

## D Diskussion

### 1 Charakterisierung des Nichtwirts-Pathosystems *Arabidopsis thaliana*-*Phytophthora infestans*

#### **Eine Mutation in *PEN2* führt zu erhöhter Penetrations-Häufigkeit sowie zu potenzierten Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion.**

Der hypersensitive Zelltod, als eine Komponente der HR, ist eine häufig beobachtete Abwehrreaktion in der Pflanze-Pathogen-Interaktion, welche an der Ausprägung der Resistenz sowohl in Wirts-Pathosystemen als auch in Nichtwirts-Pathosystemen beteiligt ist (Staskawicz *et al.*, 1995; Dangl *et al.*, 1996; Kamoun *et al.*, 1999; Vleeshouwers *et al.*, 2000; Heath, 2000). Es wird grundsätzlich angenommen, dass die Zelltod-Reaktion eine effektive Abwehr gegen biotrophe Phytopathogene darstellt (McDowell & Dangl, 2000; Glazebrook, 2005; Oliver & Ipcho, 2004). Im Gegensatz dazu scheint der Zelltod jedoch für nekrotrophe Pathogene ein Virulenzfaktor zu sein, welcher notwendig ist um anfällige Pflanzen zu besiedeln (Thomma *et al.*, 2001).

Die zytologische Analyse *P. infestans*-infizierter und Trypan-Blau-gefärbter Blätter in *g11* zeigte, dass es an den meisten Interaktionsorten zu einem effektiven Abstoppen der eindringenden Hyphen ohne Beteiligung einer HR kommt (Abb. C-6). Nur in Einzelfällen reagieren infizierte Epidermiszellen in *g11* mit einer HR bzw. mit hypersensitivem Zelltod. Die makroskopische Analyse infizierter Blätter von *g11* deutet ebenso auf eine Resistenzausprägung ohne maßgebliche Beteiligung einer HR hin (Abb. C-1). Demnach scheint die hypersensitive Reaktion für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in der Interaktion mit *P. infestans* eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Gegensatz dazu wird in Huitema *et al.* (2003; 2004) und Kamoun (2001) für das Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* die HR infizierter Epidermiszellen als typische Abwehrreaktion beschrieben. An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass in den Arbeiten von Huitema *et al.* im Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten *P. infestans*-Isolat CRA208 das wahrscheinlich virulentere Isolat 90128 verwendet wurde.

Den Untersuchungen von Huitema *et al.* (2003; 2004) und Kamoun (2001) entsprechend erfolgte in dem von Mysore & Ryu (2004) vorgeschlagenen Modell zur Klassifizierung der Nichtwirtsresistenz eine Zuordnung dieses Pathosystems zum Typ II, d. h. zu Nichtwirts-Interaktionen, die durch eine sichtbare HR (Nekrose) gekennzeichnet sind. Die Nichtwirts-Interaktionen, welche ohne sichtbare Symptome verlaufen werden danach dem Typ I zugeordnet.

Eine klare Einstufung des Pathosystems *A. thaliana* – *P. infestans* in einen der Nichtwirtsresistenz-Typen I und II erscheint jedoch schwierig, da die Ausprägung des Nichtwirtsresistenz-Phänotyps beispielsweise von der Virulenz des verwendeten *P. infestans*-Isolats oder von dem untersuchten *A. thaliana*-Ökotyp abhängig sein kann. So zeigte die Analyse *P. infestans*-infizierter Blätter des *A. thaliana* Ökotyps Landsberg *erecta* sichtbare Nekrotisierungen der infizierten Blätter, die jedoch

nicht in infizierten Blättern des Ökotyps Columbia nachzuweisen waren (Daten nicht gezeigt). Ebenso ist anzunehmen, dass unterschiedliche Infektionsbedingungen einen Einfluss auf die Ausprägung des Infektions-Phänotyps haben können. Beispielsweise ist unter Nutzung hoher *P. infestans*-Inokulum-Dichten auch in *gl1* eine sichtbare schwache HR induzierbar (Daten nicht gezeigt).

Durch mikroskopische und makroskopische Untersuchung der Zelltod-Reaktionen bzw. der Nekrotisierungen in infizierten Blättern von *pen2* wurde eine Beteiligung der HR an den Abwehrreaktionen von *A. thaliana* gegen *P. infestans* gezeigt. Obwohl in einzelnen infizierten Epidermiszellen in *pen2* trotz erfolgreicher Penetration keine Zelltod-Reaktion beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass die erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* mit der Potenzierung des hypersensitiven Zelltods in *pen2* korreliert.

Die Tatsache, dass die Resistenzausprägung in infizierten Blättern von *gl1* in Abwesenheit der HR erfolgt, führt zu der Annahme, dass hauptsächlich präformierte Barrieren sowie HR-unabhängige induzierbare Abwehrmechanismen eine Besiedlung von *A. thaliana* durch *P. infestans* effektiv verhindern können. In Übereinstimmung damit deutete die zytologische Analyse infizierter Blätter von *gl1* auf eine Reihe von induzierten Abwehrreaktionen, wie beispielsweise Zellwandauflagerungen (Papillen) sowie eine nachweisbare Akkumulation von autofluoreszierenden Komponenten, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Kallose an den Orten der versuchten Penetration hin (Abb. C-6; Abb. C-8 - C-10).

Die Bildung struktureller Barrieren, wie Zellwandauflagerungen, ist als eine wesentliche Ebene in der Resistenzausprägung gegen phytopathogene Pilze beschrieben worden (Aist & Bushnell, 1991, Thordal-Christensen *et al.*, 2000; Zeyen *et al.*, 2002). So bilden Papillen als lokale Zellwandauflagerungen die Grundlage der basalen Penetrationsresistenz bzw. der Nichtwirtsresistenz gegen Mehltaupilze in Gerste bzw. *Arabidopsis* (Collins *et al.*, 2003; Schulze-Lefert, 2004). Durch Identifizierung der funktionell homologen Syntaxine PEN1 in *Arabidopsis* und ROR2 in Gerste, welche in Pathogen-induzierten Membranfusionsprozessen involviert sind, wurde gezeigt, dass ein prinzipiell ähnlicher Mechanismus an der Ausprägung von sowohl Penetrationsresistenz als auch Nichtwirtsresistenz gegen Gerstemehltau beteiligt ist (Freialdenhoven *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2003).

Die zytologischen Untersuchungen der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* deuten ebenso auf eine grundlegende Funktion der Pathogen-induzierten Papillen-Formation in der Resistenzausprägung dieses Nichtwirts-Pathosystems. Es wurde aber auch gezeigt, dass PEN1 offensichtlich keinen Effekt auf die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu haben scheint (siehe 1.1 - 1.3; C Ergebnisse).

Die Induzierung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion legt ebenso nahe, dass eine Erkennung von *P. infestans*-assoziierten spezifischen Strukturen (PAMPs) in

*Arabidopsis* stattfindet. Inokulationen mit einer Lösung, die Exudate der *P. infestans*-Zoosporen jedoch keine Sporen enthielt, deuteten bereits darauf hin, dass für eine solche Erkennung ein direkter Kontakt mit *P. infestans*-Strukturen notwendig ist (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Es scheint daher, dass die von *P. infestans* sekretierten extrazellulären PAMPs nicht für eine Erkennung bzw. Auslösung von Abwehrreaktionen in *Arabidopsis* ausreichend sind. Dass extrazelluläre PAMPs aus Oomyzeten der Gattung *Phytophthora* in der Lage sind, komplexe Abwehrreaktionen in Petersilie und Kartoffel auszulösen, wurde in Untersuchungen des schon erwähnten Pep-13 gezeigt (Nürnberger *et al.*, 1994; Brunner *et al.*, 2002; Halim *et al.*, 2004).

Desweiteren sind in der Literatur vor allem die bereits erwähnten Elicitine von *P. infestans* und anderer *Phytophthora*-Spezies beschrieben worden, welche als extrazelluläre Proteine HR in unterschiedlichen Nichtwirts-Pflanzen auslösen können (Kamoun *et al.*, 1998; Huitema *et al.*, 2005). Eine Beteiligung von Elicitinen an der Auslösung von Abwehrreaktionen in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* ist bisher jedoch noch nicht untersucht worden. Ebenso sind extrazelluläre Mucin-ähnliche Proteine aus *P. infestans*-Appressorien erwähnt worden, welche eine Funktion in der Zellwand-Anhaftung der *P. infestans*-Sporen haben und daher potentielle PAMPs darstellen können (Gornhardt *et al.*, 2000).

Es ist aber auch bekannt, dass *P. infestans*-assoziierte Moleküle in der Lage sind, Abwehrreaktionen in Wirtspflanzen zu unterdrücken. Beispielsweise supprimieren lösliche Glukane von *P. infestans* in Kartoffel die Akkumulation von ROS und die Ausprägung der HR (Doke, 1975). Durch Analyse der Akkumulation von Kallose in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* wurde eine Beteiligung der Kallose an den nach *P. infestans*-Infektion induzierten Zellwandauflagerungen gezeigt (Abb. C-10). Es wurde bisher angenommen, dass Kallose am Aufbau physischer Barrieren gegen eindringende Pathogene beteiligt ist und daher potentiell in der Lage ist, die Invasion phytopathogener Organismen zu verhindern oder zu erschweren (Brown *et al.*, 1989; Aist & Bushnell, 1991; Donofrio & Delaney, 2001).

