des amplifizierten Produkts durchgeführt. Diese Methode nutzt die Eigenschaft des SYBR Green, der sich durch graduelle Temperaturerhöhung von 60°C auf 99°C an einem charakteristischen Schmelzpunkt von der DNA löst, was zu einem raschen Abfall an Fluoreszenzemission führt. Charakteristisch für jedes Amplifikat ergibt die erste Ableitung der Fluoreszenzänderung im Verhältnis zur Temperaturänderung ein spezifisches Produkt (Peak). Primerdimere oder unspezifische Nebenprodukte lassen sich diese aufgrund ihrer vom eigentlichen Produkt abweichenden Schmelzkurve leicht erkennen.

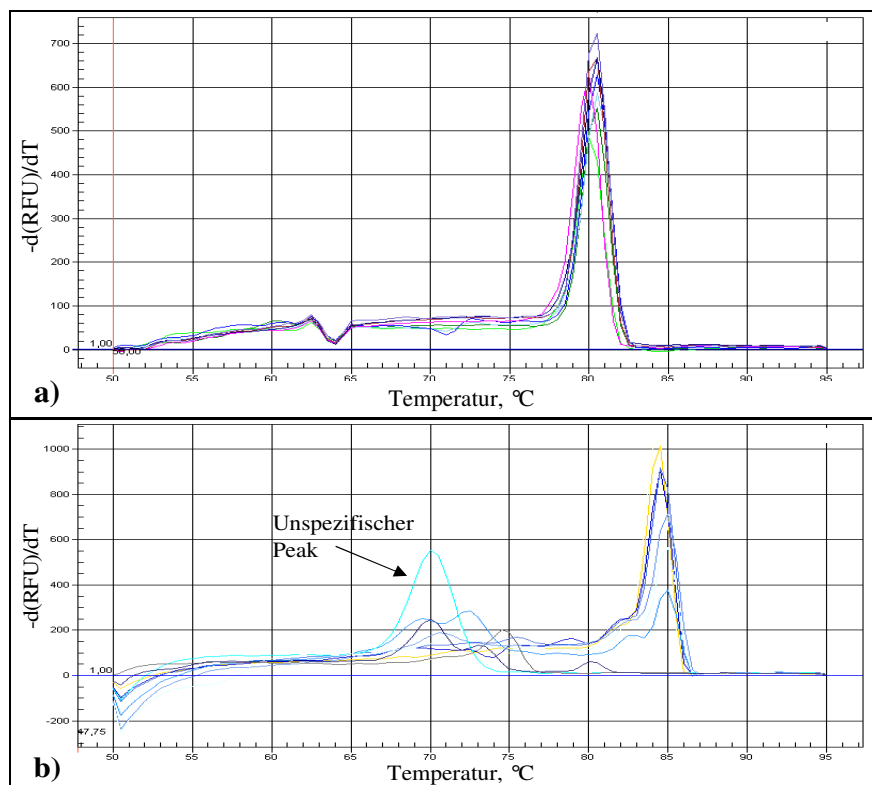


Abbildung 1.4: Beispiel von Schmelzkurven in der RT-PCR

a) Ein spezifische Peak; b) Unspezifische Peaks

(Quelle: Eigene Ergebnisse erstellt mit der Bio-Rad iQ5 Optical System Software)

Abbildung 1.4 a) gibt ein Beispiel einer Schmelzkurve mit einem spezifischen Peak. Im darunter abgebildetem Diagramm (Abb 1.4 b) lässt sich erkennen, dass neben dem Hauptpro-

dukt unspezifische Peaks entstanden sind. In diesem Falle muss davon ausgegangen werden, dass beispielsweise Primerdimere oder Nebenprodukte mit amplifiziert wurden, die die anschließende Auswertung negativ beeinflussen und somit erschweren.

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge in der RT-PCR wird der sogenannte *Crossing Point* (CT) herangezogen. Er entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die notwendig ist, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen. Dies bedeutet, dass am CT in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge an neu synthetisierter DNA zu finden ist. Ein um 0,50 höherer CT-Wert als ein zweiter Basis-CT-Wert entspricht einer um 50% höheren Genexpression.

Quantifizierungsstrategien in der Real-Time-PCR

Das Fundament für einen evidenten quantitativen Nachweis von Genen ist eine funktionierende Analytik, die eindeutige DNA-Quantifizierungsergebnisse mit hoher Reproduzierbarkeit liefert. Für die RT-PCR stehen mit der absoluten und der relativen Quantifizierung grundsätzlich zwei Strategien zur Verfügung. Während die relative Quantifizierung auf einer Normalisierung der Expressionsergebnisse beruht, wird bei der absoluten Methode die Anzahl der kopierten DNA in Relation zu einer Verdünnungsreihe von PCR-Produkten gesetzt.

Absolute Quantifizierung

Der einfachste Weg, einen absoluten Wert einer unbekannten Zielkonzentration zu erhalten, ist die Verwendung eines externen Standards [Bustin, 2000]. Dabei wird die Amplifikation der unbekannten Target-DNA mit einer Kalibrierungskurve des Standards verglichen, weshalb diese auch Standardkurve genannt wird. Dabei handelt es sich um eine lineare Regressionslinie mit den Parametern m und t , der unabhängigen Variable $x = \log[\text{konz.}]$ und der exogenen Größe $y = \text{CT}$. Zur Ableitung einer Standardkurve ist die Erzeugung einer Verdünnungsreihe des externen Standards notwendig, der die zu erwartende Konzentration des unbekannten Targets enthält. Löst man die lineare Gleichung nach $x = \log[\text{konz.}]$ auf und setzt den CT-Wert des unbekannten Targets ein, ist eine Rekalkulation auf die Expression pro g Gewebe und auf die totale RNA-Konzentration in ng möglich.

Relative Quantifizierung

Der wesentliche Unterschied der relativen Quantifizierung zur Methode der absoluten Quantifizierung ist, dass keine absoluten Konzentrationen bestimmt werden, sondern dass die Expression des Zielgens auf ein zweites Gen, ein sogenanntes Hauskeeper Gen (HK), das ubiquitär und homogen im gesamten Probenpanel vorkommt, bezogen und mit einem Kalibrator

verglichen wird [Bustin und Nolan, 2004; Pfaffl 2001; Pfaffl et al., 2004]. Bei dem Kalibrator handelt es sich um eine Probe oder einer ganzen Gruppe von Proben aus dem vorliegenden Panel. Als HK dienen bei Pflanzen in der Regel β -tubulin, Cyclophilin, Aktin, Elongation Faktor 1- α (EF), Ubiquitin, Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und ribosomale Untereinheiten wie 18S rRNA. Vorteil der Normalisierung im Vergleich zur Berechnung mit absoluten Zahlen ist der geringere Mehraufwand, da Varianzen in der Expression oder Fehler bei der RT vernachlässigbar sind. Grund dafür ist, dass diese beim Zielgen und beim HK gleichermaßen vorkommen. Diese Variante der Quantifizierung wurde für die vorliegenden Analysen verwendet. Auf die genauen Berechnungsformeln wird im Methodenteil dieser Arbeit (Kap. 2.11.3) näher eingegangen.

1.6.2 Microarray-Analyse mittels der *Geniom one* Technik

Kennzeichnend für die *Geniom one* Technik ist die Integration und Automatisierung aller Prozessschritte von der Arraysynthese über die Hybridisierung und Detektion bis hin zur Datenanalyse in einem Gerät (Abb. 1.5 c). Die zu untersuchenden Gene können dabei vom Anwender bei jedem Chip individuell bestimmt werden. Die Herstellung der Microarrays erfolgt durch eine *in situ* Oligonukleotid-Synthese auf einem DNA Prozessor. Dabei handelt es sich um einen ca. 17x16 mm großen Glas-Silikon-Glas-Sandwich, in den acht unabhängige, schlangenartig gewundene Kanäle geätzt sind (Abb. 1.5 b).

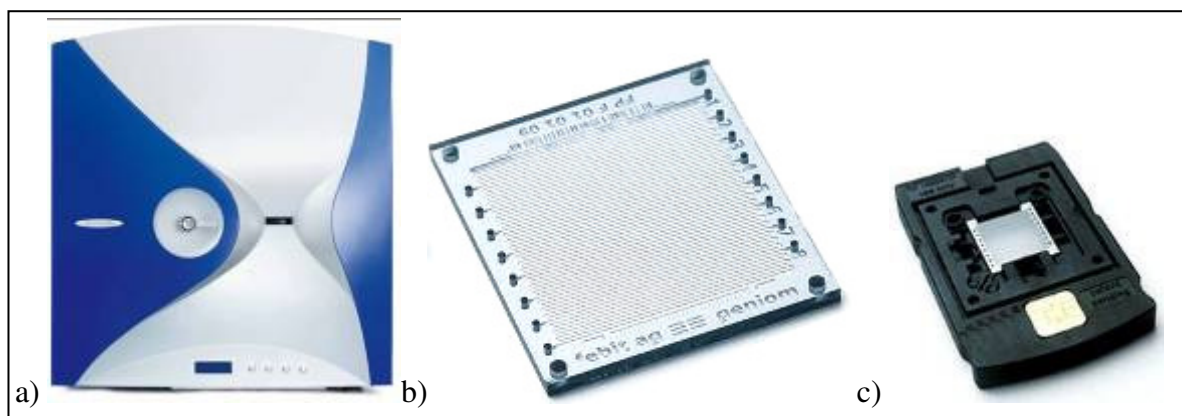


Abbildung 1.5: DNA-Prozessor des *Geniom one* Gerätes

a) *Geniom one* Apparatur; b) DNA-Prozessor; c) DNA-Prozessor in Kassette mit Speicherchip
(Quelle: Febit biomed GmbH)

Jeder Kanal kann zum jetzigen Zeitpunkt 6776 individuelle Sonden aufnehmen. Somit ist es möglich, pro Biochip eine Gesamtzahl von achtmal 6776, also 54208, Genen zu untersuchen. Berücksichtigt werden muss jedoch die übliche Verwendung von Kontrollen und Dup-

likaten, die die Gesamtzahl der Gene entsprechend mindert. Aufgrund der Unabhängigkeit der einzelnen Kanäle untereinander lassen sich bis zu acht unterschiedliche Proben hybridisieren. Der DNA Prozessor befindet sich in einer Kassette, auf welcher wiederum ein Speicherchip zur Identifikation aufgebracht ist (Abb. 1.5 c).

Jeder Spot auf dem DNA Prozessor hat eine Dimension von $33 \times 33 \mu\text{m}$ und kann individuell durch ein digitales Mikrospiegelsystem angestrahlt werden. Dabei handelt es sich um ein Netz aus 786432 gelenkartig montierten Mikrospiegeln. Die Deflexion jedes Spiegels wird durch eine Software reguliert. Abbildung 1.6 gibt den Anlauf der Oligonukleotid-Synthese wieder. Die Glasoberfläche des Prozessors wird vor der Synthese mit langkettigen Polymeren bedeckt, die jeweils eine photolabile Schutzgruppe tragen (Abb. 1.6, 1.).

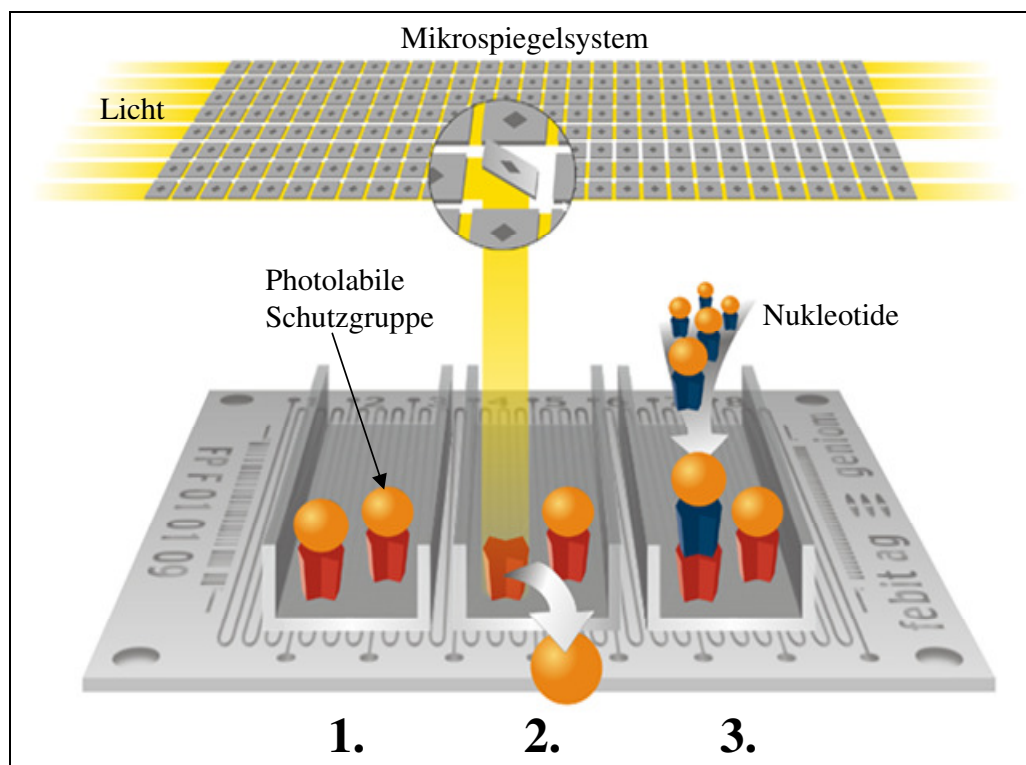


Abbildung 1.6: Ablauf der lichtaktivierten Oligonukleotidsynthese im *Geniom One*
(Quelle: Febit biomed GmbH)

Während der Synthese werden die ebenfalls mit photolabilen Schutzgruppen bestückten Nukleinsäurebausteine ACGT nacheinander durch das Mikrokanalsystem gepumpt. Durch das Mikrospiegelsystem erfolgt eine lichtbedingte Abspaltung der photolabilen Gruppe (Abb. 1.6, 2.). So können die Nukleotide immer an die schon vorhandenen Oligonukleotide koppeln, die keine Schutzgruppe tragen (Abb. 1.6, 3.). Auf diese Weise werden Schritt für Schritt alle 54208 Oligonukleotide parallel synthetisiert. Ein einmal erstellter DNA Prozes-

sor kann entweder direkt im Anschluss hybridisiert oder für spätere Analysen gelagert werden. Die Hybridisierung erfolgt mit der amplifizierten und markierten DNA, welche mit einer speziellen Spritze in die Hybridisierungseinheit injiziert wird. Die Detektion der hybridisierten Proben erfolgt mittels einer acht Megapixel CCD-Kamera. Als Ergebnis der Detektion liegt für jeden Farbkanal eine Bilddatei im TIF-Format mit einer Graustufentiefe von 16 Bit vor. Vorteil der *Geniom one* Technik im Vergleich zur herkömmlichen Microarray Analyse ist der Wegfall einer manuellen Zuordnung der Spots. Grund dafür ist, dass sich die Synthese der Oligonukleotide exakt auf den Bereich beschränkt, der durch das Mikroskopiesystem belichtet wird. Die Spotgeometrie ist somit quadratisch und die Anordnung durch die Lage der Mikrospiegel eindeutig festgelegt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Für den Weinbau ist die Erzeugung von transgenen, reblausresistenten Unterlagsreben von wesentlichem Wert. Voraussetzung für eine erfolgreiche Herstellung sind fundierte Kenntnisse über die Mechanismen der Reblausresistenz. Mit der vorliegenden Arbeit wurden daher drei Zielsetzungen verfolgt, die in unmittelbarem Zusammenhang stehen. Das erste Ziel bestand darin, die Gene zu identifizieren, die verantwortlich für die Reblausresistenz in Börner sein können. Anhand der ermittelten Kandidatengene sollten zum zweiten Rückschlüsse auf die Mechanismen der Resistenzreaktion gezogen werden. An dritte Stelle kam es darauf an, Erkenntnisse über die Rolle der IES als auslösender Faktor der Resistenzreaktion in Börner zu gewinnen. Zur Erreichung dieser dreifachen Zielstellung mussten Vergleiche angestellt werden. So war es eine wichtige Aufgabe, die Genexpression im IES behandelten Gewebe von Börner zu messen und der Expression im Normalgewebe gegenüber zu stellen. Zum anderen war eine komparative Betrachtung der genetischen Reaktion von Börner, SO4 und Riesling – jeweils mit Blick auf die IES Behandlung – erforderlich. Dieser Vergleich erlaubte es, Unterschiede zwischen reblausresistenten, -toleranten und -anfälligen Reben ausfindig zu machen und nach ihrer Bedeutung zu hinterfragen. Er setzte aber auch die Anwendung von molekulargenetischen Methoden voraus. Die Microarray Analyse mit Hilfe des *Geniom one* Systems und die RT-PCR, zwei Konzepte, die schwerpunktmäßig zum Einsatz kamen, sollten bei der Aufklärung der Fragen helfen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Labortechnik und Verbrauchsmaterialien

Deckgläser (60 mm x 24 mm x 0,25 mm)	Sigma, München, Deutschland
Geldokumentationsgerät:	
- Epi Chemi TM II Darkroom	UVP, Upland, USA
Gelelektrophoresekammern, horizontal	Hoefer, San Francisco, USA und Harnischmacher, Kassel, Deutschland
Glasgeräte	Schott, Mainz, Deutschland
Küvetten für OD-Messung (220-1660 nm)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Labormixer:	
- Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS Laboratory & Medical Supplies, Brigachtal, Deutschland
Labornetzteil:	
- PS 500XT DC Power Supply	Hoefer, San Francisco, USA
Laserscanner:	
- Affymetrix 428 TM Array Scanner	Affymetrix, Santa Clara, USA
Magnetrührer/Wärmeplatte:	
- Heidolph MR 3001	Labotec, Wiesbaden, Deutschland
Mörser, Porzellan	Haldenwanger, Berlin, Deutschland
Nylongaze (Porengröße: Ø 80 µm)	Millipor, Bedford, USA
pH-Meter:	
- Mikroprozessor HI9321	Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland
Plastikpetrischalen (Ø 8,5 cm)	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße:	
- 0,2 ml	Abgene, Epsom, England
- 0,5 und 1,5 ml	Roth, Karlsruhe, Deutschland
- 1,5 ml RNase frei, Biopur Safe-Lock	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- 50 ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ös- terreich

Real-Time-PCR-System:

- iQ5 Real-Time PCR Detection System

Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

RITA (*Récepteur à Immersion Temporaire Automatique*)

VitroPic, Saint-Mathieu-de-Trévières, Frankreich

Rundfilter (Ø 8,5 cm)

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Spektralfotometer:

-Bio Photometer

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Sterilfilter Minisart (Porengröße: Ø 0,20µm)

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Thermocycler:

- Primus 96 Plus und Primus HT

MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland

- PTC-100TM

MJ Research, München, Deutschland

Wärmeschränke/Hybridisierungsöfen:

- Duo-Therm-Hybridisierungsöfen

Biometra, Göttingen, Deutschland

- Peltier-/Präzisionsbrutschrank,
IPP 200-400

Memmert, Schwabach, Deutschland
MGW

Wasserbad RM6

Lauda, Lauda, Deutschland

Watte (40 cm breit)

Hartmann, Heidenheim, Deutschland

Zentrifugen:

- MiniSpin Plus

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

- Centrifuge 5403

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Biochemika

5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)

BTS Biotech Trade & Service GmbH, St-Leon, Deutschland

Agarose

Roth, Karlsruhe

β-Mercaptoethanol

Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland

Bacto-Agar

Difco Laboratories, Detroit, USA

Bromphenolblau

Serva, Heidelberg, Deutschland

Butanol (C ₄ H ₉ OH)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carbenicillin Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB)	Duchefa Biochemie, Harlem, Niederlande
Cyanin 3 bzw. 5 (Cy3, Cy5)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA
	Biomol, Hamburg, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes Wasser	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Polymerasen:	
- Advantage TM 2 Polymerase Mix	- Clontech Laboratories, TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich
- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	- MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
- Titanium TM <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	- Clontech Laboratories, TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich
Eisessig	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs.	Labor-Service GmbH, Saarbrücken, Deutschland
Glycerol	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Guanidinthiocyanat	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Guanosin	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Indol-3-Buttersäure (IBA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Indol-3-Essigsäure (IES)	Merck, Darmstadt, Deutschland
iQ TM SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland

Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropyl-D-thiogalactosid (IPTG)	Eurobio, Frankreich
Luria-Bertani (LB)	Sigma, München, Deutschland
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Molekulargewichtsstandard, GeneRuler Ladder Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Liquid Block TM	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
Luria-Bertani (LB)	Sigma, München, Deutschland
Mineralöl	Eurobio, Frankreich
N2-Ethylendiamintetraessigsäure (N ₂ EDTA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat (C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇)	Fluka (Sigma-Aldrich), München, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochlorid (NaOCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
N-Laurylsarcosin	Sigma, München, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Sigma, München, Deutschland AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Reverse Transkriptase</i> , PowerScript TM	Clontech Laboratories, eine TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich
<i>RsaI</i>	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Universelle Primer M13 forward und revers	MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)-Stamm:	Stratagene, La Jolla, USA
<i>XL1-Blue</i> komponente Zellen	

2.1.3 Kits und Vorschriften

BD PCR-Select TM cDNA Subtraction Kit	Clontech Laboratories, TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich
Chroma-Spin TM -1000 Columns	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
iScript TM cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Omniscript TM PCR-Select TM cDNA Subtraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland Clontech Laboratories, TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich
pGEM-T Easy Vektor System	Promega, Mannheim, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
QuickPick TM mRNA nano kit	Bio-Nobile Oy, Turku, Finnland
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
SMART TM PCR cDNA Synthese Kit	Clontech Laboratories, enie TAKARA BIO Company, St-Germain-en-Lye, Frankreich

2.1.4 Puffer und Lösungen

Carbenicillin	10µg/ml in Aqua deionisiert (autoklaviert) -steril filtriert
E-Puffer (20x, Stammlösung)	194g Tris 15g Na ₂ EDTA 8g NaOH 80ml Eisessig ad 2l Aqua dest.
E-Puffer/Guanosin	283mg Guanosin (1mM) auf 1l 1x E-

	Puffer
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	23g NaOH 186g Na ₂ EDTA ad 1l Aqua dest. -pH 8,0
Fragmentierungspuffer (Febit biomed GmbH, Heidelberg)	200mM Tris (pH 8.1) 150mM magnesiumacetat 500mM possessionacetat DEPC Wasser für ein finales Volumen von 100µl
total-RNA-Extraktionspuffer nach Baiges und Mas (2003)	3% (<i>weight per volume</i> (w/v)) CTAB 1,4M NaCl 20mM Na ₂ EDTA 1M Tris-HCL (pH 8,0) -autoklaviert
Hybridisierungsmix 2 (Febit biomed GmbH, Heidelberg)	1x MES-hybridisation buffer 0.1 mg/ml herring sperm-DNA 0.5 mg/ml BSA-dilution (beides in DEPC Wasser gelöst) control oligo mix 1 DEPC Wasser für ein finales Volumen von 150µl
IES-Lösung (0,1%)	0,1g IES auf 100ml Aqua deion. -unter Wärmezufuhr (ca. 50°C) gelöst
IPTG	25mg/ml in Aqua dest.
LB/Carbenicillin-Agar (pH 7,5)	15,5g LB 15,0g Bacto-Agar ad 1l Aqua dest. -pH 7,5 - Zugabe von 5ml Carbenicillin (10µg/ml) nach Autoklavierung
LB-Medium (flüssig; pH 7,5)	2,3g LB ad 150ml Aqua dest.

	-pH 7,5 -autoklaviert
Waschlösungen für Microarrays nach Galbraith et al. (siehe Kapitel 2.1.5):	
MA/1	2x SSC (<i>volume per volume</i> (v/v)) 0,5% SDS (w/v) ad 40 ml Aqua dest.
MA/2	0,5x SSC (v/v) ad 40 ml Aqua dest.
MA/3	0,05x SSC (v/v) ad 40ml Aqua dest.
MES-Hybridisierungspuffer (Febit biomed GmbH, Heidelberg)	54.8 mM MES (morpholinoethansulfon acid, free acid monohydrate) 147.7 mM MES (morpholinoethansul- fon acid, sodium salt) 1.8 M NaCl in einer finalen Konzentra- tion von 202.5mM (pH 6.5-6.7)
Stopppuffer (10x)	25ml Glycerol 20ml 0,5M Na ₂ EDTA (pH 8,0) 1M 5ml Tris-HCL (pH 8,0) 0,1g Bromphenolblau
TNE-Puffer (1x)	10mM NaCl 10mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	10mM Tris-HCl (pH 8,0) 1mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)
Tris-HCl (1 M ; pH 8,0 bzw. 8,6)	121g Tris 50ml HCl ad 1l Aqua deion. -mit Hcl auf pH 8,0 bzw. 8,6 einstellen
SSC-Puffer (20x; pH 7,0)	3M NaCl 0,3M Natriumcitrat
X-Gal	100mg/ml in DMSO

2.1.5 Software und Datenbanken

Amplify 1.2	Engels, 1993
Bio-Rad iQ5 Optical System Software	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
GeneSight™ 4.1 Lite Edition	Biodiscovery, El Segundo, USA
ImageGene™ 5.6 Standard Edition	Biodiscovery, El Segundo, USA
Jaguar™ 2.0	Affymetrix, Santa Clara, USA UVP, Upland, USA
Lab Works™ 4.0.0.8	Upland, USA
<i>Computational Biology and Functional Genomics Laboratory (DFCI)</i>	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/
<i>DFCI Grape Gene Index</i>	http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=grape/
<i>Galbraith et al.</i>	http://www.ag.arizona.edu/microarray/
<i>Multalin</i>	http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html/
<i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
<i>Primer3</i>	http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi/

2.2 Pflanzenmaterial

Als Ausgangsmaterial für alle nachfolgenden Untersuchungen dienten Seitenwurzeln von Börner, Selektion Oppenheim (SO4) und Riesling, die zum einen aus Topfrebenmaterial in einem Kultursystem nach El-Nady [2001] und zum anderen durch Kultivierung in Flüssigkultur in RITA-Gefäßen herangezogen wurden.

2.2.1 Seitenwurzelbildung in einem unsterilen Wurzelkultursystem

Für das Heranziehen neuer Seitenwurzeln mit Hilfe des Kultursystems nach El Nady [2001] (Abb. 2.1) wurden eingangs aus dem Wurzelballen von Topfreben der Sorten Börner, SO4 und Riesling Wurzelstücke herausgeschnitten und unter fließendem Wasser von grobem Schmutz gereinigt. Im Anschluss daran erfolgte eine Oberflächendesinfektion, für die die Wurzeln zunächst mit 70% Ethanol (EtOH) desinfiziert und anschließend für 15 Minuten auf

einem Magnetrührer in 1% NaOCl geschwenkt wurden. Es folgten drei Waschschrirte für jeweils eine, zwei und fünf Minuten in autoklaviertem Aqua bidest. Die nun folgenden Arbeitsschritte sind unter sterilen Bedingungen durchgeführt worden. Zunächst wurden alle Seitenwurzeln entfernt, um das Wachstum neuer Seitenwurzeln zu ermöglichen. Anschließend wurden die Wurzeln in 5-6cm lange Stücke geschnitten und an einem Ende mit in Aqua deion. getränkter Watte umwickelt.

Plastikpetrischalen mit EtOH desinfiziert und mit Filterpapier ausgelegt, dienten als Boden dieses Kultursystems. Geschlossen wurden sie mit einem Deckel, der eine ca. 5cm² große, mit einer Nylongaze (Porendurchmesser: 80µm) bedeckte Aussparung enthielt, die der Luftzufuhr dienen sollte. Nachdem die in Watte gebetteten Wurzelstücke in die Plastikschalen platziert worden sind, wurden diese mit handelsüblicher Frischhaltefolie verschlossen, um die Feuchtigkeit für einen längeren Zeitraum in dem Kultursystem zu erhalten. Die Kultivierung des Systems erfolgte ohne Licht bei 24°C. Die austreibenden Seitenwurzeln wurden für nachfolgende Untersuchungen akkumuliert.



Abbildung 2.1: Unsteriles Wurzelkultursystem zum Austreiben von Seitenwurzeln nach El-Nady [2001]

2.2.2 Seitenwurzelbildung durch Kultivierung in Flüssigkultur in RITA-Gefäßen

Für das Austreiben neuer Seitenwurzeln aus Internodien von *in-vitro* Reben in Flüssigkultur, wurde mit sogenannten RITA-Gefäßen (*Récipient à Immersion Temporaire Automatique*) gearbeitet. Diese zylinderförmigen, etwa 15 cm hohen Gefäße bestehen aus einem unteren Bechergefäß, in dem sich das Nährmedium befindet, sowie einem Einsatz, auf dem auf einer dünnen Schaumstoffschicht aus Polyurethan das Pflanzenmaterial aufgebracht wird (Abb. 2.2 b). Den oberen Abschluss bildet ein Schraubdeckel, der mit zwei Schläuchen und sterilen

Filtern für die Zu- und Abluft versehen ist (Abb. 2.2 a). Das System arbeitet mit einer zeitlich begrenzten und über eine angeschlossene Pumpe ausgelösten Überflutung des Pflanzenmaterials mit flüssigem Nährmedium. Dabei wird die sogenannte Wurzel-Induktionsphase, während der das Nährmedium 10 μ M IBA enthält, von der Expressionsphase, in der das Nährmedium frei von IBA ist, unterschieden.

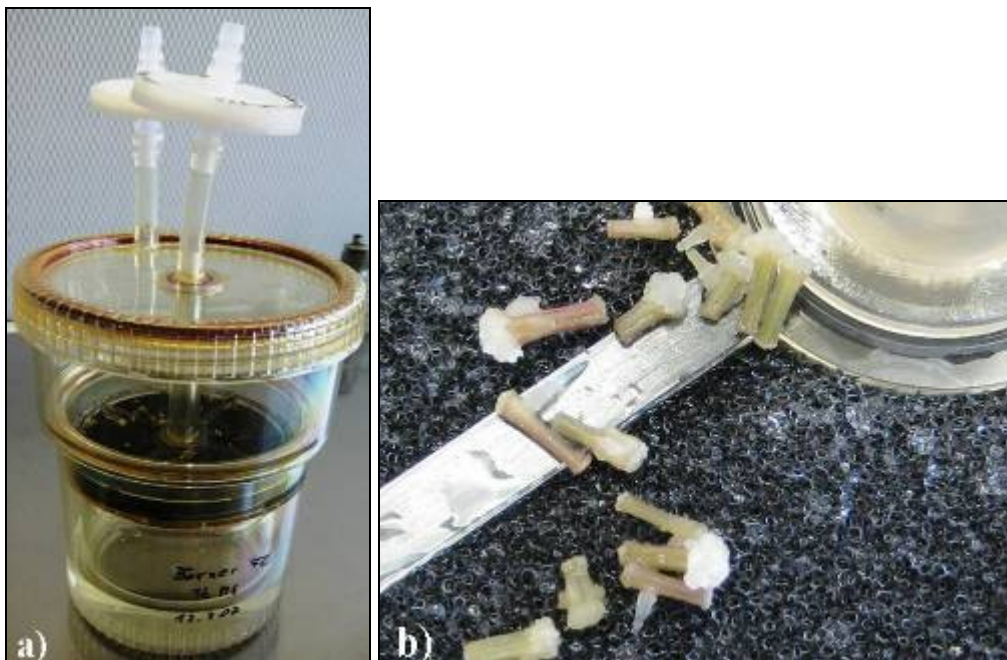


Abbildung 2.2: RITA-Gefäß zur Induktion des Seitenwurzelschritts
a) RITA-Gefäß; b) Internodien mit Seitenwurzeln auf der Schaumstoffschicht eines RITA-Gefäßes
(Quelle: Eigene Abbildung)

Zur Versuchsdurchführung wurden 150ml des Induktions-Nährmediums, bestehend aus 342,97mg $\frac{1}{2}$ MS, 3,00g Saccharose und 3,04ml IBA, auf einen pH-Wert von 5,6 eingestellt, in die RITA-Gefäße gefüllt und alles zusammen autoklaviert. Anschließend wurden unter auxenischen Bedingungen an einer sterilen Werkbank 0,5-1,0cm lange Internodien aus den *in-vitro* Pflanzen der Sorten Börner, SO4 und Riesling herausgeschnitten und auf die Schaumstoffschicht platziert. Die RITA-Gefäße wurden an die Pumpe angeschlossen und die Explantate alle 24 Stunden für 10 Minuten mit dem Medium überflutet. Nach einer Induktionsphase der Explantate von 48 Stunden wurde der Einsatz mit dem darauf befindlichem Pflanzenmaterial in ein neues, mit Expressionsmedium befülltes, autoklaviertes RITA-Gefäß platziert. Nachfolgend wurden die Gefäße wieder an die Pumpen angeschlossen. Die austreibenden Seitenwurzeln wurden für nachfolgende Untersuchungen akkumuliert.

2.2.3 Induktion der Nekrosen- bzw. Gallenbildung durch Applikation von IES und Separation des Wurzelgewebes

Eine experimentell induzierte Nekrosen- bzw. Gallenbildung wurde mittels einer 0,1%igen IES-Lösung, die einer Konzentration von 5,7mM entsprach, herbeigeführt. Zu diesem Zweck wurde die IES-Lösung mit einem Weichhaarpinsel auf die Streckungszone und die Kalyptra der aus dem Kultursystem neu entstandenen Seitenwurzeln von Börner aufgetragen. Dahingegen wurden die Internodien mit den neuen Seitenwurzeln aus den RITA-Gefäßen von Börner und zusätzlich von SO4 und vom Riesling jeweils einmal komplett in die IES-Lösung eingetaucht. Nach definierten Induktionszeiten von 7min, 15min, 30min, 60min, 90min und 150min wurden die Seitenwurzeln mit einem Skalpell von der Wurzel abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70°C.

2.3 Total-RNA Isolierung nach Baiges und Mas [2003]

Die RNA-Extraktion aus dem Wurzelspitzen Gewebe erfolgte nach dem Protokoll von Baiges et. al [2003]. Ungefähr 1g der bei -70°C gefrorenen Seitenwurzelspitzen wurden in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Mörsers homogenisiert und jeweils 100mg in ein 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde 500µl Extraktionspuffer zusammen mit 1µl 2-Mercaptoethanol hinzugefügt und das Gemisch sofort in ein 60°C warmes Wasserbad gestellt. Während der Inkubationszeit von 30 Minuten wurde in regelmäßigen Abständen für zwei bis fünf Minuten gemischt. 1 Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol [25:24:1] wurde nach der Inkubation hinzugegeben und das Gemisch 10 bis 15 Minuten geschüttelt. Die Proben wurden nun bei 10000rpm (*revolutions per minute*) für 40 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nachdem der entstandene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde, folgte die Zugabe von 0,7 Volumen kalten Isopropanols. Die anschließende Zentrifugation bei 10000rpm für 5 Minuten erfolgte bei 4°C. Das Pellet wurde nach zweimaligem Waschen mit 75%igem Ethanol unter einer Sterilbank getrocknet. Anschließend wurden 100µl DEPC jedem Reaktionsgefäß zugegeben, diese etwa 5 Minuten auf Eis inkubiert, dann die DNA resuspendiert. Um DNA aus der Probe zu entfernen wurde 0,33 Volumen von 8M LiCl hinzugegeben, über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend bei 13000rpm für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 75%igem Ethanol gewaschen und in einer Sterilbank getrocknet. Zum Schluss erfolgte die Lösung des Pellets in 50µl-100µl DEPC sowie die Messung der RNA-Konzentration im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280nm.

2.4 RNA-Proben und deren weitere Verwendung

Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über die extrahierten RNA-Proben, ihre im Folgenden verwendete Bezeichnung sowie ihre Verwendung in den Genexpressionsanalysen.

	Unsteriles Wurzel- kultursystem	RITA-Gefäße			Proben- beschreibung
<i>Methode/Sorte</i>	Börner	Börner	SO4	Riesling	
cDNA-Subtraktionen	K	-	-	-	unbehandelt, Kontrolle
	90'	-	-	-	90min IES induziert
	K 90'	-	-	-	90min H ₂ O induziert, Kontrolle
Microarrayanalysen	K	-	-	-	unbehandelt, Kontrolle
	90'	-	-	-	90min IES induziert
Genom one Analysen/ RT-PCR	-	B K	S K	R K	unbehandelt, Kontrolle
	-	B 90'	S 90'	R 90'	90min IES induziert
	-	B 90' b	-	-	90min IES induziert, biologische Wiederholung
	-	B 60'	S 60'	R 60'	60min IES induziert
	-	B 30'	S 30'	R 30'	30min IES induziert
	-	B 15'	S 15'	R 15'	15min IES induziert
	-	B 7'	S 7'	R 7'	7min IES induziert

Tabelle 2.1: RNA-Proben und deren weitere Verwendung in den Genexpressionsanalysen

2.5 cDNA Subtraktion

2.5.1 Vorbereitungen für die cDNA Subtraktion

Für die cDNA Subtraktion nach dem Protokoll des SMARTTM PCR cDNA Synthese Kits von TAKARA BIO waren diverse, im Folgenden erläuterte, vorbereitende Schritte notwendig. Durchgeführt wurde die cDNA Subtraktion im ersten Durchgang mit der B 90' Probe sowie der Kontrollprobe B K, im zweiten Durchgang ebenfalls mit B 90' und B K und zusätzlich mit der 90min mit H₂O behandelten Probe B K 90'.

Erststrangsynthese

Zunächst erfolgte nach Herstellerangaben eine Umschreibung der *messenger(m)*RNA in Einzelstrang cDNA ausgehend von 0,5µg total-RNA.

Zweitstrangsynthese

Für jeden PCR Ansatz wurde abhängig von der Konzentration der total-RNA 2 bis 10µl der Einzelstrang cDNA eingesetzt und nach Herstellerangaben die PCR vorbereitet. Zunächst erfolgte mit einem Testansatz die Bestimmung der optimalen Zyklenzahl. Dazu wurden nach einer Amplifikation im Thermocycler von 15, 18, 21 und 24 Zyklen jeweils 15µl des Testansatzes entnommen und die PCR Produkte auf einem 1,2%igem Agarosegel getestet. Nach Herstellerangaben konnte anhand des Gelbildes die optimale Zyklenzahl abgelesen werden, mit der die experimentellen Ansätze im Anschluss amplifiziert wurden.

Säulenchromatographie

Im nächsten Schritt erfolgte eine nach Herstellerangaben durchgeführte Aufreinigung der synthetisierten cDNA-Proben mit Chroma SpinTM-1000 Columns (TAKARA BIO). Abweichend vom originalen Protokoll wurde zum einen mit TE- anstatt mit TEN-Puffer eluiert. Zum anderen wurden zwei weitere Eluierungsschritte mit je 150µl durchgeführt, um die cDNA Ausbeute zu maximieren. Anschließend wurden die Eluate auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und die Intensitäten der elektrophoretisch aufgetrennten DNA verglichen. Die Eluate mit den höchsten cDNA-Gehalten wurden je Probe kombiniert

RsaI-Restriktionsverdauung

Aufgrund der Tatsache, dass die cDNA-Proben vor der Subtraktion mit Adaptoren ligiert werden, war es notwendig eine Restriktion mit dem Enzym RsaI durchzuführen, um kürzere „*blunt-ended*“ cDNA Fragmente zu erhalten. Hierzu wurde eine Verdauung mit RsaI nach Herstellerangaben durchgeführt, gegebenenfalls Puffer und Enzym an das größere Volumen aus den zusätzlichen Eluierungsschritten angepasst. Auf einem 1,2%igem Agarosegel erfolgte nach Herstellerangaben eine Kontrolle der verdauten Proben im Vergleich mit den unverdauten Proben.

Aufreinigung der cDNA

Für die Aufreinigung der cDNA wurden zunächst 400µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) zu den Proben gegeben, sorgfältig gemischt und bei 14000rpm für 10 Minuten

zentrifugiert. Nach der Abnahme des wässrigen Überstandes, wurden 1/10 Volumen 4,4M NH₄Ac hinzugegeben, gemischt und die Prozedur mit 1 Volumen kaltem Isopropanol repetiert. Eine weitere Zentrifugation bei 14000rpm für 20 Minuten folgte. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das entstandene Pellet unter einer Sterilbank getrocknet, in 10µl TE-Puffer gelöst und über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Quantifizierung der aufgereinigten cDNA

Die Konzentrationsmessung der aufgereinigten cDNA erfolgte mittels eines Biophotometers bei den Wellenlängen 230nm, 260nm und 280nm. Die Quotienten 260/280, 260/230 gaben Aufschluss über die Qualität der cDNA.

2.5.2 cDNA Subtraktion

Die B 90' Probe wurde jeweils als *tester* gegen die unbehandelte Probe B K und die H₂O behandelte Probe B K 90' als *driver* subtrahiert. Die erste Subtraktion erfolgte nur in eine Richtung, die zweite in beide Richtungen.

Präparation der Kontrollprobe

Im ersten Schritt erfolgte die cDNA Synthese einer dem Kit beiliegenden Kontrollprobe (*human skeletal muscle polyA⁺-RNA*) nach Angaben des Herstellers.

Adapterligation

Vorbereitend wurden die experimentellen *tester* Proben zunächst mit H₂O auf eine Konzentration von 300ng/µl eingestellt. Die Kontrollprobe wurde laut Protokoll verwendet. Anschließend erfolgte die Adapterligation den Herstellerangaben entsprechend.

Hybridisierung

Im nächsten Schritt wurden zwei Hybridisierungsschritte nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurden die *driver* Proben ebenfalls auf eine Konzentration von 300ng/µl eingestellt. Auch hier wurde die Kontrollprobe nach dem Protokoll verwendet.

PCR-Amplifikation

Der Hybridisierung folgten nach Herstellerangaben zwei PCR-Amplifikationsschritte. Nach Protokoll des Herstellers wurden vor der Amplifikation jedem Ansatz neben einer nicht-subtrahierten Negativkontrolle eine kommerziell subtrahierte Kontrolle zugeben. Nach der

Amplifikation wurden die PCR-Produkte auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen und die Ergebnisse der Subtraktion laut Protokoll des Herstellers abgelesen.

2.6 Microarrayanalyse der 90min Probe mittels Arabidopsis Chips

Die Microarraychips wurden von Galbraith et al. (vgl. Kapitel 2.1.5) bezogen. Gespottet waren sie mit dem *Arabidopsis genome oligo set 3.0* (QIAGEN). Die Version 3.0 umfasste 29110 Oligonukleotide (70mere), unter denen sich 28964 Protein kodierende und 87 microRNA-Gene von Arabidopsis befanden. Vor Gebrauch wurden die Microarraychips nach Angabe des Herstellers rehydriert und ein UV-Crosslinking bei 130 mJ durchgeführt. Die Microarraychips wurden in 1 % SDS (w/v) für fünf Minuten, anschließend in EtOH abs. für 30 Sekunden gewaschen und für zwei Minuten bei 1000 rpm trocken zentrifugiert.

Zur differentiellen Expressionsanalyse der 90min induzierten Börner Gewebeprobe im Vergleich zur unbehandelten Probe wurden DNA-Microarray Experimente mit Arabidopsis-Komplett-Genom-Arrays durchgeführt. In einem ersten Schritt erfolgte mit allen Proben eine cDNA-Synthese mit dem SMARTTM PCR cDNA Synthese Kit von BD BIOSCIENCES. Anschließend wurden die 90min IES behandelte Probe und die unbehandelte Probe in unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung gemeinsam auf einem Chip hybridisiert. Auf einem zweiten Chip wurden die gleichen Proben in der jeweils anderen Markierung hybridisiert, *flip-dye*-Prinzip genannt. Für eine technische Repetition der Microarrayanalyse wurden erneut eine cDNA-Synthese der beiden Proben sowie zwei Hybridisierungsexperimente durchgeführt. In die Analyse gingen demnach vier Chips ein.

2.6.1 Präparation der Proben und Markierung mit Cy3 und Cy5

Nach der Erstsynthese ausgehend von 0,5µg total-RNA nach Angaben des Herstellers (TAKARA BIO) folgte die Bestimmung der optimalen Zyklenzahl für den PCR-Ansatz mit einem Testansatz (vgl. 2.5.1). Dem Protokoll des Herstellers weiter folgend wurden anschließend die experimentellen Ansätze für zwei Zyklen weniger als die zuvor bestimmte optimale Zyklenzahl im Thermocycler amplifiziert. Für jede Probe wurden zwei Ansätze amplifiziert, die nach der PCR kombiniert wurden. Die im Anschluss daran durchgeführte Aufreinigung der PCR-Produkte mit dem QIAquick[®] Purification Kit (QIAGEN) erfolgte nach Herstellerprotokoll. Die gereinigten Proben wurden in jeweils 50µl Aqua dest. gelöst. Nachfolgend wurde die cDNA-Konzentration photometrisch bestimmt (vgl. Kap. 2.5.1).

Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den synthetischen Farbstoffen Cy3 und Cy5 markiert. Der Einbau erfolgte in einer zweizyklischen PCR-Amplifikation nach dem in Tabelle

2.2 aufgelistetem Ansatz im Thermocycler. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Proben jedes Hybridisierungsexperimentes in gleicher Konzentration eingesetzt wurden. Im Anschluss daran wurden die markierten Proben mit dem QIAquick[®] Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt, in 50µl Aqua dest. aufgenommen und die cDNA Konzentration bestimmt (vgl. Kap. 2.5.1).

Komponente	Eingesetzte Menge [µl]
PCR-Produkt	Je nach Probe
dCTP, dATP, dGTP, dTTP (10mM)	1,25 je dNTP
Cy3 bzw. Cy5	1,6
SMART Primer (10mM)	2,0
10xPuffer	10
50x Advantage Polymerase	2,0
A. bidest	ad 100

Tabelle 2.2: PCR-Ansatz zur Markierung der Proben mit Cy3 und Cy5

2.6.2 Hybridisierung der markierten Proben auf dem Microarraychip

Die gereinigten und markierten Proben wurden in gleichen Mengen zusammen mit den in Tabelle 2.3 aufgeführten Komponenten auf dem jeweiligen Chip hybridisiert. Die verwendete cDNA-Menge variierte dabei zwischen 0,5µg und 3,5µg. Die Hybridisierungsansätze wurden gründlich gemischt und einer einminütigen Zentrifugation unterzogen. Nach einer zweiminütigen Denaturierung im Thermocycler bei 94°C wurden die Proben unmittelbar auf Eis gestellt.

Komponente	Menge [µl]
Aqua bidest	Je nach Probe
markierte Probe	Je nach Probe
20x SSC	25
Liquid Block	15
2% SDS	10
Gesamt	250

Tabelle 2.3: Ansatz zur Hybridisierung der markierten Proben auf den Chips

Der jeweilige Microarraychip wurde zunächst auf einer 65°C warmen Heizplatte platziert. Anschließend wurde der vollständige Hybridisierungsansatz auf den Chip pipettiert und ein Deckglas ohne Einschluss von Luft darüber gelegt. Die Chips wurden in eine Hybridisierungskammer gelegt, in die zuvor einige Tropfen Aqua dest. gegeben wurden. Die folgende Inkubation erfolgte im Wärmeschrank bei 55°C für etwa 15 Stunden.

2.6.3 Waschen und Scannen der Microarraychips

Die Waschschritte der Microarraychips wurden an das Protokoll von Galbraith et al. angelehnt (vgl. Kap. 2.1.4). Dazu wurden die Microarraychips zunächst in Waschlösung MA/1 für fünf Minuten bei 55°C unter leichtem Schütteln gewaschen. Währenddessen konnte das Deckglas entfernt werden. Im Anschluss daran folgten ebenfalls unter leichtem Schütteln zwei weitere Waschschritte der Chips in den Waschlösungen MA/2 bzw. MA/3 bei Raumtemperatur. Nach dem Waschen wurden die Microarraychips in einem leeren 50ml Reaktionsgefäß zum Trocknen bei 1200rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Direkt im Anschluss wurden die Chips mit dem Affymetrix 428TM Array Scanner und der Software JaguarTM 2.0 von AFFYMETRIX gescannt. Die Emissionen für Cy3 bzw. Cy5 wurden bei 570nm bzw. 670nm gemessen.

2.6.4 Datenauswertung der Microarraychips

Die Visualisierung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale wurde mit der Software *ImageGeneTM 5.6 Standard Edition* (BIODISCOVERY) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software *GeneSightTM 4.1 Lite Edition* (BIODISCOVERY). Für jedes einzelne Hybridisierungsexperiment wurde die gleiche, im Folgenden dargelegte siebenstufige Datentransformation realisiert. (1) Zu Beginn erfolgte eine lokale Hintergrundkorrektur, der sich (2) zweitens die Entfernung negativer bzw. minderwertiger Spots anschloss. (3) Im dritten Schritt wurden die fehlenden Werte aus Schritt zwei durch das arithmetische Mittel aller auf dem Chip befindlichen Signalwerte ersetzt. (4) Als nächstes wurde ein Schwellenwert festgelegt und alle Gene entfernt, die bei der mit IES behandelten Probe und der unbehandelten Kontrolle unterhalb dieses Wertes lagen. Der Schwellenwert lag bei allen Hybridisierungsexperimenten bei 1000. Im fünften und sechsten Schritt wurde eine (5) Logarithmierung der Signalwerte zur Basis 2 und eine (6) globale, lineare LOWESS-Normalisierung durchgeführt. Die Bildung der Ratio für jedes Gen aus den Signalwerten von Probe und Kontrolle bildete den Abschluss der Datentransformation. Zusätzlich wurde zur Identifizierung differenziell exprimierter Gene ein sogenannter *fold-change-cut-off* von zwei gesetzt. Das bedeutet, dass Gene, die in einem der beiden Farbkanäle eine doppelt so hohe bzw. niedrigere Signalstärke lieferten, als differentiell exprimiert bewertet werden konnten. Konnten auch bei einer visuellen Überprüfung der Spots keine Hinweise auf Verunreinigungen gefunden werden, gingen die Gene in die Ergebnisse ein.

2.7 cDNA-Synthese nach dem iScript™ cDNA Synthese Kit von BioRad

Einzelsträngige cDNAs für den Einsatz in der Real-Time-PCR wurden mittels des iScript™ cDNA Synthese Kit von BioRad nach Herstellerangaben ausgehen von 0,5µg total-RNA synthetisiert.

2.8 Design RT-PCR tauglicher Primer

Für die Amplifikation von Börner-, SO4- und Riesling-cDNAs in der RT-PCR wurden 32 spezifische Primerpaare generiert. Dazu wurden die jeweiligen Weinreben ESTs in die Online-Software *Primer 3* [Rozen und Skaletsky, 2000] eingespeist und unter folgenden Konditionen Primer erstellt: optimale Tm 60°C, GC-Gehalt zwischen 40% and 60% und Primergröße zwischen 18 and 22 bp. In Tabelle 2.4 sind die zur Primergenerierung herangezogenen *Vitis*-Gene und die Sequenzen aller verwendeten Primerpaare dargestellt. Die Synthese der Primer erfolgte über die MWG BIOTECH AG (Deutschland). Vor Gebrauch wurden die Primer in DEPC behandeltem Wasser über Nacht bei 4°C resuspendiert.

Genbezeichnung	Vitis-EST	Primersequenz (3' – 5')
Vitis vinifera gene for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds	AB015870	3' GATGTGCTGGGTTGTTGATG 5' 3' TGTGATTGAGGAGCTTGGTG 5'
Vitis labrusca x Vitis vinifera VXET1 mRNA for Xyloglucan-transglycosylase, complete cds.	AB074999	3' CAATGGAATCGGTGCAGAAG 5' 3' CAAATCTTGGAGGCTTGGAC 5'
Vitis vinifera PR-4 type protein (PR-4a) gene, complete cds	AF061329	3' GGGCATCCATTGACTGACTT 5' 3' TGGTTTGTGAGTGAGGAGGA 5'
Vitis vinifera alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) mRNA, complete cds	AF194174	3' TTTCGGTTTAGGAGCAGTGG 5' 3' CATCGGTCATCTCAGCAATC 5'
Vitis vinifera beta-tubulin (TUB) mRNA, partial cds	AF196485	5' GCAGTGAACCTGATCCCATTTCC 3' 5' GCTCACTCACCTCCTGAACATC 3'
Vitis vinifera putative transcription factor mRNA, complete cds	AF281656	3' CACGAGCATCACGAGAAGAA 5' 3' GGGTTTCACAAGGACACACA 5'
Vitis vinifera polygalacturonase inhibiting protein mRNA, complete cds	AF305093	3' TCGTTGACTTCTCACGGAAC 5' 3' CACCGGAATCTTACCACACA 5'
Vitis vinifera thaumatin-like protein (TI3) mRNA, complete cds	AF532965	3' GCTATGCAGCCACCTTCAAC 5' 3' CGGTCTCACACTTCCCATTC 5'
Vitis vinifera class IV chitinase (Chi4D) mRNA, complete cds	AF532966	3' CAGCTTTCTTCGCTCATGTC 5' 3' CAACAATTCCAGGGTTGCTC 5'
Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related protein (grip32 gene)	AJ237991	3' GAGAGGGTTATGGGCAAGGT 5' 3' GTGGGAAGAAGAAGGGAGGA 5'

Tabelle 2.4 : Spezifische Primerpaare zur Amplifikation von Börner, SO4 und Riesling-cDNAs

Vitis vinifera mRNA for flavonoid-3,5'-hydroxylase	AJ880356	3' CATCAAGCGTAATCGAGTGG 5' 3' AAGGTTTCAGTGGTGTGGATG 5'
Vitis vinifera proline-rich protein 1 (PRP1) mRNA, complete cds	AY046416	3' GATTTGTTGGGAGGGCTTGT 5' 3' ATCCACTTAGGCAGGGCATT 5'
Vitis vinifera putative alanine acetyl transferase (AAT) mRNA, partial cds	AY156051	3' TGGTGGATGTGGAGAATGGT 5' 3' GAATCAAGGTTGGGGATCAG 5'
Vitis vinifera lipoxygenase (Lox) mRNA, partial cds.	AY159556	3' CAGACCCTTCTTGGCATCTC 5' 3' CACAGGCCCAACTCTGTTCT 5'
Vitis riparia beta-1,3-glucanase mRNA, complete cds	AY353062	3' CAAGGCCAAATCAAGGTCTC 5' 3' TGTGTGTTGCCGGTGTAAC 5'
Vitis aestivalis lipid transfer protein mRNA, complete cds	AY39574	3' CCTCAACAGCTCGGCTAAGA 5' 3' ACCTTGGTGCAGTCAGTGG 5'
Vitis aestivalis putative WRKY4 transcription factor mRNA, complete cds	AY484579	3' GAGCATAACCATCCACACCA 5' 3' GCCATCTGTTCCACCAAGAA 5'
Vitis aestivalis putative ethylene response factor 4 mRNA, complete cds.	AY484580	3' TAGGGTTTGGCTTGGAACCT 5' 3' ATCCGGTGAGGCTTCTTCTT 5'
Vitis vinifera cultivar Riesling actin mRNA, partial cds.	AY847627	5' CTATTGGAGCTGAGAGATTC 3' 5' TGGGAGCAAGAGCAGTGATT 3'
Vitis vinifera sucrose responsive element binding protein (SREBP) mRNA, complete cds	AY953543	3' GATCATACCTCCCGAAACGA 5' 3' GTGTTGGTGCATCGGAATCT 5'
Disease resistance protein (NBS-LRR class), putative	CA32EN0005	5' CAAGCAGAACCCATTTGTGA 3' 5' TGGATCTCAACCCAGATGTT 3'
fag-B-IES4h-03 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-03 similar to Solanum tuberosum methionine synthase (MS) mRNA (AF082893), mRNA sequence	CK906347	3' TAAGGCGCTTGGAGTAGACA 5' 3' ATCACAAGGGTGGGTTCATC 5'
fag-B-IES4h-04 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-04 similar to V.vinifera mRNA for polyphenol oxidase - catalytic unit (Z27411), mRNA sequence	CK906348	3' GGCCAAGGAAATCAAGGAGT 5' 3' TTATGGGAGTGTTGGTGTGG 5'
fag-B-IES4h-08 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-08 similar to Malus domestica mRNA for adventitious rooting related oxygenase ARRO-1 (AJ225045), mRNA sequence	CK906352	3' TCCTCACCAAAGGGAGACAA 5' 3' AGGAAGCTGGAATCTGTGTG 5'
Elongation factor 1a	CK986222	5' GATCTCAAGCGTGGGTTTGT 3' 5' ATCGCCTGTCAATCTTGGTC 3'

Tabelle 2.4 (Fortsetzung)

fag-B-IES4,5h-27 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4,5h-27 similar to Vitis labrusca labst1 gene for stilbene synthase, mRNA sequence	DV466767	3' GGCTCACCTTTCATTTGTGG 5' 3' TGCCTAGTTGCTTCGAGTTTC 5'
Vitis vinifera Regent and Trincadeira SMART-GATEWAY combined cDNA library Vitis vinifera cDNA clone VvTR1578 similar to putative glutathione S-transferase T4, mRNA sequence	EC907674	3' AGAAGGCTATGGAGTCAGCA 5' 3' TCATGGAGTGATGGGAACCT 5'
Universal stress protein (USP) family protein / early nodulin ENOD18 family protein	TC38871	5' TGTTCCTCGCACCGCTTT 3' 5' CTCGCCCTCTTCGTAGTGTC 3'
Putative ethylene receptor (EIN4)	TC40660	5' CACTAATAGGGCTGTGACCAG 3' 5' ATGGCTTCTGTGACTTACC 3'
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	TC46331	5' ATCGACTTGATCCGCCACAT 3' 5' AGCCTCATAACACCCAAACA 3'
P-Glycoprotein 1	TC47027	5' GGCTAATGCCACACAAGTTCGT 3' 5' AAGAGCACTCGTTGCCTCATC 3'
Vitis vinifera CHS mRNA for chalcone synthase	X75969	3' CACATGACCGAGTTGAAGGA 5' 3' ACAAGGTGGGTGATCTTGA 5'

Tabelle 2.4 (Fortsetzung)

2.9 Gelelektrophorese zur Auftrennung der PCR-Produkte

Zur Darstellung der Länge der amplifizierten PCR-Produkte wurden die DNA-Fragmente der Größe nach elektrophoretisch mittels eines horizontalen Agarosegels aufgetrennt. Die Agarose wurde in Konzentrationen zwischen 0,8% bis 2,0% (w/v) mit 1x E-Puffer versetzt. Als DNA-Größenstandard diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix von MBI FERMENTAS, der in einer Konzentration von 0,08µg/µl eingesetzt wurde. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die DNA-Proben mit jeweils 0,8µl bis 2,0µl 10x Stopppuffer versetzt. Das Gel wurde einem elektrischen Gleichspannungsfeld mit einer Stromstärke von 60mA bis 100mA ausgesetzt. Die anschließende Färbung der Agarosegele erfolgte in einer 1µg/ml Ethidiumbromidlösung in Aqua dest., der zwei Waschschrte folgten.

Die Detektion der elektrophoretischen Auftrennung wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365nm mit dem Geldokumentationsgerät Epi Chemi™ Darkroom und der Software Lab Works™ durchgeführt.

2.10 Sequenzierung von Börner, SO4 und Riesling-cDNA

Vorbereitend für eine DNA Sequenzierung mussten zunächst die cDNA Fragmente aus dem elektrophoretischem Gel extrahiert, in einen Vektor ligiert und in Bakterien transformiert werden. Bei erfolgreichem Verlauf wurde im Anschluss eine Präparation der Plasmide durchgeführt, deren Insert dann sequenziert wurde.

2.10.1 Extraktion von cDNA Fragmenten aus elektrophoretischem Gel

Die für die Sequenzierung vorgesehenen cDNA Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpell aus dem elektrophoretischen Gel ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Extraktion und Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben. Die DNA wurde mit 50µl H₂O eluiert.

2.10.2 Klonierung

Vektorligation

Als Vektor für die Ligation der isolierten DNA-Fragmente diente der pGEM-T Easy Vektor von PROMEGA. Der Ligationsansatz erfolgte nach Herstellerangaben, wobei ein molares Vektor-/ Insertverhältnis von 1:3 einzuhalten war. Bei sehr niedrigen DNA-Konzentrationen wurde das Herstellerprotokoll so verändert, dass stets mindestens 1µl DNA-Probe zu dem Ligationsansatz gegeben wurde. Das Endvolumen betrug 20µl.

Transformation

Transformiert wurden XL-1 Blue MRF' *E.coli* Bakterien (Stratagene). Dazu wurden zunächst 100µl der bei -70°C gelagerten, kompetenten *E.coli* langsam auf Eis aufgetaut und nachfolgend der komplette Ligationsansatz zugegeben. Im nächsten Schritt wurden die Reaktionsgefäße 30min auf Eis inkubiert. Nun wurden 100µl flüssiges LB-Medium hinzugegeben und das Gemisch bei 37°C für 30min in einem Wasserbad inkubiert. Nachdem zu jedem Tube 20µl IPTG (25mg/ml) und 10µl X-Gal (100mg/ml) beigelegt wurden, erfolgte eine Ausplattierung mit 200µl dieser Mischung auf eine LB-Carbenicillin(10µg/ml)-Platte. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Kolonie-Check-PCR

Die Überprüfung einer Integration des Plasmids in den Bakterien erfolgte zum einen visuell anhand der Blau-Weiß-Selektion nach Ullmann et al. [1967]. Handelte es sich um weiße Kolonien wurde eine PCR-Reaktion mit den universellen Primern M13 durchgeführt, um das

Insert auf die gewünschte Größe hin zu überprüfen. Dazu wurde mit einem sterilen Zahnstocher ein kleiner Teil der Kolonie entnommen, in einen PCR-Ansatz (Tab. 2.5) überführt und im Thermocycler amplifiziert (Tab. 2.6).

Elemente	Eingesetzte Menge [μ l]
10x Puffer	1,0
MgCl₂	0,8
DNTP	0,25
M13 for	0,3
M13 rev	0,3
Taq	0,1
A. bidest.	ad 10

Tabelle 2.5: PCR-Ansatz zur Insertkontrolle

Zyklus	Repetition.	Schritt	Temperatur [$^{\circ}$ C]	Dauer
1	1	1	95	5min
2	30	1	95	30sek
		2	65	90sek
3	1	1	75	5min

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Insertkontrolle

Anhand der nachfolgend durchgeführten elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 0,8%igem Agarosegel konnte abgelesen werden, ob der Einbau erfolgreich war.

Anlegen von Stammkulturen

Für die Präparation von Stammkulturen wurden zunächst 4ml LB-Medium und 20 μ l Carbenicillin (10 μ g/ml) in ein verschraubbares Reagenzglas gegeben. Im nächsten Schritt wurden die Kolonien vollständig von der Platte entnommen und in das Reagenzglas überführt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 $^{\circ}$ C auf einem Schüttler wurde aus jeder Übernachtskultur 1ml entnommen und in ein 1,5ml Reaktionsgefäß, welches 0,5ml Glycerol enthielt, gefüllt. Das Gefäß wurde mit Parafilm verschlossen, gründlich gemischt und nachfolgend bei -70 $^{\circ}$ C gelagert.

2.10.3 Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation erfolgte ausgehend von 3ml Übernachtskultur mit dem QIAprep Miniprep Kit von QIAGEN nach Herstellerangaben. Plasmid-DNA wurde in 50 μ l Aqua dest. aufgenommen.

2.10.4 Sequenzierung

Die cDNA-Sequenzierung erfolgte ausgehend von jeweils 15µl Plasmid-Probe bei der Firma GENTERprise Genomics (Mainz).

2.10.5 Annotierung der Börner-Sequenzen

Zunächst wurde mit Hilfe der Online-Software VecScreen (NCBI) der Vektorbereich innerhalb der Sequenzen kenntlich gemacht und die Primerbindungsstellen markiert. Im nächsten Schritt wurde mit der verbleibenden Sequenz mittels dem *basic local alignment search tool* (Blast) [Altschul et al., 1990] auf Nukleotidebene (Blastn) und Aminosäureebene (Blastx) in der Datenbank NCBI nach Homologien zu Gen- bzw. Proteinsequenzen in anderen Pflanzen gesucht. Die höchste Übereinstimmung wurde notiert und die Sequenz in NCBI eingetragen. War ein Vergleich zwischen Sequenzen notwendig, wurde die Internetanwendung *Multalin* (siehe Internetquellen Kapitel 2.1.5) hinzugezogen. Die annotierten Börner Sequenzen wurden jeweils unter einer bestimmten ID in die EST Datenbank des NCBI eingetragen.

2.11 DNA-Amplifikation mittels Real-Time-PCR im iQ™5

Für die RT-PCR-Reaktionen wurde ein Premix, bestehend aus 12,5µl des iQ SYBR Green Supermix (BioRad), je 1,8µl des spezifischen Primerpaares (10x), 5,6µl steriles H₂O sowie 3µl der cDNA Probe (25ng/µl) zusammen pipettiert, so dass ein Endvolumen von 25µl pro Reaktionsgefäß in den Cycler eingesetzt wurde. Um mögliche Pipettierfehler leichter erkennen zu können, wurde stets im doppelten Ansatz gemessen. Als Negativkontrolle diente in allen Läufen steriles, deionisiertes H₂O. Nach einem initialen, laut Herstellerangabe dreiminütigem, Denaturierungsschritt, der die Aktivierung der iTaq™ DNA Polymerase zur Folge hat, wurde stets das kongruente, in Tabelle 2.7 dargestellte, PCR-Programm verwendet.

Zyklus	Repetition	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer
1	1	1	95	3min
2	40	1	95	30sek
		2	55-60	45sek
		3	75	30sek
3	1	1	95	1min
4	1	1	55	1min
5	18	1	55	10sek

Tabelle 2.7: RT-PCR Programm zur quantitativen Expressionsanalyse

2.11.1 Validierung interner Kontrollen zur quantitativen Genexpressionsanalyse

Für eine präzise und zuverlässige quantitative Genexpressionsanalyse wird eine Normalisierung gegen ein internes Kontrollgen, im Folgenden als *housekeeping gene* (HK) bezeichnet, benötigt. Es sollte ubiquitär in der Weinrebe exprimiert sein und keine Schwankungen innerhalb der unterschiedlich behandelten Proben aufweisen.

Vier HK-Kandidaten (Actin, GAPDH, β -tubulin und Elongationsfaktor- α 1 (EF)) wurden ausgewählt und deren entsprechende Primer mit jeder verwendeten Probe in einem RT-PCR-Lauf getestet. Anschließend wurde aus den CT-Werten mittels der frei verfügbaren EXCEL-basierten Software *geNorm* [Vandesompele et al., 2002] die durchschnittliche Expression-Stabilität (M) berechnet. Ziel der Software ist es, die HK mit der stabilsten Expression in einem Probenpanel zu identifizieren. Ein niedriger M-Wert ist indikativ für eine stabilere Expression, woraus eine Steigerung der Eignung eines HK für die Genexpressionsanalyse resultiert. Das Programm eliminiert jeweils den HK mit dem schlechtesten Ergebnis und berechnet für die verbliebenen einen neuen M-Wert, bis nur noch zwei HK übrig bleiben. Dabei werden HK mit M-Werten oberhalb von 1,5 von den Analysen ausgeschlossen.

2.11.2 Ermittlung der Effizienzen von Zielgen und HK

Damit die quantitative Genexpressionsanalyse stringent ist, sollte die Effizienz der Amplifikation von Zielgen und HK in die Berechnung der Genexpression einbezogen werden. Eine optimale Effizienz ergibt sich, wenn die Anzahl der PCR-Produkte in jedem Zyklus verdoppelt wird. Zu deren Berechnung wird für jeden Primer aus den CT-Werten einer fünfstufigen Verdünnungsreihe beider Gene eine Standardkurve angefertigt. In den vorliegenden Analysen wurde stets die jeweilige unbehandelte Probe zur Ermittlung der Effizienz herangezogen. Die Effizienz E der Reaktion lässt sich dann aus der Steigung („slope“) der Standardkurve nach $E = 10^{-1/\text{slope}}$ berechnen [Pfaffl, 2001]. Bei Effizienzen unter 80% oder über 150% wurden die Primer nicht für eine Genexpressionsanalyse verwendet.

In die Kalkulation der Genexpression gingen alle Effizienz-Werte der jeweiligen Gene von Börner, SO4 und Riesling ein, um einen expressionellen Unterschied nicht nur innerhalb sondern auch zwischen den Sorten eruieren zu können.

2.11.3 Berechnung der normalisierten Expression

Die grundlegende Berechnung der normalisierten Expression erfolgte nach der effizienzkorrigierten $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode nach Pfaffl et al. [2004]. Da in den vorliegenden Analysen aber

mehrere HK, GOI und Rebsorten verwendet wurden, ist die Berechnung auch an Vandesompele [2002] angelehnt. Die Berechnungsformeln sind im Folgenden dargestellt:

- [1] **Relative Quantity** (Probe a (Gen x)) = RQ =

$$= \text{Efficiency } E (\text{Gen x}) \exp (\text{CT (Referenzgen)} - \text{CT (Probe a)})$$
- [2]
$$E = 10 \exp (-1/\text{slope})$$
- [3] **Normalized Expression** (Probe a (Gen x)) =

$$= \text{RQ (Probe a (Gen x))} /$$

$$[(\text{RQ (Probe a (HK1))} * \text{RQ (Probe a (HK2))} * \dots * \text{RQ (Probe a (HKn))}) \exp (1/n)]$$

Zunächst wird die *Relative Quantity* (QR) [1] berechnet. Das heißt, der CT-Wert einer Probe wird unter Einbezug der Effizienz [2] des zu untersuchenden Gens auf ein Referenzgen bezogen. Bei allen Kalkulationen wurde die hier die Probe „B K“ als Referenzgen verwendet. Im nächsten Schritt wird die QR gegen die ausgewählten HK normalisiert [3]. Man erhält so den relativen Expressionsunterschied (*Normalized Expression* - NE) einer Probe, normalisiert zu den HK und relativ zu dem Referenzgen.

2.12 Microarrayanalyse mittels der *Geniom one* Technik

Zur differentiellen Expressionsanalyse in Börner, SO4 und Riesling Wurzeln nach IES-Behandlung wurde insgesamt mit sechs Chips die *Geniom one* Technik durchgeführt. Die Oligonukleotid Synthese, Hybridisierung, Detektion und Teile der Datenanalyse wurden von der Febit biomed GmbH durchgeführt.

2.12.1 Verwendete ESTs

Für die *Geniom one* Analysen wurden 600 *Vitis* ESTs ausgewählt. Als Quelle der Sequenzen diente die Datenbank NCBI (vgl. Kap. Onlinequellen 2.1.5) sowie bisher ermittelte ESTs von Börner. Es wurden Gene aus fünf Funktionsgruppen gewählt: Auxin-assoziierte Gene, Gene, die in biotischen und abiotischen Stress involviert sind, HR-assoziierte Gene, sowie TF. Zusätzlich wurden verschiedene HK als Kontrollen hinzugenommen. Die *Geniom one* Software fügte außerdem 280 interne Kontrollen hinzu. Somit wurden 880 ESTs pro Array verwendet. Die Länge der Oligonukleotide entsprach 25mer. Pro Gen und Array wurden 10 Sonden aufgetragen. Insgesamt befanden sich demnach 7040 Sonden auf jedem Chip.

