

CHARAKTERISIERUNG DES PAMP-INDUZIERBAREN TRANSPORTERS *ABCG1*

AUS *SOLANUM TUBEROSUM*

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biologin Ramona Landgraf

geboren am 02.11.1982 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. Dierk Scheel (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
2. Prof. Dr. Holger Deising (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)
3. Dr. Christiane Nawrath (Université de Lausanne; Schweiz)

Datum der Verteidigung: 13.09.2016

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Das Periderm (echtes Korkgewebe) | 1 |
| 1.2 | Suberin..... | 3 |
| 1.2.1 | Suberin Biosynthese | 6 |
| 1.3 | ABC-Transporter | 9 |
| 1.4 | Die Pflanzen-Pathogen-Interaktion von <i>Solanum tuberosum</i> und <i>Phytophthora infestans</i> | 12 |
| 1.5 | Die pflanzliche Immunantwort | 15 |
| 1.6 | Die Rolle des PAMPs Pep-13 in der Abwehr von <i>Solanum tuberosum</i> und Identifizierung des Kandidatengens <i>ABCG1</i> | 22 |
| 1.7 | Zielstellung..... | 24 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN..... | 25 |
| 2.1 | Material | 25 |
| 2.1.1 | Chemikalien, Enzyme und Oligonukleotide | 25 |
| 2.1.2 | Medien, Puffer und Lösungen | 25 |
| 2.1.3 | Klonierungsvektoren | 27 |
| 2.1.4 | Bakterienstämme | 27 |
| 2.1.5 | Pflanzen | 27 |
| 2.1.6 | <i>Phytophthora infestans</i> | 28 |
| 2.1.7 | Pep-13..... | 28 |
| 2.2 | Methoden..... | 28 |
| 2.2.1 | Kultivierung von Organismen | 28 |
| 2.2.1.1 | Bakterienkultivierung | 28 |
| 2.2.1.2 | Pflanzenkultivierung..... | 28 |
| 2.2.1.3 | <i>Phytophthora infestans</i> -Kultivierung | 29 |
| 2.2.2 | Experimente mit Pflanzenbehandlungen | 29 |
| 2.2.2.1 | Blattverwundungsexperimente | 29 |
| 2.2.2.2 | Infektionsexperimente mit <i>Phytophthora infestans</i> | 30 |
| 2.2.2.3 | Experimente mit PAMP-Behandlung..... | 30 |
| 2.2.3 | Molekularbiologische Methoden | 31 |
| 2.2.3.1 | Isolation von Nukleinsäuren | 31 |
| 2.2.3.2 | Reverse Transkription (RT)..... | 32 |
| 2.2.3.3 | Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR) | 33 |
| 2.2.3.4 | Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren und deren Aufreinigung | 34 |
| 2.2.3.5 | Klonierungen | 34 |
| 2.2.3.6 | Transformation von Bakterien und Pflanzen | 35 |
| 2.2.3.7 | Restriktionsspaltung | 36 |
| 2.2.3.8 | DNA-Sequenzierung | 36 |
| 2.2.3.9 | Southern- und Northern-Blot-Analysen | 37 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2.3.10 | Quantitative PCR (qPCR)..... | 38 |
| 2.2.4 | Mikroskopische Analysen..... | 38 |
| 2.2.4.1 | Fixierung, Einbettung und Schneiden von Pflanzenmaterial | 38 |
| 2.2.4.2 | Übersichtsfärbung mit Toluidinblau | 39 |
| 2.2.4.3 | Suberinfärbung mit Fluorol-Yellow-088 | 39 |
| 2.2.4.4 | Suberinfärbung mit Sudanrot (Sudan III) | 39 |
| 2.2.4.5 | Licht- und Fluoreszenzmikroskopie | 40 |
| 2.2.5 | Quantifizierung der Läsionsintensität und der Suberinfärbung | 41 |
| 2.2.6 | Chemische Analyse von Kartoffelperiderm..... | 41 |
| 2.2.6.1 | Extraktion und Analyse semipolarer Verbindungen | 42 |
| 2.2.6.2 | Extraktion und Analyse apolarer Verbindungen..... | 43 |
| 2.2.6.3 | Analyse von verdautem depolymerisiertem Periderm | 44 |
| 2.2.7 | Statistische Auswertung und bioinformatische Analysen..... | 45 |
| 3 | ERGEBNISSE | 46 |
| 3.1 | Struktur von ABCG1 aus <i>Solanum tuberosum</i> und Phylogenie zu <i>Arabidopsis thaliana</i> ABCG Proteinen..... | 46 |
| 3.2 | Charakterisierung von ABCG1 in Wildtyp-Kartoffelpflanzen..... | 48 |
| 3.2.1 | ABCG1-Expression nach Pep-13-Infiltration..... | 48 |
| 3.2.2 | ABCG1-Expression nach <i>Phytophthora</i> -Infektion..... | 49 |
| 3.2.3 | ABCG1-Expression nach Blattverwundung..... | 50 |
| 3.2.4 | ABCG1-Expression in verschiedenen Geweben | 51 |
| 3.2.5 | Subzelluläre Lokalisation des ABCG1-Proteins..... | 52 |
| 3.3 | Funktionelle Analyse | 53 |
| 3.3.1 | Charakterisierung von ABCG-RNAi-Kartoffelpflanzen | 53 |
| 3.3.1.1 | RNAi-vermittelte Suppression der ABCG1-Expression in Kartoffelpflanzen | 54 |
| 3.3.1.2 | Phänotyp der ABCG-RNAi-Pflanzen..... | 56 |
| 3.3.1.3 | Wasserverlust von ABCG-RNAi-Knollen | 59 |
| 3.3.1.4 | Visualisierung der Suberineinlagerung in den Zellwänden des ABCG-RNAi-Knollenperiderms und der Wurzelexodermis | 61 |
| 3.3.1.5 | Suberinzusammensetzung im Knollenperiderm von ABCG-RNAi-Pflanzen | 64 |
| 3.3.1.6 | Apolare Verbindungen im Knollenperiderm von ABCG-RNAi-Pflanzen | 66 |
| 3.3.1.7 | Semipolare Verbindungen im Knollenperiderm von ABCG-RNAi-Pflanzen..... | 70 |
| 3.3.2 | Charakterisierung von ABCG1-überexprimierenden Kartoffelpflanzen | 72 |
| 3.3.2.1 | Wasserverlust und Fluorol-Yellow-Färbung bei ABCG1-Überexpressionspflanzen | 73 |
| 3.3.2.2 | Suberinzusammensetzung im Knollenperiderm von ABCG1-Überexpressionspflanzen..... | 76 |
| 3.3.2.3 | Apolare Verbindungen im Knollenperiderm von ABCG1-Überexpressionspflanzen..... | 78 |
| 3.4 | Die Rolle von ABCG1 in der basalen Abwehr von <i>Phytophthora infestans</i> | 80 |
| 3.4.1 | Die Auswirkung der ABCG1-Suppression auf die basale Abwehr von <i>Solanum tuberosum</i> gegen <i>Phytophthora infestans</i> | 80 |
| 3.4.2 | Einfluss der ABCG1-Überexpression auf die Suberineinlagerung und die basale Abwehr in Blättern von <i>Solanum tuberosum</i> | 86 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4 | DISKUSSION..... | 91 |
| 4.1 | ABCG1 bildet eine phylogenetische Gruppe mit anderen ABC-Halbtransportern mit Funktion in der Suberinisierung..... | 91 |
| 4.2 | Mögliche Funktion von <i>ABCG1</i> in der Suberinbiosynthese..... | 93 |
| 4.3 | Der Einfluss einer reduzierten <i>ABCG1</i> -Genexpression auf die Morphologie der unterirdischen Organe und die Barriereigenschaften des Kartoffelknollenperiderms von <i>Solanum tuberosum</i> | 99 |
| 4.4 | Mögliche Bedeutung des <i>ABCG</i> -Halbtransporters und von Suberin in der Abwehr von <i>Solanum tuberosum</i> gegen <i>Phytophthora infestans</i> | 101 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 107 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 110 |
| 7 | ANHANG | 131 |
| 7.1 | Übersicht der verwendeten Primer | 131 |
| 7.2 | Übersicht der verwendeten Sonden für die qPCR-Analysen | 131 |
| 7.3 | Übersicht der verwendeten Restriktionsenzyme..... | 132 |
| 7.4 | Akzessionsnummern für die Stammbaumanalyse | 132 |
| 7.5 | Nukleotidsequenz von <i>ABCG1</i> | 132 |
| 7.6 | Nukleotidsequenz des <i>ABCG1</i> -RNAi-Fragments (Altmann 2009) | 133 |
| 7.7 | Homologie der Nukleotidsequenz des <i>ABCG1</i> -RNAi-Fragments zu <i>ABCG20</i> | 134 |
| 7.8 | Analytische Daten der mittels GC/EI-QMS identifizierten Monomere nach Trimethylsilylierung ... | 136 |
| 7.9 | Analytische Daten der mittels UPLC/ESI(-)-QTOFMS identifizierten Monomere | 138 |
| 7.10 | Relative Quantifizierung der mittels UPLC/ESI(-)-QTOFMS identifizierten apolaren Monomere... | 143 |
| 7.11 | Relative Quantifizierung der mittels UPLC/ESI(-)-QTOFMS identifizierten semipolaren Monomere im Knollenperiderm der 35S- <i>ABCG1</i> -Linien..... | 148 |
| 7.12 | Molekulare Strukturen möglicher Ferulasäurekonjugate..... | 149 |
| 7.13 | Knollenphänotyp in Gewebekultur..... | 149 |
| 7.14 | Blattinfektion von <i>ABCG</i> -RNAi-Linien im Vergleich zu den Kontrollpflanzen..... | 150 |
| 7.15 | Suberinfärbung Pep-13-infiltrierter Blätter von Kontroll- und 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen..... | 152 |
| 7.16 | <i>Phytophthora infestans</i> -Biomassebestimmung in 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen | 156 |
| | DANKSAGUNG..... | i |
| | EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG..... | iii |
| | LEBENS LAUF | iv |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|--------------------------------|--|
| aa | Aminosäure(n) |
| ABA | engl. <i>abscisic acid</i> ; Abscisinsäure |
| ABC | engl. <i>ATP-binding cassette</i> |
| AOC | Allenoxidcyclase |
| Avr | Avirulenz |
| BLAST | engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| bp | Basenpaare |
| C | Cortexzellen |
| CC-NB-LRR | engl. <i>coiled coiled-nucleotide binding-leucine rich repeat</i> |
| cDNA | engl. <i>copy DNA</i> |
| CFP | cyan fluoreszierendes Protein |
| Co | Cortex |
| COI1 | engl. <i>coronatine insensitive</i> , an JA-Perzeption beteiligtes F-BOX-Protein |
| Col | Columbia |
| Ct | engl. <i>threshold cycle</i> |
| d | Tage |
| DAMP | engl. <i>damage associated molecular pattern</i> |
| DNA | engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| dNTP | Desoxy-Nukleosidtriphosphat |
| dph | engl. <i>days post harvesting</i> |
| dpi | engl. <i>days post infection</i> |
| EFR | EF-Tu-Rezeptor |
| EI | Elektronenionisierung |
| En | Endodermis |
| engl. | Englisch |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| ESI | Electrospray Ionisierung |
| EST | engl. <i>expressed sequence tag</i> |
| ET | Ethylen |
| et al. | lat. <i>et alteri</i> |
| ETI | engl. <i>effector-triggered immunity</i> |
| ETS | engl. <i>effector-triggered susceptibility</i> |
| EV | Vektorkontrolle |
| eV | Elektronenvolt |
| Ex | Exodermis |
| Exp. | Experiment |
| FAE | Fettsäure-Elongations-Komplexe |
| FHT | engl. <i>Fatty ω-Hydroxyacid/Fatty Alcohol Hydroxycinnamoyl-transferase</i> |
| FLS | engl. <i>flagellin-sensitive</i> |
| GC-MS | Gas-Chromatographie-Massenspektroskopie |
| gDNA | genomische DNA |
| h | Stunde |
| H ₂ O _{dd} | doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser |
| hpi | engl. <i>hours post infection</i> |

