

B Material und Methoden

1 Material

1.1 Laborchemikalien, Enzyme, Radioisotope und Oligonukleotide

Die verwendeten Feinchemikalien hatten analytischen Reinheitsgrad und wurden, falls nicht gesondert vermerkt, von den Firmen DIFCO LAB. (Detroit, USA), MERCK (Darmstadt), ROTH (Karlsruhe), SERVA (Heidelberg), SIGMA-ALDRICH (Steinheim) und BIOZYM (Hess. Oldendorf) bezogen. Enzyme für molekularbiologische Arbeiten wurden, wenn nicht anders angegeben, von INVITROGEN (Karlsruhe), FERMENTAS GmbH (St. Leon-Rot), ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS (Mannheim) geliefert. Die Radiochemikalie α -[³²P]-dATP wurde von VALEANT PHARMACEUTICALS INTERNATIONAL (Costa Mesa, USA) bezogen. Die Synthese der Oligonukleotide erfolgte durch MWG-BIOTECH (Ebersberg).

1.2 Organismen und Plasmid-Vektoren

1.2.1 Pflanzen

Die in der Arbeit verwendeten unterschiedlichen Ökotypen, Mutanten und transgenen Linien von *Arabidopsis thaliana* (L.) sind in der Tab. B-1 zusammengefasst.

1.2.2 Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren

Die Infektion der Pflanzen erfolgte mit den Phytopathogenen *Phytophthora infestans* CRA208, *Alternaria brassicicola* MUCL 20297 oder *Botrytis cinerea* MUCL 30158 (Tab. B-2). Der *Escherichia coli*-Stamm DH5 α diente als Wirtsbakterienstamm für Transformationsexperimente.

1.2.3 Oligonukleotide

Die zur Kartierung der Sekundärmutation bzw. zur Genotypisierung verwendeten Oligonukleotide sind in Tab. B-3 und B-4 dargestellt.

Tab. B-1: Ökotypen, Mutanten und transgene Linien von *Arabidopsis thaliana*

<i>Arabidopsis thaliana</i>	gen. Hintergrund	Referenz / Herkunft
Ökotyp		
Columbia	Col-0	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
Landsberg <i>erecta</i>	Ler	Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC)
Mutante		
<i>gl1-1</i> (ATH243900)	Col-3	Hülkamp <i>et al.</i> , 1994; Koornneef <i>et al.</i> , 1982
<i>pen2-1</i> (At2g44490)	Col-3 <i>gl1-1</i>	Lipka <i>et al.</i> , 2005
<i>pen1-1</i> (At3g11820)	Col-0	Collins <i>et al.</i> , 2003
<i>pmr4-1</i> (At4g03550)	Col-0	Vogel & Somerville, 2000; Nishimura <i>et al.</i> , 2003
<i>edr1-1</i> (At1g08720)	Col-0	Frye & Innes, 1998; Frye <i>et al.</i> , 2001
<i>pad4-1</i> (At3g52430)	Col-0	Glazebrook <i>et al.</i> , 1996; Jirage <i>et al.</i> , 1999
Doppelmutante		
<i>pen2-1 pen1-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 rar1-10</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 eds1-2</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Ler	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 pad4-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 ndr1-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
<i>pen2-1 npr1-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Col-0	Dittgen, 2005
Dreifachmutante		
<i>pen2-1 rar1-10 sgt1b-1</i>	Col-3 <i>gl1-1</i> / Ler	Dittgen, 2005
transgene Linie		
<i>pen2-1 NahG</i> ¹	Col-3 <i>gl1-1</i> / Col-0	Dittgen, 2005

¹⁾ *NahG*-Transgen aus *Pseudomonas syringae* (You *et al.*, 1991; Delaney *et al.*, 1994)

Tab. B-2: Phytopathogene Organismen, Bakterien und Plasmid-Vektoren

Oomyzet	Merkmal	Referenz/Herkunft
<i>Phytophthora infestans</i> CRA208	GFP-Transgen, G418 ^r	F. Mauch; Fribourg, CH (Si-Ammour <i>et al.</i> , 2003)
Pilz		
<i>Alternaria brassicicola</i> MUCL 20297	GUS-Transgen	Myzothèque l'Université catholique de Louvain (MUCL); (Louvain, B) (Thomma <i>et al.</i> , 1998)
<i>Botrytis cinerea</i> MUCL 30158		Myzothèque l'Université catholique de Louvain (MUCL); (Louvain, B)
Bakterienstamm		
<i>Escherichia coli</i> DH5α	<i>supE44 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983
Plasmid-Vektor		
pCR2.1	f1 ori, <i>col</i> /E1 ori, <i>lacZ</i> , MCS, Amp ^r , Kan ^r , T7- Promotor	INVITROGEN (Groningen, NL)

Tab. B-3: Molekulare Marker/ Oligonukleotide (Genkartierung)