2.12.2 Versuchsaufbau der *Geniom one* Analysen

Es wurden sechs Microarrays (Chip a - f) mit der *Geniom one* Analyse durchgeführt. Dabei wurden die einzelnen Proben immer nach dem gleichen, in Abbildung 2.3 dargestellten, Muster auf die acht Kanäle des DNA-Prozessors verteilt. Die IES behandelten sowie die unbehandelten Proben wurden jeweils in einer technischen Wiederholung auf dem Chip hybridisiert. Jede Probe nahm demnach zwei Kanäle in Anspruch.

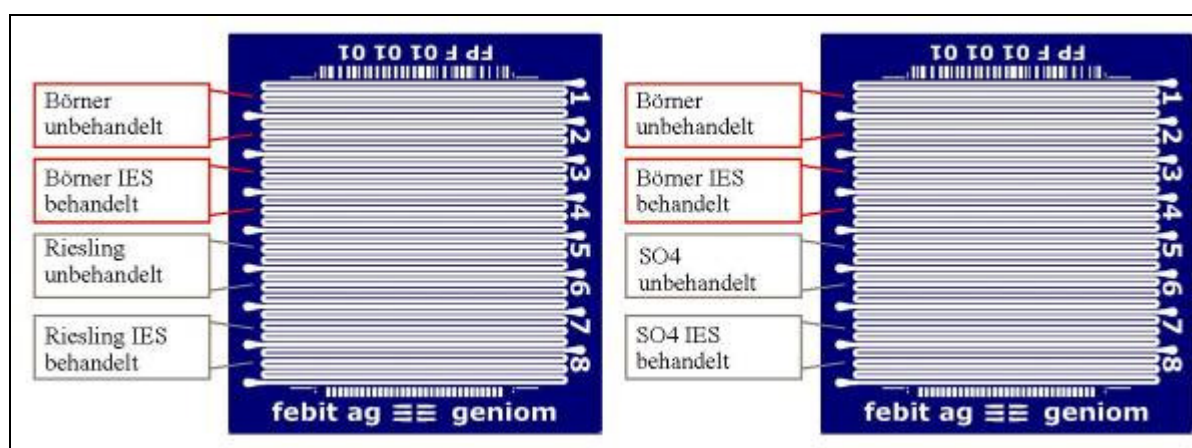


Abbildung 2.3: Probenbelegung auf dem DNA-Prozessor des *Geniom one*

a) Chip a, c-f; b) Chip b

(Quelle: Modifiziert von febit biomed GmbH)

Wie in Tabelle 2.8 ablesbar waren auf ‚Chip a‘ und c‘ bis f‘ IES behandelte Proben von Börner und Riesling Proben mit Induktionszeiten von 90min, 60min, 30min, 15min und 7min zusammen mit den jeweils unbehandelten Kontrollen aufgetragen.

	Börner		Riesling		SO4	
‚Chip a‘	90min IAA	unbehandelte Kontrolle	90min IAA	unbehandelte Kontrolle		
‚Chip b‘	90min IAAb	unbehandelte Kontrolle			90min IAA	unbehandelte Kontrolle
‚Chip c‘	60min IAA	unbehandelte Kontrolle	60min IAA	unbehandelte Kontrolle		
‚Chip d‘	30min IAA	unbehandelte Kontrolle	30min IAA	unbehandelte Kontrolle		
‚Chip e‘	15min IAA	unbehandelte Kontrolle	15min IAA	unbehandelte Kontrolle		
‚Chip f‘	7min IAA	unbehandelte Kontrolle	7min IAA	unbehandelte Kontrolle		

Tabelle 2.8: Versuchsaufbau der *Geniom one* Analysen

Auf ‚Chip b‘ wurde neben einer biologischen Wiederholung der 90min Probe von Börner (90min IAAb) sowie der unbehandelten Probe, die 90min IES behandelte und die unbehandelte Probe von SO4 hybridisiert (Tab. 2.8).

2.12.3 Färbung, Fragmentierung und Hybridisierung

Für die Markierung der RNA Proben wurde das MessageAmp II Biotin Enhanced Kit (Ambion) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Ausgangsmaterial waren 1µg total-RNA. Die in vitro Transkription ist über Nacht für 14 Stunden durchgeführt worden.

Vorbereitend für die Hybridisierung der Proben wurden zunächst für jeden Array 7,5µg bio cRNA nach folgendem Protokoll fragmentiert. Zuerst wurde die cRNA in 2µl DEPC Wasser gelöst und zu 2µl 2x Fragmentierungspuffer (Febit biomed GmbH) gegeben. Der Ansatz wurde 35Min bei 94°C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Nachfolgend wurden 12µl febit Hybridisierungsmix (Febit biomed GmbH) zu jedem Ansatz gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 45°C für 16 Stunden. Im Anschluss daran wurden 20µl der präparierten Proben mit einer speziellen Spritze in den DNA Prozessor injiziert. Die Chips wurden mit einem speziellen Waschprogramm gewaschen und mit Streptavidin-Phycoerythrin markiert. Diese Schritte sind automatisiert. Die Signaldetektion erfolgte mit Hilfe eines Cy3-Filterset und eines internen acht Megapixel CCD Kamerasystems des *Geniom one*.

2.12.4 Datenauswertung

Die Signalstärke der einzelnen Spots wird automatisch berechnet und in einer Datei gespeichert. Die Datenauswertung wurde mit der Software *Gene Spring* (Agilent) unter konsekutiven Bedingungen realisiert:

- (1) Bildung des Medians aus den 10 Datenpunkten (Sonden) pro Gen
- (2) Werte unter 0,01 wurden als 0,01 gesetzt
- (3) Pro Chip: Jeder Messwert wurde durch die 50. Perzentile von allen Messwerten der Probe dividiert (alle Messwerte auf einem Chip werden durch eine spezifische Perzentile geteilt. Voreingestellt ist 50%)

Die pro Chip Normalisierung dient als Kontrolle der Chip-weiten Schwankungen in den Intensitäten. Diese Schwankungen können durch inkonsistentes Waschen, inkonsistente Probenpräparation oder andere Mängel in der Microarrayproduktion entstehen.

- (4) Pro Gen: Jedes Gen wurde durch den Median seiner Messwerte in allen Proben dividiert

(Signalstärke von GenA in sampleX / Median von jedem Messwert, der für GenA in dem Experiment genommen wurde)

- (5) Wenn der Median der Rohdaten unter 10 lag, wurde jeder Messwert für dieses Gen durch 10 dividiert, falls der Numerator über 10 lag. Anderenfalls wurde der Messwert aus der Berechnung ausgeschlossen
- (6) Erstellung von Listen aller Gene, die bei Gruppierung zweier Proben einen 1,5-fachen Unterschied zeigten, der statistisch signifikant nach folgenden Punkten ist:
- (7) Parametrischer Test: Student's t-Test mit einer Grenze des p-Wert bei 0,05, unter Annahme der Gleichheit der Varianzen
- (8) Benjamini-Hochberg-Korrektur mit den resultierenden p-Werten (Benjamini, Y. und Hochberg, 1995)

Bei dieser Korrektur werden die p-Werte der einzelnen Vergleiche in absteigender Reihenfolge sortiert und anschließend mit einem Faktor, der aus dem Umkehrbruch der Anordnung in der nummerierten Reihenfolge der p-Werte besteht, multipliziert. Diese Korrektur ist notwendig, um die Fehlerrate beim Vergleich aller Gene möglichst gering zu halten

Anhand der normalisierten Daten wurde die *fold change* der gruppierten Proben von den Genen gebildet, die einen signifikanten Unterschied nach oben genannten Bedingungen zeigten. Die *fold change* bezeichnet das Verhältnis der Genexpression im Bezug auf den Vergleichswert. So konnte demonstriert werden, ob die Gene eine Hoch- oder Herunterregulation in Bezug auf die Vergleichsprobe zeigten.

3 Ergebnisse

3.1 Sammlung von Wurzelmaterial aus Börner-, SO4- und Rieslingreben

3.1.1 Seitenwurzelbildung in einem unsterilen Wurzelkultursystem

Die Bildung von Seitenwurzeln der Sorte Börner begann in der Regel zwei bis drei Wochen nach Ansatz des Kultursystems. In dem folgenden Zeitraum von drei bis vier Wochen war die Gewinnung von Seitenwurzeln möglich. Danach ließ das Wachstum der Wurzeln deutlich nach. Das Heranziehen von Seitenwurzel war an jahreszeitliche Schwankungen gebunden. So konnten in den Wintermonaten keine Wurzeln für das Kultursystem verwendet werden. Die Sammlung einer ausreichenden Menge an Seitenwurzeln für die nachfolgende RNA-Extraktion erstreckte sich meist über einen Zeitraum von drei Monaten.

3.1.2 Seitenwurzelbildung in RITAs

Das Seitenwurzelwachstum von Börner, SO4 und Riesling in den RITA Gefäßen setzte sieben bis zehn Tage nach Umsetzung in das Expressionsmedium ein. Die Ausbeute in den darauf folgenden sechs bis acht Tagen war stets sehr hoch. Vereinzelt zeigte erst nach zehn bis 14 Tagen ein Seitenwurzelwachstum. Sortenspezifische Unterschiede bei der Wachstumsgeschwindigkeit der Seitenwurzeln konnten nicht festgestellt werden. Die Anzahl der Seitenwurzeln pro Internodium variierte zwischen einer und vier. Aufgrund der Verwendung von *in-vitro* Pflanzenmaterial war die Gewinnung von Seitenwurzeln im RITA System nicht an die Jahreszeit gebunden. Nach einem Maximum von drei Wochen war eine ausreichend hohe Menge an Seitenwurzeln vorhanden, um daraus RNA zu extrahieren.

3.2 Experimentelle Induktion der Nekrosenbildung an Seitenwurzeln von Börner durch IES

3.3 Kultursystem

Eine 0,1%-ige IES Behandlung an Seitenwurzeln von Börner aus dem unsterilen Wurzelkultursystem führte zu einer Bildung von Nekrosen nach etwa 24h. Die Braunfärbung des Gewebes zeigte sich ausschließlich auf dem behandelten Bereich.

3.3.1 RITA

Die in RITA Gefäßen herangezogenen Seitenwurzeln von Börner zeigten ebenfalls spätestens 24h nach der 0,1%-igen IES Behandlung eine Nekrosenbildung des Gewebes (Abb. 3.1). Da-

bei beschränkte sich die Braunfärbung trotz des vollständigen Eintauchens von Internodium plus Seitenwurzeln stets auf den Bereich der Streckungszone der Seitenwurzel.

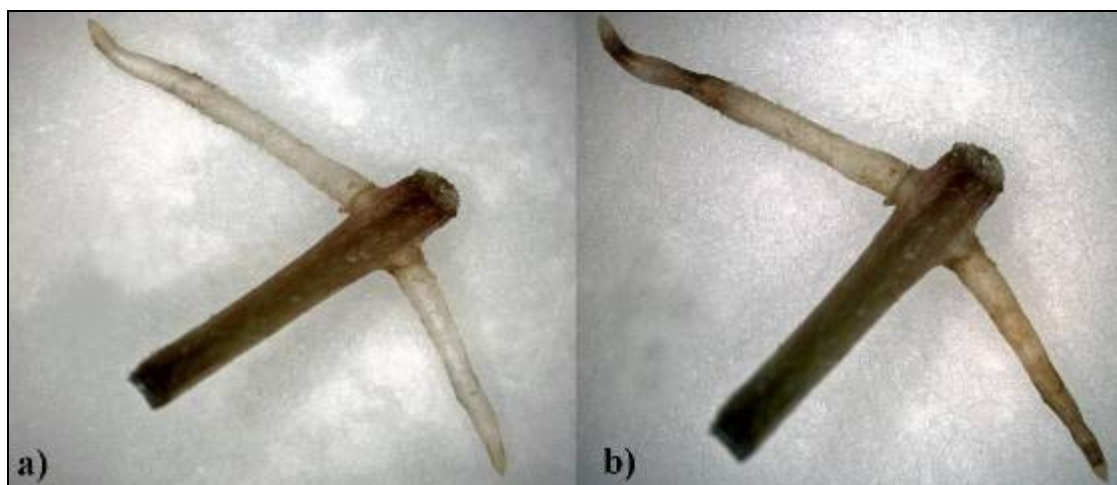


Abbildung 3.1: IES induzierte HR an Seitenwurzel von Börner

a) unbehandelte Börner Wurzel; b) IES behandelte Börner Wurzel mit Nekrosen nach 24h

3.4 RNA-Extraktion

Das RNA-Extraktionsprotokoll nach Baiges und Mas [2003] führte durchweg zu guten Ergebnissen. Mit einer eingesetzten Wurzelmenge von etwa 15mg bis 130mg wurden RNA Konzentration zwischen 100ng/μg und 1200ng/μg erreicht. Die mittels eines Photometers gemessen Quotienten 260/280 und 260/230 lagen im geforderten Bereich von 1,6 und 2,2. Dadurch konnte auf eine gute Reinheit der RNA geschlossen werden.

3.5 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit von BioRad lieferte in allen Fällen eine gute Qualität der cDNA. Mit einer Ausgangsmenge von 0,5μg total-RNA wurden Konzentrationen von 200ng/μl bis 800ng/μl erreicht.

3.6 cDNA-Subtraktion

Die cDNA-Subtraktion wurde zur differentiellen Genexpressionsanalyse der 90min IES behandelten Börner Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe durchgeführt. Zusätzlich wurde bei der technischen Wiederholung der Subtraktion die behandelte Probe, außer von der unbehandelten, auch von einer 90min H₂O behandelten Kontrolle subtrahiert. Die Subtraktionen wurden jeweils in beide Richtungen durchgeführt. Das heißt, dass jede Probe von jeder anderen Probe subtrahiert wurde.

In Abbildung 3.2 ist die elektrophoretische Auftrennung der subtrahierten und unsubtrahierten cDNA-Proben nach der ersten (a) bzw. zweiten (b) PCR-Amplifikation dargestellt. Sowohl die unsubtrahierten Börner-Proben, die unsubtrahierte Kontrolle als auch die subtrahierten Börner Proben zeigten einen undifferenzierten cDNA-„Schmier“ auf dem Gelbild. Ein Bandenmuster ließ sich lediglich bei der subtrahierten Kontrolle und der kommerziell subtrahierten Kontrolle erkennen. Da hier eine deutliche Übereinstimmung der Banden dieser beiden Proben zu sehen ist, kann nach Angaben des Herstellerprotokolls von einer erfolgreich verlaufenen cDNA-Subtraktion ausgegangen werden. Differenziell exprimierte Gene in der 90min Börner Proben konnten hierbei nicht ermittelt werden.

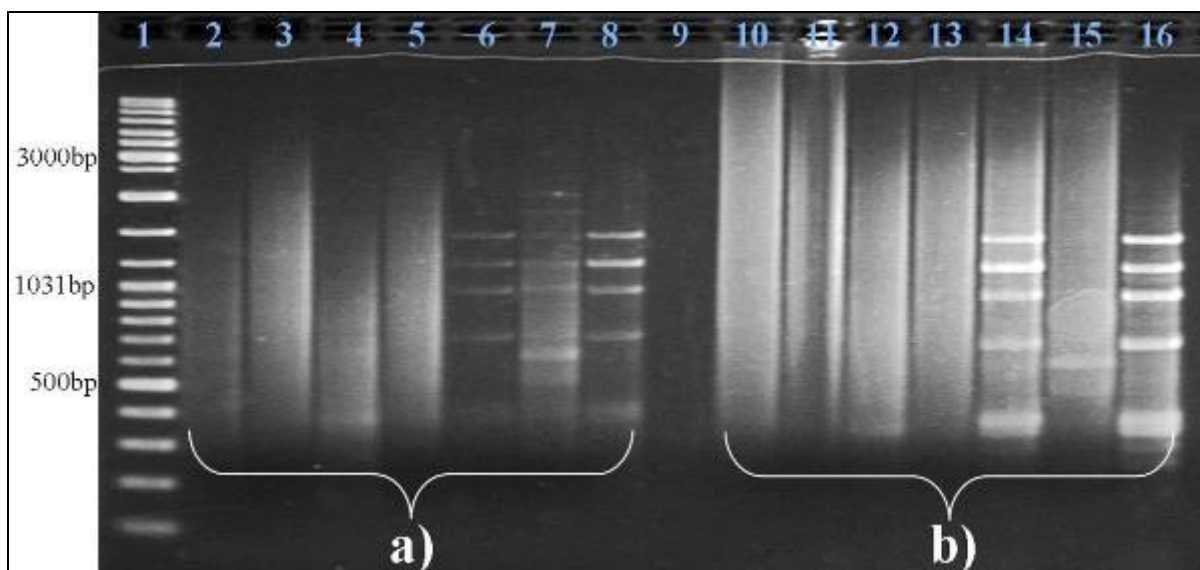


Abbildung 3.2: cDNA-Subtraktion der 90min Börner Probe

Nach der a) ersten und b) zweiten PCR-Amplifikation; Marker (1); 90min Probe von der H₂O Probe subtrahiert (2, 10); unsubtrahierte 90 min Probe (3, 11); unbehandelte Probe von der 90min Probe subtrahiert (4, 12); unsubtrahierte unbehandelte Probe (5, 13); subtrahierte Kontrolle (6, 14); unsubtrahierte Kontrolle (7, 15); kommerziell subtrahierte Kontrolle (8, 16); freie Spur (9).

Auch eine technische Wiederholung der Subtraktion, in der zusätzlich mit einer H₂O behandelten Börner Probe gearbeitet wurde, führte nicht zum gewünschten Ergebnis. Aufgrund der Bandenübereinstimmung der subtrahierten Kontrolle und der kommerziell subtrahierten Kontrolle konnte auch hier festgestellt werden, dass das Verfahren der Subtraktion erfolgreich war (Abb. 3.3). Aber die subtrahierten Börner Proben zeigten einen ebenso undifferenzierten cDNA-„Schmier“ wie die unsubtrahierten Proben, wie die Abbildung zeigt. Somit konnte auch durch die technische Wiederholung der cDNA-Subtraktion keine differentiell exprimierten Gene in der 90min Börner Probe im Vergleich zur unbehandelten bzw. H₂O behandelten Probe detektiert werden.

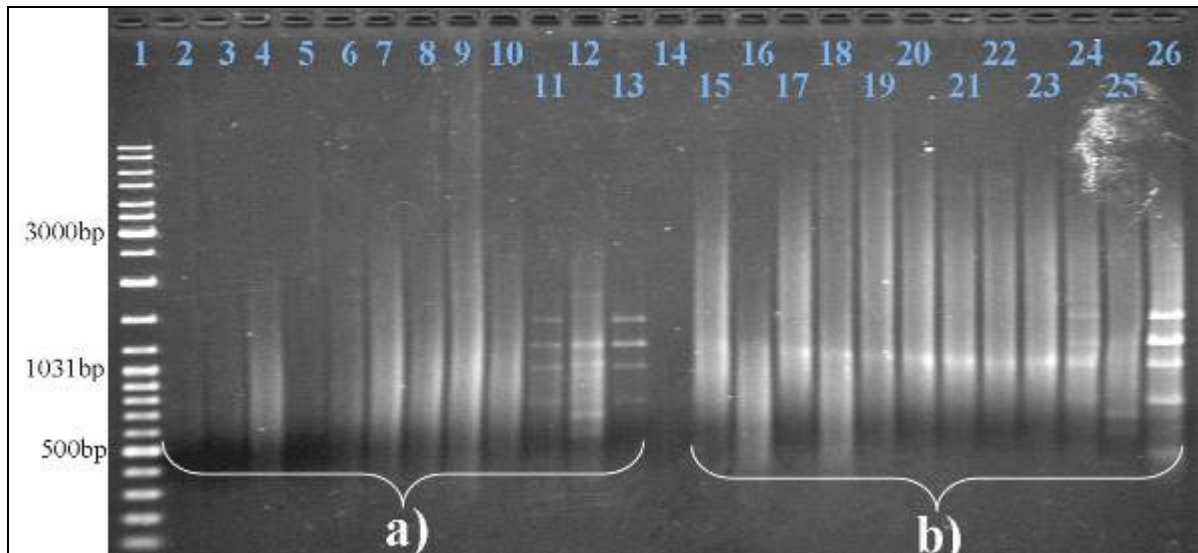


Abbildung 3.3: Wiederholung der cDNA-Subtraktion der 90min Börner Probe

Nach der a) ersten und b) zweiten PCR-Amplifikation; Marker (1); 90min Probe von der H₂O Probe subtrahiert (2, 15); 90min Probe von der unbehandelten Probe subtrahiert (3, 16); unsubtrahierte 90 min Probe (4, 17); H₂O Probe von der 90min Probe subtrahiert (5, 18); H₂O Probe von der unbehandelten Probe subtrahiert (6, 19); unsubtrahierte H₂O Probe (7, 20); unbehandelte Probe von der 90min Probe subtrahiert (8, 21); unbehandelte Probe von der H₂O Probe subtrahiert (9, 22); unsubtrahierte unbehandelte Probe (10, 23); subtrahierte Kontrolle (11, 24); unsubtrahierte Kontrolle (12, 25); kommerziell subtrahierte Kontrolle (13, 26); freie Spur (14).

3.7 Microarrayanalyse der 90min Börner Probe

Zur differentiellen Genexpressionsanalyse der 90min induzierten Börner Probe im Vergleich zur unbehandelten Probe wurden DNA-Microarray Experimente mit vier Arabidopsis-Komplett-Genom-Arrays durchgeführt.

Auf Chip_272 und Chip_289 wurde die 90min Probe mit der Cy5-Markierung und die unbehandelte Probe mit der Cy3-Markierung hybridisiert. Auf den Chips 273 und 288 erfolgten die entsprechenden *flip-dye* Experimente.

Drei der vier Arrays zeigten in beiden Farbkanälen deutliche Signale mit wenig Hintergrund, weshalb auf eine gute Hybridisierungsqualität geschlossen werden konnte. Chip_288 ging aufgrund starker Hintergrundsignale nicht in die Auswertung mit ein. Auf allen drei Microarrays konnten Hybridisierungen mit Kontrollspots (HK) gefunden werden, die gleichmäßig über sämtliche Subarrays verteilt waren (Abb. 3.4). Es handelte sich dabei unter anderem um ein *expressed protein* und das Polyubiquitin 14.

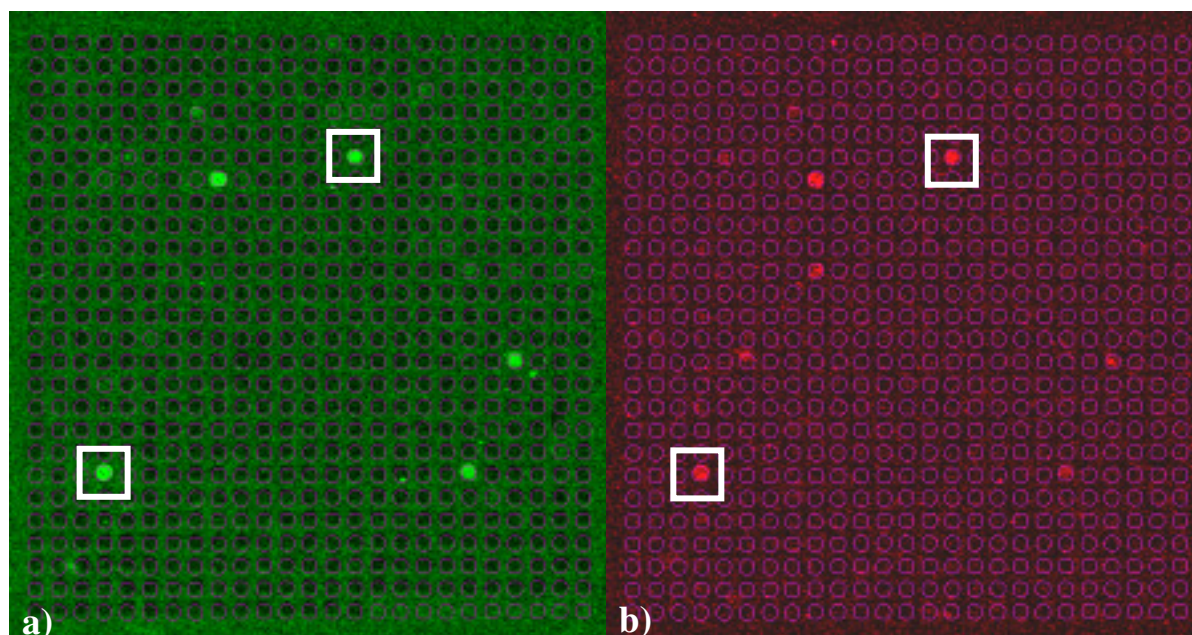


Abbildung 3.4: Microarray Chip_273, Subarray

a) Cy3 markierte Probe b) Cy5 markierte Probe; Kontrollspots (weiß umrandet)

Für jeden der drei Microarraychips wurde die Ratio aus den normalisierten Cy3- und Cy5-Hybridisierungswerten gebildet. Die Mehrzahl der Gene zeigte einen Ratiowert um eins, das heißt, dass kein Unterschied zwischen der IES behandelten und der unbehandelten Probe vorlag.

positiv regulierte Gene (>1,5)	Gen ID	Ratio	Chip
transcriptional factor B3 family protein	At4g215	2,04	289
glycine-rich protein	At2g05440	2,03 1,98	272 289
disease resistance protein RPS5 (CC-NBS-LRR class)	At1g12220	1,60 1,69	272 273
hypothetical protein	At5g35650	1,59	273
metallo-beta-lactamase family protein	At2g01730	1,58	272
proline-rich extensin-like family protein	At4g08370	1,56	289
sugar transporter, putative	At3g05165	1,55 1,65	273 289
negativ reguliertes Gen (<-1,5)	Gen ID	Ratio	Chip
CER1 protein identical to maize gl1 homolog (glossy1 locus)	At1g02205	-1,65	289

Tabelle 3.1: Microarrayergebnisse der 90min Börner Probe

Auf Chip_272 und Chip_273 konnten jeweils drei positiv regulierte Gene gefunden werden. Die Ergebnisse von Chip_289 lieferten vier positiv regulierte Gene und ein negativ reguliertes Gen. Nur bei drei Genen konnte die Regulation von einem Chip auf einem weiteren Chip gefunden werden. Insgesamt konnten so 11 Gene auf den drei Chips gefunden werden, die durch IES signifikant reguliert waren.

3.8 Genom one Analysen

Die *Genom one* Analysen wurden zum einen zur differentiellen Genexpressionsanalyse in Börner, SO4 und Riesling Wurzeln nach Behandlung von IES in unterschiedlichen Induktionszeiten durchgeführt. Zum anderen sollte die Genexpression nach der IES Induktion in Börner mit der in Riesling bzw. SO4 verglichen werden. In den folgenden Kapiteln (3.8.1-3.8.6) sind zunächst die Anzahl der differentiell exprimierten Gene sowie deren Richtung der Regulation pro Chip dargestellt. In Kapitel 3.8.7 ist eine Zusammenstellung der regulierten Gene zu finden. Die ausführliche Liste mit den entsprechenden Gennamen sowie die *fold change* der regulierten Gene sind im Anhang (Tab. 9.1) tabellarisch aufgelistet.

3.8.1 ,Chip a': Börner / Riesling, 90min IES Inkubationszeit

Auf ,Chip a' wurden von Börner und Riesling die Proben B K, R K, B 90' und R 90' hybridisiert. In einem ersten Schritt der Auswertung sollte die Qualität der Hybridisierung bewertet werden. Dazu wurden die Rohdaten der technischen Replikate für jedes Gen in einem Streudiagramm graphisch miteinander verglichen (Abb. 3.5). Zusätzlich wurde der Pearson-Korrelationskoeffizient (R) für jede der auf ,Chip a' hybridisierten Probe gebildet. R stellt ein dimensionsloses Maß für den Grad des linearen Zusammenhangs zwischen den Replikaten dar.

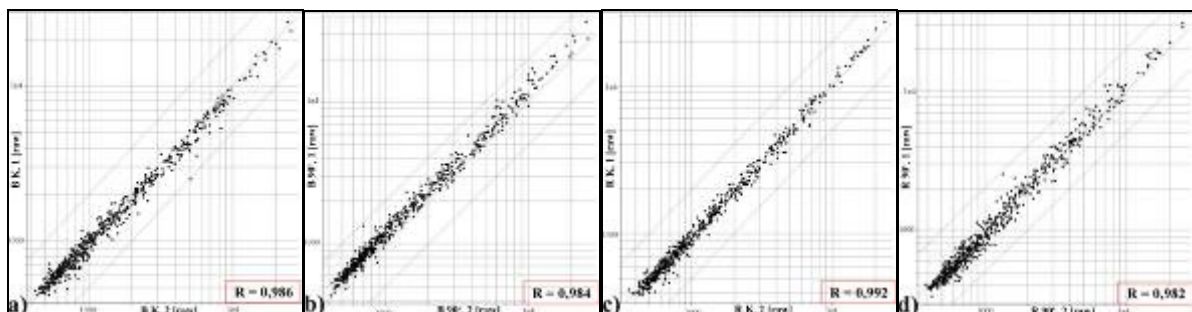


Abbildung 3.5: Streuung der technischen Replikate auf ,Chip a'
a) B K, b) B 90', c) R K, d) R 90'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

Auf ‚Chip a‘ lag R zwischen 0,982 und 0,992 und damit sehr nahe an dem Optimalwert von eins. Die technische Wiederholung der Proben zeigte folglich eine nahezu perfekte positive Korrelation und somit eine gute Reproduzierbarkeit. Aus diesem Grund ließ sich auf eine hohe Qualität der Hybridisierung schließen.

Für jede Sorte wurde die *fold change* aus den normalisierten Werten der 90‘ Probe und der K Probe gebildet. Bei Börner konnten so 34 und bei Riesling 29 signifikant regulierte Gene nach 90min IES Induktion gefunden werden. In Abbildung 3.6 ist dargestellt, wie viele der Gene in den IES behandelten Proben der beiden Sorten positiv oder negativ reguliert waren (Schnittmenge), und wie viele nur in einer der beiden Sorten eine Regulation zeigten. In Börner wurden deutlich mehr Gene positiv als negativ reguliert. In Riesling waren die positiv regulierten Gene nur leicht in der Überzahl. Insgesamt zeigte sich, dass in der B 90‘ Probe mehr Gene differentiell exprimiert waren als in der von Riesling.

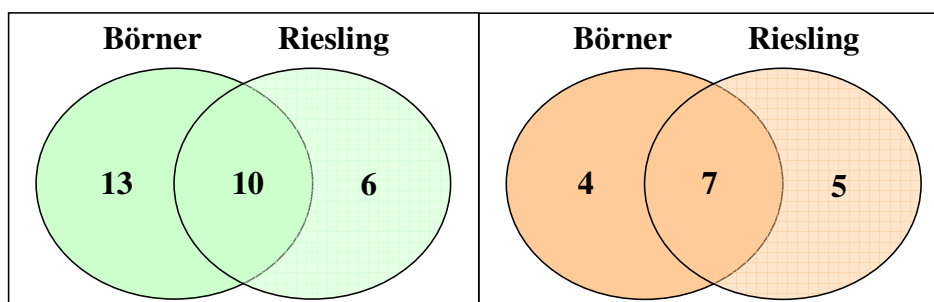


Abbildung 3.6: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 90min IES Induktion

Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

3.8.2 ‚Chip b‘: Börner / SO4, 90min IES Inkubationszeit

Auf ‚Chip b‘ sollte die Reaktion der Sorten Börner und SO4 auf eine 90 minütige IES Inkubationszeit untersucht werden. Dazu wurden die jeweiligen unbehandelten Proben zusammen mit den 90min IES behandelten Proben auf den Chip hybridisiert. Bei der 90min Probe von Börner handelte es sich um eine biologische Wiederholung von der Probe, die auf ‚Chip a‘ verwendet wurde. Die unbehandelte Probe von Börner blieb identisch zu dem vorherigen Chip. Zur Einschätzung der Qualität der Hybridisierung wurden zunächst analog zu ‚Chip a‘ die Rohdaten der technischen Replikate in einem Streudiagramm aufgetragen sowie R berechnet (Abb. 3.7). Die Werte von R lagen mit 0,968 bei Probe B K und 0,974 bei Probe S 90‘ weniger nahe dem Idealwert von eins als bei den Proben B 90‘b und S K, die R-Werte von 0,982 und 0,986 aufwiesen. Von einer guten Reproduzierbarkeit der technischen Wie-

derholungen sowie einer hohen Qualität der Hybridisierung auf ‚Chip b‘ konnte daher nur bedingt ausgegangen werden.

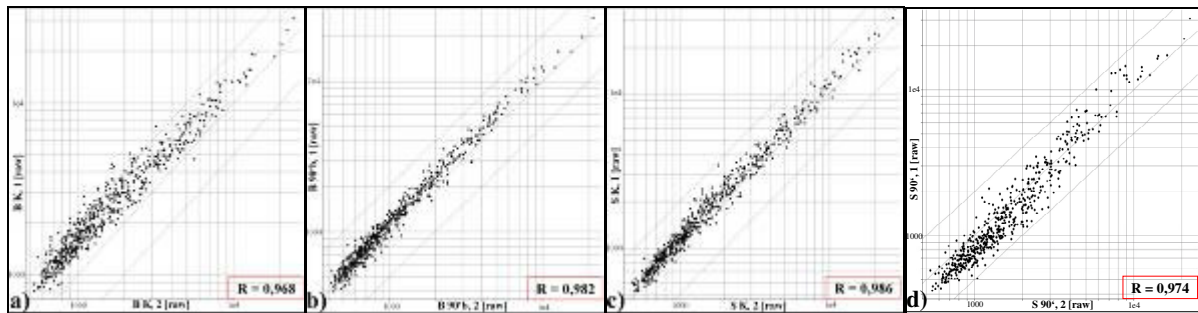


Abbildung 3.7: Streuung der technischen Replikate auf ‚Chip b‘
a) B K, b) B 90' b, c) S K, d) S 90'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden die Rohdaten normalisiert und anschließend die *fold change* der IES behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Proben der beiden Sorten gebildet. In den Börner Proben konnten auf diese Weise 32 Gene gefunden werden, die nach 90min IES Behandlung signifikant reguliert waren. Davon waren 25 hoch und sieben herunter reguliert (Abb. 3.8). Bei SO4 zeigten sich hingegen keine signifikant regulierten Gene.

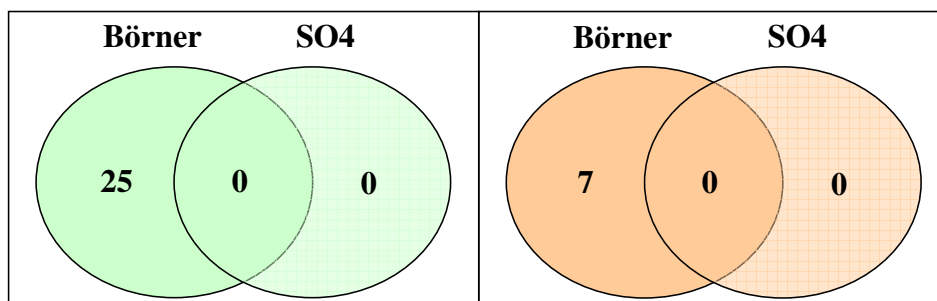


Abbildung 3.8: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und SO4 nach 90min IES Induktion
Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

Ein Vergleich der biologischen Wiederholung B 90' b mit der Probe B 90' zeigte, dass die Übereinstimmung der differentiell regulierten Gene in beiden Proben etwa 70% betrug. Für die folgenden Auswertungen wurden die Rohdaten der beiden Proben gemittelt und erneut die Normalisierung sowie die *fold change* berechnet. Anschließend konnten in Börner 32 signifikant differentiell exprimierte Gene gefunden werden, von denen 25 positiv und sieben negativ reguliert waren. Von den positiv regulierten waren sieben Gene auch in der 90min IES behandelten Probe von Riesling signifikant reguliert, von den negativ regulierten sechs.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine IES Behandlung von 90 Minuten in Börner eine größere Anzahl von Genen reguliert hat als in Riesling. Außerdem wurde die Mehrheit der Gene hoch reguliert.

3.8.3 ,Chip c': Börner / Riesling, 60min IES Inkubationszeit

Auf ,Chip c' wurden Proben der Sorten Börner und Riesling mit einer IES Inkubationszeit von 60min und den entsprechenden unbehandelten Kontrollproben hybridisiert. Abbildung 3.9 zeigt das Streudiagramm sowie die R-Werte von den Rohdaten der technischen Replikate. Mit R-Werten zwischen 0,990 und 0,994 war der optimale Wert von eins nahezu erreicht. Demnach ließen sich die Daten der Replikate gut reproduzieren. Die Qualität der Hybridisierung war daher als hoch einzuschätzen.

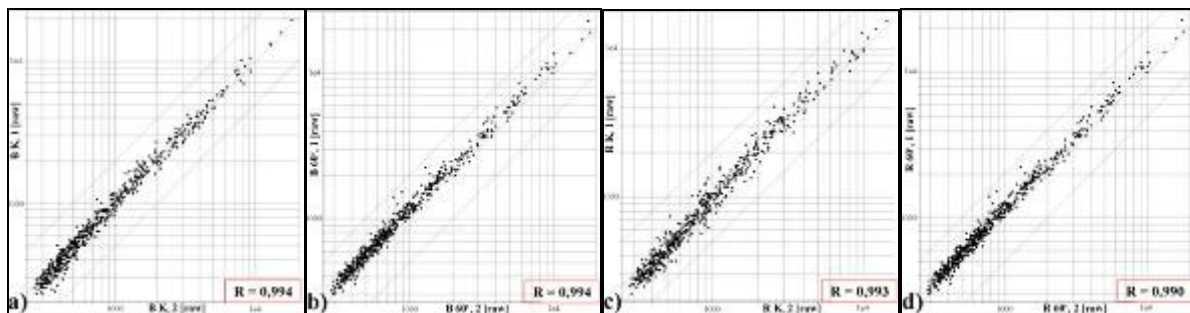


Abbildung 3.9: Streuung der technischen Replikate auf ,Chip c'
a) B K, b) B 60', c) R K, d) R 60'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

Auch bei diesem Chip wurde die *fold change* aus den normalisierten Werten der IES behandelten mit den unbehandelten Proben gebildet. Bei Börner konnten so 43, bei Riesling lediglich zehn signifikant exprimierte Gene gefunden werden. Abbildung 3.10 verdeutlicht die Aufteilung der Gene auf die beiden Sorten sowie die Richtung der Regulation. Auffällig ist die vierfach höhere Anzahl signifikant regulierter Gene in der 60min Börner Probe im Vergleich zu der von Riesling. Weiterhin bemerkenswert ist, dass in Börner zweidrittel der regulierten Gene eine negative *fold change* zeigten. In Riesling hingegen waren die positiv regulierten Gene in der Überzahl.

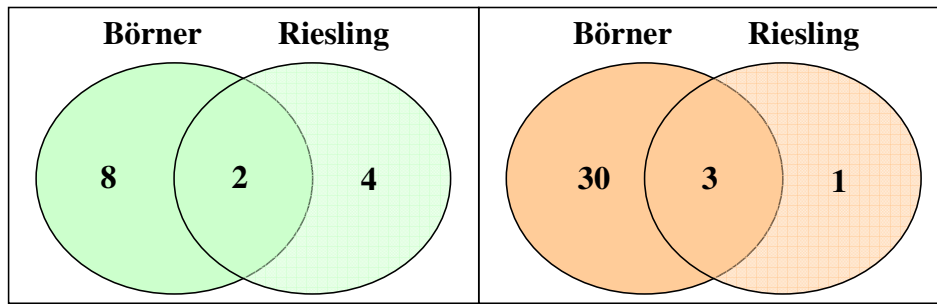


Abbildung 3.10: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 60min IES Induktion
 Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

3.8.4 ,Chip d': Börner / Riesling, 30min IES Inkubationszeit

Proben von Börner und Riesling mit der IES Inkubationszeit von 30min sowie ihre unbehandelten Kontrollen wurden auf ,Chip d' hybridisiert. Auch hier wurde in einem ersten Schritt die Qualität der Hybridisierung überprüft. Die dazu berechneten R-Werte sind zusammen mit den Streudiagrammen aus den Rohdaten der technischen Replikate in Abbildung 3.11 dargestellt. Sie lagen auf diesem Chip zwischen 0,987 und 0,995. Dies lässt auf eine nahezu übereinstimmende positive Korrelation zwischen den Replikaten schließen. Es zeigte sich demnach eine gute Qualität der Hybridisierung sowie eine hohe Reproduzierbarkeit der technischen Wiederholung.

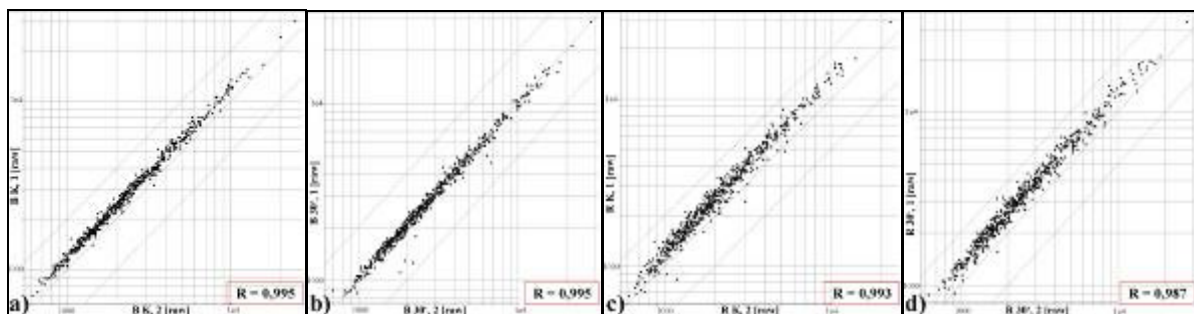


Abbildung 3.11: Streuung der technischen Replikate auf ,Chip d'
 a) B K, b) B 30', c) R K, d) R 30'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

In Abbildung 3.12 ist die Anzahl der signifikant regulierten Gene in Börner und Riesling auf ,Chip d' dargestellt. Dazu wurde die *fold change* der 30min IES behandelten Probe mit der unbehandelten berechnet. Insgesamt konnten bei Börner 22 und bei Riesling sechs signifikant exprimierte Gene gefunden werden. Erwähnenswert ist, dass auch hier ähnlich wie nach 60min IES Behandlung fast viermal mehr Gene in Börner als in Riesling reguliert waren. Weiterhin auffällig ist, dass 90% der in Börner differentiell exprimierten Gene eine negative

Regulation aufwiesen. In Riesling hielt sich die Anzahl der positiv und negativ regulierten Gene die Waage. Beachtlich ist schließlich noch, dass die Hälfte der regulierten Gene in Riesling auch in Börner eine Regulation zeigte. Andersherum waren es lediglich ein sechstel der Gene.

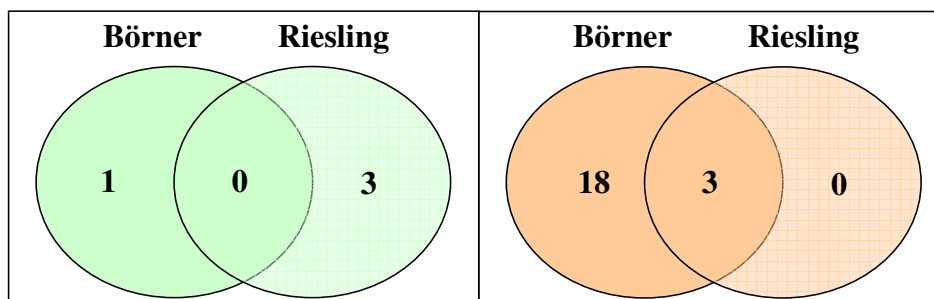


Abbildung 3.12: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 30min IES Induktion
Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

3.8.5 ,Chip e': Börner / Riesling, 15min IES Inkubationszeit

Auf ,Chip e' wurden die unbehandelten Kontrollproben von Börner und Riesling zusammen mit den 15min IES induzierten Proben hybridisiert. Um die Reproduzierbarkeit der technischen Wiederholung der Proben abschätzen zu können, wurden deren Rohdaten in einem Streudiagramm aufgetragen und der Wert R berechnet. Zunächst lagen die Werte zwischen 0,942 und 0,969. Da hier die Streuung als zu groß erachtet wurde, ist eine komplette Wiederholung des Chips unter den gleichen Bedingungen durchgeführt worden. Mit einer Kombination aus beiden Chips lag R zwischen 0,955 und 0,989 (Abb. 3.13). Da diese Werte nun wieder nahe dem Optimalwert von eins lagen, konnte auf eine gute Reproduzierbarkeit und eine gute Qualität der Hybridisierung geschlossen und die Daten weiter verwendet werden.

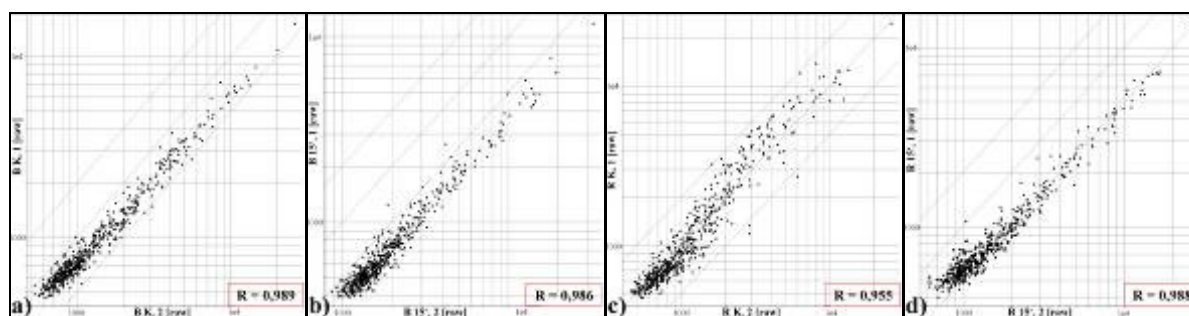


Abbildung 3.13: Streuung der technischen Replikate auf ,Chip e'
a) B K, b) B 15', c) R K, d) R 15'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

Die Normalisierung der Rohdaten und die Bildung der *fold change* von den IES behandelten bezogen auf die unbehandelten Proben der beiden Sorten zeigte, dass bei Börner 35 Gene nach 15min IES Induktion signifikant reguliert waren (Abb. 3.14). In Riesling konnte kein reguliertes Gen gefunden werden. Alle in Börner differentiell exprimierten Gene waren herunter reguliert.

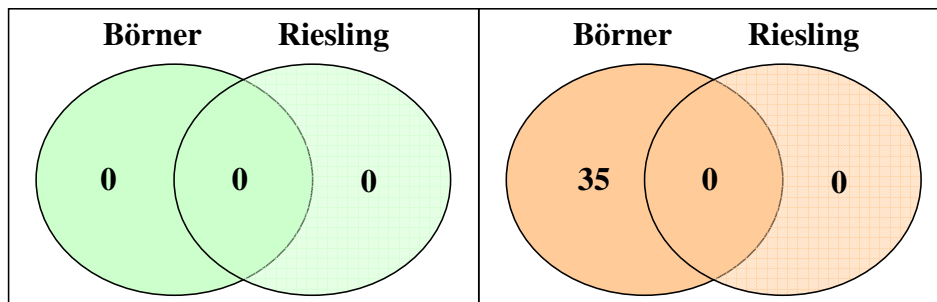


Abbildung 3.14: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 15min IES Induktion
Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

3.8.6 ,Chip f': Börner / Riesling, 7min IES Inkubationszeit

Den Abschluss der vorliegenden Untersuchungen mit dem *Geniom one* System bildete der ,Chip f'. Auf diesen Chip wurden die Proben B K, B 7', R K und R 7' hybridisiert. Abbildung 3.15 gibt die Streuung der Rohdaten der technischen Replikate sowie die jeweiligen R-Werte wieder. Die Ergebnisse von R lagen in einem Bereich von 0,988 bis 0,993 und damit nahe dem Idealwert von eins. Lediglich die R K Probe wies mit einem R Wert von 0,935 eine etwas schwächere Reproduzierbarkeit auf. Insgesamt zeigte sich aber, dass die Daten der Replikate hoch reproduzierbar waren und folglich von einer guten Qualität der Hybridisierung ausgegangen werden konnte.

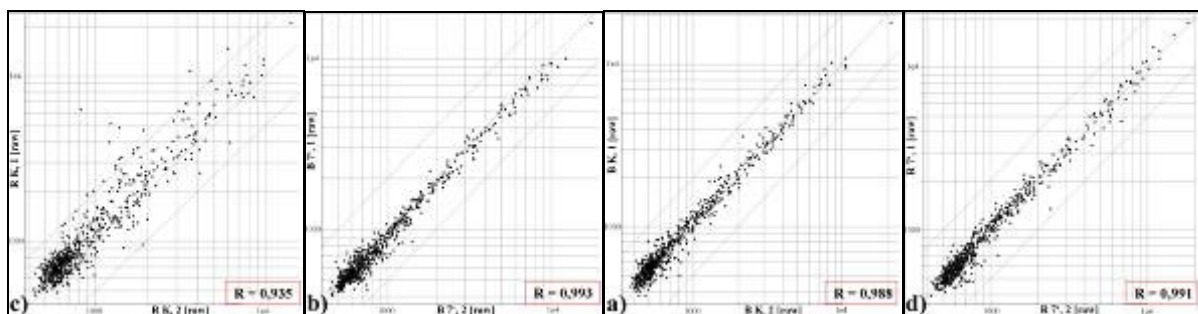


Abbildung 3.15: Streuung der technischen Replikate auf ,Chip f'
a) B K b) B 7', c) R K, d) R 7'; R: Pearson-Korrelationskoeffizient

Für jede Sorte wurde die *fold change* der normalisierten Daten der 7min IES behandelten im Vergleich mit der unbehandelten Probe gezogen. Auf diese Weise zeigte sich, dass in Börner 42 und in Riesling 10 Gene signifikant durch IES reguliert waren (Abb. 3.16). Neben der Tatsache, dass in Börner viermal mehr Gene reguliert waren als in Riesling, fällt auf, dass in Börner 90% der Gene negativ reguliert waren. Bei den positiv regulierten Genen gab es keine Übereinstimmungen zwischen Börner und Riesling, bei den negativ regulierten waren drei der Gene in beiden Sorten exprimiert.

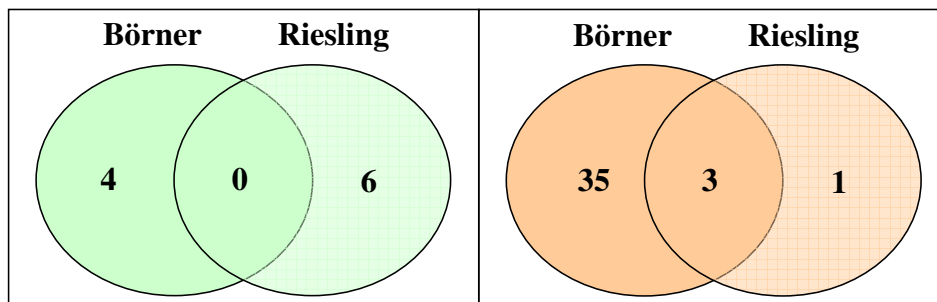


Abbildung 3.16: Anzahl signifikant differentiell exprimierter Gene in Börner und Riesling nach 7min IES Induktion
Grün: positiv regulierte Gene, Rot: negativ regulierte Gene

3.8.7 Zusammenfassung ,Chip a' - ,Chip f'

Für die zusammenfassende Analyse der Ergebnisse von ,Chip a' bis ,Chip f' wurde zunächst die Verteilung der Anzahl regulierter Gene über die fünf verschiedenen IES Induktionszeiten in einem Diagramm aufgetragen (Abb. 3.17). Auf diese Weise zeigte sich, dass bis auf den 90min Chip zu jeder Induktionszeit viermal mehr Gene durch IES in Börner reguliert wurden als in Riesling. Weiterhin auffallend war, dass in Börner mit Ausnahme des ersten Chips mehr Gene negativ als positiv reguliert wurden. Die Anzahl positiv regulierter Gene dieser Sorte fällt erst von 7min auf 15min und steigt dann kontinuierlich bis 90min an. In IES induzierten Riesling Wurzeln hielt sich die Anzahl der positiv und negativ regulierten Gene die Waage. Insgesamt konnten mittels der *Geniom one* Analysen 72 Gene gefunden werden, die durch IES signifikant reguliert wurden. Im Anhang (Tab. 9.1) sind die ausführlichen Genamen, die Gen-IDs sowie die *fold change*-Werte der Genregulation in Börner und/oder Riesling zu finden.

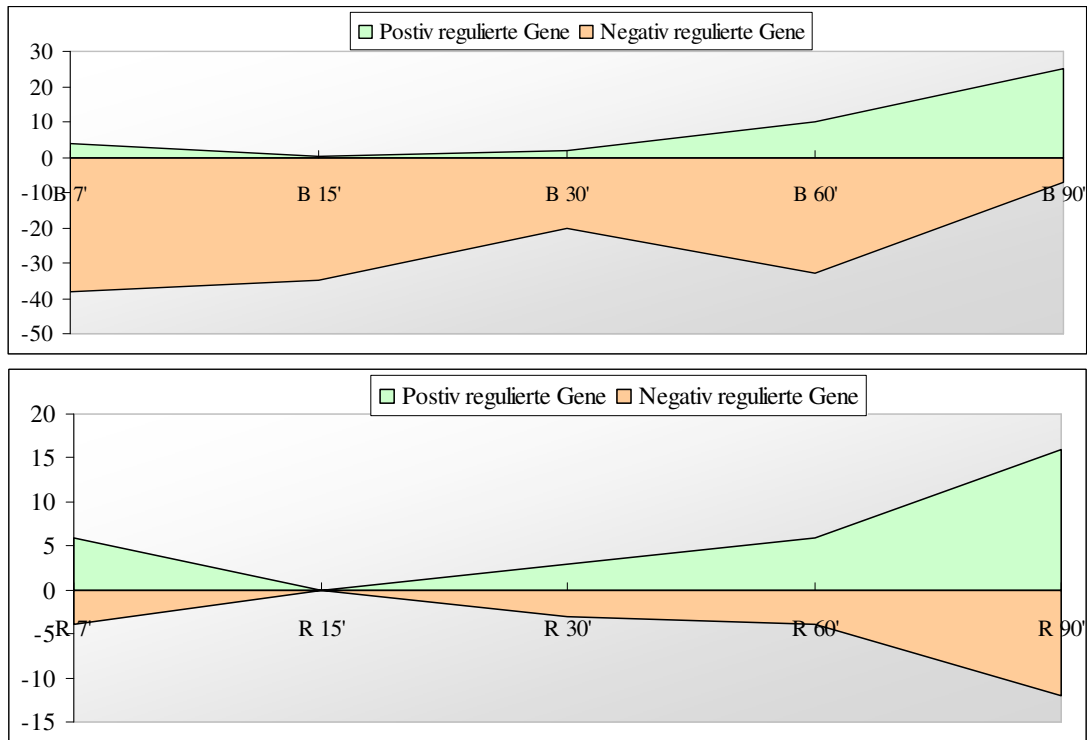


Abbildung 3.17: Verteilung der Anzahl signifikant regulierter Gene über fünf IES Induktionszeiten

a) Börner; b) Riesling

Von den 72 Genen zeigten 42 Gene nur in Börner Wurzeln eine Regulation, nicht jedoch in Riesling. Diese 42 Gene konnten aufgrund ihrer Verwandtschaft in 26 Gengruppen bzw. Genfamilien zusammengefasst werden. In Tabelle 3.2 sind diese Gruppen sowie die Richtung der Regulation in Börner bzw. Riesling aufgelistet.

Das Vorgehen der Auswertung soll am Beispiel des *lipid transfer protein* (LTP) erläutert werden. Auf die Chips wurden ESTs dieses Gens von *Vitis berlandieri* x *Vitis vinifera* sowie von *Vitis aestivalis* hybridisiert. Die Sequenz-Homologie der ESTs lag bei über 90%. Aus diesem Grund konnten die Ergebnisse der beiden ESTs in den Auswertungen kombiniert werden. Wie aus Tabelle 3.2 a) ersichtlich zeigte das LTP in Börner nach 7min, 15min, 60min und 90min eine signifikant negative Regulation, während es in Riesling lediglich nach 90min herunter reguliert wurde. Andere Gene, wie beispielsweise die *alanine acetyl transferase* (AAT), wurden in Börner nur nach 90min hoch reguliert und zeigte in Riesling gar keine Reaktion auf die IES Behandlung (Tab. 3.2 b). Auf diese Weise konnte festgestellt werden, dass die eine Hälfte der Gengruppen ausschließlich in Börner auf den IES Reiz reagierten (Tab. 3.2 b), die andere Hälfte in beiden Sorten (Tab. 3.2 a). Vier der Gene wurden in Börner nach allen Induktionszeiten differentiell exprimiert. Dazu zählten die *Chitinase/ En-*

dochitinase, die *Stilbene Synthase* (STS), das *Thaumatococcus*-ähnliche Protein (TLP) sowie die PR Proteine.

a)

Gene	B 7'	B 15'	B 30'	B 60'	B 90'	R 7'	R 15'	R 30'	R 60'	R 90'
Alcohol dehydrogenase (ADH)										
Beta-1,3-glucanase										
Chitinase/ endochitinase										
Ethylene response factor (ERF)										
Glutathione S-transferase (GST)										
Hexose transporter										
Lipid transfer protein (LTP)										
Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)										
Proline-rich protein (PRP)										
Ripening protein (Rip)										
Stilbene synthase (STS)										
Thaumatococcus-like protein (TLP)										
Transcription factor, putative (TF)										

b)

Gene	B 7'	B 15'	B 30'	B 60'	B 90'
Adventitious rooting related oxygenase (ARRO)					
Alanine acetyl transferase (AAT)					
Chalcone synthase CHS)					
Dehydrin-like protein (DHN)					
Lipoxygenase (LOX)					
Methionine synthase (MS)					
Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP)					
Polyphenol oxidase (PPO)					
PR protein					
Quinone reductase (QR)					
Sucrose responsive element binding protein (SREBP)					
Heat-shock protein 90 (Hsp90)					
Xyloglucan-transglycosylase (XT)					

Tabelle 3.2: Signifikant differentiell exprimierte Gene in Börner und Riesling Wurzeln nach verschiedenen IES Induktionszeiten

a) in Börner und Riesling regulierte Gene; b) nur in Börner regulierte Gene; rot markiert: negative Regulation, grün markiert: positive Regulation

3.8.8 Vergleich der Kontrollproben von Börner und Riesling

Eine Gegenüberstellung der Kontrollproben von Börner und Riesling wurde aus zwei Gründen durchgeführt. Zum einen sollte die Vergleichbarkeit der Chips zueinander überprüft werden. Dies war möglich, da immer dieselben RNA Proben als jeweilige Kontrolle dienten. Zum anderen sollten potenzielle Expressionsunterschiede zwischen unbehandelten Börner und unbehandelten Riesling Wurzeln aufgedeckt werden.

Zunächst wurden die Rohdaten der Kontrollproben aller Chips von Börner und Riesling gemittelt und analog zu den vorangegangenen Analysen normalisiert. Im Anschluss daran wurde eine hierarchische Clusteranalyse (*condition tree*) aufgestellt, deren Ergebnisse in Abbildung 3.18 dargestellt sind.

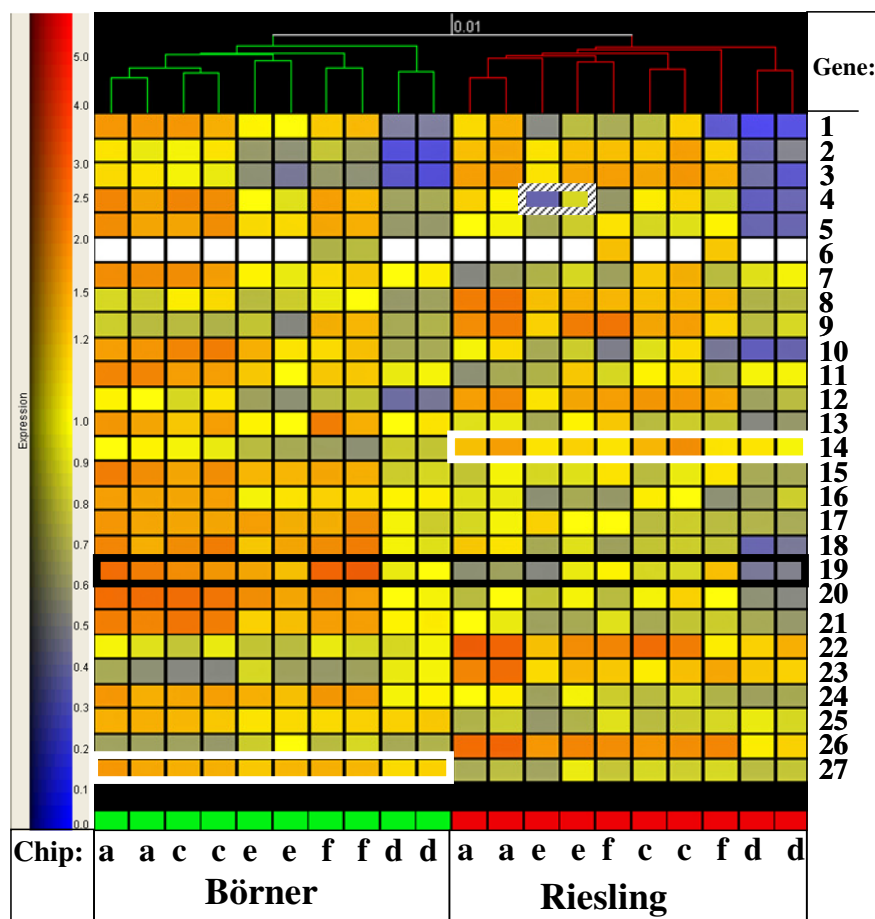


Abbildung 3.18: Condition Tree der Kontrollproben von Börner und Riesling auf ,Chip a' bis ,Chip f'

Farbliche Umrandungen: Weiß: Gute Übereinstimmung der Werte über alle Chips; Weiß-schwarz: weniger gute Übereinstimmung auf einem Chip; schwarz: größter Genexpressionsunterschied zwischen Börner und Riesling

Von jedem Chip wurden die Werte der Gene, die einen signifikanten Unterschied zwischen B K und R K zeigten, zueinander klassifiziert. Das Ergebnis der Analyse ist in einer hierarchischen Baumstruktur wiedergegeben, deren Äste die Ähnlichkeit der Werte von jedem einzelnen Chip zueinander wiedergeben. Das farbliche Schema zeigt das Ausmaß der Expression an. Dabei repräsentieren die Farben blau, gelb bzw. rot eine geringe, mittlere bzw. hohe Expression. Es zeigte sich, dass 27 Gene einen signifikanten Unterschied zwischen den unbehandelten Kontrollproben von Börner und Riesling aufwiesen, von denen 17 ein höheres Grundlevel in Börner Wurzeln hatten. In untenstehender Abbildung sind die 27 Gene durchnummeriert. Die entsprechenden Gennamen mit den dazugehörigen *fold change* - Werten sind im Anhang (Tab. 9.2) zu finden. Den größten Unterschied mit einer *fold change* in B K verglichen mit R K von 2,39 zeigte das PGIP. Dieses ist in Abbildung 3.18 als Gen Nummer 19 mit der schwarzen Umrandung darstellt. Gut zu sehen sind hier die farblichen Unterschiede zwischen den beiden Sorten. Die in der Grafik weiß umrandeten Bereiche stellen am Beispiel des Gens 14 (*auxin-binding protein*) in Riesling, sowie des Gens 27 (*beta 1-3 glucanase*) in Börner ein Exempel für eine gute Übereinstimmung der Werte über alle Chips dar. Erkennbar ist dies durch die gleichbleibende Farbgebung im *condition tree* bei diesen beiden Genen. Dahingegen lieferte die schwarz-weiß-gestreift gekennzeichnete Probe ein Beispiel für eine weniger gute Übereinstimmung der technischen Wiederholung auf einem Chip. Aufgrund der unterschiedlichen Farbgebung lässt sich erkennen, dass hier das Gen Nummer 4 (*isoflavone reductase-like protein 3*) auf ‚Chip e‘ abweichende Werte in der unbehandelten Rieslingprobe zeigte. Diese Erkenntnis deckt sich mit der Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (vgl. Kap. 3.8.5), der mit einem Wert von 0,955 etwas unterhalb der übrigen Werte lag. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kontrollproben über alle Chips hinweg größtenteils ähnliche Werte aufwiesen. Eine Vergleichbarkeit der Chips untereinander war demnach gegeben.

3.9 Sequenzierungen

3.9.1 Börner ESTs

Aus der B 90' Probe konnten 27 cDNAs mit einer Größe zwischen 122bp und 456bp erfolgreich isoliert, kloniert und sequenziert werden. Eine Annotierung der Sequenzen über die NCBI-Gendatenbank war bis auf eine Ausnahme in allen Fällen auf Nukleotid- bzw. AS-Ebene möglich. In Tabelle 3.3 sind die Börner-ESTs, mit ihrer jeweiligen NCBI-ID, der

Länge des isolierten Bereiches sowie der besten NCBI Datenbankübereinstimmung auf Nukleotid- bzw. AS-Ebene zusammengestellt.

'Börner' EST	NCBI-ID	Länge der isolierten cDNA [bp]	Länge des sequenzierten Bereichs [bp]/ Seq.-Primer	Beste NCBI Datenbankübereinstimmung (prozentuale Übereinstimmung)
Fag-B-IES1,5h-76	FK938980	212	356/M13 forward	<u>Blastn:</u> Arabidopsis thaliana universal stress protein (USP) family protein (75%)
Fag-B-IES1,5h-K1-79	EE489290	384	706/M13 forward	<u>Blastn:</u> Petunia x hybrida, ethylene receptor (ETR2) (83%)
Fag-B-IES1,5h-K1-90	ES584598	172	356/M13 forward	<u>Blastx:</u> Medicago truncatula, Disease resistance protein (66%)
Fag-B-IES1,5h-K1-93	EH058225	166	358/M13 forward	<u>Blastn:</u> Solanum tuberosum, P-glycoprotein (96%)
Fag-B-IES1,5h-K1-95	EH058217	187	356/M13 forward	<u>Blastn:</u> Arabidopsis thaliana, multidrug resistance-associated protein homolog (85%)
Fag-B-IES1,5h-113	FK938954	238	356/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis aestivalis putative ethylene response factor 4 mRNA, complete cds (96%)
Fag-B-IES1,5h-114	FK938955	154	314/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera putative alanine acetyl transferase (AAT) mRNA, partial cds (96%)
Fag-B-IES1,5h-115	FK938956	196	357/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera gene for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds (96%)
Fag-B-IES1,5h-116	FK938957	242	356/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis labrusca x Vitis vinifera VXET1 mRNA for Xyloglucan -transglycosylase, complete cds (93%)
Fag-B-IES1,5h-117	FK938958	189	357/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera sucrose responsive element binding protein (SREBP) mRNA, complete cds (97%)
Fag-B-IES1,5h-118	FK938959	206	365/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related protein (grip32 gene) (99%)
Fag-B-IES1,5h-119	FK938960	210	356/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera lipoxygenase (Lox) mRNA, partial cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-120	FK938961	221	355/M13 forward	<u>Blastn:</u> Vitis vinifera putative transcription factor mRNA, complete cds (98%)

Tabelle 3.3: Isolierte und sequenzierte Börner-Sequenzen aus der 90min Probe zur Verifizierung der Genom one Ergebnisse sowie als Grundlage für RT-PCR Analysen

Fag-B-IES1,5h-121	FK938962	128	356/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera PR-4 type protein (PR-4a) gene, complete cds (97%)
Fag-B-IES1,5h-123	FK938964	205	356/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera clone 361795_A1 stilbene synthase mRNA, partial cds (100%)
Fag-B-IES1,5h-125	FK938966	228	357/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera class IV chitinase (Chi4D) mRNA, complete cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-126	FK938967	191	355/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis riparia beta-1,3-glucanase mRNA, complete cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-127	FK938968	184	357/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera polygalacturonase inhibiting protein mRNA, complete cds (100%)
Fag-B-IES1,5h-129	FK938970	210	357/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera thaumatin-like protein (Tl3) mRNA, mRNA sequence (100%)
Fag-B-IES1,5h-130	FK938971	174	357/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera lipid transfer protein isoform 4 mRNA, complete cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-132	FK938973	191	356/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) mRNA, complete cds (99%)
Fag-B-IES1,5h-133	FK938974	196	356/M13 forward	<u>Blastx</u> : Lycopersicon esculentum putative glutathione S-transferase T4 mRNA, complete cds (76%)
Fag-B-IES1,5h-134	FK938975	228	355/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera proline-rich protein 1 (PRP1) mRNA, complete cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-135	FK938976	199	356/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera polyphenol oxidase mRNA, complete cds (83%)
Fag-B-IES1,5h-136	FK938977	210	356/M13 forward	<u>Blastx</u> : Malus domestica mRNA for adventitious rooting related oxygenase ARRO-1 (72%)
Fag-B-IES1,5h-137	FK938978	245	356/M13 forward	<u>Blastn</u> : Vitis vinifera chalcone synthase (CHS) mRNA, complete cds (98%)
Fag-B-IES1,5h-138	FK938979	207	356/M13 forward	<u>Blastx</u> : Carica papaya clone Cp38 methionine synthase mRNA, complete cds (85%)

Tabelle 3.3 (Fortsetzung)

3.9.2 Vergleich der Sequenzen von Börner, SO4 und Riesling

Für die nachfolgenden RT-PCR Analysen war es notwendig die Sequenz von jedem zu untersuchenden Gen nicht nur in Börner, sondern auch in SO4 sowie in Riesling zu ermitteln. Dazu wurden analog zu Börner aus den 90' Proben von SO4 und vom Riesling die entspre-

chenden cDNA isoliert, kloniert und sequenziert. So standen für die 27 zu analysierenden Gene die Sequenzen von Börner, SO4 und Riesling zur Verfügung. Der anschließende Vergleich der drei Sequenzen pro Gen wurde mit der CLUSTALW Methode [Higgins et al., 1996] durchgeführt. Diese Methode arbeitet nach dem sogenannten *neighbor joining* Prinzip. Das heißt, dass anfangs nicht über alle Sequenzen hinweg nach Homologien gesucht wird. Stattdessen werden zunächst zwei ähnliche Sequenzen zueinander aliniert, und diese dann stückweise mit den nächst ähnlichen Sequenzen erweitert. In Tabelle 3.4 sind die prozentualen Übereinstimmungen jeder Sequenzpaarung pro Gen aufgelistet. Es kam heraus, dass die Sequenzen der untersuchten Gene in Börner, SO4 und Riesling alle eine Homologie von über 91% aufwiesen. Eine Ausnahme bildete das PR-Gen, dessen Sequenz zwischen Börner und Riesling bzw. zwischen SO4 und Riesling nur etwa 73% homolog war. Bei sechs Genen zeigte sich in den sequenzierten Bereichen keinerlei Unterschied zwischen den drei Sorten.