Jedoch deuten neuere Studien auch auf eine kontroverse Funktion der Kallose in der Pflanze-Pathogen-Interaktion. So wurde in *Arabidopsis* gezeigt, dass der Verlust der Pathogen-assoziierten Kallose-Akkumulation in der Mutante *pmr4-1* (POWDERY MILDEW RESISTANCE4) bzw. in einer transgenen Linie mit einer T-DNA-Insertion im Gen *GSL5* (GLUCAN SYNTHASE-LIKE5) zu einer breiten Resistenz gegen virulente Mehltaupilze führt (Nishimura *et al.*, 2003; Jacobs *et al.*, 2003). Möglicherweise dient die Pathogen-induzierte Kallose-Akkumulation einer Maskierung von Pathogen-assoziierten Elicitoren, was infolgedessen eine Auslösung effizienter Abwehrreaktionen im Wildtyp verhindert (Jacobs *et al.*, 2003). Diskutiert wird aber auch ein durch Kallose ermöglichter Schutz der eindringenden Pilze vor antimikrobiellen Substanzen der Pflanze.

Um den Einfluss der Papillen-assoziierten Kallose in der Nichtwirts-Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* zu untersuchen, erfolgte die Analyse der Mutante *pmr4-1* sowie der Doppelmutante *pmr4-1 pen2*. Da der HR-Phänotyp der infizierten Mutante *pmr4-1* vergleichbar mit dem infizierter

Blätter des Wildtyps Col-0 ist und auch keine signifikante Veränderung des *pen2*-abhängigen HR-Phänotyps in infizierten Blättern der Doppelmutante *pmr4-1 pen2* beobachtet wurde, kann angenommen werden, dass die Akkumulation von Kallose wahrscheinlich von untergeordneter Bedeutung in der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* ist (Daten nicht gezeigt).

In diesem Hintergrund erscheint eine Bedeutung der für die Mutante *pen2* gezeigten verstärkten Kallose-Akkumulation nach *P. infestans*-Infektion für die Nichtwirtsresistenz fraglich. Möglicherweise erfolgt nach der (verstärkten) Pathogen-Erkennung in *pen2* im Gegensatz zu *gl1* die Aktivierung eines breiten Spektrums von Abwehrmechanismen nach dem „Alles-oder-Nichts“-Prinzip, unabhängig von der Effizienz der einzelnen Abwehrreaktion.

Von Nishimura *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass trotz des Verlustes der Papillen-assoziierten Kallose eine im Vergleich zum Wildtyp nicht signifikant veränderte Papillen-Formation in infizierten Blättern der Mutante *pmr4-1* zu beobachten ist. Demnach erfolgt die Bildung der Papillen unabhängig von einer Kallose-Auflagerung.

Einen Hinweis, welcher auf die Beteiligung phenolischer Verbindungen am Aufbau der Papillen-Strukturen nach *P. infestans*-Infektion hindeutet, lieferte die Untersuchung der Akkumulation autofluoreszierender Komponenten in infizierten Blättern von *gl1* und *pen2* (Abb. C-8). So wurde gezeigt, dass sowohl in *gl1* als auch in *pen2* autofluoreszierende Komponenten in den Zellwandauflagerungen unterhalb der Penetrationsorte akkumulieren (Abb. C-8). Es ist daher denkbar, dass die am Aufbau der Papillen beteiligte Akkumulation phenolischer Verbindungen hinreichend zum Aufbau effizienter Papillen-Strukturen ist. Eine Untersuchung der Akkumulation von Kallose in den Papillen-Strukturen der Mutante *pmr4-1* bzw. der Doppelmutante *pmr4-1 pen2* nach *P. infestans*-Infektion wäre jedoch noch erforderlich, um die Annahme einer möglichen Kallose-unabhängigen Resistenzausprägung in der Interaktion mit *P. infestans* zu unterstützen.

Hinweise für eine Beteiligung des pflanzlichen Zytoskeletts sowie von zellulären Organellen an Pathogen-induzierten dynamischen Prozessen während der Interaktion *A. thaliana* – *P. infestans* lieferten mikroskopische Analysen infizierter epidermaler Zellen. So wurde in einigen hypersensitiv reagierenden Epidermiszellen, sowohl in *gl1* als auch in *pen2*, eine veränderte granuläre Zytoplasma-Struktur in Reaktion auf das eindringende Pathogen beobachtet (Abb. C-6; Daten nicht gezeigt). In diesem Zusammenhang sind sogenannte zytoplasmatische Aggregationen und Neuordnungen innerhalb des Zytoskeletts der pflanzlichen Zelle als früh sichtbare zelluläre Reaktionen auf virulente und avirulente Oomyzeten-Pathogene bereits beschrieben worden (Takemoto *et al.*, 2003, Holub & Cooper, 2004). Experimentelle Bestätigung der dynamischen Reaktion des Zytoskeletts innerhalb der Interaktion von Pflanze und Pathogen liefert auch die von Yun *et al.* (2003) demonstrierte Beteiligung von Aktin-Mikrofilamenten an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen Weizenmehltau.

Desweiteren deutet die Akkumulation von Vesikel-ähnlichen Strukturen und von Mitochondrien unmittelbar am Ort der versuchten Penetration auf Pathogen-induzierte dynamische Prozesse in der Zellperipherie (Abb. C-11).

Ebenso wurde in *B. graminis*-infizierten epidermalen Zellen aus Gerste gezeigt, dass es zur Akkumulation von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-beladenen Vesikeln unterhalb der Penetrationsstelle kommt und dass das Auftreten solcher Vesikel in Korrelation zur Ausprägung der Resistenz gegen Gerstemehltau steht (Hückelhoven *et al.*, 1999; Collins *et al.*, 2003). Die Identifizierung von PEN1 verdeutlicht interessanterweise, dass Vesikel bzw. Vesikelfusionsereignisse, auch in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *B. graminis* f. sp. *hordei* eine bedeutende Funktion haben (Collins *et al.*, 2003).

Ein weiteres Beispiel für Pathogen-induzierter, dynamischer Prozesse stellt die Relokalisierung zellulärer Organellen zum Ort der Pathogenpenetration im Pathosystem *A. thaliana* – *P. sojae* dar, von der angenommen wird, dass sie eine Funktion beim Aufbau physischer und chemischer Barrieren gegen eindringende Pathogene hat (Holub & Cooper, 2004).

Die Beurteilung der Penetrationsresistenz im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* erfolgte durch Bonitur der Penetrations-Häufigkeit nach *P. infestans*-Infektion, d. h. durch Auszählung penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen in infizierten Blättern. Es wurde gezeigt, dass ein Verlust der Genfunktion von *PEN2* eine im Vergleich zu *gl1* erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* zur Folge hat. Aufgrund der Penetrations-Anfälligkeit gegen weitere biotrophe und nekrotrophe Nichtwirts-Pathogene kann angenommen werden, dass *PEN2* wahrscheinlich an der Resistenzausprägung gegen ein breites Pathogenspektrum beteiligt ist (Lipka *et al.*, 2005; Dittgen, 2005). Aufgrund des gegenwärtig noch unbekanntem Substrats der Glykosyl-Hydrolase *PEN2* kann derzeit über den der *PEN2*-vermittelten Resistenz zugrunde liegenden Mechanismus keine Aussage getroffen werden. Jedoch scheint die Funktion von *PEN2* Teil eines nach Pathogeninfektion induzierten, zentralen und unspezifischen Abwehrmechanismus in der Zellperipherie zu sein (Lipka *et al.*, 2005).

### **Die PR-Genexpression ist in *pen2* nach Infektion mit *P. infestans* verstärkt.**

Genexpressionsanalysen von Markergenen für SA- bzw. JA/ET-abhängige Abwehrreaktionen sollten zum einen Aufschluss über die Beteiligung von unterschiedlichen Signaltransduktionskaskaden an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *A. thaliana* gegen *P. infestans* geben. Zum anderen sollte eine mögliche Korrelation des in *pen2* nach *P. infestans*-Infektion beobachteten HR-Phänotyps mit einer möglichen veränderten *PR*-Genexpression untersucht werden.

Die Analyse der Genexpression zeigte eine früh nach Pathogeninfektion induzierte JA/ET-abhängige *PDF1.2*-Expression, während eine schwache Induzierung der SA-abhängigen *PR1*-

Expression in den späten Phasen der Interaktion mit *P. infestans* zu beobachten war. Dieses Genexpressionsmuster ist weitgehend in Übereinstimmung mit der von Huitema *et al.* (2003) für das Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* beschriebenen Genexpression, in der eine nach *P. infestans*-Infektion signifikant induzierte Expression des JA/ET-abhängigen Markergens *PDF1.2* gezeigt wurde.

Ein weiterer Hinweis für eine mit der Aktivierung der JA/ET-abhängigen Abwehr assoziierte Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* liefern DNA-*microarray*-basierte, vergleichende Genexpressionanalysen (Huitema *et al.*, 2003). So wurde durch Analyse der nach JA-Behandlung bzw. nach *P. infestans*-Infektion veränderten Genexpression gezeigt, dass in großen Teilen Ähnlichkeiten hinsichtlich der beobachteten Genexpressionsmuster existieren (Huitema *et al.*, 2003).

Untersuchungen der Genexpression in Nichtwirts-Interaktionen von *Arabidopsis* und biotrophen Mehltäupilzen deuteten auf Unterschiede in der Induzierbarkeit der JA/ET-regulierten Abwehr. So zeigte Zimmerli *et al.* (2004) in Analogie zu Huitema *et al.* (2003) eine Korrelation von Nichtwirtsresistenz und Induzierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen in der Interaktion mit Gerstemehltau. Vergleichende Expressionsstudien in Nichtwirts- und Wirts-Interaktionen zeigten, dass virulente Mehltäupilze offenbar in der Lage sind, JA/ET-vermittelte Abwehrreaktionen zu supprimieren bzw. die Fähigkeit besitzen, die Auslösung dieser zu vermeiden.