Bezeichnung	Typ	Sequenz in (5'-3')	Referenz/TAIR ¹ -Accession
AEAT1	SSLP	CGAACAGCCAACATTAATTCCC GCCACTGCGTGAATGATATG	Bell & Ecker, 1994 (At1g05010)
NGA248	SSLP	TCTGTATCTCGGTGAATTCTCC TACCGAACCAAAACACAAAGG	Bell & Ecker, 1994 (At1g28280)
NGA280	SSLP	GGCTCCATAAAAAGTGCACC CTGATCTCACGGACAATAGTGC	Bell & Ecker, 1994 (At1g55840)
ATPASE	SSLP	GTTACAGAGAGACTCATAAACCA CTGGGAACGGTTTCGATTTCGAGC	Bell & Ecker, 1994 <i>Genetic marker</i> : 1945474
PLS6	SSLP	ATAGTGGGTGATCTTTGAATGTA ACTTGTCTCGTCGCACTGTT	TAIR Accession: Person 4602 <i>Genetic marker</i> : 2005380
BIO2	SSLP	TTAACAGAAACCCAAAGCTTTC TGACCTCCTCTTCCATGGAG	Bell & Ecker, 1994 (At2g43360)
NGA172	SSLP	CATCCGAATGCCATTGTTCC AGCTGCTTCCATTATAGCGTCC	Bell & Ecker, 1994 (At3g03340)
NGA162	SSLP	CTCTGTCACTCTTTTCTCTGG CATGCAATTTGCATCTGAGG	Bell & Ecker, 1994 (At3g13960)
NT204	SSLP	TGGAAGCTCTAGAAACGATCG ACCACCTAAACCGAGAATTGG	Bell & Ecker, 1994 <i>Genetic marker</i> : 1945510
CIW11	SSLP	CCCCGAGTTGAGGTATT GAAGAAATTCCTAAAGCATTCC	TAIR Accession: Person 6556 <i>Genetic marker</i> : 2005403
GAPAB	SSLP	TCCTGAGAATTCAGTGAACCC CACCATGGCTTCGGTTACTT	Bell & Ecker, 1994 (At3g26650)
T6H20 ²	SSLP	CGGCTGAAACTTGAAGGGAC AGGAAGAACGTGTGATTGTG	TAIR Accession: Locus 2102832 (At3g46870)
F1P2-TGF	SSLP	TTTGTCTGAAGATGTGGAGAGAGAG CAAAACCCCACTCTTCATTATTGTT	TAIR Accession: Person 5394 <i>Genetic marker</i> : 2005393
SORBO34 ³	SSLP	GGAGAAGCGCTTTGTTTCAGA TGCTTCTTCTTCTTCTTCTTCG	TAIR Accession: Locus 2082866 (At3g49160)
CIW4	SSLP	GTTCAATTAACCTTGCCTGTGT TACGGTCAGATTGAGTGATTCC	TAIR Accession: Person 6556 <i>Genetic marker</i> : 2005404
F24M12TGF	SSLP	GTTCTCTGCATTCCACACATACTCT CTTGGGTATTCTGAAGAGCATAAAT	TAIR Accession: Person 5394 <i>Genetic marker</i> : 2005395
NGA6	SSLP	ATGGAGAAGCTTACACTGATC TGGATTTCTTCTCTCTTCAC	Bell & Ecker, 1994 (At3g62220)
NGA8	SSLP	TGGCTTTTCGTTTATAAACATCC GAGGGCAAATCTTTATTTCCG	Bell & Ecker, 1994 (At4g08830)
CIW7	SSLP	AATTTGGAGATTAGCTGGAAT CCATGTTGATGATAAGCACAA	TAIR Accession: Person 6556 <i>Genetic marker</i> : 2005420
NGA1139	SSLP	TTTTTCTTGTGTTGCATTCC TAGCCGGATGAGTTGGTACC	Bell & Ecker, 1994 (At4g34390)
NGA225	SSLP	TCTCCCCACTAGTTTTGTGTCC GAAATCCAAATCCCAGAGAGG	Bell & Ecker, 1994 <i>Genetic marker</i> : 1945530
NGA139	SSLP	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG AGAGCTACCAGATCCGATGG	Bell & Ecker, 1994 <i>Genetic marker</i> : 1945524
CIW9	SSLP	CAGACGTATCAAATGACAAATG GACTACTGCTCAAATATTCCG	TAIR Accession: Person 6556 (At5g42600)
CIW10	SSLP	CCACATTTTCTTCTTTTATA CAACATTTAGCAAATCAACTT	TAIR Accession: Person 6556 (At5g60960)

¹⁾ TAIR (*The Arabidopsis Information Resource*; <http://www.arabidopsis.org/>)

²⁾ abgeleitet vom Sequenzpolymorphismus CER460925 / BAC-Accession AL096859

³⁾ abgeleitet vom Sequenzpolymorphismus 470173 / BAC-Accession AL132956

Tab. B-4: Oligonukleotide (Genotypisierung)

Genotypisierung			
Bezeichnung	Typ	Sequenz (5'-3')	Referenz
PEN2OUTER	CAPS	TTTGGAAGCTGCTTCATCTTCTTATCAGG CCTGTACAAGAAATCAATCACAGATCTTCA	Lipka <i>et al.</i> , 2005 Dittgen, 2005

1.3 Medien und Kultivierungen

Als Lösungsmittel für alle Medien wurde 1fach destilliertes Wasser verwendet, welches an einer Anionenaustauschersäule (MILLI-Q_{PLUS}; MILLIPORE-WATERS, Eschborn) aufbereitet wurde (im folgenden mit tridest. H₂O bezeichnet).

1.3.1 Medien und Kultivierung von Bakterien

Zur Kultivierung des verwendeten *E. coli*-Stamms wurde LB (Luria Bertani)-Medium (1% [w/v] Trypton, 0,5 % [w/v] Hefeextrakt, 0,5 % [w/v] Natriumchlorid; pH 7,0) bzw. LB-Platten (LB-Medium mit 0,8 % [w/v] Agar) unter Zusatz von 50 µg / ml Ampicillin verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Inkubation der *E. coli*-Kultur erfolgte über Nacht bei 37°C, wobei die Flüssigkultur geschüttelt wurde. Um Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen, wurde dem Medium nach dem Autoklavieren 0,004 % [w/v] X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galaktosid) zugesetzt.

1.3.2 Lagerung der Bakterien

Für eine Langzeitlagerung der Bakterien wurden von dem verwendeten *E. coli*-Stamm und transformierten *E. coli*-Stämmen Glycerinkulturen angelegt. Dafür wurden 850 µl einer Flüssigkultur mit 150 µl sterilem 87 % [v/v] Glycerin versetzt, anschließend sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

1.3.3 Herstellung und Transformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Die Herstellung sowie die Transformation kompetenter *E. coli* DH5α-Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Inoue *et al.*, 1990.