| | |
|--------------|---|
| hpt | engl. <i>hours post treatment</i> |
| hpw | engl. <i>hours post wounding</i> |
| HR | engl. <i>hypersensitive response</i> |
| i.d.R. | in der Regel |
| IPB | Institut für Pflanzenbiochemie |
| JA | engl. <i>jasmonic acid</i> |
| kb | kilo Basenpaare |
| KCS | β-Ketoacyl-CoA-Synthasen |
| lat. | lateinisch |
| LB | engl. <i>lysogeny broth</i> |
| Lb | Leitbündel |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| LRR | engl. <i>leucine rich repeat</i> |
| LSM | <i>Laser-Scanning-Mikroskop</i> |
| MAMP | engl. <i>microbial associated molecular pattern</i> |
| MAPK | engl. <i>mitogen activated protein kinase</i> |
| MeOH | Methanol |
| MF | engl. <i>match factor</i> |
| min | Minuten |
| mind. | mindestens |
| ML | Mittellamelle |
| MS | engl. <i>mass spectrometry</i> |
| n | Anzahl |
| n.d. | nicht detektierbar |
| <i>NahG</i> | Salizylhydroxylase-kodierendes Gen aus <i>Pseudomonas putida</i> |
| NBD | Nukleotid-Bindedomäne |
| NB-LRR (NLR) | engl. <i>nucleotide binding-leucine rich repeat</i> |
| NO | Stickstoffmonoxid |
| <i>nptII</i> | Neomycin-Phosphotransferase II |
| OPR3 | 12-Oxophytodiensäurereduktase 3 |
| p | statistische Wahrscheinlichkeit |
| p.a. | engl. <i>per analysis</i> |
| PAMP | engl. <i>pathogen associated molecular pattern</i> |
| ppm | engl. <i>parts per million</i> |
| PCD | engl. <i>programmed cell death</i> |
| PCI | Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol- Lösung |
| PCR | engl. <i>polymerase chain reaction</i> |
| Pd | Phelloderm |
| PDA | engl. <i>photodiode array</i> |
| pDNA | Plasmid DNA |
| PDR | engl. <i>pleiotropic drug resistance</i> |
| Pe | Perizykel |
| Pep-13 | PAMP, Elicitoraktives 13 aa langes Peptid (VWNQPVRGFKVYE) von <i>Phytophthora sojae</i> |
| Pg | Phellogen |
| PGN | Peptidoglycane |
| PI | Phellem |
| PM | Plasmamembran |
| PR | engl. <i>pathogenesis related</i> |
| PRR | engl. <i>pattern recognition receptor</i> |
| Pst | <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> |

| | |
|---------------|--|
| PTI | engl. <i>PAMP triggered immunity</i> |
| pv. | lat. <i>pathovar</i> |
| PW | Primärwand |
| QMS | Quadrupol-Massenspektrometrie |
| qPCR | engl. <i>quantitative-PCR</i> |
| qRT-PCR | engl. <i>quantitative real-time-PCR</i> |
| QTOF | engl. <i>quantitative time-of-flight</i> |
| R | Resistenz |
| rel. | relative |
| RF | engl. <i>radio-frequency</i> |
| RFP | rot fluoreszierendes Protein |
| Rh | Rhizodermis |
| RLK | engl. <i>receptor like kinase</i> |
| RNA | engl. <i>ribonucleic acid</i> |
| RNAi | RNA Interferenz |
| ROS | engl. <i>reactive oxygen species</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RXLR-Proteine | Effektorproteine mit einem konservierten RXLR-dEER Aminosäure-Motiv |
| s. | siehe |
| SA | engl. <i>salicylic acid</i> |
| SAR | engl. <i>systemic acquired resistance</i> |
| SD | engl. <i>standard deviation</i> |
| SDS | engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> |
| SE (SEM) | engl. <i>standard error of the mean</i> |
| SL | Suberinlamellen |
| spp. | lat. <i>species pluralis</i> |
| sq | engl. <i>semiquantitative</i> |
| SW | Sekundärwand |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| TG | Trockengewicht |
| TMD | <i>trans</i> -Membrandomäne |
| TW | Tertiärwand |
| U | engl. <i>unit(s)</i> ; Einheit(en) |
| u.a. | unter anderem |
| unabh. | unabhängig |
| UPLC | engl. <i>Ultraperformance liquid chromatography</i> |
| v/v | engl. <i>volume per volume</i> |
| VLCFA | engl. <i>very long-chain fatty acids</i> |
| w/v | engl. <i>weight per volume</i> |
| W2A | Pep-13-Analogon mit Aminosäureaustausch an Position 2, inaktiver Elicitor/PAMP |
| WT | Wildtyp (Sorte Désirée) |

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1: Struktur eines Knollenperiderms von *S. tuberosum*. 2

Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Suberinbiosynthese in *A. thaliana*
(verändert nach Vishwanath *et al.* 2015). 8

Abbildung 1.3: Schematische Struktur eines ABCG Halbtransporters in der Plasmamembran. 10

Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Orientierung der Domänenstruktur der ABC-Transporter,
exemplarisch für die Unterfamilien ABCG und ABCB (verändert nach Shoji 2014). 11

Abbildung 1.5: Asexueller Infektionszyklus von *P. infestans* auf anfälligen *S. tuberosum*-Pflanzen. 14

Abbildung 1.6: Modell der pflanzlichen Abwehrsysteme (verändert nach Dangl *et al.* 2013). 20

Abbildung 1.7: Modell der Pep-13-induzierten Abwehrreaktionen in *S. tuberosum*. 23

Abbildung 1.8: Ergebnisse der vorausgegangenen Microarray-Analyse von *ABCG1*. 24

Abbildung 3.1: Schematische Struktur des *ABCG1*-Gens bzw. des ABCG1-Proteins. 46

Abbildung 3.2: Phylogenetische Sequenzanalyse von *StABCG1* und *AtABCG1* bis *AtABCG43*. 47