Hinweise, welche diese Annahme unterstützen, lieferte die Beobachtung, dass ektopische Aktivierung des JA/ET-vermittelten Signaltransduktion zur Resistenz gegenüber virulenten biotrophen Pathogenen führte (Zimmerli *et al.*, 2004).

Obwohl die Studien eine präferenzielle Aktivierung der JA/ET-vermittelten Abwehr in der Nichtwirtsresistenz von *Arabidopsis* gegen *B. graminis* belegen, zeigten JA/ET-Signaltransduktionsmutanten nach *B. graminis*-Infektion Wildtyp-ähnliche Phänotypen (Zimmerli *et al.*, 2004). In Übereinstimmung damit scheint die JA/ET-vermittelte Abwehr in der Nichtwirts-Interaktion von *Arabidopsis* mit Weizenmehltau keine signifikante Bedeutung zu haben (Yun *et al.*, 2003).

Die Untersuchung der Expression von *PR1* und *PDF1.2* in *gl1* bzw. *pen2* verdeutlicht ebenso, dass die verstärkte Abwehrreaktion der Mutante *pen2* nach *P. infestans*-Infektion mit einer im Vergleich zu *gl1* verstärkten Induzierung der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression korreliert, wobei das zeitliche Genexpressionsmuster von *PDF1.2* in *pen2* und *gl1* weitestgehend übereinstimmt. Die *PR1*-Transkriptakkumulation wurde in *gl1* im Gegensatz zu *pen2* innerhalb von 48 h nach *P. infestans*-Infektion nur schwach oder gar nicht beobachtet. Daher kann in Übereinstimmung mit den Studien von Huitema *et al.* (2003) angenommen werden, dass die SA-abhängige Abwehr in der Kontrolle der frühen Interaktion mit *P. infestans* eine untergeordnete Bedeutung hat.

In Bezug auf die zumindest für die frühen Infektionsphasen von *P. infestans* beschriebenen biotrophen Lebensweise erscheint es daher auch überzeugend, dass die mit HR und

Nekrotisierung korrelierende SA-abhängige Abwehr während der frühen Infektion möglicherweise aktiv oder passiv, z. B. durch eine Aktivierung JA/ET-vermittelter Signaltransduktionswege unterdrückt wird. Hinweise für eine antagonistische Regulation des SA-vermittelten Signalwegs durch Aktivierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen lieferten die bereits erwähnten Untersuchungen von Zhao *et al.* (2003).

### **PEN1 hat keinen Einfluss auf die Nichtwirtsresistenz im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans*.**

Die makroskopische und zytologische Untersuchung der pflanzlichen Abwehrreaktionen in der Mutante *pen1* deuteten darauf hin, dass PEN1 keinen signifikanten Effekt auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* hat. In Übereinstimmung damit zeigten die bisherigen Untersuchungen der Mutante *pen1*, dass PEN1 wahrscheinlich eine spezifische Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze zu haben scheint (Collins *et al.*, 2003; Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Auch im Hintergrund einer verstärkten *P. infestans*-Penetration in der Doppelmutante *pen1 pen2* wurde keine Veränderung des *pen2*-abhängigen Phänotyps beobachtet. Dementgegen ist nach Infektion der Doppelmutante *pen1 pen2* mit Gerstemehltau ein additiver Effekt in der Penetrationsanfälligkeit gezeigt worden (Dittgen, 2005). Es wird angenommen, dass PEN1 sowie PEN2 und PEN3 die Hauptelemente der Zellperipherie-assoziierten Penetrationsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze darstellen. Desweiteren deuten genetische Analysen auf die Existenz eines weiteren Mechanismus, der sogenannten posthaustoriellen Resistenz hin, in der die EDS1-Komplexe eine zentrale Funktion übernehmen (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Es scheint daher, dass zwei weitgehend unabhängige Mechanismen an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen biotrophe Mehltaupilze beteiligt sind, wobei gezeigt wurde, dass einzelne Komponenten dieser Mechanismen auch in der Resistenz gegen weitere phylogenetisch entfernte Nichtwirtspathogene involviert sind (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005; diese Arbeit).

Untersuchungen der Nichtwirts-Interaktion *A. thaliana* – *P. syringae* pv *phaseolicola* zeigten, dass auch während einer ohne sichtbare Symptome verlaufenden Nichtwirts-Interaktion die Induzierung von Abwehrreaktionen, wie z. B die Expression von *PR*- oder Abwehr-assoziierten Genen, erfolgen kann (Lu *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2003). Die Analysen der Expression der *PR*-Gene *PR1* und *PDF1.2* in der Mutante *pen1*, die ebenso keinen sichtbaren Phänotyp nach *P. infestans*-Inokulation zeigt, sowie in der Doppelmutante *pen1 pen2*, welche einen *pen2*-ähnlichen Phänotyp zeigt, deutete auf eine vergleichbare *PR*-Genexpression in Col-0 und *pen1* bzw. in *pen2* und *pen1 pen2* hin. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der zytologischen Untersuchung kann daher angenommen werden, dass PEN1 keinen Effekt auf die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* hat.

Nach Untersuchung des Nichtwirts-Pathosystems *A. thaliana* – *P. infestans* auf zytologischer und molekularer Ebene kann angenommen werden, dass präformierte Barrieren wahrscheinlich in Kombination mit weiteren früh induzierten Abwehrreaktionen ein Vordringen von *P. infestans*-Strukturen bereits auf epidermaler Ebene effizient limitieren können. Zur Ausprägung der Resistenz in *Arabidopsis* gegen *P. infestans* scheint die HR von geringerer Bedeutung zu sein, wobei gezeigt wurde, dass erst nach dem Verlust der Penetrationsresistenz (*pen2*) eine mit der HR assoziierte Abwehr erfolgt.

## **2 Analyse der Nichtwirtsresistenz gegen *Phytophthora infestans* in unterschiedlichen *Arabidopsis thaliana*-Signaltransduktionsmutanten**

**PAD4 und EDR1 sind an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt, wobei die Fähigkeit zur Salizylsäure-Akkumulation keinen Einfluss zu haben scheint.**

Die Genexpressionsanalyse von *gl1* zeigte, dass die Expression des SA-regulierten Gens *PR1* in der frühen Interaktion von *A. thaliana* und *P. infestans* wahrscheinlich weniger bedeutend ist (Abb. C-13). Die Northern-Blot-Analyse der Mutante *pen2* deutete aber auf eine Verstärkung der *PR1*-Genexpression nach Pathogeninfektion hin, was ein Hinweis dafür sein könnte, dass die erhöhte Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* und die verstärkten Abwehrreaktionen in *pen2* unter Beteiligung SA-regulierter Mechanismen erfolgen. Die *P. infestans*-Inokulation einer *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linie führte jedoch zu keiner Verstärkung oder Abschwächung der *pen2*-abhängigen HR (Daten nicht gezeigt). In Analogie dazu demonstriert der Wildtyp-ähnliche Phänotyp einer infizierter *NahG*-exprimierenden Linie eine von der Signalkomponente SA unabhängige Ausprägung der Nichtwirtsresistenz im *A. thaliana* Ökotyp Col-0. An dieser Stelle ist darauf hinzuweisen, dass der Einfluss von SA-Abbauprodukten, wie Catechol, auf den in *pen2* *NahG* beobachteten Phänotyp nicht auszuschließen ist.

Da einerseits die Aktivierung der Genexpression des SA-regulierten Gens *PR1* nach *P. infestans*-Infektion gezeigt wurde, andererseits das SA-Signal offenbar nicht essentiell für die Nichtwirtsresistenz gegen *Arabidopsis* zu sein scheint, ist anzunehmen, dass die *PR1*-Expression in der Ausprägung der Resistenz gegen *P. infestans* von untergeordneter Bedeutung ist. Unterstützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass in der Mutante *npr1-1* eine Wildtyp-ähnliche (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung) bzw. in der Doppelmutante *pen2 npr1-1* eine *pen2*-ähnliche HR-Ausprägung nach *P. infestans*-Infektion beobachtet wurde. Eine Analyse der *PR1*-Genexpression in infizierten *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linien bzw. in *pen2 npr1-1* müsste jedoch zur Bestätigung der Annahme einer von der Expression SA-regulierter *PR*-Gene unabhängigen Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* noch erfolgen.



Die genetische Analyse der Nichtwirtsresistenz in Tomate und Tabak gegen den Rostpilz *Uromyces vignae* sowie in *Arabidopsis* gegen Gerstemehltau deuten ebenso auf eine untergeordnete Funktion der SA-regulierten Abwehr in diesen Pathosystemen hin (Mellersh & Heath, 2003; Dittgen, 2005). Ebenso zeigen Untersuchungen von Zimmerli *et al.* (2004), dass Komponenten der SA-regulierten Signaltransduktion in der Nichtwirtsresistenz von *A. thaliana* gegen Gerstemehltau keinen signifikanten Effekt haben. Demgegenüber scheint die SA-vermittelte Abwehr eine stärker ausgeprägte Funktion in der Nichtwirtsresistenz gegen Weizenmehltau zu haben (Yun *et al.*, 2003). So wurde gezeigt, dass in den Mutanten *pad4*, *npr1* und *eds1* und in transgenen *NahG*-Pflanzen die Penetrations-Häufigkeit von *B. graminis* f. sp. *tritici* erhöht ist. Darüber hinaus ist demonstriert worden, dass ein additiver Verlust der EDS1-Funktion und der Aktin-Funktion hinreichend ist, um die Nichtwirtsresistenz gegen Weizenmehltau zu überwinden.