1.3.4 Medien und Kultivierung von phytopathogenen Organismen

Als Lösungsmittel für alle Medien wurde 1fach destilliertes Wasser verwendet, welches an einer Anionenaustauschersäule (MILLI-Q_{PLUS}; MILLIPORE-WATERS, Eschborn) aufbereitet wurde (im folgenden mit tridest. H₂O bezeichnet).

1.3.4.1 *Phytophthora infestans*

Die Kultivierung des *P. infestans* Isolats CRA208 erfolgte auf Hafer-Bohne-Medium (3,4 % [w/v] Bohnenmehl, 1,7 % [w/v] Hafermehl, 0,85 % [w/v] Saccharose, 1,5 % [w/v] Agar) bei 18°C im Dunkeln. Nach dem Autoklavieren wurde dem Medium 5 µg / ml Geneticin (G418) zugesetzt. Zur Isolation der Zoosporensuspension wurde das Myzel nach 10 - 12 Tagen mit 10 ml tridest. H₂O überschichtet und etwa 3 h bei 4°C inkubiert. Der Überstand wurde anschließend kräftig geschüttelt und durch ein Nylonnetz filtriert. Die Bestimmung der Sporenkonzentration erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer. Je nach Verwendung wurde die Sporenkonzentration mit tridest. H₂O auf 5×10^3 – 5×10^5 Zoosporen / ml eingestellt.

1.3.4.1.1 Lagerung von *Phytophthora infestans*

Zum Anlegen einer Glycerinkultur des *P. infestans*-Isolats wurde eine Sporangiensuspension einer 10 - 12 Tage alten Kultur verwendet. Dazu wurde das Myzel mit sterilem tridest. H₂O überschichtet, der Überstand kräftig geschüttelt und sofort durch ein Nylonnetz filtriert. Anschließend wurde 100 µl Überstand mit 100 µl sterilem 50 % [v/v] Glycerin versetzt und schrittweise abgekühlt (30 min 4°C, 1 h -20°C und -80°C über Nacht). Die Langzeitlagerung der Glycerinkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff. Alternativ dazu wurden Agarstücke mit Myzel von einer 10 - 12 Tage alten Kultur ausgestochen, mit 500 µl sterilem 50 % [v/v] Glycerin versetzt und ebenso schrittweise abgekühlt bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

1.3.4.2 *Alternaria brassicicola*

Die Kultivierung des *A. brassicicola*-Isolats MUCL 20297 erfolgte auf 0,5 x *Potato Dextrose Agar*-Medium (DUCHEFA, Haarlem; NL) bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für 9 Tage. Zur Isolation der Zoosporensuspension wurde das Myzel mit tridest. H₂O überschichtet, der Überstand durch ein Nylonnetz filtriert und die Sporenkonzentration in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration der Sporensuspension wurde auf 5×10^5 / ml eingestellt.

1.3.4.2.1 Lagerung von *Alternaria brassicicola*

Zur Langzeitlagerung des *A. brassicicola*-Isolats wurde die nach dem Überschichten des Myzels mit tridest. H₂O isolierte Sporensuspension bei -20°C gelagert.

1.3.4.3 *Botrytis cinerea*

Die Kultivierung des *B. cinerea*-Isolats MUCL 30158 erfolgte auf 0,5 x *Potato Dextrose Agar*-Medium (DUCHEFA, Haarlem; NL) bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für 14 Tage. Zur

Isolation der Konidiosporen wurden Agarstücke mit Myzel ausgestochen und 1 h in 2 % [w/v] Malzextrakt geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand durch ein Nylonnetz filtriert und die Sporenkonzentration in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bestimmt. Die Konzentration der Sporensuspension wurde auf 5×10^5 / ml eingestellt.

1.3.4.3.1 Lagerung von *Botrytis cinerea*

Die Lagerung des *B. cinerea*-Isolats erfolgte auf 0,5 x *Potato Dextrose Agar*-Medium bei 12 h Lichtphase / 12 h Dunkelphase für etwa 3 Monate.

1.3.5 Substrat und Anzucht von Pflanzen

Die Anzucht aller *A. thaliana*-Ökotypen und Mutanten erfolgte in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (8 h Lichtphase [200 μ E] bei 22°C und 16 h Dunkelphase bei 20°C / 60 % relative Luftfeuchtigkeit. Die Aussaat der Samen erfolgte in einem Gemisch von gedämpfter Einheitserde und Vermiculit (3:1). Die Anzuchtdauer richtete sich nach der Verwendung und Größe der Pflanzen und betrug 4 - 5 Wochen.

1.3.6 Pathogeninfektion von Pflanzen

Für Infektionsexperimente wurden die 4 - 5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (16 h Lichtphase [200 μ E] bei 20°C und 8 h Dunkelphase bei 18°C / 100 % relative Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Die Pathogeninfektion der Pflanzen erfolgte, wenn nicht gesondert vermerkt, durch Tropfeninokulation der Oberseite voll entwickelter Rosettenblätter mit einer Sporensuspension des entsprechenden Phytopathogens.

2 Methoden

2.1 Standardmethoden

Alle im molekularbiologischen Methodenteil angegebenen Geräte und hitzestabile Lösungen wurden bei 121°C und einem Druck von 1 bar 20 min autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert. Nicht autoklavierte Geräte wurden mit 70 %igem Ethanol abgewischt oder abgeflammt. Wenn nicht gesondert vermerkt, wurde als Lösungsmittel tridest. H₂O verwendet. Zentrifugationsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, bei RT durchgeführt. Es wurden die Geräte 5415 C sowie 5403 der Firma EPPENDORF (Hamburg) verwendet. Standardmäßige molekularbiologische Arbeitsmethoden wurden nach Ausubel *et al.*, 1997 durchgeführt.