Sequenzpaarung/ Gen	Börner – SO4 [%]	Börner – Riesling [%]	SO4 – Riesling [%]
USP	99,1	99,5	98,6
ETR	99,0	99,0	99,7
DRP	99,4	99,4	100,0
PGP1	100,0	100,0	100,0
PGP4	99,5	100,0	99,5
ERF	96,6	99,6	96,2
AAT	97,4	95,5	98,1
PAL	99,0	97,4	98,5
XT	97,1	97,1	100,0
SREBP	98,4	96,3	97,9
RRP	100,0	100,0	100,0
LOX	98,1	98,6	98,6
TF	98,2	98,2	99,1
PR-Gen	97,7	73,0	73,3
STS	91,2	99,0	90,2
Chitinase	98,2	100,0	98,2
Glucanase	100,0	99,0	99,0
PGIP	100,0	100,0	100,0
TLP	100,0	99,5	99,5
LTP	98,3	98,3	100,0
ADH	99,5	99,5	100,0
GST	100,0	100,0	100,0
PRP	94,6	98,7	95,2
PPO	100,0	100,0	100,0
ARRO	100,0	100,0	100,0
CHS	99,2	100,0	99,2
MS	99,5	99,5	100,0

Tabelle 3.4: Prozentuale Übereinstimmung der Sequenzpaarungen der untersuchten Gene in Börner, SO4 und Riesling

3.10 Quantitative Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR / Validierung der *Geniom one* Ergebnisse

Mit Hilfe der RT-PCR sollte auf der einen Seite eine Validierung der *Geniom one* Ergebnisse in Börner und Riesling Wurzeln nach den entsprechenden IES Induktionszeiten durchgeführt werden. Auf der anderen Seite diente sie zur differentiellen Genexpressionsanalyse. Hierbei wurde zusätzlich eine weitere Induktionszeit (150min) sowie eine weitere Rebsorte, SO4, mit dem analogen Probenpanel untersucht. Die Genexpression sollte vor und nach der IES Induktion in Börner mit der in Riesling bzw. SO4 verglichen werden. Neben 23 Genen aus den *Geniom one* Ergebnissen (vgl. Tab. 3.2) wurden zwei Gene aus vorangegangenen Microarrayanalysen [Dietrich, 2005] sowie zwei Auxintransporter untersucht.

3.10.1 Effizienzen der Zielgene und HK

Eine präzise quantitative Genexpressionsanalyse mittels der RT-PCR setzt voraus, dass die verwendeten Primer eine effiziente Verdopplung der DNA-Stränge bewirken. Das heißt die Effizienz der RT-PCR sollte nahe dem Optimalwert von 100% liegen. Diese Effizienz wurde für jede Sorte und jedes Primerpaar ermittelt. Bei Werten zwischen 80% bis 130% wurden die Primer für die folgenden Genexpressionsanalysen verwendet. Zu diesem Zweck wurde in einem ersten Schritt eine RT-PCR aus einer fünfstufigen Verdünnungsreihe der unbehandelten Probe jeder Sorte durchgeführt. Abbildung 3.19 gibt beispielhaft die Quantifizierungskurven einer solchen Verdünnungsreihe von dem HK EF in unbehandelten Börner Wurzeln wieder. Der gleichbleibende Abstand der Kurven von einer Verdünnungsstufe zur nächsten macht deutlich, dass hier eine nahezu optimale Verdopplung der DNA Stränge vorlag.

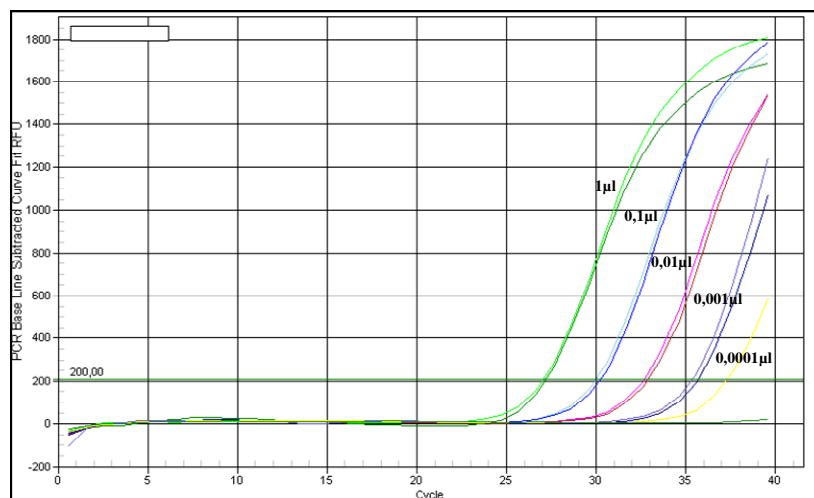


Abbildung 3.19: Quantifizierungskurven des HK EF einer fünfstufigen Verdünnungsreihe von unbehandelten Börner Wurzeln

Aus den resultierenden CT-Werten wurde im zweiten Schritt eine Standardkurve erstellt. Ebenfalls am Beispiel des HK EF sind in Abbildung 3.20 die entsprechenden Standardkurven von Börner, SO4 und Riesling sowie die daraus hervorgehenden Effizienzen dargestellt. Aufgetragen sind die CT-Werte gegen die logarithmische Konzentration. Aus der Steigung der Geraden ist die Effizienz (E) berechnet worden. Sie lag bei diesem Primerpaar für Börner bei 109%, für SO4 bei 114% und für Riesling bei 104%. Damit konnten die Primer für die weiteren Genexpressionsanalysen verwendet werden. Die Effizienzen aller untersuchten Gene sind im Anhang (Tab. 9.3) zusammengestellt. Der niedrigste Wert lag bei 85%, der höchste bei 129%. Durch Modifikation der Annealingtemperatur konnte in den meisten Fällen eine Effizienz in dem gesetzten Bereich erzielt werden. Bei zwei Primerpaaren gelang dies nicht und es wurden neue Primer erstellt.

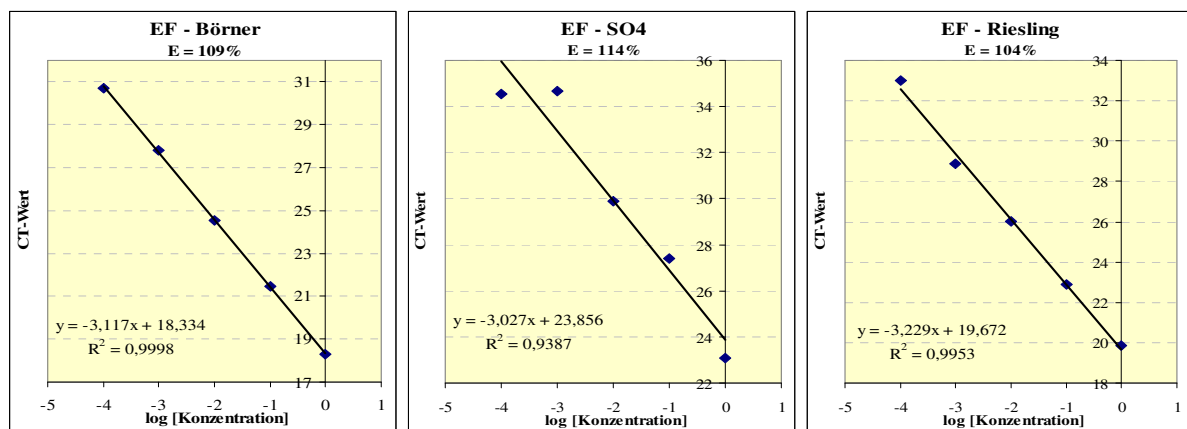


Abbildung 3.20: Effizienz der EF-Primer von Börner, SO4 und Riesling

3.10.2 HK-Ermittlung

Für die Ermittlung geeigneter HK wurden vier Kandidaten (Actin, GAPDH, β -tubulin und EF- α 1) für jede Probe in der RT-PCR getestet. Anschließend wurde mittels der *geNorm* Analyse [Vandesompele et al., 2002] die durchschnittliche Expressions-Stabilität (M) berechnet. In Abbildung 3.21 ist das Ergebnis dargestellt. EF, β -tubulin und GAPDH zeigten M-Werte unterhalb des Schwellenwertes von 1,5. Den höchsten M-Wert, also die schwächste Kontinuität der Werte innerhalb des verwendeten Probenpanels, zeigte das Actin mit über 1,7. Es wurde folglich nicht als HK für die weiterführenden Analysen eingesetzt. Die in den folgenden Kapiteln dargestellten Ergebnisse der Genexpressionsanalysen wurden somit mit drei HK berechnet.

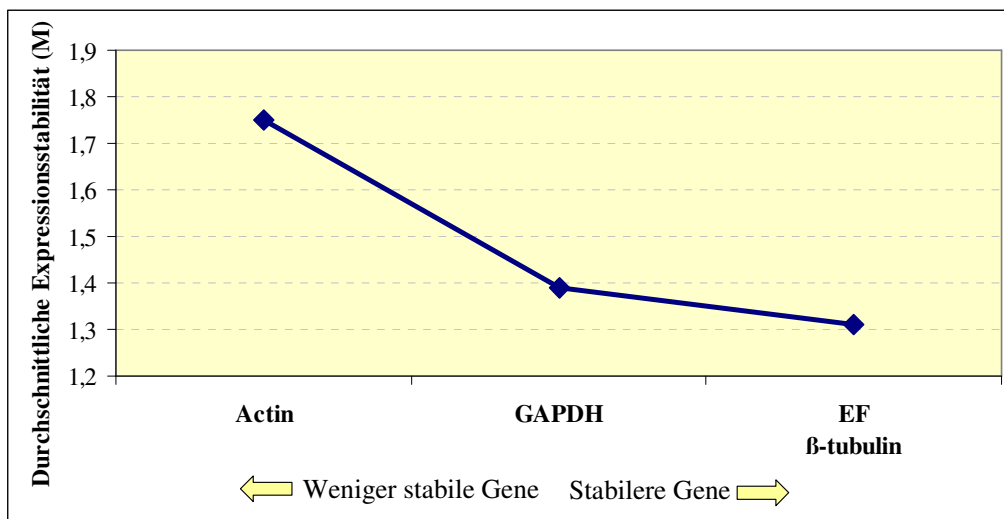


Abbildung 3.21: Durchschnittliche Expressionsstabilität (M) von vier HK im Probenpanel von Börner, SO4 und Riesling

3.10.3 RT-PCR Analyse

In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der RT-PCR Analyse der verschiedenen Gene dargestellt. Die ersten zwei Gene (Kap. 3.10.3.1 - 3.10.3.2) beziehen sich auf Ergebnisse von Microarrayanalysen, die dieser Arbeit vorangegangen sind [Dietrich, 2005]. Bei den zwei nachfolgenden Genen handelt es sich um Auxintransporter. Nach diesen vier Genen werden die RT-PCR Ergebnisse von 23 Genen aus der eigens durchgeführten *Geniom one* Analyse vorgestellt (Kap. 3.10.3.6 - 3.10.3.27). Die Resultate der RT-PCR sind für jedes Gen in einem Balkendiagramm dargestellt, in dem die Normalisierte Expression (NE) gegen die verschiedenen Proben der drei Sorten, Börner, SO4 und Riesling, aufgetragen ist. Dabei stellt die NE jeweils die x-fache (*fold*) Expression des Gens dar. Im Anhang (Tab. 9.4 und 9.5) sind die Werte der NE, sowie der relativen Quantität, der Standardabweichung (SD) und der p-Wert zu jedem Gen zu finden.

In den Kapiteln 3.10.3.6 bis 3.10.3.27 werden zudem die Ergebnisse der beiden verwendeten Methoden, der *Geniom one* Analyse und der RT-PCR, miteinander verglichen. Der Herangezogene Vergleich zu den *Geniom one* Analysen bezieht sich dabei stets auf die in Tabelle 3.2 (Kap. 3.8.7) dargestellten Resultate.

3.10.3.1 Disease resistance protein (DRP)

Die Ergebnisse der RT-PCR Analyse des DRP in Börner, SO4 und Riesling Proben sind in Abbildung 3.22 wiedergegeben. Auffallend ist zunächst, dass die IES Behandlung in Börner

nach 7min eine fast 12-fache Erhöhung der Genexpression verursacht hat. Zusätzlich zeigte sich in Börner nach 60min eine etwa fünffache Steigerung der Expression. In SO4 konnte nach 7min und 150min eine leichte, und nach 30min und 60min eine deutlichere Hochregulation des DRP nachgewiesen werden. In Riesling zeigte sich in allen IES induzierten Proben eine positive Regulation im Vergleich zur Kontrolle. Weiterhin bemerkenswert ist die schwache, aber signifikant höhere Expression des DRP in den unbehandelten Wurzeln von Börner verglichen mit denen von SO4 und vom Riesling.

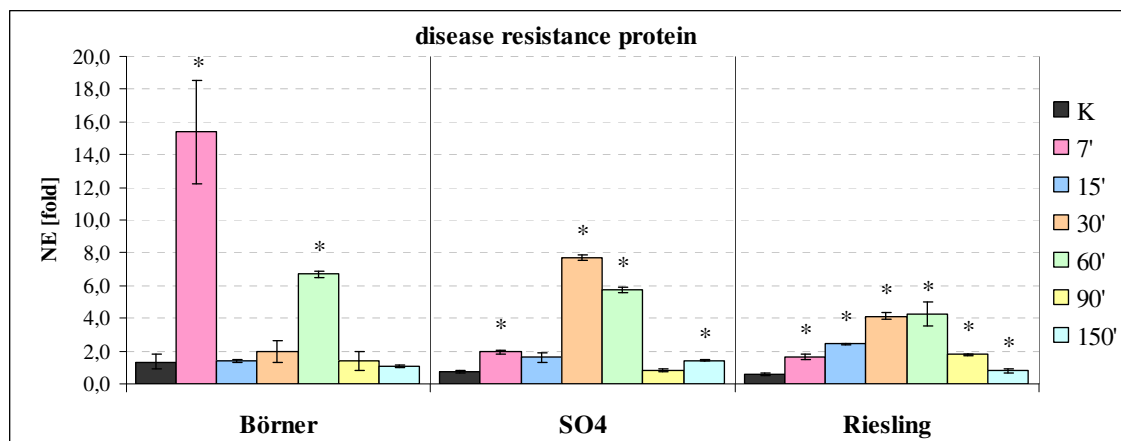


Abbildung 3.22: Quantitative Genexpressionsanalyse des DRP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.2 Ethylene receptor (ETR)

Mit Hilfe der RT-PCR konnte, wie Abbildung 3.23 zeigt, in allen IES induzierten Proben von Börner eine signifikante Hochregulation des ETR festgestellt werden. Die Expression nahm dabei von 7min bis 60min stetig zu, um anschließend wieder abzunehmen. So konnte in der B 60' Probe ein etwa 2,5-facher Zuwachs der Genexpression gemessen werden. Auch in Riesling zeigte sich in allen behandelten Proben eine positive Regulation des Gens, die jedoch in der 7' Probe nicht signifikant war.

Wie unten stehendes Diagramm veranschaulicht, lag bei Riesling eine maximal zweifach höhere Expression des ETR verglichen mit der Kontrolle vor. In SO4 hingegen ließ sich lediglich nach 90min IES Behandlung eine signifikant positive, sowie nach 150min eine signifikant negative Genregulation im Vergleich zur Kontrolle verzeichnen. Auffällig war die statistisch signifikante, etwa doppelt so hohe, Expression des ETR in der Kontrollprobe von Börner in Gegenüberstellung mit den Kontrollproben von SO4 und vom Riesling.

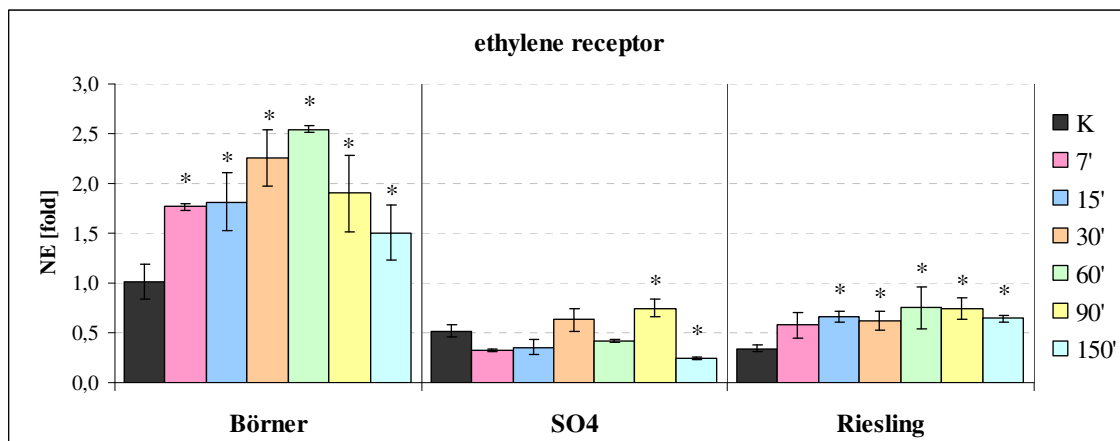


Abbildung 3.23: Quantitative Genexpressionsanalyse des ETR in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.3 Universal stress protein (USP)

Anders als bei den zuvor beschriebenen Genen zeigte das USP eine IES bedingte Abnahme seiner Expression in allen Proben der drei Sorten, in denen eine signifikante Regulation gemessen wurde. Abbildung 3.24 veranschaulicht, dass dies auf alle Börner Proben zutraf. Dabei konnte die deutlichste Regulation in 60' Probe von Börner beobachtet werden, in der die Genexpression um das 4,5-fachen zurück ging. Dahingegen ließ sich in SO4 und im Riesling nur nach vier IES Induktionszeiten eine signifikante negative Regulation des USP messen. Die beträchtlichste Expressionsabnahme, etwa um das vierfache im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle, wurde in den 150' Proben der beiden Sorten registriert.

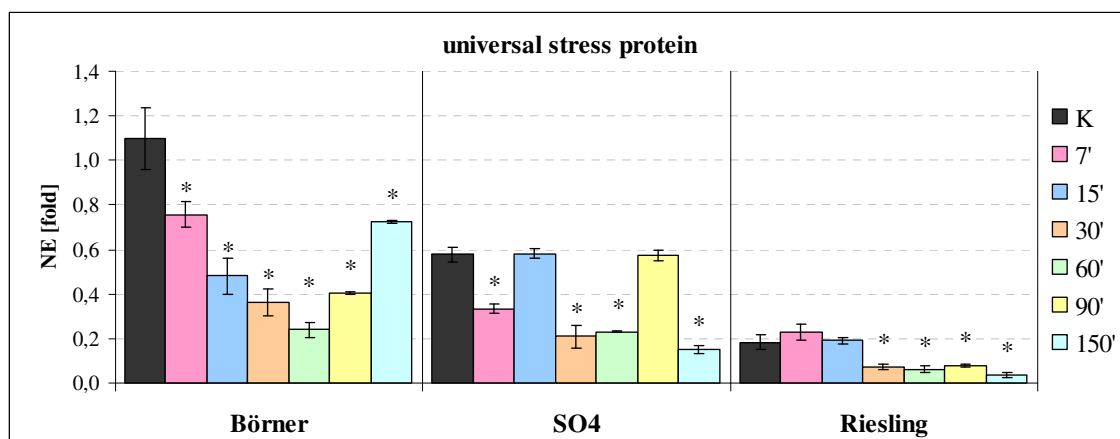


Abbildung 3.24: Quantitative Genexpressionsanalyse des USP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Darüber hinaus lässt sich oben stehendem Diagramm entnehmen, dass erhebliche Expressionsunterschiede des USP in den drei Kontrollproben aufgetreten sind. So zeigte sich in der unbehandelten Börner Probe eine zwei- bzw. sechsfach höhere Genexpression verglichen mit denen von SO4 bzw. vom Riesling.

3.10.3.4 P-Glykoprotein 1 (PGP1)

Die RT-PCR Analyse des PGP1 lieferte in Börner, SO4 und Riesling sehr unterschiedliche Ergebnisse, wie Abbildung 3.25 verdeutlicht. In Börner konnte nach 7min bis 60min IES Behandlung eine signifikante Hochregulation des Gens festgestellt werden. Die stärkste Zunahme zeigte sich dabei in der 30' Probe, in der eine vierfach höhere NE datiert wurde als in der Kontrolle. In den B 60' und B 90' Proben hingegen wurde ein signifikanter Rückgang der Genexpression beobachtet. Anders als in Börner ließ sich in SO4 und im Riesling nur in jeweils zwei IES behandelten Proben eine veränderte Genregulation dokumentieren, die, wie die Abbildung 3.25 illustriert, auch weniger deutlich ausfiel als in Börner. In SO4 zeichnete sich bei einem Vergleich mit der Kontrollprobe in der S 30' Probe eine 2,5-fach höhere Expression des PGP1 ab Weiterhin ließ sich eine signifikante Herunterregulation in den 150' Proben von SO4 und vom Riesling sowie in der R 7' Probe registrieren. Auch bei diesem Gen zeigte eine Gegenüberstellung der Kontrollproben, dass seine Expression in Börner höher war als in SO4 und im Riesling. Diese war statistisch signifikant zu SO4.

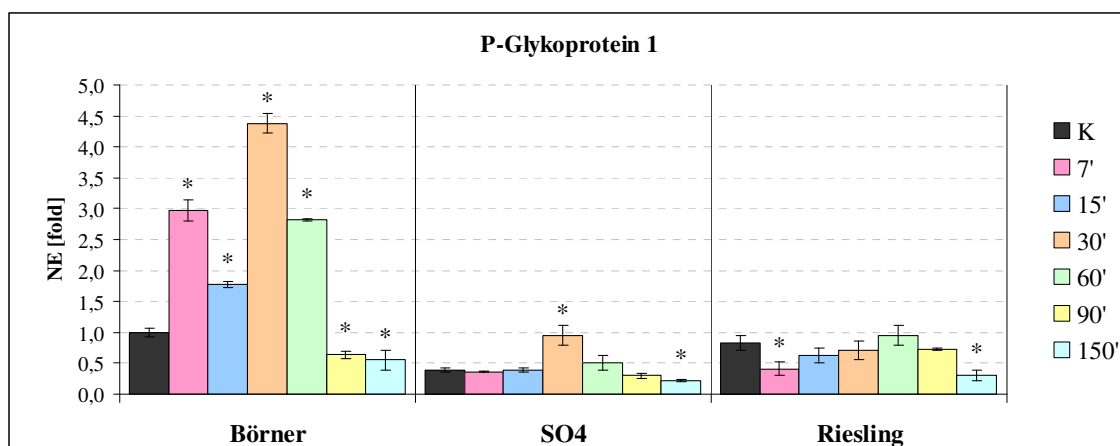


Abbildung 3.25: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGP1 in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.5 P-Glykoprotein 4 (PGP4)

Die Ergebnisse der RT-PCR des PGP4 in Börner, SO4 und Riesling Wurzeln sind in Abbildung 3.26 aufgetragen. Die Abbildung macht deutlich, dass erhebliche Unterschiede in der Reaktion dieses Genes auf die IES Behandlung in den drei Sorten bestanden. So zeigte sich in SO4 und im Riesling lediglich eine schwache signifikante Hochregulation des PGP4 nach 150min. In Börner hingegen stieg die Genexpression schon nach 7min IES Induktionszeit um das Siebenfache an. Dem folgte eine etwas geringere Steigerung der Expression in der 15min Probe, um etwa das 2,5-fache. Anschließend erhöhte sich die quantitative Genexpression kontinuierlich bis zur 150min Probe. In dieser Probe zeigte das PGP4 eine etwa sechsfache Expression im Vergleich zur Kontrollprobe. Eine Gegenüberstellung der drei unbehandelten Proben ließ erkennen, dass das Gen in Börner signifikant höher exprimiert war als in Riesling.

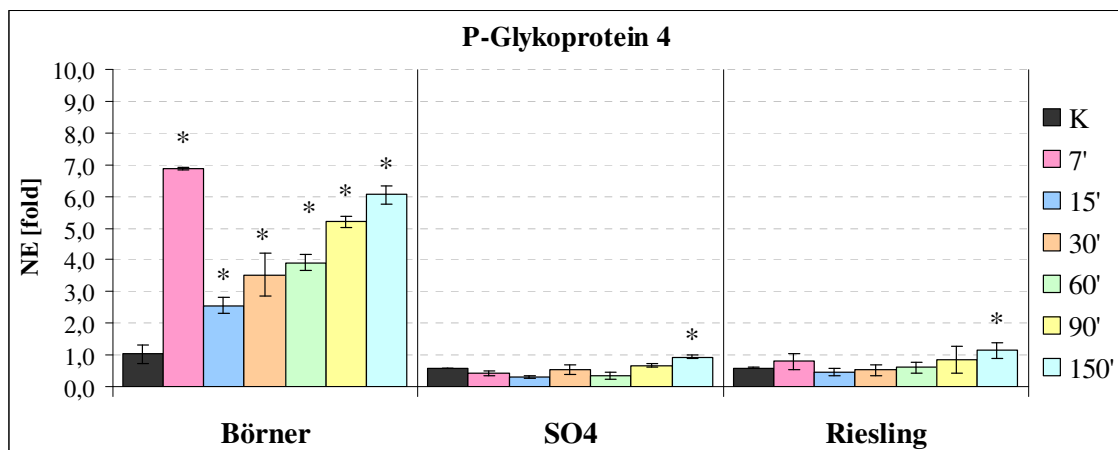


Abbildung 3.26: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGP4 in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.6 Alcohol dehydrogenase (ADH)

Der grafischen Veranschaulichung der Ergebnisse der quantitativen RT-PCR der ADH in den Proben von Börner, SO4 und Riesling dient Abbildung 3.27. Im Quervergleich der Sorten stellt sie ähnliche Regulationsmuster heraus. So wurde die ADH in jeder Sorte nach den IES Induktionszeiten von 7min, 15min, 30min, 60min und 150min signifikant herunter reguliert. Am deutlichsten war dies in der 7' und 15' Probe von Börner zu sehen, wie die Abbildung bestätigt. Dagegen zeigten die 90' Proben der drei Sorten eine signifikante Hochregulation, welche in Börner am stärksten ausfiel. Dort ließ sich eine Steigerung der Expression

um beinahe das 2,5-fache im Vergleich zur Kontrollprobe feststellen. Zum Vergleich: In SO4 und im Riesling lag der Expressionszuwachs jeweils bei zirka 1,5. Die *Geniom one* Analyse, deren Auswertungen in Kapitel 3.8 systematisch vorgestellt wurden, brachte ähnliche Ergebnisse. Dort zeigte sich eine signifikante Herunterregulation der ADH in den Börner Proben 7', 15' und 60' und eine positive Regulation in den 90' Proben von Börner und Riesling. Dies ließ sich durch die RT-PCR verifizieren. Die in der RT-PCR zusätzlich nachgewiesene negative Regulation der B 30' Probe war in der *Geniom one* Analyse nicht auffindbar. Selbiges traf auf die Proben von Riesling zu, von der besagten 90' Probe ausgenommen.

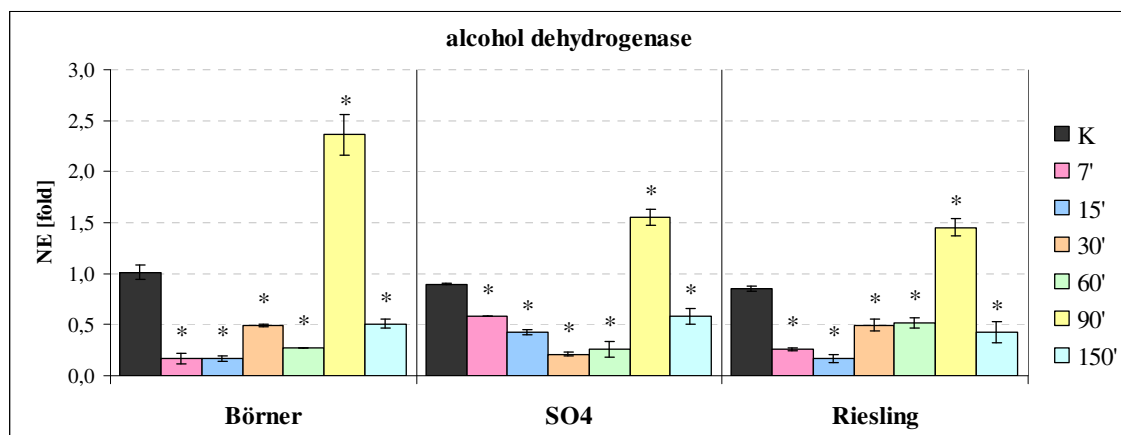


Abbildung 3.27: Quantitative Genexpressionsanalyse der ADH in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.7 Beta-1,3-glucanase

Die in Abbildung 3.28 dargestellten Ergebnisse der durchgeführten RT-PCR zeigen, dass die beta-1,3-glucanase in Börner verglichen mit der Kontrollprobe zu jeder IES Induktionszeit signifikant herunter reguliert wurde. Eine Ausnahme bildete lediglich die B 30' Probe, in der die Abnahme der Genregulation nicht signifikant war. Bereits nach 7min IES Behandlung zeigte sich die stärkste Reduktion der Genexpression in Börner. Dort wurde eine etwa 4,5-fache Abnahme im Vergleich zu Kontrolle festgestellt. Anders sah es hingegen in SO4 und in Riesling aus. In erst genannter Sorte wurde zum einen eine signifikante Herunterregulation des Gens nach 7min und 15min Induktionszeit beobachtet. Zum anderen ließ sich jedoch eine signifikante Hochregulation nach 90min und 150min erkennen. In Riesling hingegen wurde die beta-1,3-glucanase nur in der 7' und 90' Probe signifikant herunter reguliert. Der Grafik ist weiterhin zu entnehmen, dass das Gen in unbehandelten Wurzeln von Börner um

das sieben- bzw. das zweifache höher exprimiert ist als in denen von SO4 bzw. vom Riesling.

Ein Vergleich dieser Ergebnisse mit denen aus der *Geniom one* Analyse zeigte, dass dort exakt die gleichen Ergebnisse gefunden wurden. Dort ließ sich eine ebenfalls eine negative Regulation in den Börner Proben 7', 15', 60' und 90' sowie in den Riesling Proben 7' und 90' nachweisen. Folglich konnten die Resultate der *Geniom one* Analyse durch die RT-PCR verifiziert werden.

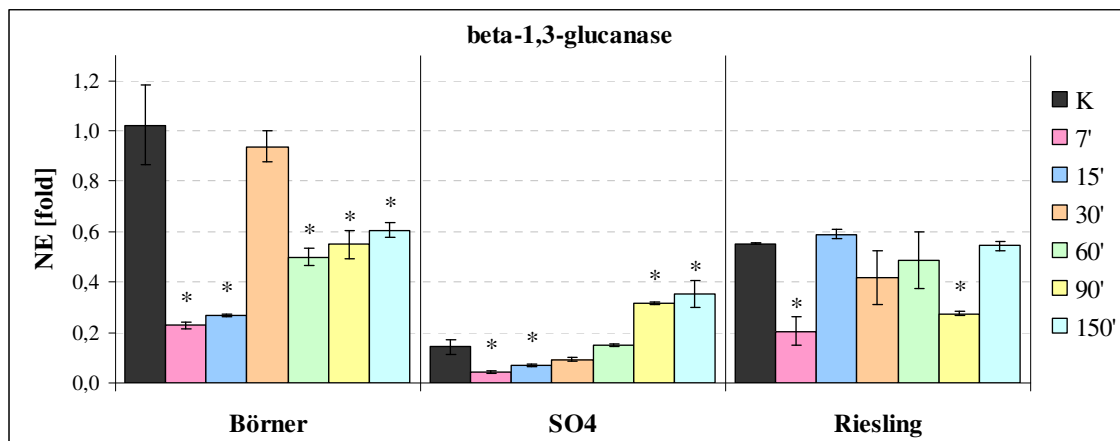


Abbildung 3.28: Quantitative Genexpressionsanalyse der beta-1,3-glucanase in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.8 Chitinase

Mit Hilfe der RT-PCR konnte festgestellt werden, dass die IES Behandlung in allen drei Sorten und zu allen Induktionszeiten eine signifikante Herunterregulation der Chitinase hervorgerufen hat, wie Abbildung 3.29 zu entnehmen ist. Die stärkste Reduktion wurde dabei in den Börner Proben 7', 15', 30' und 60' verzeichnet. Dort reduzierte sich die Expression des Gens um ca. das Acht- bis Neunfache im Vergleich zur unbehandelten Probe. Eine Gegenüberstellung der drei Kontrollproben zeigte, dass die Chitinase in unbehandelten Börner Wurzeln signifikant höher exprimiert war als in den entsprechenden Wurzelproben von SO4 und vom Riesling.

Ähnliche Resultate ließen sich der *Geniom one* Analyse entnehmen. Dort stellte sich heraus, dass die Chitinase in allen IES behandelten Proben von Börner sowie in der 7' und 90' Probe von Riesling signifikant herunter regulierte wurde. Dies konnte durch die RT-PCR bestätigt werden. Lediglich die negative Regulation in den Riesling Probe 15', 30' und 60' konnte in der *Geniom one* Analyse nicht gefunden werden.

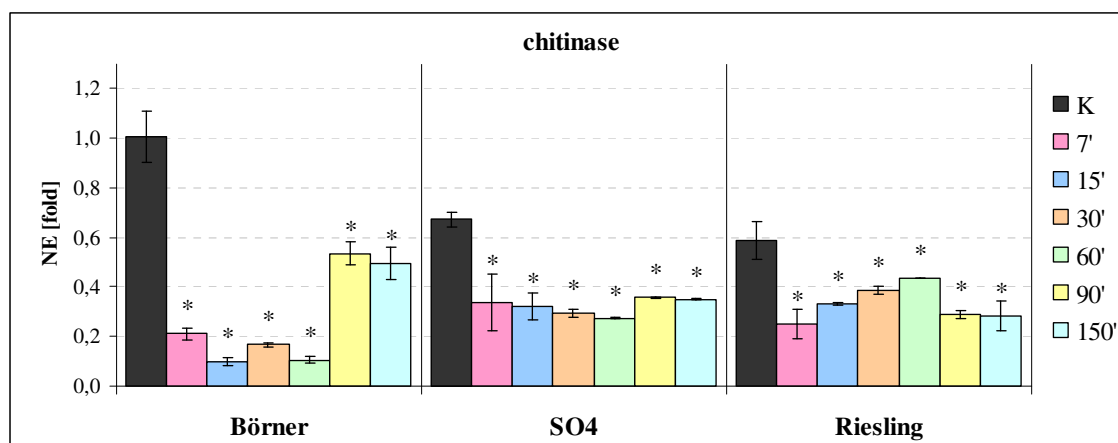


Abbildung 3.29: Quantitative Genexpressionsanalyse der Chitinase in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.9 Ethylene response factor (ERF)

In allen Proben konnte durch die RT-PCR eine IES bedingte Hochregulation des ERF festgestellt werden. Diese war statistisch signifikant, von B 7', R 7' und R 30' ausgenommen, wie Abb. 3.30 grafisch veranschaulicht. Die deutlichste Erhöhung der Expression zeigte sich bei allen Sorten in der 90' Probe, gefolgt von der 150' Probe. In Börner war die Zunahme der Genexpression am stärksten ausgeprägt. So ließ sich in der 90' Probe in Börner eine beinahe 13-fache, in SO4 und im Riesling dagegen eine etwa zehnfache Expression im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle verzeichnen. In den 150' Proben wurde die Genexpression durch IES bei allen Sorten um etwa das neunfache erhöht.

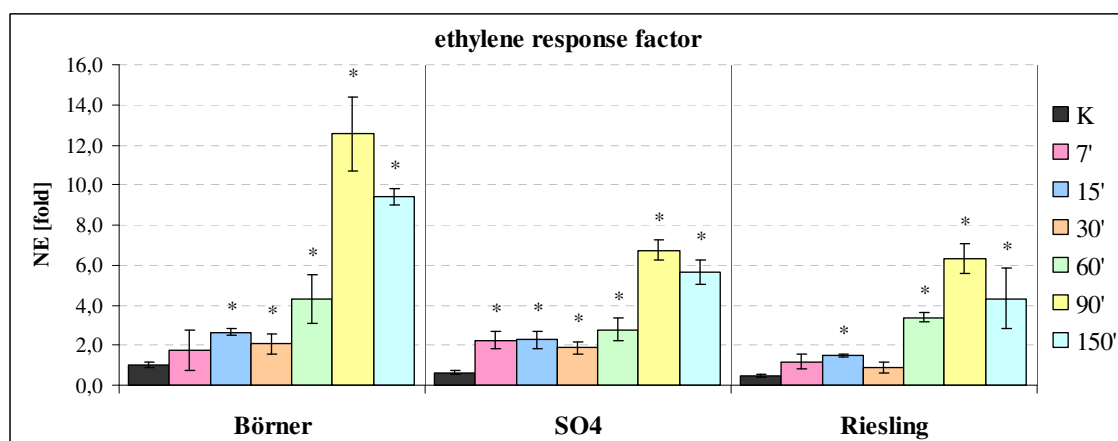


Abbildung 3.30: Quantitative Genexpressionsanalyse des ERF in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Weiterhin bemerkenswert ist die signifikante, um das 1,5- bzw. zweifach höhere Expression des ERF in unbehandelten Börner Wurzeln im Vergleich zu denen von SO4 bzw. vom Riesling.

Ähnliche Ergebnisse erbrachte die *Geniom one* Analyse. Dort zeigte sich in den Proben B 7', B 30', B 60' und B 90' sowie in R 60' und R 90' eine signifikant positive Regulation des ERF im Vergleich zur unbehandelten Probe. In der RT-PCR war lediglich die Hochregulation der B 7' Probe nicht signifikant. Somit ließen sich die Resultate der *Geniom one* Analyse durch die RT-PCR verifizieren.

3.10.3.10 Glutathione S-transferase (GST)

Mit Hilfe der RT-PCR zeigte sich, dass die GST in allen IES induzierten Börner Proben signifikant herunter reguliert wurde. Wie Abbildung 3.31 veranschaulicht, konnte die deutlichste Reduktion der Expression in der B 15' Probe gemessen werden. Dort war das Gen um das vierfache niedriger exprimiert als in der Kontrolle. In SO4 hingegen konnte lediglich in der S 7' Probe eine signifikante negative Regulation der GST festgestellt werden. Die übrigen Proben zeigten keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle. Anders in Riesling: hier ließ sich eine signifikante Herunterregulation nach 7min, 15min und 30min sowie eine signifikante Hochregulation nach 60min und 90min IES Induktion verzeichnen. Die stärkste Regulation zeigte sich dabei in der 7' Probe, in der die GST Expression verglichen mit der Kontrolle um etwa das Sechsfache vermindert war. Auffällig ist die höhere Expression des Gens in der unbehandelten Probe von Börner im Vergleich zu den unbehandelten Proben von SO4 und vom Riesling (hier auch statistisch signifikant).

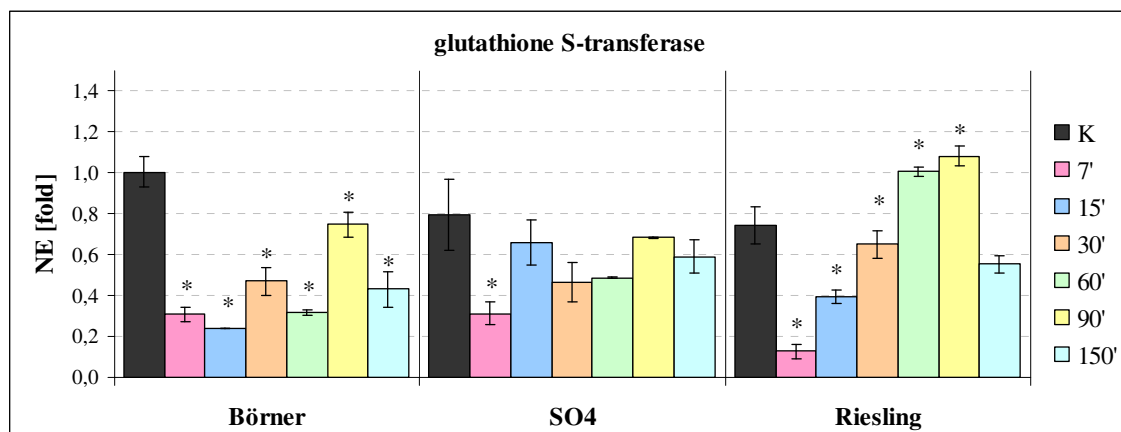


Abbildung 3.31: Quantitative Genexpressionsanalyse des GST in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die *Geniom one* Analyse zeigte ähnlich Ergebnisse. Dort ließ sich in den Proben B 7', B 15', B 60' sowie R 7' eine signifikante negative Regulation des GST verzeichnen. Zusätzlich ergab sich eine positive Regulation in der 60' sowie der 90' Probe von Riesling. Dies konnte wiederum durch die RT-PCR validiert werden. Allerdings traten hier, wie oben beschrieben, bei weiteren Proben von Börner und Riesling signifikante IES bedingte Regulationen des Gens auf.

3.10.3.11 Lipid transfer protein (LTP)

Die durchgeführte RT-PCR Analyse des LTP führte, wie Abbildung 3.32 belegt, in den drei Sorten zu sehr heterogenen Resultaten. So konnte in Börner in allen IES behandelten Proben eine signifikante Herunterregulation des Gens festgestellt werden. In SO4 hingegen bewirkte die IES Behandlung eine schwache Abnahme der Expression nach 7min sowie eine signifikante Zunahme nach 30min, 60min und 150min. Dahingegen führte die Behandlung mit IES in Riesling zu keinerlei Genregulation. Die stärkste Regulation der LTP Expression ließ sich verglichen mit der Kontrolle in der B 15' Probe erkennen, in der eine Abnahme um etwa das Vierfache gemessen wurde. In untenstehendem Diagramm hervorstechend ist die extrem unterschiedlich hohe Expression des LTP in den unbehandelten Proben der drei Sorten. So wurde in unbehandelten Börner Wurzeln eine etwa 14- bzw. 22-fach höhere Genexpression festgestellt als in denen von SO4 bzw. vom Riesling.

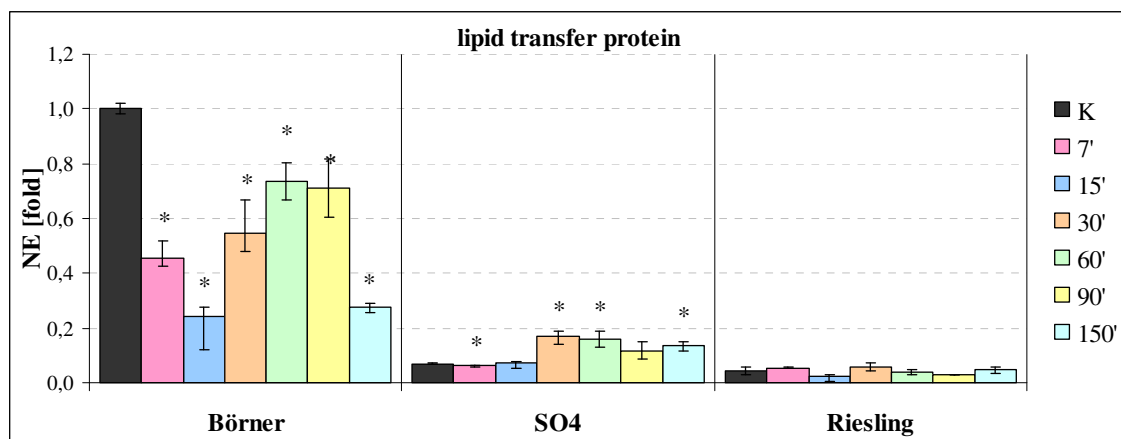


Abbildung 3.32: Quantitative Genexpressionsanalyse des LTP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die *Geniom one* Analyse lieferte vergleichbare Ergebnisse. Dort zeigten die Proben B 7', B 15', B 60', B 90' und R 90' signifikante negative Regulationen des LTP. Im Falle von Bör-

ner konnte dies durch die RT-PCR bestätigt werden, hier zeigte jedoch auch in der B 30' eine signifikante Herunterregulation. Die in der *Geniom one* Analyse festgestellte negative Regulation der R 90' war in der RT-PCR zwar sichtbar, aber statistisch nicht signifikant.

3.10.3.12 Phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

In Abbildung 3.33 sind die Ergebnisse der RT-PCR von der PAL in Wurzeln von Börner, SO4 und Riesling dargelegt. In Börner konnte eine signifikant positive Regulation der PAL durch IES nach 30min, 60min und 90min sowie eine signifikant negative Regulation nach 7min und 15min nachgewiesen werden. In SO4 und im Riesling zeigte sich, abgesehen von der R 15' Probe, in allen Proben eine IES bedingte signifikante Hochregulation. Auffallend ist die unterschiedliche Höhe der Regulation bei Börner im Vergleich zu SO4 und Riesling. So konnte in der B 150' Probe eine 12-fach stärkere Expression der PAL als in der Kontrolle nachgewiesen werden. In SO4 und im Riesling hingegen fiel die Expressionserhöhung des Gens mit einer maximalen Steigerung von 8,5 in der S 90' und von 4,5 in der R 60' geringer aus. Eine statistische Gegenüberstellung der Kontrollproben brachte hervor, dass die PAL in Börner signifikant um das zwei- bzw. 4,5-fache höher exprimiert war als in SO4 bzw. im Riesling.

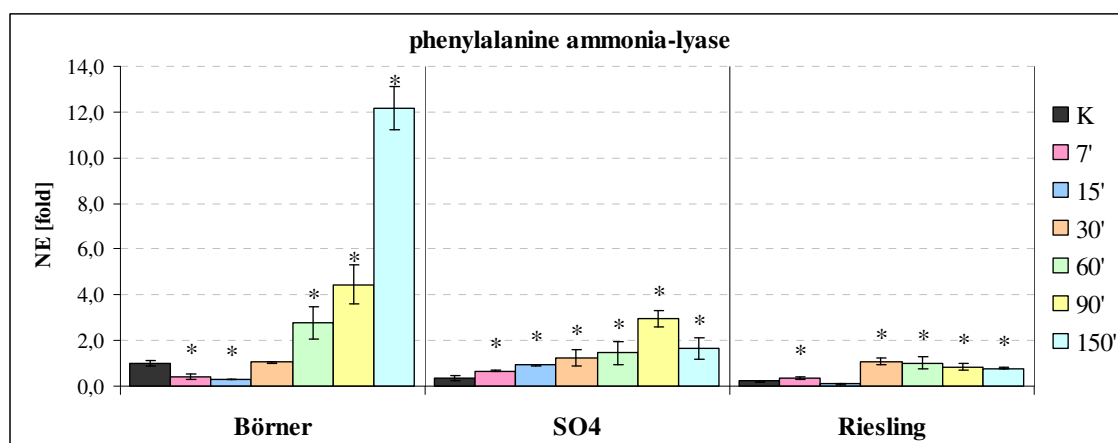


Abbildung 3.33: Quantitative Genexpressionsanalyse der PAL in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die Resultate der durchgeführten *Geniom one* Analyse zeigten, dass die PAL nur nach 90min IES Behandlung eine positive Regulation in Börner und in Riesling aufwies. Die Tatsache, dass in der 90' Probe der beiden Sorten eine positive Regulation des Gens zu beobachten ist, deckt sich mit den Ergebnissen der RT-PCR. Es wurden aber wie oben beschrie-

ben zusätzlich signifikante Genexpressionsänderungen während der anderen IES Induktionszeiten gefunden.

3.10.3.13 Proline-rich protein (PRP)

Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR Analyse des PRP in Börner, SO4 und Riesling Proben ist in Abbildung 3.34 wiedergegeben. Wie zu sehen, konnte in allen IES behandelten Proben von Börner eine signifikante Herunterregulation des Gens im Vergleich zur Kontrolle nachgewiesen werden. In SO4 wurde dies in den Proben S 7' bis S 60', in Riesling in den Proben R 7', R 15' und R 150' beobachtet. Bemerkenswert ist jedoch, dass die Reduktion der Expression des PRP in Börner deutlich stärker ausfiel. So ist in dieser Sorte nach 7min bzw. 15min IES Induktion eine 11- bzw. 16-fache Verminderung der Genexpression zu verzeichnen. In SO4 und im Riesling hingegen wurde lediglich eine etwa fünf- bis achtfache Abnahme der Genexpression in diesen Proben beobachtet. Weiterhin auffällig war die signifikante, fast dreifach höhere Expression des PRP in der unbehandelten Börner Probe im Vergleich zu den Kontrollproben von SO4 und vom Riesling.

Aus den Ergebnissen der *Geniom one* Analyse ließ sich entnehmen, dass das PRP in den Proben B 7', B 15' und B 30' sowie in R 90' signifikant herunter reguliert wurde. Eine Bestätigung dafür brachte die RT-PCR. In dieser zeigten sich jedoch zusätzlich in den oben genannten Proben signifikante Regulationen.

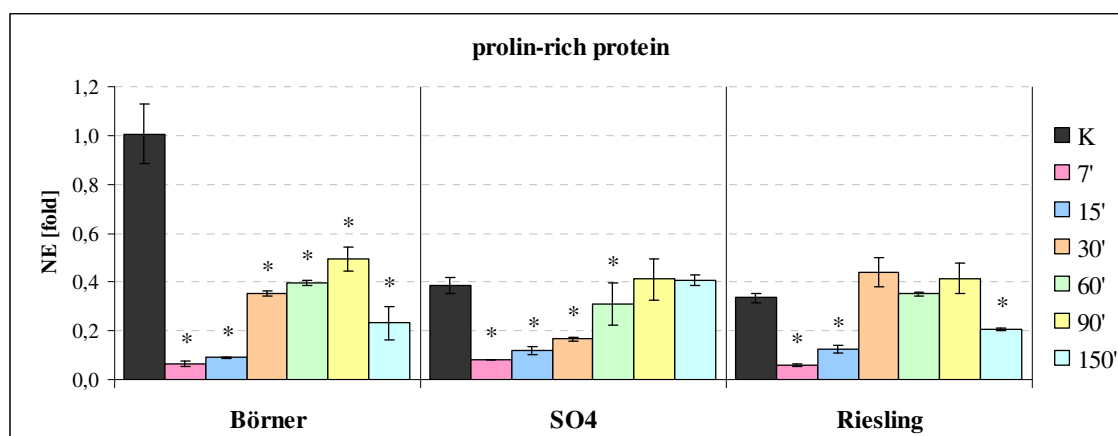


Abbildung 3.34: Quantitative Genexpressionsanalyse des PRP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.14 Ripening-related protein (Grip)

Abbildung 3.35 dient der grafischen Veranschaulichung der Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse des Grip in Börner, SO4 und Riesling Proben mit Hilfe der RT-PCR. Dem Diagramm ist zu entnehmen, dass die IES Behandlung in Börner nach 30min bis 150min eine signifikante Hochregulation des Gens bewirkte. Bei SO4 konnte dies in der 90' Probe und bei Riesling in der 90' und 150' Probe beobachtet werden. Zusätzlich wurde das Grip in Riesling nach 15min IES Induktionszeit signifikant negativ reguliert. Insgesamt war die Erhöhung der Expression in der B 90' am stärksten sichtbar.

Nahezu identische Ergebnisse erbrachte die *Geniom one* Analys. Dort zeigte sich in Börner in der 7', 30', 60' und 90' eine positive Regulation des Grip verglichen mit der unbehandelten Probe. In Riesling war diese Regulation nur in der 90' Probe zu beobachten. Diese Resultate konnten mit der RT-PCR verifiziert werden. Lediglich die in der RT-PCR festgestellte Herunterregulation der R 7' Probe hat sich in der *Geniom one* Analyse nicht bestätigt.

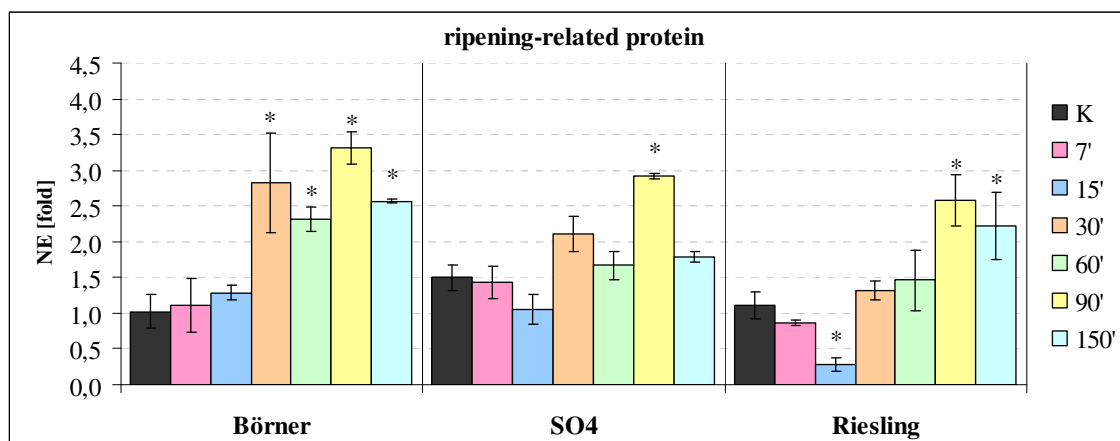


Abbildung 3.35: Quantitative Genexpressionsanalyse der Grip in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.15 Stilbene synthase

Die quantitative Genexpressionsanalyse der STS mittels RT-PCR wies, wie Abbildung 3.36 verdeutlicht, in Börner und Riesling eine signifikant negative Regulation nach 7min bis 60min IES Induktion nach. Anschließend wurde das Gen nach 90min und nach 150min deutlich hochreguliert. In SO4 ließ sich lediglich eine negative Regulation in der 7', 30' und 60' Probe sowie eine positive Regulation in der 150' Probe dokumentieren. Bemerkenswert ist, dass die Hochregulation der 90' Börner Probe stärker ausfiel als in der entsprechenden Probe

von Riesling. So bewirkte die IES Behandlung in Börner nach 90min eine 3,5-fache Erhöhung der Expression des Gens, in Riesling lediglich die 2,5-fache. Ein Vergleich der unbehandelten Kontrollproben zeigte, dass die Expression der STS in Börner und SO4 signifikant, um das 2,5-fache, höher war als in Riesling.

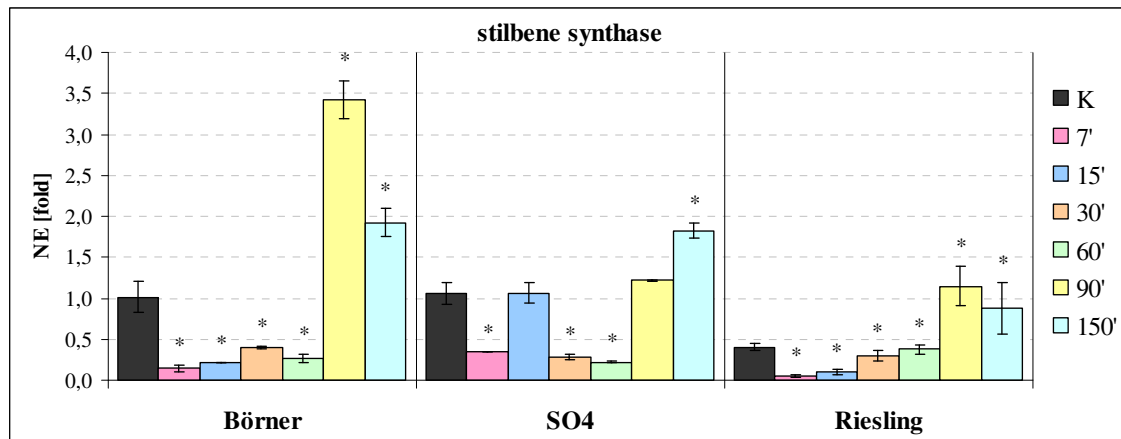


Abbildung 3.36: Quantitative Genexpressionsanalyse der STS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die *Geniom one* Analyse lieferte bei Börner deckungsgleiche und bei Riesling ähnliche Resultate. Dort konnte analog zu den RT-PCR Ergebnissen eine statistisch signifikante negative Regulation der STS in den Börner Proben 7', 15', 30' und 60' sowie eine signifikante positive Regulation in der 90' Probe gefunden werden. Die signifikante Herunterregulation der 30' und 60' Riesling Probe konnte ebenfalls durch die RT-PCR bestätigt werden. Allerdings wurden hier auch in den anderen Riesling Proben signifikante Regulationen gefunden.

3.10.3.16 Thaumatin-like protein (TLP)

Abbildung 3.37 veranschaulicht, dass mit Hilfe der RT-PCR in allen IES behandelten Proben von Börner, SO4 und Riesling eine Herunterregulation des TLP im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle verzeichnet werden konnte. Mit Ausnahme der 150' Probe von SO4 war die Abnahme in allen Proben statistisch signifikant. Die deutlichste Reduktion der Genexpression konnte in der 7' und 15' Probe von Börner gemessen werden, in denen die Expression des Gens etwa um das 17-fache vermindert war. Auffallend war der signifikant höhere Level des TLP in der unbehandelten Probe von Börner verglichen mit den entsprechenden Proben von SO4 und vom Riesling. Dabei wies das TLP in Börner eine fünfmal höhere Expressionsrate auf als in Riesling.

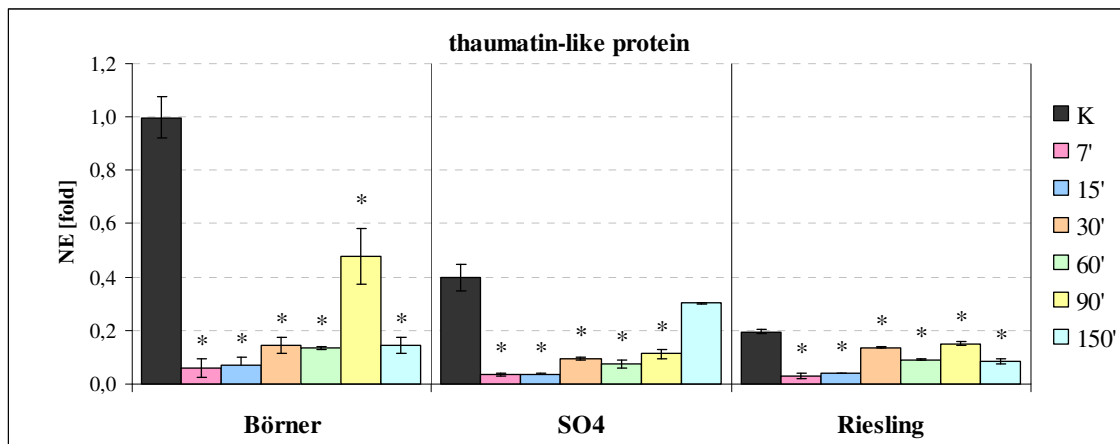


Abbildung 3.37: Quantitative Genexpressionsanalyse des TLP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

In der *Geniom one* Analyse zeigte sich, analog zu den Ergebnissen der RT-PCR, in allen behandelten Börner Proben sowie in den 60min und 90min IES behandelten Proben von Riesling eine signifikante Herunterregulation des TLP im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Die RT-PCR Analyse konnte dies somit verifizieren. Sie ließ jedoch auch in den übrigen Riesling Proben eine signifikante Regulation erkennen.

3.10.3.17 Transcription factor, putative (TF)

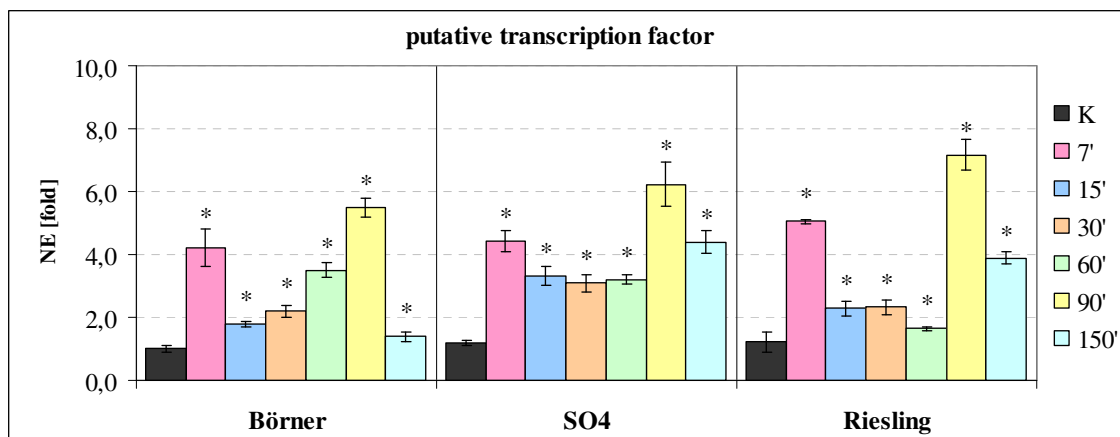


Abbildung 3.38: Quantitative Genexpressionsanalyse des putative TF in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

In durchgängig allen IES induzierten Proben von Börner, SO4 und Riesling konnte mit Hilfe der RT-PCR eine signifikante Hochregulation des TF ermittelt werden. Am deutlichsten wurde dies, wie Abbildung 3.38 deutlich macht, in den 7' und 90' Proben der drei Sorten, in

denen eine vier- bis sechsfache Zunahme der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle gemessen wurde. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Kontrollproben konnte hier nicht registriert werden.

Die Ergebnisse der *Geniom one* Analyse stimmten nur zum Teil mit denen der RT-PCR überein. So konnte in der *Geniom one* Analyse eine signifikante Hochregulation des TF in den Börner und Riesling Proben 60' und 90' eruiert werden. Gleiches brachte zwar auch die RT-PCR hervor, hier wurden jedoch auch in allen anderen IES behandelten Proben signifikante Expressionsunterschiede gefunden.

3.10.3.18 Adventitious rooting related oxygenase (ARRO)

In Abbildung 3.39 ist die quantitative Genexpression der ARRO in unbehandelten und behandelten Börner, SO4 und Riesling Proben dargestellt. Wie zu sehen ist, bewirkte die IES Behandlung in Börner nach jeder Induktionszeit eine signifikante Abnahme der Genexpression, mit Ausnahme der B 90' Probe. Ihren Tiefpunkt erreichte die Abnahme bereits nach 7min, wo eine annähernd siebenfach niedrigere Expression im Vergleich zu Kontrolle festgestellt wurde. Auch in den IES behandelten Proben von SO4 wurde eine durchgängig signifikante Reduktion der Genexpression beobachtet. In Riesling hingegen konnte nach einer schwachen Herunterregulation der ARRO nach 15min IES Behandlung, eine schwache, signifikant positive Regulation nach 60min und 90min verzeichnet werden.

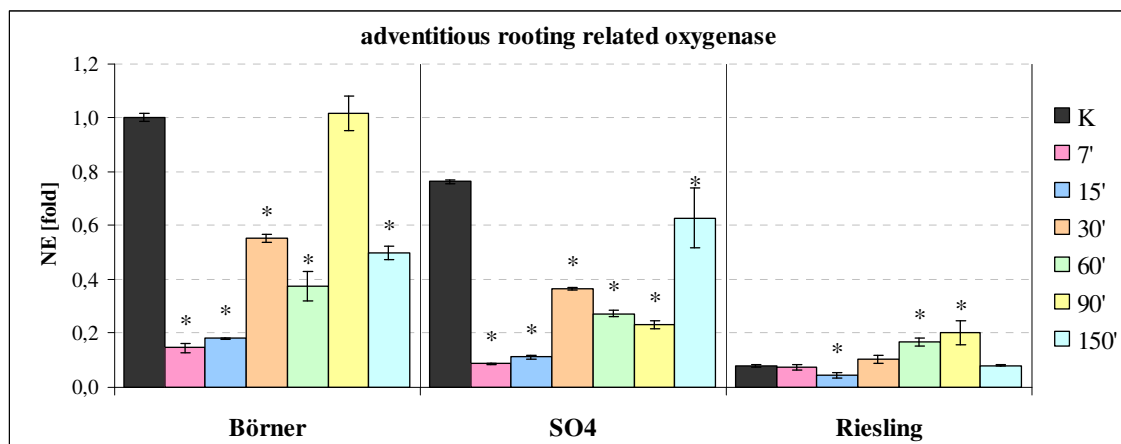


Abbildung 3.39: Quantitative Genexpressionsanalyse der ARRO in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Ferner fällt beim Betrachten der Grafik auf, dass auch bei diesem Gen die Expression in der unbehandelten Börner Probe signifikant höher war als in den entsprechenden Proben von

SO4 und vom Riesling. So wurde in Börner eine nahezu 13-fach höhere Genexpression gemessen als in Riesling.

In der vorangegangenen *Geniom one* Untersuchung zeigte sich bei der ARRO in Börner eine signifikante Herunterregulation nach 7min, 15min und 60min. Eine Regulation durch IES in Riesling konnte nicht festgestellt werden. Durch die RT-PCR konnte folglich bestätigt werden, dass es in den genannten Proben zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression kommt. Jedoch zeigten sich mit der RT-PCR auch in der B 30' Probe sowie in mehreren Proben von Riesling signifikante Regulationen.

3.10.3.19 Alanine acetyl transferase

Die Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse der AAT mittels RT-PCR sind im untenstehenden Diagramm (Abb. 3.40) aufgetragen. Zu sehen ist, dass in Börner, SO4 und Riesling nach 90min und 150min IES Behandlung eine signifikante Hochregulation der AAT zu verzeichnen war. In Börner ließ sich eine etwa zehnfach höhere Expression in der B 90' Probe im Vergleich zur Kontrolle verzeichnen. Dahingegen konnte in SO4 bzw. in Riesling lediglich eine Erhöhung um das drei- bzw. um das sechsfache in den 90' Proben beobachtet werden.

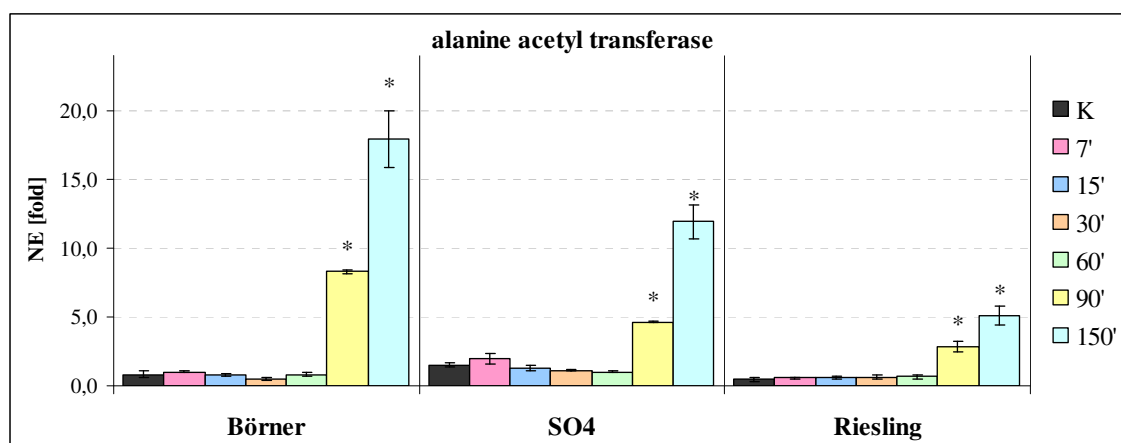


Abbildung 3.40: Quantitative Genexpressionsanalyse der AAT in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Einen noch deutlicheren Effekt erzielte die IES Behandlung nach 150min. Hier ist die AAT in Börner um das 22-fache, in SO4 und im Riesling um das acht- bzw. 11-fache im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle signifikant erhöht. Nach den übrigen IES Induktionszeiten war keine differentielle Expression des Gens erkennbar.

Übereinstimmend mit der RT-PCR deckte die *Geniom one* Analyse eine positive Regulation der AAT in der B 90' Probe auf. Die Steigerung der Genexpression in der R 90' Probe hingegen, konnte nur mit der RT-PCR nachgewiesen werden.

3.10.3.20 Chalcone synthase (CHS)

Die RT-PCR der CHS lieferte in Börner, SO4 und Riesling sehr divergente Ergebnisse, wie in Abbildung 3.41 zu sehen ist. Die einzige Übereinstimmung in allen Sorten war die signifikante Hochregulation des Gens in den 90' und 150' Proben. In Börner wurden zusätzlich signifikant negative Regulationen in den Proben B 7', B 15' und B 30' gefunden. In SO4 führte die IES Behandlung nach 15min und 30min zu einer signifikant positiven sowie nach 60min zu einer signifikant negativen Regulation. In Riesling zeigten außerdem die Proben R 7' und R 60' eine Hochregulation der CHS im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste Regulation im gesamten Probenpanel wurde in Riesling nach 150min IES Behandlung gefunden. Dort nahm die Expression des Gens um etwa das Vierfache zu. Unterschiede zwischen den Kontrollproben waren bei diesem Gen nicht ersichtlich.

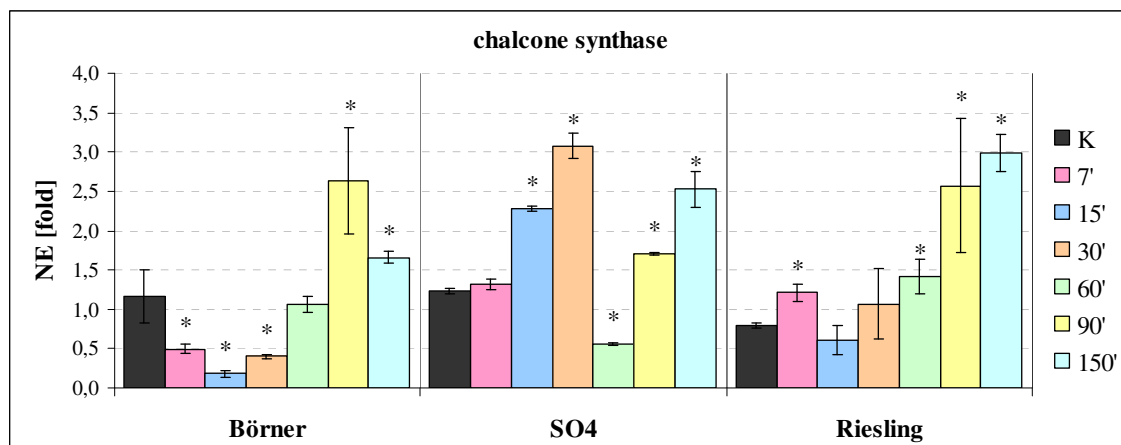


Abbildung 3.41: Quantitative Genexpressionsanalyse der CHS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Den Ergebnissen der *Geniom one* Analyse ließ sich für die CHS nur eine signifikante Herunterregulation in der Börner Probe B 15' entnehmen. Eine negative Regulation in dieser Probe konnte zwar durch die RT-PCR verifiziert werden, es traten dort jedoch in weiteren Proben von Börner als auch von Riesling signifikante Expressionsunterschiede auf.