Abbildung 3.3: Einfluss von Pep-13 auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern. 48

Abbildung 3.4: Einfluss von *P. infestans* auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern. 50

Abbildung 3.5: Einfluss von Verwundung auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation
in Kartoffelblättern. 50

Abbildung 3.6: Organ-/Gewebespezifische *ABCG1*-Expression in WT-Kartoffelpflanzen. 51

Abbildung 3.7: Lokalisation des ABCG1-RFP-Fusionsproteins in Mesophyllprotoplasten
von *A. thaliana*. 52

Abbildung 3.8: Schematische Struktur von *ABCG1* mit Position des für das RNAi-Konstrukt
genutzten Fragmentes. 53

Abbildung 3.9: *ABCG1*-Transkriptakkumulation in *ABCG*-RNAi-Linien. 55

Abbildung 3.10: Veränderte Knollenmorphologie von *ABCG*-RNAi-Pflanzen. 57

Abbildung 3.11: Veränderte Wurzelmorphologie von *ABCG*-RNAi-Pflanzen. 58

Abbildung 3.12: Knollengewichtsverlust von *ABCG*-RNAi-Pflanzen. 60

Abbildung 3.13: Fluorol-Yellow-088-Färbung von Knollenperiderm und Wurzeln der Kontroll- und
ABCG-RNAi-Pflanzen. 62

Abbildung 3.14: Quantitative Zusammensetzung aliphatischer Suberinmonomere von Kontroll- und
ABCG-RNAi-Knollenperiderm. 65

Abbildung 3.15: UV-Chromatogramm der apolaren Peridermextrakte von Kontroll- und
ABCG-RNAi-Knollen. 67

Abbildung 3.16: Relative Quantifizierung monomerer Vorstufen von Suberin in apolaren Peridermextrakten
von Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Knollen. 69

Abbildung 3.17: Southern- und Northern-Blot-Analyse von 35S-*ABCG1*-Kartoffellinien. 72

Abbildung 3.18: Knollengewicht und -phänotyp nach Lagerung von 35S-*ABCG1*-Knollen. 74

Abbildung 3.19: Fluorol-Yellow-088-Färbung von Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Knollenperiderm. 75

Abbildung 3.20: Quantitative Zusammensetzung aliphatischer Suberinmonomere im Knollenperiderm von
Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen. 77

| | |
|---|-----|
| Abbildung 3.21: Quantifizierung monomerer Vorstufen von Suberin in apolaren Knollenperidermextrakten von Kontroll- und 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen. | 79 |
| Abbildung 3.22: Nekrosenbildung und Suberineinlagerung in Blättern von <i>ABCG</i> -RNAi-Pflanzen nach Infiltration mit Pep-13. | 82 |
| Abbildung 3.23: Suberineinlagerung um <i>P. infestans</i> -Inokulationsstellen bei Blättern von <i>ABCG</i> -RNAi- und Kontroll-Pflanzen. | 83 |
| Abbildung 3.24: Anfälligkeit der <i>ABCG</i> -RNAi-Pflanzen gegenüber <i>P. infestans</i> | 84 |
| Abbildung 3.25: Anfälligkeit der <i>ABCG</i> -RNAi-Knollen gegenüber unbekanntem Pathogenen. | 86 |
| Abbildung 3.26: Suberinfärbung Pep-13-infiltrierter Blätter von Kontroll- und 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen. | 87 |
| Abbildung 3.27: Suberinfärbung <i>P. infestans</i> -infizierter Blätter von Kontroll- und 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen. | 88 |
| Abbildung 3.28: Blattinfektion von 35S- <i>ABCG1</i> - und Kontrollpflanzen nach Behandlung mit <i>P. infestans</i> | 89 |
| Abbildung 4.1: Vereinfachte Modelle über die Funktion von <i>ABCG</i> -Halbtransportern in der Suberinbiosynthese in WT- und <i>ABCG</i> -RNAi-Pflanzen von <i>S. tuberosum</i> | 98 |
| Abbildung 7.1: Molekulare Struktur detektierter Ferulasäurekonjugate in den apolaren Peridermextrakten der <i>ABCG</i> -RNAi-Linien. | 149 |
| Abbildung 7.2: Repräsentative Knollen von ca. drei Monate alten <i>in vitro</i> gewachsenen Gewebekulturpflanzen. (A) Knollenphänotyp von Kontrollpflanzen (WT, EV) und (B) <i>ABCG</i> -RNAi-Pflanzen (Linie: B4, K2, A3 und G4). | 149 |
| Abbildung 7.3: Blattläsionen in Aufsicht und im Querschnitt von Kontrollpflanzen (A+B) | 150 |
| Abbildung 7.4: Blattläsionen in Aufsicht und im Querschnitt von <i>ABCG</i> -RNAi-Pflanzen (C+D) | 151 |
| Abbildung 7.5: Semidünnschnitte Pep-13 (100 µM)-infiltrierter Blätter von Kontrollpflanzen (WT) | 152 |
| Abbildung 7.6: Semidünnschnitte Pep-13 (100 µM)-infiltrierter Blätter von 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen | 153 |
| Abbildung 7.7: Semidünnschnitte von Kontrollblättern (WT) nach Infiltration mit W2A- (A) bzw. Wasser (B). | 154 |
| Abbildung 7.8: Semidünnschnitte von 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen nach Infiltration mit W2A- (A) bzw. Wasser (B) | 155 |
| Abbildung 7.9: Quantitative Bestimmung der <i>P. infestans</i> -Biomasse in Kontroll- und 35S- <i>ABCG1</i> -Pflanzen. | 156 |

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1: Zusammensetzung und Struktur aliphatischer Suberinmonomere..... 5

Tabelle 2.1: Zusammensetzung verwendeter Medien 25

Tabelle 2.2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen 26

Tabelle 2.3: Verwendete Klonierungsvektoren 27

Tabelle 2.4: Anregungswellenlängen der verwendeten Fluorochrome 40

Tabelle 3.1: Relative Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren, Phenole, Anthocyane und Glykoalkaloide in semipolaren Peridermextrakten von *ABCG*-RNAi- und Kontrollknollen..... 71

Tabelle 7.1: Analytische Daten der 1-Trimethylsilyloxy-Alkane..... 136

Tabelle 7.2: Analytische Daten der α,ω -Dicarbonsäuredimethylester..... 136

Tabelle 7.3: Analytische Daten der Fettsäuremethylester 137

Tabelle 7.4: Analytische Daten der ω -Trimethylsilyloxy-Fettsäuremethylester 137

Tabelle 7.5: Analytische Daten der Trimethylsilyloxy-Zimtsäuremethylester..... 138

Tabelle 7.6: Analytische Daten der Feruloyloxyfettsäuren 138

Tabelle 7.7: Analytische Daten der Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester..... 139

Tabelle 7.8: Analytische Daten der Alkylferulate 139

Tabelle 7.9: Analytische Daten der Hydroxyalkylferulate 140

Tabelle 7.10: Analytische Daten der Feruloyloxyalkylferulate 140

Tabelle 7.11: Analytische Daten der ω -Hydroxyfettsäuren..... 140

Tabelle 7.12: Analytische Daten der α,ω -Dicarbonsäuren 141

Tabelle 7.13: Analytische Daten der Fettsäuren..... 141

Tabelle 7.14: Analytische Daten der aromatischen Aminosäuren, Phenylpropanoide, Anthocyane und Glykoalkaloide 142

Tabelle 7.15: Relative Quantifizierung der Ferulasäurekonjugate, ω -Hydroxyfettsäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und Fettsäuren in apolaren Periderm-Extrakten von *ABCG*-RNAi- , *35S-ABCGI*- und Kontrollpflanzen. 144

Tabelle 7.16: Relative Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren, Phenole, Anthocyane und Glykoalkaloide in semipolaren Peridermextrakten von *35S-ABCGI* - und Kontrollknollen..... 148