2.2 Nukleinsäureanalytik

2.2.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

2.2.1.1.1 Mini-Präparation

Das Prinzip dieser Methode basiert auf der alkalischen Lyse von Zellen in Gegenwart von SDS nach (Birnboim & Doly, 1979).

Es wurden 2 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation pelletiert (12 000 x g, RT, 1 min). Das Zellpellet wurde vollständig in 100 µl Lysispuffer (50 mM Glukose, 25 mM Tris pH 8,0 (HCl), 10 mM EDTA; pH 8,0) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung (0,2 N NaOH, 1 % [w/v] SDS) und vorsichtigem Mischen erfolgte die Lyse der Zellen. Nach einer weiteren fünfminütigen Inkubation des Lysats auf Eis wurden 150 µl Kaliumacetat-Lösung (3 M Kaliumacetat, 2 M Essigsäure) zur Neutralisation und zur Präzipitation von Proteinen und chromosomaler DNA hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Das Plasmid, welches in renaturierter Form im Überstand vorlag, wurde von den präzipitierten Bestandteilen des Ansatzes mittels Zentrifugation (12 000 x g, 4°C, 10 min) abgetrennt. Aus dem gewonnenen Überstand wurden die Nukleinsäuren mit 0,6 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT gefällt und anschließend zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 15 min). Das Plasmid-Pellet wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.1.1.2 Midi-Präparation

Um größere Mengen qualitativ hochwertiger Plasmid-DNA für Klonierungsexperimente zu gewinnen, wurde der „QIAfilter™ Plasmid-Midi-Kit“ (QIAGEN, Hilden) unter Verwendung des vom Hersteller empfohlenen Protokolls benutzt. Die Methode beruht auf Trennung der Plasmid-DNA von anderen Zellbestandteilen durch Anionenaustauschersäulen.

2.2.1.2 Präparation von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana*

2.2.1.2.1 Mini-Präparation

Die Isolation genomischer DNA für die PCR erfolgte durch die CTAB-Mini-Präparation nach Rogers & Bendich, 1988. Dazu wurden 2 - 3 Blätter im vorgekühlten Mörser oder im Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Stickstoffpulver wurde in 200 µl CTAB-Extraktionspuffer (100 mM Tris pH 8,0 (HCl), 20 mM EDTA pH 8,0, 1,4 M NaCl, 2 % [w/v] CTAB; 1 % [w/v] Polyvinylpyrrolidin) aufgenommen, geschüttelt und anschließend bei 65°C 20 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurde vorsichtig geschüttelt. Zur Trennung des

Phasengemisches erfolgte eine Zentrifugation des Ansatzes (12 000 x g, 4°C, 15 min). Aus der abgenommenen, oberen wässrigen Phase wurden nun die Nukleinsäuren mit 3 Vol. 96 %igem Ethanol nach 20 min Inkubation bei -20°C ausgefällt. Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.2 Isolierung von RNA

Alle für den Umgang mit RNA verwendeten Geräte wurden vor Gebrauch mit 0,1 % [v/v] DEPC behandelt und anschließend autoklaviert oder mit 10 % [v/v] H₂O₂ abgewischt. Lösungen wurden ebenfalls mit 0,1 % [v/v] DEPC versetzt und autoklaviert oder DEPC-behandeltes autoklaviertes tridest. H₂O wurde autoklavierten Puffern zugesetzt.

2.2.2.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Die Isolation der Gesamt-RNA wurde nach der TRIZOL[®]-Methode (Chomczynski & Sacchi, 1987) durchgeführt. Dazu wurde etwa 0,1 g Blattmaterial im vorgekühlten Mörser oder im Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Das Stickstoffpulver wurde in 1 ml RNA-Extraktionspuffer (0,8 M Guanidinthiozyanat, 0,4 M Ammoniumthiozyanat, 0,1 M Natriumacetat pH 5,0, 5 % [v/v] Glycerin, 38 % [v/v] in Wasser gesättigtes Phenol) aufgenommen und etwa 1 min kräftig geschüttelt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde nochmals 1 min kräftig geschüttelt. Zur Denaturierung der Proteine wurde 200 µl Chloroform zugesetzt. Anschließend wurde 30 sec kräftig geschüttelt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Trennung des Phasengemisches wurde der Ansatz zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 15 min). Aus der abgenommenen, oberen wässrigen Phase wurden nun die Nukleinsäuren mit 0,8 Vol. Isopropanol nach 10 min Inkubation bei RT ausgefällt und der Ansatz anschließend zentrifugiert (12 000 x g, 4°C, 10 min). Das Präzipitat wurde mit 70 %igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl sterilem tridest. H₂O aufgenommen.

2.2.3 Gelelektrophorese von DNA und RNA

2.2.3.1 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Die nichtdenaturierende Agarosegelelektrophorese wurde für die präparative und analytische Auftrennung von DNA-Fragmenten verwendet. Die Präparation des Gels sowie die Elektrophorese erfolgten in TAE-Laufpuffer (40 mM Tris (HCl), 20 mM Natriumacetat; 2 mM EDTA pH 8,0). Die Agarosekonzentration lag je nach Größe der zu analysierenden Fragmente bei 0,8-1,5 % [w/v]. Zur Analyse der SSLP-Marker-PCR erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente in 3 %iger [w/v] *low melting*-Agarose unter Verwendung von TBE-Laufpuffer (89 mM Tris (HCl), 89 mM Borsäure, 2

mM EDTA pH 8,0). Die DNA-Proben wurden mit rund 0,1 Vol. Probenpuffer (0,1 % [w/v] Bromphenolblau, 50 % [v/v], Glycerin, 0,1 % [w/v] Xylenzanol, 0,1 M EDTA) versetzt und bei einer Spannung von 70-100 V in horizontalen Elektrophoresekammern (HORIZON® 1114; LIFE TECHNOLOGIES™ GIBCO BRL, Eggenstein) aufgetrennt. Als Größenmarker wurde λ -DNA, die mit der Restriktionsendonuklease PstI geschnitten wurde, eingesetzt.