3.10.3.21 Lipoxygenase (LOX)

Die Abbildung 3.42 veranschaulicht, dass in Börner, SO4 und Riesling nur in der 90' Probe und in der 150' Probe eine signifikante positive Regulation der LOX mittels der RT-PCR verzeichnet werden konnte. Auffallend ist die deutlich stärkere Erhöhung in der B 90' Probe von Börner im Vergleich zu den Proben von SO4 und vom Riesling. So wies die B90' Probe eine 3,5-fach höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. In SO4 und im Riesling hingegen zeigte das Gen in deren 90' Proben nur eine schwache, 1,5-fache Erhöhung, verglichen mit der unbehandelten Probe. Signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollproben konnten nicht gemessen werden.

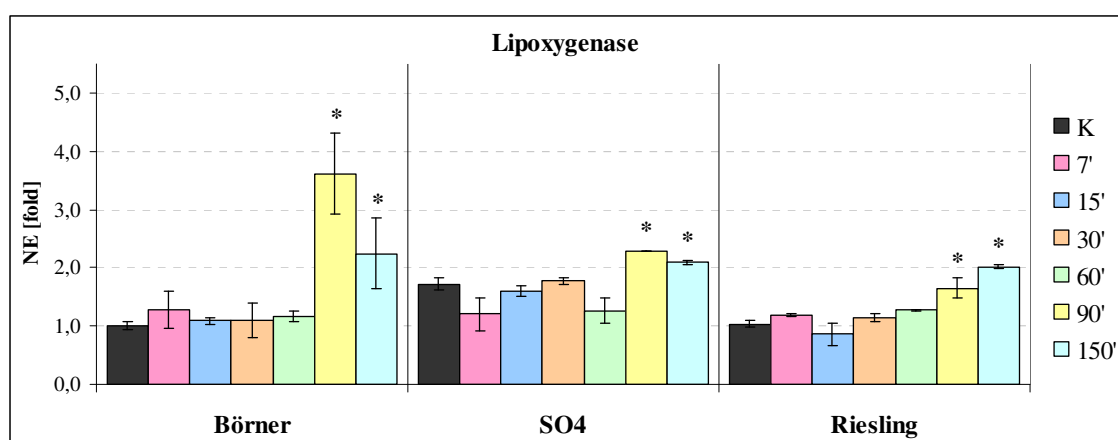


Abbildung 3.42: Quantitative Genexpressionsanalyse der LOX in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die *Geniom one* Analyse ergab, dass die LOX lediglich in der 90' Probe von Börner signifikant im Vergleich zu Kontrolle erhöht ist. Die Resultate der RT-PCR bestätigten auf der einen Seite, dass nur die 90' Probe von Börner reguliert wurde. Auf der anderen Seite ließ sich durch die RT-PCR auch eine signifikante positive Regulation der 90' Probe von Riesling dokumentieren.

3.10.3.22 Methionine synthase (MS)

In ausnahmslos allen IES behandelten Börner Proben konnte durch die RT-PCR eine signifikante Regulation der MS im Vergleich zur Kontrolle ermittelt werden. Diese fiel, wie in Abbildung 3.43 zu sehen ist, bis auf die B 15' Probe positiv aus, in der gleichzeitig die stärkste Regulation gemessen werden konnte. Dort war die Genexpression um etwa das Dreifache erniedrigt. Die deutlichste Hochregulation wurde in der B 7' Probe verzeichnet. Im Gegen-

satz zu Börner zeigte sich in den anderen beiden Sorten jeweils nur in zwei Proben eine signifikante Genregulation, die zudem deutlich schwächer ausfiel als in Börner. So wurde in SO4 die MS nach 15min signifikant herunter und nach 15min signifikant hoch reguliert. In Riesling konnte eine signifikante Herunterregulation in den Proben R 7' und R 30' gemessen werden. Weiterhin bemerkenswert war die schwache, aber signifikante, höhere Expression der MS in unbehandelten Börner Wurzeln verglichen mit denen von SO4 und vom Riesling.

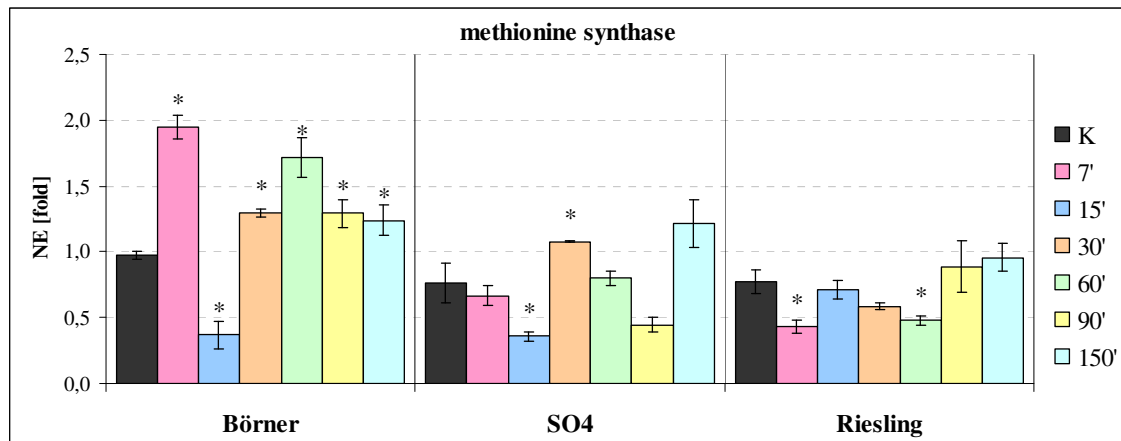


Abbildung 3.43: Quantitative Genexpressionsanalyse der MS in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die *Geniom one* Analyse brachte nur bei einer Probe ein mit der RT-PCR übereinstimmendes Ergebnis hervor. So wurde bei beiden Methoden eine signifikante Herunterregulation der B 15' Probe nachgewiesen. Während aber in der *Geniom one* Analyse in keiner der anderen Proben von Börner und Riesling signifikante Regulationen auftraten, konnten mittels der RT-PCR in einigen weiteren Proben eine Regulation gefunden werden.

3.10.3.23 Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP)

Die Ergebnisse der RT-PCR, dargestellt in Abbildung 3.44, stellten heraus, dass das PGIP in allen IES behandelten Proben von Börner und SO4 signifikant herunter reguliert wurde. In Riesling hingegen war nur in zwei Proben, der R 7' und der R 15', eine signifikante Abnahme der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Beim Begutachten der Grafik fällt weiterhin auf, dass es erhebliche Unterschiede in der Expressionsstärke des PGIP in den unbehandelten Wurzeln der drei Sorten gab. So war in Börner eine beinahe zehnfach höhere Expression des Gens zu verzeichnen als in SO4 und im Riesling.

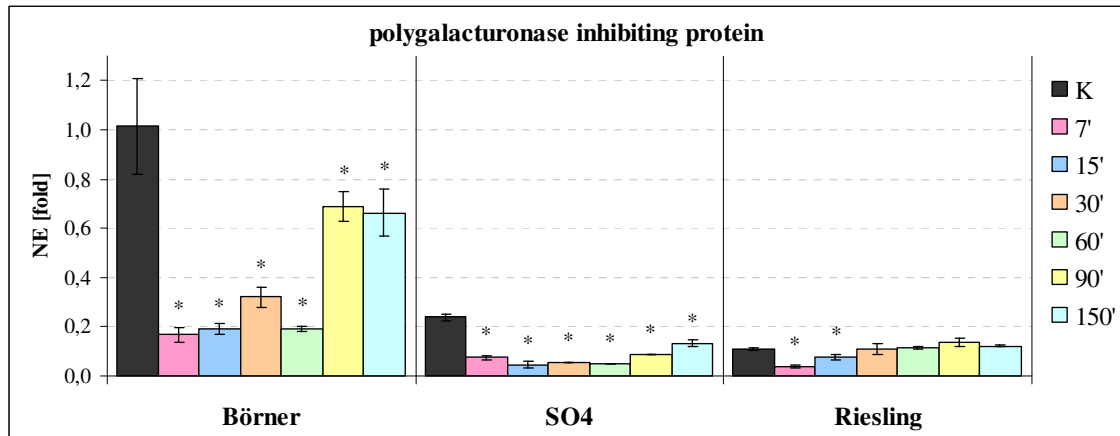


Abbildung 3.44: Quantitative Genexpressionsanalyse des PGIP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Die Resultate der im Voraus durchgeführten *Geniom one* Analyse zeigten eine negative Regulation des PGIP in Börner nach 7min bis 60min. In Riesling konnte keine signifikante Regulation festgestellt werden. Dies entsprach weitestgehend den Resultaten der RT-PCR. Lediglich die in der RT-PCR beobachtete geringe Herunterregulation des PGIP in den Proben R 7', R 15' sowie B 90' konnte mit der *Geniom one* Analyse nicht festgestellt werden.

3.10.3.24 Polyphenol oxidase (PPO)

Die quantitative Genexpressionsanalyse der PPO in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln ist in Abbildung 3.45 dargestellt. In Börner zeigte sich eine positive Regulation des Gens nach 7min, 30min, 60min und 90min. Dahingegen ließ sich in Riesling lediglich in der R 150' Probe eine signifikante Hochregulation und in SO4 in der S 7' Probe eine signifikante Herunterregulation messen. Auffällig ist die ausgeprägte Genexpressionssteigerung der B 90' Probe. In dieser Probe wurde eine fast achtfache Zunahme der Expression im Vergleich zur Kontrolle festgestellt.

Der vorangegangenen *Geniom one* Analyse konnte entnommen werden, dass die PPO nur einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle in der B 90' Probe von Börner aufwies. Die Untersuchungen mit der RT-PCR bestätigten dies. Die mit Hilfe der RT-PCR gemessenen Regulationen des PPO in der B 7', B30' und B 60' Probe wurden in der *Geniom one* Analyse jedoch nicht angezeigt.

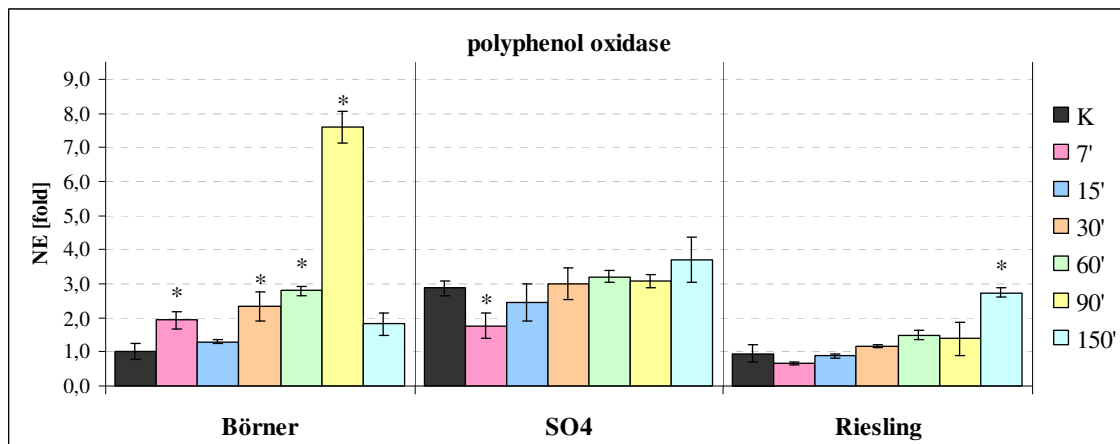


Abbildung 3.45: Quantitative Genexpressionsanalyse der PPO in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

3.10.3.25 Pathogenesis-related protein (PR)

Mit Hilfe der RT-PCR konnte festgestellt werden, dass die IES Behandlung an Börner Wurzeln nach jeder Induktionszeit zu einer signifikanten Abnahme der Expression des PR geführt hat (Abb. 3.46). Dabei ist in Börner die stärkste Abnahme nach 7min IES Behandlung zu verzeichnen gewesen, in der die Expression des Gens um beinahe das Siebenfache reduziert war. In SO4 hingegen wurde nach den ersten drei IES Induktionszeiten eine signifikante Herunterregulation dokumentiert. Nach den letzten drei Behandlungszeiten zeigte sich eine IES bedingte Hochregulation des PR.

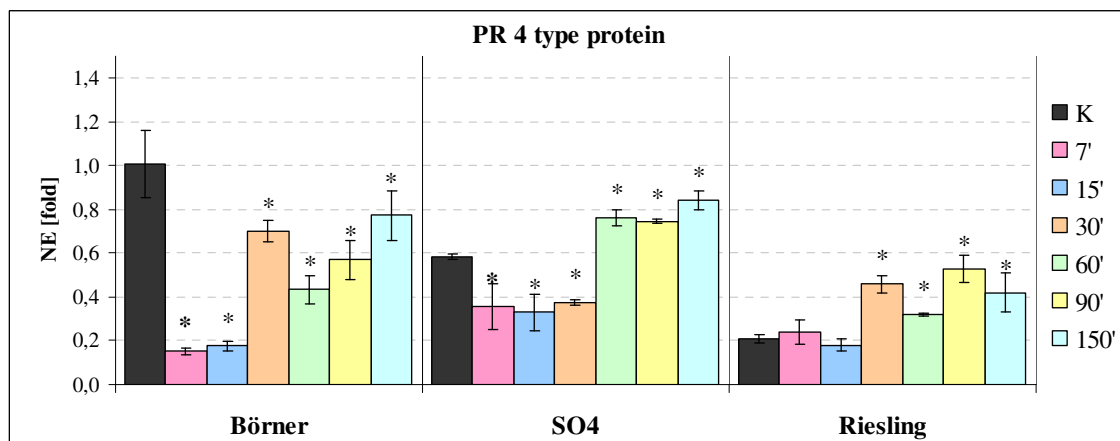


Abbildung 3.46: Quantitative Genexpressionsanalyse des PR in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

Ähnliches wurde in den Proben von Riesling beobachtet. Hier konnte eine signifikant positive Regulation des Gens nach 30min bis 150min IES Behandlung registriert werden. Bemerkenswert ist der Vergleich zwischen den unbehandelten Proben der drei Rebsorten. Wie der Abbildung 3.46 zu entnehmen ist, ließ sich eine signifikante, zwei- bzw. fünffach höhere Expression des PR in unbehandelten Börner Wurzeln im Vergleich zu den unbehandelten Wurzeln von SO4 und vom Riesling verzeichnen.

Die Analysen mit der *Geniom one* Technik ergaben bei Börner identische Resultate zu denen der RT-PCR und konnten somit verifiziert werden. Anders verhielt es sich bei Riesling. Hier war in der *Geniom one* Analyse keine Regulation des PR durch IES erkennbar. In der RT-PCR hingegen konnte die oben beschriebene signifikante Hochregulation des Gens in mehreren Proben nachgewiesen werden.

3.10.3.26 Sucrose responsive element binding protein (SREBP)

Die quantitative Genexpressionsanalyse des SREBP mit Hilfe der RT-PCR zeigte innerhalb und zwischen den Sorten Börner, SO4 und Riesling sehr heterogene Resultate, wie der Abbildung 3.47 zu entnehmen ist. Auffällig war die deutliche und statistisch signifikante Hochregulation des Gens in den 7min Proben der drei Sorten. Am stärksten ausgeprägt war diese in SO4 gefolgt von Riesling. Auch die 90' Proben von Börner und Riesling wiesen eine prägnant erhöhte SREBP Expression im Vergleich zur Kontrolle auf. Des Weiteren veranschaulicht die Abbildung, dass in unbehandelten Börner Wurzeln eine signifikante vier- bzw. sechsfach höhere Expression des SREBP im Vergleich zu den unbehandelten Wurzeln von Riesling bzw. von SO4 nachgewiesen werden konnte.

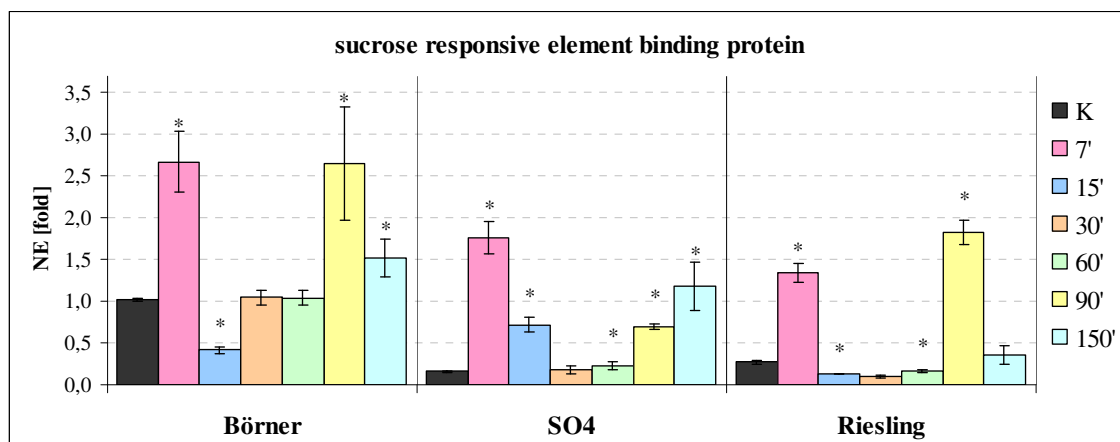


Abbildung 3.47: Quantitative Genexpressionsanalyse des SREBP in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

In der durchgeführten *Geniom one* Analyse ließ sich lediglich in der B 90' Probe von Börner eine signifikant positive Regulation des SREBP nach IES Behandlung eruieren. In der RT-PCR zeigte sich zwar auch in der B 90' Probe eine signifikante Hochregulation, aber auch in den oben beschriebenen weiteren Proben von Börner und auch von Riesling.

3.10.3.27 Xyloglucan-transglycosylase (XT)

Die in Abbildung 3.48 dargestellten Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass in nahezu allen IES behandelten Proben von Börner, SO4 und Riesling eine signifikante Regulation der XT festgestellt werden konnte. Eine Ausnahme bildeten die 150' Proben von SO4 und vom Riesling, in denen keine signifikante Genregulation beobachtet werden konnte. Die deutlichsten Reaktionen der XT auf die IES Behandlung sind in Börner gemessen worden. Nach einem leichten Rückgang der Expression nach 7min IES Behandlung, nahm die Expression anschließend drastisch zu und erreichte ihren Höhepunkt nach 150min. Dort wurde eine 5,5-fach höhere Expression im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet. In SO4 und im Riesling konnte in den Proben 7' bis 90' eine signifikante Hochregulation beobachtet werden, die aber weniger stark ausgeprägt war als in Börner. Ein Vergleich der unbehandelten Kontrollproben der drei Sorten zeigte auch bei diesem Gen, dass es schon vor der IES Behandlung in Börner signifikant höher exprimiert ist als in SO4 und in Riesling.

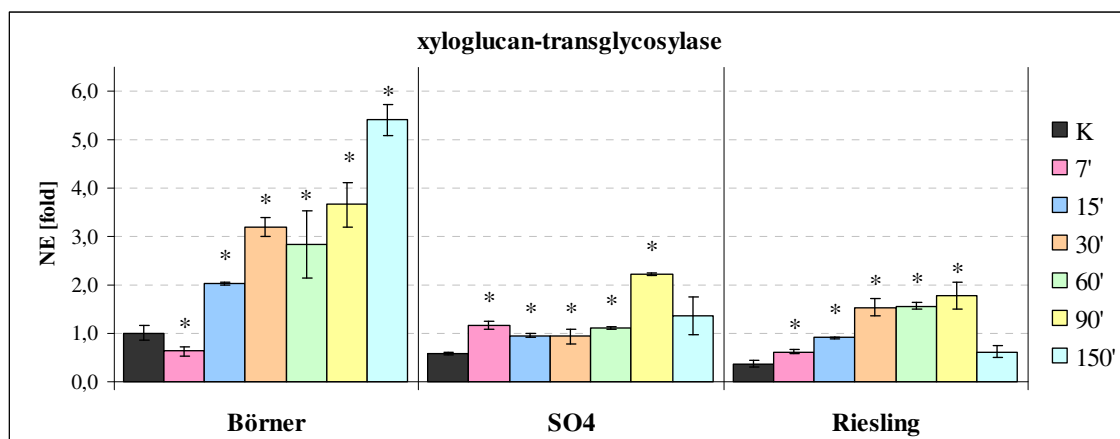


Abbildung 3.48: Quantitative Genexpressionsanalyse des XT in unbehandelten und IES behandelten Börner, SO4 und Riesling Wurzeln

NE: Normalisierte Expression; Fehlerbalken: SD; *: Student's t-Test, $p < 0,05$

In der *Geniom one* Analyse wurde eine negative Regulation der XT in der B 7', sowie eine positive Regulation in der B 60' und B 90' Probe festgestellt. Dies konnte, wie oben be-

schrieben, durch die RT-PCR bestätigt werden. In Riesling ließ sich hingegen mit der *Genom one* Analyse keine Regulation nachweisen. Anders verhielt es sich in der RT-PCR. Hier zeigten sich in fünf Riesling Proben eine signifikante Hochregulation der XT im Vergleich zur Kontrolle.

4 Diskussion

4.1 Verwendete Genexpressionsanalysen

Mit dem Ziel, Gene, die für die Reblausresistenz in Börner verantwortlich sein könnten, zu identifizieren, wurden verschiedene Verfahren der Genexpressionsanalysen eingesetzt. Die Analyseergebnisse sollen in den folgenden Unterabschnitten und in Abschnitt 4.2. diskutiert werden.

4.1.1 cDNA Subtraktion und Microarray Analyse mittels Arabidopsis Chips

Die cDNA Subtraktion ist die erste Methode, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Sie konnte jedoch keine Hinweise auf differentiell exprimierte Gene in der 90min Probe von Börner im Vergleich zur Kontrolle geben. Es ließ sich lediglich eine Bestätigung für den erfolgreichen Verlauf der Subtraktionen erkennen. Grund dafür war das übereinstimmende Bandenmuster der subtrahierten Kontrolle und der kommerziell subtrahierten Kontrolle. Nach einer IES Inkubationszeit von 2,5h und 4,5h [Dietrich, 2005] konnte eine Reihe von differentiell exprimierten Genen entdeckt werden. Warum nach 90min keine Banden im Anschluss an die Subtraktion sichtbar waren, ist zu klären. Eine Überlegung ist, dass das Verfahren nicht sensitiv genug ist, um differentiell exprimierte Gene nach dieser Zeitspanne zu identifizieren.

Mit der *Geniom one* und RT-PCR hingegen konnte eine Reihe von regulierten Genen bereits nach 7min IES Behandlung gefunden. Auch Ji et al. [2002] konnten durch Untersuchungen der Subtraktions-Methode zeigen, dass die Isolierung von Genen, deren Expression zwar differenziell reguliert wird, aber das entsprechende Transkript sowohl im *tester* als auch im *driver* vorliegt, problematisch ist. Eine Bande ist folglich nur dann sichtbar, wenn die ursprüngliche cDNA-Konzentration des Gens im *tester* die im *driver* mindestens das 5fache übersteigt. Es ist also denkbar, dass auch bei Börner die durch IES regulierten Gene in einer relativ hohen Konzentration in der unbehandelten Probe vorlagen. Die Ergebnisse der RT-PCR beispielsweise zeigten genau dieses Phänomen auf. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass das Verfahren der cDNA Subtraktion nicht zum gewünschten Erfolg geführt hat.

Als zweites wurde die Microarray Analyse mit Gesamtgenom Chips von Arabidopsis zur Identifizierung differentiell regulierter Gene in der 90min Probe von Börner durchgeführt. Aufgrund erfolgreicher Untersuchungen von Dietrich [2005] mit diesem heterologen System nach IES Inkubationszeiten von 2,5h und 4,5h [Dietrich, 2005], sollte im Rahmen dieser

Arbeit auch die 90min Probe entsprechend analysiert werden. Die Ergebnisse zeigten jedoch nur wenig differentiell regulierte Gene. Hinzu kommt, dass die Wiederholungsversuche kaum übereinstimmende Resultate brachten. Eine Reproduzierbarkeit der Chips war demnach nicht gegeben. Weil auch die *Geniom one* und die RT-PCR Analyse sehr brauchbare Ergebnisse lieferten, wird auf den Einsatz der Microarray Analyse in der weiteren Diskussion verzichtet.

4.1.2 *Geniom one* Analyse

Die *Geniom one* Analyse diente dem Screening von differentiell exprimierten Genen in IES behandelten Proben von Börner und von Riesling im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Dafür wurden von jeder Sorte Proben mit fünf verschiedenen IES Induktionszeiten eingesetzt. Der Hauptvorteil des *Geniom one* gegenüber herkömmlichen Microarray Analysen besteht darin, dass Sequenzen, die auf den Chip hybridisiert werden sollen, vom Anwender individuell aus Datenbanken ausgewählt und bei Bedarf auch verändert werden können. So konnten für die Untersuchungen gezielt ESTs von *Vitis* Genen selektiert werden, die bekanntermaßen im Zusammenhang mit der Pathogenabwehr, der HR und dem Auxintransport stehen. Zu berücksichtigen ist in diesem Zusammenhang lediglich das Risiko, dass die für die Reblausresistenz mitverantwortlichen Gene nicht zu den ausgewählten Gruppen zählen könnten. Ein weiterer Vorteil dieser Technik gegenüber gewöhnlichen Microarrays ist in der Bildanalyse zu sehen. Normalerweise ist die Spot- und Arraygeometrie bei der Microarray Herstellung nicht homogen. Das bedeutet, dass die einzelnen Spots nicht exakt auf einer Linie liegen, sondern in Folge geringfügiger Verformungen des Druckkopfes leicht zueinander versetzt sein können [Stefano und Luo, 2004]. Deshalb muss nach der Detektion die Zuordnung der Spots teilweise visuell durch den Anwender getroffen werden. Dieser fehlerbehaftete Prozess entfällt beim *Geniom one*. Grund dafür ist, dass sich die Synthese der Oligonukleotide genau auf den Bereich beschränkt, der durch das Mikrospiegelsystem belichtet wird. Dementsprechend ist die Spotgeometrie quadratisch und die Anordnung durch die Lage der Mikrospiegel eindeutig festgelegt. Aufgrund dessen zeichnet sich die *Geniom one* Analyse durch eine hohe Reproduzierbarkeit der Daten aus.

Zur Beurteilung der Qualität der *Geniom one* Analyse wurden verschiedenen Überprüfungen durchgeführt. Als erstes ist die Reproduktionsfähigkeit der Rohdaten auf jedem Chip begutachtet worden, um die Güte der jeweiligen Hybridisierung einzuschätzen. Bei fast allen Chips stimmten die Werte der technischen Wiederholungen vollkommen überein. Folglich konnte von einer hohen Hybridisierungsqualität ausgegangen werden. Ähnlich gute Repro-

duktionswerte in einer *Geniom one* Analyse konnten auch Baum et al. [2003] bei Untersuchungen von mit Kälteschock behandelten Hefen feststellen. Des Weiteren sollte eine Aussage über die Vergleichbarkeit von Chips getroffen werden. Dazu wurde die biologische Wiederholung der 90min Probe von Börner auf ‚Chip b‘ mit der Ursprungsprobe auf ‚Chip a‘ verglichen. Eine 70%-ige Übereinstimmung der regulierten Gene in den beiden Proben wies eine gute Vergleichbarkeit der Chips nach. Außerdem wurde für alle sechs Chips dieselbe Kontrollprobe von Börner und Riesling verwendet. Die abschließende Gegenüberstellung der Werte ließ auch hier eine hohe Übereinstimmung erkennen. Es darf bei der Beurteilung der Ergebnisse jedoch nicht unerwähnt bleiben, dass unterschiedlich starke Regulationen der Gene in verschiedenen Proben in Einzelfällen auf die nicht hundertprozentige Affinität der Chips zurück zu führen sein könnte.

Bei Sichtung der Analyseergebnisse fielen Unterschiede in der Menge der regulierten Gene zwischen Börner und Riesling auf. Die durchschnittliche Summe der differentiell exprimierten Gene pro Chip ließ erkennen, dass bei Börner etwa dreimal mehr Gene eine Regulation auf die IES Behandlung hin zeigten als bei Riesling. Dies könnte im Zusammenhang mit der differentiellen Reaktion der beiden Sorten nach einem Reblausbefall stehen. Ferner war festzustellen, dass besonders bei Börner schon eine 7minütige Induktionszeit nach der IES Applikation ausreicht, um bei einer Reihe von Genen eine Regulation hervor zu rufen. Dies steht vermutlich in Verbindung mit der hohen Konzentration der IES-Lösung von ca. 5,7mM. Es könnte aber auch sein, dass der IES Reiz eine sehr schnelle Abwehrreaktion in den Zellen induziert.

Durch die *Geniom one* Analyse wird neben der Anzahl der regulierten Gene die Stärke und Richtung der Expression sichtbar. So konnten die regulierten Gene in den verschiedenen Proben von Börner und Riesling mengenmäßig ermittelt werden und außerdem die Ausprägung der Hoch- oder Herunterregulation. Dadurch ließen sich Rückschlüsse auf die mögliche Funktion der Gene im Resistenzmechanismus in Börner ziehen, die im gesonderten Kapitel 4.2 diskutiert werden sollen.

Eine Unstimmigkeit in der Analyse wurde auf ‚Chip b‘ bemerkt. Bei der 90min Probe von SO4 zeigten sich keine regulierten Gene. Dies ist eventuell auf ein technisches Problem zurück zu führen. Aufgrund der Resultate von Börner und Riesling ist es unwahrscheinlich, dass SO4 keine Reaktionen auf die IES Behandlung zeigt, zumal mit Hilfe der RT-PCR und derselben RNA Probe sehr deutliche Regulationen in den IES induzierten Proben von SO4 gefunden werden konnten. Worin das Problem sonst bestanden haben könnte, lässt sich also nur schwer einschätzen. Möglicherweise lag es auch an der schwachen technischen Repro-

duzierbarkeit der S 90' Probe verglichen mit den übrigen Proben. Auf eine Wiederholung des Versuchansatzes wurde trotzdem verzichtet. Dafür gab es zwei Gründe. Erstens schien Riesling als reblausanfälliger Edelreis eine bessere Vergleichssorte zu Börner zu sein als die reblautolerante Sorte SO4. Zweitens wurde die SO4 Proben in die Validierung der *Geniom one* Ergebnisse mit der RT-PCR einbezogen.

4.1.3 RT-PCR

Die Methode der RT-PCR wurde eingesetzt, um die signifikant veränderten Gene, die sich nach Auswertung der *Geniom one* Analyse ergaben, zu verifizieren. Zudem wurde mit SO4 eine dritte Sorte sowie mit den 150min Proben eine sechste IES Induktionszeit hinzugenommen. Insgesamt wurde das Expressionsverhalten von 27 Genen an sieben Wurzelproben für alle drei Sorten, also an 21 verschiedenen Proben getestet. Damit konnten die Reaktionen einer reblausresistenten, -toleranten und -anfälligen Sorte auf sechs verschiedene IES Induktionszeiten analysiert werden. Für einen Vergleich des Expressionsverhalten der Gene zwischen Börner, SO4 und Riesling war es notwendig, die spezifische Sequenz eines jeden Gens für jede Sorte zu bestimmen. Eine komparative Analyse der ermittelten Sequenzen zeigte – von einem Ausreißer bei 76% abgesehen – Homologien zwischen 95% und 100%. Mit diesem Ergebnis war sichergestellt, dass in den drei Sorten jeweils dasselbe Gen amplifiziert wurde.

Die für die Interpretation der Resultate notwendige Normalisierung bedurfte einer Ermittlung geeigneter HK. Die Expressionslevel der HK sollten bei verschiedenen experimentellen Konditionen konstant bleiben [Thellin et al., 1999]. Zeigen die ausgewählten HK Schwankungen zwischen den Proben, können Unterschiede der zu untersuchenden Gene nicht zu Tage treten [Bustin, 2000]. Des Weiteren wird eine Kombination aus mehreren HK für die Berechnung der Expressionsstärke empfohlen [Vandesompele et al., 2002; Gilsbach et al., 2006].

Die Wahl der HK fiel auf (1) Actin, (2) GAPDH, (3) β -tubulin und (4) EF. Während die drei erstgenannten gängige HK in humanen und in pflanzlichen Studien darstellen, wird der EF vorrangig bei Experimenten an Pflanzen verwendet. Mit Hilfe der *geNorm* Methode [Vandesompele et al., 2002] wurden alle vier HK nach ihrer Expressionsstabilität innerhalb des gewählten Probenpanels, also der sieben verwendeten Proben pro Sorte, getestet. Danach war β -tubulin, GAPDH und auch EF für eine Normalisierung geeignet. (1) Actin, verantwortlich für die Struktur und Kinetik des Zytoskeletts, hingegen erwies sich als nicht zielführend. Es ist zwar das am häufigsten verwendete HK in der RT-PCR, aber in der vergan-

gen Zeit konnte des Öfteren bewiesen werden, dass sich Actin nicht immer als HK eignet. In einer Studie an humanen Zellen wurde beispielsweise gezeigt, dass es zu verfälschten Ergebnissen kommt, wenn Actin als Normalisierer genutzt wird [Glare et al., 2002]. Als Ursache dafür gilt, dass nicht das zu untersuchende Gen, sondern das Actin Veränderungen im Probenpanel aufwies. Wie erwähnt, konnte eine Instabilität dieses HK auch bei den Untersuchungen für diese Arbeit beobachtet werden. (2) Neben Actin wird GAPDH regelmäßig als HK gebraucht. Es ist ein wichtiges Enzym des Glykolyseweges. Wie für Actin finden sich auch für GAPDH in der Fachliteratur zunehmend Hinweise auf eine mangelnde Eignung als internes Kontrollgen [z.B. Glare et al., 2002]. Dies beschränkt sich jedoch hauptsächlich auf den tierischen und den humanen Sektor. In pflanzlichen Studien erwies sich das GAPDH als beständiger HK. So zeigten Jain et al. [2006], dass das Expressionsniveau von GAPDH nach verschiedenen chemischen Behandlungen am Reis stabil bleibt. Die *geNorm* Analyse des GAPDH ließ in dieser Arbeit ebenso eine gleichmäßige Expression über alle Proben hinweg erkennen, egal ob mit IES behandelt oder unbehandelt. (3) Ähnlich verhielt es sich mit β -tubulin. Es ist wie das Actin für die Struktur und Kinetik des Zytoskeletts zuständig und ein gleichfalls häufig in Gebrauch genommener HK in der RT-PCR. Das besagte stabile Expressionsverhalten konnte für das β -tubulin besonders bei abiotischem Stress nachgewiesen werden. Bei einer Validierung mittels der *geNorm* Analyse von acht HK in Mehltau infizierten Kartoffelproben zeigten β -tubulin und der in weiterer Folge näherer betrachtete EF die gleichmäßigste Expression [Nicot et al., 2005]. (4) EF wird besonders im pflanzlichen Bereich zur internen Kontrolle in RT-PCR Untersuchungen eingesetzt. Er katalysiert den ersten Schritt der Proteinsynthese [Stürzenbaum und Kille, 2001]. Weiterhin zeichnet er sich durch eine stabile Expression bei verschiedensten Umweltkonditionen aus. So stellten Dean et al. [2002] anhand eines mit dem Pilz *Colletotrichum destructivum* infizierten Tabaks heraus, dass das Expressionsniveau der EF im Infektionsverlauf konstant bleibt. Vergleichbares ist während abiotischen Stressbedingungen an der Kartoffel [Nicot et al., 2005] und bei IES Behandlungen am Reis [Jain et al., 2006] demonstriert worden. Wie Jain et al. [2006] außerdem erarbeiten konnten, scheint bei Einsatz des EF ein einziger HK für eine akkurate Normalisierung ausreichend zu sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse empirisch bestätigt werden. Schließlich änderten sich die normalisierten Werte dann besonders stark, wenn EF als HK herausgelassen wurde. Umgekehrt blieben die Werte bei Ausschluss von GAPDH oder von β -tubulin annähernd stabil. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass eine präzise Normalisierung erst durch die Kombination der drei gewählten und mit der *geNorm* Analyse validierten HK ermöglicht wurde.

Insgesamt bleibt wie folgt festzuhalten: Die RT-PCR Analysen ließen teils sehr deutliche Unterschiede zwischen den Proben und Sorten erkennen. Häufig war sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Börner Wurzeln eine stärkere Regulation der Gene zu beobachten als in den Vergleichssorten SO4 und Riesling. Diese Erkenntnisse kritisch zu hinterfragen, ist Kernaufgabe von Kapitel 4.2. Zunächst aber sollen im folgenden Unterabschnitt 4.1.4 die RT-PCR mit der *Geniom one* Analyse vergleichend betrachtet werden.

4.1.4 Vergleich der Methoden

DNA Microarrays dienen als Werkzeuge, um funktionelle Zusammenhänge auf der mRNA Ebene zwischen einer Vielzahl von Genen zu untersuchen. Die Array Ergebnisse müssen jedoch aufgrund der sequenzabhängigen Hybridisierungseigenschaften und den Variationen, die den Hybridisierungsreaktionen zugrunde liegen, nur als semi-quantitativ angesehen werden [Pfaffl und Bruckmaier, 2002]. Daher hat sich als optimale Ergänzung der signifikanten Microarray Ergebnisse die Verifikation der Expressionsdaten mit der quantitativen RT-PCR etabliert. Durch das Einsetzen von spezifischen Primern und das Einstellen individueller Schmelztemperaturen in der RT-PCR wird eine Spezifität erreicht, die bei den Microarrays so nicht gegeben ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte die RT-PCR die Ergebnisse der *Geniom one* Analyse in ausnahmslos allen Fällen bestätigen. Jedoch ließ sich oft nicht nur in den Proben eine Regulation erkennen, in denen es die *Geniom one* Analyse angezeigt hatte, sondern auch in weiteren Proben. Eine Erklärung dafür könnte die im Vergleich höhere Sensitivität der RT-PCR sein. Ferner fiel auf, dass der *fold change* in der RT-PCR häufig höher ausfiel als bei dem entsprechenden Gen in der *Geniom one* Analyse. Diese Beobachtung konnte auch in diversen Studien gemacht werden, die einen Vergleich von Daten der *Geniom one* bzw. Microarray Analyse und der RT-PCR anstellten [z.B. Baum et al., 2003; Mangalathu et al., 2001]. Letztzitierte Autorengruppe vermutete, dass hohe Homologien zwischen Mitgliedern von Genfamilien, die auf einen Microarraychip hybridisiert wurden, der Grund für die Diskrepanz der Normalisierungswerte sein könnten. Es ist also denkbar, dass die eigentlichen Expressionsunterschiede für ein spezifisches Mitglied einer Genfamilie unter Umständen durch Kreuzhybridisierungen in den Microarrays verdeckt wurden.

Während die Vorteile der RT-PCR bei der Sensitivität und auch im Quantifizierungsbereich liegen, steht bei der *Geniom one* Analyse der hohe Durchsatz in kürzester Zeit im Vordergrund. Ein Vorzug beider Verfahren ist die geringe Menge an benötigter RNA. Besonders im

vorliegenden Versuchsaufbau, indem eine Vielzahl von Seitenwurzeln für jede Probe gesammelt werden musste, war es von großer Bedeutung, möglichst viele Versuchsreihen mit einer RNA Probe durchführen zu können.

Nachteilig bei der RT-PCR wirkt sich ein umfangreiches Probenpanel aus. Wird die Expression einer größeren Anzahl von Genen in einer Vielzahl von Proben analysiert, potenziert sich die Zahl der Reaktionsansätze schnell. Nachteil der *Geniom one* Analyse und auch der Microarray Analysen generell ist, dass innerhalb einer Probe keine Schlüsse zu den Intensitäten zwischen verschiedenen Genen gezogen werden können. Grund dafür ist, dass die Affinität der markierten mRNA zu den dazugehörigen Sonden unterschiedlich ist. Je höher der GC-Gehalt einer Sequenz ist, desto intensiver ist die Bindung und je stärker die Bindung an die Sonde, desto stärker ist das Signal. Bei Sonden mit schwachem Signal kann es zwar sein, dass das Gen auch nur schwach exprimiert ist. Es könnte aber auch heißen, dass die Bindung nicht so stark ist. Ein Vergleich des Expressionsniveau verschiedener mRNA innerhalb einer Probe ist nur mit Verfahren möglich, in denen für jede Sonde bzw. jedes Oligonukleotid individuelle Bedingungen (Pufferstärke, Temperatur usw.) eingestellt werden können. Dazu zählt beispielsweise die RT-PCR, mit deren Hilfe die Ergebnisse der *Geniom one* Analyse verifiziert und ergänzt wurden.

Abschließend kann gesagt werden, dass die Verknüpfung beider Methoden ein geeignetes Verfahren ist, um Gene zu identifizieren, die für die Reblausresistenz in Börner verantwortlich sein könnten.

4.2 Funktionen der Gene bei der HR in Börner

In weiterer Folge stehen zwei Fragestellungen im Vordergrund. Einmal sollen die Gene, die bei der *Geniom one* Analyse gefunden und dann in der RT-PCR überprüft wurden, aus Gründen der Systematisierung gruppiert und so auf ihre generellen Funktionen hin näher betrachtet werden. Zum zweiten geht es in diesem Abschnitt 4.2 darum, die Rolle der Gene bei der HR in Börner zu hinterfragen. Ist diese verstanden, wird in einem gesonderten Abschnitt 4.3 das Zusammenspiel der hier betrachteten Gene für die Reblausresistenz diskutiert.

4.2.1 Auxintransport und P-Glykoproteine

Im Zytoplasma liegt IES stets in fettlöslicher, anionischer Form vor. Die Verteilung von Auxin erfolgt in Pflanzen polar durch Diffusion und/oder In- und Efflux Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind. Dazu zählen die PGP, die PIN (*pin-formed*) sowie die AUX/LAX Familien. Während die PINs und PGP1/PGP19 Auxin aus den Zellen exportie-

ren, funktionieren die AUX/LAX Proteine und das PGP4 als Importer [Gälweiler et al., 1998; Geisler et al. 2003; Parry et al., 2001; Terasaka et al., 2005]. Die genannten Proteine sind in Abbildung 4.1 in vier unterschiedlichen Farben dargestellt, wobei die rot markierten den Untersuchungsgegenstand kennzeichnen. Die zusätzlich eingezeichneten Pfeile weisen auf die Richtung hin, in die das Auxin – bekanntlich als IES geführt – transportiert wird.

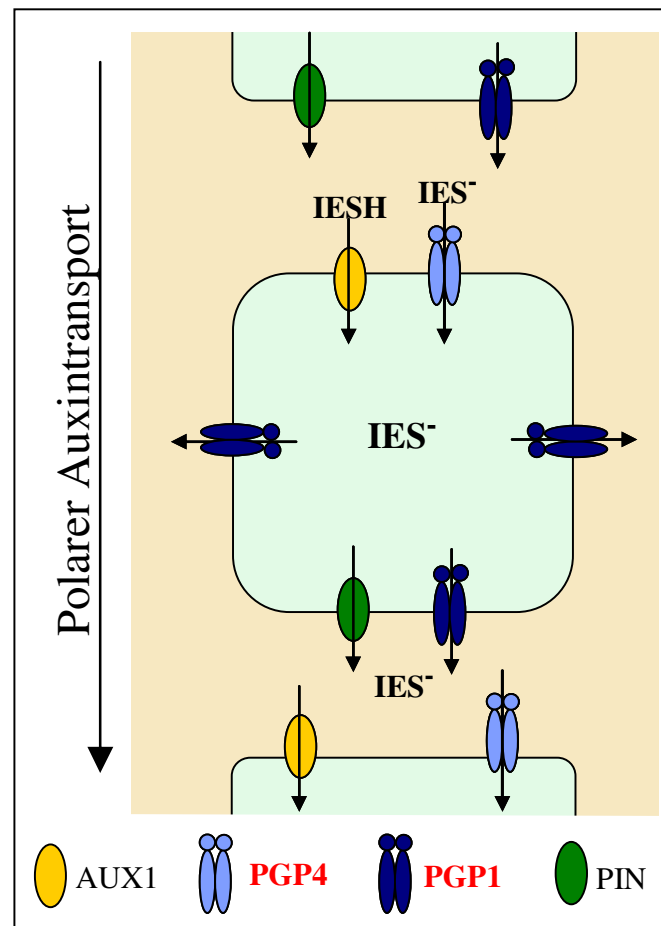


Abbildung 4.1: Zelluläres Modell des polaren Auxintransports

(Quelle: Erstellt nach den Literaturangaben im Fließtext)

Es ist von hohem Interesse zu verstehen, wie Zellen auf eine Behandlung mit IES reagieren. Genau aus diesem Grund sollte das Expressionsverhalten eines Auxinimporters, nämlich vom PGP4, und das eines Auxinexporters, genauer dem PGP1, nach der IES Behandlung der Rebwurzeln untersucht werden. PGP4 und PGP1 wiesen nach der IES Induktion in Börner Wurzeln eine ausgeprägte Hochregulation auf. Diese war in den Sorten SO4 und Riesling praktisch nicht nachweisbar.

Die PGP sind eine Untergruppe der *ATP-binding cassette*- (ABC-) Transporter Familie. Diese umfasst mehrere hundert Transportproteine und ist in den verschiedensten Organismen, von den Bakterien bis hin zum Menschen, vorhanden [Holland et al., 2003]. Obwohl jedes ABC-Protein auf ein spezifisches Substrat oder auf eine Gruppe zusammengehöriger Substrate spezialisiert ist, wird eine Vielzahl von Substanzen transportiert, die von Ionen, Zucker und Aminosäuren über Phospholipide, Peptide und Polysaccharide bis hin zu Proteinen reicht [Holland et al., 2003]. Alle ABC-Transporter haben eine identische Grundstruktur. Sie sind in zwei homologe Hälften aufgeteilt, von denen jede eine Nukleotid-Bindungsregion und sechs membrandurchspannende α -Helices, die Transmembrandomäne, beinhalten. Letztere bildet einen Kanal für die Substanzen, die durch die Membran transportiert werden. Während in Arabidopsis über 120 ABC Transporter und davon 22 als Mitglieder der PGP Subfamilie identifiziert werden konnten [Martinoia, et al. 2002; Sanchez-Fernandez et al., 2001; Theodoulou, 2000], sind beispielsweise im Menschen nur 10 PGP bekannt [Ambudkar et al., 2003]. Die humanen PGP transportieren Xenobiotika aus der Zelle und tragen so zur *Multi-Drug-Resistance* gegen Zytostatika in Tumorzellen bei [Holland et al., 2003]. In Pflanzen scheinen die PGP hauptsächlich in den Transport von Auxin involviert zu sein [Geisler et al. 2003; Noh et al., 2001; Terasaka et al., 2005]. Verschiedene Studien konnten feststellen, dass Defekte in den Arabidopsis AtPGP1 und AtPGP19 zu einem Zwergwuchs und verminderten polaren Auxintransport in Arabidopsis, Mais und Hirse führen [Geisler et al. 2003, 2005; Noh et al., 2001; Terasaka et al., 2005]. Geisler und Murphy [2006] konnten zeigen, dass AtPGP1 den aktiven Export von IAA, dem synthetischen Auxin 1-NAA und oxidativen IAA Produkten auf direktem Wege katalysiert (vgl. Abb. 4.1). Weiterhin wiesen sie nach, dass AtPGP1 eine non-polare Expression in kleinen, meristematischen Zellen der Triebe und der Wurzelspitzen und eine polare Expression in den Zellen der Elongationszone darüber aufweist. Dem PGP4 Protein konnte eine Funktion als Importer von Auxin zugesprochen werden [Terasaka et al., 2005], wie obenstehende Abbildung 4.1 deutlich macht. Das PGP4 weist eine apolare Lokalisation in der Plasmamembran der Wurzelspitze und eine polare Lokalisation in den lokal darüber gelegenen Geweben auf [Terasaka et al., 2005].

Die Proteine der PIN Familie haben als Membranproteine Ähnlichkeiten zu bakteriellen Transportproteinen und den ABC-Transportern [Palme und Gälweiler, 1999]. In Arabidopsis konnten acht Mitglieder identifiziert werden. Sie sind polar in der Zelle lokalisiert und vermitteln den polaren Efflux von Auxin [Gälweiler et al., 1998; Luschnig et al., 1998] (vgl. Abb. 4.1). Bei den AUX/LAX Proteinen handelt es sich um ein Membranprotein mit Homologie zu pflanzlichen Aminosäurepermeasen (*amino acid permease-like protein*) [Blakeslee

et al., 2005; Parry et al., 2001]. Aux1 Verlustmutanten zeigen phänotypische Merkmale, die auch beobachtet werden können, wenn Wildtyp Pflanzen mit chemischen Inhibitoren des Auxininflux behandelt werden [Parry et al., 2001]. Folglich hat der Autor den AUX Proteinen eine Rolle in der Auxinaufnahme in die Zelle zugesprochen.

Die Auxinverteilung läuft nicht in allen Zellen nach dem gleichen Prinzip ab. In vollentwickelten Geweben, in den die Zellen länger sind und eine Re-Diffusion kein limitierender Faktor ist, betritt Auxin die Zelle durch Diffusion oder durch AUX/PGP4 und verlässt sie durch PIN. In meristematischen Geweben, wo die Zellen kleiner sind und die Auxinkonzentration höher, besagen mathematische Modelle, dass die Re-Diffusion die Auxin Verteilung inhibieren würde [Kramer, 2004]. In diesen kleineren Zellen könnten asymmetrisch verteilte, energieabhängige Transporter, wie das PGP1, für eine polare Auxinverteilung essentiell sein [Luschnig, 2002, Santelia, 2005]. Es existieren Modelle, in denen die genannten Auxintransporter nicht in allen Zellen unabhängig, sondern in Synergie miteinander agieren. So kann es zur Bildung eines Import- und Efflux-Komplexes zwischen AUX/PGP4 und PIN/PGP1 kommen, wodurch der Auxintransport verstärkt wird [Luschnig, 2002]. Eine Erklärung für die Bildung des ersten Komplexes könnte in der Struktur des PGP4 gefunden werden. Dieser Transporter weist nur 10 statt der bei den PGP sonst üblichen 12 transmembranen α -Helices auf. Auch im prokaryotischem System besitzen ABC-Transporter, die in den Import involviert sind, nur vier bis zehn transmembrane α -Helices. Man spricht dann von sogenannten Halbtransportern. Dies resultiert aus einer Ko-Expression mit anderen Halbtransportern [Higgins und Gottesmann, 1992]. Ähnlich könnte es bei der Interaktion von PGP4 mit AUX der Fall sein, da bei den AUX wohl ebenfalls nur 10 transmembrane α -Helices zu finden sind.

Die Ergebnisse der RT-PCR zeigen, dass das PGP1 nicht nur eine ausgeprägte Hochregulation in den ersten 30min nach der IES Behandlung aufwies, sondern nach 60min und 90min eine signifikante Herunterregulation im Vergleich zur Kontrolle. Zwei Erklärungen sind dafür möglich. Die erste liegt in der Interaktion von PGP1 mit Flavonoiden. Flavonoide, wie beispielsweise Quercetin und Kaempferol, sind endogene pflanzliche Komponenten, die wegen ihrer Aktivität als Antioxidantien und Kinase Inhibitoren umfangreich untersucht wurden (vgl. Kap. 4.2.3). Sie sind auch dafür bekannt, mit den ATP-Bindungsstellen von verschiedenen ATP verbrauchenden Enzymen zu binden und sie dadurch sie inaktivieren [Conseil, 1998]. Eine Studie von Peer et al. [2004] brachte hervor, dass bei steigender Auxinkonzentration Quercetin an der Wurzelspitze akkumuliert. Weiterhin konnte gezeigt wer-

den, dass AtPGP1 und AtPGP4 Quercetin binden, was die Inaktivierung der Transporter zur Folge hat [Brown et al. 2001; Conseil et al., 1998; Murphy et al., 2000]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersuchte CHS (fördert die Produktion von Flavonoiden, siehe Kap. 4.2.3), zeigte genau in den Proben eine signifikante Hochregulation, in denen das PGP1 herunter reguliert wurde und andersherum. So könnte die IES Behandlung in Börner zunächst zu einer erhöhten Aufnahme und Abgabe von Auxin geführt haben, die aus einer stärkeren Expression der PGP resultieren. Mit steigender Flavonoidakkumulation, bedingt durch die Hochregulation der CHS, könnte es zu einer Bindung der Flavonoide an das PGP1 und anschließend zu dessen Hemmung gekommen sein. Die Folge wäre eine verstärkte IES Akkumulation in der Zelle. Begünstigt würde dieser Zustand durch die bestehende Hochregulation des Auxin Importers PGP4.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die auffällige Hochregulation der PGP in Börner verglichen mit SO4 und Riesling nach der IES Behandlung ein Zeichen dafür sein könnte, dass Börner besonders sensibel und effizient auf einen IES Reiz reagiert. Die durch IES aktivierten Abwehrreaktionen laufen offensichtlich schneller und wirkungsvoller ab als bei SO4 und Riesling.

4.2.2 Ethylen in der Pathogenabwehr

Bei den gemachten Analysen wurden vier Gene gefunden, die sowohl im Ethylenmetabolismus als auch in der Ethylen bedingten Pathogenabwehr bedeutsam sind. Dabei handelt es sich um den ETR, den ERF, die LOX und die MS. Diese werden nun in der genannten Reihenfolge zuerst kurz beschrieben und danach hinsichtlich ihres möglichen Einflusses auf die HR in Börner analysiert.

ETR und ERF

Der Kohlenwasserstoff Ethylen (C_2H_4) ist ein endogener Regulator für Stressantworten und entwicklungsbedingte Adaptionen in höheren Pflanzen. Abhängig vom Typ der Pflanze, der Art des Gewebes und/oder der Entwicklungsstufe, kann Ethylen eine Vielzahl von Prozessen regulieren. Darin eingeschlossen sind die Fruchtreife, die Blüten und die Blatt Seneszenz sowie die Geschlechtsbestimmung [Abeles et al., 1992]. Darüber hinaus hat das Gas eine entscheidende Bedeutung in abiotischen und biotischen Stressantworten. Dazu zählen die Pathogen induzierte systemische Aktivierung von Abwehrgenen und die Wirkung als Signalkomponente in der Wundantwort. Das Ethylen übt zudem Einfluss auf die PCD Aktivierung aus. Da das Hormon an Seneszenzprozessen beteiligt ist, ist eine solche Funktion nach-

vollziehbar. De Jong et al. [2002] haben Tomatenzellen mit dem PCD induzierenden Topoisomerase-1-Inhibitor, Camptothecin, behandelt. Dadurch konnten sie zeigen, dass es bei einer Blockierung der Ethylen-Synthese und der Ethylen-Rezeptorerkennung zu reduzierten PCD Symptomen kommt. Dagegen scheint exogen zugeführtes Ethylen den PCD zu stimulieren. Ähnliche Beobachtungen konnten von den Autoren bei Pathogen induziertem Zelltod gemacht werden. Das Pflanzenhormon alleine ist nicht in der Lage, den PCD auszulösen. Es scheint jedoch die Induktion des Zelltodprozesses durch H_2O_2 zu potenzieren. Somit ist davon auszugehen, dass die Signaltransduktionskette, die zur Aktivierung der H_2O_2 generierenden NADPH-Oxidase führt, durch Ethylen reguliert wird. Weiterhin wird eine Funktion des Hormons in der Blockierung ROS inaktivierender Enzyme, wie z.B. der Catalase, vermutet.

Die Aktivierung von Abwehrprozessen durch Ethylen bedarf einer komplexen Regulation, wie sie Abbildung 4.2 schematisch wieder gibt. Prozessauslöser ist die Ethylen Biosynthese. Ihr folgt der Schritt der Erkennung des Hormons, bevor die Zellen darauf reagieren. Der einleitende Syntheseweg des Pflanzenhormons erfolgt aus dem Methioninzyklus heraus. Dabei katalysiert die S-Adenosyl-L-Methionin (SAM)-Synthase SAM aus Methionin. Das SAM wiederum wird durch die 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure (ACC)-Synthase in zwei Teile, 5-Methylthioadenosin und ACC, gespalten. Die Katalyse von ACC zu ET mittels der ACC-Oxidase bildet den Abschluss der Ethylenproduktion. Maßgeblich beeinflusst wird die Ethylen Biosynthese durch das Auxin. Yoshii und Imaseki [1981] konnten in Versuchen mit Mungbohnen zeigen, dass sowohl die Synthese als auch die Akkumulation von ACC abhängig von der IES Konzentration in der Zelle ist. Der ACC Gehalt wiederum reguliert die Rate der Ethylenproduktion. Yu und Yang [1979] bewiesen außerdem, dass auch die ACC-Synthase durch IES stimuliert und gleichzeitig aktiviert wird (vgl. Abb. 4.2). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte IES Behandlung an Rebwurzeln könnte somit einen entscheidenden Einfluss auf die Synthese der ACC-Synthase, der ACC und letztendlich des Ethylens genommen haben. Diese Annahme wird bei der Diskussion der weiteren untersuchten Gene berücksichtigt.

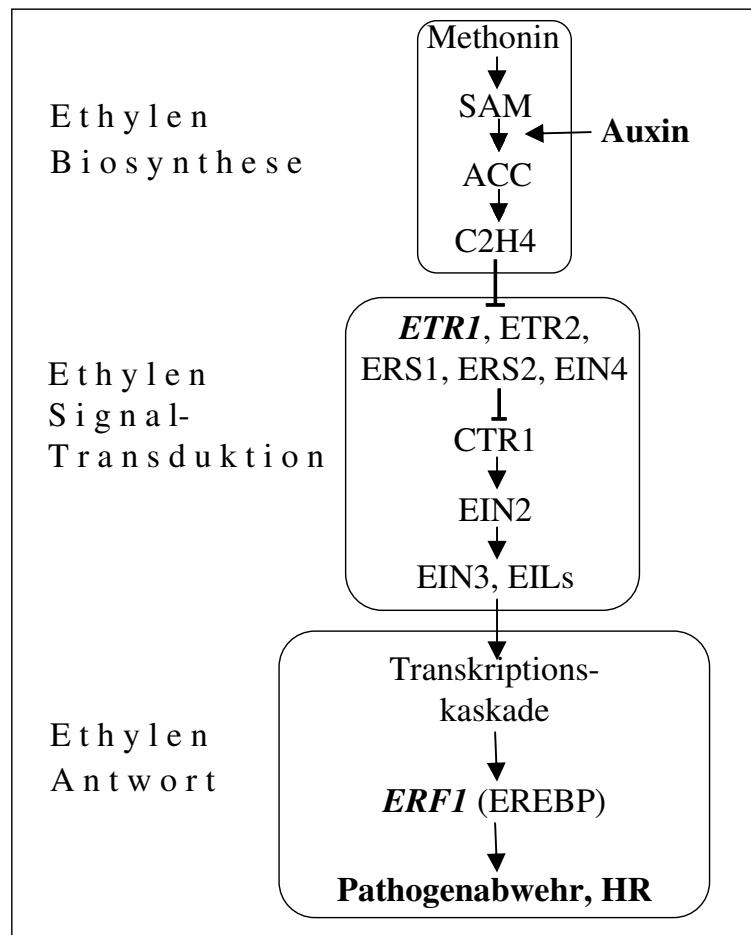


Abbildung 4.2: Schema der Ethylenbiosynthese, Signaltransduktion und Pathogen bedingte Abwehrantwort
(Quelle: Erstellt nach den Literaturangaben im Fließtext)

Die ET Erkennung erfolgt über eine membrangebundene Rezeptorfamilie. Insgesamt sind fünf **ETR** bekannt: *ETR1*, *ETR2*, *ERS1* (*ethylene response sensor 1*), *ERS2* sowie *EIN4* (*ethylene insensitive 4*). Die Carboxyl-terminale Domäne dieser Proteine zeigen Homologien zu den bakteriellen Zwei-Komponenten-Histidinkinase-Rezeptoren, welche in Pathogenabwehrantworten in Bakterien weitläufig involviert sind. Die Amino-terminalen Domänen sind sehr ähnlich und besitzen die Fähigkeit, Ethylen zu binden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Expressionsverhalten des *ETR1* nach einer IES Behandlung der Wurzeln von Börner, SO4 und Riesling untersucht. *ETR1* ist anders als die meisten Rezeptoren im Endoplasmatischen Retikulum und nicht in der Plasmamembran lokalisiert [Chen et al., 2002]. Die Ethylenbindung an den Rezeptor erfolgt über einen Kupferfaktor, welcher wahrscheinlich von dem Kupfertransporter *RAN1* (*responsive to antagonist 1*) freigesetzt wird. Das *RAN1* Protein ist in intrazellulären Membranen lokalisiert und bewirkt die Freisetzung von Kupferionen aus der Zelle. Studien mit *ran1* Arabidopsis Verlustmutanten zeigten rosettige Phänotypen.

pen, was auf eine gestörte Ethylen Rezeptorfunktion zurückgeführt wurde [Woeste und Kieber, 2000]. Eine Besonderheit der Ethylenrezeptoren ist ihre Eigenschaft, den Ethylensignalweg negativ zu regulieren [Hua und Meyerowitz, 1998]. Der Rezeptor kann dabei zwei Zustandformen annehmen. In Abwesenheit von Ethylen ist er aktiv, wodurch eine Ethylenantwort unterdrückt wird. Eine Bindung des Hormons hat jedoch eine Inaktivierung der Rezeptorfunktion sowie eine Induktion der Ethylenantwort zur Folge (vgl. Abb. 4.2). Im zweiten Fall wird das Ethylen Signal an die Serin/Threonin Kinase CTR1 (*constitutive triple-response* 1) weitergegeben. *Ctr1* Verlustmutanten zeigten eine erhöhte Ethylenantwort, weswegen davon ausgegangen wird, dass das CTR1 einen negativen Regulator der Ethylenantwort darstellt. Die CTR1 Proteinkinase hat hohe Sequenzhomologien mit der Familie der Raf Proteinkinasen. Es wird daher vermutet, dass die CTR1 als MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) in einem MAP Kinase Modul fungieren. In Abwesenheit von aktivierter CTR1 wird die Aktivierung des Membranproteins EIN2 ermöglicht, das eine Ähnlichkeit mit den Nramp Metallionen Transportern aufweist. Über einen noch nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus wird durch das aktivierte EIN2 der Transkriptionsfaktor EIN3 stabilisiert. Dieser ist ein positiver Regulator der Ethylenantwort und induziert wiederum die Expression des **ERF**, einen weiteren Transkriptionsfaktor [Solano et al., 1998].

Der ERF zeigte in den *Geniom one* und RT-PCR Analysen positive Regulationen in einigen IES behandelten Proben von Börner, SO4 und Riesling. Diese Auffälligkeit war in Börner besonders stark ausgeprägt. Bei dem ERF handelt es sich um ein Mitglied einer großen Familie von pflanzenspezifischen Transkriptionsfaktoren, die auch als AP2/EREBP bezeichnet werden. AP2/EREBP wurden in ihrer Eigenschaft identifiziert, an eine GCC-Box zu binden [Hao et al., 1998]. Die GCC-Box ist ein DNA Motiv (AGCCGCC), das sich in den Promotoren diverser Abwehr assoziierter, meist durch Ethylen und JA induzierter Gene befindet. Auch in Genen, die in der *Geniom one* Analyse als reguliert auftraten, konnte das genannte DNA Motiv gefunden werden. Dabei handelt es sich um TLP, PRP1, PAL und WRKY4. Des Weiteren sind GCC-Boxen in Defensinen, Chitinasen, β -Glucanasen und anderen PR-Genen bekannt. Durch die Aktivierung des ERF und dessen Bindung an die GCC-Box der Abwehrgene wird die Genexpression veranlasst. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass der ERF die Resistenz beispielsweise in Arabidopsis gegen *Botrytis cinerea* und *Plectosphaerella cucumerina* erhöht [Berrocal-Lobo et al., 2002]. Neben der beschriebenen Aktivierung des ERF durch Ethylen kann eine Induktion durch JA erfolgen. JA wird durch die LOX synthetisiert, ein Enzym, dass in den durchgeführten Analysen ebenfalls besonders in

den IES induzierten Börner Wurzeln hoch reguliert worden ist. Aufgrund der Aktivierung der LOX in den Börner Wurzeln kann von einer Akkumulation der JA ausgegangen werden. Zwischen Ethylen und JA kommt es im Verlauf einer Abwehrantwort zu einem komplexen Zusammenspiel. Auf der einen Seite kann eine negative Interaktion zwischen den Hormonen erfolgen. Beispielsweise kommt es in Arabidopsis nach einer Verwundung zu einer Synthese von Ethylen und JA. Dabei induziert JA systemisch die Expression von Wundgenen, während Ethylen die Expression dieser Gene an der Wundstelle selbst unterdrückt. Diese negative Interaktion der beiden Hormone garantiert eine korrekte Dosierung der systemisch induzierten Gene [Rojo et al., 1999]. Auf der anderen Seite sind positive Interaktionen zwischen Ethylen und JA bekannt. So kann der *proteinase inhibitor*, ein wichtiges Gen der Wundbildung in der Tomate, nur in einer Kombination der beiden Hormone induziert werden. Lorenzo et al. [2003] demonstrierten, dass der ERF nicht nur eine nachgeschaltete Komponente des Ethylen, sondern auch des JA Signalweges ist. Eine Blockierung einer der beiden Signalketten verhindert die Induktion des Transkriptionsfaktors. Somit sind beide Wege für eine Aktivierung des ERF und damit für die pflanzliche Resistenz gegen Pathogene notwendig.

Da in SO4 und im Riesling der ETR, der ERF und die LOX jeweils geringer durch IES induziert wurde als in Börner, ist eine Mitwirkung dieser drei Faktoren in der Börnerspezifischen HR wahrscheinlich. Die Induktion des Resistenzmechanismus in Börner könnte dabei einem ähnlichen Prinzip wie dem hier beispielhaft beschriebenen gefolgt sein. Danach könnte die applizierte IES zu einer *de novo* Synthese von Ethylen geführt haben, das sich dann vermehrt an den ETR gebunden hätte. Der vermutete Ursache-Wirkungs-Zusammenhang wäre ein Erklärungsansatz für die gesteigerte Anzahl an ETR, wie sie bei den durchgeführten Analysen zu beobachten war. Die Inaktivierung der ETR und die damit verbundene Signalweiterleitung könnte Grund dafür sein, dass der ERF aktiviert und in seiner Expression gesteigert wurde. Die Folge wäre eine Induktion von Abwehrgenen. Die Aktivierung des ERF dürfte dabei aber gemeinsam mit der JA erfolgt sein, wenn man annimmt, dass sie von der hoch regulierten LOX zuvor synthetisiert wurde. Bekannte Funktionen der LOX und ihre weitere Bedeutung für die HR in Börner sollen nachfolgend diskutiert werden.

LOX

LOX sind ubiquitär im Pflanzen- und Tierreich vorkommende nichthämeisenhaltige Dioxygenasen. Sie sind im Zytoplasma lokalisiert und katalysieren die Oxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit cis, cis-1,4-Pentadienstruktur [Siedow 1991]. Dabei kommt es zur Bildung von Oxylipinen, wozu alle Oxidationsprodukte von mehrfach unge-

sättigten Fettsäuren gezählt werden [Grechkin, 1998]. Die Biosynthese pflanzlicher LOX erfolgt aus der Linosäure und der Linolensäure. Bei Tieren hingegen handelt es sich um die in Pflanzen nicht verfügbare Arachidonsäure. Die LOX sind in einer Vielzahl von Vorgängen in der Pflanze beteiligt. Dazu zählen Samenkeimung, Wachstum und Entwicklung, Seneszenz, Verwundung und Pathogenabwehr. Nach einem Pathogenbefall, wie Insektenfraß oder einer Infektion mit Bakterien oder Pilzen, kommt es zu einer Erhöhung der LOX-Aktivität. Diese wird häufig in Verbindung einer R-avr-Gen vermittelten Inkompatibilität beobachtet. Die LOX kann dabei auf vielen Wegen zu einer Resistenz beitragen. Die LOX Aktivität führt beispielsweise zu irreversiblen Membranschäden, was zu einem Ausströmen von zellulären Komponenten führen kann und im PCD endet [Keppler und Novacky, 1986]. Alternativ kann die LOX-katalysierte Reaktion zu einer Produktion von toxischen Fettsäure-Derivaten führen, die wiederum invasive Pathogene direkt angreifen können [Croft et al., 1993]. Die Aktivierung von LOX führt zu einer erhöhten Biosynthese der LOX Oxidationsprodukte. Dazu zählt neben der im vorherigen Absatz erwähnten JA das Signalmolekül Me-JA und die Lipid Peroxidase. Sie gelten als regulatorische Komponenten im pflanzlichen Organismus und sind an Prozessen wie Fruchtreifung, Pollenentwicklung, Wurzelwachstum, Rankenbildung und Seneszenz beteiligt. Daneben wirkt besonders die JA in der Antwort auf Verwundung, abiotischem Stress und Pathogenbefall mit. Die Reaktionen der LOX und der JA sind auch im Hinblick auf einen Insektenbefall studiert worden. Eine deutlich Induktion der beiden Substanzen konnte bei einem Befall mit den Blattläusen *Myzus nicotianae*, *Diuraphis noxia* und *Schizaphis graminum* auf blattlausresistenten Pflanzen beobachtet werden [Boyko et al., 2006; Park et al., 2005]. Ellis et al. [2002] konnten zusätzlich zeigen, dass eine Überexpression von Arabidopsis Pflanzen mit JA zu einem reduzierten Befall mit der Blattlausspezies *Myzus persicae* führt. Des Weiteren ist ein Mitwirken der LOX in der Elicitor induzierten Phytoalexin Produktion bekannt. Li et al. [1991] konnten zeigen, dass die Produktion von Phytoalexinen nach einer Infektion mit *Pyricularia oryzae* bei einer Inhibierung der LOX Aktivität ausbleibt.

Eine IES bedingte LOX Regulation ließ sich in dieser Arbeit nachweisen, und zwar mittels der *Geniom one* Analyse in der 90' Probe von Börner. Die RT-PCR ließ zusätzlich positive Regulationen in den 90' Proben von SO4 und vom Riesling sowie in allen 150' Proben erkennen. Da die Zunahme der Aktivität von LOX in Börner deutlich stärker ausfiel als in den beiden anderen Sorten, ist seine Mitwirkung in der Börner-spezifischen Resistenzreaktion zu vermuten. Die Induktion der LOX ist vermutlich direkt auf die IES oder auf das IES indu-

zierte Ethylen zurückzuführen. So hat auch eine Studie von Wang et al. [1999] mit Sojabohnen zeigen können, dass eine Behandlung mit IES die Expression der LOX auslösen kann. Andersherum führte ein Auxinhemmer zu einer Unterdrückung der Akkumulation. Eine Hochregulation der LOX durch Ethylen ist ebenfalls aus verschiedenen Analysen bekannt [z.B. Schenk et al., 2000].