1 EINLEITUNG

Mit der Besiedlung des Festlandes vor rund 460 Millionen Jahren, waren die Pflanzen neuen terrestrischen Umweltbedingungen wie erhöhten Kohlendioxidgehalten, hohen Temperaturschwankungen und UV-Strahlung sowie veränderter Nährstoff- und Wasserverfügbarkeit ausgesetzt. Die Ausbildung neuer Reproduktionsmechanismen, wie auch neuer anatomischer-, morphologischer- und physiologischer Strukturen, ermöglichten nach und nach die Adaption der Pflanzen an diese klimatischen Bedingungen (Riederer 1991, Selosse & Le Tacon 1998, Heckman *et al.* 2001, Riederer & Schreiber 2001). Eine Form der Anpassung ist die Ausbildung von hydrophoben, wasserdichten Schichten auf den Oberflächen von Zellwänden, die das innere Pflanzengewebe von der Umwelt separieren. Diese spezialisierten Grenzflächen haben eine entscheidende Bedeutung im Schutz von Pflanzen sowohl gegen biotische und abiotische Umweltfaktoren als auch in der Kontrolle der Pflanzenmorphologie (Kolattukudy 1987, Riederer & Schreiber 2001, Nawrath 2006, Mattinen *et al.* 2009, Nawrath *et al.* 2013). Zudem geben sie der Pflanze Festigkeit und Stabilität (Riederer & Schreiber 2001, Pollard *et al.* 2008). Die oberirdischen Organe (primäre Pflanzengewebe wie Blätter, Blüten, Früchte und primäre Sprossachsen) werden durch die, auf der Epidermis aufgelagerten Kutikula geschützt. Diese 0,1-10 μm dünne, membranähnliche Barriere besteht aus dem Glycerolipid-Polymer Kutin und kutikulärer Wachse (Riederer & Schreiber 2001). Hauptsächliche Monomere des Kutins sind C_{16} und C_{18} Hydroxy- und Epoxyfettsäuren. Fettsäuren, Fettalkohole, Aromaten und Dicarbonsäuren (mit Ausnahme des Kutins in *Arabidopsis*-Blättern und Stängeln, mit einem Dicarbonsäureanteil von $> 40\%$) sind Nebenbestandteile des Kutins (Pollard *et al.* 2008, Li-Beisson *et al.* 2013, Nawrath *et al.* 2013). Sekundäre Pflanzengewebe, die sowohl in oberirdischen als auch unterirdischen Pflanzenorganen vorkommen, werden durch ein Periderm, insbesondere durch das eingelagerte lipophile Biopolyester Suberin, geschützt (Pollard *et al.* 2008).

1.1 DAS PERIDERM (ECHTES KORKGEWEBE)

Das Periderm ist eine effiziente Barriere in sekundären Sprossachsen, Wurzeln und in unterirdischen Speicherknollen der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum*), wo es das pflanzliche Grundgewebe vor Infektionen durch Krankheitserreger und Wasserverlust schützt. Die Peridermbildung erfolgt durch kontinuierliches sekundäres Dickenwachstum der Wurzel

sowie des Sprosses und wird durch abiotische und biotische Umwelteinflüsse stimuliert (Lulai & Corsini 1998, Schreiber *et al.* 2005, Geldner 2013, Machado *et al.* 2013). Beispielsweise entsteht nach Verwundung oder Pathogenbefall ein Periderm als Schutzschicht um beschädigte oder tote Epidermiszellen (Buskila *et al.* 2011, Lulai & Neubauer 2014). Des Weiteren können sich Periderme an Oberflächen von Abszissionszonen entwickeln (O’Gara *et al.* 2009, Beisson *et al.* 2012).

Die Peridermbildung beginnt mit der Entwicklung einer sekundär meristematischen Schicht, des Phellogens oder auch Korkkambiums. Es entsteht durch die Teilung epidermaler und subepidermaler Zellen außerhalb des vaskulären Kambiums der Sprosse oder durch Zellteilung des Perizykels (Perikambium) der Wurzelendodermis. In *S. tuberosum* resultiert das Phellogen aus epidermalen und subepidermalen Zellen der Knollenepidermis (Reeve *et al.* 1969, Barel & Ginzberg 2008). Meristematisch aktive Phellogenzellen bilden nach außen Korkzellen des Phellems (Haut) - eine mehrschichtige Schutzschicht von etwa 4-10 Zellschichten, abhängig vom Genotyp, Umweltbedingungen und Wachstumsstadium und ein nach innen gerichtetes, unverkorktes Phelloderm (Korkparenchym), welches nicht immer vorhanden ist. Alle Schichten zusammen, das Phellem, Phellogen und Phelloderm bilden das Periderm (Abbildung 1.1A; Reeve *et al.* 1969, Lulai & Freeman 2001, Lenzian 2006).

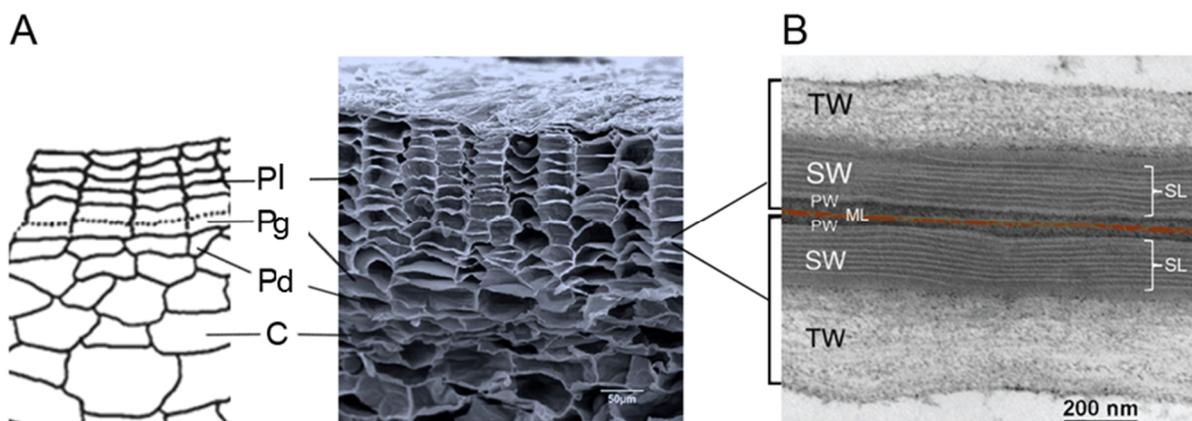


Abbildung 1.1: Struktur eines Knollenperiderms von *S. tuberosum*.

A, Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines Knollenperiderms von *S. tuberosum* (verändert nach Lulai 2007, Serra *et al.* 2009b). Zu sehen sind die einzelnen Periderm-Schichten, das Phellem (Pl), das Phellogen (Pg) und das Phelloderm (Pd), fest haftend an das untere Gewebe, die Cortexzellen (C).

B, TEM Aufnahme einer Suberinultrastruktur, von Zellwänden zweier angrenzender Phellemzellen eines Knollenperiderms (verändert nach Serra *et al.* 2009b). Die Zellwand einer typischen Phellemzelle besteht aus einer Primärwand (PW), einer suberinisierten Sekundärwand (SW) mit der typischen Suberinlamellen-Struktur (SL) und einer Tertiärwand (TW). Zwei Phellemzellen sind durch eine Mittellamelle (ML) miteinander verbunden.

Während der Periderm-Entwicklung und –Reifung, der sogenannten „Haut-Setzung“ (*Skin-set*), erhält das sekundäre Abschlussgewebe seine Barrierefunktion (Barel & Ginzberg 2008, Neubauer *et al.* 2013). Die Zellen des ausgereiften Phellems sind tote Zellen mit zellulosehaltigen Primär- und Tertiärzellwänden und charakteristischen, suberinisierten Sekundärwänden (Abbildung 1.1B; Schmidt & Schönherr 1982, Vogt *et al.* 1983, Enstone 2003, Schreiber 2010). Ein gut entwickeltes, suberinisiertes und intaktes Knollenperiderm wird als Hauptbarriere gegen Krankheiten, Insekten, Austrocknung und Knollenfäule während der Lagerung angesehen (Lulai & Freeman 2001, Schreiber *et al.* 2005, Lulai 2007). Entscheidend und essentiell für diese Barriereigenschaften ist dabei die Einlagerung von Suberin in den Zellwänden des Phellems (Lulai 2007, Beisson *et al.* 2012).

1.2 SUBERIN

Neben konstitutiv eingelagertem Suberin in endodermalen- und peridermalen Zellwänden kann die Suberinbildung ebenso infolge externer Stimuli als Reaktion auf abiotischen (z. B. Trockenheit, hoher Salzgehalt) und biotischen Stress in den Geweben induziert werden (Bernards 2002, Franke & Schreiber 2007).

Chemisch betrachtet ist Suberin ein auf Glycerol basierendes Heteropolymer, bestehend aus einem polyaliphatischen Polyester verknüpft mit polyaromatischen Komponenten und nicht-kovalent gebundenen Wachsen, die wahrscheinlich mit dem Polymer verbunden sind (Vishwanath *et al.* 2015). Eingelagert zwischen Primärwand und Plasmamembran bilden die polyaliphatischen und die polyaromatischen Komponenten die Suberinbarriere und sind als typische lamellare Struktur mit alternierenden hellen (aliphatisches Suberin) und dunklen Bereichen (aromatisches Suberin) unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zu erkennen (Abbildung 1.1 B; Serra *et al.* 2010, Serra *et al.* 2014). Durch Depolymerisation der aliphatischen Domäne können die Esterbindungen gespalten und die Zusammensetzung des dreidimensionalen polymeren Netzwerkes untersucht werden. Dabei zeigen unterschiedliche Pflanzenspezies ein gemeinsames Suberinmonomermuster aber mit verschiedener makromolekularer Struktur. So wird z. B. das *Pseudotsuga* (Douglasie)-Periderm von gesättigten Monomeren und das von *S. tuberosum* von ungesättigten Monomeren dominiert. Des Weiteren ist der jeweilige Monomer-Gehalt von der Pflanzenspezies abhängig (Graça & Santos 2006).