Die Anfärbung der DNA-Fragmente in den TAE-Agarosegelen erfolgte durch die Inkubation (10-20 min) des Gels in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (1 μg / ml). Durch die Zugabe von 0,03 % [v/v] Ethidiumbromid zur Gellösung erfolgte die Anfärbung der DNA-Fragmente in den TBE-Agarosegelen. Zur Dokumentation wurden die Gele mittels eines Transilluminators betrachtet bzw. mit einer Kamera fotografiert.

2.2.3.2 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden elektrophoretisch auf einem Agarose-Gel aufgetrennt und unter UV-Licht das DNA-Fragment erwarteter Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Reinigung erfolgte mit dem „QIAEXII Gel-Extraction-Kit“ (QIAGEN, Hilden) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

2.2.3.3 Auftrennung von RNA in denaturierenden Agarosegelen

Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte unter denaturierenden Bedingungen im 1 %igem [w/v] Agarosegel unter Verwendung von MEN-Puffer (200 mM MOPS pH 7,0 (NaOH), 50 mM Natriumacetat, 5 mM EDTA) als Laufpuffer. Dazu wurden die Agarose im Laufpuffer geschmolzen und nach dem Abkühlen mit 6 % [v/v] Formaldehyd versetzt. Die Gellösung wurde anschließend sofort in eine horizontale Elektrophoresekammer (HORIZON® 11-14; LIFE TECHNOLOGIES™ GIBCO BRL, Eggenstein) gefüllt. 20 μg Gesamt-RNA wurden mit tridest. H₂O auf ein RNA-Probenvolumen von 10 μl eingestellt und mit 15 μl RNA-Probenpuffer (50 % [v/v] Formamid, 10 % [v/v] 10x MEN-Puffer, 6 % [v/v] Formaldehyd, 6 % [v/v] Glycerin, 0,04 % [v/v] Bromphenolblau) versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 5 min bei 65 °C zur Denaturierung der RNA inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Nach Zusatz von 1 μl Ethidiumbromid (1 μg / μl) wurden die Proben auf das Gel aufgetragen und die RNA etwa 1,5 h bei einer Spannung von 80 V aufgetrennt.

2.2.4 Nachweis spezifischer RNA-Moleküle

2.2.4.1 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern-Blot)

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde mittels eines Kapillar-Blots auf eine positiv geladene Nylonmembran übertragen. Dazu wurde das zur Auftrennung der RNA verwendete Agarosegel auf einem Nylonfilter, welcher sich auf einem Stapel Zellstofflagen befand, plaziert. Durch eine geeignete Konstruktion wurde mittels Kapillarkwirkung der sich in einem Vorratsgefäß befindende Transferpuffer (20 x SSC; 3 M Natriumchlorid, 0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0) durch die Lagen Zellstoff gesogen um dabei die RNA aus dem Gel auf die Membran zu transferieren. Nach einer Transferzeit von ca. 16 h wurde die sich auf der Nylonmembran befindende Nukleinsäure durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker[®]; STRATAGENE, Heidelberg) kovalent fixiert.

2.2.4.2 Radioaktive Hybridisierung

Die zur Hybridisierung vorgesehenen Filter wurden durch 1 stündige Inkubation in 10-15 ml Hybridisierungslösung (0,2 % [w/v] Polyvinylpyrrolidin, 0,2 % [w/v] Ficoll 400 (PHARMACIA, Uppsala, Schweden), 0,2 % [w/v] BSA Fraktion V, 48 % [v/v] Lösung N (1,8 M Natriumchlorid; 100 mM Natriumdihydrogenphosphat, 10 mM EDTA, 0,2 % [w/v] SDS; pH 7,0), 48 % [v/v] Formamid, 100 µg / ml hitzedenaturierte Heringssperma-DNA) bei 42°C vorhybridisiert. Dazu wurden die Filter und die Hybridisierungslösung in Glasröhren gegeben und im Hybridisierungskubator (Modell 7601; GFL, Burgwedel) rotierend bewegt. Anschließend wurde die frisch hitzedenaturierte und auf Eis abgekühlte, radioaktiv markierte DNA-Sonde (siehe 2.2.5.1) dazugegeben. Die Hybridisierung erfolgte analog zu den oben angegebenen Bedingungen über Nacht. Die Filter wurden nach Entfernen der Hybridisierungslösung dreimal 20 min in Waschlösung I (3x SSC; 0,1 % [w/v] SDS) bei 60 °C und einmal 2 min in Waschlösung II (3x SSC) bei RT im Hybridisierungskubator gewaschen. Anschließend wurden die Filter luftgetrocknet und in Folie eingeschlagen. Die Lagerung erfolgte in strahlungsdichten Kassetten bei RT.

Die zu detektierenden Filter wurden mit einem „Phospho-Screen“ (MOLECULAR DYNAMICS, Krefeld) bei RT über Nacht exponiert und anschließend am „Phospho-Imager“ (STORM 860; MOLECULAR DYNAMICS) gescannt. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte durch das Programm „ImageQuaNT“ des gleichen Herstellers.

2.2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen und Ligation von DNA-Fragmenten wurden nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1989) durchgeführt.

2.2.5.1 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Die Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte nach der Zufallsprimer-Methode (Feinberg und Vogelstein, 1984) unter Verwendung des „Megaprime-DNA Labeling Kit“ (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Freiburg). Es wurden 5 µl DNA (ca. 25-50 ng) und 5 µl α -[³²P]-dATP (3000 Curie/mmol) eingesetzt. Nicht eingebaute Nukleotide wurden über „ProbeQuant™ G-50 Micro Columns“ des gleichen Herstellers abgetrennt.