Sowohl die Expressionssteigerung als auch der expressionelle Unterschied der LOX in den IES induzierten Börner Wurzeln, im Vergleich zu denen von SO4 und vom Riesling macht eine Mitwirkung der LOX in der HR in Börner wahrscheinlich. In der Literatur finden sich Hinweise auf die Funktion der LOX in einer HR. So produzieren LOX Fettsäurehydroperoxide, die durch Interaktion mit Übergangsmetallen zu freien Radikalen umgewandelt werden könne, welche zu Membranschäden führen [Grechkin, 1998], wie sie im Verlauf der Nekrosenbildung zu beobachten sind. Auch Rustérucci et al. [1999] zeigten, dass die Hydroxypoxide an der Bildung von nekrotischen Läsionen nach einem Pathogenbefall mitwirken. Eine ähnliche Funktion der LOX wäre auch bei der Nekrosenbildung in Börner denkbar.

Methionine synthase

Ein weiteres Gen, das in den IES behandelten Proben eine Regulation zeigte und im Ethylensignalweg eine Rolle spielt ist die *Methionine Synthase* (MS). Die MS katalysiert die Methylierung des L-Homocystein, um Methionin zu bilden. Das Enzym wird in allen Organismen für die Regeneration der Methylgruppe des S-Adenosyl-L-Methions (AdoMet) benötigt. Dabei handelt es sich um eine Verbindung, die als Methyl Donator in einer Vielzahl von biologischen Methylierungen fungiert. Die Umwandlung des Homocysteins zu Methionin bildet auch den letzten Schritt der Methionin Biosynthese in Organismen, die einer *de novo* Synthese dieser Aminosäure befähigt sind. Es existieren zwei unterschiedliche Formen der MS. Der eine Typ benötigt Cobalamin (Vitamin B12) als Kofaktor. Man spricht dann von der *cobalamin-dependent* MS. Sie ist in Organismen zu finden, die Vitamin B synthetisieren können z.B. einige Bakterien, oder die es aus der Darmflora oder Fütterung erhalten, wie Tiere und Bakterien. Der andere Typ des Enzyms ist die *cobalamin-independent* MS. Organismen, die Vitamin B nicht synthetisieren können und es nicht aus der Umgebung beziehen, verfügen über diese Art der MS. Dazu zählen Pflanzen, Pilze und einige Bakterien. Bislang existieren nicht viele Studien über das Enzym in Pflanzen. Eichel et al. [1995] haben die MS einer höheren Pflanze (*Catharanthus roseus*) kloniert und dabei feststellen können, dass es sich um eine *cobalamin-independent* MS handelt. Auf diese Weise ließ sich außerdem das Protein im Zytoplasma eindeutig lokalisieren.

Die *Geniom one* Analyse zeigte eine Herunterregulation der MS in der 15' Probe von Börner. In der RT-PCR konnte zusätzlich eine Hochregulation des Gens in den übrigen Proben von Börner und in einigen Proben der anderen beiden Sorten festgestellt werden. Dabei fiel die Expressionserhöhung in Börner wesentlich stärker aus als in SO4 und im Riesling. Der Anstieg der Genexpression in den IES induzierten Wurzeln könnte auf die Funktion der MS in der Ethylen Biosynthese zurückzuführen sein. Das von dem Gen gebildete Methionin und die daraus entstehende AdoMet ist die Substanz, aus der Ethylen synthetisiert wird. So wäre es möglich, dass es durch den Auxinstress zu einer Aktivierung der MS in den Wurzeln gekommen ist, was zu einer erhöhten Ethylenproduktion geführt hat. Durch das Ethylen könnten dann die diskutierten Abwehrreaktionen in Gang gesetzt worden sein.

Eine andere Verbindung, die durch die AdoMet synthetisiert wird, sind die Spermine. Sie gehören zur Gruppe der Polyamine, kleine, basische Moleküle, die in einer großen Auswahl an Organismen von Bakterien bis hin zu Pflanzen und Tieren auftreten. Impliziert werden Spermine zur Förderung des Wachstums und zur Aktivierung der Synthese von Nukleinsäuren. Daneben werden Spermine auch nach einem Pathogenbefall induziert. So konnten Walters und Wylie [1986] zeigen, dass eine Infektion der Gerste mit Mehltau zu einer erhöhten Konzentration an Sperminen in den infizierten Blättern geführt hat. Begleitet war dies durch eine erhöhte Aktivität des Enzyms AdoMet. Anderen Studien, wie beispielsweise Yamakawa et al. [1998] gelang es, zu demonstrieren, dass Spermine PR Proteine induzieren und so die Resistenz des Tabaks gegen den Tabakmosaikvirus (TMV) verursachen. Analog zu dieser Studie könnte auch die Aktivierung der MS in den Börner Wurzeln zu einer Induktion von weiteren Abwehrgenen geführt und so zur Reblausresistenz beigetragen haben.

4.2.3 Phenylpropanoide und die Enzyme ihrer Biosynthese

Phenylpropanoide übernehmen verschiedene Rollen im pflanzlichen Wachstum und in der Entwicklung. Sie umfassen eine große Auswahl an strukturellen Klassen. Gebildet werden sie als Folge einer Vielzahl an Stresssituationen. Zu diesen zählen hohes UV-Licht, geringe Temperaturen, reduzierter Gehalt an Stickstoff, Phosphat und Eisen, Verwundung sowie der Befall mit Pathogenen. Die Biosynthese phenolischer Substanzen, deren Enzyme im Rahmen der Analysen für die hiesige Arbeit IES bedingt reguliert wurden, ist in Abbildung 4.3 schematisch dargestellt. Ausgangskomponente des Gesamtprozesses ist das Salz der Shikimisäure, das sogenannte Shikimat. Der Shikimatweg findet seinen Ursprung in der Glucose, aus der über die Glycolyse die Hexose hydrolytisch zu Phosphoenolpyruvat und Erythrose-

4-phosphat umgebaut wird. Danach folgen mehrere Zwischenstufen, bis das Shikimat gebildet ist. Aus ihm entsteht das Chorismat, die Vorstufe der beiden aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Während Tyrosin durch die Tyrosin-Ammoniumlyase auf direktem Wege zu Cumarsäure oxidativ desaminiert wird, geht deren Bildung ausgehend von Phenylalanin über den Zwischenschritt Zimtsäure. Diese Umwandlung wird durch PAL ermöglicht. Die aus Tyrosin und Phenylalanin gewonnene Cumarsäure stellt das Ausgangssubstrat für verschiedene Phenolderivate dar. Dazu gehören das Lignin, das Chinon, die Stilbene, das Chalcon und die Gruppe der Flavonoide. An der Biosynthese dieser Derivate sind die Schlüsselenzyme PPO, CHS, STS und Chinon Reduktase (*quinone reductase*, QR) beteiligt. Dazu kommt GST, das eine Transportfunktion einnimmt, wie an spätere Stelle genauer erläutert wird. Alle vorgenannten Polyphenole und die Enzyme ihrer Biosynthese spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenabwehr.

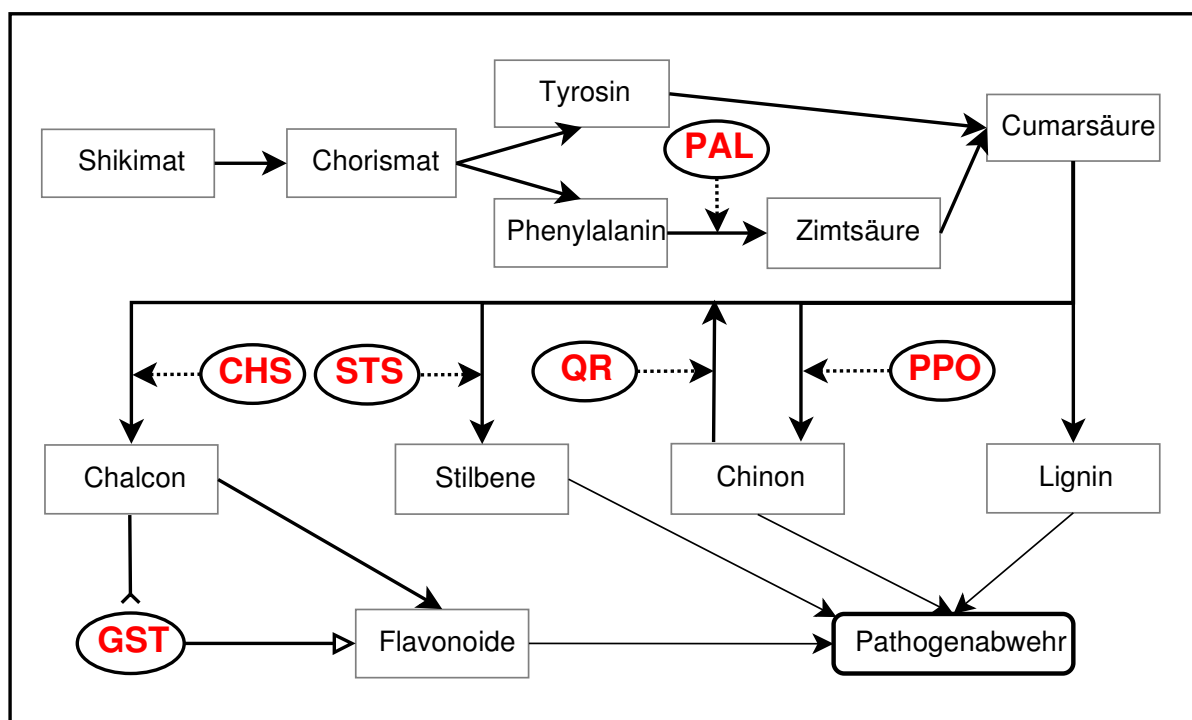


Abbildung 4.3: Beteiligung wichtiger Enzyme in der Phenolpropanoid und Flavonoid Synthese
 Rot: Regulierte Enzyme in IES induzierten Börner Wurzeln
 (Quelle: Erstellt nach den Literaturangaben im Fließtext)

Die PAL, die PPO, die CHS und die STS wurden spätestens nach 90min IES Induktionszeit signifikant hoch reguliert. Das ist Ergebnis der eigens durchgeführten *Genom one* und RT-PCR Analysen. Dabei konnte in Börner, mit Ausnahme der CHS, jeweils die stärkste Zunahme der Genexpression gemessen werden. Im Folgenden werden die zuvor genannten

Enzyme bezüglich ihrer Funktion sowie ihrer mögliche Rolle im Resistenzmechanismus in Börner diskutiert.

PAL

Das Schlüsselenzym der Phenolsynthese stellt die PAL dar. Ihre Aktivität ist in allen höheren Pflanzen, nicht jedoch in Tieren bekannt. Dem Enzym konnte eine Lokalisation im Zytosol, in Mikrosomen und in der Zellwand nachgewiesen werden [Nakashima et al., 1997]. PAL gehört zu den Abwehrgenen, die durch Stress, Verwundung und Pathogenbefall induziert werden. Sie spielt außerdem eine wichtige Rolle in der HR, was an späterer Stelle genauer gezeigt werden soll. Neben diversen Studien zur Abwehr der PAL von pilzlichen Pathogenen, gibt es Untersuchungen, die das Enzym nach einem Blattlausbefall entdeckt haben. So konnten Moran und Thompson [2001] eine Induktion der PAL in Arabidopsis Blättern 96h nach einem Befall mit der grünen Pfirsichblattlaus (*Myzus persicae*) feststellen. Ähnliches zeigten Versuche an der Gerste, wie sie von Chaman et al. [2003] durchgeführt wurden. Hier führte eine Infektion mit der Blattlaus *Schizaphis graminum* zu einer Akkumulation von PAL. Außerdem stellten sie erhöhte Level der SA fest.

Die PAL stellt ein Schlüsselenzym der SA Biosynthese dar. Dabei erfolgt die SA Synthese über die Zimt- und Benzoessäure. Nach einer Akkumulation von SA wird eine positive Feedback Regulation beobachtet. Die SA induziert seinerseits die PAL, die wiederum als Enzym der SA Synthese selbiges bildet [Shirasu et al., 1997]. Die SA übernimmt als Signalmolekül eine spezifische Rolle in der Pathogenabwehr. Sie ist maßgeblich an der Akkumulation von H₂O₂ und von PR-Proteinen beteiligt, welche im Verlauf einer HR gebildet werden. Außerdem ist die SA in der Ausbildung einer SAR involviert [Conrath et al., 2002]. Weitere Hinweise auf die bedeutende Rolle von der PAL und der SA in der Pathogenabwehr geben auch Mauch-Mani und Slusarenko [1996]. Durch eine Inhibierung der PAL Aktivität in pilzresistenten Arabidopsis Pflanzen ließen sich Symptome einer anfälligen Sorte erkennen. Die Autoren führten dies auf eine Blockierung der SA Synthese zurück.

Mit Hilfe der *Geniom one* Analyse konnte eine Induktion der PAL nach 90min IES Behandlung in Börner und in Riesling gefunden werden. Die RT-PCR zeigte dies auch für SO4 und für weitere Induktionszeiten. Auffällig war die enorme Expressionssteigerung in Börner. Sie fiel um etwa das Zwölfwache im Vergleich zur Kontrolle aus. In SO4 und im Riesling hingegen konnte eine maximal dreifache Erhöhung gemessen werden. Die PAL scheint demnach eine spezifische Bedeutung im Resistenzmechanismus in Börner einzunehmen. Dies könnte

auf die Beteiligung der PAL in der HR zurückzuführen sein. Die Rolle der PAL und auch der SA in der HR ist im Zusammenhang mit dem *oxidative burst* zu sehen. So führt das während einer HR gebildete Stickstoffmonoxid (NO) zu einer Aktivierung der PAL und zu einer Akkumulation von SA [Durner et al., 1998]. Andersherum wird eine pathogenbedingte Induktion der beiden Substanzen durch eine NO Blockierung verhindert. So ist möglicherweise auch in Börner die PAL Aktivierung mit dem Vorhandensein des NO zu erklären. Alternativ könnte die Expressionssteigerung der PAL auf die IES-vermittelte Ethyleninduktion rückführbar sein. So wurde in der PAL-Sequenz von Börner das Motiv der GCC-Box gefunden. Der ebenfalls durch IES hochregulierte ERF könnte an diese Motiv gebunden (vgl. Kap. 4.2.2) und so die die PAL Expression ausgelöst haben. Auch andere Studien haben eine Akkumulation der PAL durch Ethylen nachweisen können [u.a. Riov et al., 1969; Ecker und Davis, 1987].

Die deutlich höhere PAL Akkumulation nach der IES Behandlung in Börner im Vergleich zu SO4 und Riesling steht vermutlich auch im Zusammenhang mit der erhöhten Widerstandsfähigkeit von Börnern gegenüber der Reblaus. Dieses Phänomen konnten auch andere Studien feststellen. Versuche mit fungalen Hirse Pathogenen beispielsweise zeigten in resistenten Spezies eine höhere und länger andauernde Akkumulation von PAL als in anfälligen Sorten [Cui et al., 1996]. Ähnliches stellten Nemestothy und Guest [1990] fest. Nach einer Infektion von resistenten und anfälligen Tabaksorten kam es zu Unterschieden in der Höhe der PAL Akkumulation. In den resistenten Sorten wurde dabei eine höhere Menge an PAL gemessen als in den anfälligen.

PPO

Ein weiteres Enzym, das an der Synthese von Phenolderivaten beteiligt ist, stellt, wie Abbildung 4.3 zeigt, die PPO dar. Sie ist in der Oxidation von einer Reihe phenolischer Substanzen involviert. Die PPO wird durch ein nukleares Gen kodiert, befindet sich aber in oder auf der inneren Plastidenmembran. Räumlich getrennt davon sind die phenolischen Bestandteile in der Vakuole lokalisiert. Die Oxidation der Phenole führt zur Bildung von Chinon. Die Chinon-Produkte können polymerisieren und mit Aminosäuren von zellulären Proteinen reagieren. Dies resultiert in der typischen Braunfärbung, wie sie nach Gewebeverletzungen in Erscheinung tritt [Vaughn et al., 1988]. Eine wichtige Rolle nehmen die pflanzlichen PPO in Abwehrmechanismen gegenüber Mikroorganismen und Insekten ein. Durch eine Reihe von Studien konnte eine erhöhte PPO Aktivität nach einer Pathogeninfektion festgestellt werden. Bei Constabel et al. [2000] z.B. war der PPO Gehalt nach Insektenfraß in den Blät-

tern der Pappel bis zu 24h signifikant erhöht. Felton et al. [1989] erklärten an der Interaktion von Tomatenpflanzen und Insekten, dass die PPO einen antinutritiven Effekt auf das befallene Gewebe haben muß. Durch die von der PPO gebildeten Chinone kommt es zur Alkylierung von Aminosäuren oder Proteinen. Diese Alkylierung reduziert die Verdaubarkeit von Nahrungsproteinen und die Bioverfügbarkeit von Aminosäuren. Dadurch nimmt für das Insekt die nutritive Qualität des Blattes ab. Das Pathogen kann sich folglich nicht ernähren und wandert ab. Die PPO Induktion erscheint meistens koordinativ mit einer Reihe von anderen Abwehrgenen.

Durch die RT-PCR Analysen konnte in Börner Wurzeln eine nahezu achtfach erhöhte PPO Expression nach 90min IES Behandlung verzeichnet werden. In SO4 und im Riesling dagegen hatte die IES Induktion keine deutlichen Effekte auf den PPO Gehalt der Wurzeln. Dies könnte auf eine Beteiligung der PPO im IES induzierten Resistenzmechanismus in Börner hindeuten. Möglicherweise kam es durch die Induktion der PAL zu einer erhöhten Akkumulation von Cumarsäure, die wiederum zu einer verstärkten Induktion der PPO geführt hat. Das daraufhin gebildete Chinon könnte bei einem realen Reblausbefall den Nährwert des Pflanzensaftes für das Pathogen verschlechtert und dessen Abwanderung nach sich gezogen haben. Auch Miles [1999] hat nach einem Reblausbefall auffallend erhöhte Werte der PAL und der PPO Konzentration feststellen können. Er vermutet neben der toxischen Wirkung der Akkumulation von Chinon für das Insekt Folgereaktionen in der Pflanze. Auf der einen Seite könnte die hohe Polyphenolkonzentration für das Absterben der Nachbarzellen verantwortlich sein. Auf der anderen Seite mutmaßte er eine Induktion der Gallenbildung durch die Chinone. Für das erste Argument sprechen die Beobachtungen von El-Nady [2001]. Er wies eine erhöhte Phenoleinlagerung während der Nekrosenbildung bei Börner nach (vgl. Kapitel 1.2.2). Auch die Analysen von Henke [1963] sekundieren das. Er wies höhere Gehalte an Chinon in den Weinreben nach, die statt einer Gallenformation eine HR durchlaufen. Folglich könnte auch in Börner die Nekrosenbildung mit der erhöhten Quantität der Chinone zusammenhängen.

QR

Im Zusammenhang mit dem Chinongehalt in der Zelle ließ die *Geniom one* Analyse die Regulation eines weiteren Gens, der QR, in Börner erkennen. In Pflanzen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen der PPO und der QR. Während die PPO das Chinon aus Diphenol oxidiert, reduziert die QR die Chinone zu Diphenol. Miles und Oertli [1993] sprachen

chen in diesem Zusammenhang von einer Balance zwischen der Reduktion und Oxidation bei einer Abwehrreaktion der Pflanze gegen saugende Insekten. Dabei griffen Miles und Oertli [1993] die Ergebnisse der Arbeit von Henke [1960; 1963] auf. Er untersuchte den Zusammenhang zwischen dem Gehalt der QR und der Anfälligkeit von Rebblättern gegenüber einem Reblausbefall. Den höchsten Titer der QR konnte Henke [1960; 1963] in *Vitis vinifera* finden, die seines Erachtens mit einer HR die Bildung von Blattgallen und damit die Kolonisation der Insekten auf den Blättern verhindert. Die niedrigste QR Aktivität wurde in amerikanischen Weinreben gefunden, bei denen es zur Bildung von Blattgallen kommt. Miles und Oertli [1993] interpretierten Henkes Ergebnisse folgendermaßen: Der erhöhte Gehalt an PPO und an QR führt zu einer erhöhten Oxidierungs- und Reduzierungsaktivität, was die hohe Konzentration der toxischen Phenole Chinon und Diphenol aufrecht erhält. Dadurch kommt es zur Bildung von hypersensitiven Nekrosen, was den Phylloxerabefall verhindert.

Bei der *Geniom one* Analyse gab es auch zwischen den unbehandelten Proben von Börner und Riesling Unterschiede in der QR Expression. In Börner konnte eine 1,49-fach höhere Expression der QR gemessen werden als in Riesling. Dieser Wert lag zwar unterhalb des gesetzten Schwellenwertes von 1,5, weist aber dennoch auf einen divergenten Gehalt der QR in den beiden Sorten hin. Die Untersuchungsergebnisse von Henke [1960; 1963] lassen sich demnach hier wiederfinden.

Es bleibt die Frage zu klären, warum die Expression der QR 7min nach der IES Applikation in Börner signifikant herunter reguliert wurde. Da die PPO und damit der Chinongehalt zu diesem Zeitpunkt in den behandelten Wurzeln schon signifikant erhöht ist, könnte die QR als Protektionsmaßnahme auf den hohen Chinongehalt kurzfristig herunter geschaltet worden sein. Die Rolle der QR für die HR ist daher vermutlich in dem höheren Grundgehalt in Börner verglichen mit Riesling, und weniger in der vorübergehenden Herunterregulation, zu betrachten.

CHS und STS

Weitere Enzyme, die in Börner, SO4 und Riesling durch IES reguliert wurden, sind die CHS und STS. Beide sind für die Bildung der Flavonoide und Stilbene zuständig, die sogenannte Sekundärmetaboliten in Pflanzen darstellen. Grundsätzlich sind die Stilbene aus zwei und die Flavonoide aus drei Kohlenstoffringen mit jeweils zwei aromatischen und einem O-hetero-zyklischem Ring aufgebaut. Stilbene sind Phenylpropanoide der Weinrebe. Sie lassen sich außerdem in *Polygonum Capsidatum*, in *Veratrum*, im Eukalyptus, in der Fichte und in der Erdnuss nachweisen [Review in Pervaiz, 2003]. Im Wein finden sich zwei Arten von

Stilbenen. Zum einen gibt es das Resveratrol, zum anderen die Viniferine, die als Oligomere des Resveratrols fungieren. Zu den Oligomeren gehört z.B. das trans-Pterostilben, ein dimethyliertes Resveratrolderivat [Jeandet et al., 2002]. Den höchsten Gehalt an Stilbenen findet man in der Beerenhaut von *Vitis*. Dort sind es je nach Sorte und Umweltbedingungen 20-1000µg Stilbene pro g Beerenhaut [Romero-Pérez et al., 2001]. Die zweite Gruppe der Sekundärmetabolite, die Flavonoide, lassen sich anhand struktureller Unterschiede am C-Ring in sechs Typen untergliedern [Cos et al., 1998]. Diese sechs Typen sind, alphabetisch sortiert: Anthocyane, Flavanole, Flavanone, Flavonen, Flavonole, und Isoflavonoide.

Den Flavonoiden kann man eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen zuerkennen. Einteilen lassen sie sich in für Menschen wichtige Funktionen und solche, die der Pflanze dienen. Erstere werden in der Humanmedizin eingesetzt. Schließlich wirken zahlreiche Flavonoide antibakteriell, antiviral, entzündungshemmend und teils auch als Antioxidantien. Den Stilbenen dagegen sagt man nach, sie senkten das Krebsrisiko. Außerdem sollen sie vor Herz- und Kreislauferkrankungen schützen. (1) Eine erste Funktion der Flavonoide bei Pflanzen (genauer bei Leguminosen) ist in der Versorgung mit Stickstoff zu sehen. (2) Daneben sind Flavonoide für (2) den UV-B-Schutz, (3) die Bildung von Blütenfarbstoffen und (4) die Abwehr von Pathogenen verantwortlich. Diese vierte Aufgabe teilen sich die Flavonoide mit Stilbenen, wie weiter unten deutlich gemacht wird. (1) Flavanon, Flavon und Isoflavon kennzeichnen sich dadurch, dass sie mit Stickstoff fixierenden *Rhizobia* Bakterien in Symbiose treten. Diese drei Flavonoide werden dabei von den Pflanzenwurzeln abgesondert und induzieren die Expression von bakteriellen Nodulationsgenen. Die Gene erlauben dem Bakterium, symbiotische Knöllchen an den pflanzlichen Wurzelhaaren zu bilden, die der Pflanze Stickstoff zur Verfügung stellen [Long, 1989]. (2) Neben ihrer Funktion in der Leguminosen Nodulation dienen Flavonoide der Pflanze als UV-B-Schutz [Li et al., 1993]. Ein solches Flavonoid ist zum Beispiel das Anthocyan. UV-B-Strahlen haben die geringste Wellenlänge der ultravioletten Radiation und ferner die höchste Energie. Aus diesem Grund können sie hohen Schaden bei sessilen Organismen anrichten. Die Resistenz der Pflanzen gegenüber UV-B-Strahlen wird mit dem universalen Vorhandensein von Flavonoidpigmenten in den Blättern der Pflanze erklärt. Die Flavonoide absorbieren die UV-B Strahlen und dienen so als Filter, der das photosynthetische Gewebe vor Schäden schützt. (3) Flavonoide geben UV-B-Schutz, zählen aber auch zu den bedeutenden Blütenpigmenten. Zu der Untergruppe der Anthocyane gehören Pelargonidin (orangerot), Cyanidin (magentarot) und Delphinidin (blauviolett). (4) Flavonoide und Stilbene geben Schutz gegen ein breites Spektrum von Pathogenen. Dies schließt nicht nur ihre konstitutive Präsenz in der Pflanze mit ein, sondern auch ihr evidente

Akkumulation als Phytoalexine in der Antwort auf einen Pathogenbefall [Grayer and Harborne, 1994, Harborne, 1999]. Auch im Rahmen einer HR wird eine Induktion von Phytoalexinen beobachtet [Tsuji et al., 1992]. Ausführlich studiert wurden die Flavonoide und Stilbene in ihrer Funktion, die pilzliche Sporenkeimung zu inhibieren. Dies geschieht in Folge einer Hemmung der Aktivität der pilzlichen Cellulasen, Xylasen und Pektinasen. Aufgrund der antifungalen Wirkung gelten die Stilbene auch als Indikatoren der pflanzlichen Resistenz [Jeandet et al., 2002]. Zahlreiche Studien konnten eine Beziehung zwischen Geschwindigkeit und Resistenz in der Weinrebe gegen *Botrytis cinerea* oder *Plasmopara Viticola* oder Intensität der Phytoalexinproduktion und Resistenz nachweisen [Adrian et al., 1997; Bais et al., 2000; Bézier et al., 2002]. Flavonoide und Stilbene nehmen auch in der pflanzlichen Abwehr gegen Insekten eine wichtige Rolle ein. So konnte beispielsweise im Phloemsaft der Reispflanze Flavonoide identifiziert werden, die dort eine abschreckende Wirkung auf die Heuschrecke *Nilaparvata lugens* haben. Dabei wurden in resistenten Reissorten stets relativ hohe Konzentration der Flavonoide gemessen [Grayer et al., 1994]. Sutherland et al. [1980] zeigten ferner, dass Isoflavonoide von Leguminosen, wie etwa der Lotosblume, eine abschreckende Wirkung auf das Saugverhalten des Insekts *Heteronychus arator* haben. Der Level, bei dem Isoflavonoide das Saugen des Insekts verhindern, entspricht dem Level, bei dem die pilzliche Sporenkeimung unterbunden wird. Daher gehen die Autoren von einer dualen Aktivität dieser Phytoalexine gegen Insekten zum einen und Pilze zum zweiten aus. Stilbene hingegen nehmen auf eine andere Weise negativen Einfluss auf invasive Insekten. Sie haben eine antagonistische Aktivität auf Ecdysteroide. Ecdysteroide sind Hormone, die für die Häutung während der Metamorphose der Insekten von Bedeutung ist [Harmatha und Dinan, 2004].

Eine wichtige Rolle bei der Bildung von Flavonoiden und Stilbenen spielen die engverwandte Enzyme CHS und die STS. Schließlich nutzen beide Enzyme jene Substrate, also Malonyl CoA und 4-Coumaroyl CoA, aus denen die CHS das Chalcon und die STS das Resveratrol synthetisiert. Während die CHS in fast allen höheren Pflanzen detektierbar ist, findet sich die STS nur in wenigen Pflanzen wieder. Dazu gehört auch die Weinrebe, in der die STS durch eine Multigen-Familie kodiert wird. Viele empirische Studien konnten nachweisen, dass die Akkumulation von Flavonoiden bzw. Stilbenen eine Induktion der CHS bzw. STS zur Folge hat.

Interessante Ergebnisse lieferten die *Geniom one* und RT-PCR Analyse. Nach ihnen sind die CHS und die STS in den 90min und/oder 150min Proben von Börner, SO4 und Riesling hoch reguliert. Dabei traten bei der CHS keine klaren Sortenunterschiede in der Genexpression auf. Für die STS dagegen ließ sich eine starke Zunahme in den IES induzierten Wurzeln der Unterlagsrebe Börner erkennen. Die Expressionssteigerung in den beiden anderen Rebsorten SO4 und Riesling fiel hingegen vergleichsweise schwach aus. Diese Feststellungen sprechen dafür, dass die Akkumulation der Flavonoide, hervorgerufen durch die Induktion der CHS, die Folge von Stress auf den hohen Auxingehalt ist. Eventuell ist sie daher lediglich eine Stressreaktion, die in den anfälligen, toleranten und resistenten Rebsorten gleichermaßen stark auftritt. Die CHS Induktion in den behandelten Wurzeln könnte man aber auch auf Flavonoide beim Auxintransport zurückzuführen, wie er in Unterabschnitt 4.2.1 zur Diskussion stand [Brown et al., 1994]. Ist dem so, käme den Flavonoiden bei hohem Auxinlevel die Rolle als Inhibitoren des polaren Auxintransports zu. Für diese These spricht zumindest, dass der Auxintransporter PGP1 in den 150min Proben der drei Sorten immer dann herunter reguliert wurde, wenn die CHS eine signifikante Hochregulation zeigte. CHS hätte damit eine Kontrollfunktion in der Pflanze: Sie müsste die Auxinakkumulation nach der IES Behandlung bzw. nach einem Reblausbefall steuern. Anders als die CHS könnte die STS eine spezifische Rolle im Resistenzmechanismus in Börner einnehmen. Schließlich war in Börner die Expression nach der IES Behandlung stärker angestiegen als in SO4 oder im Riesling. STS fungieren als Inhibitoren auf fungale Pathogene. Pilzliche Elicitoren können im vorliegenden Fall aber nicht der Auslöser für ihre Induktion gewesen sein. Eine Erklärung für die IES bedingte Aktivierung von STS liefert die Studie von Chung et al. [2003]. Dort wurde eine Induktion der Expression von Resveratrol in der Erdnuss nach einer Behandlung mit SA, JA und Ethylen gemessen. Die Autoren gingen daher von einer Beteiligung der drei Hormone in der Regulation von Resveratrol aus. Ist es tatsächlich so, dass die Ethyleninduktion eine Folge der IES Behandlung der Rebwurzeln ist, kann man nicht ausschließen, dass Ethylen auch in der Weinrebe für die STS Induktion und so für die Resveratrolakkumulation (mit-)verantwortlich ist. Nach einem Reblausbefall müsste in den Wurzeln von Börner also eine höhere Menge an Resveratrol zu finden sein als in den anfälligen und den toleranten Sorten. Offen ist, warum sowohl die CHS als auch die STS in den ersten 30min nach der IES Behandlung in Börner eine Repression der Expression im Vergleich zur Kontrolle zeigte, die in dem Ausmaß weder in SO4 noch in Riesling zu finden war. Da die Fachliteratur keine Erklärung für die Rolle der Inhibierung dieser Enzyme während der Abwehrantwort gegen Pathogene liefert, ist die erkannte Herunterregulation möglicherweise

„nur“ als ein Schutzmechanismus der Wurzel auf die vergleichsweise hohe Auxinkonzentration zu interpretieren.

GST

Ein weiteres Enzym, das in der Regulation der Flavonoide eine Rolle spielt, ist die GST. Die GST katalysieren die Konjugation vom Tripeptid Glytathion (GSH) zu einer Vielzahl von hydrophoben, elektrophilen und in der Regel auch cytotoxischen Substraten. Sie bilden eine Superfamilie, die sich auf der Basis von Sequenzhomologien in die phi, tau, theta, zeta und lambda Klassen unterteilen lässt [Marrs et al., 1996]. Die GST spielt eine Rolle in dem Metabolismus von pflanzlichen Sekundärprodukten wie Anthocyanine und Zimtsäure, ist aber auch in der Detoxifikation einer Reihe von xenobiotischen Substanzen, wie Herbizide, beteiligt [Mauch und Dudler, 1993; Shimabukuro et al., 1970]. Ferner sind die GST an vielen Stressantworten beteiligt, etwa beim Befall mit Pathogenen, bei Sauerstoffmangel oder bei Schwermetallvergiftungen [Edwards et al., 2000; Mauch et al., 1993]. Im Verlauf einer pflanzlichen Abwehrreaktion kommt es gewöhnlich zur Entstehung von ROS. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Bildung von H₂O₂, einem typischen ROS, eine schnelle Stimulation der GST hervorruft. Zusätzlich wird auch die Synthese von GSH induziert, woraufhin weitere GST aktiviert werden [Marrs et al., 1996; Levine et al., 1994]. In diesem Zusammenhang ist außerdem bekannt, dass die GST die Flavonoide Quercetin und Kaempferol binden [Smith et al., 2003] und vermutlich zusammen mit einem ABC Transporter unter Energieverbrauch in die Vakuole transportieren [Alfenito et al., 1998; Marrs et al., 1995]. Einige GST zeichnen nachweislich auch für den Transport von Auxin verantwortlich und wirken als Rezeptoren des Hormons. Diese und weitere Funktionen der GST im Zusammenhang mit Auxinen lassen sich in der Literatur finden [Marrs et al., 1996]. Auf der einen Seite binden sie das natürliche Auxin IES, wahrscheinlich um die IES Aktivität und den zellulären Transport zu regulieren oder Glutathion zu konjugieren [Bilang et al., 1993; Hahn und Strittmatter, 1994; Smith et al., 2003]. Auf der anderen Seite wird überlegt, dass die GST durch Auxin induziert werden und für die Detoxifikation von elektrophilen Substanzen bedeutsam sind [Marrs et al., 1996]. Neben Auxin wirkt auch das Pflanzenhormon Ethylen stimulierend auf die Expression von GST. Im Zusammenhang mit der Seneszenz in Pflanzen kommt es zur Interaktion zwischen Ethylen und GST [Marrs et al., 1996].

Die *Geniom one* und die RT-PCR Analyse, wie sie beide zur Erstellung dieser Arbeit durchgeführt wurden, brachte aufschlussreiche Erkenntnisse. Allen voran ließ sich mit ihnen eine

signifikante, durch IES bedingte Herunterregulation der GST in Börner, SO4 und Riesling nach 7min belegen. Die Regulation setzte sich bei Börner über alle IES Induktionszeiten hinweg. Die Induktoren von GST, wie Auxin, Ethylen und H₂O₂, können danach keine stimulierende Wirkung auf das GST gehabt haben. Sonst wäre es zu einer erwarteten höheren GST Expression in den IES behandelten Wurzeln im Vergleich zu den Kontrollwurzeln gekommen. Eine Erklärung für die negative Regulation der GST findet sich in den Studien von Zhang und Das [1994] und Zhang et al., [1997]. Sie wiesen *in vitro* eine Inhibierung der GST durch das Chalcon nach. Ähnlich könnte es auch im IES induzierten HR in Börner abgelaufen sein. Der hohe Gehalt an Chalcon, bedingt durch die Erhöhung der CHS Expression nach 90min IES Inkubationszeit, könnte zu einer Inhibierung der GST geführt haben.

4.2.4 Transkriptionsfaktoren

Abwehrreaktionen der Pflanze sind mit einer transkriptionellen Reprogrammierung verbunden, die über TFs reguliert wird. Die verschiedenen pflanzlichen TF sind ähnlich aufgebaut. Sie setzen sich aus vier Komponenten zusammen, nämlich einer DNA-bindenden Region, einer Oligomerisierungsseite, einer transkriptionsregulatorischen Domäne und einem nuklearen Lokalisationssignal. Klassifiziert werden die TF nach der Zahl ihrer konservierten Rückstände in den ähnlichen Domänen. Die *Geniom one* Analyse ließ in den IES induzierten Wurzeln von Börner und Riesling Regulationen von fünf TF erkennen: die ERF, die WRKY, die CBF, die AAT und die SERBP. Dazu kommen die putativen TF, die keiner eigenen Klasse angehören und in der RT-PCR genauer untersucht wurden. Die ERF wurden bereits im Rahmen der Ethylen Signaltransduktion diskutiert und sollen deswegen hier nicht vertieft behandelt werden.

WRKY

Die WRKY Proteine sind eine Superfamilie von TF, die in Arabidopsis etwa 100 Mitglieder umfasst. Etwa 70% aller WRKY Proteine werden als Reaktion auf einen Pathogenbefall induziert. Daneben wurde eine Aktivierung von WRKY Faktoren in Seneszenzprozessen und in der Trichom Entwicklung beobachtet [Dong et al., 2003]. Die Expressionsregulation der WRKY Proteine erfolgt durch Erkennung und Bindung an eine konservierte Bindungsseite TTGAC(C/T), sogenannte W-Box Elemente, die in den Promotoren vieler Abwehr assoziierter Gene zu finden sind. Dazu zählen beispielsweise die PR-Gene, die Chitinasen, MAPK, ABC Transporter und Gene, die in die SAR involviert sind [Dong et al., 2003; Yamamoto et al., 2004]. Die W-Box konnte auch bei Börner, SO4 und Riesling in den Sequenzen dreier

Gene gefunden werden, die im Rahmen dieser Arbeit analysiert wurden. Dabei handelt es sich um die PPO, das PGIP und den ETR (vgl. Kap. 4.2.3, 4.2.6 und 4.2.2). Möglicherweise kam es im Verlauf der Abwehrreaktion auf die IES Applikation zu einer Interaktion zwischen WRKY und den drei genannten Genen.

Die WRKY können als Transkriptionsaktivatoren eine positive Feedbackregulation in der frühen Abwehrantwort ermöglichen. Zu einem späteren Zeitpunkt verhindern Repressoren aus der gleichen Familie durch eine negative Feedbackregulation eine anhaltende WRKY-Aktivität [Eulgem, 2005]. Bei Untersuchungen der HR in TMV infizierten Tabakpflanzen konnten Yoda et al. [2002] die Expression eines WRKY-Faktors feststellen. Die Aktivierung des WRKY steht möglicherweise in direktem Zusammenhang mit der Induktion und Regulation der HR. Eine positive Regulation eines WRKY konnte mittels der *Geniom one* Analyse in den 90' und 150' Proben von Börner und Riesling gefunden werden. Auch Voelckel et al. [2004] wiesen eine Hochregulation des WRKY nach einem Blattlausbefall bei Versuchen mit *Myzus nicotianae* befallenen Tabakpflanzen nach. Die Erhöhung der Expression hängt wahrscheinlich mit der Hochregulation des TFs ERF zusammen. Wie in Kap. 4.2.2 (Ethylen in der Pathogenabwehr) beschrieben, konnte in der WRKY Sequenz die GCC-Box gefunden werden, an die ein ERF binden kann. Folglich ist eine Ethylen bedingte Interaktion zwischen ERF und WRKY in den IES behandelten Wurzeln denkbar.

CBF und putative TF

Bei einem weiteren TF, der in der *Geniom one* Analyse in eine signifikante Expressionssteigerung im Vergleich zur Kontrollprobe zeigte, handelte es sich um den CBF. Die CBF besitzen wie die ERF, AP2/EREBP DNA bindende Domänen [Liu et al., 2007]. Sie sind vorrangig dafür bekannt in der Antwort auf Kältestress und Wasserdefizit involviert zu sein [Stockinger et al., 1997]. Eine massive Induktion der CBF konnte bei niedrigen Temperaturen [Gao et al., 2002] und nach Dehydration und hohen Salzgehalten nachgewiesen werden [Liu et al., 2007]. Die CBF binden an cis-aktive Elemente, die in den Promotoren vieler Kälte- und Trockenstress regulierter Gene zu finden sind. Die Literatur gibt jedoch keine konkreten Hinweise auf eine direkte Beteiligung des CBF an einer biotischen Abwehrreaktion. Die Erhöhung der Expression des CBF in den behandelten Wurzeln von Börner und Riesling ist vermutlich auf das IES induzierte Ethylen zurückzuführen. Da die CBF Mitglieder der AP2/EREBP Familie sind, die über den Ethylensignalweg reguliert werden, ist auch ein Zusammenhang zwischen CBF und Ethylen denkbar.

Die *Geniom one* Analyse zeigte zudem positive Regulationen eines putativen TF in den IES behandelten Proben von Börner, der in der RT-PCR genauer untersucht wurde. Auf Nukleotid-Ebene zeigte der aus Börner, SO4 und Riesling sequenzierte putative TF eine 100%-ige Übereinstimmung zu dem *abscisic stress ripening* Protein (ASR). Die ASR sind nukleare Proteine, die durch Stress, Reife und ABA induziert werden. Sie haben eine Zn^{2+} -abhängige DNA-bindende Aktivität in Tomaten [Gilad et al., 1997] und sind bekanntermaßen putative TF in Weintrauben (Gen-ID: AF281656). Çakir et al. [2003] zeigten, dass die Genexpression des ASR durch ABA und Zucker erheblich erhöht werden kann. Sie vermuteten daher eine Funktion des ASR Proteins als Teil des Signalweges für Zucker und für ABA. Diese Hypothese stützt das Konzept, welches dem Zuckersignalweg in Antwort auf abiotischen und biotischen Stress in Pflanzen eine primäre Rolle zuspricht [Smeekeens, 2000]. Der untersuchte TF kann folglich neben seiner Funktion als TF auch eine Rolle als ASR nach der IES Behandlung gespielt zu haben. Mittels der RT-PCR ließ sich in allen IES behandelten Proben von Börner, SO4 und Riesling eine Hochregulation des TFs erkennen. Auffällig war die frühe Regulation (7min) des Gens. Ähnliche Beobachtungen konnten Vandenabeele et al. [2003] in einer Expressionsstudie über den H_2O_2 induzierten PCD machen. Dort zählten ebenfalls die TF zu den am frühesten induzierten Genen.

Die Erhöhung der Genexpression des TF nach der IES Behandlung könnte aus dem erhöhten Ethylenlevel in den Wurzeln resultiert haben. Ethylen führt bekanntermaßen zu einer Induktion von TF, wie z.B. des ERF. Ferner besteht eine enge Interaktion zwischen dem Zucker- und dem Ethylen-Signalweg. So könnte die IES bedingte *de novo* Synthese von Ethylen zu einer Erhöhung des Glucose Gehaltes geführt haben. Dies wiederum resultierte möglicherweise in einer Induktion des ASR.

Die Ergebnisse der *Geniom one* und RT-PCR Analysen präsentierten jedoch keine sortenspezifischen Unterschiede in der Expressionssteigerung des TF nach der IES Behandlung. In Börner führe die IES Induktion zu keiner stärkeren Erhöhung des TF als in SO4 oder Riesling. Aufgrund der signifikanten Regulation in allen drei Sorten ist es zwar wahrscheinlich, dass der TF in der Stressreaktion auf die IES Behandlung mitwirkt, eine spezifische Rolle in der HR in Börner aber weniger offensichtlich.

AAT

Die *Geniom one* Analyse gab Hinweise auf die Hochregulation eines weiteren TF in den IES behandelten Wurzeln von Börner. Dabei handelt es sich um die AAT, deren Expressionsverhalten auch in der RT-PCR untersucht wurde. Die AAT gehört zur Familie der Acetyltrans-

ferase und ist ein TF, genauer gesagt ein Translationsfaktor, welcher das N-terminale Alanin eines S18-Proteins in den Ribosomen acetyliert. Auf Proteinebene zeigt die AAT eine hohe Homologie zu dem GCN5, welches der Familie der *GCN5-related N-acetyltransferase* (GNAT) angehört. Da sich aus der Literatur kaum Hinweise auf die Expression, die Regulation oder die Funktion einer AAT entnehmen lassen, stützt sich die folgende Diskussion auf die Annahme, dass es sich bei dem Gen, das in den IES behandelten Proben reguliert wurde, um das homologe GCN5 handelt.

Die Superfamilie GNAT wurde erstmals als aminoglycoside Acetyltransferase in Bakterien identifiziert, wo sie eine Resistenz gegen Antibiotika vermittelt. Mittlerweile sind über 10000 Mitglieder der Familie im Tier- und Pflanzenreich bekannt. In erster Linie sind die GNAT für die Regulation des Zellwachstums und der Zellentwicklung von Bedeutung. Dabei übernehmen sie eine wichtige Rolle in der Transkription und in der DNA Reparatur. [Vlachonasios et al., 2003] zeigten darüber hinaus, dass das GCN5 pleiotrope Effekte auf das Pflanzenwachstum ausübt. So führten GCN5 Verlustmutanten zu Zwergwuchs, verändertem Wurzelwachstum und verkürzten Blütenblätter.

Die RT-PCR Analysen ließen sehr deutliche Reaktionen der AAT (GCN5) auf die IES Behandlung erkennen. In allen drei Sorten konnte eine Hochregulation nach 90min und nach 150min nachgewiesen werden. Dabei war die Expressionserhöhung in Börner, mit einer etwa 18-fachen Zunahme in der 150' Probe, am stärksten sichtbar. Die IES Behandlung muss daher eine beträchtliche Wirkung auf dieses Gen ausgeübt haben. Auch in der Literatur lassen sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der AAT bzw. dem GCN5 und dem Auxin finden. Tian et al. [2002] stellten beispielsweise fest, dass eine Auxin Behandlung an Arabidopsis Keimlingen zu einer Induktion von Genen führt, zu denen auch die AAT zählt. Eine andere Studie zeigte, dass GCN5 Verlustmutanten in Arabidopsis vergleichbare Phänotypen aufweisen, wie in Mutanten mit reduzierter Auxinantwort [Vlachonasios et al., 2003]. Ferner konnte in Arabidopsis und im Raps ein *SCARECROW-like* Protein gefunden werden, das durch die Interaktion mit dem GCN5 die Auxinantwort mitreguliert [Gao et al, 2004, 2007]. Aufgrund dieser Studienergebnisse ist es wahrscheinlich, dass die starke Induktion der AAT bzw. des GCN5 nach der IES Behandlung ebenfalls auf eine Rolle der AAT bzw. des GCN5 in der Auxin Regulation hindeutet.

Neben Auxin wurde auch eine Beziehung von GCN5 mit dem weiter oben beschriebenen TF CBF nachgewiesen. Die GCN5 fungieren als Adaptorproteine für die CBF in der Hefe. Genetische Studien haben bewiesen, dass das CBF unter anderem das GCN5 für eine optimale

Funktionalität in der Hefe benötigt [Stockinger et al., 1997]. Auch in Arabidopsis konnte eine Interaktion zwischen dem CBF und dem GCN5 beobachtet werden [Vlachonasios et al., 2003]. Vergleichbares ist auch in den IES behandelten Börner Wurzeln denkbar, in denen sowohl das CBF als auch das GCN5 eine deutlich Hochregulation im Vergleich zur Kontrollprobe zeigten. Die frühere Induktion des CBF (nach 60min) verglichen mit der des GCN5 (AAT) (90min und 150min) könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Expressionssteigerung des CBF die Expression des GCN5 angeregt hat. Das würde bedeuten, dass das CBF, ähnlich wie in der Hefe [Stockinger et al., 1997], das GCN5 zur vollen Funktionsfähigkeit benötigt.

Eine weitere Form der Bedeutung des GCN5 in der Pathogenabwehr stellten Zhou et al. [2005] heraus. Mutationen in dem GCN5 Gen führten bei ihren Analysen zu einer verminderten Acetylation von Histon. Außerdem zeigten GCN5 Verlustmutanten eine reduzierte Expression von den Pathogenabwehrgenen ERF und Chitinasen (vgl. Kap. 4.2.2 und 4.2.5). Die Autoren vermuteten daher eine Beteiligung der Histon Acetylation in der Genregulation nach einem Pathogenbefall. Hier könnte ebenfalls ein Anhaltspunkt für die Bedeutung der AAT Induktion nach der IES Behandlung in Börner, SO4 und Riesling liegen. Die deutliche Steigerung der Genexpression der AAT nach der IES Induktion könnte ein Zeichen für eine Involvierung dieses Gens in der Abwehrreaktion auf den hohen Gehalt von Auxin sein.

SREBP

Das SREBP ist ein weiteres Gen, das in Börner durch IES reguliert wurde und vermutlich zur Gruppe der TF gezählt werden kann. Die Sequenz des SREBP wurde für die vorliegenden Untersuchungen verwendet, da sie in der Datenbank als TF annotiert ist. Jedoch lässt sich zu diesem TF zurzeit keine veröffentlichte Literatur finden. Ein Abgleich der Sequenz in der NCBI Datenbank zeigte, dass das SREBP auf DNA- und Proteinebene eine 80% bis 99%-ige Übereinstimmung mit TF aus der Gruppe der MYB aufweist. Die MYB Faktoren repräsentieren eine Familie von Proteinen, die sich allesamt durch eine konservierte MYB DNA-Bindungs-Domäne auszeichnen. Diese Domäne besteht aus bis zu drei *repeats* (R1, R2, R3), deren *helix-turn-helix* Struktur aus etwa 53 AS besteht. Die MYB Proteine werden nach der Anzahl der benachbarten *repeats* in drei Subfamilien eingeteilt. Die größte Subfamilie der pflanzlichen MYB Faktoren ist die der R2R3-MYBs, deren Bindungsdomäne aus zwei *repeats* besteht. Daneben existieren die MYB1R mit einem *repeat* und die MYB3R mit drei *repeats* [Stracke et al., 2001].

Die höchste Übereinstimmung zeigte das SERBP zu MYB Faktoren aus der R2R3 Subfamilie. R2R3-MYB Faktoren sind an verschiedenen pflanzlichen Prozessen beteiligt. Zum einen kontrollieren sie Hormon gesteuerte Regulationen des Sekundärmetabolismus, der Morphogenese, der Meristemformation und des Zellzyklus [Jin und Martin, 1999]. Zum anderen reguliert das AtMYB2 in Arabidopsis das Promotergen der ADH (vgl. Kap. 4.2.8) und ist in der Reaktion auf niedrige Sauerstoffgehalte, wie sie im Verlauf eine *oxidative burst* auftreten, involviert [Hoeren et al., 1998]. Eine regulierende Aufgabe in der Expression von Abwehrgenen wird auch für einige R2R3-MYB-Faktoren angenommen. Die Expression des AtMYB30 beispielsweise steht im engen Zusammenhang zum PCD, wie er während einer HR in Antwort auf einen Pathogenbefall oder nach einer Behandlung mit einem Elicitor auftritt. Daniel et al. [1999] konnten anhand von *Xanthomonas campestris* infizierten Arabidopsis Zellen eine Korrelation zwischen der Expression des AtMYB30 und dem Zelltod nachweisen. Des Weiteren zeigten Vailleau et al. [2002], dass das AtMYB30 nicht nur in die HR involviert ist, sondern einen positiven Regulator für den hypersensitiven Zelltod darstellt. Darüber hinaus konnten sie belegen, dass die MYB eine wichtige Aufgabe im Phenylpropanoid Stoffwechsel übernehmen. So wird die Flavonoidbiosynthese in Weinbeeren durch eine Kombination aus mehreren MYB Faktoren reguliert [Sablowski et al., 1994]. Einige MYB Faktoren werden auch durch Saccharose reguliert bzw. akkumuliert. Die Saccharose-abhängige Induktion der Anthocyane Biosynthese in Arabidopsis beispielsweise benötigt das MYB75 Gen [Teng et al., 2005]. Eine ähnliche, Saccharose verbundene Funktion wäre auch für das SREBP denkbar.

Nachdem die *Geniom one* Analyse eine positive Regulation des SREBP in der 90' Probe von Börner angezeigt hatte, ließ sich mit der anschließend durchgeführten RT-PCR auch in behandelten Proben von SO4 und vom Riesling eine Hochregulation des Proteins erkennen. Besonders auffällig war bei allen drei Sorten die starke Expressionserhöhung schon 7min nach der IES Applikation. Die Steigerung bei Börner fiel am deutlichsten aus, was für eine Beteiligung des Proteins in der frühen HR in Börner spricht. Auch in der schon angesprochenen Studie von Vailleau et al. [2002] wurde eine schnelle und ausgeprägte Expression des AtMYB30 beobachtet. Die Ergebnisse der RT-PCR zeigten zudem, dass das SREBP in den unbehandelten Börner Wurzeln einen signifikant höheren Level aufweist als in den Vergleichsproben von SO4 und vom Riesling. Möglicherweise reagiert Börner dadurch effizienter auf den IES Reiz.

Viele Abwehrrasoziierte Gene enthalten in ihrer Sequenz mehrere Bindungsstellen für MYB Faktoren. Dazu zählen unter anderem die in Börner, SO4 und Riesling durch IES regulierten PR-Gene, die PAL und das WRKY. Angenommen, bei dem durch IES aktivierten SREBP handelte es sich um einen MYB Faktor. Dann wäre es möglich, dass er die Transkription dieser drei Gene in Börner, SO4 und Riesling reguliert hat. Interessanterweise sind die PR-Gene, die PAL und das WRKY in Börner ebenfalls stärker reguliert als in SO4 oder Riesling. Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass die stärkere Expression des SREBP sowohl in den behandelten als auch in den unbehandelten Wurzeln von Börner verglichen mit denen von SO4 und vom Riesling für eine Börner-spezifische Beteiligung des Proteins in der Abwehrreaktion auf IES spricht.

4.2.5 PR-Gene

PR-Gene werden für gewöhnlich als Wirt-spezifische Proteine definiert, die in einer Vielzahl von Pflanzen während eines Pathogenbefalls induziert werden [van Loon et al., 2006]. Zu den Pathogenen zählen Viren, Bakterien, Pilze, Nematoden, Insekten und Herbivoren. Ein Akkumulieren mit PR-Genen konnte aber auch nach abiotischen Stressstimuli beobachtet werden [van Loon et al., 2006]. Die Aktivierung der PR-Gene wird durch ein komplexes Zusammenspiel der Signalkomponenten ET, JA, MeJA und SA reguliert. PR-Proteine werden nicht nur lokal an der Infektionsstelle, sondern auch systemisch induziert und spielen daher eine wichtige Rolle in der SAR (vgl. Kap. 1.5.2). Sie liegen meist extrazellulär vor und inhibieren das Wachstum, die Vermehrung und somit die Ausbreitung von Pathogenen [van Loon und van Strien, 1999]. PR-Proteine haben ein verhältnismäßig geringes Molekulargewicht (10-40kDa) und können in Umgebungen mit pH-Werten überleben, bei denen anderen Proteine denaturieren [Stintzi et al., 1993]. Insgesamt lassen sich 17 PR Familien nach Aminosäuresequenz, serologischer Verwandtschaft und/oder enzymatischer oder biologischer Aktivität ableiten [van Loon et al., 2006]. Mit Hilfe der *Geniom one* Analyse konnten Hinweise auf die Regulation von verschiedenen PR-Genen in Börner, SO4 und Riesling gefunden werden. Diese Erkenntnisse ließen sich mittels der RT-PCR bestätigen.

β-1,3-Glucanasen und Chitinase

Auf den *Geniom one* Chips zeigten sich Regulationen mit β-1,3-Glucanasen und Chitinase. Die β-1,3-Glucanasen gehören zur PR-2 Familie und katalysieren die hydrolytische Spaltung von der β-1,3-D-glucosidischen Bindung in β-1,3-Glucane. PR-2 dienen der Pflanze neben ihrer Beteiligung in Reproduktionsprozessen und Fruchtreife [Harpster et al., 1998] primär

als Abwehrsubstanzen gegen Mikroorganismen und in Reaktion auf Stress, Kälte, Ozon und UV-B-Strahlung. Da in den Zellwänden von verschiedenen Mikroorganismen β -1,3-Glucane zu finden sind, wird von einer antimikrobiellen Wirkung der β -1,3-Glucanase ausgegangen [Cota et al., 2007]. Zum anderen haben die Proteine eine indirekt abwehrende Wirkung, da sie Elicitoren freisetzen, die dann in der Abwehrreaktion gegen Pathogene eine Rolle spielen [Stintzi et al., 1993].

Die Gruppe der Chitinasen besteht aus fünf Klassen (I, II, III, V, VI), die sich auf insgesamt vier PR-Familien (PR-3,-4,-8 und -11) auf teilen. Chitinasen hydrolysieren Chitin, ein Polymer aus N-Acetyl-D-Glucosaminen, das keine natürliche Komponente in Pflanzenzellen ist, aber in den meisten Zellwänden von Pilzen sowie in der Kutikula von Insekten zu finden ist [Stintzi et al., 1993]. Somit führt die Aktivierung der Chitinase zur Eindämmung eines Pathogens indem Elicitor-aktive Oligosaccharide freigesetzt werden.

Eine Induktion von β -1,3-Glucanasen und von Chitinasen nach einem Pathogenbefall ist ein Zeichen für die Resistenz der Pflanze gegenüber Krankheitserregern, wie Untersuchungen mit Blattlaus-(*Rhopalosiphum padi*) befallenen Gerstenpflanzen gezeigt haben [Forslund et al., 2000].

Aufgrund der genannten Erkenntnisse über β -1,3-Glucanasen und von Chitinasen wäre eine Steigerung deren Expression nach der IES Behandlung zu erwarten gewesen. Auf den *Geni-one* Chips konnten jedoch Hinweise auf eine Herunterregulierung von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen in den IES behandelten Proben von Börner und Riesling gefunden werden. Gleiche Ergebnisse brachte die RT-PCR neben Börner und Riesling auch für SO4 hervor. Eine Erklärung für die starke Abnahme der Expression könnte bei der relativ hohen Konzentration der Auxinbehandlung liegen. So haben Shinshi et al. [1987] in Versuchen mit Tabakpflanzen feststellen können, dass die Induktion von Chitinasen und β -1,3-Glucanasen durch eine Kombination aus Auxin und Cytokinin inhibiert wird. Eine andere Untersuchung zeigte, dass die β -1,3-Glucanasen als Indikatoren der Fruchtreife bei Erdbeeren negativ durch Auxin reguliert werden [Harpster et al., 1998]. Möglicherweise wurden die β -1,3-Glucanasen und die Chitinasen in Börner, SO4 und Riesling zum Schutz der Zellen aufgrund des Überangebots an Auxin herunter reguliert. Der IES Reiz fungierte hier wohl nicht als Elicitor der Abwehrreaktion, sondern hat die Repression der Gene gefördert. Eine Beteiligung von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen in der IES induzierten HR in Börner ist daher fraglich.

Die durchgeführten Genexpressionsanalysen machten ferner deutlich, dass die β -1,3-Glucanase und die Chitinase in den unbehandelten Wurzeln von Börner höher exprimiert waren als in den Kontrollproben von SO4 und vom Riesling. Vergleichbares brachten auch Zhu et al. [1994] in Erfahrung. Eine konstitutiv hohe Ko-Expression von β -1,3-Glucanasen und Chitinasen führt zu einer gesteigerten Resistenz gegen Pilzinfektion in verschiedenen Pflanzen. Zum Beispiel nehmen die beiden Gene in der Abwehrreaktion gegen den Echten Mehltaupilz eine wichtige Rolle ein [Giannakis et al., 2008]. Da Börner neben der Resistenz gegen Rebläuse auch eine hohe Widerstandsfähigkeit gegen den Echten und den Falschen Mehltaupilz aufweist, ist hier möglicherweise die Bedeutung des hohen Grundgehalts der β -1,3-Glucanasen und Chitinasen zu sehen.

TLP

Zur Gruppe der PR-5 Proteine zählen die TLP, die laut der *Geniom one* und der RT-PCR Analysen signifikant durch IES in Börner, SO4 und Riesling herunter reguliert wurden. Die Namensgebung der Proteine ist auf deren Sequenzähnlichkeit mit dem Protein Thaumatin aus der Frucht des afrikanischen Strauches *Thaumatococcus daniellii* zurück zu führen [van der Wel und Loeve, 1972]. Ihre Rolle in der pflanzlichen Abwehr wurde erstmals vermutet, als das Zeamatin, ein TLP aus dem Mais, antifungale Aktivitäten gegen *C. albicans*, *N. crassa* und *T. reesei* [Roberts und Selitrennikoff 1990] zeigte. Der Mechanismus mit dem die TLP in der Abwehr gegen Pilze wirken ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird aber angenommen, dass sie sich in die Lipid Doppelschicht integrieren, Transmembranporen bilden und dadurch die Permeabilität erhöhen. [Anzlovar et al. 1998; Vigers et al. 1992]. Batalia et al. [1996] vermutete hingegen, dass die TLP Osmoregulatoren modulieren, die den Influx von Wasser und somit das Absterben der pilzlichen Hyphen verursachen.

Eine Beteiligung des TLP in Abwehrreaktion gegen Insekten oder chemischen Behandlungen ist in der Fachliteratur jedoch nicht zu finden. Zusammen mit der Tatsache, dass das Gen durch die IES Applikation herunter reguliert wurde, ist sein Mitwirken in der HR in Börner eher unwahrscheinlich.

LTP

Bei den Proteinen der PR-14 Familie handelt es sich um die LTP, eine Gruppe von Proteinen die befähigt sind ein breites Spektrum an Lipiden *in vivo* und *in vitro* zu transportieren. In den vorliegenden Genexpressionsanalysen konnte eine Herunterregulation des LTP in den IES induzierten Proben von Börner, SO4 und Riesling beobachtet werden. Ihre Rolle im

pflanzlichen Organismus wird in dem Einbau von Cutin und Wachs in die Zellwand vermutet [Kim et al., 2008]. Im Wein sind die LTP zudem in die Beerenreife involviert [da Silva et al., 2005]. Daneben werden LTP bei abiotischem Stress, wie Salz, Trockenheit, Kälte oder bei Behandlung mit SA, Ethylen oder Methyl-Jasmonaten exprimiert [Kim et al., 2006]. Zunehmend wird auch eine Funktion der LTP in der pflanzlichen Pathogenabwehr diskutiert. So zeigen sie eine erhöhte Expression als Reaktion auf Pilze, Bakterien, Viren in diversen Pflanzen [Buhot et al., 2004; Garcia-Olmedo et al., 1995]. Darüber hinaus konnten Maldonado et al. [2002] zeigen, dass die LTP in der Signaltransduktion während der Ausbildung einer SAR beteiligt sind. Das LTP1-Protein aus dem Tabak ist außerdem in der Lage, mit JA einen LTP1-JA-Komplex zu bilden [Buhot et al., 2004]. Diese Interaktion führt zu einer Konformationsänderung des LTP1 und ermöglicht dessen Bindung an einen Rezeptor. Diese Bindung führt zur Induktion von Abwehrmechanismen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse wäre anstatt der Herunterregulation des LTP eine Steigerung der Expression als Folge der Abwehrreaktion auf IES in Börner zu erwarten gewesen. Eine Erklärung geben Ergebnisse aus der Literatur, die besagen, dass LTP negativ durch Auxin reguliert werden [Song et al., 1998]. Außerdem entdeckten Coutos-Thévenot et al. [1993], dass die LTP durch ein Signal der somatischen Embryogenese induziert werden: die Blockierung des Auxins. Vermutlich führte auch im vorliegenden Fall die IES Behandlung nicht zur Induktion dieses Abwehrgens, sondern zu dessen Inhibierung.

PR-10

Die Proteine der PR-10 Familie wurden zuerst als wichtige Pollenallergene (BetV-1) von der weißen Birke identifiziert [Breiteneder et al., 1989]. Sie zeigen eine Homologie zu Ribonukleasen. Einige Mitglieder haben eine schwache ribonukleasen Aktivität, die mit der Rolle der PR-10 in der Pathogenabwehr in Verbindung gebracht wird [van Loon et al., 1994]. Sie werden im Pflanzengewebe nach einer Infektion mit Bakterien und Pilzen aktiviert und besitzen möglicherweise auch die Fähigkeit zur Degradierung viraler RNA [Park et al., 2004]. Es wird ferner vermutet, dass die PR-10 Proteine eine wichtige Rolle in der pflanzlichen Entwicklung spielen. Grund für diese Annahme ist deren konstitutive Expression in Wurzeln, Sproß, Samen und Blüten [Sikorski et al., 1999]. Die genaue physiologische Funktion und die Mitwirkung der PR-10 Proteine in Abwehrmechanismen sind jedoch bislang nicht geklärt.

PR-10 zeigte in Börner keine Induktion, sondern eine Herunterregulation von 7min bis 60min nach der IES Applikation. Das ist ein Ergebnis der eigens durchgeführten *Geniom*

one Studien. Auch Sikorski et al. [1999] konnten in Wurzelknötchen eine signifikante Abnahme in der PR-10 Expression entdecken. Die Autoren erklärten dieses Phänomen wie folgt: Da PR-10 Proteine normalerweise in Folge eines pathogenen Befalls induziert werden, erfolgt mit der Abschaltung dieser Gene eine Unterdrückung von Abwehrmechanismen und damit die Erkennung des Bakteriums als Mikrosymbionten. Zudem spielt das PR-10 nach Auffassung der Autorengruppe eher in generellen Entwicklungsprozessen der Pflanzen eine Rolle als in der Pathogenabwehr. Infolgedessen dürfte die Herunterregulation des PR-10 nach der IES Behandlung an Börner Wurzeln ebenfalls keine Abwehrreaktion in Gang gesetzt haben.

Interessanterweise zeigten die Ergebnisse der RT-PCR, dass ausnahmslos alle untersuchten PR-Gene in der unbehandelten Probe von Börner signifikant höher exprimiert waren als in denen von SO4 und vom Riesling. Der höhere Grundlevel an PR-Genen ist aller Wahrscheinlichkeit nach ein Zeichen dafür, dass die Sorte Börner effizienter auf verschiedene Formen von Stressreizen reagieren kann. Die Herunterregulation dieser Gene nach der IES Behandlung ist vermutlich, wie oben beschrieben, direkt auf die negative Wirkung von Auxin auf die PR-Gene zurück zu führen. Eine konkrete Bedeutung der Expressionsabnahme dieser Gene für die Mechanismen der Reblausresistenz in Börner ist demnach kaum ersichtlich. Es darf jedoch nicht die Sicht der Reblaus außer Acht gelassen werden. Die IES dient schließlich nicht nur als Elicitor für die Abwehrreaktionen der Pflanze, sondern sie soll den Angriff der Reblaus unterstützen. So wirkt sich die Herunterregulation der pflanzlichen PR-Proteine für den Reblausbefall positiv aus, da Abwehrreaktionen der Pflanze reduziert werden.

4.2.6 Zellwandproteine

Die Ergebnisse der *Geniom one* Analyse ließen Regulationen von drei Zellwandproteinen erkennen, die mittels der RT-PCR überprüft wurden. Dabei handelt es sich um das PRP, die XT und das PGIP. Die Bedeutung dieser drei Gene für die Pathogenabwehr wird im Folgenden diskutiert.

PRP

Die Familie der PRP gehört zu einer der drei großen Klassen an Zellwandproteinen in dikotylen Pflanzen. Neben den PRP existieren die hydroxyprolinreichen Glycoproteine (HRGP) sowie die glycinreichen Proteine. Diese drei Strukturproteinklassen beinhalten hoch repeti-

tive Peptide mit charakteristischen Motiven. Bei den PRP handelt es sich meist um Val-Tyr-Lys-Pro-Pro oder verwandte PRP Pentamere [Varner und Lin, 1989]. Die PRP übernehmen eine wichtige Funktion in der Zellwandarchitektur, da sie mit nicht-proteinösen Komponenten interagieren können. Versuche mit Karotten und Sojabohnen haben gezeigt, dass die PRP als Folge einer Verwundung und während der ersten Phase der Bildung von Wurzelknötchen exprimiert werden [Chen und Varner, 1985]. Es wird daher vermutet, dass die PRP Expression im Zusammenhang mit der Remodulation der Zellwand nach einem Pathogenbefall steht [Sheng et al., 1991]. Die PRP liegen in der Regel gelöst vor, werden in einer frühen Phase der Pathogenabwehr induziert und über ein *cross-linking* (Quervernetzung) in eine unlösliche Form überführt. Katalysiert wird dieser Vorgang durch Peroxidasen in Gegenwart von H₂O₂, das auf Grund des *oxidative burst* im Verlauf einer HR in großen Mengen vorliegt. Das *cross-linking* der PRP führt zu einer erhöhten Festigkeit und Widerstandsfähigkeit der Zellwand [Bradley et al., 1992]. In diesem Zusammenhang wird angenommen, dass auch das Prolin vor oxidativen Schäden durch ROS schützt [Chen und Murata, 2002].