In Analogie zu dem in der Mutante *npr1-1* bzw. in der *NahG*-exprimierenden Linie nach *P. infestans*-Infektion beobachteten Phänotyp zeigen die Mutanten *rar1-10*, *sgt1b-1*, *eds1-2* und *ndr1-1* ebenso eine im Vergleich zum Wildtyp unveränderte HR (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Die Analyse der entsprechenden Mutanten im *pen2*-Hintergrund demonstrierte, dass keine dieser Komponenten einen Effekt auf den *pen2*-abhängigen Phänotyp zu haben scheint. Für RAR1 und SGT1 wurde eine Funktion in der *R*-Gen-spezifischen Resistenz beschrieben, welche möglicherweise in Verbindung mit der Regulation von R-Proteinkomplexen durch SCF-abhängige Ubiquitinierungsprozesse steht. Daraus kann geschlossen werden, dass RAR1/SGT1-abhängige Ubiquitinierungen in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* nicht von Bedeutung sind. Alternativ dazu ist eine zu RAR1/SGT1 redundant vorhandene Funktion anderer Komponenten in der SCF-abhängigen Regulation nicht auszuschließen.

Beispiele, die eine Beteiligung von RAR1 oder SGT1 in der Nichtwirtsresistenz belegen, wurden im Gegensatz dazu bereits gezeigt. Neben der erwähnten Funktion von SGT1 in der Nichtwirtsresistenz von *N. benthamiana* ist von Freialdenhoven *et al.* (2005) für RAR1 eine Bedeutung im Nichtwirts-Pathosystem *Hordeum vulgare* – *Golovinomyces orontii* beschrieben worden.

Auch EDS1 und NDR1, die Funktionen in der Vermittlung *R*-Gen-spezifischer Resistenzmechanismen haben, scheinen für die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* von untergeordneter Bedeutung zu sein. Während die biochemische Funktion von NDR1, welches Glykosylphosphatidyl-Inositol-(GPI)-verankert in der Plasmamembran lokalisiert ist, gegenwärtig noch unklar ist, wird angenommen, dass EDS1, als ein Protein mit Homologie zu eukaryontischen Lipasen, in der frühen Pathogenabwehr, d. h. hierarchisch über dem PCD und dem „oxidative burst“ einzuordnen ist (Coppinger *et al.*, 2004; Wiermer *et al.*, 2005). Desweiteren ist für EDS1 in Assoziation mit PAD4 (*PHYTOALEXIN DEFICIENT4*) eine Funktion in der SA-Akkumulation und Amplifikation pflanzlicher Abwehrreaktionen beschrieben worden (Feys *et al.*,

2001). Mehrere Studien belegen, dass SA-Akkumulation und *EDS1/PAD4*-Expression durch positive Rückkopplungsmechanismen zur gegenseitigen Signalverstärkung in der Abwehr beitragen (Xiao *et al.*, 2003; Chandra-Shekara *et al.*, 2004).

Mutationen in *EDS1* führen neben einer erhöhten Anfälligkeit für virulente Pathogene auch zu einer Beeinträchtigung der Nichtwirtsresistenz und deuten daher auf eine generelle regulatorische Funktion von *EDS1* in der Pathogenresistenz hin (Parker *et al.*, 1996; Yun *et al.*, 2003; Zimmerli *et al.*, 2004; Wiermer *et al.*, 2005). So wurde beispielsweise gezeigt, dass der kombinierte Verlust von *PEN2* und *EDS1* bzw. *PEN2* und *PAD4* zu einem Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen den Erbsenmehltau *Erysiphe pisi* führte (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Der *EDS1/PAD4*-Komplex scheint demnach eine zentrale Komponente in der Nichtwirtsresistenz in *Arabidopsis* gegen *Erysiphe pisi* darzustellen. Im Gegensatz dazu kann jedoch angenommen werden, dass *EDS1* auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* keinen Effekt hat (Tab. C-1; Daten nicht gezeigt).

Die *P. infestans*-Infektion der Doppelmutante *pen2 pad4-1* deutete auf eine Suppression des *pen2*-abhängigen Nekrose- und Zelltod-Phänotyps hin (Abb. C-15; Abb. C-16). Es wurde gezeigt, dass der durch höhere Inokulum-Dichten induzierte hypersensitive Zelltod im Mesophyll von *pen2* durch eine Mutation in *PAD4* weitestgehend unterdrückt werden kann (Abb. C-16). Interessanterweise scheint jedoch die Anzahl penetrierter und hypersensitiv reagierender Epidermiszellen in *pen2* und *pen2 pad4-1* auf vergleichbarem Niveau zu sein (Abb. C-17). Offenbar ist der durch geringere Inokulum-Dichten induzierte hypersensitive Zelltod penetrierter epidermaler Zellen in *pen2* unbeeinflusst von *pad4-1*.

Es kann daher angenommen werden, dass *PAD4* eine Funktion in der positiven Regulation der HR nach *P. infestans*-Infektion in *Arabidopsis* hat. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante *eds1-2* keine HR bzw. die Doppelmutante *pen2 eds1-2* keine Veränderung der *pen2*-abhängigen HR zeigt, kann geschlossen werden, dass für die *PAD4*-abhängige Regulation der HR-Ausprägung im Mesophyll eine Interaktion mit *EDS1* nicht notwendig ist (Daten nicht gezeigt).

Ähnliche Befunde sind auch in Studien der *HRT* (*HR* to *ICV*)-spezifischen Resistenz gegen TCV (*turnip crinkle virus*) gefunden worden (Dempsey *et al.*, 1997; Chandra-Shekara *et al.*, 2004). *HRT* zeigt Homologien zu dem *R*-Gen *RPP8* (*RECOGNITION* of *PERONOSPORA PARASITICA*8) und *RPP8*-Homologen, welche Resistenz gegen den Oomyzeten *H. parasitica* vermitteln (Cooley *et al.*, 2000). Es wurde gezeigt, dass durch *pad4-1* und *eds1-1* eine Beeinträchtigung der *HRT*-abhängigen Resistenz erfolgt, diese jedoch nur in *eds1-1* durch exogene SA-Applikation wiederhergestellt werden kann. Demnach ist die *HRT*-vermittelte Resistenz SA- und *PAD4*-abhängig jedoch unabhängig von *EDS1*. Möglicherweise könnte daher eine Erkennung des Oomyzetenpathogens *P. infestans* in *Arabidopsis* analog der *HRT/RPP*-vermittelten Mechanismen erfolgen.

Nach Untersuchung der *NahG*-exprimierenden *pen2*-Linien kann geschlossen werden, dass die Akkumulation von SA für die von PAD4 regulierte Zelltod-Reaktion in *pen2* nicht essentiell ist. Diese Annahme könnte experimentell durch eine exogene SA-Applikation in infizierten *pen2 pad4-1* überprüft werden. Zu erwarten wäre dann, dass exogene SA-Applikation keinen Effekt auf die Suppression des HR-Phänotyps in *pen2 pad4-1* hat. Gleichzeitig würde ein solcher Befund dafür sprechen, dass die für die Mutante *pad4-1* beschriebene Reduzierung der SA-abhängigen Biosynthese des Phytoalexins Camalexin nicht ursächlich für den in der Doppelmutante *pen2 pad4-1* beobachteten Phänotyp ist. Übereinstimmend damit zeigten die Doppelmutanten *pen2 pad3-1* und *pen2 pad5-1* eine *pen2*-ähnliche HR nach *P. infestans*-Infektion (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung). Der in *pen2 pad4-1* beobachtete Effekt scheint daher wahrscheinlich mit einer regulatorischen Funktion von PAD4 in der Interaktion mit *P. infestans* in Verbindung zu stehen.

Als ein weiterer Interaktionspartner von EDS1 ist SAG101 (SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101) identifiziert worden (Feys *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu den anderen EDS1-Komplexen scheint der Komplex EDS1-SAG101 Kern-lokalisiert vorzuliegen. Desweiteren ist eine teilweise redundante Funktion von PAD4 und SAG101 hinsichtlich ihrer Funktion in der (TIR-NBS-LRR)-*R*-Gen-spezifischen Resistenz beschrieben worden (Wiermer *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde kürzlich demonstriert, dass der kombinierte Verlust der Funktion von SAG101 und PAD4 hinreichend ist, um die Nichtwirtsresistenz gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* zu überwinden (Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Ebenso scheint es, dass die Sporulation dieses biotrophen Nichtwirtspathogens mit einer signifikant reduzierten Zelltod-Reaktion infizierter Zellen in *pad4-1 sag101-1* korreliert. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem Grundsatz, dass die Entwicklung biotropher Pathogene effizient durch den hypersensitiven Zelltod eingeschränkt werden kann. Um einen möglichen Effekt von SAG101 in der Interaktion mit *P. infestans* zu untersuchen, erfolgt zur Zeit die Analyse weiterer Mutantenkombinationen von *pen2*, *pad4-1* und *sag101-1*.

Desweiteren erscheint überraschend, dass *P. infestans* trotz der im Mesophyll unterdrückten Zelltod-Reaktion in *pen2 pad4-1* nicht in der Lage ist, sich weiter im infizierten Gewebe auszubreiten und daher in *pen2 pad4-1* sowie *pen2* eine vergleichbare Entwicklung zeigt (Daten nicht gezeigt). Als Grund hierfür könnte angenommen werden, dass der bereits in den penetrierten Epidermiszellen induzierte hypersensitive Zelltod hinreichend ist, um *P. infestans* effizient an der weiteren Ausbreitung zu hindern.