2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von Nukleotidsequenzen in den SSLP- bzw. CAPS-Marker-Analysen eingesetzt. Als DNA-Matrize diente die in der Minipräparation (siehe 2.2.1.2.1) aus *A. thaliana* isolierte genomische DNA. Die PCR wurde nach Herstellerangaben mit *Taq*-DNA-Polymerase (ROCHE MOLECULAR BIOCHEMICALS oder INVITROGEN) in Thermozyklern (PERKIN ELMER, Wellesley; USA) unter Verwendung der folgenden Reaktionsbedingungen durchgeführt: 1 min Vorinkubation bei 94°C; 40 Zyklen mit 30 sec Denaturierung bei 94°C, 30 sec Primeranlagerung bei 50 - 55°C und 30 sec Extension bei 72°C; 2 min Endamplifikation bei 72°C. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen: 1 µl DNA-Matrize, 0,5 µl 5'-Oligonukleotid (100 µM), 0,5 µl 3'-Oligonukleotid (100 µM), 2 µl 10 x *Taq*-Reaktionspuffer, 0,6 – 1 µl MgCl₂ (50 mM), 2 µl dNTP-Mix (2 mM), 2 – 5 U *Taq*-DNA-Polymerase, ad 20 µl tridest. H₂O)

2.2.5.3 Genotypisierung

Um Aufschluss über den Genotyp der unterschiedlichen mutanten *A. thaliana*-Linien hinsichtlich einer Homo- bzw. Heterozygotie von *pen2* zu erhalten, erfolgte eine CAPS-Marker-basierte Genotypisierung. Dazu wurde DNA der entsprechenden Pflanzen isoliert (siehe 2.2.2.1) und unter Nutzung von *pen2*-spezifischen Oligonukleotiden eine PCR (siehe 2.2.5.2) durchgeführt. Anschließend wurden 10 µl des PCR-Ansatzes mit der Restriktionsendonuklease *Bsp*PI 2 Stunden bei 55°C verdaut und die DNA-Fragmente in 3 %iger [w/v] *low melting*-Agarose unter Verwendung von TBE-Laufpuffer aufgetrennt. Da die Restriktionsschnittstelle von *Bsp*PI nur im PEN2-Wildtypallel vorhanden ist, wurden je nach Genotyp die in der Tab. B-5 dargestellten Fragmentgrößen erwartet.

Tab. B-5: Genotypisierung / Fragmentgrößen nach *Bsp*PI-Verdau

Genotyp	Fragmentgrößen nach <i>Bsp</i> PI-Verdau
<i>PEN2</i> / <i>PEN2</i> (homozygot Wildtyp)	179 bp, 169 bp
<i>PEN2</i> / <i>pen2</i> (heterozygot)	348 bp, 179 bp, 169 bp
<i>pen2</i> / <i>pen2</i> (homozygot Mutante)	348 bp

2.2.5.4 Grobkartierung der Sekundärmutation

Zur Grobkartierung der Sekundärmutation, d. h. zur Bestimmung der Position der Sekundärmutation relativ zu bereits bekannten Markern erfolgte die Segregationsanalyse von Sequenzpolymorphismen (SSLP-Marker) in der F₂-Nachkommenschaft (Kartierungspopulation) einer Kreuzung der Mutante 222 (*Col-3gl1pen2*-Hintergrund) und des *A. thaliana*-Ökotyps Landsberg *erecta* (*Ler*-Hintergrund). Aufgrund der sehr ähnlichen genetischen Konstitution der Columbia-*Accession* 0 (*Col-0*) und der Columbia-*Accession* 3 (*Col-3*), wurden die zwischen dem *A. thaliana*-Ökotyp *Ler* und dem *A. thaliana*-Ökotyp *Col-0* existierenden Sequenzpolymorphismen verwendet. Dazu erfolgte die Nutzung der unter <http://www.arabidopsis.org/> bereitgestellten Internetressourcen und Datenbanken. Zur Analyse der Segregation der SSLP-Marker erfolgte die Isolation von F₂-Pflanzen aus der Kartierungspopulation mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR nach *P. infestans*-Infektion (1×10^5 / ml), d. h. von Mutanten in denen die Sekundärmutation putativ homozygot vorlag. Die zu untersuchenden Sequenzbereiche wurden durch spezifische Oligonukleotide (siehe Tab. B-3) mit Hilfe der PCR (siehe 2.2.5.2) amplifiziert und anschließend in Agarosegelen (siehe 2.2.3.1) analysiert. Durch Verwendung kodominanter SSLP-Marker war es dabei möglich, neben den homozygoten Konstitutionen auch die heterozygote Konstitution zu erkennen. Es wurde davon ausgegangen, dass eine Kopplung der Sekundärmutation und einem bereits kartierten Marker zu einer Abweichung der erwarteten Segregation für frei rekombinierbare Marker führt, da die Rekombinationsfrequenz zwischen benachbarten Loci abnimmt, je näher diese zusammenliegen. Besteht zwischen diesen Loci eine Kopplung, kommt es zu einer Verschiebung der Segregation in Richtung Columbia, da der Genotyp in der Nähe der im Columbia-Hintergrund erzeugten Sekundärmutation Columbia ist.

2.2.5.5 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

2.2.5.5.1 Automatisierte Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA-Fragmente erfolgte mittels eines automatischen Sequenzierers (LiCor, Modell 4000L bzw. LONGREADIR 4200, MWG-Biotech, Ebersberg). Für die Sequenzierungsreaktionen wurde der „SequiTherm EXCEL™ Long-Read™ Sequencing Kit“ (BIOZYM,

Hess. Oldendorf) verwendet, wobei die verwendeten Primer „IRD700“ bzw. „IRD800“ (MWG-BIOTECH, Ebersberg) 5'-fluoreszenzmarkiert waren.

2.2.5.5.2 Computergestützte Sequenzanalyse

DNA-Sequenzdaten wurden mit Einträgen in Datenbanken unter Verwendung von Programmen, die den BLAST-Algorithmus (Altschul *et al.*, 1997) unterstützen, verglichen. Die verwendeten Programme werden vom *National Centre for Biotechnological Information* unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST> zur Verfügung gestellt.