Weder die *Geniom one* noch die RT-PCR Analysen zeigten eine Induktion des PRP. Stattdessen kam es in beiden Verfahren durch die IES Behandlung der Rebwurzeln zu einer signifikanten Herunterregulation des PRP. Diese fiel in Börner deutlich stärker aus als in SO4 und im Riesling. Analog zu diesen Ergebnissen konnten Sheng et al. [1991] und Zhang et al. [1993] zeigen, dass nach einer Behandlung von Bohnenzellen mit einem pilzlichen Elicitor die Expression des PRP bis zu 24h lang herunter reguliert wurde. Sie vermuteten, dass das PRP ein wichtiger Bestandteil der Zellwand in der normalen Entwicklung darstellt, aber keine effektive Komponente in der Verstärkung der Zellwand ist, wie sie während einer Abwehrantwort auftritt. Sauer et al. [1990] gehen im Zusammenhang mit der dynamischen Remodulation der Zellwand während einer Pathogenantwort von zwei koordinierten Prozessen aus. Auf der einen Seite vermuten sie Gene, die aktiviert werden und deren Produkte eine effektive Barriere gegen den Pathogenbefall darstellen. Auf der anderen Seite gibt es ihren Untersuchungen zur Folge Gene, die deaktiviert werden und deren Produkte der Funktionalität der Zellwand während des Pflanzenwachstums dienen. Des Weiteren konnten Toppan et al. [1982] an Melonen feststellen, dass das pathogen-induzierte Ethylen einen positiven Einfluss auf die Synthese des HRGP nimmt. Bei den PRP jedoch scheint das Hormon nicht für eine Akkumulation verantwortlich zu sein. So zeigten Studien von Tierney et al. [1988] an Karottenwurzeln eine Herunterregulation des PRP nach einer Ethylenbehandlung. Für eine Reaktion zwischen PRP und Ethylen in der vorliegenden Arbeit spricht, dass das PRP das

Motiv der GCC-Box in seiner Sequenz enthält, an die das ERF binden kann (vgl. Kap. 4.2.2). Nach der IES Behandlung der Rebwurzeln könnte daher folgendes Szenario passiert sein. Durch das induzierte IES kam es zu einer *de novo* Synthese von Ethylen, was negativ auf die PGP Expression wirkte. Damit lassen sich die Ergebnisse von Tierney et al. [1988] bestätigen. Durch die negative Expression könnte es dann zu einer Kooperation mit anderen Zellwand-assoziierten Genen gekommen sein, die die Entstehung einer Barriere gegen Pathogene fördern. Zu diesen Genen könnte die XT gehören, die – wie es nachstehend noch zu zeigen gilt – in den vorliegenden Analysen eine deutliche Hochregulation in den IES behandelten Börner Proben zeigte. Zusätzlich stellt sich die Frage nach der Bedeutung des 2,5-fach höheren Basislevels des PRP in Börner verglichen mit SO4 und mit Riesling. Möglicherweise liegt hier nicht der Mechanismus der Reblausresistenz, sondern der Mehlttauresistenz zu Grunde. Für diese Annahme spricht die schon diskutierte Widerstandsfähigkeit von Börner gegen den Mehlttaupilz. Nach Deepak et al. [2007] beispielsweise ist die Menge an HRGP in mehlttauresistenten Pflanzensorten mindestens doppelt so hoch wie in anfälligen Sorten. So könnte der hohe PRP Level in den unbehandelten Wurzeln von Börner auf eine Mehlttauresistenz dieser Unterlagsrebe hindeuten.

XT

Xyloglucan ist ein Polysaccharid und Bestandteil pflanzlicher Zellwände. Gespalten und reformiert werden die Xyloglucanverbindungen durch die XT. Letztere sind auch am Transfer von Xyloglucanketten beteiligt, d.h. für den Umbau der Zellwand essenziell und verantwortlich für die Zellwandarchitektur, -stärke und -dehnbarkeit. Darüber hinaus sind die XT in der Fruchtreife beteiligt und spielen für die Pathogenabwehr eine Rolle. So konnten Divol et al. [2007] zeigen, dass es zu einer Induktion der XT nach einem Befall mit Blattläusen kommt. Sie vermuteten daher, dass die XT Modifikationen in den Zellwänden der Pflanze hervorruft, die gegen den Blattlausangriff schützen. Ferner ist aus Studien bekannt, dass eine Behandlung mit Ethylen und auch mit Auxin die Induktion der XT Expression stimuliert [Saab und Sachs, 1996; Catalá et al., 1997].

Vorstellbar wäre eine solche Induktion auch nach der IES Behandlung der Börner, SO4 und Riesling Wurzeln. So könnte die Behandlung von Auxin zu einer Induktion des Ethylen geführt haben. Daraus resultierte dann wahrscheinlich die gestiegene Expression der XT in den IES behandelten Wurzeln. Der signifikant höhere Level an XT in den unbehandelten Börner Wurzeln im Vergleich zu SO4 und Riesling, verbunden mit einer deutlich stärkeren Hochregulation des Gens, könnte aber auch mit dem gleichfalls erhöhten Gehalt des ERF und des

ETR in Börner erklärt werden. Denkbar ist ferner, dass die hohe Expression des XT in Zusammenhang mit der Nekrosenbildung in Börner steht. Eventuell kam es durch die Auxin-vermittelte Hochregulation des Gens zu Zellwandmodifikation, die eine Abgrenzung bzw. Isolierung der infizierten Geweberegionen zu Folge hatte, wie sie bei Nekrosen zu beobachten ist. Bei einem realen Reblausbefall wären so die Ausbreitung des Pathogens und die Entstehung von Sekundärinfektionen verhindert.

PGIP

Pathogene besitzen eine Vielzahl an Enzymen, die die Polysaccharide pflanzlicher Zellwände zerstören können. Ein solches Enzym ist die Polygalacturonase (PG), das in einer frühen Phase der Infektion abgesondert wird und das Homogalacturonan durch Abspaltung der α -1,4 glycosidischen Bindungen zwischen der Galacturonsäure depolymerisiert [De Lorenzo et al., 2001]. PG werden von Bakterien, Pilzen, Nematoden und Insekten produziert [Desiderio et al., 1997; De Lorenzo und Ferrari, 2002]. Besonders die PG aus den Speicheldrüsen von pathogenen Insekten können großen Schaden an der Pflanze verursachen [Ma et al., 1990]. Viele Pflanzen produzieren daher extrazelluläre PGIP, die die PG von Pilzen und Insekten erkennen und inhibieren können [De Lorenzo und Ferrari, 2002]. PGIP gehören zur Familie der LRR Proteine, die auf Interaktionen zwischen Proteinen spezialisiert ist [Di Matteo et al., 2003]. Die PG-PGIP Interaktion limitiert das destruktive Potential der PG und führt, wie die Autorengruppe *in vitro* zeigen konnte, zu einer Akkumulation von Oligogalacturoniden. Diese Oligosaccharide erfüllen eine Elicitor Funktion und aktivieren wohl die Expression weiter pflanzlicher Abwehrgene, wie von Phytoalexinen, ETR, Glucanasen, Chitiansen und PAL [De Lorenzo et al., 1997; Ridley et al., 2001]. Ferner verlangsamt die Inhibierung pilzlicher PG durch PGIP die Ausbreitung von Nekrosen, wie Powell et al. [2000] in Versuchen mit Tomatenpflanzen belegen konnten.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde im Bezug auf das PGIP eine signifikante Herunterregulation in den IES behandelten Proben von Börner festgestellt. In SO4 und im Riesling hingegen fiel die Abnahme der Genexpression deutlich schwächer aus. Die untersuchten Wurzelproben wurden jedoch nicht mit Rebläusen infiziert, sondern mit IES behandelt. Dadurch kann es nicht zu einer Interaktion des PGIP mit möglichen PG aus dem Reblauspeichel gekommen sein. Zumal es auch nicht zu einer Aktivierung, sondern zu einer Repression des Gens gekommen ist. Die Funktion der PGIP im Auxin induzierten Resistenzmechanismus bei Börner zu bewerten ist daher problematisch. Auch die Literatur liefert keine Hin-

weise auf eine mögliche Wechselwirkung von PGIP mit Auxinen oder Ethylen. Möglicherweise war die Herunterregulation ein Schutzmechanismus der Wurzel auf den hohen Auxin-gehalt. Für diese Annahme spricht die Tatsache, dass die negative Regulation des PGIP schon nach der frühen IES Induktionszeit von 7min signifikant zu beobachten war.

In den Analysen zu dieser Arbeit wurde ferner eruiert, dass das PGIP in den unbehandelten Proben um nahezu das zehnfache höher exprimiert war als in den unbehandelten Wurzeln von SO4 und vom Riesling. Das könnte ein Hinweis dafür sein, dass Börner durch das höhere Grundlevel des PGIP schneller und effektiver auf einen realen Reblausbefall reagieren kann als die tolerante bzw. die anfällige Sorte.

4.2.7 DRP und Hitzeschockproteine

Die DRP, oder auch R-Proteine genannt, dienen der Pflanze der spezifischen Erkennung eines Pathogens. Durch die genetische Interaktion des R-Proteins mit dem passenden avr-Protein des Pathogens kommt es zu einer raschen Induktion von Abwehrreaktionen, die in den meisten Fällen zur Ausbildung einer HR führt. In Abwesenheit von Pathogenen liegen die DRP in hetero-multimerisierten Proteinkomplexen vor, was eine Aktivierung von Abwehrreaktionen durch die DRP verhindert. Eine Erkennung und Interaktion zwischen avr- und R-Protein führt zur Änderungen des Komplexes und zur Aktivierung von Abwehr initierenden Signalkaskaden. Für diese Vorgänge werden weitere Komponenten benötigt. Man geht davon aus, dass R-Proteine eine Reihe von stabilisierenden und die Signaltransduktion unterstützenden Proteinen benötigen. Zu diesen Proteinen werden das Hsp90, das SGT1 (*suppressor of G-two allele of skp1*) und das RAR1 (*required for Mla12 resistance*) gezählt [Takahashi et al. 2003].

Das erstgenannte Hsp90, welches in der *Geniom one* Analyse eine signifikant positive Regulation in der 7min Probe von Börner zeigte, ist ein abundant vorkommendes molekulares Chaperon. Die Chaperone (engl.: Anstandsdame) haben die Aufgabe, die Fehlfaltung und irreversible Verklumpung neusynthetisierter Proteinketten zu verhindern. Die Expression einiger Chaperone wird unter Stressbedingungen für die Zelle, wie z.B. erhöhte Temperatur oder chemischer Stress, induziert oder verstärkt. Deshalb sind diese Proteine auch unter dem Namen Hitzeschockproteine (Hsp) bekannt [Zusammengefasst in Mayer und Bukau, 1999]. Die Hsp sind demnach nicht nur für die Faltung neusynthetisierter Proteine erforderlich, sondern auch für die Reparatur von Proteinketten, die sich unter Zellstress wie hoher Temperatur fehlgefaltet haben [Hattori et al., 1993].

Abbildung 4.4 veranschaulicht den Aufbau des Hsp90, des SGT1 und des RAR1. Wie zu erkennen ist, bestehen alle drei Proteine aus drei Domänen. Im Hsp90 ist ein N-terminales ATP-bindendes Modul (NTD), eine mittlere Bindungsdomäne und eine C-terminale Dimerisierungsdomäne zu finden. Die SGT1 Proteine besitzen neben einer SGS (*SGT1 specific domain*), eine TRP (*tetratricopeptide repeat*) und eine CS (*CHORD and SGT1 motif*) Domäne. Dagegen weist das RAR1 sogenannte CHORD (*cystein and histidine-rich domain*) Domänen auf. Sowohl die CHORD Domäne des SGT1 als auch die CS Domäne des RAR1 vermitteln eine Bindung an das Hsp [Botër et al., 2007; Takahashi et al. 2003]. Biochemische Analysen belegen, dass SGT1 und RAR1 als Co-Chaperon des Hsp90 fungieren. Vermutlich bildet das Hsp90 zusammen mit dem RAR1 und dem SGT1 einen Chaperon-Komplex, der die Proteinfaltung von den DRP vermittelt und/oder sie in funktionale Komplexe überführt. Nullmutanten der entsprechenden Gene haben eine deutlich reduzierte Akkumulation von R-Proteinen in Abwesenheit von Pathogenen zur Folge.

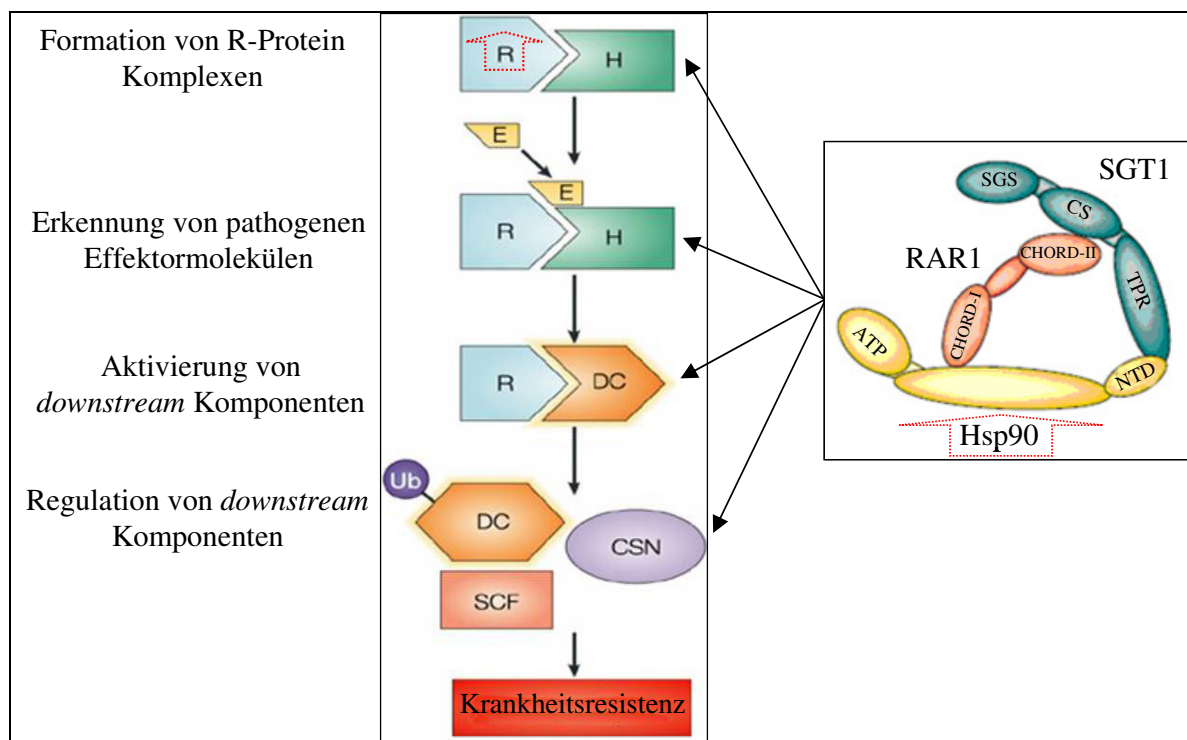


Abbildung 4.4: Model des R-Protein abhängigen Krankheitsresistenz-Signalweges mit der Beteiligung des Hsp90

R: DRP, H: *Host Protein*, DC: *downstream Komponenten*, CSN: *COP9 signalosome*; SCF: *stem-cell factor*; E: Effektormolekül, Ub: Ubiquitin. Rote Pfeile: In IES behandelten Börner Wurzeln hoch regulierte Proteine.

(Quelle: In Anlehnung an Shirasu und Schulze-Lefert [2003] und Sullivan et al. [2003])

Der Hsp90-RAR1-SGT1 (HRS) Komplex ist vermutlich an vier verschiedenen Phasen der DRP abhängigen Resistenz beteiligt. Wie obiges Ablaufschema zeigt, ist einmal eine Beteiligung in der Formation eines Komplexes von R-Proteinen mit *Host* Genen möglich. Denkbar ist auch, dass der HRS Komplex die Aktivierung der komplexierten R-Proteine während der Erkennung eines pathogenen Effektormolekül fördert. Die Aktivierung von *downstream* Komponenten stellt den dritten Schritt im R-Protein-Signalweg dar, der vom HRS Komplex reguliert sein könnte. Zuletzt wird eine Partizipation des HRS Komplexes in der Regulation von *downstream* Komponenten vermutet. Diese Regulation wird durch eine Ubiquitylierung kontrolliert, die von zwei Komplexen, dem SCF (*stem-cell factor*) und dem CSN (*COP9 signalosome*), vermittelt wird. Der HRS Komplex könnte dabei negative Regulatoren inhibieren und positive Regulatoren entsprechend aktivieren [Shirasu und Schulze-Lefert, 2003]. Wenn der HRS Komplexes R-Proteine stabilisiert führt das zur *nonhost resistance* in den verschiedensten Pflanze-Pathogen-Interaktionen. Bei einer Infektion von Arabidopsispflanzen mit *Pseudomonas syringae* konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Auslösung einer HR und die Resistenz der Pflanze gegen dieses Pathogen nicht allein von der Interaktion zwischen dem R- und dem avr-Protein, sondern von dem HRS Komplex verursacht wird [Takahashi et al. 2003; Zhang et al., 2004]. Eine Inhibierung einer der drei Komponenten des Komplexes führte zum Ausbleiben der HR. Die Studie von Kanzaki et al. [2003] wies nach, dass Hsp90 zusammen mit SGT1 R-Proteine stabilisieren und so die *nonhost resistance* im Tabak vermittelt.

Die mögliche Bedeutung der DRP und des Hsp90 für die HR in Börner ist zu erklären. In der vorliegenden Studie wurde der Reblausbefall durch die IES Behandlung simuliert. Aus diesem Grund können avr-Gene keine Rolle bei der deutlichen Zunahme der DRP Expression in den behandelten Wurzeln von Börner gespielt haben. Eine Bewertung der Funktion solcher R-Proteine im Auxin induzierten Resistenzmechanismus bei Börner ist daher problematisch. Die Literatur liefert keine Hinweise auf eine mögliche Wechselwirkung von R-Proteinen mit Auxinen. Für die Induktion des DRP auf die IES Behandlung sind jedoch zwei Erklärungen möglich. Erstens ist es denkbar, dass die DRP direkt durch IES oder indirekt durch Komponenten aktiviert worden sind, die ihrerseits durch IES induziert wurden. Dies könnte eine Initiierung von Abwehrreaktionen zur Folge gehabt haben. Zum zweiten könnte die IES Behandlung zu einer Überexpression des DRP geführt haben. Wie bereits geschildert verhindert die Komplexbildung des DRP mit anderen Proteinen eine die Auslösung von Abwehrreaktionen in Abwesenheit von Pathogenen. Zhang et al. [2004] zeigten, dass bei einer Über-

expression des R-Gens nicht alle R-Proteine in dem beschriebenen Proteinkomplex gebunden werden. Der damit verbundene Überschuss an freien, nicht im Komplex gebundenen R-Proteinen kann zur Aktivierung von Resistenzreaktionen und von der HR auch in Abwesenheit eines avr-Proteins führen [Tang et al., 1999]. Vergleichbares wäre auch in den IES behandelten Wurzeln in Börner denkbar. Die frühe und intensive Erhöhung der DRP Expression in den behandelten Börner Wurzeln spricht für die These einer Überproduktion des Gens und dessen Beteiligung im nachfolgenden Resistenzmechanismus. Ferner ist der signifikant höhere Level des DRP in der unbehandelten Börner Probe verglichen mit den unbehandelten Proben von SO4 und vom Riesling ein Zeichen dafür, dass Börner besser auf einen Pathogenbefall reagieren kann.

Die *Geniom one* Analyse zeigte ferner, dass das Hsp90 7min nach der IES Behandlung nur in Börner und nicht in Riesling hoch exprimiert wurde. Da zu dieser IES Induktionszeit auch das DRP in Börner in seiner Expression gesteigert wurde ist es denkbar, dass es zu einer Interaktion zwischen dem Hsp90 und dem DRP in Börner gekommen ist. Vorausgesetzt, dass ein komplexiertes DRP Abwehrreaktionen verhindert, dürfte das DRP nicht zu der HR in Börner beigetragen haben. Untersuchungen am Tabak von Zhang et al. [2004] bewiesen jedoch gegenteiliges. Ein R-Protein benötigt das Hsp90, um in Abwesenheit eines avr-Proteins eine HR auszulösen. Die Autoren vermuteten, dass es dem R-Protein erst mit Hilfe des HSp90 möglich wird, *downstream* Komponenten zu aktivieren und so die HR auszulösen. Es ist daher vorstellbar, dass das Hsp90 auch in dem IES induzierten Resistenzmechanismus in Börner mit dem DRP interagiert und so zur HR beigetragen hat.

4.2.8 Allgemein Stress-assoziierte Gene

Die *Geniom one* Analysen ließen Regulationen in Genen erkennen, die keiner genauen Gruppe zugeordnet werden können. Diese Gene werden hier deshalb als allgemein Stress-assoziierte Gene zusammengefasst und nach ihrer Bedeutung für die Abwehrreaktion auf IES in Börner diskutiert.

Alcohol dehydrogenase (ADH)

Die ADH wird durch ein breites Spektrum an Stressstimuli induziert. Dazu zählen die Behandlung mit Fettsäuren, Salizylsäure, UV Licht und niedrigen Temperaturen [Jarillo et al., 1993; Matton et al., 1990] und die exogene Gabe von Ethylen und Abscisinsäure (ABA - *abscisic acid*) [Fuchs und Gertman, 1974; Bruxelles et al. 1996]. Des Weiteren konnte man

eine Akkumulation der ADH unter sauerstoffarmen Bedingungen feststellen. Jarillo et al. [1993], Kanellis et al. [1991] und Matton et al. [1990] schrieben der ADH deswegen eine Rolle im anaeroben Metabolismus zu. Heute wird die ADH auch als Marker für Redoxstress in verschiedenen Untersuchungen verwendet [Robertson et al., 1995]. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl auf den *Geniom one* Chips als auch in der RT-PCR eine ausgeprägte Hochregulation des Gens nach 90min IES Behandlung festgestellt werden, die in Börner stärker ausfiel als in SO4 und im Riesling. Die deutliche Induktion der ADH kann drei Ursachen haben. Bekanntlich kommt es im Verlauf einer HR zu einer erhöhten Produktion von ROS (siehe Kap. 1.5.2). Dabei könnte die Expression der ADH in Börner durch einen Sauerstoffmangel in den Zellen stimuliert worden sein. Zudem ist die Induktion möglicherweise ein Zeichen dafür ist, dass überhaupt ein *oxidative burst* stattgefunden hat. Als zweites ist eine transkriptionelle Aktivierung der ADH durch das MYB denkbar, dass ebenfalls nach 90min in Börner hoch reguliert wurde (vgl. Kap. 4.2.4 Transkriptionsfaktoren). MYB sind für die stressinduzierte ADH Expression wichtige TF [Hoeren et al., 1998]. Die Regulation der ADH erfolgt dabei durch eine Bindung des MYB an zwei Seiten des ADH Promotors. Ferner konnte eine Studie von Fuchs und Gertman [1974] zeigen, dass ADH durch Ethylen aktiviert wird. Weil Auxin die Ethylenproduktion stimuliert, könnte hier die dritte Erklärung für die Induktion der ADH in den 90min IES behandelten Wurzeln von Börner als auch von SO4 und vom Riesling liegen.

Es bleibt aber weiterhin zu klären, warum (außer in der 90' Probe) in allen anderen IES behandelten Proben der drei Sorten eine signifikante Herunterregulation des ADH gefunden wurde. In der Literatur gilt das Ethanol als bekanntester pflanzlicher ADH Inhibitor [z.B. Mukherjee et al., 2006]. Seine Beteiligung im Resistenzmechanismus in Börner erscheint unwahrscheinlich, weswegen die negative Regulation der ADH vermutlich eher als Überreaktion auf den Auxinstress zurückzuführen ist.

Adventitious rooting related oxygenase (ARRO)

Die ARRO ist eine 2-Oxosäure abhängige Dioxygenase und weist nur eine geringe Sequenzidentität mit anderen Dioxygenasen, etwa der ACC, auf. Butler und Gallagher [1999] führten Untersuchungen über die ARRO an Apfelkeimlingen durch. Dabei konnte zweierlei festgestellt werden. Erstens wurde nachgewiesen, dass die ARRO während der Seitenwurzelbildung im Apfel hoch reguliert wird. Als zweites fand man heraus, dass eine IBA und eine IES Behandlung zu einer Aktivierung der ARRO Genexpression führt [Butler und Gallagher, 2000]. Da exogenes IBA bekanntermaßen zu IES konvertiert wird, ist anzunehmen, dass die

ARRO nicht direkt durch IBA, sondern hauptsächlich durch IES aktiviert wird. Die ARRO wird daher auch oft zu den Auxin induzierten und Auxin sensitiven Wachstumsgenen gezählt.

Danach wäre eine ARRO Genexpressionssteigerung in den IES behandelten Wurzeln von Börner, SO4 und Riesling zu erwarten gewesen. Die *Geniom one* und RT-PCR Analysen haben dies jedoch nur in Riesling gezeigt. In Börner und SO4 hat die Behandlung mit IES zu einer signifikanten Herunterregulation der ARRO geführt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch Siemens et al. [2006] machen. Dort resultierte die Infektion von Arabidopsis Pflanzen mit *Plasmodiophora brassicae* ebenfalls in einer negativen Regulation der ARRO. Da sich weder eine Bedeutung in der Herunterregulation der ARRO in Börner, noch eine Funktion des Gens in der Pathogenabwehr aus der Literatur erkennen lassen, ist ein spezifischer Einfluss der ARRO in dem IES induzierten HR Mechanismus in Börner eher unwahrscheinlich. Die negative Regulation der Auxin-sensitiven ARRO ist vermutlich als Schutzmaßnahme auf den hohen Auxinlevel in den behandelten Proben zurückzuführen.

Dehydrin-like protein

Dehydrin-like proteins oder Dehydrins (DHN) sind in Pflanzen aufgrund ihrer Akkumulation in Folge von Wasserstress, niedrigen Temperaturen, Verwundung oder ABA Behandlung identifiziert worden [Van Zee et al., 1995; Rouse et al., 1996]. Sie werden für die Toleranz gegen Dehydration in der Pflanze verantwortlich gemacht [Bravo et al., 1999]. Die DHN fungieren dabei als Kühlprotektoren, indem sie Makromoleküle oder zelluläre Strukturen bei reduzierter Flüssigkeitszufuhr infolge von Frost stabilisieren [Close, 1996]. Während zahlreiche Studien über die Funktion der DHN in Kälte- und Trockenstress existieren, ist über eine Rolle der DHN in der Pathogenabwehr weniger bekannt. Turco et al. [2004] aber untersuchten die Expression eines DHN in Trockenheitsanfälligen und -toleranten Eichen nach einer Infektion mit *Phytophthora cinnamomi*, der Wurzelfäule. In den toleranten Pflanzen war die Expression des DHN vor der Infektion deutlich messbar und danach signifikant erhöht. Dahingegen konnte in den anfälligen Eichen weder vor noch nach der Infektion eine Expression des Proteins verzeichnet werden. Das DHN scheint demnach neben seiner Reaktion auf abiotischen Stress auch in der Antwort auf einen Pathogenbefall involviert zu sein. Richard et al. [2000] haben zudem nachweisen können, dass Ethylen, als Signalsubstanz in der Pathogenabwehr, einen positiven Effekt auf die Expression von DHN ausübt. Dies könnte im Zusammenhang mit der von Fujimoto et al. [2000] getroffenen Aussage stehen, dass

das DHN eine GCC-Box in seiner Sequenz beinhaltet, an die ein ERF binden kann (vgl. Kap. 4.2.2).

Anhand dieser Erkenntnisse ist es verwundernswert, dass die *Geniom one* Analyse keine Steigerung der Genexpression dieses Proteins erkennen ließ, sondern eine, ausschließlich in Börner aufgetretene, Herunterregulation 7min nach der IES Applikation. Eine mögliche Erklärung könnte sich durch Untersuchungen an ERF in Arabidopsis finden lassen [Fujimoto, 2000]. Die fünf in Arabidopsis gefundenen ERF haben unterschiedliche Wirkung auf die Gene an die sie binden. Während AtERF1, AtERF2 und AtERF5 als Aktivatoren der GCC-Box abhängigen Transkription fungieren, können AtERF3 und AtERF4 die Expression einiger Abwehrgene unterdrücken. Dass der ERF nach der IES Behandlung in Börner hoch reguliert wurde, könnte für seine Wirkung als Repressor auf das DHN sprechen. Die Frage nach der Bedeutung des Proteins für die HR in Börner bleibt damit jedoch offen. Mit Blick auf die ausschließlich und sehr frühe Repression des DHN in Börner ist sie möglicherweise einzig ein Indikator für die Stresssituation in den behandelten Wurzeln.

Grape Ripening Induced Proteins

Die *Geniom one* Analyse lieferte Hinweise auf eine Regulation von fünf *Grape Ripening Induced Proteins* (Grip). Mittels eines differentiellen Screening ist es Davies und Robinson [2000] gelungen verschiedene cDNAs zu isolieren, die während der Weinbeerenreife induziert werden. Auf diese Weise konnten die Autoren 17 Grip identifiziert, die größtenteils Homologien zu den Zellwandproteinen und den Stress-induzierten Proteinen aufweisen. Bei den in der *Geniom one* Analyse gefundenen Grip handelt es sich um das Grip3, Grip21, Grip32, Grip55 und Grip68. Sowohl das Grip3 als auch das Grip68 gehören zu den Zellwandproteinen und weisen aufgrund ihrer Prolinreichen Sequenz Ähnlichkeiten zu den PRP (vgl. Kap. 4.2.6) auf. Das Protein des Grip55 scheint ein Mitglied der basischen Leucin zipper Familie der Transkriptionsfaktoren zu sein und wird zu den Thaumatin-ähnlichen Proteinen gezählt. Aufgrund seiner Ähnlichkeit zu einem *Dc3 Promoter-binding factor*, ein ABA-verantwortliches Element des Karottengen *Dc3*, wird dem Grip55 eine Rolle in der ABA-induzierten Genexpression während der Beerenreife zugesprochen. Das Grip21 und das Grip32 werden aufgrund ihrer Homologien zu Genen aus anderen Organismen zu den Stress-induzierten Proteinen gezählt. So wurden Sequenzübereinstimmungen des Grip32 mit Genen aus der Zitrone und der Sojabohne gefunden, die bei niedrigen Temperaturen induziert werden und daher in der Adaption auf Temperaturstress involviert sind [Takahashi et

al., 1994]. Einige dieser Gene werden durch Trockenheit, Verwundung oder auch virale Infektionen induziert [Takahashi et al., 1994].

Die Reaktion des Grip32 wurde in der vorliegenden RT-PCR auf eine IES Behandlung hin untersucht. Es konnte eine deutliche Hochregulation des Gens ab eine Behandlungszeit von 30min festgestellt werden, die in Börner stärker ausfiel als in SO4 und im Riesling. Die Induktion des Grip32 ist vermutlich auf den Auxinstress in den Wurzel zurückzuführen. Auch Davis und Robinson [2000] nahmen an, dass eine Korrelation zwischen dem Auxingehalt und der Grip Induktion besteht. Die höhere Expression in den IES behandelten Börner Wurzel könnte ein Indiz dafür sein, dass die Pflanze besser auf den hohen Auxingehalt reagieren kann.

Universal stress protein

Die Familie der USP hat eine Vielzahl an Mitgliedern. Sie können in den Genomen von Protozoen, Bakterien, Pilzen und Pflanzen gefunden werden. Am besten ist das *UspA* in *E.coli* untersucht. Das *UspA* ist eine autophosphorylierendes Serin und Threonin Phosphoprotein, das entweder GTP oder ATP als Phosphat Donator benutzt [Freestone et al., 1997]. Typischerweise wird das USP durch verschiedene abiotische Stressstimulantien induziert. Dazu zählen das Fehlen von Phosphaten, Stickstoff, Sulfaten oder Aminosäuren sowie Behandlungen mit Hitze, Metallen oder Antibiotika [Kvint et al., 2003]. Folglich wäre zu erwarten gewesen, dass die IES Behandlung an den Rebenwurzeln eine Erhöhung der USP Expression zur Folge hat. Die RT-PCR Analyse zeigte jedoch das Gegenteil. Besonders in den Börner Wurzel hat die IES Induktion eine deutliche Herunterregulation des USP bewirkt. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Experimente mit dem *UspA* in *E.coli* gemacht werden. Dort wurden einige abiotische Bedingungen, wie extreme Temperaturen oder die Belastung mit Tetrazyklin, gefunden, die eine Repression statt einer Induktion des Gens zur Folge hatten [Kvint et al., 2003]. Weiterhin ist bekannt, dass der Gehalt von dem USP Regulator ppGpp (*guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate*) nach einem Kälteschock oder einer Tetrazyklin Behandlung reduziert ist [Gustavsson, 2002; Kvint et al., 2003]. Andere Studien mit *E.coli* zeigten, dass eine Repression des ppGpp die Induktion weiterer Stress assoziierten Gene stimuliert [Jones et al., 1992]. Neben einer stärkeren Repression des USP in den IES behandelten Börner Proben im Vergleich zu denen von SO4 und vom Riesling, konnte auch in Börner ein höheres Grundlevel des Gens in den unbehandelten Wurzeln gefunden werden. Beides könnte zur Folge haben, dass die aus der Herunterregulation des USP resultierende

Repression des ppGpp eine stärkere Induktion von Abwehrgenen in Börner als in SO4 und im Riesling bewirkt hat.

4.3 Zusammenspiel der durch IES regulierten Gene im Resistenzmechanismus in Börner

In dieser Arbeit konnte eine Reihe von Genen identifiziert werden, die in Börner Wurzeln durch eine IES Applikation reguliert werden. Wie die Diskussion über die Funktion und die potentielle Bedeutung der Gene in der HR in Börner gezeigt hat, dürfen diese Gene nicht unabhängig voneinander betrachtet werden. Schließlich finden Interaktionen zwischen ihnen statt. Um die Börner charakteristischen Abwehrreaktionen zu erkennen, ist es von Bedeutung, das Zusammenspiel der durch IES regulierten Gene zu verstehen. Dazu soll die unten stehende Abbildung 4.5 beitragen. Sie fasst alle gefundenen Gene und die Richtung ihrer Regulation in den IES behandelten Börner-Proben zusammen. Außerdem macht sie die Wechselwirkungen zwischen den Genen deutlich. Nicht zuletzt veranschaulicht sie die Bedeutung der Gene in der HR bzw. für die Resistenz in Börner. Alle fett abgekürzten Gene stehen für eine intensivere Regulation in Börner bei Gegenüberstellung mit den Sorten SO4 und Riesling.

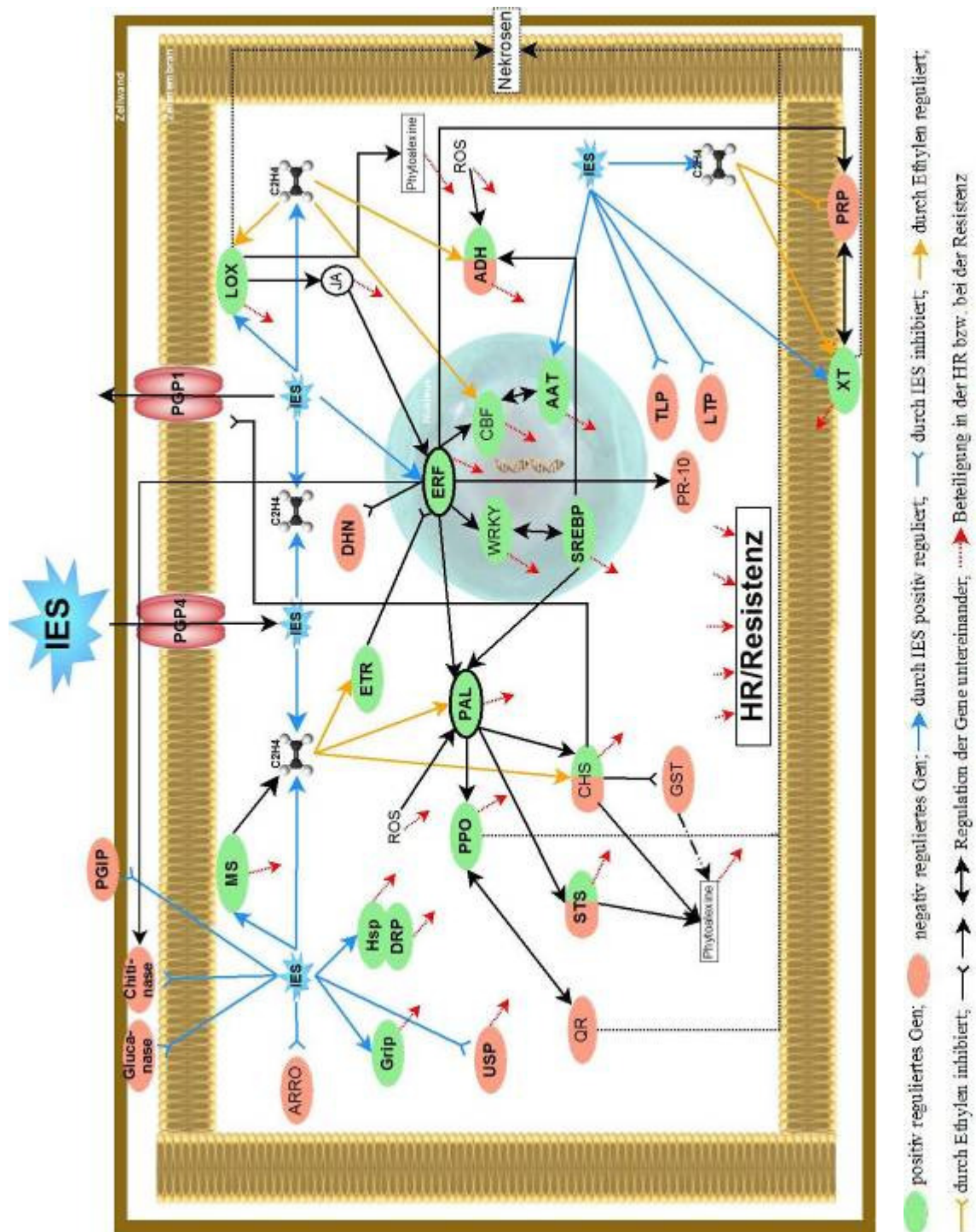


Abbildung 4.5: Zelluläres Modell des Zusammenspiels der durch IES regulierten Gene und ihre mögliche Beteiligung in der HR bzw. bei der Reblausresistenz in Börner

Alanine acetyl transferase (AAT), Alcohol dehydrogenase (ADH), Adventitious rooting related oxygenase (ARRO), Chalcone synthase (CHS), Dehydrin-like protein (DHN), Disease resistance protein (DRP), Ethylene response factor (ERF), Ethylenrezeptor (ETR), Ripening protein (Grip), Glutathione S-transferase (GST), Heat-shock protein (Hsp), Lipoxigenase (LOX), Lipid transfer protein (LTP), Methionine synthase (MS), Phenylalanine ammonialyase (PAL), Polygalacturonase inhibiting protein (PGIP), P-Glykoprotein1 (PGP1), Glykoprotein4 (PGP4), Polyphenol oxidase (PPO), PR protein (PR10), Proline-rich protein (PRP), Quinone reductase (QR), Sucrose responsive element binding protein (SREBP), Stilbene synthase (STS), Transcription factor (TF), Thaumatin-like protein (TLP), Universal stress protein (USP), Xyloglucan-transglycosylase (XT), Ethylen (C2H4), Hypersensitivitätsreaktion (HR), Indol-3-Essigsäure (IES), jasmonic acid (JA), reactive oxygen species (ROS).

Auslöser der Abwehrreaktionen in dem vorliegenden Versuchsmodell ist die IES. Die Erkennung des Hormons und seine Einschleusung in die Zelle können durch PGP4 erfolgen. Dieser Transporter wurde in Börner 7min nach der IES Applikation stark hochreguliert. Im Gegenzug dazu kann der gleichso relativ früh hochregulierte PGP1 Transporter überschüssiges IES aus der Zelle heraus befördern. PGP1 und PGP4 zeigten in den IES behandelten Wurzeln von Börner eine auffällige Expressionssteigerung, die sich weder in SO4 noch in Riesling beobachten ließ. Für den weiteren Verlauf der Abwehrreaktion sind die Regulation der Auxintransporter und die Auxinkonzentration in der Zelle deswegen bestimmende Faktoren.

Nach ihrer Einschleusung über die Zellmembran fördert die IES die Aktivierung der ACC-Synthase. Dabei wird Ethylen gebildet. Gemäß dem Schaubild wird der Herstellungsprozess durch MS, einem durch IES hochreguliertes Gen, begünstigt. IES und Ethylen haben auf die Mehrzahl der gefundenen Gene einen direkt positiven oder negativen regulatorischen Einfluss. Die Folgen sind eine Aktivierung und Vernetzung von verschiedenen Signalwegen.

Beim Betrachten der Abbildung 4.5 stechen zwei Gene ins Auge, die als Knotenpunkte des Netzwerkes fungieren. Dabei handelt es sich um die (1) PAL und den (2) ERF. Beide Gene werden auf direktem Wege durch Ethylen bzw. IES positiv reguliert. Außerdem hat der Vergleich der IES behandelten Proben von Börner, SO4 und Riesling gezeigt, dass die PAL und der ERF in Börner weit stärker hoch reguliert sind als in den beiden anderen Sorten. Es ist daher anzunehmen, dass die PAL und der ERF eine zentrale Bedeutung in den Abwehrreaktionen in Börner einnehmen, die einen Beitrag zur Reblausresistenz leisten. (1) Ausgehend vom Ethylen kann über den ERF und teils auf direktem Wege von IES und Ethylen eine Induktion von TF erfolgen. Zusätzlich übt hier das von der LOX gebildete JA einen positiven Einfluss auf die TF Regulation aus. So führt das Zusammenspiel der drei Hormone IES, Ethylen und JA über die TF zu einer transkriptionellen Aktivierung von weiteren resistenzassoziierten Genen. (2) Ein zweiter IES induzierter Signalweg beginnt mit der Ethylen bedingten Aktivierung der PAL und führt über den Phenylpropanoidweg, der mit der Bildung von Phytoalexinen endet. Es ist davon auszugehen, dass die an diesem zweiten Signalweg beteiligten Gene und die Phytoalexine HR- bzw. resistenzfördernd in Börner sind. Die Gene der beiden kurz beschriebenen Signalwege sind innerhalb und zwischen den Wegen miteinander verknüpft. Hier zeigt sich die Komplexität der Resistenzmechanismen in Börner. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die PAL und der ERF anhand der vorliegenden Untersuchungen für die Reblausresistenz in Börner als die bedeutendsten Kandidatengene anzusehen sind.

Zudem ist aus der Grafik ersichtlich, dass einige Gene (LOX, QR, PPO und XT), die eine direkte oder indirekte Regulation durch IES und/oder Ethylen erfahren, bei der Bildung von Nekrosen mitwirken. Grundlage für den Versuchsaufbau dieser Arbeit war die von El-Nady [2001] gewonnene Erkenntnis, dass die Applikation von IES zu Nekrosen an Blättern und Wurzeln von Börner führt. Die Ergebnisse und Diskussion dieser Arbeit zeigen somit Gene auf, die durch ihre IES bedingte Regulation zur Entstehung der Nekrosen in Börner beitragen.

Aus Abbildung 4.5 ist ferner die negative Wirkung von IES auf diverse Gene, wie beispielsweise die Gruppe der PR Gene oder der Zellwandproteine, ersichtlich. Zurückzuführen ist das mutmaßlich auf die unphysiologisch hohe IES Konzentration bei der Behandlung der Wurzeln. So werden diese Gene im Rahmen einer Schutzreaktion herunterreguliert. Die negativen Regulationen dieser Gene wirken sich zwar aus Sicht der Reblaus positiv auf ihren Angriff aus, da Abwehrreaktion in der Pflanze dadurch reduziert werden, für die HR in Börner spielen sie jedoch weniger eine Rolle. An dieser Stelle ist die Frage zu diskutieren, ob durch den IES Gehalt im Reblauspeichel identische Abwehrreaktionen initiiert werden können wie im vorliegenden Modelversuch. Wie eingangs beschrieben lag die Konzentration des Hormons im Speichel der durch Schäller [1968a] untersuchten Rebläuse noch im physiologisch wachstumsfördernden Bereich von 10^{-5} Mol/l. Dennoch stellte Schäller [1968a] in den infizierten Geweben einen erhöhten Gehalt an IES fest. Es muss also durch den Reblausstich zu einer Potenzierung der IES gekommen sein. Zwei Erklärungen dafür sind denkbar. Zum einen befindet sich im Reblauspeichel die Aminosäure Tryptophan [Anders, 1958; Schäller, 1968b]. Sie ist Ausgangssubstanz für die Auxinsynthese und könnte folglich zur Erhöhung der IES Konzentration geführt haben. Zum anderen können die untersuchten Auxintransporter PGP1 und PGP4 eine Rolle gespielt haben. Die Erhöhung der PAL Expression (Signalweg (2)) zieht die Erhöhung der CHS nach sich (vgl. Abb. 4.5). Die CHS reduziert daraufhin die Zahl der PGP1, so dass ein weiterer Export von IES verhindert wird. Der Auxinimporter PGP4 hingegen bleibt expressionell erhöht und transportiert weiterhin IES in die Zelle. Die Folge ist eine verstärkte IES Akkumulation im infizierten Gewebe, wie sie auch Schäller [1968a] nachgewiesen hat. Es ist daher davon auszugehen, dass ungeachtet der Ausgangskonzentration ein exogener IES-Reiz zu einer Ansammlung des Hormons in der Zelle führt. Die in Abbildung 4.5 dargestellten Prozesse können demnach bei einem realen Reblausbefall identisch ablaufen und zur Aktivierung der HR sowie zur Reblausresistenz in Börner beitragen.

5 Ausblick

Mit dem verwendeten Versuchsaufbau und den eingesetzten molekulargenetischen Methoden konnten entscheidende Erkenntnisse über die Resistenzmechanismen in der Unterlagsrebe Börner gewonnen werden. Um dem Anspruch des gesamten Forschungsprojektes, transgene reblausresistente Unterlagsreben zu erzeugen, gerecht zu werden, müssen jedoch weitere Detailuntersuchungen folgen. Vorstellbar wäre in diesem Kontext, sich mit einer Verkürzung der IES Induktionszeit zu befassen, um sich so Schritt für Schritt dem Zeitpunkt Null der Abwehrreaktion zu nähern. Dadurch könnten die Gene identifiziert werden, die zeitlich vor allen anderen auf den IES Reiz reagieren. Eine sicherlich geeignete Methode hierfür wäre die *Geniom one* Technik. Außerdem sollte man sich eingehender mit der Frage nach der Bedeutung des IES Gehalts für die Auslösung der Resistenzreaktion beschäftigen. So ist anzunehmen, dass der IES Gehalt im Reblauspeichel unter der hier verwendeten Konzentration liegt. Wichtige Anhaltspunkte für eine solche Analyse könnten Versuche mit veränderten Konzentrationen der IES-Lösung bei ansonsten gleichen Ausgangsbedingungen liefern. Anstatt Anpassungen an der Konzentration vorzunehmen, könnte man auch den IES Gehalt im Reblauspeichel tiefer analysieren. Dazu liefern die Ergebnisse der Untersuchungen von Schaller [1968a] sicherlich eine interessante Grundlage. Eine geeignete Methode für diese Analyse könnte die *high-performance-liquid-chromatography* (HPLC) sein. Sie hat den Vorteil, dass flüssige Substanzen identifiziert und quantifiziert werden können. Eine zweifellos große Schwierigkeit dabei ist nur eine für die Analyse ausreichende Menge des Speichelsekrets zu sammeln. Um diesen Schwachpunkt auszugleichen, bedarf es eines praktikablen Versuchsmodells. Zusätzlich zu Untersuchungen des Reblauspeichels sollten auch Versuche in Erwägung gezogen werden, in denen die IES Behandlung durch wirkliche Rebläuse ersetzt wird. Dem Vorteil realerer Bedingungen steht ein erheblicher Nachteil gegenüber. Schließlich kann der Zeitpunkt des Einstiches einer Reblaus kaum vorausgesagt werden [Dietrich, 2005]. Die weitergehenden Analysen müssen sich nicht auf Börner begrenzen. Dem aufmerksamen Leser kommen dabei neben der besagten Unterlagsrebe die Sorten Rici und Cina in den Sinn. Mit ihnen eröffnet sich der Forschung die Möglichkeit, die hier ermittelte Expression der Kandidatengene in Börner mit der Expression in zwei weiteren reblausresistenten Sorten zu vergleichen. Möglicherweise ließe sich dadurch die Zahl der potentiellen Resistenzgene noch weiter einschränken und dem Ziel, für die Reblausresistenz verantwortliche Gene aufzuspüren, ein weiteres Stück näher rücken. Eine Methode für diesen Ver-

suchsansatz wäre die RT-PCR. Mit ihr lassen sich Expressionsunterschiede präzise aufdecken und auswerten. Ein weiterer wichtiger Schritt für die Erschaffung von transgenen Reben ist ein fundiertes Verständnis für die zellulären und biochemischen Funktionen aller in Frage kommenden Resistenzgene. Analysen mit *knock-out*-, *RNA-interference* oder Antisense-Techniken können zur Klärung beitragen. In dieser Arbeit wurde auf die Antisense-Technik gesetzt und diese für drei Gene (PGP1, USP und DRP) konkret angewendet. Weil die Regeneration somatischer Embryonen im der Technik nachfolgenden Transformationssystem bei Reben äußerst langwierig ist, konnten die Ergebnisse der Antisense-Technik allerdings nicht ausgewertet werden. Hier besteht Nachholbedarf in Gestalt weiterer Analysen.

6 Zusammenfassung

Dass Pflanzen gegen phytopathogene Infektionen resistent sind, ist das Ergebnis von multip-
len Abwehrreaktionen. Eine solche ist auch die Hypersensitivitätsreaktion (HR). Sie ist die
Folge eines Befalls von Börner mit Rebläusen und zeigt sich an Blättern und Wurzeln der
resistenten Unterlagsrebe in Form von lokalen Nekrosen. Die Erzeugung von neuen, trans-
genen reblausresistenten Unterlagsreben verlangt präzise Kenntnisse über die Mechanismen
der Reblausresistenz. Um Resistenzgene zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit
differenzielle Genexpressionsanalysen eingesetzt. Diese waren die Microarray Analyse mit
der *Geniom one* Technik und die *real time* (RT) -PCR. Sie erlaubten eine Gegenüberstellung
der Genexpression in behandeltem Wurzelgewebe mit der Expression im Normalgewebe der
Unterlagsrebe Börner. Als experimenteller Induktor der HR in Börner diente die Indol-3-
Essigsäure (IES), ein Bestandteil des Reblausspeichels. Frühere Untersuchungen zur Reb-
lausresistenz zeigten, dass bei einer Behandlung mit IAA an Wurzeln von Börner Nekrosen
entstehen, nicht jedoch an Wurzeln von der reblautoleranten Unterlagssorte SO4 oder dem
reblausanfälligen Edelreis. Das war der Grund, SO4 und Riesling als Vergleichsobjekte zu
Börner für diese Studie auszuwählen. So sollte die Bedeutung der Rolle von IES als Auslö-
ser der Resistenzmechanismen in Börner erklärt werden. Insgesamt konnten deutliche Unter-
schiede in den Reaktionen der drei Rebsorten auf die IES Behandlung aufgedeckt werden.
Während in Börner eine hohe Anzahl an Genen und diese intensiv auf den IES Reiz reagiert,
fallen die Gene bei SO4 und Riesling zahlenmäßig kaum ins Gewicht und die Reaktionen
der beiden Sorten auf IES zudem eher schwach aus. In der Summe waren es 27 Gene, die für
die Reblausresistenz in Börner verantwortlich sein könnten. So konnte eine IES bedingte
Aktivierung von Genen beobachtet werden, die bei der Produktion von Phytoalexinen be-
deutsam sind, wie z.B. die *phenylalanine ammonia-lyase*, die *lipoxygenase* und die *stilbene
synthase*. Weiter ließ sich eine Regulation von allgemein Stress assoziierten Genen und von
Zellwandproteinen und eine Induktion von Signalkomponenten, etwa des Transkriptionsfak-
tors *ethylene response factor*, nachweisen. Eine deutliche Hochregulation von Au-
xintransportern in den IES behandelten Börnerwurzeln gab zudem Anhaltspunkte auf sorten-
spezifische Unterschiede in der zellulären Aufnahme und Abgabe der IES. Durch die Ausar-
beitung des Zusammenspiels der durch IES regulierten Gene konnten in dieser Arbeit wert-
volle Hinweise auf die Mechanismen der Reblausresistenz in Börner gewonnen werden.

7 Abstract

In general, hytopathogen resistance in plants is the result of multiple, and inter-connected signalling pathways. This is especially true for the hypersensitivity reaction (HR). In the rootstock cultivar 'Börner' a Phylloxera infestation leads to an HR, and results in the formation of local necroses on leaves and roots, respectively. In order to develop transgenic Phylloxera resistant rootstocks accurate knowledge about the underlying resistance mechanisms is required. Therefore, the present study is contributing to the identification of the genes involved in the HR in 'Börner'. Two different methods have been used in order to study the differential gene expression after experimental simulation of the Phylloxera attack on roots: (1) microarray analysis with the *geniom one* technique, and (2) RT-PCR. Indol-acetic-acid (IAA) is a component of the Phylloxera saliva, and therefore, was used as an elicitor of the HR in the Phylloxera-resistant rootstock cultivar 'Börner'. Previous studies demonstrated that IAA-treatment of root tips is resulting in necrosis formation in 'Börner' roots, but not in the roots of the Phylloxera-sensitive rootstock cultivar 'SO4', as well as in the Phylloxera-sensitive scion cultivar 'Riesling'. Therefore, 'SO4' and 'Riesling' were used as controls in differential gene expression analysis.

In general, IAA induction resulted in higher number of differentially expressed genes in Börner than in SO4 and Riesling, respectively. In total, 27 putative HR-genes were identified in 'Börner' by microarray analysis (FEBIT *geniom one*), and quantitatively analysed by RT-PCR. Those genes are involved in the production of phytoalexins, or encode *phenylalanine ammonia-lyase*, *lipxygenase* and *stilbene synthase*, general stress associated gene products, cell wall proteins, components of signalling pathways (e.g. the transcription factor *ethylene response factor*), and auxin transporters.

Thus, the present study is contributing to a better understanding of the signal transduction pathways involved in the hypersensitivity reaction underlying the necrosis formation after Phylloxera attack in the rootstock cultivar 'Börner'.

8 Literatur

- Abeles, F.B. (1992): Ethylene in Plant Biology. 2nd edition. New York: Academic Press.
- Adrian, M., Jeandet, P., Veneau, J., Weston, L.A., Bessis, R. (1997): Biological Activity of Resveratrol, a Stilbenic Compound from Grapevines, Against *Botrytis cinerea*, the Causal Agent for Gray Mold. *Journal of Chemical Ecology* **23** (7), 1689-1702.
- Alfenito, M.R., Souer, E., Goodman, C.D., Buell, R., Mol, J., Koes, R., Walbot, V. (1998): Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *Plant Cell* **10**, 1135-1149.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- Ambudkar, S.V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z.E., Gottesman, M.M. (2003): P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **22**, 7468-7485.
- Anders, F. (1957): Untersuchungen über die Bildung der Reblaus-Blattgalle. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* **13**, 29-30.
- Anders, F. (1958): Aminosäuren als gallenerregende Stoffe der Reblaus (*Viteus [Phylloxera] viti-folii* Shimer). *Experientia* **14**, 62-63.
- Anders, F. (1959): Das galleninduzierende Prinzip der Reblaus (*Viteus vitifolii* SHIMER). *Verhandlungen der Deutschen Zoologischen Gesellschaft 1958, Zoologischer Anzeiger* **22**, 355-363.
- Anzlovar, S., Serra, M.D., Dermastia, M., Menestrina, G. (1998): Membrane permeabilizing activity of pathogenesis-related protein linusitin from flax seed. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 610-617.
- Bais, J.A., Murphy, P.J., Dry, I.B. (2000): The molecular regulation of stilbene phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Australian Journal of Plant Physiology* **27** (7) 723-723.
- Batalia, M.A., Monzingo, A.F., Ernst, S., Roberts, W., Robertus, J.D. (1996): The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like PR-5 protein family. *Nature structural biology* **3**, 19-23.
- Baum, M., Bielau, S., Rittner, N., Schmid, K., Eggelbusch, K., Dahms, M., Schlauersbach, A., Tahedl, H., Beier, M., Güimil, R., Scheffler, M., Hermann, C., Funk, J.M., Wixmerten, A., Rebscher, H., Hönig, M., Andreae, C., Büchner, D., Moschel, E., Glathe, A., Jäger, E., et al. (2003): Validation of a novel, fully integrated and flexible microarray benchtop facility for gene expression profiling. *Nucleic Acids Research* **31** (23), e151.

- Benjamini, Y. und Hochberg, Y. (1995): Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society B* **57**, 289-300.
- Berrocal-Lobo, M., Molina, A., Solano, R. (2002): Constitutive expression of ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1 in Arabidopsis confers resistance to several necrotrophic fungi. *The Plant Journal* **29**, 23-32.
- Bézier, A., Lambert, B., Baillieul, F. (2002): Study of Defense-related Gene Expression in Grapevine Leaves and Berries Infected with *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* **108** (2), 111-120.
- Bilang, J., Macdonald, H., King, P.J., Sturm, A. (1993): A Soluble Auxin-Binding Protein from *Hyoscyamus muticus* is a Glutathione S-Transferase. *Plant Physiology* **102**, 29-34.
- Blakeslee, J.B., Peer, W.A., Murphy, A.S. (2005): Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 494-500.
- Boller, T. (1995): Chemoperception of microbial signals in plant cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 189-214.
- Bogdanove, A.J. (2002): Protein-protein interactions in pathogen recognition by plants. *Plant Molecular Biology* **50**, 981-989.
- Bonas, U. und Lahaye, T. (2002): Plant disease resistance triggered by pathogen-derived molecules: refined models of specific recognition. *Current Opinion in Microbiology* **5**, 44-50.
- Börner, C. (1943): Die ersten reblausimmunen Rebenkreuzungen. *Sonderabdruck aus „Angewandte Botanik“* **XXV** (1 u. 2), 126-143.
- Botër, M., Amigues, B., Peart, J., Breuer, C., Kadota, Y., Casais, C., Moore, G., Kleanthous, C., Ochsenbein, F., Shirasu, K., Guerois, R. (2007): Structural and Functional Analysis of SGT1 Reveals That Its Interaction with HSP90 Is Required for the Accumulation of Rx, an R Protein Involved in Plant Immunity. *The Plant Cell* **19**, 3791-3804.
- Boyko, E.V., Smith, C.M., Thara, V.K., Bruno, J.M., Deng, Y., Starkey, S.R., Klaahsen, D.L. (2006): The molecular basis of plant gene expression during aphid invasion: wheat Pto- and Pti-like sequences are involved in interactions between wheat and Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* **99**, 1430-1445.
- 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.
- Bravo, L.A., Close, T.J., Corcuera, L.J., Guy, C.L. (1999): Characterization of an 80-kDa dehydrin-like protein in barley responsive to cold acclimation. *Physiologia Plantarum* **106** (2), 177-183.

- Breiteneder, H., Pettenburger, K., Bito, A., Valenta, R., Kraft, D., Rumpold, H., Scheiner, O., Breitenbach, M. (1989): The gene coding for the major birch pollen allergen Bet6 1 is highly homologous to a pea disease resistance response gene, *EMBO Journal* **8**, 1935-1938.
- Brown, D.E., Rashotte, A.M., Murphy, A.S., Normanly, J., Tague, B.W., Peer, W.A., Taiz, L., Muday, G.K. (2001): Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**, 524-535.
- Bruxelles de, C.L., Peacock, W.J., Dennis, E.S., Dolferus, R. (1996): Absciscic Acid Induces the Alcohol Dehydrogenase Gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **11** (1), 381-391.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R., Eds. (2000): Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists.
- Buhot, N., Gomès, E., Milat, M.-L., Ponchet, M., Marion, D., Lequeu, J., Delrot, S., Coutos-Thévenot, P., Blein, J.-P. (2004): Modulation of the Biological Activity of a Tobacco LTP1 by Lipid Complexation. *Molecular Biology of the Cell* **15**, 5047-5052.
- Burg, S.P. und Burg, E.A. (1966): The Interaction between Auxin and Ethylene and Its Role in Plant Growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **55** (2), 262-269.
- Bustin, S.A. (2000): Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* **25**, 169:193.
- Bustin S. und Nolan T. (2004): Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR (2004), in: Real-Time PCR: An Essential Guide. *Horizon Bioscience*, London.
- Butler, E.D. und Gallagher, T.F. (1999): Isolation and characterization of a cDNA encoding a novel 2-oxoacid-dependent dioxygenase which is up-regulated during adventitious root formation in apple. *Journal of Experimental Botany* **50** (333), 551-552.
- Butler, E.D. und Galla Butler, E.D. und Gallagher, T.F. (2000): Characterization of auxin-induced ARRO-1 expression in the primary root of *Malus domestica*. *Journal of Experimental Botany* **51** (351), 1765-1766.
- Çakir, B., Agasse, A., Gaillard, C., Saumonneau, A., Delrot, S., Atanassova, R. (2003): A Grape ASR Protein Involved in Sugar and Absciscic Acid Signaling. *The Plant Cell* **15**, 2165-2180.
- Cameron, R., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1994): Biologically induced systemic acquired resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **5**, 715-725.
- Catalá, C., Rose, J.K.C., Bennett, A.B. (1997): Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4- β -D-glucanase and a Xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *The Plant Journal* **12** (2), 417-426.

- Chaman, M.E., Copaja, S.V., Argandona, V.H. (2003): Relationships between Salicylic Acid Content, Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) Activity, and Resistance of Barley to Aphid Infestation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* **51** (8), 2227-2231.
- Chen, Y.F., Randlett, M.D., Findell, J.L., Schaller, G.E. (2002): Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 19861-19866.
- Chen, T.H. und Murata, N. (2002): Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 250-257.
- Chen, J. und Varner, J.E. (1985): Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33 kDa protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 4399-4403.
- Chung, I.-M., Park, M.R., Chun, J.C., Yun, S.J. (2003): Resveratrol accumulation and resveratrol synthase gene expression in response to abiotic stresses and hormones in peanut plants. *Plant Science* **164**, 103-109.
- Close, T.J. (1996): Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* **97**, 795-803.
- Conseil, G., Baubichon-Cortay, H., Dayan, G., Jault, L.-M., Barron, D., Di Pietro, A. (1998): Flavonoids: A class of modulators with bifunctional interactions at vicinal ATP- and steroid-binding sites on mouse P-glycoprotein. *Biochemistry* **95**, 9831-9836.
- Constabel, C.P., Yip, L., Patton, J.J., Christopher, M.E. (2000): Polyphenol Oxidase from Hybrid Poplar. Cloning and Expression in Response to Wounding and Herbivory. *Plant Physiology* **124**, 285-295.
- Conrath, U., Pieterse, C.M.J., Mauch-Mani, B. (2002): Priming in plant-pathogen interactions. *TRENDS in Plant Science* **7** (5), 210-216.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Vanden Berghe, D. (1998): Structure-Activity Relationship and Classification of Flavonoids as Inhibitors of Xanthine Oxidase and Superoxide Scavengers. *Journal of Natural Products* **61**, 71-76.
- Cota, I.E., Troncoso-Rojas, R., Sotelo-Mundo, R., Sánchez-Estrada, A., Tiznado-Hernández, M.E. (2007): Chitinase and b-1,3-glucanase enzymatic activities in response to infection by *Alternaria alternata* evaluated in two stages of development in different tomato fruit varieties. *Scientia Horticulturae* **112**, 42-50.
- Coutos-Thévenot, P., Jouenne, T., Maës, O., Guerbette, F., Grosbois, M., Le Caer, J. P., Boulay, M., Deloire, A., Kader, J. C., and Guern, J. (1993): Four 9-kDa Proteins excreted by somatic embryos of grapevine are isoforms of lipid-transfer proteins. *European Journal of Biochemistry* **217**, 885-889.

- Croft, K.P.C., Jiittner, F., Slusarenko, A.J. (1993): Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. *Plant Physiology* **101**, 13-24.
- Cui, Y. Magill, J., Frederiksen, R., Magill, C. (1996): Chalcone synthase and phenylalanine ammonia-lyase mRNA levels following exposure of sorghum seedlings to three fungal pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **49**, 187-199.
- Daniel, X., Lacomme, C., Morel, J.B., Roby, D. (1999): A novel myb oncogene homologue in *Arabidopsis thaliana* related to hypersensitive cell death. *Plant Journal* **20**, 57-66.
- Da Silva, F.G., Iandolino, A., Al-Kayal, F., Bohlmann, M.C., Cushman, M.A., Lim, H., Ergul, A., Figueroa, R., Kabuloglu, E.K., Osborne, C., Rowe, J., Tattersall, E., Leslie, A., Xu, J., Baek, J., Cramer, G.R., Cushman, J.C., Cook, D.R. (2005): Characterizing the Grape Transcriptome. Analysis of Expressed Sequence Tags from Multiple Vitis Species and Development of a Compendium of Gene Expression during Berry Development. *Plant Physiology* **139**, 574-597.
- Dangl, J. L. und Jones, J. D. G. (2001): Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Davies C. und Robinson, S.P. (2000): Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response proteins. *Plant Physiology* **3**, 803-812.
- Dean, J.D., Goodwin, P.H., Hsiang, T. (2002): Comparison of Relative RT-PCR and Northern Blot Analyses to Measure Expression of β -1,3-Glucanase in *Nicotiana benthamiana* Infected With *Colletotrichum destructivum*. *Plant Molecular Biology Reporter* **20**, 347-356.
- Deepak, S., Shailasree, S., Kini, R., Hause, B., Shetty, S., Mithöfer, A. (2007): Role of hydroxyproline-rich glycoproteins in resistance of pearl millet against downy mildew pathogen *Sclerospora graminicola*. *Planta* **226** (2), 323-333.
- De Jong, A. J., Yakimova, E.T., Kapchina, V.M. Woltering, E.J. (2002): A critical role for ethylene in hydrogen peroxide release during programmed cell death in tomato suspension cells. *Planta* **214**, 537-545.
- De Lorenzo, G., Castoria, R., Bellincampi, D., Cervone, F. (1997): Fungal invasion enzymes and their inhibition. In: Carroll G.C. und Tudzynski P., editors. *The Mycota V. Plant Relationships, Part B*. Berlin: Springer-Verlag, 61-83.
- De Lorenzo, G., D'Ovidio, R., Cervone, F. (2001): The role of polygalacturonase-inhibiting proteins (PGIPs) in defense against pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* **39**, 313-335.
- De Lorenzo, G. und Ferrari, S., (2002): Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 295-299.

- Delledonne, C., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001): Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13454-13459.
- Desiderio, A., Aracri, B., Leckie, F., Mattei, B., Salvi, G., Tigelaar, H., Van Roekel, J.S.C., Baulcombe, D.C., Melchers, L.S., De Lorenzo, G., Cervone, F. (1997): Polygalacturonase-Inhibiting Proteins (PGIPs) with Different Specificities Are Expressed in *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10** (7), 852-860.
- Desveaux, D., Maréchal, A., Brisson, N. (2005): Whirly transcription factors: defense gene regulation and beyond. *TRENDS in Plant Science* **10** (2), 95-102.
- Dietrich, A. (2005): Untersuchungen zur Genexpression in Wurzeln der reblausresistenten Unterlagsrebsorte 'Börner'. Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg- Universität in Mainz.
- Di Matteo, A., Federici, L., Mattei, B., Salvi, G., Johnson, K.A., Savino, C., De Lorenzo, G., Tsernoglou, D., Cervone, F. (2003): The crystal structure of polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (17), 10124-10128.
- Divol, F., Vilaine, F., Thibivilliers, S., Kusiak, C., Sauge, M.H., Dinant, S. (2007): Involvement of the Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolases encoded by celery *XTH1* and *Arabidopsis XTH33* in the phloem response to aphids. *Plant, Cell and Environment* **30**, 187-201.
- Dong, J., Chen, C., Chen, Z. (2003): Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology* **51**, 21-37.
- Dong, X. (1996): SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 316-323.
- Doke, N. (2005): A strategy to enhance disease resistance of potato using the mechanism of the hypersensitive reaction against potato late blight. *Journal of General Plant Pathology* **71**, 444-447.
- Durner, J., Dendehenne, D., Klessig, D.F. (1998): Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 10328-10333.
- Ecker, J. und Davis, R.W. (1987): Plant defense genes are regulated by ethylene (stress responses/plant hormone/wounding/RNA blot analysis). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5202-5206.
- Edwards, R., Dixon, D.P. Walbot, V. (2000): Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in Plant Science* **5** (5), 193-198.
- Eichel, J., Gonzáles, J.C., Hotze, M., Matthews, R.G., Schroeder, J. (1995): Vitamin-B12-independent methionine synthase from a higher plant (*Catharanthus roseus*) Molecu-

- lar characterization, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. *European Journal of Biochemistry* **230**, 1053-1058.
- Ellis, C., Karafyllidis, I., Turner, J.G. (2002): Constitutive Activation of Jasmonate Signaling in an *Arabidopsis* Mutant Correlates with Enhanced Resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1025-1030.
- El-Nady, M. F. (2001): Untersuchungen zum Mechanismus der Reblausresistenz der Unterlagsrebe 'Börner', Dissertation am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., Somssich, I.E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. *TRENDS in Plant Science* **5** (5), 199-206.
- Eulgem, T. (2005): Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Science* **10**, 72-78.
- Felton, G.W., Donato, K., Del Vecchio, R.J., Duffey, S.S. (1989): Activation of foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of dietary protein of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology* **15**, 2667-2693.
- Flor, H. H. (1955): Host-parasite interaction in flax rust-its genetic and other implications. *Phytopathology* **45**, 680-685.
- Forslund, K., Pettersson, J., Bryngelsson, T., Jonsson, L. (2000): Aphid infestation induces PR-proteins differently in barley susceptible or resistant to the birdcherry-oat aphid (*Rhopalosiphum padi*). *Physiologia Plantarum* **110** (4), 496-502.
- Freemann W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E. (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* **26** (1), 122-122, 124-125.
- Freestone, P., Nyström, T., Trinei, M., Norris, V. (1997): The universal stress protein, UspA, of *Escherichia coli* is phosphorylated in response to stasis. *Journal of Molecular Biology* **274** (3), 318-324.
- Fuchs, Y. und Gertman, E. (1974): Studies of the effects of ethylene on yeast alcohol dehydrogenase activity. *Plant and Cell Physiology*. **15**, 701-708.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., Ohme-Takag, M. (2000): *Arabidopsis* Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box-Mediated Gene Expression. *The Plant Cell* **12**, 393-404
- Gälweiler, L., Guan, C., Müller, A., Wisman, E., Mendgen, K., Yephremov, A., Palme, K. (1998): Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* **282**, 2226-2230.
- Gao, M.-J., Allard, G., Byass, L., Flanagan, A.M., Singh, J. (2002): Regulation and characterization of four CBF transcription factors from *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology* **49**, 459-471.