Allgemein umfasst der aliphatische Teil des Suberins nach Transesterifizierung Fettsäurederivate, hauptsächlich Glycerol, α,ω -Dicarbonsäuren und ω -Hydroxyfettsäuren, aber auch Fettsäuren, primäre Fettalkohole und geringe Mengen an Hydroxyzimtsäuren, vor allem Ferulasäure. Die Monomere sind über Esterbindungen untereinander und mit Glycerol verbunden (Graça & Pereira 2000a, 2000b, Pollard *et al.* 2008). Der nicht depolymerisierbare phenolische Teil des Suberins wird als ein Lignin-ähnliches, dreidimensionales polymeres Netzwerk angesehen, dessen Komponenten vom Phenylpropanweg abgeleitet sind. Es besteht hauptsächlich aus Hydroxyzimtsäuren und deren Derivaten, überwiegend Ferulasäure, ρ -Coumarsäure, Kaffeesäure und Feruloyltyramine, die vermutlich über Etherbindungen die unlöslichen Polyaromaten vernetzen. Zudem beinhaltet die Domäne einen geringen Anteil an Monolignolen im Unterschied zum eigentlichen Lignin (Negrel *et al.* 1996, Bernards 2002, Ranathunge & Schreiber 2011; Graça 2015). Da es gegenwärtig noch nicht möglich ist, Suberin effektiv und in einer intakten Form zu isolieren, existieren zahlreiche Modelle um die makromolekulare Struktur von Suberin zu erklären (Bernards 2002, Graça & Santos 2007, Pollard *et al.* 2008, Santos *et al.* 2013). Allgemein wird angenommen, dass Diester aus langkettigen α,ω -Dicarbonsäuren und Glycerol den Kern des Suberins bilden und dass von dort aus durch Glycerol-vermittelte Esterbindungen die aliphatische Domäne zu einem dreidimensionalen Polymer wächst. Am Ende vermittelt Ferulasäure die Verknüpfung der Polyester Domäne mit der polyaromatischen Domäne und ihre Bindung an Zellwand-Polysaccharide der Primärwand (Franke & Schreiber 2007, Serra *et al.* 2010). In Tabelle 1.1 sind allgemeine charakteristische aliphatische Suberinmonomere und deren Gehalte in einer kurzen Übersicht dargestellt.

Tabelle 1.1: Zusammensetzung und Struktur aliphatischer Suberinmonomere.

| Monomere | Struktur | Suberin |
|----------------------------------|----------|---------|
| ω - Hydroxysäuren | | 11-43 % |
| α,ω - Dicarbonsäuren | | 24-45 % |
| Glycerol | | 14-26 % |
| Ferulasäure | | 0-10 % |
| Fettalkohole | | 0-10 % |
| Suberin-Ester | | |
| Lineare-Ester | | |
| Glycerol-Ester | | |
| Ferulasäure-Ester | | |

Repräsentative Struktur und relative Gehalte aliphatischer Suberinmonomere-. Dargestellt sind typische Haupt-(exemplarische Darstellung als C18-Monomere) und Neben-Monomere (verändert nach Franke & Schreiber 2007, Pollard *et al.* 2008).

1, 18-Hydroxy-Octadecensäure verestert mit 18-Hydroxy-Decensäure. **2**, 9-Epoxy-18-Hydroxy-Octadecensäure verestert mit 9-Epoxy-Octadecan-1,18-Disäure. **3**, Glycerol verestert mit Octadecan-1,18-Disäure, **4**, Glycerol verestert mit 9-Epoxy-Octadecan-1,18-Disäure verestert mit Glycerol. **5**, 9-Epoxy-Octadecan-1,18-Disäure verestert mit Glycerol verestert mit Octadecan-1,18-Disäure. **6**, Ferulasäure verestert mit 22-Hydroxy-Decosensäure verestert mit Glycerol.

1.2.1 SUBERIN BIOSYNTHESE

Die Suberinisierung benötigt die Biosynthese von aliphatischen, phenolischen und Glycerol-Monomeren, deren Transport in den Apoplasten der Zelle, gefolgt vom Zusammenbau der zwei separaten Monomer-Domänen und letztendlich deren Verknüpfung zum Makromolekül.

Die meisten Enzyme von *Arabidopsis*, aber auch einige von *S. tuberosum*, die in der Suberinbiosynthese involviert sind, wurden durch die Charakterisierung von Mutanten, die eine quantitativ veränderte Suberin-Zusammensetzung aufwiesen, identifiziert (Vishwanath *et al.* 2015 und darin enthaltenen Referenzen).

Die Abbildung 1.2 zeigt ein vereinfachtes Modell der Suberinbiosynthese (verändert nach Vishwanath *et al.* 2015). Generell wird angenommen, dass der erste Schritt die Bildung von Acyl-Coenzym A (Acyl-CoA)-Thioestern durch die Aktivierung der freien Fettsäuren mit deren Übertragung auf Coenzym A ist. Charakteristisch für Suberin sind lang- und sehr langkettige Fettsäuren (bis zu C30), wodurch die Elongation und ω -Oxidation der Fettsäuren zwei wesentliche Prozesse der Suberinbiosynthese darstellen (Franke & Schreiber 2007, Pollard *et al.* 2008). Die Elongation der Acyl-Coenzym A-Moleküle werden mit Hilfe von Elongasen des Fettsäure-Elongations-Komplexes (FAE) schrittweise zu Vorstufen von sehr langkettigen Fettsäuren (*very long-chain fatty acids* (VLCFA)) mit Kettenlängen von bis zu C36 verlängert. Die Kontrolle erfolgt durch β -Ketoacyl-CoA-Synthasen (KCS), die ersten Enzyme des FAEs. In *S. tuberosum* ist *StKCS6*, eine 3-Ketoacyl-CoA Synthase im Kartoffelperiderm, für den ersten Schritt der Elongation der aliphatischen Komponenten und Wachse verantwortlich (Serra *et al.* 2009a). Einige der VLCFA werden in der Kettenmitte je nach Pflanzenspezies zu ungesättigten oder Epoxyfettsäuren modifiziert. Diese, aber auch die aktivierte Form der Fettsäuren, werden durch ω -Hydroxylierung zu ω -Hydroxyfettsäuren und weiter von einer ω -Hydroxyfettsäuredehydrogenase zu α,ω -Dicarbonsäuren oxidiert. Die ω -Hydroxylierung wird von NADPH-abhängigen P450-Monooxygenasen, vor allem aus der CYP86-Familie, katalysiert (Beisson *et al.* 2012). Für *S. tuberosum* konnte *CYP86A33*, das Orthologe von *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) *CYP86A31*, als essentielle Komponente der aliphatischen Suberinbiosynthese identifiziert werden (Serra *et al.* 2009b). Die ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren werden entweder miteinander verknüpft oder mit Glycerol und/oder Ferula- bzw. Coumarsäure verestert. Die Veresterung der ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren mit Glycerol-3-Phosphat zu *sn*-2-Monoacylglycerole (MAGs) wird durch Acyl-CoA-abhängige Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferasen (GPATs) katalysiert (Yang *et al.* 2010). Die phenolische Komponente

Ferulasäure wird durch Feruloyl-CoA-Transferasen mit ω -Hydroxyfettsäuren und Fettalkoholen verestert (Boher *et al.* 2013). In *S. tuberosum* wird diese Reaktion von der *FHT* (*Omega*-Hydroxyfettsäure/Fettalkohol-Hydroxycinnamoyltransferase) katalysiert (Serra *et al.* 2010). Des Weiteren können die aktivierten Fettsäuren zu gesättigten primären Fettalkoholen reduziert werden, die je nach Pflanzenspezies bis zu zehn Prozent der aliphatischen Suberinmonomere ausmachen (Pollard *et al.* 2008). Langkettige Fettalkohole und Alkylferulate bis zu einer Kettenlänge von C32 sind überwiegende Bestandteile Suberin-assoziiierter Wachse in *S. tuberosum* (Schreiber *et al.* 2005; Serra *et al.* 2010). Für die Synthese von Wachsbestandteilen scheint die *FHT* von Bedeutung (Serra *et al.* 2010).

Die Suberinmonomere oder -oligomere werden anschließend vom Endoplasmatischen Retikulum (ER) über die Plasmamembran (PM) in den Apoplasten transportiert und dort, vermutlich über Peroxidasen zu einem Suberin-Makromolekül polymerisiert (Bernards *et al.* 1999). Die Hydroxyfettsäure-Glycerolester scheinen dabei das Grundgerüst von Suberin zu bilden. Der Transportmechanismus der Suberinmonomere und -oligomere in den Apoplasten ist noch unbekannt. Es wird angenommen, dass die Suberinpräkursoren über Golgi-vermittelte Vesikel vom ER zur Plasmamembran gelangen und dort sekretiert werden (Vishwanath *et al.* 2015). Eine andere Hypothese besagt, dass die Monomere durch Transportproteine zur Membran und dort über Plasmamembran-lokalisierte ABC-Transporter exportiert werden (Pollard *et al.* 2008, Beisson *et al.* 2012).

