

Untersuchung des Pathosystems
Arabidopsis thaliana* (L.) – *Phytophthora infestans
und Charakterisierung von Mutanten mit einem veränderten
Nichtwirtsresistenz-Phänotyp

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Jörn Landtag
geb. am 19. September 1974 in Halle (Saale)

Halle (Saale), den 06. März 2006

Verteidigungsdatum: 12. Juli 2006

Inhalt

A	Einleitung	1
1	Grundlagen pflanzlicher Pathogenresistenz.....	1
1.1	Pathogenperzeption	3
1.2	R-Gen-spezifische Wirtsresistenz	4
1.3	Induzierbare pflanzliche Abwehrreaktionen.....	9
1.4	Salizylsäure-abhängige Abwehrreaktionen	13
1.5	Jasmonsäure- und Ethylen-abhängige Abwehrreaktionen.....	15
1.6	„Cross-talk“ der unterschiedlichen Signaltransduktionswege.....	17
1.7	Nichtwirtsresistenz	18
1.7.1	Komponenten der Nichtwirtsresistenz gegen <i>Blumeria graminis</i>	20
1.7.2	Das Nichtwirtspathosystem <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Phytophthora infestans</i>	22
1.8	Zielsetzung der Arbeit	23
B	Material und Methoden	24
1	Material.....	24
1.1	Laborchemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide.....	24
1.2	Organismen und Plasmid-Vektoren	24
1.2.1	Pflanzen	24
1.2.2	Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren	24
1.2.3	Oligonukleotide.....	24
1.3	Medien und Kultivierungen.....	27
1.3.1	Medien und Kultivierung von Bakterien.....	27
1.3.2	Lagerung der Bakterien.....	27
1.3.3	Herstellung und Transformation kompetenter <i>Escherichia coli</i> -Zellen	27
1.3.4	Medien und Kultivierung von Phytopathogenen Organismen	27
1.3.4.1	<i>Phytophthora infestans</i>	28
1.3.4.1.1	Lagerung von <i>Phytophthora infestans</i>	28
1.3.4.2	<i>Alternaria brassicicola</i>	28
1.3.4.2.1	Lagerung von <i>Alternaria brassicicola</i>	28
1.3.4.3	<i>Botrytis cinerea</i>	28
1.3.4.3.1	Lagerung von <i>Botrytis cinerea</i>	29
1.3.5	Substrat und Anzucht von Pflanzen	29
1.3.6	Pathogeninfektion von Pflanzen	29
2	Methoden	29
2.1	Standardmethoden	29
2.2	Nukleinsäureanalytik	30

2.2.1	Isolierung von DNA	30
2.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.1.1.1	Mini-Präparation	30
2.2.1.1.2	Midi-Präparation	30
2.2.1.2	Präparation von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
2.2.1.2.1	Mini-Präparation	30
2.2.2	Isolierung von RNA	31
2.2.2.1	Präparation von Gesamt-RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
2.2.3	Gelelektrophorese von DNA und RNA	31
2.2.3.1	Auftrennung von DNA in Agarosegelen.....	31
2.2.3.2	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.2.3.3	Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen	32
2.2.4	Nachweis spezifischer RNA-Moleküle.....	33
2.2.4.1	Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot).....	33
2.2.4.2	Radioaktive Hybridisierung.....	33
2.2.5	Enzymatische Modifikation von DNA.....	33
2.2.5.1	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden.....	34
2.2.5.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	34
2.2.5.3	Genotypisierung	34
2.2.5.4	Grobkartierung der Sekundärmutation	35
2.2.5.5	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse.....	35
2.2.5.5.1	Automatisierte Sequenzierung	35
2.2.5.5.2	Computergestützte Sequenzanalyse.....	36
2.3	Mikroskopische Analysen.....	36
2.3.1	Lichtmikroskopische Analyse	36
2.3.1.1	Trypan-Blau-Färbung infizierter Blätter	36
2.3.1.2	DAB-Färbung infizierter Blätter	36
2.3.1.3	Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter.....	37
2.3.1.4	Kombinierte Trypan-Blau- und Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter.....	37
2.3.1.5	Untersuchung der Autofluoreszenz	37
2.3.2	Elektronenmikroskopische Analyse.....	37
2.4	Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> - Mutanten	38
2.4.1	EMS-Remutagenese von <i>pen2</i> -Samen.....	38
2.4.2	Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit.....	38
2.4.3	Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H ₂ O ₂ -Akkumulation und der Autofluoreszenz	39