Um diese Annahmen zu unterstützen wären weitere genetische Analysen unter Nutzung von weiteren Doppelmutanten-Linien erforderlich. Denkbar wäre beispielsweise eine Kombination von *pen2* und den *dnd* (defense, no death)-Mutationen, welche durch eine erhöhte Pathogenresistenz bei gleichzeitigem Verlust des HR-assoziierten Zelltods gekennzeichnet sind (Yu *et al.*, 1998; Jurkowsky *et al.*, 2005).

Die Untersuchung der Doppelmutante *pen2 edr1-1* nach *P. infestans*-Infektion zeigte, dass durch kombinierten Verlust der Funktion von PEN2 und EDR1 eine Verstärkung des *pen2*-abhängigen HR-Phänotyps induziert werden kann (Abb. C-15). Durch mikroskopische (Daten nicht gezeigt) und makroskopische Analyse des hypersensitiven Zelltods (Abb. C-16) wurde demonstriert, dass im Vergleich zu *pen2* eine größere Anzahl von Zellen mit hypersensitivem Zelltod auf die *P. infestans*-Infektion reagiert. In welchem Maß die verstärkte Zelltod-Häufigkeit mit einer erhöhten Anzahl penetrierter epidermaler Zellen korreliert, konnte aufgrund der starken Zelltod-Reaktion im Mesophyll von *pen2 edr1-1* nicht zweifelsfrei ermittelt werden. Es wäre daher auch möglich, dass der Phänotyp in *pen2 edr1-1* durch die HR von Epidermis- und Mesophyllzellen hervorgerufen wird, welche an penetrierte Zellen angrenzen, jedoch selbst nicht penetriert worden.

Nach *P. infestans*-Infektion der Mutante *edr1-1* wurde eine *gl1*-ähnliche HR bzw. Penetrations-Häufigkeit beobachtet, was zu der Annahme führt, dass ein Verlust der EDR1-Funktion nur im *pen2*-Hintergrund eine weitere Verstärkung der HR in infizierten Blättern hervorruft. Für die Ausprägung des verstärkten Mesophyll-Zelltods in *pen2 edr1-1* ist daher die Unterdrückung der Penetrationsresistenz (*pen2*) notwendig.

*EDR1* kodiert für eine CTR1 (CONSTITUTIVE IRIPPLE RESPONSE1)-ähnliche Kinase und ist als negativer Regulator der pflanzlichen Pathogenabwehr isoliert worden (Frye & Innes, 1998). Desweiteren ist die Beteiligung der MAPK Kinase Kinase EDR1 an MAP-Kinase-Kaskaden beschrieben worden, welche SA-abhängige Abwehrreaktionen nach Pathogenbefall negativ regulieren (Frye & Innes, 1998; Frye *et al.*, 2001). So wurde beispielsweise in *edr1-1* eine im Vergleich zum Wildtyp schnellere Induzierung des Mesophyll-Zelltods nach Infektion mit dem virulenten Mehltau *Erysiphe cichoracearum* demonstriert (Frye *et al.*, 2001).

Es könnte daher angenommen werden, dass EDR1 bzw. MAP-Kinase-Kaskaden an einer Signaltransduktion beteiligt sind, welche zur Suppression des hypersensitiven Zelltods im Mesophyll nach *P. infestans*-Infektion führt. Dabei wäre denkbar, dass nur in den infizierten Epidermiszellen bzw. in wenigen umgebenden Mesophyllzellen der negative Effekt von EDR1 überlagert wird, so dass es zur Auslösung des Zelltods bzw. zur Limitierung des eindringenden Pathogens kommt. Alternativ dazu könnte es ebenso möglich sein, dass die EDR1-Funktion auf das Mesophyll beschränkt ist. Die Pathogen-induzierte Unterdrückung dieser Funktion ist jedoch nur in der Mutante *pen2* wirksam, da *P. infestans* in *pen2* in der Lage ist bis in das Mesophyll vorzudringen. In dem umgebenden nicht infizierten Gewebe würde die Pathogen-induzierte Überlagerung des EDR1-Effekts jedoch nicht erfolgen, was die EDR1-vermittelte Unterdrückung der HR zur Folge hätte. Eine solche Regulation könnte demnach ein für die Pflanze essentiellen Mechanismus darstellen, um die Ausbreitung der Pathogen-assoziierten HR im nicht infizierten Gewebe einzugrenzen.

In Untersuchungen der gegen ein breites Spektrum von Mehltäupilzen gerichteten *RPW8*-vermittelten Resistenz wurde gezeigt, dass EDR1 sowohl HR als auch Resistenz durch Limitierung

der *RPW8.1*- und *RPW8.2*-Expression negativ reguliert (Xiao *et al.*, 2003; 2005). Es wird angenommen, dass die nur an den Orten der Pathogenpenetration erfolgte starke *RPW8*-Transkriptakkumulation zu einer lokalen Aktivierung des hypersensitiven Zelltods führt, wobei EDR1 in dem umgebenden Gewebe durch Unterdrückung der *RPW8*-Transkriptakkumulation die HR-Ausprägung limitiert.

Neben der Funktion in der Pathogenresistenz ist ebenso eine Beteiligung von EDR1 in der Regulation der ET-induzierten Seneszenz und verschiedener Stress-induzierter Prozesse, wie Zelltod und Wachstumsstörung beschrieben worden (Tang *et al.*, 2005; Tang & Innes, 2002). Demnach korreliert die normale Funktion von EDR1 mit dem Schutz vor nachteilig wirkender Aktivierung Stress-induzierter pflanzlicher Reaktionen und Seneszenz.

Die Untersuchung der Nichtwirtsresistenz unterschiedlicher Signaltransduktionsmutanten deutet darauf hin, dass der Funktionsverlust einzelner Faktoren der SA-regulierten Abwehr sowie das SA-Signal selbst keinen Effekt auf die Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu haben scheinen. Erst durch funktionellen Verlust der PEN2-Ebene, d. h. der Penetrationsresistenz wurde für PAD4 und EDR1 eine Beteiligung an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* gezeigt, wobei ein kombinierter Verlust der Genfunktion von *PEN2* und *PAD4* bzw. *PEN2* und *EDR1* zu einer im Vergleich zu *pen2* nicht signifikant veränderten Entwicklung der Infektionsstrukturen des Oomyzeten führt.

### **3 *Arabidopsis thaliana*-Mutanten mit einem veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp nach *Phytophthora infestans*-Inokulation**

**Die *pen2*-Mutagenese führte zur Isolation unterschiedlicher putativer Mutanten mit einer im Vergleich zu *pen2* verstärkten HR nach Infektion mit *P. infestans*.**

Durch chemische Mutagenese sollten Mutationen im *pen2*-Genom induziert werden, welche zu einer im Vergleich zu *pen2* veränderten Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* führen. Da eine Mutation in *PEN2* bereits zu einem veränderten Phänotyp nach *P. infestans*-Infektion führt, konnte ein Spektrum von Phänotypen erwartet werden, welches von einer Suppression des *pen2*-abhängigen Phänotyps bis hin zur Suszeptibilität reicht. In der Primärcharakterisierung, d. h. in der Analyse des HR-Phänotyps der M2-Nachkommenschaft der remutagenisierten *pen2*-Population war bereits zu erkennen, dass sich wahrscheinlich keine suszeptiblen Linien unter den isolierten putativen Mutanten befanden. Durch die Überprüfung des Phänotyps in der M3-Nachkommenschaft wurde diese Beobachtung bestätigt. Es ist daher anzunehmen, dass die Einführung einer Sekundärmutation in den *pen2*-Hintergrund nicht hinreichend ist, um einen Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* zu bewirken. Diese Annahme würde mit der für die Nichtwirtsresistenz postulierten Stabilität übereinstimmen, welche darin begründet wird, dass

dieser Resistenzform wahrscheinlich unterschiedliche Faktoren bzw. mehrere unabhängige Ebenen der Abwehr zu Grunde liegen (Heath, 2000; Kamoun, 2001; Thordal-Christensen, 2003). Die Beständigkeit der Nichtwirtsresistenz kann auch darin begründet sein, dass die Resistenzvermittelnden Faktoren genetisch redundant in der Zelle vorliegen. Gleichzeitig könnte die genetische Redundanz dieser Komponenten die Ursache dafür sein, weshalb keine putativen Mutanten mit einem vollständigen Verlust der Nichtwirtsresistenz isoliert werden konnten. An dieser Stelle ist aber auch zu erwähnen, dass in einigen Nichtwirts-Pathosystemen demonstriert wurde, dass bereits der Verlust der Funktion zweier unabhängiger Faktoren den Verlust der Nichtwirtsresistenz bedingen kann (Yun *et al.*, 2003; Dittgen, 2005; Lipka *et al.*, 2005). Als eine weitere Möglichkeit ist ebenso nicht auszuschließen, dass eine Mutation in Genen, die essentiell für die Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* sind, zu Letalität in den entsprechenden Mutanten führt.