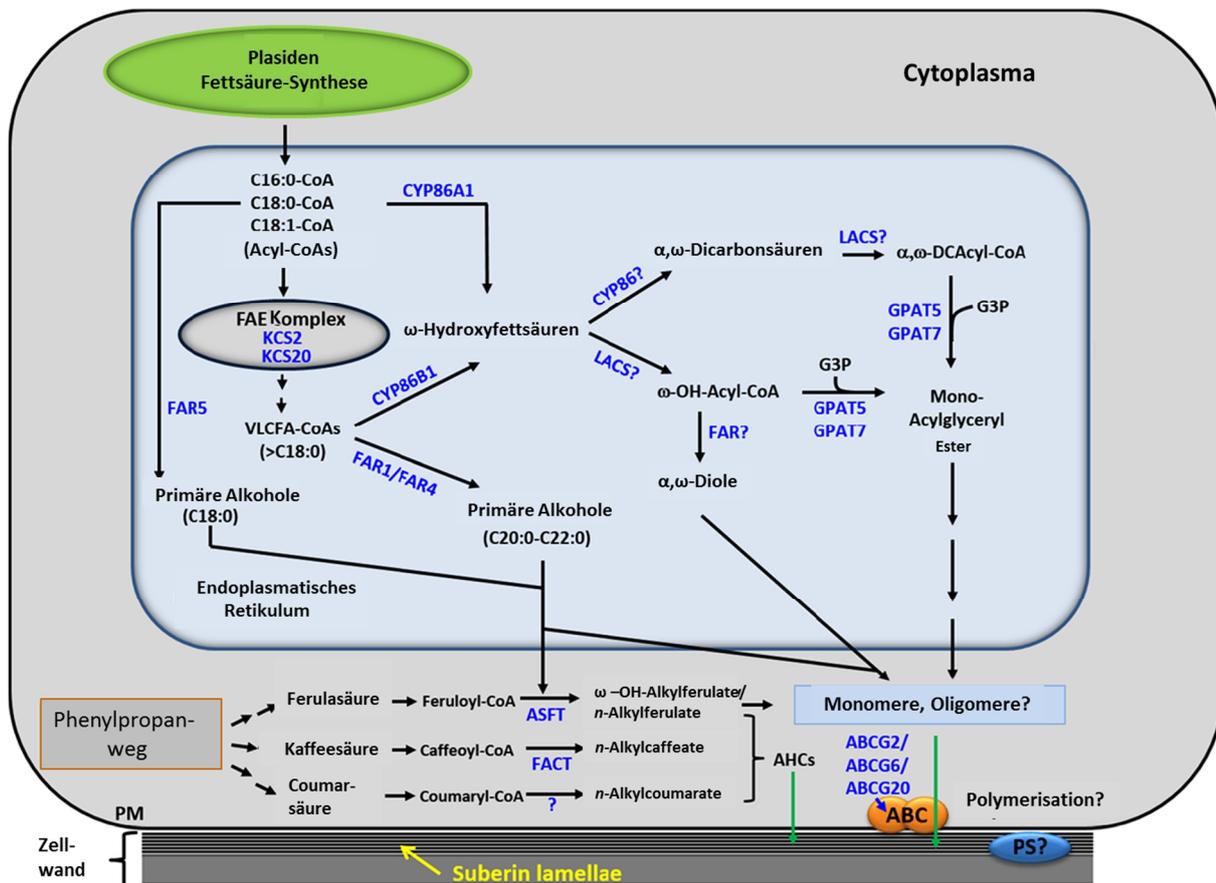


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Suberinbiosynthese in *A. thaliana* (verändert nach Vishwanath *et al.* 2015)

Aliphatische Suberinmonomere werden im ER ausgehend von plastidären C16 und C18 Fettsäuren synthetisiert. ER-assoziierte Proteine modifizieren und verlängern die aktivierten Fettsäuren zu langkettigen Fettsäurederivaten. Diese werden stufenweise zu ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonylsäuren oxidiert oder zu primären Alkoholen reduziert. Acyltransferasen verknüpfen die ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonylsäuren mit Glycerol und/-oder der vom Phenylpropanweg abgeleiteten Ferulasäure zu Estern oligomerer Suberinpräkursoren, die im Anschluss in den Apoplasten, vermutlich über ABC-Transporter, exportiert werden. Nachdem apoplastischen Export werden die Mono- bzw. Oligomere wahrscheinlich von Peroxidasen und Hydrolasen zu einem Suberin-Makromolekül, polymerisiert (Franke & Schreiber 2007, Vishwanath *et al.* 2015). FAE, Fettsäure-Elongations-Komplex; VLCFA, sehr langkettige Fettsäuren; FARs, Fettsäure-Reduktasen; CYPs, Cytochrom P450-Oxidase; ω -OHs, ω -Hydroxyfettsäuren; α,ω -DCAs, α,ω -Dicarbonylsäuren; G3P, Glycerol-3-Phosphat; GPATs, Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferasen; LACSs, Langketten-Acyl-CoA-Synthetasen; ASFT, Aliphatische-Suberin-Feruloyltransferase; FACT, Fettalkohol:Caffeoyl-CoA-Caffeoyltransferase; AHCs, Alkyl-Hydroxy-Zimtsäureamide; ABC, ATP-bindende Kasette; PS, Polyester-Synthasen; PM, Plasmamembran

1.3 ABC-TRANSPORTER

Die ABC-Transporter-Superfamilie (englisch: *ATP binding cassette*, ABC) gehört zu den größten Proteinfamilien aller lebenden Organismen von Pro- und Eukaryoten. Die überwiegend membrangebundenen Proteine fungieren in Abhängigkeit ihrer Richtung relativ zum Cytoplasma entweder als Importer oder Exporter. Im Pflanzengenom wurden in *A. thaliana* und *Oryza sativa* jeweils mehr als 120 und für *S. tuberosum* 250 ABC-Transporter identifiziert. Sie zeigen unterschiedliche Substratspezifitäten und sind unter anderem nicht nur am Transport von Metaboliten, in Detoxifikationsprozessen und an der Aufnahme von Nährstoffen involviert, sondern haben auch eine große Bedeutung in der Pflanzenabwehr sowie für das Wachstum und die Entwicklung (Verrier *et al.* 2008, Kang *et al.* 2011, Andolfo *et al.* 2015).

Ein Kennzeichen der ABC-Transporter ist ihre Fähigkeit, durch Hydrolyse von ATP die nötige Energie für den Transport der Substrate über eine Membran zu gewinnen. Diese wird durch eine ATP-bindende Kasette (ABC-Domäne) vermittelt. Sie besteht aus hochkonservierten Sequenzmotiven: das „Walker-A“ Motiv, für die Bindung von ATP, das „Walker-B“ Motiv, welches an der Hydrolyse von ATP beteiligt ist und einem ABC-Signaturmotiv (alias C-Motiv) zwischen den zwei Walker-Motiven. Einschließlich einer H-Schleife (H-loop) und einer Q-Schleife (Q-loop) stellt die ABC-Domäne die Nukleotidbindedomäne (NBD) dar. Neben der cytoplasmatischen NBD enthalten die Transporter eine hydrophobe *trans*-Membrandomäne (TMD), die überwiegend aus sechs membrandurchspannenden α -Helices besteht (Abbildung 1.3). Die TMD ist für die Substraterkennung und deren Translokation über die Plasmamembran verantwortlich. Den Kern eines ABC-Proteins umfassen eine TMD und eine NBD, wodurch die Einteilung der Transporter in „*Halbtransporter*“ und „*Volltransporter*“ erfolgt. Ein ABC-Halbtransporter verfügt über nur eine Kerneinheit und muss, um funktionell aktiv zu sein, homo- oder heterodimerisieren. Ein Volltransporter hingegen ist bereits funktionell und besteht aus zwei Kerneinheiten (zwei TMD und zwei NBD (Schulz & Kolukisaoglu 2006, Rea 2007, Verrier *et al.* 2008, Matsuda *et al.* 2012).

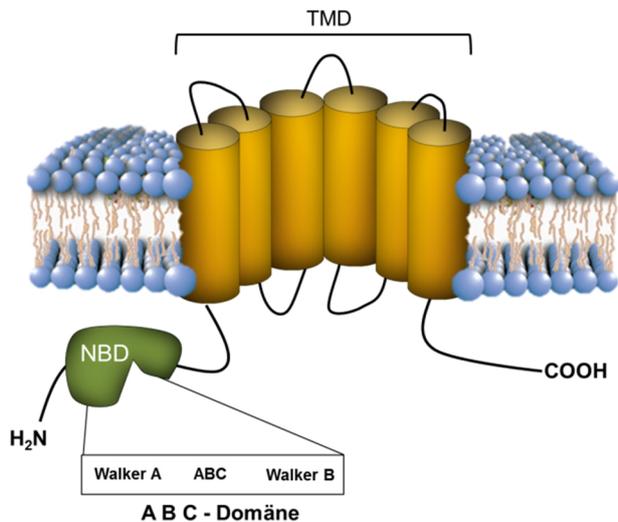


Abbildung 1.3: Schematische Struktur eines ABCG-Halbtransporters in der Plasmamembran.