2.4.4	Kreuzung von <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
2.4.5	Statistische Auswertung der Daten	39
C	Ergebnisse	40
1	Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Phytophthora infestans</i>	40
1.1	Nekrose-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	40
1.2	Autofluoreszenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	41
1.3	Hypersensitiver Zelltod nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	43
1.4	Zytologische Analyse des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> – <i>Phytophthora infestans</i>	44
1.4.1	Trypan-Blau-Färbung: Analyse von Pathogenwachstum und hypersensitivem Zelltod in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	44
1.4.2	Analyse der Autofluoreszenz in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	46
1.4.3	DAB-Färbung: Untersuchung der H ₂ O ₂ -Akkumulation in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	48
1.4.4	Anilin-Blau-Färbung: Untersuchung der Kallose-Akkumulation in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	50
1.4.5	Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in <i>pen2</i> und <i>gl1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	51
1.4.6	Zytologische Analyse von Col-0, <i>pen1</i> und <i>pen2 pen1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	53
1.5	Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	54
1.6	Untersuchung der <i>PR</i> -Genexpression nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	55
1.6.1	<i>PR</i> -Genexpression in <i>gl1</i> und <i>pen2</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	55
1.6.2	<i>PR</i> -Genexpression unterschiedlicher <i>Arabidopsis thaliana</i> -Genotypen nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	57
2	Untersuchung der Nichtwirtsresistenz in unterschiedlichen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten und transgenen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linien.....	59
2.1	HR-Phänotyp unterschiedlicher <i>Arabidopsis thaliana</i> -Signaltransduktions- Mutanten im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	59
2.2	HR-Phänotyp einer <i>NahG</i> exprimierenden <i>Arabidopsis thaliana</i> -Linie im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	63
2.3	HR-Phänotyp der <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutante <i>pmr4-1</i> nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation.....	63

3	Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	64
3.1	EMS-Remutagenese des <i>pen2</i> -Saatguts	64
3.2	Durchmusterung der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten <i>pen2</i> -Population	64
3.3	Effizienz der Remutagenese des <i>pen2</i> -Saatguts	64
3.4	Primärcharakterisierung putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten in der M2-Nachkommenschaft.....	64
3.5	Untersuchung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten in der M3-Nachkommenschaft.....	66
3.6	Charakterisierung der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten.....	68
3.6.1	HR-Phänotyp putativer <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	69
3.6.2	Untersuchung der Penetrations-Häufigkeit in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	70
3.6.3	Hypersensitiver Zelltod in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	71
3.6.4	H ₂ O ₂ -Akkumulation in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	73
3.6.5	Zytologische Analyse der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	75
3.6.5.1	Elektronenmikroskopische Analyse: Untersuchung von zellulären Feinstrukturen in den putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	75
3.6.6	<i>PR</i> -Genexpression in putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	76
3.6.7	Kreuzungsanalysen der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten 202 und 222	79
3.6.7.1	Segregationsanalysen in den Kartierungspopulationen der putativen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten 202 und 222.....	79
3.6.7.2	Grobkartierung der Sekundärmutation 222	82
3.6.7.3	HR-Phänotyp der Doppelmutante 202 / 222 im <i>pen2</i> -Hintergrund nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	85
3.6.8	Untersuchung der Resistenz der putativen Mutanten gegen unterschiedliche nekrotrophe Phytopathogene	87
3.6.8.1	Analyse der Interaktion mit <i>Alternaria brassicicola</i>	87

3.6.8.2	Analyse der Interaktion mit <i>Botrytis cinerea</i>	89
D	Diskussion	91
1	Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems <i>Arabidopsis thaliana</i> - <i>Phytophthora infestans</i>	91
2	Analyse der Nichtwirtsresistenz gegen <i>Phytophthora infestans</i> in unterschiedlichen <i>Arabidopsis thaliana</i> -Signaltransduktionsmutanten.....	98
3	<i>Arabidopsis thaliana</i> -Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach <i>Phytophthora infestans</i> -Inokulation	103
E	Zusammenfassung	112
F	Literatur	114

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AVR	Avirulenz
BAC	<i>Bacterial artificial chromosome</i>
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
ca.	zirka
CAPS	<i>Cleaved amplified polymorphic sequence</i>
CC	<i>Coiled coil</i>
cDNA	komplementäre DNA
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cv	Kultivar
DAB	Diaminobenzidin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrokarbonat
d. h.	das heißt
DIC	<i>Differential interference contrast</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ET	Ethylen
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
F _(x)	Generation nach Kreuzung (Filialgeneration)
f. sp.	forma specialis
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
<i>gl1</i>	<i>glabrous1</i>
h	Stunde(n)
hpi	Stunde(n) nach Infektion
HR	Hypersensitive Reaktion
JA	Jasmonsäure
L.	Linnè
l	Liter

LRR	<i>Leucinrich-repeats</i>
M _(x)	Generation nach Mutagenese
M	mol/l
min	Minute(n)
ml	Milliliter
<i>NahG</i>	Salizylhydroxylasegen aus <i>Pseudomonas putida</i>
NBS	<i>Nucleotide-binding site</i>
N-Terminus	Aminoterminus, aminoendständiger Aminosäure-Rest
nm	Nanometer
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
<i>pen</i>	<i>penetration</i> -Mutanten
PCD	<i>Programmed cell death</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PR	<i>Pathogenesis related</i>
pv	Pathovar
R	Resistenz
rel.	relativ
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Konstante
SA	Salizylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SSLP	<i>Simple sequence length polymorphism</i>
Tab.	Tabelle
TLR	<i>Toll-like-receptors</i>
U	<i>Unit(s)</i>
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumenanteil(e)
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen
z. B.	zum Beispiel