2.3 Mikroskopische Analysen

2.3.1 Lichtmikroskopische Analyse

Alle lichtmikroskopischen Analysen von infiziertem Blattmaterial erfolgten mit dem Fluoreszenz-Mikroskop ZEISS Axioskop II (ZEISS, Göttingen). Zur Übersichtsanalyse der Autofluoreszenz bzw. zur Durchmusterung des Autofluoreszenz-Phänotyps in der M2-Nachkommenschaft wurde das Fluoreszenz-Stereomikroskop LEICA MZ FLIII (LEICA, Wetzlar) mit GFP-Filtersatz verwendet.

2.3.1.1 Trypan-Blau-Färbung infizierter Blätter

Zum Nachweis des hypersensitiven Zelltods bzw. von Pathogenstrukturen in infiziertem Blattgewebe erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Trypan-Blau (modifiziert nach Wilson & Coffey, 1980). Dazu wurden inokulierte Rosettenblätter in einer siedenden Trypan-Blau-Färbelösung (1 Vol. Lactophenol-Trypan-Blau (10 ml Milchsäure, 10 g Phenol, 10 ml Glycerin, 10 ml tridest. H₂O, 0,1 % [w/v] Trypan-Blau), 2 Vol. 96 % [v/v] Ethanol) etwa 1 min inkubiert und anschließend in tridest. H₂O gewaschen. Zum Entfärben der Blätter erfolgte eine 2 – 5tägige Inkubation in Chloral-Hydrat (2,5 g / ml) bei RT, wobei die Entfärbelösung mindestens einmal erneuert wurde. Nach dem Entfärben wurden die Blätter in tridest. H₂O gewaschen und zur Lagerung in 50 % (v/v) Glycerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % (v/v) Glycerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik (*Differential Interference Contrast*).

2.3.1.2 DAB-Färbung infizierter Blätter

Zur Untersuchung der Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies erfolgte der Nachweis von H₂O₂ in infiziertem Blattgewebe durch Färbung mit dem Farbstoff DAB (3,3'-Diaminobenzidin), modifiziert nach Thordal-Christensen *et al.*, 1997. Dazu wurden inokulierte Rosettenblätter in einer frisch hergestellten DAB-Färbelösung (0,2 % [w/v] 3,3'-Diaminobenzidin; pH 3,8 (HCl)) für 2 h bei RT

inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Die Chlorophyllextraktion erfolgte durch kurzes Aufkochen der Blätter in 96 %igem [v/v] Ethanol. Zum Entfärben des Blattmaterials erfolgte eine 1 – 2tägige Inkubation in Chloral-Hydrat (2,5 g / ml) bei RT, wobei die Entfärbelösung mindestens einmal erneuert wurde. Nach dem Entfärben wurden die Blätter in tridest. H₂O gewaschen und zur Lagerung in 50 % [v/v] Glycerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glycerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik.

2.3.1.3 Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter

Um Kallose in den infizierten Blättern nachzuweisen erfolgte die Färbung mit dem Farbstoff Anilin-Blau nach einem modifizierten Protokoll von Adam & Somerville, 1996. Dazu wurde durch kurzes Aufkochen der Blätter in 96 % [v/v] Ethanol das Chlorophyll extrahiert. Das Blattmaterial wurde anschließend in einer frisch hergestellten Anilin-Blau-Färbelösung (150 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 0,01 % [w/v] Anilin-Blau; pH 9,5 (KOH)) für 30–60 min bei RT inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Blätter in 50 % [v/v] Glycerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glycerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.1.4 Kombinierte Trypan-Blau- und Anilin-Blau-Färbung infizierter Blätter

Um die Akkumulation von Kallose und den hypersensitiven Zelltod in infizierten Blättern parallel zu untersuchen wurde eine kombinierte Färbung mit Trypan-Blau und Anillin-Blau durchgeführt. Dazu erfolgte zunächst eine Trypan-Blau-Färbung 2.3.1.1 ohne jedoch die gefärbten Blätter in Chloral-Hydrat zu entfärben. Das Trypan-Blau-gefärbte Blattmaterial wurde nun in einer frisch hergestellten Anilin-Blau-Färbelösung für 30–60 min bei RT inkubiert und anschließend mit tridest. H₂O gewaschen. Zur Lagerung wurden die Blätter in 50 % [v/v] Glycerin aufgenommen oder zur Mikroskopie in 50 % [v/v] Glycerin eingebettet. Die mikroskopische Analyse der gefärbten Blätter erfolgte im Hellfeld unter Verwendung einer DIC-Optik und unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.1.5 Untersuchung der Autofluoreszenz

Die mikroskopische Untersuchung der Autofluoreszenz infizierter Blätter erfolgte in dem bereits mit Trypan-Blau oder DAB gefärbten Blattmaterial unter Fluoreszenz-Anregung (365 nm).

2.3.2 Elektronenmikroskopische Analyse

Die elektronenmikroskopische Analyse wurde durchgeführt von M. Birschwilks (IPB Halle). Dazu wurden die nekrotischen Blattbereiche 3 Tage nach Inokulation einer *P. infestans*-

Zoosporenkonzentration (5×10^5 / ml) präpariert und in 3 %igem [v/v] Glutaraldehyd in Phosphatpuffer (18,2 % [v/v] Lösung A (67 mM Kaliumdihydrogenphosphat), 81,8 % [v/v] Lösung B (84 mM Dinatriumhydrogenphosphat [2 H₂O])) vorfixiert. Die Fixierung erfolgte in 1 %igem [w/v] Osmiumtetroxid in Paladepuffer (2,94 % [w/v] Veronal-Natrium, 1,94 % [w/v] Natriumacetat [3 H₂O])). Das Blattgewebe wurde anschließend in einer Aceton-Reihe entwässert und in Spurr's Epoxydharz ERL (*Epoxy Resin Low Viscosity*) eingebettet (Spurr, 1969). Nach der Infiltration wurden die Proben in Einbettungsgefäße überführt und 2 Tage bei 60°C polymerisiert. Die gesamte Prozedur erfolgte in einem Einbettungsautomaten (LYNXTMel, LEICA).