Ein ABCG-Halbtransporter umfasst eine C-terminale *trans*-Membrandomäne (TMD) mit sechs membrandurchspannenden α -Helices und eine cytoplasmatische, N-terminale, Nukleotidbindedomäne (NBD). Die Walker-A und -B Sequenzen und das ABC-Signaturmotiv der NBD vermitteln die Bindung und/oder Hydrolyse von ATP. Sie bilden das gemeinsame Strukturmerkmal der ABC-Transporter, die ATP-bindende Kasette (ABC-Domäne). Abbildung verändert nach Remaley *et al.* 1999 (Bildquelle Plasmamembran www.cohenweb.rc.fas.harvard.edu).

Basierend auf der Organisation ihrer Domänenstruktur (Reihenfolge der TMD und NBD) und ihrer phylogenetischen Verwandtschaft werden die ABC-Transporter in acht Unterfamilien, ABCA bis ABCI (ABCH wurde nicht in Pflanzen gefunden), eingeteilt (Verrier *et al.* 2008, Kretzschmar *et al.* 2011). Eine der größten Familien der ABC-Transporter ist die Unterfamilie G, welche in *A. thaliana* 28 Halbtransporter (WBC, *white-brown complex homologs*) und 15 Vollständigtransporter (PDR, *pleiotropic drug resistance*), benannt jeweils nach ihrem *Drosophyla melanogaster* WBC- bzw. *Saccharomyces cerevisiae* PDR5-Vorläufer, umfasst (Sánchez-Fernández *et al.* 2001, Verrier *et al.* 2008). Die Orientierung der Domänen der Unterfamilie G ist in umgekehrter Richtung (*“reverse orientation“*; NBD-TMD-Transporter) organisiert, die anderen Unterklassen hingegen entsprechen überwiegend dem TMD-NBD-Typ (*“forward orientation“*) (exemplarisch Abbildung 1.4). Gene, die für PDR/ABCG-Homologe kodieren, konnten in Pflanzen, Braunalgen, Pilzen, Oomyceten und Schleimpilzen, nicht aber in Prokaryoten und Tieren identifiziert werden (Kang *et al.* 2011). Die Funktion dieser Transporter in den Pflanzen ist sehr divers und umfasst unter anderem die Detoxifikation von Schwermetallen, den Phytohormontransport, den Schutz der Pflanze vor Wasserverlust und Sekretion sekundärer Metabolite, aber auch die Pathogenabwehr und hier vor allem der Transport von antimikrobiell-wirkenden Substanzen (Kang *et al.* 2011, Qin *et al.* 2013).

Die ABCG-Transporter der WBC-Untergruppe sind Halbtransporter und benötigen eine Dimerisierung, um entweder als Homo- oder Heterodimere ihre Substrate transportieren zu können. Bisher gibt es nur wenige WBC/ABCG-Transporter, deren Funktionen bekannt sind. Alle bisher charakterisierten Halb-ABCGs, mit Ausnahme des an der vakuolären Membran sitzenden Halbtransporters *AtABCG19* mit Funktion im Transport von Kanamycin, lokalisieren

an der Plasmamembran (Sánchez-Fernández *et al.* 2001, Verrier *et al.* 2008, Kang *et al.* 2011). Einige Vertreter der Halb-ABCGs haben eine Bedeutung für den Transport von Pflanzenhormonen. Die Mehrheit der bisher charakterisierten Halbtransporter tragen zur Synthese extrazellulärer Barrieren bei. Darunter der *Arabidopsis*-Transporter *AtABCG11/WBC11/DSO*, welcher den Transport von Kutin- und Wachsbiosynthesemonomeren vermittelt. *AtABCG12/CER5* spielt eine Rolle in der extrazellulären Wachsablagerung in der Spross epidermis (Pighin *et al.* 2004, Bird *et al.* 2007, Panikashvili *et al.* 2007). Diese ABCG-Halbtransporter fungieren als Heterodimere, wobei *AtABCG11* auch als Homodimer funktionell sein kann und wahrscheinlich geringfügig die Zusammensetzung von Suberin beeinflusst (McFarlane *et al.* 2010, Panikashvili *et al.* 2010). *AtABCG13* ist ein weiterer Transporter, der zur Kutinbildung in Blüten beiträgt (Panikashvili *et al.* 2011). Im gleichen Zeitraum zu dieser Arbeit veröffentlichte Publikationen zeigen zudem, dass neben *AtABCG11* auch *AtABCG2*, *AtABCG6* wie auch *AtABCG20* die Monomierzusammensetzung des Suberins in den Wurzeln beeinflussen (Yadav *et al.* 2014). Ebenso wird in Reis (*Oryza sativa*) der ABCG-Transporter *OsABCG5/RCN1* für die Suberinisierung der Hypodermiszellen, der apoplastischen Barriere der Wurzel, benötigt (Shiono *et al.* 2014).

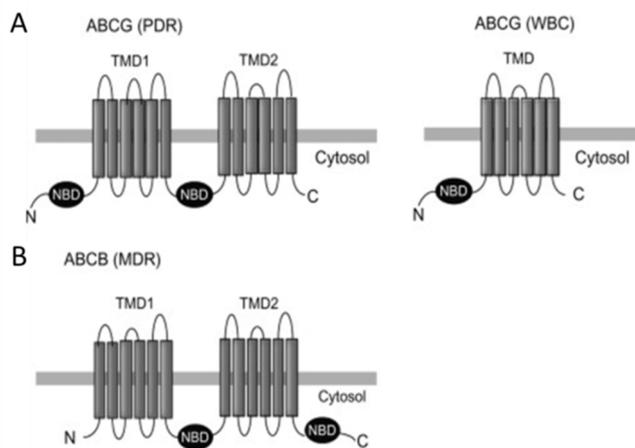


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Orientierung der Domänenstruktur der ABC-Transporter, exemplarisch für die Unterfamilien ABCG und ABCB (verändert nach Shoji 2014).

Die Nukleotidbindedomäne (NBD) der ABC-Transporter der Unterfamilie G befindet sich am N-Terminus, die *trans*-Membrandomäne (TMD) am C-Terminus (A) in umgekehrter Richtung („reverse orientation“) zu der Anordnung der Domänenstruktur der übrigen ABC-Transporter Unterfamilien wie beispielsweise die Volllängentransporter der Unterfamilie B vom MDR (*multidrug resistance protein*)-Typ (B). Die Anordnung dieser Domänenstruktur wird „forward orientation“ genannt, mit hydrophober N-terminal orientierter TMD und C-terminaler NBD. Die PDR (*pleiotropic drug resistance*)-Transporter sind die Volllängentransporter der Unterfamilie G, mit zwei TMD und zwei NBD. Hingegen besitzen die ABCG-Halbtransporter nur eine TMD und eine NBD.

Die Nukleotidbindedomäne (NBD) der ABC-Transporter der Unterfamilie G befindet sich am N-Terminus, die *trans*-Membrandomäne (TMD) am C-Terminus (A) in umgekehrter Richtung („reverse orientation“) zu der Anordnung der Domänenstruktur der übrigen ABC-Transporter Unterfamilien wie beispielsweise die Volllängentransporter der Unterfamilie B vom MDR (*multidrug resistance protein*)-Typ (B). Die Anordnung dieser Domänenstruktur wird „forward orientation“ genannt, mit hydrophober N-terminal orientierter TMD und C-terminaler NBD. Die PDR (*pleiotropic drug resistance*)-Transporter sind die Volllängentransporter der Unterfamilie G, mit zwei TMD und zwei NBD. Hingegen besitzen die ABCG-Halbtransporter nur eine TMD und eine NBD.

Durch den Transport von Komponenten, die zum Aufbau von Barrieren beitragen oder von antimikrobiell wirkenden Substanzen, wird eine Rolle von ABCG-Transportern in der Pathogenabwehr vermutet (Kang *et al.* 2011).

1.4 DIE PFLANZEN-PATHOGEN-INTERAKTION VON *SOLANUM TUBEROSUM* UND *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Die ursprünglich aus den südamerikanischen Anden stammende *S. tuberosum* ist heute neben *O. sativa*, *Saccharum officinarum* (Zuckerrohr), *Zea mays* (Mais) und *Triticum* spp. (Weizen) eine der wichtigsten weltweiten Kulturpflanzen. Die tetraploide Pflanze aus der Familie der Nachtschattengewächse (*Solanaceae*) bildet Sprossknollen, die als Nährstoffspeicher der Pflanze und wirtschaftlich als Nahrungs- und Futtermittel Verwendung findet. *S. tuberosum* kann sich generativ, meist durch Selbstbestäubung, oder vegetativ über Knollen vermehren. Die oberirdischen Pflanzenteile, die Knollenschale, aber auch ergrünte Knollen enthalten Alkaloide, vor allem Solanin und Chaconin, die zum Schutz vor Fraßfeinden dienen (Schreiber 1963, Percival *et al.* 1999).