Der Phänotyp der putativen Suppressoren des *pen2*-abhängigen Phänotyps wurde in der M3-Nachkommenschaft nicht bestätigt. Anzunehmen ist, dass die in der M2-Generation beobachtete Unterdrückung des Nekrose- und Autofluoreszenz-Phänotyps wahrscheinlich eher durch eine niedrige Keimungsrate oder durch ungenügende Virulenz des verwendeten *P. infestans*-Isolats als durch eine Suppressor-Mutation verursacht wurde. In der Gruppe der putativen Mutanten, die eine Verstärkung des *pen2*-abhängigen Phänotyps zeigten (Klasse 1 und 2) wurde von 110 überprüften putativen Mutanten für 26 Linien aus 13 unabhängigen M1-Gruppen der beobachtete Phänotyp in der M3-Generation bestätigt. Als nicht unerheblichen Grund für die verhältnismäßig hohe Zahl von putativen Mutanten, deren Phänotyp nicht bestätigt wurde, ist die hohe biologische Variabilität des durch *P. infestans* induzierten Nekrose-Phänotyps anzunehmen. So wurde nach *P. infestans*-Inokulation mehrerer Individuen eines Genotyps unter identischen Bedingungen eine verhältnismäßig große Variabilität in der Ausprägung eines Phänotyps beobachtet. Ebenso sind experimentelle Schwankungen, die bei einer Tropfen-Inokulation einer großen Zahl von Pflanzen unvermeidbar sind, nicht auszuschließen.

### **Die untersuchten Sekundärmutationen führen zu einer Potenzierung der in *pen2* beobachteten Abwehrreaktionen sowie zu einer weiteren Erhöhung der Penetrations-Häufigkeit in den Mutanten 202 und 222 nach *P. infestans*-Infektion**

Die Untersuchung der im Rahmen dieser Arbeit isolierten putativen Mutanten zeigte, dass die Einführung von Sekundärmutationen in den *pen2*-Hintergrund eine weitere Verstärkung unterschiedlicher Abwehrreaktionen nach *P. infestans*-Infektion bewirkt. Es ist daher anzunehmen, dass die korrespondierenden Gene direkt oder indirekt in der negativen Regulation der pflanzlichen Pathogenabwehr involviert sind.

Faktoren, die im Zusammenhang mit der negativen Regulation pflanzlicher Abwehrreaktionen stehen, wie z. B. dem Pathogen-induzierten hypersensitiven Zelltod, sind bereits identifiziert

worden. Ein negativer Regulator des programmierten Zelltods (*programmed cell death*; PCD) in Pflanzen ist z. B. der putative Transkriptionsfaktor LSD1 (*LESIONS SIMULATING DISEASE1*; Jabs *et al.*, 1996). Genetische Studien demonstrierten, dass Mutationen in *PAD4* und *EDS1* in der Lage sind, den *lsd1*-Phänotyp zu supprimieren, was darauf hindeutet, dass sich LSD1 hierarchisch unter *PAD4* und *EDS1* befindet (Lorrain *et al.*, 2003). Desweiteren wird angenommen, dass LSD1 ein Schlüssel-Faktor in der SA-abhängigen Signal-Amplifizierung ist, welche zur Auslösung der HR führt (Aviv *et al.*, 2002). Die Identifizierung des LSD1-Homologen LOL1 (*LSD1-ONE-LIKE1*) lieferte den Hinweis, dass möglicherweise über einen antagonistischen und Schwellenwert-abhängigen Mechanismus beider Komponenten eine Regulation der Zelltod-Exekution ermöglicht wird (Epple *et al.*, 2003; Lam, 2004). Obwohl weitere Regulatoren des pflanzlichen PCDs identifiziert worden sind, wie z. B. Caspase-ähnliche Proteasen oder BAX (*BCL2-ASSOCIATED X PROTEIN*)-ähnliche Proteine, ist die Aufklärung der PCD-Signaltransduktion in Pflanzen im Vergleich zu tierischen Systemen jedoch noch sehr lückenhaft (Lam, 2004).

Ein weiterer negativer Regulator in der pflanzlichen Pathogenabwehr stellt das bereits erwähnte EDR1 dar (Frye & Innes, 1998; Frye *et al.*, 2001). Die Beteiligung von EDR1 an der Ausprägung der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* wurde in Studien der Doppelmutante *pen2 edr1-1* demonstriert (Abb. C-15). Durch erste Kartierungsexperimente wurde eine Mutation in *EDR1* als Ursache für die verstärkte HR in der Mutante 222 bereits ausgeschlossen. Ob eine mögliche Mutation in *EDR1* an der Ausprägung des veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyps in den verbleibenden putativen Mutanten beteiligt ist, muss jedoch noch untersucht werden.

Aufgrund der Tatsache, dass die Penetrations-Häufigkeit nicht in allen isolierten Mutanten zweifelsfrei bestimmt werden konnte, ist nicht auszuschliessen, dass die durch die Sekundärmutationen 190, 242, 266, 272 und 303 induzierte stärkere HR die Folge einer potenzierten Abwehrreaktion von nicht penetrierten Zellen ist. Es ist daher möglich, dass trotz der beobachteten stärkeren HR die Penetrations-Häufigkeit in diesen Linien mit der in *pen2* vergleichbar ist. Obwohl die Penetrations-Häufigkeit von *P. infestans* in den Mutanten 202 und 222 im gegenüber der in *pen2* erhöht ist, wurde, wie auch in den übrigen untersuchten Mutanten, im Vergleich zu *pen2* keine signifikant veränderte zelluläre Differenzierung des Oomyzeten oder ein weiteres Vordringen der *P. infestans*-Strukturen beobachtet.

Durch Kreuzungsanalysen wurde gezeigt, dass die Kombination der Mutationen 202 und 222 keine im Vergleich zur Mutante 202 oder 222 weitere Verstärkung des HR-Phänotyps zur Folge hat (siehe Tab. C-8). Daraus kann formal abgeleitet werden, dass die Mutationen 202 und 222 Auswirkungen auf den gleichen zur Verstärkung der HR nach *P. infestans*-Infektion führenden Mechanismus haben.

Die Faktoren 202 und 222 stellen daher, neben *PEN2*, weitere Elemente der Penetrationsresistenz gegen *P. infestans* dar, welche jedoch nicht, wie auch die übrigen Sekundärmutationen, zur Überwindung der Nichtwirtsresistenz führen. Es ist daher anzunehmen, dass noch weitere

Faktoren bzw. Ebenen in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt sind und zu deren Stabilität beitragen. In allen untersuchten mutanten Linien ist daher nicht von einem Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* auszugehen. Mögliche Gründe hierfür sind bereits diskutiert worden (siehe 3; D Diskussion).

Da der vollständige Verlust der Nichtwirtsresistenz gegen unterschiedliche biotrophe Mehltaupilze, deren natürliche Wirtspflanzen monokotyle Gräser sind, in *Arabidopsis* bereits gezeigt worden ist, kann angenommen werden, dass die phylogenetische Distanz der Nichtwirtspflanze gegenüber der Wirtspflanze wahrscheinlich kein Kriterium für die Stabilität der Nichtwirtsresistenz darstellt.

Die Segregationsanalyse unterschiedlicher SSLP-Marker in der Kartierungspopulation der Mutante 222 deutet darauf hin, dass die Mutation 222 auf dem Chromosom 3 lokalisiert ist (Tab. C-6). Die dabei ermittelte Kopplung von SSLP-Markern des Chromosoms 3, insbesondere die des SSLP-Markers CIW4 stellt einen Hinweis dar, dass die Sekundärmutation 222 möglicherweise auf dem unteren Arm des Chromosoms 3 lokalisiert ist (Tab. C-7). Bestätigt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass die ermittelte Rekombinationsfrequenz in dieser Region bezogen auf die Sekundärmutation 222 sinkt, wenn die in einem zweiten Experiment nicht eindeutig in ihrem HR-Phänotyp bestätigten Linien nicht berücksichtigt werden. Desweiteren deutet die genetische Konstitution in den Linien 13, 42 und 105 nicht auf eine Lokalisation der Sekundärmutation 222 in der Region des SSLP-Markers CIW4 hin, was jedoch auch darauf zurückzuführen sein könnte, dass die Sekundärmutation 222 in diesen Linien nicht homozygot vorliegt. Obwohl der HR-Phänotyp dieser Linien in einem Experiment bestätigt wurde, ist anzunehmen, dass die gesicherte Identifizierung von für die Mutation 222 homozygoter Linien nur nach wiederholter Bestätigung des HR-Phänotyps in der F3-Nachkommenschaft möglich ist. Es ist daher davon auszugehen, dass die in der Mutante 222 beobachtete und im Vergleich zu anderen isolierten Mutanten verhältnismäßig schwach ausgeprägte Verstärkung des HR-Phänotyps nach *P. infestans*-Infektion Fehlinterpretationen des HR-Phänotyps begünstigt. Da der zur Erstellung der Kartierungspopulation verwendete *A. thaliana*-Ökotyp Ler eine schwache HR nach *P. infestans*-Infektion zeigt (siehe 2.1; C Ergebnisse), kann angenommen werden, dass der heterogene genetische Hintergrund aus sowohl Col-0 als auch Ler-Sequenzbereichen in den zu untersuchenden Linien eine Beurteilung des HR-Phänotyps zusätzlich erschwert.

Desweiteren ist auffallend, dass die Kopplung der SSLP-Marker SORBO34 bzw. F24M12TGF und der Sekundärmutation 222 verhältnismäßig schwach ist bezogen auf die relativ geringe Entfernung zum SSLP-Marker CIW4 (siehe Tab. C-7). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Region auf Chromosom 3 eine im Vergleich zu anderen Regionen des *A. thaliana*-Genoms erhöhte Häufigkeit für Rekombinationsereignisse zeigt. In der Literatur ist jedoch eine erhöhte Rekombinationsfrequenz dieser Region bisher nicht beschrieben worden, so dass davon



ausgegangen werden muss, dass es sich um eine spezifische Beobachtung in der untersuchten Kartierungspopulation handelt.