- Gao, M.-J., Parkin, I.A.P., Lydiate, D.J., Hannoufa, A. (2004): An auxinresponsive SCARE-CROW-like transcriptional activator. *Plant Molecular Biology* **55**, 417-431.
- Gao, M.-J., Hegedus, D.D., Sharpe, A.G., Robinson, S.J., Lydiate, D.J., Hannoufa, A. (2007): Isolation and characterization of a GCN5-interacting protein from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **225**, 1367-1379.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995): The defensive role of non-specific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* **3** (2), 72-74.
- Geisler, M., Kolukisaoglu, H.U., Bouchard, R., Billion, K., Berger, J., Saal, B., Frangne, N., Koncz-Kálmán, Z., Koncz, C., Dudler, R., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S., Martinoia, E., Schulz, B. (2003): TWISTED DWARF1, a unique plasma membrane-anchored immunophilin-like protein, interacts with Arabidopsis multidrug resistance-like transporters AtPGP1 and AtPGP19. *Molecular Biology of the Cell* **14**, 4238-4249.
- Geisler, M., Blakeslee, J.J., Bouchard, R., Lee, O.R., Vincenzetti, V., Bandyopadhyay, A., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bailly, A., Richards, E.L., Ejendal, K.F.K., Smith, A.P., Baroux, C., Grossniklaus, U., Müller, A., Hrycyna, C.A., Dudler, R., Murphy, A.S., Martinoia, E. (2005): Cellular efflux of auxin catalyzed by the Arabidopsis MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal* **44**, 179-194.
- Geisler, M. und Murphy, A.S. (2006): The ABC of auxin transport: The role of p-glycoproteins in plant development. *FEBS Letters* **580**, 1094-1102.
- Giannakis, C., Bucheli, C.S., Skene, K.G.M., Robinson, S.P., Steele Scott, N. (2008): Chitinase and β -1,3-glucanase in grapevine leaves: a possible defence against powdery mildew infection. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **4** (1), 14-22.
- Gilad, A., Amitai-Zeigerson, H., Scolnik, P.A., Bar-Zvi, D. (1997): Asr1, a tomato water-stress regulated gene: genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity. *Acta Horticulturae* **447**, 447-454.
- Gilsbach, R., Kouta, M., Bönisch, H., Brüss, M. (2006): Comparison of in vitro and in vivo reference genes for internal standardization of real-time PCR data. *BioTechniques* **40**, 173-177.
- Glare, E.M., Divjak, M., Bailey, M.J., Walters, E.H. (2002): β -Actin and GAPDH house-keeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* **57**, 765-770.
- Goodman, R. N. und Novack, A. J. (1994): The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. ASP Press, St. Paul.
- Grayer, R.J. und Harborne, J.B. (1994): A survey of antifungal compounds from higher plants 1982-1993. *Phytochemistry* **37**, 19-42.

- Grayer, R.J., Harborne, J.B., Kimmins, F.M., Stevenson, P.C., Wijayagunasekera, H.N.P. (1994): Phenolics in rice phloem sap as sucking deterrents to the brown. *ISHS Acta Horticulturae 381: International Symposium on Natural Phenols in Plant Resistance*.
- Grechkin, A. (1998): Recent developments in biochemistry of the plant Lipoxygenase pathway. *Progress in Lipid Research* **37** (5), 317-352.
- Greenberg, J. T. (1997): Programmed Cell Death in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 525-545.
- Greenberg, J. T. und Yao, N. (2004): The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Cellular Microbiology* **6**, 201-211.
- Gustavsson, N., Diez, A.A., Nyström, T. (2002): The universal stress protein paralogues of *Escherichia coli* are co-ordinately regulated and co-operate in the defence against DNA damage. *Molecular Microbiology* **43**, 107-117.
- Hahn, K. und Strittmatter, G. (1994): Pathogen-defence gene prpl-1 from potato encodes an auxin-responsive glutathione S-transferase. *European Journal of Biochemistry* **226**, 619-626.
- Harborne, J.B. (1999): The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology* **27**, 335-368.
- Harmatha, J. und Dinan, L. (2004): Biological activities of lignans and stilbenoids associated with plant-insect chemical interactions. *Phytochemistry Reviews* **2**, 321-330.
- Harpster, M.H., Brummell, D.A., Dunsmuir, P. (1998): Expression Analysis of a Ripening-Specific, Auxin-Repressed Endo-1,4- β -Glucanase Gene in Strawberry. *Plant Physiology* **118** (4), 1307-1316.
- Hao, D., Ohme-Takagi, M., Sarai, A. (1998): Unique Mode of GCC Box Recognition by the DNA-binding Domain of Ethylene-responsive Element-binding Factor (ERF Domain) in Plant. *The Journal of Biology Chemistry* **273** (41), 26857-26861.
- Hartmann, T. (1985): Prinzipien des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. *Plant Systematics and Evolution* **150** (1-2), 15-34.
- Hattori, H., Kaneda, T., Lokeshwar, B., Laszlo, A., Ohtsuka, K. (1993): A stress-inducible 40 kDa protein (hsp40): purification by modified two-dimensional gel electrophoresis and co-localization with hsc70(p73) in heat-shocked HeLa cells. *Journal of Cell Science* **104** (3), 629-638.
- He, S.Y., Bauer, D.W., Collmer, A., Beer, S.V. (1994): Hypersensitive response elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 289-292.
- Heath, M. C. (1998): Apoptosis, programmed cell death and the hypersensitive response. *European Journal of Plant Pathology* **104**, 117-124.

- Heath, M. C. (2000a): Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* **44**, 321-334.
- Heath, M. C. (2000b): Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Microbiology* **3**, 315-319.
- Henke, O. (1960): Über die Bedeutung der Stickstoffverbindungen für die stoffwechselphysiologischen Beziehungen zwischen Parasit und Wirt am Beispiel Reblaus-Rebe. *Phytopathologische Zeitschrift* **41**, 387-426.
- Henke, O. (1963): Über den Stoffwechsel reblausanfälliger und -unanfälliger Reben. *Phytopathologische Zeitschrift* **47**, 314-326.
- Hermann, J. V. (1995): Die Reblaus in Franken - eine alte Bekannte meldet sich zurück. *Rebe & Wein* **2**, 58-60.
- Higgins, C.F. und Gottesmann, M.M. (1992): Is the multidrug transporter a flippase? *Trends in Biochemical Sciences* **17**(1), 18-24.
- Higgins, D.G., Thompson, J.D., Gibson, T.J. (1996): Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in enzymology* **266**, 383-402.
- Hoeren, F.U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W.J., Dennies, E.S. (1998): Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the *Arabidopsis thaliana* alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* **149**, 479-490.
- Holland, I.B., Cole, A.P.C., Kuchler, K., Higgins, C.F. (2003): ABC-Proteins-From Bacteria to Man, Academic Press, London, 2003.
- Hopp, H.H. (1955): Wirkung von Blattreblausseichel auf Pflanzengewebe. *Die Weinwissenschaft* **9**, 9-22.
- Hua, J. und Meyerowitz, E.M. (1998): Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **94**, 261-271.
- Jabs, T. (1999): Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochemical Pharmacology* **57**, 231-245.
- Jain, M., Nijhawan, A., Akhilesh, Tyagia, K., Khurana, J.P. (2006): Validation of house-keeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **345** (2), 646-651.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. (2000): bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *TRENDS in Plant Science* **7** (3), 106-111.
- Jarillo, J.A., Leyva, A., Salinas, J., Martinez-Zapater, J.M. (1993): Low Temperature Induces the Accumulation of Alcohol Dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a Chilling-Tolerant Plant. *Plant Physiology*, **101**, 833-837.

- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A.-C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M. (2002): Phytoalexins from the Vitaceae: Biosynthesis, Phytoalexin Gene Expression in Transgenic Plants, Antifungal Activity, and Metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 2731-2741.
- Ji, W., Wright, M.B., Cai, L., Flament, A. und Lindpaintner, K. (2002): Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. *BMC Genomics* **3**, 1-7.
- Jin, H., Martin, C. (1999): Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology* **41**, 577-585.
- Jones, P.G., Cashel, M., Glaser, G., Neidhardt, F.C. (1992): Function of a Relaxed-Like State following Temperature Downshifts in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **174** (12), 3903-3914.
- Kanellis, A.K., Solomos, T., Roubelakis-Angelakis, K.A. (1991): Suppression of Cellulase and Polygalacturonase and Induction of Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes in Avocado Fruit Mesocarp Subjected to Low Oxygen Stress. *Plant Physiology*. **96**, 269-274.
- Kanzaki, H., Saitoh, H., Ito, A., Fujisawa, S., Kamoun, S., Katou, S., Yoshioka, H., Terauchi, R. (2003): Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant Pathology* **4**, 383-391.
- Kellow, A. V., Sedgley, M., Van Heeswijck, R. (2004): Interaction between *Vitis vinifera* and grape *phylloxera*: Changes in root tissue during nodosity formation, *Annals of Botany* **93**, 581-590
- Keppeler, L.D., und Novacky, A. (1986): Involvement of membrane lipid peroxidation in the development of a bacterially induced hypersensitive reaction. *Phytopathology* **76**, 104-108.
- Kim, T.H., Kim, M.C., Park, J.H., Han, S.S., Kim, B.R., Moon, B.Y., Suh, M.C., Cho, S.H. (2006): Differential Expression of Rice Lipid Transfer Protein Gene (LTP) Classes in Response to Abscissic Acid, Salt, Salicylic Acid, and the Fungal Pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Plant Biology* **49**, 371-375.
- Kim, T.H., Park, J.H., Kim, M.H., Cho, S.H. (2008): Cutin monomer induces expression of the rice OsLTP5 lipid transfer protein gene. *Journal of Plant Physiology* **165**, 345-349
- Kloft, W. (1960): Wechselwirkungen zwischen pflanzensaugenden Insekten und den von ihnen besogenen Pflanzengewebe Teil I. *Zeitschrift für angewandte Entomologie* **45**, 337-381.
- Kramer, E.M. (2004): PIN1 and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends in Plant Science*. **9**, 578-582.

- Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., Nyström, T. (2003): The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 140-145.
- Lamb, C. und Dixon, R. A. (1997): The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**, 251-275.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79** (4), 583-93.
- Li, J., Ou-Lee, T.-M., Raba, R., Amundson, R.G., Last, R.L. (1993): Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *Plant Cell* **5**, 171-179.
- Li, W., Kodama, O., Akatsuka, T. (1991): Role of Oxygenated Fatty Acids in Rice Phytoalexin Production. *Agricultural Biology and Chemistry* **55** (4), 1041-1047.
- Liu, J.-G., Zhang, Z., Qin, Q.-L., Peng, R.-H., Xiong, A.-S., Chen, J.-M., Xu, F., Zhu, H., Yao, Q.-H. (2007): Isolated and characterization of a cDNA encoding ethylene-responsive element binding protein (EREBP)/AP2-type protein, RCBF2, in *Oryza sativa* L.. *Biotechnology Letters* **29** (1), 165-173.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., Solano, R. (2003): ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense. *The Plant Cell* **15**, 165-178.
- Luschnig, C., Gaxiola, R.A., Grisafi, P., Fink, G.R. (1998): EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development* **12**, 2175-2187.
- Luschnig, C. (2002): Auxin transport: ABC proteins join the club. *Trends in Plant Science* **7**, 329-332.
- Ma, R., Reese, J.C., Black, W.C., Bramel-COX, P. (1990): Detection of pectinesterase and polygalacturonase from salivary secretions of living greenbugs, *Schizaphis graminum* (Homoptera: Aphididae). *Journal of Insect Physiology* **36** (7) 507-512
- Madhusudhan, V.V. & Miles, P. W. (1998): Mobility of salivary components as a possible reason for differences in the responses of alfalfa to the spotted alfalfa aphid and pea aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **86**, 25-39.
- Mangalathu, S., Rajeevan, Vernon, S.D., Taysavang, N., Unger, E.R. (2001): Validation of Array-Based Gene Expression Profiles by Real-Time (Kinetic) RT-PCR. *Journal of Molecular Diagnostics* **3** (1), 26-31.
- Marrs, K.A., Alfenito, M.R., Lloyd, A.M., Walbot, V. (1995): A glutathione S-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* **375**, 397-400.
- Marrs, K.A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**, 127-158.

- Martinoia, E., Klein, M., Geisler, M., Bovet, L., Forestier, C., Kolukisaoglu, Ü., Müller-Röber, B., Schulz, B. (2002): Multifunctionality of plant ABC transporters - more than just detoxifiers. *Planta* **214**, 345-355.
- Matton, D.P., Constabel, P., Brisson, N. (1990): Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Molecular Biology* **14**, 775-783.
- Mauch, F. und Dudler, R. (1993): Differential Induction of Distinct Glutathione-S-Transferases of Wheat by Xenobiotics and by Pathogen Attack. *Plant Physiology* **102**, 1193-1201.
- Mauch-Mani, B. und Slusarenko, A. (1996): Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* **8**, 203-212.
- Mayer, M.P., Bukau, B. (1999): Molecular chaperones: the busy life of Hsp90. *Current Biology* **9**, R322-R325.
- Mellington, S. (2001): PCR-Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin 2001.
- Miles, P.W. (1999): Aphid Saliva. *Biological Reviews* **74**, 41-85.
- Miles, P.W. und Oertli, J.J. (1993): The significance of antioxidants in the aphid-plant interaction: the redox hypothesis. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **67**, 285-273.
- Mittler, R., Del Pozo, O., Meisel, L., Lam, E. (1997): Pathogen-induced Programmed Cell Death in Plants, a Possible Defense Mechanism. *Developmental Genetics* **21**, 279-289.
- Mittler, R. (2002): Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Moran, P.J. und Thompson, G.A. (2001): Molecular Responses to Aphid Feeding in *Arabidopsis* in Relation to Plant Defense Pathways. *Plant Physiology* **125**, 1074-1085.
- Mukherjee, P.K., Mohamed, S., Chandra, J., Kuhn, D., Liu, S., Antar, O.S., Munyon, R., Mitchell, A.P., Andes, D., Chance, M.R., Rouabhia, M., Ghannoum, M.A. (2006): Alcohol Dehydrogenase Restricts the Ability of the Pathogen *Candida albicans* To Form a Biofilm on Catheter Surfaces through an Ethanol-Based Mechanism. *Infection and Immunity* **74** (7), 3804-3816.
- Murphy, A., Peer, W.A., Taiz, L. (2000): Regulation of Auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **211**, 315-324.
- Mysore, K.S. und Ryu, C.-M. (2004): Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**, 97-104.
- Nakashima, J., Awano, T., Takabe, K., Fujita, M., Hiroshi, S. (1997): Immunocytochemical Localization of Phenylalanine Ammonia-Lyase and Cinnamyl Alcohol Dehydro-

- genase in Differentiating Tracheary Elements Derived from Zinnia Mesophyll Cells. *Plant and Cell Physiology* **38** (2) 113-123.
- Nemchinov, L.G., Shabala, L., Shabala, S. (2008): Calcium Efflux as a Component of the Hypersensitive Response of *Nicotiana benthamiana* to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell Physiology* **49** (1), 40-46.
- Nemestothy, S. und Guest, D.I (1990): Phytoalexin accumulation, phenylalanine ammonia lyase activity and ethylene biosynthesis in fosetyl-Al treated resistant and susceptible tobacco cultivars infected with *Hytophthora nicotianae* var. *nicotianae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **37**, 207-219.
- Nicot, N., Hausman, J.-F., Hoffmann, L. Evres, D. (2005): Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Evers Journal of Experimental Botany* **56** (421), 2907-2914.
- Niklowitz, W. (1955): Histologische Studien an den Reblausgallen und Reblausabwehrnekrosen. *Phytopathologische Zeitschrift* **24**, 299-340.
- Noh, B., Murphy, A.S., Spalding, E.P. (2001) Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, **13**, 2441-2454.
- Palme, K. und Gälweiler, L. (1999): PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 375-81.
- Park, C. Y., Heo, W.D., Yoo, J.H., Lee, J.H., Kim, J.C., Chun, H.J., Moon, B.C., Kim, I.H., Park, H.C., Choi, M.S., Ok, H.M., Cheong, M.S., Lee, S.M. (2004): Pathogenesis-related Gene Expression by Specific Calmodulin Isoforms is Dependent on NIM1, a Key Regulator of Systemic Acquired Resistance. *Molecular Cell* **18**, 207-213.
- Park, S.-J., Huang, Y., Ayoubi, P. (2005): Identification of expression profiles of sorghum genes in response to greenbug phloem-feeding using cDNA subtraction and microarray analysis. *Planta* **223**, 932-947.
- Parry, G., Marchant, A., May, S., Swarup, S., Swarup, K., James, N., Graham, N., Allen, T., Martucci, T., Ymm, A., Napier, R., Manning, K., King, G., Bennett, M. (2001): Quick on the uptake: Characterization of a family of plant auxin influx carriers. *Journal of Plant Growth Regulation* **20**, 217-25
- Peer, W.A., Bandyopadhyaya, A., Blakeslee, J.J., Makama, S.N., Chenb, R.J., Massonb, P.H., Murphy, A.S. (2004): Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 1898-1911.
- Pervaiz, S. (2003): Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **17** (14), 1975-1985.
- Pfaffl, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29** (9), 2000-2007.

- Pfaffl, M.W. und Bruckmaier, R.M. (2002): DNA array and real-time PCR an optimal combination ! The use of real-time (kinetic) quantitative PCR to validate cDNA array results. *Array Meeting: COST B20: Mammary development, function and cancer on 10th and 11th of May in Utrecht*.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: Best-Keeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* **26**, 509-515.
- Porten, M. und Hoffmann, C. (2004): Reblaus gestern und heute. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **24**, 16-18.
- Powell, A.L.T., van Kan, J., ten Have, A., Visser, J., Greve, L.C., Bennett, A.B., Labavitch, J.M. (2000): Transgenic Expression of Pear PGIP in Tomato Limits Fungal Colonization. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13** (9), 942-950.
- Presser, C. (1993): Die Reblaus - kein Problem mehr. *Das Deutsche Weinmagazin* **23**, 22-25.
- Richard, S., Morency, M-J., Drevet, C., Jouanin, L. and Séguin A. 2000. Isolation and characterization of a dehydrin gene from white spruce induced upon wounding, drought and cold stresses. *Plant Mol. Biol.* **43**: 1-10.
- Ridley, B.L., O'Neill, M.A., Mohnen, D. (2001): Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling. *Phytochemistry* **57**, 929-967.
- Riov, J., Monselise, S.P., Kahan, R.S. (1969): Ethylene-controlled Induction of Phenylalanine Ammonia-lyase in Citrus Fruit Peel. *Plant Physiology* **44**, 631-635.
- Roberts, K. and Selitrennikoff C. (1990): Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity. *Journal of General Microbiology* **136**, 1771-1778.
- Robertson, D., Davies, D.R., Gerrish, C., Jupe, S.C., Bolwell, G.P. (1995): Rapid changes in oxidative metabolism as a consequence of elicitor treatment of suspension-cultured cells of French bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Molecular Biology* **27**, 59-67.
- Rojo, E., León, J., Sánchez-Serrano, J.J. (1999): Cross-talk between wound signaling pathways determines local versus systemic gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **20**, 135-142.
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C., de la Torre-Boronat, M.C. (2001): Method for the Quantitative Extraction of Resveratrol and Piceid Isomers in Grape Berry Skins. Effect of Powdery Mildew on the Stilbene Content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **49** (1) 210-215.
- Rouse, D.T., Marotta, R., and Parish, R.W. (1996). Promoter and expression studies on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Letters* **381**, 252-256.

- Roy, B. A. und Kirchner J. W. (2000): Evolutionary Dynamics of Pathogen Resistance and Tolerance. *Evolution* **54** (1), 51-63.
- Rozen, S. und Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology* **132**, 365-386.
- Rust rucci, C., Montillet, J.-L., Agnel, J.-P., Battesti, C., Alonso, B., Knoll, A., Bessoule, J.-J., Etienne, P., Suty, L., Blein, J.-P., Triantaphylid s, C. (1999): Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *Journal of Biological Chemistry* **274** (51), 36446-3655.
- Saab, I.N. und Sachs, M.M. (1996): A Flooding-Induced Xyloglucan Endo-Transglycosylase Homolog in Maize is Responsive to Ethylene and Associated with Aerenchyma. *Plant Physiology* **7** (72), 385-391.
- Sablowski, R.W., Moyano, E., Culianez-Macia, F.A., Schuch, W., Martin, C., Bevan, M. (1994): A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes. *EMBO Journal* **13** (1), 128-137.
- Sanchez-Fernandez, R., T. G. Davies, E., Coleman, J.O.D., Rea, P.A. (2001): The Arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 30231-30244.
- Santelia, D., Vincenzetta, V., Azzarellod, E., Bovetb, L., Fukaoa, Y., D chtigc, P., Mancusod, S., Martinoiaa, E., Geisler, M. (2005): MDR-like ABC transporter AtPGP4 is involved in auxin-mediated lateral root and root hair development. *FEBS Letters* **579**, 5399-5406.
- Sauer, N., Corbin, D.R., Keller, B., Lamb, C.J. (1990): Cloning and characterization of a wound-specific hydroxyproline- rich glycoprotein in Phaseolus vulgaris. *Plant Cell Environmet* **13**, 257-266.
- Sch ller, G. (1960): Untersuchungen  ber den Aminos uregehalt des Speicheldr senssekretes der Reblaus (*Viteus [Phylloxera] vitifolii* Shimer), Homoptera. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **3**, 128-136.
- Sch ller, G. (1963): Papierchromatographische Analyse der Aminosäuren und Amide des Speichels und Honigtaus von 10 Aphidenarten mit unterschiedliche Phytopathogenit t. *Zoologische Jahrbücher (Abteilung Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere)* **70**, 399-406.
- Sch ller, G. (1965): Untersuchungen über den β -indolessigs uregehalt des Speichels von Aphidenarten mit unterschiedlicher Phytopathogenit t. *Zoologische Jahrbücher (Abteilung Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere)* **71**, 385-392.
- Sch ller, G. (1968a): Biochemische Analyse des Aphidenspeichels und seiner Bedeutung für die Gallenbildung. *Zoologische Jahrbücher (Abteilung Allgemeine Zoologie und Physiologie der Tiere)* **74**, 54-87.

- Schäller, G. (1968b): Untersuchen zur Erzeugung künstlicher Pflanzengallen. *Marcellia* **25**, 131-153.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 11655-11660.
- Schirra, K.-J., Kopf, A., Louis, F. (1999): Lebensweise mit Tücken. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **8**, 24-27.
- Schmid, J., Bleser, E., Rühl, E.. (1999): Züchtung vollständig reblausresistenter Unterlagsorten: Gib der Reblaus keine Chance. *Das Deutsche Weinbaumagazin* **9**, 37-41.
- Schruff, G. (1992): Die Reblaus - Biologie und heutige Bedeutung. *Der Badische Winzer* **3**, 124-129.
- Schwab, A. (2006): Chlorose, Verrieselung und Stiellähmeprobleme. *Weinbauring-Rundbrief VII*, 1-8.
- Seeliger, R. (1933): Der neue Weinbau; Grundlagen des Anbaues von Pfropfreben. Verlag Paul Parey, Berlin.
- Sheng, J D' Ovidiot, R., Mehdy, M.C.. (1991): Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding. *The Plant Journal* **1** (3), 345-354.
- Shimabukuro R.H., Swanson, H.R., Walsh, W.C. (1970): Glutathione conjugation: atrazine detoxification mechanism in corn. *Plant Physiology* **46**, 103-107.
- Shinshi, H., Mohnen, D., Meins, F. (1987): Regulation of a plant pathogenesis-related enzyme: Inhibition of chitinase and chitinase mRNA accumulation in cultured tobacco tissues by auxin and cytokinin (*Nicotiana tabacum*/glucan endo-1,3-1-glucosidase mRNA/13-1,3-glucanase). *ings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 89-93.
- Shirasu, K., Nakajima, H., Rajasekhar, V.K., Dixon, R.A., Lambas, C. (1997): Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**, 261-270.
- Shirasu, K., Schulze-Lefert, P. (2003): Complex formation, promiscuity and multifunctionality: protein interactions in disease resistance pathways. *TRENDS in Plant Science* **8**, 252-258.
- Siedow, J.N. (1991): Plant lipoxygenase: structure and function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **42**, 145-188.
- Siemens, J., Keller, I., Sarx, J., Kunz, S., Schuller, A., Nagel, W., Schmülling, T., Parniske, M., Ludwig-Müller, J. (2006): Transcriptome Analysis of *Arabidopsis* Clubroots In-

- dicare a Key Role for Cytokinins in Disease Development. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19** (5), 480-494.
- Sikorski, M.M., Biesiadka, J., Kasperska, A.E., Kopcinska, J., Łotocka, N., Golinowski, W., Legocki, A.B. (1999): Expression of genes encoding PR10 class pathogenesis-related proteins is inhibited in yellow lupine root nodules. *Plant Science* **149**, 125-137.
- Smeeckens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**, 49-81.
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S., Goldsbrough, P.B. (2003): Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *The Plant Journal* **36** (4), 433-442.
- Solano R., Stepanova, A., Chao, Q., Ecker., J.R. (1998): Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development* **12**, 3703-3714.
- Song, J.Y., Choi, D.W., Lee, J.S., Kwon, Y.M., Kim, S. G. (1998): Cortical tissue-specific accumulation of the root-specific ns-LTP transcripts in the bean (*Phaseolus vulgaris*) seedlings. *Plant Molecular Biology* **38**, 735-742.
- Sopp, E., Bleser, E., Rühl, E. (1997): Renaissance der Reblaus: Schädling gibt noch viele Rätsel auf. *Das Deutsche Weinmagazin* **10**, 22-26.
- Stakmann, E. C. (1915): Relation between Puccinia graminis and plants highly resistant to its attack. *Journal of Agriculture research* **4**, 193-199.
- Stefano, L. und Luo, Y. (2004): Gridding and compression of microarray images. *Proceedings of the 2004 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference*, 2004.
- Sterling, C. (1952): Ontogeny of the *Phylloxera* Gall of Grape Leafs. *American Journal of Botany* **39**, 6-15.
- Stintzi, A., Heitza, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmanna, S., Geoffroya, P., Legrand, M., Fritiga, B. (1993): Plant "pathogenesis-related" proteins and their role in defense against pathogens. *Biochemie* **75**, 687-706.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., Thomashow, M.F. (1997): *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1035-1040.
- Stracke, R., Werber, M., Weisshaar, B. (2001): The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* **4** (5), 447-56.

- Stürzenbaum, S.R. und Kille, P. (2001): Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **130** (3), 281-289.
- Sullivan, J.A., Shirasu, K., Deng, X.W. (2003): The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews Genetics* **4** (12), 948-58.
- Sutherland, O.R.W., Russell, G.B., Biggs, D.R., Lane, G.A. (1980): Insect Feeding Deterrent Activity of Phytoalexin Isoflavonoids. *Biochemical Systematics and Ecology* **8**, 73-75.
- Takahashi, A., Casais, C., Ichimura, K., Shirasu, K. (2003): HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 11777-11782.
- Takahashi, R., Joshee, N., Kitagawa, Y. (1994) Induction of chilling resistance by water stress, and cDNA sequence analysis and expression of water stress-regulated genes in rice. *Plant Molecular Biology* **26**, 339-352.
- Takatsuji, H. (1998): Zinc-finger transcription factors in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 582-596.
- Tang, X., Xie, M., Kim, Y.J., Zhou, J., Klessig, D.F., Martin, G.B. (1999): Overexpression of Pto activates defense response and confers broad resistance. *Plant Cell* **11**, 15-30.
- Teng, S., Keurentjes, J., Bentsink, L., Koornneef, M., Smeekeens, S. (2005): Sucrose-Specific Induction of Anthocyanin Biosynthesis in Arabidopsis Requires the MYB75/PAP1 Gene1. *Plant Physiology* **139**, 1840-1852.
- Terasaka K., Blakeslee, J.J., Titapiwatanakun, B., Peer, W.A., Bandyopadhyay, A., Makam, S.N., Ran Lee, O., Richards, E.L., Murphy, A.S., Sato, F., Yazakic, K. (2005): PGP4, an ATP Binding Cassette P-Glycoprotein, Catalyzes Auxin Transport in Arabidopsis thaliana Roots. *Plant Cell* **17**, 2922-2939.
- Thellin, O., Zorzi, W. Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E. (1999): Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of Biotechnology* **75**, 291-295.
- Theodoulou, F.L. (2000): Plant ABC transporters. *Biochimica et biophysica acta* **1465**, 79-103.
- Tian, Q., Uhler, N.J., Reed, J.W. (2002): Arabidopsis SHY2/IAA3 Inhibits Auxin-Regulated Gene Expression. *The Plant Cell* **14**, 301-319.
- Tierney, M.L., Wiechert, J., Pluymers, D. (1988): Analysis of the expression of extensin and p33-related cell wall proteins in carrot and soybean. *Molecular and General Genetics* **211**, 393-399.

- Toppan, A., Roby, D., Esquerré-Tugayé, M.-T. (1982): Cell Surfaces in Plant-Microorganism Interactions III. IN VIVO EFFECT OF ETHYLENE ON HYDROXYPROLINE-RICH GLYCOPROTEIN ACCUMULATION IN THE CELL WALL OF DISEASED PLANTS. *Plant Physiology* **70**, 82-86.
- Tsuji, J. (1992): Phytoalexin Accumulation in *Arabidopsis thaliana* during the Hypersensitive Reaction to *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. *Plant Physiology* **98** (4), 1304-1309.
- Turco, E., Close, T.J., Fenton, R.D Ragazzi, A. (2004): Synthesis of dehydrin-like proteins in *Quercus ilex* L. and *Quercus cerris* L. seedlings subjected to water stress and infection with *Phytophthora cinnamomi*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **65** (3), 137-144.
- Ullmann, A., Jacob, F., Monod, J. (1967): Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **24**, 339-343.
- Vailleau, F., Daniel, X., Tronchet, M., Montillet, J.-L., Triantaphylidès, C., Roby, D. (2002): A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 10179-10184.
- Vandenabeele, S., Van Der Kelen, K., Dat, J., Gadjev, I., Boonefaes, T., Morsa, S., Rottiers, P., Slooten, L., Van Montagu, M., Zabeau, M., Inze, D., Van Breusegem, F. (2003): A Comprehensive Analysis of Hydrogen Peroxide-Induced Gene Expression in Tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 16113-16118.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**, research 0034.1-0034.11.
- Van der Wel, H. und Loeve, K. (1972): Isolation and Characterization of Thaumatin I and 11, the Sweet -Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii*. *European Journal of Biochemistry* **31**, 221-225.
- Van Doorn, W.G. und Woltering, E.J. (2005): Many ways to exit? Cell death categories in plants. *Trends in Plant Science* **10** (3), 117-122.
- Van Loon, L.C. und van Strien, E.A. (1999): The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **55**, 85-97.
- Van Loon, L.C., Pierpoint, W.S., Boller, T., Conejero, V. (1994) Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology* **12**, 245-264.
- Van Loon, L.C., Rep, M., Pieterse, C.M.J. (2006): Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* **44**, 1-28.

- Van Zee, K., Chen, F.Q., Hayes, P.M., Close, T.J., Chen, T.H.H. (1995): Cold-specific induction of a dehydrin gene family member in barley. *Physiologia Plantarum* **108**, 1233-1239.
- Varner, J. E., and Lin, L.-S. (1989). Plant cell wall architecture. *Cell* **56**, 231-239.
- Vaughn, K.C., Lax, A.R., Duke, S.O. (1988): Polyphenol oxidase: the chloroplast enzyme with no established function. *Physiologia Plantarum* **72**, 659-665.
- Vigers A., Wiedemann, S., Roberts, W.K., Legrand, M., Selitrennikoff, C.P., Fritig, B. (1992): Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal. *Plant Science* **83**, 155-161.
- Vlachonasios, K.E., Thomashow, M.F., Triezenberg, S.J. (2003): Disruption mutations of ADA2b and GCN5 transcriptional adaptor genes dramatically affect Arabidopsis growth, development, and gene expression. *Plant Cell* **15**, 626-638.
- Vogt, E. und Schruft, G. (2000): Weinbau. 8. Auflage. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart.
- Walters, D.R. und Wylie, M.A. (1986): Polyamines in discrete regions of barley leaves infected with the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis*. *Physiologia Plantarum* **67**, 630-633.
- Wan, J., Dunning, F.M., Bent, A.F. (2002): Probing plant-pathogen interactions and downstream defense signaling using DNA microarrays. *Functional & Integrative Genomics* **2**, 259-273.
- Wang, C., Järlfors, U., Hildebrand, D.F. (1991): Regulation and subcellular localization of auxin-induced lipooxygenases. *Plant Science* **148**, 147-153.
- Wapshere A.J und Helm K.F. (1987): Phylloxera and Vitis: An experimentally restable co-evolution Hypothesis. *American Journal of Enology and Viticulture* **38** (3), 216-222.
- Williams, W. G., Kennedy, G.G., Yamamoto, R.T., Thacker, J.D., Bordner, J. (1980): 2-Tridecanone: A naturally occurring insecticide from the wild tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Science* **207**, 888-889.
- Woeste, K. und Kieber, J.J. (2000): A strong loss-of-function mutation in RAN1 results in constitutive activation of the ethylene response pathway as well as a rosette-lethal phenotype. *The Plant Cell* **12**, 443-455.
- Wojtaszek, P. (1997): Oxidative burst : an early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* **322**, 681-692.
- Xu, H. und Heath, M.C. (1998): Role of Calcium in Signal Transduction during the Hypersensitive Response Caused by Basidiospore-Derived Infection of the Cowpea Rust Fungus. *The Plant Cell* **10**, 585-597.

- Yamakawa, H., Kamada, H., Satoh, M., Ohashi, Y. (1998): Spermine is a salicylate-independent endogenous inducer for both tobacco acidic pathogenesis-related proteins and resistance against tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiology* **118**, 1213-1222.
- Yamamoto, S., Nakano, T., Suzuki, K., Shinshi, H. (2004): Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochimica et Biophysica Acta* **1679**, 279-287.
- Yoda, H. Ogawa, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Kusano, T., Sano, H. (2002): Identification of early-responsive genes associated with the hypersensitive response to tobacco mosaic virus and characterization of a WRKY-type transcription factor in tobacco plants. *Molecular Genetics and Genomics* **267**, 154-161.
- Yoshii, H. und Imaseki, H. (1981): Biosynthesis of Auxin-Induced Ethylene. Effects of Indole-3-Acetic Acid, Benzyladenine and Absciscic Acid on Endogenous Levels of 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid (ACC) and ACC Synthase. *Plant and Cell Physiology* **22** (3), 369-379.
- Yu, Y.-B. und Yang, S.F. (1979): Auxin-induced Ethylene Production and Its Inhibition by Aminoethoxyvinylglycine and Cobalt Ion. *Plant Physiology* **64**, 1074-1077.
- Zhang, K. und Das, N.P. (1994): Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochemical Pharmacology* **47** (11), 2063-2068.
- Zhang, K., Yang, E.-B., Tang, W.-Y., Ping Wong, K. Mack P. (1997): Inhibition of glutathione reductase by plant polyphenols. *Biochemical Pharmacology* **54** (9), 1047-1053.
- Zhang, S. und Klessig, D.F. (2001): MAPK cascades in plant defense signalling. *TRENDS in Plant Science* **6** (11), 520-527.
- Zhang, S., Sheng, J., Liu, Y., Mehdy, M.C. (1993): Fungal Elicitor-Induced Bean Proline-Rich Protein mRNA Down-Regulation Is Due to Destabilization That Is Transcription and Translation Dependent. *Plant Cell* **5** (9), 1089-1099.
- Zhang, Y., Dorey S., Swiderski, M., Jones, J.D.G. (2004): Expression of RPS4 in tobacco induces an AvrRps4-independent HR that requires EDS1, SGT1 und HSP90. *The Plant Journal* **40**, 213-224.
- Zhou, C., Zhang, L., Duan, J., Miki, B., Wu, K. (2005): HISTONE DEACETYLASE19 Is Involved in Jasmonic Acid and Ethylene Signaling of Pathogen Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**, 1196-1204.
- Zhu, Q., Maher, E.A., Masoud, S., Dixon, R.A., Lamb, C.J. (1994): Enhanced protection against fungal attack by constitutive coexpression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Biotechnology* **12**: 807-812.

9 Anhang

Gen ID	Gen Name	B 7'	B 15'	B 30'	B 60'	B 90'	R 7'	R 15'	R 30'	R 60'	R 90'
alcohol dehydrogenase											
EC907662	Vv001 Vitis vinifera Regent and Trincadeira SMART-GATEWAY combined cDNA library Vitis vinifera cDNA clone VvTR 60'2 similar to cinnamyl alcohol dehydrogenase, mRNA sequence					1,77					2,52
AF194173	Vitis vinifera alcohol dehydrogenase 1 (ADH1) mRNA, complete cds	0,60			0,54						0,58
AF194174	Vitis vinifera alcohol dehydrogenase 2 (ADH2) mRNA, complete cds	0,28	0,35		0,53						
beta-1,3-glucanase											
U68144	Vitis vinifera beta-1,3-glucanase mRNA, partial cds.	0,53	0,53			0,63					0,56
AF239617	Vitis vinifera beta-1,3-glucanase mRNA, complete cds	0,50	0,64		0,49						
AY353062	Vitis riparia beta-1,3-glucanase mRNA, complete cds	0,36	0,45		0,59			1,56			
AJ277900	Vitis vinifera mRNA for beta 1-3 glucanase (gl gene)		0,58		0,61						
chitinase/ endochitinase											
Z68123	V.vinifera mRNA for acidic chitinase	0,48	0,60		0,50						
U97521	Vitis vinifera class IV endochitinase (VvChi4A) mRNA, complete cds	0,30	0,43	0,50	0,28	0,47	0,65				0,43
U97522	Vitis vinifera class IV endochitinase (VvChi4B) mRNA, complete cds	0,31	0,46	0,56	0,40	0,43	0,53				0,40
AF532966	Vitis vinifera class IV chitinase (Chi4D) mRNA, complete cds	0,28	0,43	0,53	0,27	0,47	0,47				0,49
AY137377	Vitis vinifera class IV chitinase (Chi4C) mRNA, complete cds	0,57	0,65		0,54						
Z54234	V.vinifera mRNA for chitinase		0,62								
DQ267094	Vitis vinifera chitinase class I mRNA, complete cds		0,64								
ethylene response factor											
AY395744	Vitis aestivalis putative ethylene response factor ERF3a mRNA, complete cds.					1,69					1,94
AY395745	Vitis aestivalis putative ethylene response factor ERF3b mRNA, complete cds.	1,50			1,51	1,69				1,87	1,96
AY484580	Vitis aestivalis putative ethylene response factor 4 mRNA, complete cds.				1,85	2,74					
AY484581	Vitis aestivalis putative ethylene response factor 5 mRNA, complete cds			1,68	1,66			1,51			
CK986231	fag-B-IES4,5h-149 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4,5h-149 similar to Capsicum chinense auxin and ethylene responsive GH3-like protein (GH3) mRNA, mRNA sequence	0,59			0,39						
lipid transfer protein											
AF465408	Vitis berlandieri x Vitis vinifera nonspecific lipid transfer protein 1 (LTP1) mRNA, complete cds	0,57	0,62		0,58						0,46
AY395741	Vitis aestivalis lipid transfer protein mRNA, complete cds	0,64	0,55		0,56	0,58					0,47
phenylalanine ammonia-lyase/ alanine acetyl transferase											
AB015870	Vitis vinifera gene for phenylalanine ammonia-lyase, partial cds					1,62					
AB015871	Vitis vinifera gene for phenylalanine ammonia-lyase, complete cds.					2,07					1,80
Prolin-rich protein											
AY046416	Vitis vinifera proline-rich protein 1 (PRP1) mRNA, complete cds	0,24	0,49	0,67							0,66
AY046417	Vitis vinifera proline rich protein 2 (PRP2) mRNA, complete cds	0,40									
PR protein											
AF061329	Vitis vinifera PR-4 type protein (PR-4a) gene, complete cds				0,63	0,66					
DQ336289	Vitis pseudoreticulata pathogenesis-related protein 10 mRNA, complete cds	0,21	0,33	0,49	0,30						
ripening protein											
BE846416	EST0079 Grape berries Lambda Zap II Library Vitis vinifera cDNA clone B018 similar to ABA stress ripening protein, mRNA sequence			1,79	1,79						
AJ237988	Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related protein (grip21 gene).					2,58					2,36
AJ237991	Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related protein (grip32 gene)					1,59					
AJ237992	Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related bZIP protein (grip55 gene)	1,56									
AJ237987	Vitis vinifera mRNA for putative ripening-related protein (grip68 gene)	0,66									

Tabelle 9.1: Fold change Werte der differentiell regulierte Gene in der *Geniom one* Analyse in IES behandelten Wurzeln von Börner und Riesling

Gen ID	Gen Name	B 7'	B 15'	B 30'	B 60'	B 90'	R 7'	R 15'	R 30'	R 60'	R 90'
AJ237981	Vitis vinifera mRNA for putative proline-rich cell wall protein (grip3 gene)	0,60									
stilbene synthase											
AB046373	Vitis riparia ripst1 gene for stilbene synthase, complete cds	0,30	0,33	0,49	0,32	1,70					
AB046374	Vitis labrusca labst1 gene for stilbene synthase, complete cds	0,34	0,30	0,53	0,36						
AB046375	Vitis vinifera vinst1 gene for stilbene synthase, complete cds	0,33	0,35	0,39	0,40				0,59		
AF418567	Vitis sp. cv. 'Norton' stilbene synthase 2 (st2) gene, complete cds	0,27	0,42	0,54	0,52						
S63221	Vitis stilbene synthase mRNA, complete cds	0,33	0,32	0,51	0,38	1,68					
CK906354	fag-B-IES4h-12 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-12 similar to Vitis riparia ripst1 gene for stilbene synthase (AB046373), mRNA sequence					1,54					
X76892	V.vinifera StSy mRNA for stilbene synthase.	0,34	0,39	0,57	0,47	3,77					
AY670188	Vitis vinifera clone 361608_S1 stilbene synthase mRNA, partial cds.	0,60	0,64	0,64		3,77					
AY670227	Vitis vinifera clone 361659_P1 stilbene synthase mRNA, partial cds	0,54			0,43	1,59					
AY670234	Vitis vinifera clone 361668_H3 stilbene synthase mRNA, partial cds	0,42		0,60	0,43						
AF128861	Vitis riparia stilbene synthase gene, complete cds	0,36	0,39	0,50	0,33	1,86					
DV466766	fag-B-IES2,5h-82 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES2,5h-82 similar to Vitis vinifera vinst1 gene for stilbene synthase, mRNA sequence	0,37	0,42	0,43	0,26				0,61	0,49	
DV466767	fag-B-IES4,5h-27 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4,5h-27 similar to Vitis labrusca labst1 gene for stilbene synthase, mRNA sequence	0,32	0,33	0,44	0,36				0,65	0,64	
DV466768	fag-B-IES4,5h-144 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4,5h-144 similar to Vitis riparia ripst1 gene for stilbene synthase, mRNA sequence	0,47	0,54		0,45						
DV466771	fag-B-IES2,5h-133 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES2,5h-133 similar to Vitis vinifera clone 361666_A1 stilbene synthase mRNA, mRNA sequence		0,47	0,49	0,36						
DQ235274	Vitis vinifera stilbene synthase mRNA, partial cds	0,33	0,34	0,57	0,51	1,79					
sucrose responsive element binding protein/ hexose transporter											
AY953543	Vitis vinifera sucrose responsive element binding protein (SREBP) mRNA, complete cds					1,62					
AY538261	Vitis vinifera hexose transporter (HT5) mRNA, complete cds.					2,50				2,14	4,50
thaumatin-like protein											
AF532965	Vitis vinifera thaumatin-like protein (Tl3) mRNA, complete cds	0,22	0,28	0,50	0,26						
AJ237999	Vitis vinifera mRNA for thaumatin-like protein.					0,64					0,62
transcription factors											
EC907672	Vv011 Vitis vinifera Regent and Trincadeira SMART-GATEWAY combined cDNA library Vitis vinifera cDNA clone VvTR 60'356 similar to putative transcription factor, mRNA sequence				1,57						
AF281656	Vitis vinifera putative transcription factor mRNA, complete cds					1,55					
AY484579	Vitis aestivalis putative WRKY4 transcription factor mRNA, complete cds.				1,58	3,16				1,77	3,49
AY509152	Vitis aestivalis putative WRKY transcription factor 30 mRNA, complete cds.					2,09				1,80	2,79
AY706986	Vitis riparia CBF-like transcription factor (CBF4) gene, complete cds				1,55						1,74
Xyloglucan transglycosylase											
AB074999	Vitis labrusca x Vitis vinifera VXET1 mRNA for Xyloglucan-transglycosylase, complete cds.				1,99	1,61					
AY043237	Vitis vinifera putative xyloglucan endotransglycosylase XET1 mRNA, partial cds	0,65									
sonstige											
CK906352	fag-B-IES4h-08 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-08 similar to Malus domestica mRNA for adventitious rooting related oxygenase ARRO-1 (AJ225045), mRNA sequence	0,57	0,64		0,58						

Tabelle 9.1 (Fortsetzung)

Gen ID	Gen Name	B 7'	B 15'	B 30'	B 60'	B 90'	R 7'	R 15'	R 30'	R 60'	R 90'
AY156051	Vitis vinifera putative alanine acetyl transferase (AAT) mRNA, partial cds					2,36					
X75969	V.vinifera CHS mRNA for chalcone synthase		0,61								
AF220407	Vitis riparia dehydrin-like protein (Dhn) mRNA, complete cds	1,70									
EC907674	Vv013 Vitis vinifera Regent and Trincadeira SMART-GATEWAY combined cDNA library Vitis vinifera cDNA clone VvTR 60'578 similar to putative glutathione S-transferase T4, mRNA sequence	0,50	0,58		0,65						
VvTC61689	Grape Hsp90	1,54									
AY159556	Vitis vinifera lipoxygenase (Lox) mRNA, partial cds.					1,76					
CK906347	fag-B-IES4h-03 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-03 similar to Solanum tuberosum methionine synthase (MS) mRNA (AF082893), mRNA sequence		0,66								
AF305093	Vitis vinifera polygalacturonase inhibiting protein mRNA, complete cds	0,24	0,29	0,54	0,35						
CK906348	fag-B-IES4h-04 Boerner cDNA subtraction library Vitis cinerea x Vitis riparia cDNA clone fag-B-IES4h-04 similar to V.vinifera mRNA for polyphenol oxidase - catalytic unit (Z27411), mRNA sequence					1,56					
AY159559	Vitis vinifera putative quinone reductase (Qor) mRNA, partial cds	0,65									

Tabelle 9.1 (Fortsetzung)

Nr.	Gen	Fold change B K / R K
1	xyloglucan endotransglycosylase XET2	1,64
2	chit1a gene for chitinase	0,64
3	chalcone synthase	0,53
4	putative ripening-related protein (grip28 gene)	1,74
5	isoflavone reduCTase-like protein 3 (ifrl3 gene)	1,63
6	VvTC54666	0,60
7	lipid transfer protein 1 (LTP1)	1,56
8	lipoxygenase (Lox)	0,61
9	proline rich protein 2 (PRP2)	0,56
10	60S ribosomal protein L10	1,90
11	lipid transfer protein	1,58
12	flavonol synthase	0,54
13	stilbene synthase	1,68
14	auxin-binding protein	0,66
15	auxin and ethylene responsive GH3-like protein (GH3)	1,75
16	adventitious rooting related oxygenase ARRO-1	1,62
17	cysteine proteinase inhibitor	1,70
18	adventitious rooting related oxygenase ARRO-1	2,10
19	polygalacturonase inhibiting protein	2,39
20	thaumatin-like protein (Tl3)	2,24
21	flavonoid-3,5'-hydroxylase	2,13
22	clone VvTR912 similar to J2P	0,46
23	glutathione S-transferase (GST1)	0,49
24	isoflavone reduCTase-like protein 6 (ifrl6 gene)	1,78
25	ripening-related P-450 enzyme (gfh2 gene)	1,52
26	(+)-valencene synthase	0,39
27	beta 1-3 glucanase (g1 gene)	1,74

Tabelle 9.2: Gene mit signifikante Unterschiede zwischen den unbehandelten Proben von Börner (B K) und vom Riesling (R K)

Gen	Effizienz		
	Börner	SO4	Riesling
AAT	2,08	2,11	2,13
ADH	2,20	2,21	2,21
ARRO	1,98	1,99	2,04
Chitinase	2,18	2,22	2,24
CHS	1,99	2,04	2,11
DRP	2,01	2,00	1,99
ERF	2,17	1,92	2,06
ETR	1,88	2,24	1,85
Glucanase	2,04	2,26	2,25
Grip	2,17	1,93	2,26
GST	2,21	2,29	2,28
LOX	2,03	1,88	1,93
LTP	2,03	2,11	2,29
MS	2,08	1,97	2,15
PAL	2,01	2,12	2,00
PGIP	2,05	2,19	2,24
PGP1	2,04	2,19	2,22
PGP4	2,00	2,06	2,07
PPO	2,03	2,09	2,10
PR4	2,02	1,97	2,06
PRP	2,14	2,22	2,10
SREBP	2,03	2,00	1,99
STS	2,24	2,19	2,20
TF	2,00	2,01	2,01
TLP	2,04	2,11	2,13
USP	2,07	1,86	2,18
XT	2,03	2,11	2,25
β-tubulin	1,90	1,89	1,99
EF	1,97	2,02	1,99
GAPDH	2,09	2,13	2,04

Tabelle 9.3: RT-PCR Effizienzen der analysierten Gene in Börner, SO4 und Riesling

EF					GAPDH				
Probe	E	CT Kal. B K	CT Probe	RQ	Probe	E	CT Kal. B K	CT Probe	RQ
B 7'	2,09	20,7	22,88	0,200	B 7'	1,96	26,49	32,16	0,022
B 15'	2,09	20,7	19,79	1,956	B 15'	1,96	26,49	27,23	0,608
B 30'	2,09	20,7	22,08	0,362	B 30'	1,96	26,49	26,77	0,828
B 60'	2,09	20,7	22,8	0,213	B 60'	1,96	26,49	27,01	0,705
B 90'	2,09	20,7	21,78	0,451	B 90'	1,96	26,49	27,28	0,588
B 150'	2,09	20,7	25,23	0,035	B 150'	1,96	26,49	30,21	0,082
B K	2,09	20,7	20,7	1,000	B K	1,96	26,49	26,49	1,000
R 7'	2,04	20,7	21,89	0,428	R 7'	1,99	26,49	28,28	0,292
R 15'	2,04	20,7	21,51	0,561	R 15'	1,99	26,49	27,07	0,671
R 30'	2,04	20,7	22,35	0,308	R 30'	1,99	26,49	25,69	1,734
R 60'	2,04	20,7	21,38	0,616	R 60'	1,99	26,49	25,83	1,575
R 90'	2,04	20,7	23,76	0,113	R 90'	1,99	26,49	29,6	0,118
R 150'	2,04	20,7	23,09	0,182	R 150'	1,99	26,49	27,28	0,581
R K	2,04	20,7	20,38	1,256	R K	1,99	26,49	25,36	2,176
S 7'	2,13	20,7	19,6	2,297	S 7'	2,02	26,49	27,44	0,513
S 15'	2,13	20,7	19,58	2,332	S 15'	2,02	26,49	26,41	1,058
S 30'	2,13	20,7	21,4	0,589	S 30'	2,02	26,49	27,74	0,415
S 60'	2,13	20,7	21,36	0,607	S 60'	2,02	26,49	27,21	0,603
S 90'	2,13	20,7	20,22	1,438	S 90'	2,02	26,49	26,13	1,288
S 150'	2,13	20,7	24,91	0,041	S 150'	2,02	26,49	29,9	0,091
S K	2,13	20,7	23,25	0,145	S K	2,02	26,49	25,29	2,325

β-tubulin

Probe	E	CT Kal. B K	CT Probe	RQ
B 7'	1,90	23,57	27,59	0,076
B 15'	1,90	23,57	23,24	1,236
B 30'	1,90	23,57	24,48	0,558
B 60'	1,90	23,57	24,59	0,520
B 90'	1,90	23,57	25,64	0,265
B 150'	1,90	23,57	29,73	0,019
B K	1,90	23,57	23,57	1,000
R01	1,99	23,57	25,09	0,351
R 15'	1,99	23,57	24,51	0,524
R 30'	1,99	23,57	24,63	0,482
R 60'	1,99	23,57	23,77	0,871
R 90'	1,99	23,57	27,44	0,070
R 150'	1,99	23,57	26,07	0,179
R K	1,99	23,57	23,61	0,973
S 7'	1,89	23,57	22,93	1,503
S 15'	1,89	23,57	22,66	1,785
S 30'	1,89	23,57	24,57	0,529
S 60'	1,89	23,57	24,12	0,705
S 90'	1,89	23,57	22,76	1,675
S 150'	1,89	23,57	28,54	0,042
S K	1,89	23,57	25,3	0,332

Tabelle 9.4: Relative Quantitiy (QR) der verwendeten HK in Börner, SO4 und Riesling

E: Effizienz, CT: Crossing Point, Kal.: Kalibrator

AAT

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,08	26,75	30,46	0,066	0,952	0,984	0,046	0,213
B 7'	2,08	26,75	30,37	0,071	1,017			
B 15'	2,08	26,75	27,04	0,809	0,711	0,770	0,084	0,399
B 15'	2,08	26,75	26,83	0,943	0,830			
B 30'	2,08	26,75	28,82	0,220	0,399	0,461	0,088	0,063
B 30'	2,08	26,75	28,45	0,288	0,523			
B 60'	2,08	26,75	28,37	0,305	0,715	0,809	0,134	0,477
B 60'	2,08	26,75	28,05	0,386	0,904			
B 90'	2,08	26,75	25,05	3,473	8,419	8,297	0,172	0,000
B 90'	2,08	26,75	25,09	3,373	8,176			
B 150'	2,08	26,75	27,38	0,630	16,512	17,956	2,041	0,000
B 150'	2,08	26,75	27,16	0,741	19,399			
B K	2,08	26,75	26,93	0,876	0,876	0,821	0,244	
B K	2,08	26,75	26,57	1,141	1,141			
B K	2,08	26,75	27,46	0,595	0,595			
B K	2,08	26,75	27,29	0,673	0,673			
R 7'	2,08	26,75	28,86	0,213	0,605	0,558	0,066	0,180
R 7'	2,08	26,75	29,09	0,180	0,511			
R 15'	2,08	26,75	28,36	0,308	0,528	0,603	0,106	0,121
R 15'	2,08	26,75	28,02	0,395	0,678			
R 30'	2,08	26,75	28,22	0,341	0,510	0,616	0,150	0,120
R 30'	2,08	26,75	27,81	0,460	0,723			
R 60'	2,08	26,75	27,58	0,545	0,576	0,674	0,139	0,067
R 60'	2,08	26,75	27,18	0,730	0,772			
R 90'	2,08	26,75	28,37	0,305	3,133	2,851	0,397	0,000
R 90'	2,08	26,75	28,64	0,251	2,570			
R 150'	2,08	26,75	26,48	1,219	4,574	5,074	0,707	0,000
R 150'	2,08	26,75	26,21	1,485	5,574			
R K	2,08	26,75	26,89	0,903	0,651	0,442	0,144	
R K	2,08	26,75	27,50	0,577	0,417			
R K	2,08	26,75	27,65	0,517	0,373			
R K	2,08	26,75	27,83	0,453	0,327			
S 7'	1,86	26,75	25,57	2,080	1,719	1,989	0,382	0,108
S 7'	1,86	26,75	25,13	2,733	2,259			
S 15'	1,86	26,75	25,81	1,792	1,093	1,243	0,212	0,237
S 15'	1,86	26,75	25,42	2,283	1,393			

Tabelle 9.5: Ergebnisse der quantitativen Genexpressionsanalyse in unbehandelten und IES behandelten Wurzeln von Börner, SO4 und Riesling

NE: Normalisierten Expression, E: Effizienz, CT: Crossing Point, Kal.: Kalibrator, Cond.: Condition (Probe), QR: Relative Quantity, Mean NE: durchschnittliche NE, SD NE: Standardabweichung der NE

S 30'	1,86	26,75	27,61	0,586	1,159	1,121	0,054	0,095
S 30'	1,86	26,75	27,72	0,548	1,083			
S 60'	1,86	26,75	27,35	0,689	1,083	1,014	0,098	0,066
S 60'	1,86	26,75	27,57	0,601	0,945			
S 90'	1,86	26,75	23,65	6,847	4,695	4,638	0,081	0,000
S 90'	1,86	26,75	23,69	6,679	4,580			
S 150'	1,86	26,75	27,58	0,597	11,021	11,906	1,252	0,000
S 150'	1,86	26,75	27,34	0,693	12,791			
S K	1,86	26,75	27,12	0,795	1,647	1,496	0,163	
S K	1,86	26,75	27,30	0,711	1,473			
S K	1,86	26,75	27,53	0,616	1,277			
S K	1,86	26,75	27,18	0,766	1,587			

ADH

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,20	24,17	30,15	0,009	0,129	0,165	0,051	0,000
B 7'	2,20	24,17	29,59	0,014	0,201			
B 15'	2,20	24,17	26,40	0,172	0,152	0,169	0,024	0,000
B 15'	2,20	24,17	26,14	0,212	0,186			
B 30'	2,20	24,17	25,80	0,277	0,502	0,494	0,011	0,000
B 30'	2,20	24,17	25,84	0,268	0,487			
B 60'	2,20	24,17	26,92	0,114	0,268	0,271	0,005	0,000
B 60'	2,20	24,17	26,89	0,117	0,274			
B 90'	2,20	24,17	24,13	1,032	2,502	2,362	0,197	0,000
B 90'	2,20	24,17	24,28	0,917	2,223			
B 150'	2,20	24,17	29,10	0,021	0,537	0,505	0,045	0,000
B 150'	2,20	24,17	29,26	0,018	0,473			
B K	2,20	24,17	24,03	1,117	1,117	1,014	0,071	
B K	2,20	24,17	24,18	0,992	0,992			
B K	2,20	24,17	24,23	0,954	0,954			
B K	2,20	24,17	24,18	0,992	0,992			
R 7'	2,21	24,17	27,14	0,095	0,269	0,258	0,016	0,001
R 7'	2,21	24,17	27,25	0,087	0,247			
R 15'	2,21	24,17	27,32	0,082	0,141	0,168	0,038	0,001
R 15'	2,21	24,17	26,91	0,114	0,196			
R 30'	2,21	24,17	25,73	0,290	0,456	0,497	0,058	0,008
R 30'	2,21	24,17	25,52	0,343	0,539			
R 60'	2,21	24,17	25,16	0,456	0,482	0,517	0,049	0,007
R 60'	2,21	24,17	24,99	0,522	0,552			
R 90'	2,21	24,17	26,58	0,148	1,518	1,454	0,090	0,006
R 90'	2,21	24,17	26,69	0,136	1,391			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 150'	2,21	24,17	26,72	0,132	0,497	0,426	0,100	0,014
R 150'	2,21	24,17	27,14	0,095	0,356			
R K	2,21	24,17	23,99	1,153	0,832	0,849	0,024	
R K	2,21	24,17	23,94	1,200	0,866			
S 7'	2,22	24,17	24,51	0,763	0,630	0,584	0,066	0,011
S 7'	2,22	24,17	24,71	0,650	0,537			
S 15'	2,22	24,17	24,57	0,727	0,443	0,428	0,022	0,001
S 15'	2,22	24,17	24,66	0,677	0,413			
S 30'	2,22	24,17	27,06	0,100	0,197	0,212	0,020	0,000
S 30'	2,22	24,17	26,89	0,114	0,226			
S 60'	2,22	24,17	26,38	0,172	0,270	0,254	0,021	0,000
S 60'	2,22	24,17	26,53	0,152	0,239			
S 90'	2,22	24,17	23,10	2,347	1,610	1,554	0,079	0,004
S 90'	2,22	24,17	23,19	2,185	1,498			
S 150'	2,22	24,17	28,40	0,034	0,632	0,577	0,078	0,014
S 150'	2,22	24,17	28,64	0,028	0,522			
S K	2,22	24,17	25,23	0,429	0,890	0,897	0,010	
S K	2,22	24,17	25,21	0,436	0,904			

ARRO

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	1,98	25,45	32,29	0,009	0,135	0,147	0,018	0,000
B 7'	1,98	25,45	32,04	0,011	0,160			
B 15'	1,98	25,45	27,78	0,204	0,179	0,181	0,003	0,000
B 15'	1,98	25,45	27,75	0,208	0,183			
B 30'	1,98	25,45	27,22	0,298	0,542	0,553	0,016	0,001
B 30'	1,98	25,45	27,16	0,311	0,565			
B 60'	1,98	25,45	28,28	0,145	0,339	0,377	0,054	0,002
B 60'	1,98	25,45	27,98	0,178	0,416			
B 90'	1,98	25,45	26,79	0,400	0,971	1,016	0,064	0,409
B 90'	1,98	25,45	26,66	0,438	1,061			
B 150'	1,98	25,45	31,30	0,018	0,482	0,499	0,024	0,001
B 150'	1,98	25,45	31,20	0,020	0,516			
B K	1,98	25,45	25,43	1,014	1,014	1,003	0,015	
B K	1,98	25,45	25,46	0,993	0,993			
R 7'	2,04	25,45	30,43	0,029	0,081	0,074	0,011	0,324
R 7'	2,04	25,45	30,72	0,023	0,066			
R 15'	2,04	25,45	30,80	0,022	0,038	0,045	0,011	0,028
R 15'	2,04	25,45	30,33	0,031	0,053			
R 30'	2,04	25,45	29,43	0,059	0,092	0,104	0,017	0,084
R 30'	2,04	25,45	29,11	0,074	0,116			
R 60'	2,04	25,45	27,95	0,168	0,178	0,167	0,016	0,008
R 60'	2,04	25,45	28,14	0,147	0,155			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 90'	2,04	25,45	31,19	0,017	0,171	0,202	0,043	0,028
R 90'	2,04	25,45	30,76	0,023	0,233			
R 150'	2,04	25,45	30,89	0,021	0,078	0,080	0,003	0,332
R 150'	2,04	25,45	30,81	0,022	0,082			
R K	2,04	25,45	28,62	0,104	0,075	0,078	0,004	
R K	2,04	25,45	28,52	0,112	0,081			
S 7'	1,99	25,45	28,70	0,107	0,088	0,087	0,001	0,000
S 7'	1,99	25,45	28,73	0,105	0,087			
S 15'	1,99	25,45	27,84	0,193	0,118	0,111	0,009	0,000
S 15'	1,99	25,45	28,01	0,172	0,105			
S 30'	1,99	25,45	27,91	0,184	0,364	0,366	0,004	0,000
S 30'	1,99	25,45	27,89	0,187	0,369			
S 60'	1,99	25,45	28,00	0,173	0,272	0,273	0,001	0,000
S 60'	1,99	25,45	27,99	0,174	0,274			
S 90'	1,99	25,45	26,97	0,351	0,241	0,232	0,012	0,000
S 90'	1,99	25,45	27,08	0,326	0,223			
S 150'	1,99	25,45	30,55	0,030	0,552	0,629	0,110	0,113
S 150'	1,99	25,45	30,19	0,038	0,707			
S K	1,99	25,45	26,89	0,371	0,769	0,764	0,007	
S K	1,99	25,45	26,91	0,366	0,759			

Chitinase

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,18	24,28	29,60	0,016	0,228	0,210	0,025	0,000
B 7'	2,18	24,28	29,82	0,013	0,192			
B 15'	2,18	24,28	26,96	0,124	0,109	0,098	0,015	0,000
B 15'	2,18	24,28	27,24	0,100	0,088			
B 30'	2,18	24,28	27,29	0,096	0,174	0,167	0,009	0,000
B 30'	2,18	24,28	27,39	0,089	0,161			
B 60'	2,18	24,28	28,36	0,042	0,097	0,106	0,012	0,000
B 60'	2,18	24,28	28,16	0,049	0,114			
B 90'	2,18	24,28	26,30	0,207	0,502	0,536	0,047	0,002
B 90'	2,18	24,28	26,14	0,235	0,569			
B 150'	2,18	24,28	29,50	0,017	0,448	0,494	0,065	0,002
B 150'	2,18	24,28	29,26	0,021	0,540			
B K	2,18	24,28	24,13	1,124	1,124	1,006	0,104	
B K	2,18	24,28	24,22	1,048	1,048			
B K	2,18	24,28	24,44	0,883	0,883			
B K	2,18	24,28	24,32	0,969	0,969			
R 7'	2,24	24,28	27,09	0,104	0,294	0,250	0,062	0,019
R 7'	2,24	24,28	27,53	0,073	0,206			
R 15'	2,24	24,28	26,34	0,190	0,326	0,332	0,008	0,020
R 15'	2,24	24,28	26,30	0,196	0,337			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 30'	2,24	24,28	25,99	0,252	0,377	0,388	0,015	0,032
R 30'	2,24	24,28	25,98	0,254	0,399			
R 60'	2,24	24,28	25,38	0,412	0,436	0,436	0,000	0,050
R 60'	2,24	24,28	25,38	0,412	0,436			
R 90'	2,24	24,28	28,65	0,029	0,302	0,291	0,017	0,015
R 90'	2,24	24,28	28,75	0,027	0,279			
R 150'	2,24	24,28	27,31	0,087	0,326	0,284	0,059	0,023
R 150'	2,24	24,28	27,68	0,064	0,242			
R K	2,24	24,28	24,43	0,886	0,640	0,588	0,074	
R K	2,24	24,28	24,65	0,742	0,536			
S 7'	2,22	24,28	25,14	0,504	0,416	0,336	0,113	0,028
S 7'	2,22	24,28	25,75	0,310	0,256			
S 15'	2,22	24,28	25,25	0,461	0,281	0,320	0,054	0,007
S 15'	2,22	24,28	24,95	0,586	0,358			
S 30'	2,22	24,28	26,72	0,143	0,282	0,293	0,015	0,002
S 30'	2,22	24,28	26,63	0,153	0,303			
S 60'	2,22	24,28	26,59	0,158	0,249	0,273	0,034	0,003
S 60'	2,22	24,28	26,37	0,189	0,297			
S 90'	2,22	24,28	25,10	0,520	0,357	0,358	0,002	0,002
S 90'	2,22	24,28	25,09	0,524	0,359			
S 150'	2,22	24,28	29,25	0,019	0,350	0,349	0,002	0,002
S 150'	2,22	24,28	29,26	0,019	0,348			
S K	2,22	24,28	25,65	0,335	0,695	0,673	0,030	
S K	2,22	24,28	25,73	0,315	0,652			

CHS

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	1,99	24,88	29,91	0,031	0,452	0,493	0,057	0,025
B 7'	1,99	24,88	29,67	0,037	0,533			
B 15'	1,99	24,88	27,44	0,172	0,151	0,179	0,039	0,006
B 15'	1,99	24,88	26,99	0,234	0,206			
B 30'	1,99	24,88	27,02	0,229	0,416	0,399	0,025	0,015
B 30'	1,99	24,88	27,15	0,210	0,381			
B 60'	1,99	24,88	25,94	0,482	1,129	1,063	0,093	0,422
B 60'	1,99	24,88	26,12	0,426	0,998			
B 90'	1,99	24,88	25,05	0,890	2,156	2,631	0,671	0,005
B 90'	1,99	24,88	24,52	1,281	3,106			
B 150'	1,99	24,88	28,94	0,061	1,603	1,660	0,081	0,015
B 150'	1,99	24,88	28,84	0,066	1,717			
B K	1,99	24,88	24,99	0,927	0,927	1,164	0,335	
B K	1,99	24,88	24,39	1,401	1,401			
B K	1,99	24,88	25,09	0,865	0,865			
B K	1,99	24,88	25,04	0,896	0,896			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 7'	2,11	24,88	25,94	0,453	1,285	1,208	0,108	0,017
R 7'	2,11	24,88	26,11	0,399	1,132			
R 15'	2,11	24,88	26,00	0,433	0,744	0,612	0,188	0,159
R 15'	2,11	24,88	26,59	0,279	0,479			
R 30'	2,11	24,88	25,05	0,881	1,384	1,070	0,444	0,234
R 30'	2,11	24,88	25,86	0,481	0,756			
R 60'	2,11	24,88	24,71	1,135	1,201	1,416	0,215	0,015
R 60'	2,11	24,88	24,49	1,338	1,415			
R 60'	2,11	24,88	24,30	1,542	1,631			
R 90'	2,11	24,88	26,45	0,310	3,177	2,574	0,853	0,049
R 90'	2,11	24,88	27,09	0,192	1,970			
R 150'	2,11	24,88	25,11	0,842	3,161	2,994	0,237	0,003
R 150'	2,11	24,88	25,26	0,753	2,826			
R K	2,11	24,88	24,80	1,062	0,766	0,790	0,033	
R K	2,11	24,88	24,72	1,127	0,813			
S 7'	2,04	24,88	24,18	1,647	1,362	1,315	0,066	0,131
S 7'	2,04	24,88	24,28	1,534	1,268			
S 15'	2,04	24,88	23,05	3,687	2,249	2,273	0,034	0,001
S 15'	2,04	24,88	23,02	3,766	2,298			
S 30'	2,04	24,88	24,31	1,501	2,968	3,078	0,155	0,002
S 30'	2,04	24,88	24,21	1,612	3,188			
S 60'	2,04	24,88	26,30	0,363	0,571	0,559	0,017	0,001
S 60'	2,04	24,88	26,36	0,348	0,547			
S 90'	2,04	24,88	23,61	2,473	1,696	1,708	0,017	0,002
S 90'	2,04	24,88	23,59	2,509	1,720			
S 150'	2,04	24,88	27,58	0,146	2,691	2,529	0,229	0,008
S 150'	2,04	24,88	27,76	0,128	2,367			
S K	2,04	24,88	25,58	0,607	1,258	1,232	0,037	
S K	2,04	24,88	25,64	0,582	1,205			

DRP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,01	27,18	27,38	0,868	12,499	15,374	3,149	0,001
B 7'	2,01	27,18	27,13	1,033	14,883			
B 7'	2,01	27,18	26,80	1,301	18,739			
B 15'	2,01	27,18	26,46	1,649	1,451	1,388	0,089	0,439
B 15'	2,01	27,18	26,59	1,506	1,325			
B 30'	2,01	27,18	26,83	1,274	2,313	1,965	0,632	0,115
B 30'	2,01	27,18	26,69	1,405	1,236			
B 30'	2,01	27,18	26,81	1,292	2,346			
B 60'	2,01	27,18	25,64	2,924	6,846	6,683	0,231	0,000
B 60'	2,01	27,18	25,71	2,784	6,520			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B 90'	2,01	27,18	28,00	0,563	1,364	1,428	0,572	0,409
B 90'	2,01	27,18	28,41	0,423	1,025			
B 90'	2,01	27,18	27,66	0,714	1,069			
B 90'	2,01	27,18	27,28	0,930	2,255			
B 150'	2,01	27,18	31,70	0,043	1,114	1,054	0,097	0,179
B 150'	2,01	27,18	31,71	0,042	1,106			
B 150'	2,01	27,18	31,94	0,036	0,942			
B K	2,01	27,18	26,70	1,395	1,395	1,331	0,453	
B K	2,01	27,18	27,41	0,850	0,850			
B K	2,01	27,18	27,42	0,844	1,748			
R 7'	1,99	27,18	27,86	0,625	1,771	1,642	0,183	0,001
R 7'	1,99	27,18	28,09	0,533	1,512			
R 15'	1,99	27,18	26,69	1,398	2,401	2,426	0,035	0,000
R 15'	1,99	27,18	26,66	1,427	2,451			
R 30'	1,99	27,18	25,72	2,725	4,281	4,125	0,221	0,000
R 30'	1,99	27,18	25,83	2,526	3,969			
R 60'	1,99	27,18	26,60	1,487	3,718	4,258	0,764	0,001
R 60'	1,99	27,18	26,82	1,278	4,797			
R 90'	1,99	27,18	29,70	0,176	1,807	1,783	0,028	0,000
R 90'	1,99	27,18	29,74	0,171	1,758			
R 90'	1,99	27,18	29,70	0,176	1,807			
R 150'	1,99	27,18	29,40	0,217	0,813	0,784	0,111	0,036
R 150'	1,99	27,18	29,70	0,176	0,661			
R 150'	1,99	27,18	29,29	0,234	0,877			
R K	1,99	27,18	27,60	0,747	0,539	0,596	0,076	
R K	1,99	27,18	27,26	0,944	0,682			
R K	1,99	27,18	27,53	0,784	0,566			
S 7'	2,24	27,18	26,16	2,270	1,877	1,956	0,111	0,004
S 7'	2,24	27,18	26,06	2,461	2,034			
S 15'	2,24	27,18	26,15	2,289	1,396	1,602	0,291	0,029
S 15'	2,24	27,18	25,83	2,963	1,807			
S 30'	2,24	27,18	25,51	3,835	7,581	7,706	0,176	0,000
S 30'	2,24	27,18	25,47	3,961	7,830			
S 60'	2,24	27,18	25,60	3,566	5,603	5,742	0,196	0,000
S 60'	2,24	27,18	25,54	3,743	5,881			
S 90'	2,00	27,18	26,79	1,307	0,897	0,836	0,086	0,208
S 90'	2,00	27,18	27,00	1,130	0,775			
S 150'	2,00	27,18	30,84	0,079	1,456	1,426	0,042	0,006
S 150'	2,00	27,18	30,90	0,076	1,397			
S K	2,00	27,18	28,53	0,391	0,811	0,744	0,095	
S K	2,00	27,18	28,79	0,327	0,677			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