Für die Anfertigung der Ultradünnschnitte (50 – 70 nm) wurde ein Ultramikrotom (ULTRACUT S, LEICA) verwendet. Die erhaltenen Ultradünnschnitte wurden mit Chloroform gestreckt und mit Cedukol-beschichteten Kupferträgernetzchen (200 *mesh*) aufgenommen.

Die Kontrastierung der Präparate erfolgte wie in Reynolds (1963) beschrieben. Die Auswertung der Ultradünnschnitte erfolgte an einem Transmissionselektronenmikroskop (EM 912 OMEGA; LEO ELEKTRONENMIKROSKOPIE, Oberkochen).

2.4 Erzeugung, Isolation und Charakterisierung von *Arabidopsis thaliana*-Mutanten

2.4.1 EMS-Remutagenese von *pen2-1*-Samen

Die EMS-Remutagenese wurde in Zusammenarbeit mit V. Lipka (MPIZ, Köln) durchgeführt. Zur Vorbehandlung wurden das Saatgut nacheinander für 4 Tage bei 4°C und 1 Tag bei 25°C in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Remutagenese des *pen2-1*-Saatguts erfolgte durch eine ca. 10stündige Inkubation von etwa 50 000 *pen2-1*-Samen in einer 0,3 %igen [v/v] EMS-Lösung. Reste der EMS-Lösung wurden anschließend durch mehrfaches Waschen mit tridest. H₂O entfernt. Alle EMS-kontaminierten Gegenstände und Materialien wurden zunächst in einer 4 %igen [w/v] Natriumhydroxid-Dekontaminierungslösung aufbewahrt, welche nach 24 Stunden mit Chlorwasserstoffsäure neutralisiert wurde. Um eine gleichmäßige Aussaat des remutagenisierten *pen2-1*-Saatguts zu ermöglichen, wurden die Samen in einer 0,1 % [w/v] Agaroselösung aufgenommen und in definierten Volumina auf dem Anzuchtsubstrat verteilt.

2.4.2 Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit

Die Bonitur der Resistenz unterschiedlicher *A. thaliana*-Genotypen gegen *P. infestans* erfolgte durch Bestimmung der Penetrations-Häufigkeit, d. h. der Anzahl infizierter und mit hypersensitivem Zelltod reagierender epidermaler Zellen je Blatt. Zum Nachweis hypersensitiv reagierender, d. h. toter Zellen erfolgte eine Trypan-Blau-Färbung des infizierten Blattmaterials. Dazu wurden voll entwickelte Rosettenblätter mit 10 µl einer *P. infestans*-Zoosporensuspension (5×10^3 oder 2×10^4 / ml) in der Blattmitte inokuliert und 3 Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in einer

Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen (siehe 1.3.6) inkubiert und anschließend mit Trypan-Blau gefärbt. Ausgewertet wurden 8 - 15 infizierte Blätter je Genotyp.

2.4.3 Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H₂O₂-Akkumulation und der Autofluoreszenz

Die Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods sowie der H₂O₂-Akkumulation erfolgte durch computergestützte Bestimmung des Trypan-Blau- bzw. des DAB-Index in entsprechenden infizierten und gefärbten Blättern. Dazu wurden die Blätter fotografiert und die Intensität der gefärbten Bereiche durch Analyse der Pixel mittels des Programms SCION IMAGE 4.0.2 (<http://www.scioncorp.com>) quantifiziert. Zur Quantifizierung der Autofluoreszenz wurden infizierte Blätter am Fluoreszenz-Stereomikroskop fotografiert und die Intensität der fluoreszierenden Bereiche durch Analyse der Pixel ermittelt.

2.4.4 Kreuzung von *Arabidopsis thaliana*

Zur Kreuzung der unterschiedlichen *A. thaliana*-Linien wurden die Pflanzen am Binokular unter Verwendung einer Präzisionsspinzette (DUMONT No. 5) präpariert. Als Pollenempfänger wurden Pflanzen ausgewählt, welche eine entsprechend große Zahl von Blüten aufwiesen die noch ungeöffnet waren, d. h. die Spitzen der Petalen (Kronblätter) waren bereits als weißer Punkt zu erkennen. Nachdem alle Blütenteile, bis auf das Karpel (Fruchtblatt) entfernt wurden, erfolgte die Bestäubung mit Pollen einer bereits voll geöffnete Blüte des Pollenspenders. Alle übrigen Blütenstände des Pollenempfängers wurden ebenfalls entfernt. Nach der Kreuzung wurden die Pflanzen einige Tage bei 100 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und unter Langtagbedingungen im Gewächshaus zur Samenreife gebracht.

2.4.5 Statistische Auswertung der Daten

Die statistische Analyse der Daten zur Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* sowie sämtliche Daten zur Quantifizierung des hypersensitiven Zelltods, der H₂O₂-Akkumulation und der Autofluoreszenz nach *P. infestans*-Infektion erfolgte durch Einweg-ANOVA mit einem post-hoc Tukey Test mit Hilfe des Programms GRAPHPAD INSTAT Version 3.05 (<http://www.graphpad.com>), wobei $P \leq 0,05$ als statistisch signifikant angesehen wurde. Zur Prüfung der Kreuzungsergebnisse, d. h. zur Ermittlung der Wahrscheinlichkeit mit der ein experimentell ermittelter Wert dem erwarteten Mittelwert einer normierten Zufallsverteilung entspricht, wurde der χ^2 -Test verwendet, wobei $P \geq 0,05$ als statistisch signifikant galt.