### **Die Sekundärmutationen 202 und 242 führen zu einer im Vergleich zu *pen2* veränderten *PR*-Genexpression nach *P. infestans*-Infektion**

Die Analyse der *PR1*- und *PDF1.2*-Expression in den Mutanten 272 und 222 zeigte, dass die Genexpression nach *P. infestans*-Infektion weitestgehend mit der in *pen2* beobachteten Transkriptakkumulation vergleichbar ist. Die für diese putativen Mutanten im Vergleich zu *pen2* gezeigten verstärkten Abwehrreaktionen korrelieren demnach nicht mit einer entsprechenden verstärkten Induzierung der *PR*-Genexpression. Es kann daher angenommen werden, dass die Mechanismen, welche zur Ausprägung der HR und zur Aktivierung der *PR*-Genexpression nach *P. infestans*-Infektion führen, teilweise überlappende Funktionen haben, aber scheinbar auch durch spezifische Komponenten unabhängig voneinander reguliert werden können. Ebenso ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine mögliche verstärkte *PR*-Gen-Transkriptakkumulation in den putativen Mutanten durch die starke Mazeration des infizierten Blattgewebes nicht nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu wurde für die mutante Linie 202 gezeigt, dass die Sekundärmutation zu einer konstitutiven Expression von *PDF1.2* nach *P. infestans*-Infektion führt. Die erhöhte Penetrationshäufigkeit der Mutante 202 scheint daher mit der Aktivierung von JA/ET-regulierten Abwehrreaktionen zu korrelieren. In Übereinstimmung damit wurde bereits in *pen2* eine früh nach *P. infestans*-Infektion induzierte *PDF1.2*-Expression beobachtet.

Ein kausaler Zusammenhang zwischen der Induzierung JA/ET-abhängiger Abwehrmechanismen und erhöhter Suszeptibilität erscheint jedoch unwahrscheinlich. So wurde nach *P. infestans*-Infektion unterschiedlicher JA/ET-Signaltransduktionsmutanten ein Wildtyp-ähnlicher Phänotyp beobachtet (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), was darauf hindeutet, dass für die Ausprägung der Penetrationsresistenz die JA/ET-regulierte Abwehr von untergeordneter Bedeutung ist. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass für die Resistenzausprägung im Pathosystem *A. thaliana* – *P. infestans* der Verlust von Komponenten der JA/ET-vermittelten Signaltransduktionskaskade nicht limitierend ist. Es bleibt jedoch durch geeignete genetische Analysen zu prüfen, ob für die erhöhte Anfälligkeit der Mutante 202 eine funktionelle JA- bzw. ET-regulierte Abwehr notwendig ist.

Die für die Mutante 202 gezeigte konstitutive *PDF1.2*-Expression (Abb. C-26) sowie die beobachteten Wachstumsstörungen (Daten nicht gezeigt) liefern darüber hinaus Hinweise auf einen möglichen Allelismus zu *cev1-1* (*constitutive expression of VSP1*; Ellis & Turner, 2001). So wurde in der Mutante *cev1-1* eine Korrelation von konstitutiver Expression JA/ET-abhängiger Abwehrgene und von Wachstumsstörungen gezeigt. In weiteren Fällen ist ebenso ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung von Abwehrreaktionen und der Inhibierung von Wachstum demonstriert worden (Feys *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1995a,b; Zimmerli *et al.*, 2004).

Die diesen Mechanismen zu Grunde liegenden Faktoren sind größtenteils unbekannt, jedoch wird davon ausgegangen, dass die Aktivierung von Abwehr-assoziierten Genen mit einer Suppression von Genen des Photosynthese-Apparats und des generellen Metabolismus korreliert (Logemann *et al.*, 1995; Ehness *et al.*, 1997).

Es wird angenommen, dass möglicherweise Störungen der Zellwand-Integrität in *cev1-1* zu einer aktivierten JA/ET-abhängigen Stress- und Abwehrreaktion führen (Ellis *et al.*, 2002). Erste Experimente zur Kartierung des Mutanten-Lokus in 202 weisen jedoch nicht auf einen Allelismus zu *cev1* hin.

Die Isolierung weiterer *Arabidopsis*-Mutanten wie *cet1-1* und *cet3-1* (*c*o*n*s*t*i*t*u*t*i*v*e *e*x*p*r*e*s*s*io*n* *o**f* *t**h**e* *t**h**i**o**n**i**n* *g**e**n**e*), *cex1-1* (*c*o*n*s*t*i*t*u*t*i*v*e *e*x*p*r*e*s*s*io*n* *o**f* *J**A*-*r**e**g**u**l**a**t**e**d* *g**e**n**e**s**1*) sowie *joe1-1* (*j**a**s**m**o**n**a**t**e* *o**v**e**r**e**x**p**r**e**s**s**i**o**n**g**1*) deutet ebenso auf eine durch erhöhte Akkumulation von JA oder OPDA (12-*o**x**o*-*p**h**y**t**o**d**i**e**n**o**i**c*-*a**c**i**d*) verursachte konstitutive Expression JA-abhängiger Gene hin und liefert damit Hinweise für eine mögliche Identität negativer Regulatoren der JA-vermittelten Abwehr (Hilpert *et al.*, 2001; Xu *et al.*, 2001; Jensen *et al.*, 2002).

Die Untersuchung der Genexpression der putativen Mutante 242 zeigt eine konstitutive Expression von *PR1* (Abb. C-26). Interessanterweise ist die in den Wasser-behandelten Proben beobachtete konstitutive *PR1*-Transkriptakkumulation zwischen 12 h und 72 h nicht mehr nachzuweisen. Es scheint jedoch, dass die Pathogen-induzierte *PR1*-Expression der putativen Mutante 242 in diesem Zeitraum mit der in *pen2* vergleichbar ist. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, dass der während der Pathogen-Inkubation experimentell bedingte Wasserstress nach 12 h zu einer Unterdrückung der konstitutiven *PR1*-Expression in der putativen Mutante 242 führt, welcher jedoch möglicherweise keinen Effekt auf die Pathogen-induzierte *PR1*-Transkriptakkumulation hat. Hinweise auf eine von der Substratbewässerung bzw. Luftfeuchtigkeit abhängige konstitutive *PR*-Genexpression lieferte bereits die Mutante *cpn1-1* (*c*o*p*ine*1*; Jambunathan *et al.*, 2001). Es wurde gezeigt, dass eine Mutation in *CPN1* in Abhängigkeit von der Wasserverfügbarkeit der Mutante spontane Läsionen, eine beschleunigte HR sowie eine erhöhte Pathogenresistenz zur Folge hat. Die Isolierung von *CPN1*, welches für ein Kalzium-abhängiges Phospholipid-bindendes Protein kodiert, deutet daher auf eine mögliche Koregulation der Aktivierung von Abwehrreaktionen und der Adaption an unterschiedliche abiotische Stimuli hin (Jambunathan & McNellis, 2003; Liu *et al.*, 2005).

Desweiteren scheint die konstitutive *PR1*-Expression mit einem spontanen HR-Phänotyp in der putativen Mutante 242 zu korrelieren. In Übereinstimmung damit steht der für eine Reihe von *Arabidopsis*-Mutanten, den sogenannten LM (*l**e**s**i**o**n* *m**i**m**i**c*)-Mutanten beschriebene Zusammenhang der konstitutiven Expression von Abwehrmechanismen und der Ausprägung spontaner Läsionen (Lorrain *et al.*, 2003). Außerdem wurde für eine große Zahl der LM-Mutanten eine erhöhte Pathogenresistenz gezeigt. Darüber hinaus demonstrierten genetische Analysen, dass für einige dieser LM-Mutanten die Akkumulation von SA notwendig für die Ausprägung der

spontanen Läsionen sowie der erhöhten Resistenz gegen virulente Pathogene ist. In anderen LM-Mutanten hingegen scheint eine Unterdrückung der SA-Akkumulation zu einer Beeinträchtigung der *PR*-Genexpression sowie der Pathogenresistenz, jedoch nicht zur Suppression der spontanen Läsionen zu führen (Hunt *et al.*, 1997; Rate & Greenberg, 2001).

Eine Untersuchung der SA-Abhängigkeit der konstitutiven *PR1*-Genexpression und der verstärkten HR nach *P. infestans*-Infektion in der putativen Mutante 242 würde daher weiteren Aufschluss über einen möglichen Zusammenhang von SA-Akkumulation und der in dieser Linie beobachteten Phänotypen geben.

Hinsichtlich der HR-Ausprägung nach Pathogenbefall sind unterschiedliche Effekte in LM-Mutanten beschrieben worden. Es wurde gezeigt, dass LM-Mutanten wie z. B. *Isd2 - Isd5*, *dll1* (*disease-like lesions1*) und *acd5* (*accelerated cell death5*) nach Infektion mit avirulenten Pathogenen mit einer Wildtyp-ähnlichen Ausprägung von HR und Pathogenresistenz reagieren (Lorrain *et al.*, 2003).

Für die LM-Mutanten *Isd1*, *acd1* und *acd2* wurde hingegen das Phänomen des *runaway cell death* (RCD), d. h. die durch endogene oder exogene Faktoren ausgelöste unkontrollierte HR sowie erhöhte Pathogenresistenz gezeigt (Dietrich *et al.*, 1994; Greenberg *et al.*, 1994). Desweiteren scheint in einigen LM-Mutanten im Gegensatz zum Wildtyp bereits die Inokulation mit niedrigeren Pathogendichten eine HR auszulösen (Greenberg *et al.*, 1994).