ERF

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,17	26,42	29,80	0,073	1,050	1,756	0,999	0,127
B 7'	2,17	26,42	28,70	0,171	2,463			
B 15'	2,17	26,42	25,06	2,868	2,523	2,635	0,159	0,000
B 15'	2,17	26,42	24,95	3,123	2,747			
B 30'	2,17	26,42	26,49	0,947	1,720	2,079	0,507	0,015
B 30'	2,17	26,42	26,04	1,342	2,438			
B 60'	2,17	26,42	25,92	1,473	3,450	4,305	1,210	0,007
B 60'	2,17	26,42	25,40	2,204	5,161			
B 90'	2,17	26,42	24,17	5,715	13,854	12,547	1,849	0,001
B 90'	2,17	26,42	24,44	4,637	11,239			
B 150'	2,17	26,42	27,78	0,349	9,133	9,425	0,413	0,000
B 150'	2,17	26,42	27,70	0,371	9,717			
B K	2,17	26,42	26,29	1,106	1,106	1,006	0,105	
B K	2,17	26,42	26,40	1,016	1,016			
B K	2,17	26,42	26,56	0,897	0,897			
R 7'	2,06	26,42	27,97	0,326	0,925	1,171	0,348	0,053
R 7'	2,06	26,42	27,38	0,500	1,417			
R 15'	2,06	26,42	26,56	0,904	1,553	1,493	0,084	0,002
R 15'	2,06	26,42	26,67	0,835	1,434			
R 30'	2,06	26,42	26,93	0,692	1,087	0,901	0,263	0,075
R 30'	2,06	26,42	27,51	0,455	0,715			
R 60'	2,06	26,42	24,79	3,248	3,435	3,383	0,235	0,000
R 60'	2,06	26,42	24,73	3,392	3,588			
R 60'	2,06	26,42	24,92	2,957	3,127			
R 90'	2,06	26,42	27,21	0,565	5,797	6,321	0,741	0,004
R 90'	2,06	26,42	26,98	0,667	6,845			
R 150'	2,06	26,42	25,92	1,435	5,387	4,329	1,496	0,034
R 150'	2,06	26,42	26,61	0,872	3,272			
R K	2,06	26,42	26,93	0,692	0,499	0,470	0,041	
R K	2,06	26,42	27,10	0,612	0,442			
S 7'	1,92	26,42	25,23	2,173	1,797	2,244	0,633	0,035
S 7'	1,92	26,42	24,61	3,257	2,692			
S 15'	1,92	26,42	24,22	4,200	2,563	2,255	0,434	0,018
S 15'	1,92	26,42	24,64	3,194	1,948			
S 30'	1,92	26,42	26,69	0,839	1,658	1,870	0,301	0,015
S 30'	1,92	26,42	26,34	1,054	2,083			
S 60'	1,92	26,42	25,87	1,432	2,249	2,787	0,565	0,007
S 60'	1,92	26,42	25,60	1,707	3,375			
S 60'	1,92	26,42	25,57	1,741	2,735			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 90'	1,92	26,42	23,00	9,309	6,384	6,735	0,497	0,002
S 90'	1,92	26,42	22,84	10,333	7,086			
S 150'	1,92	26,42	28,12	0,330	6,086	5,662	0,600	0,004
S 150'	1,92	26,42	28,35	0,284	5,238			
S K	1,92	26,42	28,36	0,282	0,585	0,636	0,073	
S K	1,92	26,42	28,11	0,332	0,688			

ETR

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	1,88	27,55	26,42	2,037	1,791	1,764	0,039	0,041
B 7'	1,88	27,55	26,47	1,973	1,736			
B 15'	1,88	27,55	26,59	1,829	1,609	1,814	0,290	0,014
B 15'	1,88	27,55	26,23	2,296	2,020			
B 30'	1,88	27,55	27,07	1,351	2,453	2,255	0,281	0,004
B 30'	1,88	27,55	27,35	1,132	2,056			
B 60'	1,88	27,55	27,43	1,076	2,521	2,545	0,034	0,001
B 60'	1,88	27,55	27,40	1,097	2,569			
B 90'	1,88	27,55	28,35	0,602	1,460	1,900	0,387	0,011
B 90'	1,88	27,55	27,81	0,847	2,053			
B 90'	1,88	27,55	27,71	0,902	2,187			
B 150'	1,88	27,55	31,79	0,069	1,798	1,505	0,281	0,031
B 150'	1,88	27,55	32,10	0,056	1,479			
B 150'	1,88	27,55	32,38	0,047	1,239			
B K	1,88	27,55	27,82	0,842	0,842	1,011	0,179	
B K	1,88	27,55	27,56	0,992	0,992			
B K	1,88	27,55	27,26	1,198	1,198			
R 7'	1,85	27,55	29,27	0,346	0,595	0,575	0,131	0,131
R 7'	1,85	27,55	29,78	0,253	0,435			
R 15'	1,85	27,55	29,02	0,404	0,694	0,663	0,052	0,014
R 15'	1,85	27,55	29,25	0,351	0,602			
R 30'	1,85	27,55	28,88	0,440	0,692	0,627	0,095	0,003
R 30'	1,85	27,55	28,93	0,427	0,671			
R 60'	1,85	27,55	28,71	0,489	0,517	0,751	0,206	0,003
R 60'	1,85	27,55	27,93	0,790	0,835			
R 90'	1,85	27,55	31,50	0,088	0,901	0,747	0,107	0,004
R 90'	1,85	27,55	31,97	0,066	0,675			
R 90'	1,85	27,55	31,97	0,066	0,675			
R 90'	1,85	27,55	31,83	0,072	0,736			
R 150'	1,85	27,55	30,47	0,166	0,621	0,643	0,031	0,006
R 150'	1,85	27,55	30,36	0,177	0,665			
R K	1,85	27,55	28,89	0,438	0,316	0,341	0,036	
R K	1,85	27,55	28,65	0,507	0,366			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 7'	2,24	27,55	28,37	0,515	0,314	0,326	0,017	0,011
S 7'	2,24	27,55	28,28	0,554	0,338			
S 15'	2,24	27,55	28,05	0,666	0,407	0,357	0,071	0,081
S 15'	2,24	27,55	28,40	0,502	0,307			
S 30'	2,24	27,55	28,81	0,361	0,714	0,630	0,118	0,181
S 30'	2,24	27,55	29,14	0,277	0,547			
S 60'	2,24	27,55	29,16	0,272	0,428	0,419	0,012	0,076
S 60'	2,24	27,55	29,21	0,261	0,411			
S 90'	2,24	27,55	27,34	1,181	0,810	0,747	0,089	0,049
S 90'	2,24	27,55	27,55	0,997	0,684			
S 150'	2,24	27,55	32,96	0,013	0,234	0,245	0,015	0,013
S 150'	2,24	27,55	32,85	0,014	0,256			
S K	2,24	27,55	29,16	0,272	0,564	0,520	0,062	
S K	2,24	27,55	29,37	0,230	0,476			

Glucanase

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,04	24,66	30,41	0,017	0,238	0,228	0,015	0,007
B 7'	2,04	24,66	30,54	0,015	0,217			
B 15'	2,04	24,66	26,30	0,310	0,273	0,268	0,007	0,009
B 15'	2,04	24,66	26,35	0,299	0,263			
B 30'	2,04	24,66	25,65	0,493	0,895	0,938	0,061	0,344
B 30'	2,04	24,66	25,52	0,541	0,982			
B 60'	2,04	24,66	26,89	0,204	0,477	0,500	0,033	0,027
B 60'	2,04	24,66	26,76	0,223	0,523			
B 90'	2,04	24,66	26,64	0,243	0,590	0,549	0,058	0,036
B 90'	2,04	24,66	26,85	0,209	0,508			
B 150'	2,04	24,66	29,99	0,022	0,585	0,607	0,031	0,049
B 150'	2,04	24,66	29,89	0,024	0,628			
B K	2,04	24,66	24,21	1,376	1,376	1,023	0,257	
B K	2,04	24,66	24,60	1,042	1,042			
B K	2,04	24,66	24,99	0,789	0,789			
B K	2,04	24,66	24,83	0,884	0,884			
R 7'	2,25	24,66	27,67	0,087	0,246	0,205	0,058	0,007
R 7'	2,25	24,66	27,55	0,096	0,165			
R 15'	2,25	24,66	26,00	0,337	0,578	0,590	0,017	0,047
R 15'	2,25	24,66	25,95	0,351	0,602			
R 30'	2,25	24,66	26,54	0,217	0,341	0,417	0,106	0,105
R 30'	2,25	24,66	26,09	0,313	0,492			
R 60'	2,25	24,66	25,84	0,383	0,405	0,485	0,113	0,242
R 60'	2,25	24,66	25,43	0,534	0,565			
R 90'	2,25	24,66	29,14	0,026	0,271	0,275	0,006	0,000
R 90'	2,25	24,66	29,10	0,027	0,280			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 150'	2,25	24,66	27,07	0,141	0,531	0,544	0,019	0,275
R 150'	2,25	24,66	27,01	0,148	0,557			
R K	2,25	24,66	24,98	0,770	0,556	0,553	0,003	
R K	2,25	24,66	24,99	0,764	0,551			
S 7'	2,26	24,66	28,44	0,046	0,038	0,041	0,005	0,020
S 7'	2,26	24,66	28,23	0,054	0,045			
S 15'	2,26	24,66	27,43	0,104	0,064	0,068	0,006	0,037
S 15'	2,26	24,66	27,27	0,119	0,072			
S 30'	2,26	24,66	28,35	0,049	0,097	0,092	0,008	0,072
S 30'	2,26	24,66	28,50	0,044	0,086			
S 60'	2,26	24,66	27,72	0,082	0,129	0,147	0,025	0,430
S 60'	2,26	24,66	27,42	0,105	0,165			
S 90'	2,26	24,66	25,62	0,456	0,313	0,317	0,005	0,007
S 90'	2,26	24,66	25,59	0,468	0,321			
S 150'	2,26	24,66	29,65	0,017	0,315	0,352	0,053	0,019
S 150'	2,26	24,66	29,39	0,021	0,389			
S K	2,26	24,66	28,14	0,058	0,121	0,142	0,029	
S K	2,26	24,66	27,78	0,078	0,162			

Grip

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,17	26,05	29,71	0,059	0,845	1,111	0,376	0,378
B 7'	2,17	26,05	29,08	0,096	1,377			
B 15'	2,17	26,05	25,63	1,385	1,218	1,288	0,099	0,123
B 15'	2,17	26,05	25,49	1,543	1,357			
B 30'	2,17	26,05	25,73	1,281	2,327	2,825	0,704	0,011
B 30'	2,17	26,05	25,27	1,830	3,323			
B 60'	2,17	26,05	26,13	0,940	2,201	2,318	0,165	0,004
B 60'	2,17	26,05	26,00	1,039	2,434			
B 90'	2,17	26,05	25,70	1,311	3,179	3,310	0,226	0,000
B 90'	2,17	26,05	25,70	1,311	3,179			
B 90'	2,17	26,05	25,55	1,473	3,571			
B 150'	2,17	26,05	29,04	0,099	2,583	2,563	0,028	0,002
B 150'	2,17	26,05	29,06	0,097	2,544			
B K	2,17	26,05	25,87	1,150	1,150	1,021	0,239	
B K	2,17	26,05	25,85	1,168	1,168			
B K	2,17	26,05	26,43	0,745	0,745			
R 7'	2,26	26,05	27,54	0,297	0,841	0,866	0,035	0,102
R 7'	2,26	26,05	27,47	0,314	0,891			
R 15'	2,26	26,05	28,01	0,202	0,348	0,279	0,098	0,015
R 15'	2,26	26,05	28,63	0,122	0,210			
R 30'	2,26	26,05	26,18	0,899	1,413	1,317	0,136	0,171
R 30'	2,26	26,05	26,36	0,777	1,220			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 60'	2,26	26,05	25,93	1,103	1,166	1,460	0,415	0,198
R 60'	2,26	26,05	25,43	1,658	1,754			
R 90'	2,26	26,05	27,63	0,276	2,829	2,578	0,356	0,018
R 90'	2,26	26,05	27,87	0,227	2,326			
R 150'	2,26	26,05	26,52	0,682	2,558	2,225	0,471	0,045
R 150'	2,26	26,05	26,89	0,504	1,892			
R K	2,26	26,05	25,38	1,727	1,246	1,115	0,186	
R K	2,26	26,05	25,67	1,363	0,984			
S 7'	1,93	26,05	25,40	1,533	1,267	1,426	0,225	0,372
S 7'	1,93	26,05	25,06	1,917	1,585			
S 15'	1,93	26,05	25,02	1,968	1,201	1,053	0,209	0,073
S 15'	1,93	26,05	25,45	1,484	0,905			
S 30'	1,93	26,05	26,08	0,980	1,938	2,112	0,245	0,051
S 30'	1,93	26,05	25,83	1,156	2,285			
S 60'	1,93	26,05	26,09	0,974	1,530	1,667	0,193	0,232
S 60'	1,93	26,05	25,84	1,148	1,804			
S 90'	1,93	26,05	23,83	4,305	2,952	2,923	0,041	0,004
S 90'	1,93	26,05	23,86	4,221	2,894			
S 150'	1,93	26,05	29,55	0,100	1,847	1,788	0,083	0,085
S 150'	1,93	26,05	29,65	0,094	1,729			
S K	1,93	26,05	26,42	0,784	1,625	1,501	0,174	
S K	1,93	26,05	26,67	0,665	1,378			

GST

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,21	25,17	29,93	0,023	0,331	0,307	0,033	0,003
B 7'	2,21	25,17	30,12	0,020	0,284			
B 15'	2,21	25,17	26,82	0,270	0,238	0,240	0,003	0,002
B 15'	2,21	25,17	26,80	0,275	0,242			
B 30'	2,21	25,17	27,01	0,232	0,422	0,470	0,068	0,009
B 30'	2,21	25,17	26,75	0,286	0,519			
B 60'	2,21	25,17	27,66	0,139	0,325	0,315	0,014	0,003
B 60'	2,21	25,17	27,74	0,130	0,305			
B 90'	2,21	25,17	26,73	0,290	0,704	0,748	0,063	0,032
B 90'	2,21	25,17	26,58	0,327	0,792			
B 150'	2,21	25,17	30,18	0,019	0,493	0,432	0,087	0,009
B 150'	2,21	25,17	30,54	0,014	0,371			
B K	2,21	25,17	25,23	0,954	0,954	1,005	0,073	
B K	2,21	25,17	25,10	1,057	1,057			
R 7'	2,28	25,17	28,73	0,053	0,151	0,127	0,034	0,006
R 7'	2,28	25,17	29,20	0,036	0,102			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 15'	2,28	25,17	27,02	0,218	0,374	0,397	0,032	0,018
R 15'	2,28	25,17	26,88	0,244	0,420			
R 30'	2,28	25,17	26,33	0,384	0,604	0,652	0,068	0,183
R 30'	2,28	25,17	26,15	0,446	0,701			
R 60'	2,28	25,17	25,25	0,936	0,990	1,007	0,023	0,030
R 60'	2,28	25,17	25,21	0,968	1,023			
R 90'	2,28	25,17	27,94	0,102	1,046	1,082	0,050	0,022
R 90'	2,28	25,17	27,86	0,109	1,118			
R 150'	2,28	25,17	27,56	0,139	0,524	0,553	0,042	0,056
R 150'	2,28	25,17	27,43	0,155	0,583			
R K	2,28	25,17	25,03	1,122	0,810	0,746	0,091	
R K	2,28	25,17	25,24	0,944	0,681			
S 7'	2,29	25,17	26,20	0,426	0,352	0,313	0,055	0,033
S 7'	2,29	25,17	26,50	0,332	0,275			
S 15'	2,29	25,17	25,23	0,952	0,581	0,659	0,111	0,226
S 15'	2,29	25,17	24,94	1,210	0,738			
S 30'	2,29	25,17	27,11	0,200	0,396	0,465	0,097	0,073
S 30'	2,29	25,17	26,75	0,270	0,534			
S 60'	2,29	25,17	26,67	0,289	0,453	0,488	0,048	0,070
S 60'	2,29	25,17	26,50	0,332	0,522			
S 90'	2,29	25,17	25,18	0,992	0,680	0,683	0,004	0,230
S 90'	2,29	25,17	25,17	1,000	0,686			
S 150'	2,29	25,17	29,21	0,035	0,649	0,590	0,083	0,137
S 150'	2,29	25,17	29,45	0,029	0,532			
S K	2,29	25,17	26,53	0,324	0,671	0,796	0,176	
S K	2,29	25,17	26,15	0,444	0,920			

LOX

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,03	25,74	28,93	0,104	1,505	1,281	0,317	0,104
B 7'	2,03	25,74	29,43	0,073	1,057			
B 15'	2,03	25,74	25,39	1,281	1,127	1,089	0,054	0,118
B 15'	2,03	25,74	25,49	1,194	1,050			
B 30'	2,03	25,74	26,75	0,489	0,888	1,100	0,299	0,298
B 30'	2,03	25,74	26,20	0,722	1,311			
B 60'	2,03	25,74	26,66	0,521	1,221	1,159	0,087	0,053
B 60'	2,03	25,74	26,81	0,469	1,098			
B 90'	2,03	25,74	25,41	1,263	3,062	3,612	0,695	0,001
B 90'	2,03	25,74	25,27	1,395	3,381			
B 90'	2,03	25,74	24,90	1,813	4,394			
B 150'	2,03	25,74	28,96	0,102	2,680	2,247	0,611	0,016
B 150'	2,03	25,74	29,51	0,069	1,815			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B K	2,03	25,74	25,66	1,058	1,058	1,002	0,069	
B K	2,03	25,74	25,71	1,021	1,021			
B K	2,03	25,74	25,85	0,925	0,925			
R 7'	1,93	25,74	27,08	0,414	1,175	1,186	0,017	0,054
R 7'	1,93	25,74	27,05	0,423	1,198			
R 15'	1,93	25,74	26,56	0,583	1,002	0,859	0,202	0,177
R 15'	1,93	25,74	27,07	0,417	0,717			
R 30'	1,93	25,74	26,28	0,701	1,102	1,147	0,064	0,107
R 30'	1,93	25,74	26,16	0,759	1,192			
R 60'	1,93	25,74	25,47	1,194	1,263	1,267	0,006	0,053
R 60'	1,93	25,74	25,46	1,202	1,271			
R 90'	1,93	25,74	28,41	0,173	1,773	1,654	0,169	0,020
R 90'	1,93	25,74	28,63	0,150	1,534			
R 150'	1,93	25,74	26,70	0,532	1,997	2,016	0,028	0,001
R 150'	1,93	25,74	26,67	0,543	2,036			
R K	1,93	25,74	25,25	1,380	0,996	1,037	0,058	
R K	1,93	25,74	25,13	1,493	1,078			
S 7'	1,88	25,74	24,90	1,699	1,405	1,202	0,287	0,068
S 7'	1,88	25,74	24,96	1,636	0,998			
S 15'	1,88	25,74	24,28	2,513	1,533	1,599	0,093	0,166
S 15'	1,88	25,74	24,15	2,728	1,665			
S 30'	1,88	25,74	25,95	0,876	1,732	1,771	0,055	0,302
S 30'	1,88	25,74	25,88	0,915	1,810			
S 60'	1,88	25,74	26,28	0,711	1,117	1,264	0,208	0,054
S 60'	1,88	25,74	25,91	0,898	1,411			
S 90'	1,88	25,74	23,83	3,339	2,290	2,283	0,010	0,008
S 90'	1,88	25,74	23,84	3,318	2,275			
S 150'	1,88	25,74	29,21	0,112	2,063	2,090	0,037	0,020
S 150'	1,88	25,74	29,17	0,115	2,116			
S K	1,88	25,74	26,10	0,797	1,651	1,721	0,100	
S K	1,88	25,74	25,97	0,865	1,792			

LTP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,03	27,19	31,94	0,035	0,499	0,457	0,059	0,003
B 7'	2,03	27,19	32,20	0,029	0,415			
B 15'	2,03	27,19	29,16	0,248	0,218	0,241	0,032	0,001
B 15'	2,03	27,19	28,89	0,300	0,264			
B 30'	2,03	27,19	28,50	0,396	0,718	0,547	0,122	0,004
B 30'	2,03	27,19	29,21	0,239	0,434			
B 30'	2,03	27,19	28,92	0,294	0,533			
B 30'	2,03	27,19	29,01	0,276	0,501			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B 60'	2,03	27,19	28,92	0,294	0,688	0,735	0,066	0,016
B 60'	2,03	27,19	28,74	0,334	0,781			
B 90'	2,03	27,19	28,78	0,324	0,786	0,711	0,106	0,032
B 90'	2,03	27,19	29,08	0,262	0,636			
B 150'	2,03	27,19	33,69	0,010	0,263	0,274	0,016	0,000
B 150'	2,03	27,19	33,57	0,011	0,286			
B K	2,03	27,19	27,17	1,014	1,014	1,000	0,020	
B K	2,03	27,19	27,21	0,986	0,986			
R 7'	2,29	27,19	31,97	0,019	0,054	0,055	0,002	0,198
R 7'	2,29	27,19	31,92	0,020	0,056			
R 15'	2,29	27,19	32,23	0,015	0,026	0,024	0,003	0,102
R 15'	2,29	27,19	32,42	0,013	0,023			
R 30'	2,29	27,19	30,97	0,044	0,069	0,056	0,018	0,242
R 30'	2,29	27,19	31,54	0,027	0,043			
R 60'	2,29	27,19	31,04	0,041	0,044	0,037	0,010	0,313
R 60'	2,29	27,19	31,50	0,028	0,030			
R 90'	2,29	27,19	34,25	0,003	0,030	0,029	0,001	0,152
R 90'	2,29	27,19	34,29	0,003	0,029			
R 150'	2,29	27,19	32,65	0,011	0,041	0,047	0,013	0,402
R 150'	2,29	27,19	32,73	0,010	0,038			
R 150'	2,29	27,19	32,16	0,016	0,061			
R K	2,29	27,19	30,16	0,085	0,062	0,044	0,016	
R K	2,29	27,19	30,92	0,045	0,033			
R K	2,29	27,19	30,80	0,050	0,036			
S 7'	2,11	27,19	30,68	0,074	0,061	0,061	0,000	0,020
S 7'	2,11	27,19	30,69	0,073	0,061			
S 15'	2,11	27,19	30,03	0,120	0,073	0,075	0,002	0,084
S 15'	2,11	27,19	29,97	0,125	0,077			
S 30'	2,11	27,19	30,37	0,093	0,184	0,169	0,021	0,010
S 30'	2,11	27,19	30,60	0,078	0,155			
S 60'	2,11	27,19	30,29	0,099	0,155	0,160	0,007	0,002
S 60'	2,11	27,19	30,21	0,105	0,165			
S 90'	2,11	27,19	29,82	0,140	0,096	0,118	0,031	0,079
S 90'	2,11	27,19	29,32	0,204	0,140			
S 150'	2,11	27,19	33,63	0,008	0,150	0,133	0,015	0,006
S 150'	2,11	27,19	33,92	0,007	0,121			
S 150'	2,11	27,19	33,84	0,007	0,129			
S K	2,11	27,19	31,70	0,034	0,071	0,070	0,003	
S K	2,11	27,19	31,77	0,033	0,068			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

MS

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,08	21,68	24,46	0,131	1,881	1,945	0,091	0,000
B 7'	2,08	21,68	24,37	0,139	2,009			
B 15'	2,08	21,68	23,19	0,331	0,291	0,367	0,107	0,000
B 15'	2,08	21,68	22,62	0,502	0,442			
B 30'	2,08	21,68	22,12	0,725	1,316	1,297	0,027	0,001
B 30'	2,08	21,68	22,16	0,704	1,278			
B 60'	2,08	21,68	22,02	0,780	1,826	1,719	0,151	0,000
B 60'	2,08	21,68	22,19	0,688	1,612			
B 90'	2,08	21,68	22,46	0,565	1,369	1,293	0,107	0,004
B 90'	2,08	21,68	22,62	0,502	1,218			
B 150'	2,08	21,68	25,76	0,050	1,320	1,238	0,115	0,009
B 150'	2,08	21,68	25,94	0,044	1,157			
B K	2,08	21,68	21,68	1,000	1,000	0,979	0,030	
B K	2,08	21,68	21,74	0,957	0,957			
B K	2,08	21,68	21,69	0,993	0,993			
B K	2,08	21,68	21,59	1,068	1,068			
R 7'	2,15	21,68	24,03	0,165	0,469	0,434	0,049	0,021
R 7'	2,15	21,68	24,24	0,141	0,399			
R 15'	2,15	21,68	22,93	0,384	0,660	0,712	0,073	0,264
R 15'	2,15	21,68	22,74	0,444	0,763			
R 30'	2,15	21,68	23,01	0,361	0,568	0,586	0,025	0,051
R 30'	2,15	21,68	22,93	0,384	0,603			
R 60'	2,15	21,68	22,66	0,472	0,500	0,478	0,031	0,023
R 60'	2,15	21,68	22,78	0,431	0,456			
R 90'	2,15	21,68	25,10	0,073	0,749	0,887	0,195	0,265
R 90'	2,15	21,68	24,69	0,100	1,025			
R 150'	2,15	21,68	23,57	0,235	0,883	0,956	0,103	0,098
R 150'	2,15	21,68	23,37	0,274	1,029			
R K	2,15	21,68	21,49	1,157	0,835	0,773	0,088	
R K	2,15	21,68	21,70	0,985	0,711			
S 7'	1,97	21,68	21,88	0,873	0,722	0,668	0,077	0,250
S 7'	1,97	21,68	22,12	0,742	0,613			
S 15'	1,97	21,68	22,57	0,547	0,334	0,357	0,032	0,032
S 15'	1,97	21,68	22,38	0,622	0,380			
S 30'	1,97	21,68	22,57	0,547	1,081	1,078	0,005	0,049
S 30'	1,97	21,68	22,58	0,543	1,074			
S 60'	1,97	21,68	22,83	0,459	0,720	0,799	0,111	0,409
S 60'	1,97	21,68	22,54	0,558	0,877			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 90'	1,97	21,68	22,44	0,597	0,410	0,446	0,051	0,052
S 90'	1,97	21,68	22,20	0,703	0,482			
S 150'	1,97	21,68	25,85	0,059	1,091	1,219	0,181	0,056
S 150'	1,97	21,68	25,54	0,073	1,347			
S K	1,97	21,68	22,96	0,420	0,870	0,764	0,149	
S K	1,97	21,68	23,37	0,318	0,659			

PAL

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,01	30,52	35,29	0,036	0,516	0,425	0,128	0,019
B 7'	2,01	30,52	35,91	0,023	0,334			
B 15'	2,01	30,52	31,97	0,363	0,320	0,316	0,005	0,006
B 15'	2,01	30,52	32,00	0,356	0,313			
B 30'	2,01	30,52	31,28	0,588	1,068	1,046	0,031	0,300
B 30'	2,01	30,52	31,34	0,564	1,024			
B 60'	2,01	30,52	30,57	0,966	2,261	2,756	0,700	0,036
B 60'	2,01	30,52	30,05	1,388	3,251			
B 90'	2,01	30,52	29,85	1,596	3,870	4,458	0,831	0,014
B 90'	2,01	30,52	29,47	2,081	5,046			
B 150'	2,01	30,52	31,70	0,439	11,493	12,172	0,960	0,002
B 150'	2,01	30,52	31,54	0,491	12,851			
B K	2,01	30,52	30,42	1,072	1,072	0,999	0,103	
B K	2,01	30,52	30,63	0,926	0,926			
R 7'	2,00	30,52	33,34	0,142	0,401	0,357	0,063	0,046
R 7'	2,00	30,52	33,70	0,110	0,313			
R 15'	2,00	30,52	34,73	0,054	0,093	0,113	0,028	0,032
R 15'	2,00	30,52	34,21	0,077	0,133			
R 30'	2,00	30,52	31,22	0,616	0,967	1,083	0,164	0,009
R 30'	2,00	30,52	30,91	0,763	1,199			
R 60'	2,00	30,52	30,85	0,796	0,841	1,032	0,270	0,025
R 60'	2,00	30,52	30,31	1,157	1,223			
R 90'	2,00	30,52	33,95	0,093	0,952	0,844	0,152	0,014
R 90'	2,00	30,52	34,32	0,072	0,737			
R 150'	2,00	30,52	32,74	0,215	0,806	0,797	0,012	0,001
R 150'	2,00	30,52	32,77	0,210	0,789			
R K	2,00	30,52	32,41	0,270	0,195	0,212	0,024	
R K	2,00	30,52	32,18	0,316	0,228			
S 7'	2,12	30,52	30,78	0,823	0,680	0,667	0,018	0,025
S 7'	2,12	30,52	30,83	0,792	0,655			
S 15'	2,12	30,52	29,93	1,558	0,950	0,930	0,030	0,078
S 15'	2,12	30,52	29,99	1,489	0,909			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 30'	2,12	30,52	31,41	0,512	1,013	1,255	0,342	0,035
S 30'	2,12	30,52	30,89	0,757	1,497			
S 60'	2,12	30,52	31,00	0,697	1,095	1,461	0,517	0,048
S 60'	2,12	30,52	30,32	1,162	1,826			
S 90'	2,12	30,52	28,46	4,702	3,224	2,958	0,376	0,005
S 90'	2,12	30,52	28,70	3,926	2,692			
S 150'	2,12	30,52	34,01	0,073	1,340	1,675	0,474	0,030
S 150'	2,12	30,52	33,47	0,109	2,010			
S K	2,12	30,52	32,64	0,203	0,421	0,348	0,104	
S K	2,12	30,52	33,21	0,132	0,275			

PGIP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,05	23,21	29,61	0,010	0,145	0,167	0,031	0,002
B 7'	2,05	23,21	29,24	0,013	0,189			
B 15'	2,05	23,21	25,44	0,201	0,177	0,193	0,022	0,002
B 15'	2,05	23,21	25,21	0,237	0,209			
B 30'	2,05	23,21	25,75	0,161	0,292	0,320	0,039	0,005
B 30'	2,05	23,21	25,51	0,191	0,347			
B 60'	2,05	23,21	26,65	0,084	0,197	0,189	0,012	0,002
B 60'	2,05	23,21	26,77	0,077	0,181			
B 90'	2,05	23,21	25,05	0,266	0,645	0,687	0,059	0,046
B 90'	2,05	23,21	24,88	0,300	0,728			
B 150'	2,05	23,21	28,48	0,023	0,594	0,663	0,097	0,041
B 150'	2,05	23,21	28,19	0,028	0,731			
B K	2,05	23,21	22,88	1,263	1,263	1,014	0,194	
B K	2,05	23,21	23,14	1,048	1,048			
B K	2,05	23,21	23,51	0,803	0,803			
B K	2,05	23,21	23,29	0,941	0,941			
R 7'	2,24	23,21	28,74	0,012	0,033	0,038	0,007	0,004
R 7'	2,24	23,21	28,41	0,015	0,043			
R 15'	2,24	23,21	27,18	0,041	0,070	0,078	0,011	0,043
R 15'	2,24	23,21	26,92	0,050	0,086			
R 30'	2,24	23,21	26,67	0,061	0,096	0,111	0,021	0,412
R 30'	2,24	23,21	26,33	0,080	0,126			
R 60'	2,24	23,21	26,02	0,103	0,109	0,115	0,008	0,198
R 60'	2,24	23,21	25,90	0,114	0,120			
R 90'	2,24	23,21	28,69	0,012	0,123	0,134	0,016	0,078
R 90'	2,24	23,21	28,48	0,014	0,146			
R 150'	2,24	23,21	27,43	0,033	0,124	0,122	0,003	0,043
R 150'	2,24	23,21	27,47	0,032	0,120			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R K	2,24	23,21	25,62	0,143	0,103	0,107	0,006	
R K	2,24	23,21	25,52	0,155	0,112			
S 7'	2,19	23,21	26,35	0,085	0,070	0,076	0,008	0,002
S 7'	2,19	23,21	26,15	0,099	0,082			
S 15'	2,19	23,21	26,29	0,089	0,054	0,045	0,013	0,002
S 15'	2,19	23,21	26,80	0,060	0,036			
S 30'	2,19	23,21	27,73	0,029	0,057	0,056	0,001	0,001
S 30'	2,19	23,21	27,77	0,028	0,055			
S 60'	2,19	23,21	27,36	0,038	0,060	0,050	0,015	0,003
S 60'	2,19	23,21	27,90	0,025	0,040			
S 90'	2,19	23,21	25,82	0,129	0,088	0,087	0,001	0,002
S 90'	2,19	23,21	25,85	0,126	0,086			
S 150'	2,19	23,21	29,42	0,008	0,141	0,131	0,014	0,008
S 150'	2,19	23,21	29,61	0,007	0,122			
S K	2,19	23,21	26,01	0,111	0,230	0,239	0,013	
S K	2,19	23,21	25,91	0,120	0,249			

PGPI

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,04	25,70	27,86	0,214	3,088	2,972	0,165	0,002
B 7'	2,04	25,70	27,97	0,198	2,855			
B 15'	2,04	25,70	24,74	1,983	1,744	1,776	0,045	0,003
B 15'	2,04	25,70	24,69	2,055	1,807			
B 30'	2,04	25,70	24,50	2,353	4,272	4,382	0,155	0,001
B 30'	2,04	25,70	24,43	2,473	4,491			
B 60'	2,04	25,70	25,45	1,195	2,799	2,809	0,014	0,000
B 60'	2,04	25,70	25,44	1,204	2,819			
B 90'	2,04	25,70	27,72	0,237	0,574	0,634	0,067	0,005
B 90'	2,04	25,70	27,43	0,291	0,706			
B 90'	2,04	25,70	27,61	0,256	0,621			
B 150'	2,04	25,70	31,30	0,018	0,483	0,554	0,157	0,007
B 150'	2,04	25,70	31,62	0,015	0,385			
B 150'	2,04	25,70	31,37	0,018	0,460			
B 150'	2,04	25,70	30,71	0,028	0,736			
B 150'	2,04	25,70	30,77	0,027	0,705			
B K	2,04	25,70	25,77	0,951	0,951	1,001	0,071	
B K	2,04	25,70	25,63	1,051	1,051			
R 7'	2,22	25,70	27,89	0,174	0,494	0,413	0,115	0,036
R 7'	2,22	25,70	28,39	0,117	0,332			
R 15'	2,22	25,70	26,80	0,416	0,715	0,632	0,117	0,118
R 15'	2,22	25,70	27,13	0,320	0,549			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 30'	2,22	25,70	26,67	0,461	0,725	0,711	0,145	0,150
R 30'	2,22	25,70	26,72	0,443	0,696			
R 60'	2,22	25,70	25,97	0,806	0,853	0,951	0,157	0,227
R 60'	2,22	25,70	25,71	0,992	1,049			
R 90'	2,22	25,70	29,00	0,072	0,738	0,727	0,016	0,176
R 90'	2,22	25,70	29,04	0,070	0,715			
R 150'	2,22	25,70	28,61	0,098	0,369	0,309	0,084	0,019
R 150'	2,22	25,70	29,10	0,066	0,249			
R K	2,22	25,70	25,66	1,032	0,745	0,831	0,121	
R K	2,22	25,70	25,40	1,270	0,917			
S 7'	2,19	25,70	26,77	0,432	0,357	0,363	0,008	0,235
S 7'	2,19	25,70	26,73	0,446	0,369			
S 15'	2,19	25,70	26,21	0,670	0,409	0,384	0,036	0,487
S 15'	2,19	25,70	26,38	0,587	0,358			
S 30'	2,19	25,70	26,49	0,538	1,064	0,949	0,162	0,020
S 30'	2,19	25,70	26,80	0,422	0,835			
S 60'	2,19	25,70	26,94	0,378	0,594	0,509	0,120	0,147
S 60'	2,19	25,70	27,37	0,270	0,424			
S 90'	2,19	25,70	26,89	0,393	0,270	0,299	0,041	0,076
S 90'	2,19	25,70	26,64	0,479	0,328			
S 150'	2,19	25,70	31,27	0,013	0,234	0,220	0,020	0,014
S 150'	2,19	25,70	31,43	0,011	0,207			
S K	2,19	25,70	27,93	0,174	0,361	0,385	0,034	
S K	2,19	25,70	27,77	0,197	0,409			

PGP4

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,00	23,81	25,23	0,374	6,883	6,859	0,034	0,000
B 7'	2,00	23,81	25,24	0,371	6,836			
B 15'	2,00	23,81	22,72	2,129	2,394	2,563	0,238	0,251
B 15'	2,00	23,81	22,53	2,428	2,731			
B 30'	2,00	23,81	23,02	1,729	4,014	3,528	0,687	0,001
B 30'	2,00	23,81	23,42	1,310	3,042			
B 60'	2,00	23,81	23,36	1,366	4,090	3,914	0,249	0,000
B 60'	2,00	23,81	23,49	1,248	3,738			
B 90'	2,00	23,81	23,03	1,717	5,322	5,196	0,178	0,000
B 90'	2,00	23,81	23,10	1,636	5,070			
B 150'	2,00	23,81	26,33	0,174	5,839	6,048	0,296	0,000
B 150'	2,00	23,81	26,23	0,187	6,258			
B K	2,00	23,81	24,17	0,779	0,779	1,030	0,283	
B K	2,00	23,81	23,82	0,993	0,993			
B K	2,00	23,81	23,29	1,434	1,434			
B K	2,00	23,81	23,94	0,914	0,914			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 7'	2,06	23,81	25,28	0,346	0,980	0,796	0,260	0,197
R 7'	2,06	23,81	25,93	0,216	0,613			
R 15'	2,06	23,81	25,40	0,317	0,544	0,462	0,117	0,121
R 15'	2,06	23,81	25,90	0,221	0,379			
R 30'	2,06	23,81	25,66	0,263	0,413	0,534	0,172	0,325
R 30'	2,06	23,81	25,02	0,417	0,655			
R 60'	2,06	23,81	24,31	0,697	0,737	0,606	0,186	0,480
R 60'	2,06	23,81	24,92	0,448	0,474			
R 90'	2,06	23,81	27,89	0,052	0,538	0,839	0,426	0,254
R 90'	2,06	23,81	26,85	0,111	1,140			
R 150'	2,06	23,81	25,16	0,377	1,415	1,147	0,250	0,021
R 150'	2,06	23,81	25,93	0,216	0,811			
R 150'	2,06	23,81	25,40	0,317	1,190			
R 150'	2,06	23,81	25,42	0,312	1,172			
R K	2,06	23,81	24,09	0,817	0,590	0,598	0,012	
R K	2,06	23,81	24,05	0,841	0,607			
S 7'	2,07	23,81	24,95	0,436	0,361	0,418	0,081	0,051
S 7'	2,07	23,81	24,57	0,575	0,476			
S 15'	2,07	23,81	24,60	0,563	0,343	0,306	0,053	0,009
S 15'	2,07	23,81	24,94	0,439	0,268			
S 30'	2,07	23,81	25,91	0,217	0,429	0,537	0,153	0,352
S 30'	2,07	23,81	25,35	0,326	0,645			
S 60'	2,07	23,81	25,60	0,272	0,427	0,345	0,117	0,051
S 60'	2,07	23,81	26,27	0,167	0,262			
S 90'	2,07	23,81	23,87	0,957	0,656	0,671	0,069	0,084
S 90'	2,07	23,81	23,73	1,060	0,727			
S 90'	2,07	23,81	24,04	0,846	0,580			
S 90'	2,07	23,81	23,74	1,052	0,722			
S 150'	2,07	23,81	27,97	0,048	0,894	0,946	0,073	0,010
S 150'	2,07	23,81	27,82	0,054	0,997			
S K	2,07	23,81	25,56	0,280	0,580	0,584	0,006	
S K	2,07	23,81	25,54	0,284	0,589			

PPO

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,03	24,62	27,59	0,122	1,759	1,937	0,251	0,031
B 7'	2,03	24,62	27,33	0,147	2,115			
B 15'	2,03	24,62	24,12	1,425	1,253	1,295	0,058	0,119
B 15'	2,03	24,62	24,03	1,519	1,336			
B 30'	2,03	24,62	24,46	1,120	2,034	2,329	0,418	0,030
B 30'	2,03	24,62	24,10	1,445	2,624			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B 60'	2,03	24,62	24,42	1,152	2,698	2,787	0,126	0,005
B 60'	2,03	24,62	24,33	1,228	2,875			
B 90'	2,03	24,62	22,95	3,262	7,908	7,586	0,455	0,002
B 90'	2,03	24,62	23,07	2,997	7,264			
B 150'	2,03	24,62	28,22	0,078	2,047	1,811	0,334	0,054
B 150'	2,03	24,62	28,59	0,060	1,576			
B K	2,03	24,62	24,85	0,850	0,850	1,013	0,231	
B K	2,03	24,62	24,39	1,177	1,177			
R 7'	2,10	24,62	26,54	0,241	0,682	0,663	0,028	0,133
R 7'	2,10	24,62	26,62	0,227	0,643			
R 15'	2,10	24,62	25,57	0,494	0,849	0,892	0,061	0,405
R 15'	2,10	24,62	25,44	0,544	0,935			
R 30'	2,10	24,62	25,05	0,727	1,142	1,172	0,043	0,171
R 30'	2,10	24,62	24,98	0,766	1,203			
R 60'	2,10	24,62	24,25	1,316	1,392	1,491	0,141	0,060
R 60'	2,10	24,62	24,07	1,504	1,591			
R 90'	2,10	24,62	27,69	0,103	1,052	1,390	0,479	0,183
R 90'	2,10	24,62	27,02	0,169	1,729			
R 150'	2,10	24,62	25,00	0,754	2,831	2,740	0,129	0,006
R 150'	2,10	24,62	25,09	0,706	2,648			
R K	2,10	24,62	24,55	1,053	0,760	0,943	0,259	
R K	2,10	24,62	24,02	1,561	1,126			
S 7'	2,09	24,62	23,81	1,817	1,502	1,767	0,375	0,034
S 7'	2,09	24,62	23,40	2,458	2,032			
S 15'	2,09	24,62	22,97	3,375	2,059	2,453	0,558	0,214
S 15'	2,09	24,62	22,53	4,668	2,848			
S 30'	2,09	24,62	24,22	1,343	2,655	2,984	0,465	0,391
S 30'	2,09	24,62	23,92	1,675	3,312			
S 60'	2,09	24,62	23,71	1,956	3,073	3,203	0,184	0,116
S 60'	2,09	24,62	23,60	2,121	3,332			
S 90'	2,09	24,62	22,64	4,304	2,952	3,076	0,176	0,199
S 90'	2,09	24,62	22,53	4,668	3,201			
S 150'	2,09	24,62	26,64	0,226	4,161	3,700	0,652	0,114
S 150'	2,09	24,62	26,98	0,176	3,239			
S K	2,09	24,62	24,11	1,456	3,018	2,870	0,209	
S K	2,09	24,62	24,25	1,314	2,722			

PR4

Probe	E	CT Kal.B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,02	28,32	34,69	0,011	0,163	0,151	0,017	0,008
B 7'	2,02	28,32	34,92	0,010	0,139			
B 15'	2,02	28,32	30,50	0,216	0,190	0,175	0,021	0,009
B 15'	2,02	28,32	30,74	0,182	0,160			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B 30'	2,02	28,32	29,75	0,366	0,664	0,699	0,049	0,057
B 30'	2,02	28,32	29,61	0,404	0,733			
B 60'	2,02	28,32	30,57	0,206	0,481	0,434	0,067	0,020
B 60'	2,02	28,32	30,88	0,165	0,387			
B 90'	2,02	28,32	30,23	0,261	0,633	0,569	0,090	0,037
B 90'	2,02	28,32	30,55	0,208	0,505			
B 150'	2,02	28,32	33,19	0,033	0,853	0,772	0,115	0,112
B 150'	2,02	28,32	33,49	0,026	0,691			
B K	2,02	28,32	28,16	1,119	1,119	1,009	0,155	
B K	2,02	28,32	28,47	0,900	0,900			
R 7'	2,06	28,32	31,54	0,098	0,277	0,238	0,055	0,276
R 7'	2,06	28,32	32,00	0,070	0,198			
R 15'	2,06	28,32	31,29	0,117	0,201	0,181	0,028	0,193
R 15'	2,06	28,32	31,59	0,094	0,162			
R 30'	2,06	28,32	30,11	0,274	0,431	0,459	0,040	0,008
R 30'	2,06	28,32	29,94	0,310	0,487			
R 60'	2,06	28,32	30,26	0,246	0,317	0,322	0,007	0,008
R 60'	2,06	28,32	30,22	0,253	0,326			
R 90'	2,06	28,32	32,54	0,047	0,486	0,530	0,062	0,010
R 90'	2,06	28,32	32,31	0,056	0,574			
R 150'	2,06	28,32	31,16	0,128	0,482	0,419	0,089	0,041
R 150'	2,06	28,32	31,58	0,095	0,356			
R K	2,06	28,32	30,14	0,268	0,194	0,208	0,020	
R K	2,06	28,32	29,95	0,308	0,222			
S 7'	1,97	28,32	29,90	0,343	0,283	0,357	0,105	0,046
S 7'	1,97	28,32	29,28	0,522	0,431			
S 15'	1,97	28,32	29,51	0,446	0,272	0,331	0,083	0,008
S 15'	1,97	28,32	28,98	0,639	0,390			
S 30'	1,97	28,32	30,73	0,195	0,386	0,377	0,013	0,002
S 30'	1,97	28,32	30,80	0,186	0,368			
S 60'	1,97	28,32	29,34	0,501	0,787	0,761	0,036	0,012
S 60'	1,97	28,32	29,44	0,468	0,735			
S 90'	1,97	28,32	28,21	1,077	0,739	0,746	0,011	0,003
S 90'	1,97	28,32	28,18	1,100	0,754			
S 150'	1,97	28,32	32,93	0,044	0,810	0,841	0,044	0,008
S 150'	1,97	28,32	32,82	0,047	0,873			
S K	1,97	28,32	30,21	0,278	0,575	0,585	0,014	
S K	1,97	28,32	30,16	0,287	0,595			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

PRP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,14	22,81	30,11	0,004	0,056	0,063	0,010	0,001
B 7'	2,14	22,81	29,80	0,005	0,071			
B 15'	2,14	22,81	25,82	0,101	0,089	0,090	0,001	0,001
B 15'	2,14	22,81	25,80	0,103	0,090			
B 30'	2,14	22,81	24,99	0,190	0,346	0,354	0,011	0,003
B 30'	2,14	22,81	24,93	0,199	0,362			
B 60'	2,14	22,81	25,12	0,172	0,404	0,396	0,011	0,003
B 60'	2,14	22,81	25,17	0,166	0,389			
B 90'	2,14	22,81	25,00	0,189	0,458	0,494	0,050	0,006
B 90'	2,14	22,81	24,81	0,218	0,529			
B 150'	2,14	22,81	28,77	0,011	0,281	0,233	0,068	0,002
B 150'	2,14	22,81	29,32	0,007	0,185			
B K	2,14	22,81	22,64	1,138	1,138	1,005	0,122	
B K	2,14	22,81	22,84	0,977	0,977			
B K	2,14	22,81	22,95	0,899	0,899			
R 7'	2,10	22,81	27,95	0,022	0,063	0,060	0,004	0,001
R 7'	2,10	22,81	28,07	0,020	0,057			
R 15'	2,10	22,81	26,46	0,067	0,115	0,125	0,014	0,003
R 15'	2,10	22,81	26,24	0,078	0,135			
R 30'	2,10	22,81	24,40	0,307	0,483	0,441	0,060	0,071
R 30'	2,10	22,81	24,66	0,253	0,398			
R 60'	2,10	22,81	24,27	0,339	0,358	0,352	0,009	0,197
R 60'	2,10	22,81	24,32	0,326	0,345			
R 90'	2,10	22,81	27,28	0,036	0,372	0,415	0,061	0,109
R 90'	2,10	22,81	27,00	0,045	0,458			
R 150'	2,10	22,81	26,69	0,056	0,211	0,207	0,005	0,006
R 150'	2,10	22,81	26,74	0,054	0,203			
R K	2,10	22,81	23,79	0,483	0,349	0,335	0,019	
R K	2,10	22,81	23,90	0,445	0,321			
S 7'	2,22	22,81	25,69	0,101	0,083	0,083	0,000	0,003
S 7'	2,22	22,81	25,68	0,101	0,084			
S 15'	2,22	22,81	24,73	0,216	0,132	0,121	0,016	0,005
S 15'	2,22	22,81	24,96	0,180	0,110			
S 30'	2,22	22,81	25,97	0,080	0,159	0,166	0,009	0,007
S 30'	2,22	22,81	25,87	0,087	0,172			
S 60'	2,22	22,81	24,89	0,190	0,299	0,309	0,014	0,050
S 60'	2,22	22,81	24,81	0,203	0,319			
S 90'	2,22	22,81	23,65	0,512	0,351	0,411	0,085	0,368
S 90'	2,22	22,81	23,28	0,687	0,471			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 150'	2,22	22,81	27,64	0,021	0,392	0,406	0,021	0,274
S 150'	2,22	22,81	27,55	0,023	0,421			
S K	2,22	22,81	24,84	0,198	0,410	0,386	0,035	
S K	2,22	22,81	25,00	0,174	0,361			

SREBP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,03	29,13	31,65	0,168	2,419	2,674	0,360	0,011
B 7'	2,03	29,13	31,38	0,203	2,929			
B 15'	2,03	29,13	30,32	0,431	0,379	0,412	0,047	0,002
B 15'	2,03	29,13	30,09	0,507	0,446			
B 30'	2,03	29,13	29,83	0,609	1,106	1,044	0,089	0,347
B 30'	2,03	29,13	30,00	0,540	0,981			
B 60'	2,03	29,13	30,43	0,398	0,933	1,039	0,150	0,419
B 60'	2,03	29,13	30,14	0,489	1,145			
B 90'	2,03	29,13	28,77	1,290	3,128	2,648	0,679	0,038
B 90'	2,03	29,13	28,88	1,194	2,168			
B 150'	2,03	29,13	33,17	0,057	1,499	1,520	0,226	0,020
B 150'	2,03	29,13	33,41	0,048	1,265			
B 150'	2,03	29,13	32,90	0,069	1,815			
B 150'	2,03	29,13	33,17	0,057	1,499			
B K	2,03	29,13	29,13	1,000	1,000	1,014	0,020	
B K	2,03	29,13	29,09	1,029	1,029			
R 7'	1,99	29,13	30,17	0,489	1,386	1,343	0,119	0,001
R 7'	1,99	29,13	30,37	0,426	1,208			
R 7'	1,99	29,13	30,12	0,506	1,434			
R 15'	1,99	29,13	32,97	0,071	0,122	0,123	0,001	0,007
R 15'	1,99	29,13	32,96	0,072	0,123			
R 30'	1,99	29,13	32,91	0,074	0,111	0,099	0,017	0,008
R 30'	1,99	29,13	33,33	0,056	0,087			
R 60'	1,99	29,13	31,76	0,164	0,173	0,167	0,008	0,016
R 60'	1,99	29,13	31,86	0,153	0,162			
R 90'	1,99	29,13	31,72	0,168	1,726	1,827	0,142	0,002
R 90'	1,99	29,13	31,56	0,188	1,927			
R 150'	1,99	29,13	32,28	0,114	0,430	0,352	0,110	0,204
R 150'	1,99	29,13	32,93	0,073	0,275			
R K	1,99	29,13	30,66	0,349	0,252	0,269	0,025	
R K	1,99	29,13	30,47	0,398	0,287			
S 7'	2,00	29,13	28,16	1,959	1,619	1,759	0,198	0,004
S 7'	2,00	29,13	27,93	2,297	1,899			
S 15'	2,00	29,13	29,04	1,064	0,649	0,713	0,091	0,006
S 15'	2,00	29,13	28,78	1,275	0,778			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

S 30'	2,00	29,13	32,95	0,071	0,140	0,176	0,051	0,303
S 30'	2,00	29,13	32,35	0,107	0,212			
S 60'	2,00	29,13	31,83	0,154	0,242	0,225	0,024	0,029
S 60'	2,00	29,13	32,05	0,132	0,208			
S 90'	2,00	29,13	29,15	0,986	0,676	0,701	0,034	0,001
S 90'	2,00	29,13	29,05	1,057	0,725			
S 150'	2,00	29,13	32,87	0,075	1,381	1,178	0,286	0,018
S 150'	2,00	29,13	33,37	0,053	0,976			
S K	2,00	29,13	32,92	0,072	0,150	0,154	0,006	
S K	2,00	29,13	32,84	0,076	0,158			

STS

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,24	21,50	27,50	0,008	0,114	0,141	0,039	0,002
B 7'	2,24	21,50	27,01	0,012	0,169			
B 15'	2,24	21,50	23,25	0,243	0,214	0,217	0,004	0,002
B 15'	2,24	21,50	23,22	0,249	0,219			
B 30'	2,24	21,50	23,41	0,214	0,388	0,401	0,018	0,006
B 30'	2,24	21,50	23,33	0,228	0,414			
B 60'	2,24	21,50	24,40	0,096	0,225	0,263	0,054	0,003
B 60'	2,24	21,50	24,04	0,129	0,301			
B 90'	2,24	21,50	21,01	1,482	3,592	3,426	0,234	0,000
B 90'	2,24	21,50	21,13	1,345	3,260			
B 150'	2,24	21,50	24,82	0,069	1,797	1,921	0,175	0,002
B 150'	2,24	21,50	24,66	0,078	2,044			
B K	2,24	21,50	21,23	1,241	1,241	1,013	0,189	
B K	2,24	21,50	21,63	0,899	0,899			
B K	2,24	21,50	21,74	0,822	0,822			
B K	2,24	21,50	21,39	1,091	1,091			
R 7'	2,19	21,50	26,34	0,022	0,064	0,054	0,014	0,001
R 7'	2,19	21,50	26,82	0,015	0,044			
R 15'	2,19	21,50	25,37	0,048	0,083	0,104	0,030	0,001
R 15'	2,19	21,50	24,84	0,073	0,125			
R 30'	2,19	21,50	23,81	0,163	0,244	0,291	0,066	0,045
R 30'	2,19	21,50	23,46	0,215	0,337			
R 60'	2,19	21,50	22,98	0,313	0,331	0,373	0,060	0,043
R 60'	2,19	21,50	22,69	0,393	0,415			
R 90'	2,19	21,50	24,12	0,128	1,313	1,148	0,234	0,005
R 90'	2,19	21,50	24,49	0,096	0,983			
R 150'	2,19	21,50	23,06	0,294	1,103	0,877	0,319	0,034
R 150'	2,19	21,50	23,73	0,174	0,652			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R K	2,19	21,50	22,35	0,513	0,370	0,401	0,038	
R K	2,19	21,50	22,28	0,542	0,391			
R K	2,19	21,50	22,12	0,614	0,443			
S 15'	2,20	21,50	22,60	0,419	0,347	0,344	0,004	0,003
S 15'	2,20	21,50	22,62	0,413	0,341			
S 15'	2,20	21,50	20,90	1,602	0,977	1,065	0,124	0,478
S 15'	2,20	21,50	20,69	1,890	1,153			
S 30'	2,20	21,50	24,06	0,133	0,262	0,283	0,030	0,002
S 30'	2,20	21,50	23,87	0,154	0,305			
S 60'	2,20	21,50	23,84	0,158	0,248	0,222	0,037	0,002
S 60'	2,20	21,50	24,14	0,124	0,196			
S 90'	2,20	21,50	20,78	1,761	1,207	1,217	0,014	0,104
S 90'	2,20	21,50	20,76	1,789	1,227			
S 150'	2,20	21,50	24,48	0,095	1,756	1,821	0,091	0,003
S 150'	2,20	21,50	24,39	0,102	1,886			
S K	2,20	21,50	22,52	0,447	0,925	1,058	0,133	
S K	2,20	21,50	22,20	0,575	1,191			
S K	2,20	21,50	22,35	0,511	1,058			

TF

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,00	23,04	24,68	0,321	4,622	4,214	0,577	0,008
B 7'	2,00	23,04	24,96	0,264	3,807			
B 15'	2,00	23,04	21,98	2,085	1,834	1,779	0,078	0,006
B 15'	2,00	23,04	22,07	1,959	1,723			
B 30'	2,00	23,04	22,85	1,141	2,072	2,193	0,172	0,007
B 30'	2,00	23,04	22,69	1,275	2,315			
B 60'	2,00	23,04	22,53	1,424	3,335	3,505	0,240	0,003
B 60'	2,00	23,04	22,39	1,569	3,675			
B 90'	2,00	23,04	21,92	2,173	5,269	5,477	0,295	0,001
B 90'	2,00	23,04	21,81	2,346	5,686			
B 150'	2,00	23,04	27,27	0,053	1,396	1,384	0,129	0,020
B 150'	2,00	23,04	27,16	0,058	1,506			
B 150'	2,00	23,04	27,43	0,048	1,249			
B K	2,00	23,04	22,94	1,072	1,072	1,002	0,098	
B K	2,00	23,04	23,14	0,933	0,933			
R 7'	2,01	23,04	22,20	1,798	5,096	5,043	0,075	0,002
R 7'	2,01	23,04	22,23	1,760	4,990			
R 15'	2,01	23,04	22,53	1,428	2,453	2,278	0,247	0,032
R 15'	2,01	23,04	22,75	1,224	2,104			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 30'	2,01	23,04	22,59	1,369	2,151	2,321	0,240	0,029
R 30'	2,01	23,04	22,38	1,585	2,491			
R 60'	2,01	23,04	22,44	1,520	1,608	1,642	0,049	0,100
R 60'	2,01	23,04	22,38	1,585	1,677			
R 90'	2,01	23,04	23,63	0,662	6,796	7,164	0,480	0,000
R 90'	2,01	23,04	23,45	0,751	7,706			
R 90'	2,01	23,04	23,59	0,681	6,989			
R 150'	2,01	23,04	22,94	1,072	4,025	3,889	0,192	0,005
R 150'	2,01	23,04	23,04	1,000	3,753			
R K	2,01	23,04	22,58	1,379	0,995	1,218	0,315	
R K	2,01	23,04	22,05	1,996	1,441			
S 7'	2,01	23,04	20,56	5,648	4,669	4,422	0,349	0,003
S 7'	2,01	23,04	20,72	5,051	4,176			
S 15'	2,01	23,04	20,53	5,768	3,519	3,311	0,294	0,005
S 15'	2,01	23,04	20,71	5,087	3,103			
S 30'	2,01	23,04	22,50	1,458	2,882	3,087	0,289	0,006
S 30'	2,01	23,04	22,31	1,665	3,291			
S 60'	2,01	23,04	21,97	2,111	3,316	3,204	0,158	0,002
S 60'	2,01	23,04	22,07	1,968	3,093			
S 90'	2,01	23,04	19,77	9,805	6,724	6,225	0,705	0,005
S 90'	2,01	23,04	20,00	8,351	5,726			
S 150'	2,01	23,04	25,01	0,253	4,662	4,402	0,369	0,003
S 150'	2,01	23,04	25,18	0,224	4,141			
S K	2,01	23,04	23,78	0,597	1,236	1,182	0,076	
S K	2,01	23,04	23,91	0,545	1,129			

TLP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,04	24,56	31,76	0,006	0,085	0,060	0,036	0,002
B 7'	2,04	24,56	33,04	0,002	0,034			
B 15'	2,04	24,56	28,51	0,060	0,053	0,068	0,022	0,002
B 15'	2,04	24,56	27,86	0,095	0,084			
B 30'	2,04	24,56	28,35	0,067	0,122	0,144	0,032	0,002
B 30'	2,04	24,56	27,91	0,092	0,167			
B 60'	2,04	24,56	28,62	0,055	0,130	0,133	0,005	0,002
B 60'	2,04	24,56	28,54	0,059	0,137			
B 90'	2,04	24,56	27,08	0,166	0,402	0,476	0,105	0,015
B 90'	2,04	24,56	26,64	0,227	0,550			
B 150'	2,04	24,56	31,68	0,006	0,164	0,143	0,029	0,002
B 150'	2,04	24,56	32,08	0,005	0,123			
B K	2,04	24,56	24,49	1,051	1,051	0,998	0,075	
B K	2,04	24,56	24,64	0,945	0,945			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

R 7'	2,13	24,56	30,83	0,009	0,025	0,031	0,009	0,001
R 7'	2,13	24,56	30,28	0,013	0,038			
R 15'	2,13	24,56	29,44	0,025	0,043	0,039	0,006	0,001
R 15'	2,13	24,56	29,71	0,020	0,035			
R 30'	2,13	24,56	27,79	0,087	0,137	0,135	0,002	0,005
R 30'	2,13	24,56	27,82	0,085	0,134			
R 60'	2,13	24,56	27,81	0,086	0,091	0,091	0,001	0,002
R 60'	2,13	24,56	27,79	0,087	0,092			
R 90'	2,13	24,56	30,19	0,014	0,145	0,150	0,007	0,015
R 90'	2,13	24,56	30,10	0,015	0,156			
R 150'	2,13	24,56	29,45	0,025	0,093	0,084	0,012	0,004
R 150'	2,13	24,56	29,72	0,020	0,076			
R K	2,13	24,56	26,33	0,262	0,189	0,195	0,008	
R K	2,13	24,56	26,25	0,279	0,201			
S 7'	2,11	24,56	28,65	0,047	0,039	0,036	0,005	0,005
S 7'	2,11	24,56	28,50	0,053	0,032			
S 15'	2,11	24,56	28,31	0,061	0,037	0,035	0,004	0,005
S 15'	2,11	24,56	28,51	0,052	0,032			
S 30'	2,11	24,56	28,69	0,046	0,091	0,094	0,005	0,007
S 30'	2,11	24,56	28,58	0,050	0,098			
S 60'	2,11	24,56	28,60	0,049	0,077	0,077	0,000	0,006
S 60'	2,11	24,56	28,61	0,049	0,076			
S 90'	2,11	24,56	26,86	0,180	0,123	0,112	0,015	0,008
S 90'	2,11	24,56	27,12	0,148	0,101			
S 150'	2,11	24,56	30,07	0,016	0,301	0,303	0,002	0,057
S 150'	2,11	24,56	30,06	0,016	0,304			
S K	2,11	24,56	26,65	0,210	0,435	0,399	0,050	
S K	2,11	24,56	26,89	0,176	0,364			

USP

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,07	23,77	27,93	0,049	0,700	0,756	0,058	0,009
B 7'	2,07	23,77	27,72	0,057	0,815			
B 7'	2,07	23,77	27,83	0,052	0,752			
B 15'	2,07	23,77	24,36	0,652	0,574	0,481	0,081	0,001
B 15'	2,07	23,77	24,78	0,480	0,423			
B 15'	2,07	23,77	24,70	0,509	0,448			
B 30'	2,07	23,77	25,87	0,217	0,395	0,363	0,058	0,001
B 30'	2,07	23,77	26,27	0,163	0,295			
B 30'	2,07	23,77	25,86	0,219	0,398			
B 60'	2,07	23,77	27,31	0,076	0,179	0,240	0,033	0,001
B 60'	2,07	23,77	27,72	0,057	0,133			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

B 90'	2,07	23,77	26,22	0,169	0,409	0,404	0,006	0,003
B 90'	2,07	23,77	26,25	0,165	0,400			
B 150'	2,07	23,77	28,71	0,028	0,721	0,724	0,004	0,018
B 150'	2,07	23,77	28,70	0,028	0,727			
B K	2,07	23,59	23,65	0,957	0,957	1,099	0,140	
B K	2,07	23,77	23,64	1,101	1,101			
B K	2,07	23,77	23,48	1,237	1,237			
R 7'	2,18	23,77	27,14	0,072	0,205	0,232	0,037	0,083
R 7'	2,18	23,77	26,85	0,091	0,258			
R 15'	2,18	23,77	26,51	0,118	0,203	0,192	0,016	0,369
R 15'	2,18	23,77	26,66	0,105	0,181			
R 30'	2,18	23,77	27,54	0,053	0,083	0,074	0,014	0,005
R 30'	2,18	23,77	27,88	0,041	0,064			
R 60'	2,18	23,77	27,19	0,070	0,074	0,062	0,017	0,004
R 60'	2,18	23,77	27,68	0,048	0,050			
R 90'	2,18	23,77	30,14	0,007	0,072	0,077	0,007	0,005
R 90'	2,18	23,77	29,98	0,008	0,081			
R 150'	2,18	23,77	29,40	0,012	0,047	0,038	0,012	0,002
R 150'	2,18	23,77	29,98	0,008	0,030			
R 150'	2,18	23,77	33,45	0,001	0,002			
R 150'	2,18	23,77	26,37	0,132	0,496			
R K	2,18	23,77	25,31	0,302	0,218	0,183	0,031	
R K	2,18	23,77	25,50	0,260	0,188			
R K	2,18	23,77	25,86	0,197	0,142			
R K	2,18	23,77	25,51	0,258	0,186			
S 7'	1,86	23,77	25,17	0,420	0,347	0,333	0,020	0,000
S 7'	1,86	23,77	25,31	0,385	0,318			
S 15'	1,86	23,77	23,89	0,930	0,567	0,582	0,020	0,444
S 15'	1,86	23,77	23,81	0,977	0,596			
S 30'	1,86	23,77	27,69	0,088	0,174	0,208	0,049	0,000
S 30'	1,86	23,77	27,15	0,123	0,243			
S 60'	1,86	23,77	26,88	0,145	0,228	0,232	0,005	0,000
S 60'	1,86	23,77	26,83	0,150	0,236			
S 90'	1,86	23,77	24,01	0,863	0,592	0,574	0,025	0,448
S 90'	1,86	23,77	24,11	0,811	0,556			
S 150'	1,86	23,77	31,68	0,007	0,136	0,149	0,018	0,000
S 150'	1,86	23,77	31,40	0,009	0,162			
S K	1,86	23,77	25,89	0,269	0,557	0,578	0,033	
S K	1,86	23,77	25,72	0,299	0,619			
S K	1,86	23,77	25,80	0,284	0,589			
S K	1,86	23,77	25,92	0,264	0,547			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)

XT

Probe	E	CT Kal. B K	Cond. CT	RQ	NE	Mean NE	SD NE	tTest
B 7'	2,03	26,38	30,66	0,048	0,696	0,627	0,097	0,016
B 7'	2,03	26,38	30,97	0,039	0,559			
B 15'	2,03	26,38	25,18	2,339	2,057	2,029	0,041	0,000
B 15'	2,03	26,38	25,22	2,274	2,000			
B 30'	2,03	26,38	25,64	1,689	3,067	3,202	0,192	0,000
B 30'	2,03	26,38	25,52	1,838	3,338			
B 60'	2,03	26,38	26,38	1,000	2,342	2,827	0,687	0,002
B 60'	2,03	26,38	25,89	1,415	3,313			
B 90'	2,03	26,38	25,93	1,375	3,334	3,656	0,456	0,000
B 90'	2,03	26,38	25,68	1,642	3,979			
B 150'	2,03	26,38	28,67	0,198	5,176	5,406	0,325	0,000
B 150'	2,03	26,38	28,55	0,215	5,635			
B K	2,03	26,38	26,10	1,219	1,219	1,010	0,149	
B K	2,03	26,38	26,39	0,993	0,993			
B K	2,03	26,38	26,44	0,958	0,958			
B K	2,03	26,38	26,58	0,868	0,868			
R 7'	2,25	26,38	28,21	0,227	0,643	0,613	0,042	0,032
R 7'	2,25	26,38	28,33	0,206	0,583			
R 15'	2,25	26,38	27,15	0,536	0,920	0,905	0,021	0,006
R 15'	2,25	26,38	27,19	0,518	0,891			
R 30'	2,25	26,38	26,31	1,058	1,663	1,538	0,176	0,007
R 30'	2,25	26,38	26,51	0,900	1,414			
R 60'	2,25	26,38	25,86	1,525	1,612	1,562	0,072	0,002
R 60'	2,25	26,38	25,94	1,429	1,511			
R 90'	2,25	26,38	28,41	0,193	1,978	1,784	0,275	0,010
R 90'	2,25	26,38	28,68	0,155	1,589			
R 150'	2,25	26,38	28,43	0,190	0,712	0,620	0,130	0,075
R 150'	2,25	26,38	28,80	0,141	0,527			
R K	2,25	26,38	27,02	0,595	0,430	0,374	0,079	
R K	2,25	26,38	27,39	0,441	0,318			
S 7'	2,11	26,38	25,99	1,338	1,106	1,167	0,086	0,006
S 7'	2,11	26,38	25,85	1,485	1,228			
S 15'	2,11	26,38	25,83	1,508	0,920	0,948	0,040	0,004
S 15'	2,11	26,38	25,75	1,601	0,977			
S 30'	2,11	26,38	27,55	0,417	0,825	0,937	0,158	0,044
S 30'	2,11	26,38	27,23	0,530	1,048			
S 60'	2,11	26,38	26,91	0,673	1,058	1,116	0,082	0,006
S 60'	2,11	26,38	26,77	0,747	1,174			
S 90'	2,11	26,38	24,82	3,205	2,198	2,215	0,023	0,000
S 90'	2,11	26,38	24,80	3,254	2,231			
S 150'	2,11	26,38	30,17	0,059	1,089	1,359	0,382	0,052
S 150'	2,11	26,38	29,63	0,088	1,629			
S K	2,11	26,38	28,05	0,287	0,595	0,582	0,018	
S K	2,11	26,38	28,11	0,275	0,569			

Tabelle 9.5 (Fortsetzung)