In welchem Ausmaß der spontane HR-Phänotyp bzw. die konstitutive *PR*-Genexpression in der putativen Mutante 242 eine verstärkte Anfälligkeit gegen *P. infestans* bewirkt, d. h. ob im Vergleich zu *pen2* eine erhöhte Penetrations-Häufigkeit auftritt, konnte auf Grund des starken Mesophyll-Zelltods experimentell nicht ermittelt werden. Alternativ dazu könnte durch *real time*-PCR ein potentiell verstärktes *P. infestans*-Wachstum, welches möglicherweise lichtmikroskopisch nicht erkennbar ist, durch Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse nachgewiesen werden.

### **Die Kombination von *pen2* und der Sekundärmutation 242 oder 272 führt zum Verlust der Resistenz gegen *Alternaria brassicicola***

Um eine Beteiligung der für den veränderten Nichtwirtsresistenz-Phänotyp in den putativen Mutanten verantwortlichen Faktoren an der Ausprägung der Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene zu untersuchen, erfolgte die Infektion mit *Alternaria brassicicola* und *Botrytis cinerea*.

Die *A. brassicicola*-Infektion von *gl1* und *pen2* verlief ohne sichtbare Symptome, was zu der Annahme führt, dass die Ausprägung der Resistenz gegen *A. brassicicola* unabhängig von *PEN2* ist (Abb. C-28). Die Inokulation der putativen Mutanten 242 und 272 zeigte jedoch, dass die Sekundärmutationen 242 und 272 zu einer Anfälligkeit für *A. brassicicola* führen (Abb. C-28). Da *A. brassicicola* in der Lage ist, in beiden mutanten Linien erfolgreich zu sporulieren, ist davon auszugehen, dass die Resistenz gegen dieses nekrotrophe Pathogen durch Kombination von *pen2* mit der Sekundärmutation 242 oder 272 überwunden werden kann. An dieser Stelle ist zu

erwähnen, dass in der Literatur hinsichtlich der Resistenzausprägung im Pathosystem *A. thaliana* – *A. brassicicola* unterschiedliche Beobachtungen beschrieben worden sind (Van Wees *et al.*, 2003; Kagan & Hammerschmidt, 2002; Glazebrook, 2005). Als Grund dafür ist beispielsweise denkbar, dass die Inokulation hoher Pathogendichten oder eines virulenteren *A. brassicicola*-Isolats in einigen *Arabidopsis*-Ökotypen Symptome hervorrufen kann und in anderen Ökotypen nicht. Die Einstufung dieses Pathosystems in eines der Konzepte der pflanzlichen Pathogenresistenz erscheint daher schwierig.

Die in den putativen Mutanten 242 und 272 beeinträchtigte Resistenz gegen die phylogenetisch entfernten Pathogene *P. infestans* und *A. brassicicola* deutet darauf hin, dass die Faktoren 242 und 272 möglicherweise eine Funktion in der Ausprägung der Resistenz gegen ein breiteres Spektrum an Pathogenen haben könnten. Unterstützt wird diese Annahme, durch die zumindest in der putativen Mutante 272 ebenfalls beobachtete erhöhte Anfälligkeit für *B. cinerea*.

Für die Sekundärmutationen 190, 202 und 303 wurde ebenso ein Effekt auf die Resistenz gegen *A. brassicicola* gezeigt, jedoch scheint dieser im Vergleich zu den Sekundärmutationen 242 und 272 von geringerem Ausmaß zu sein (Abb. C-28).

Die Untersuchung der Interaktion *A. thaliana* – *B. cinerea* in den putativen Mutanten demonstriert, dass die konstitutive Expression von *PDF1.2* mit einer im Vergleich zu *pen2* deutlich schwächeren Induzierung der HR nach *B. cinerea*-Infektion in der Mutante 202 korreliert (Abb. C-26; Abb. C-29). In Übereinstimmung damit steht die Annahme, dass die JA/ET-abhängige Signaltransduktion, welche z. B. die Aktivierung der *PDF1.2*-Expression zur Folge hat, für eine effiziente Abwehr nekrotropher Pathogene notwendig ist (Thomma *et al.*, 1998). Die aufgrund der konstitutiven *PDF1.2*-Expression in der Mutante 202 bereits aktivierte Abwehr könnte daher auch eine Ursache für die nach *A. brassicicola*-Infektion dieser Mutante im Gegensatz zu *pen2* beobachteten schwachen HR sein. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die schwachen nekrotische Reaktion der putativen Mutante 202 nach *A. brassicicola*-Infektion die Folge von Pathogenanfälligkeit sind, was darauf hindeuten würde, dass die konstitutive *PDF1.2*-Expression einerseits mit einer reduzierten Resistenz gegen *A. brassicicola* und andererseits mit einer erhöhten Resistenz gegen *B. cinerea* korreliert. In Analogie dazu ist beschrieben worden, dass die Mutante *pad3-1* anfällig für *A. brassicicola* jedoch nicht für *B. cinerea* ist, was einen Hinweis dafür liefert, dass die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene neben generellen auch durch Pathogenspezifische Abwehrmechanismen beeinflusst wird (Thomma *et al.*, 1999b).

Da in der Literatur bereits unterschiedliche Gene beschrieben worden sind, wie z. B. *PAD2* und *CO11*, die einen Einfluss auf die Resistenz gegen nekrotrophe Pathogene wie *A. brassicicola* haben, kann vermutet werden, dass diese Faktoren potentielle Kandidaten für die Sekundärmutation in den putativen Mutanten mit erhöhter Anfälligkeit nach *A. brassicicola*-Infektion sein könnten. Es wurde gezeigt, dass eine Mutation in unterschiedlichen *PAD*-Loci neben der verringerten oder fehlenden Akkumulation des *Arabidopsis*-Phytoalexins Camalexin auch eine

Beeinträchtigung der Resistenz gegen *A. brassicicola* aber auch gegen biotrophe Pathogene zur Folge hat (Glazebrook *et al.*, 1997a; Glazebrook & Ausubel, 1994; Van Wees *et al.*, 2003). Studien von Kagan & Hammerschmidt (2002) verdeutlichten jedoch, dass das Indol-Derivat Camalexin nicht der Schlüssel-Faktor in der Resistenz gegen *A. brassicicola* zu sein scheint. So wurde gezeigt, dass sowohl resistente als auch susceptible *Arabidopsis*-Ökotypen hinreichende Camalexin-Mengen produzieren, um das *A. brassicicola*-Wachstum *in vitro* effizient zu hemmen. Aufgrund der Tatsache, dass die Mutante *pad2-1* neben einer erhöhten Anfälligkeit für *A. brassicicola* auch eine verstärkte HR nach Infektion mit *P. infestans* zeigt (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Sekundärmutationen 242, 272 oder 303 möglicherweise in *PAD2* lokalisiert ist. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Mutante *pad2-1* (Ferrari *et al.*, 2003) wie auch die putativen Mutanten 272 und 303 eine erhöhte Anfälligkeit für *B. cinerea* zeigen. Diese Beobachtung lässt es auf der anderen Seite unwahrscheinlich erscheinen, dass es sich bei der Sekundärmutation 242 um *PAD2* handelt, da die Untersuchung der Resistenz der Mutante 242 nach *B. cinerea*-Infektion nicht auf eine Anfälligkeit hindeutete. Interessanterweise wurde ebenso demonstriert, dass *PAD2* eine Funktion in der Ausprägung der Resistenz von *Arabidopsis* gegen den Oomyzeten *Phytophthora brassicae* hat (Roetschi *et al.*, 2001). Der gegenwärtig noch unbekannte *PAD2*-abhängige Resistenzmechanismus gegen *P. brassicae* scheint jedoch unabhängig von SA-, JA- und ET-regulierten Abwehrreaktionen zu sein. Da *PAD2* wahrscheinlich auch in der Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* beteiligt ist (L. Westphal, IPB Halle; persönliche Mitteilung), könnte angenommen werden, dass *PAD2* möglicherweise eine Funktion in der basalen Abwehr von Oomyzeten-Pathogenen hat.

Ein potentieller Kandidat für die Sekundärmutation 272 bzw. 303 stellt *COI1* dar. Es wurde demonstriert, dass die Mutation *coi1-1* zu einer erhöhten Anfälligkeit sowohl für *A. brassicicola* als auch für *B. cinerea* führt (Penninckx *et al.* 1996; Thomma *et al.* 1998). Jedoch ist zu erwähnen, dass die putativen Mutanten 272 und 303 keine Störung der Fertilität zeigen, die Mutante *coi1-1* hingegen ist männlich steril.

Desweiteren wurde gezeigt, dass Mutationen in *BOS* (*BOTRYTIS-SUSCEPTIBLE*)-Genen sowie eine Mutation in *ESA1* (*ENHANCED SUSCEPTIBILITY to ALTERNARIA*) ebenfalls zu einer beeinträchtigten Resistenz gegen *A. brassicicola* und *B. cinerea* führen und somit ebenso für die Identität der Sekundärmutationen in Frage kommen könnten (Mengiste *et al.*, 2003 Veronese *et al.*, 2004). Interessanterweise führt die Mutation in *BOS1* neben der erhöhten Anfälligkeit für *A. brassicicola* und *B. cinerea* auch zu verstärkten Krankheitssymptomen nach Infektion mit dem biotrophen Oomyzeten *Hyaloperonospora parasitica*. Es ist demnach davon auszugehen, dass die mit den Sekundärmutationen korrespondierenden Gene für Faktoren kodieren, welche zusätzlich zur Nichtwirtsresistenz gegen *P. infestans* auch in der Resistenz gegen die nekrotrophen Pathogene *A. brassicicola* und/oder *B. cinerea* involviert sind.