Ein Hauptverursacher vieler Ernteverluste und damit einer der größten Schädlinge der Kartoffelpflanze ist der Erreger der Kraut- und Knollenfäule, *Phytophthora infestans*. Als phytopathogener Vertreter der Oomyceten ist er ein mit Braun- und Kieselalgen verwandter, Pilz-ähnlicher Mikroorganismus, dessen Zellwände, anders als die Chitin-haltigen Zellwände der echten Pilze, hauptsächlich aus Cellulose und β -Glucan bestehen. Eine weitere wirtschaftlich bedeutende Krankheit stellt die durch *P. infestans* verursachte Kraut- und Braunfäule an *Solanum lycopersicum* (Tomate) dar (Kamoun & Smart 2005, Fry & Grünwald 2010).

Mit *S. tuberosum* als Wirt ermöglicht der asexuelle Lebenszyklus des hemibiotrophen Oomyceten bei hoher Luftfeuchtigkeit eine dramatisch schnelle Vermehrung mittels Sporangien, die über Wind verbreitet werden und zügig andere Pflanzen infizieren (siehe Abbildung 1.5). Innerhalb von zwei Wochen kann eine Ernte komplett zerstört werden, was die Kraut- und Knollenfäule zu einer der gefährlichsten Pflanzenkrankheiten macht. Hemibiotrophe Pathogene wie *P. infestans* sind durch zwei verschiedene Phasen ihres Lebenszyklus gekennzeichnet: eine nicht symptomatische biotrophe Phase von zwei Tagen und eine späte destruktive nekrotrophe Phase von drei bis vier Tagen nach Infektion. In der biotrophen Phase breitet sich der Oomycet im lebenden Wirt über interzelluläre Hyphen im Blattgewebe aus und bildet Haustorien (Abbildung 1.5f, 1.5B). Über diese werden die Nährstoffe aus dem Inneren der Zelle des Wirts extrahiert und kleine Moleküle, sogenannte Effektoren, in den Apoplasten entlassen (Abbildung 1.5B; Anderson 2007, Fry 2008). Die nekrotrophe Phase ist durch die Auflösung und das Absterben des infizierten Gewebes und sichtbaren wässrigen braunen Läsionen und Nekrosen charakterisiert (Abbildung 1.5g, h).

Später entwickeln sich aus dem Myzel, erkennbar als weißer Belag auf der Blattunterseite, Sporangienträger mit Sporangien (Abbildung 1.5a, g, i; Kamoun & Smart 2005, Fry 2008). In den Boden gelangende Sporangien können direkt die Knollen von *S. tuberosum* infizieren (Abbildung 1.5h). *Phytophthora* überwintert als Myzel in infizierten Knollen oder als Oospore im Boden (Agrios 2005).

Es wird angenommen, dass der Übergang von der biotrophen- zur zerstörenden nekrotrophen Phase des Pathogens durch die koordinierte Sekretion der *Phytophthora*-Effektorproteine reguliert wird. Diese ermöglichen *P. infestans* den Wirtsmetabolismus während der biotrophen Phase zu manipulieren und dessen Abwehrreaktionen, u. a. in Form von Zelltod, zu unterdrücken (siehe auch Abschnitt 1.5). Die Krankheitssymptome und ein großflächiger Zelltod in der nekrotrophen Phase hingegen entstehen vermutlich durch die koordinierte Sekretion von lytischen Enzymen und Elicitoren, die Zelltod induzieren (Kelley *et al.* 2010). Zum Beispiel induziert *PiINF1* (Infestin1) programmierten Zelltod und wirkt synergistisch mit dem *PiNep1* (Nekrose und Ethylen induzierendes Protein 1)-ähnlichen Protein *PiNPP1.1* (Nekrose induzierendes *Phytophthora* Protein) im spätem Stadium der Infektion von Tomate und *Nicotiana benthamiana* (Kamoun *et al.* 1997, Kanneganti *et al.* 2006). Hingegen unterdrückt der Effektor *PiSNE1* (*suppressor of necrosis1*) in *S. lycopersicum* die durch *PiNPP1.1* ausgelöste Nekrosenbildung während der biotrophen Phase, um diese zu fördern (Kelley *et al.* 2010).

Die Bekämpfung der Kraut- und Knollenfäule stellt nach wie vor ein großes Problem dar. Der Einsatz von Pestiziden ist kostenintensiv und belastet die Umwelt. Ebenso ist die Züchtung resistenter Sorten, aufgrund der schnellen Anpassungsfähigkeit des Oomyceten an die Umwelt und demzufolge des Auftretens von neuen virulenten Stämmen nicht von sehr langer Dauer. Aus diesem Grund besteht reges Interesse an der Identifizierung und Analyse von Komponenten, die zur Abwehr von *P. infestans* beitragen.

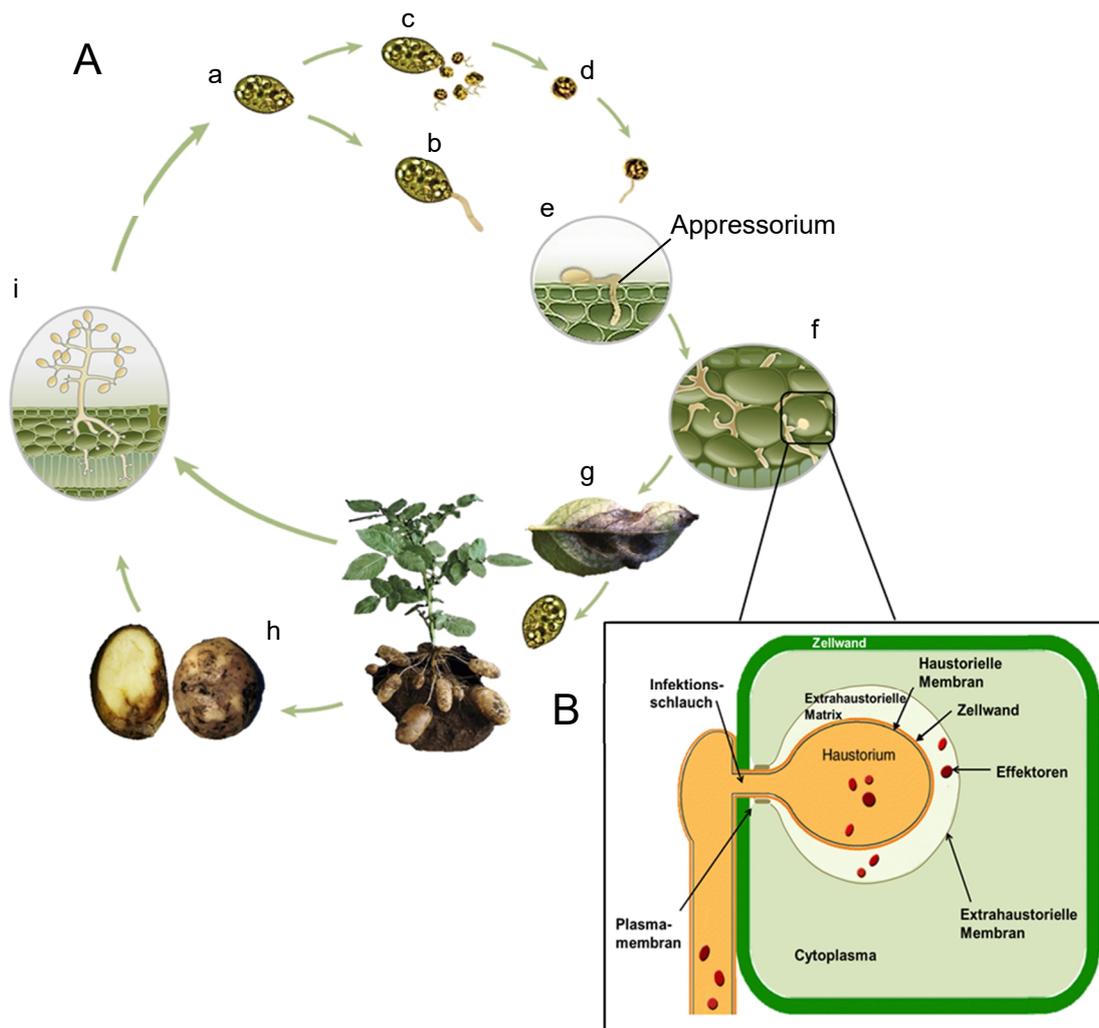


Abbildung 1.5: Asexueller Infektionszyklus von *P. infestans* auf anfälligen *S. tuberosum*-Pflanzen.

(A) Die Infektion durch *P. infestans* erfolgt für gewöhnlich durch Sporangien (a) oder durch begeißelte Zoosporen. Die Sporangien keimen bei hohen Temperaturen und hoher Luftfeuchtigkeit direkt aus (b) oder entlassen bei niedrigeren Temperaturen heterokont begeißelte Zoosporen (c), die nach Endocystierung (d) auf der Blattoberfläche auskeimen (e). Nach der Keimung und Ausbildung eines Appressoriums dringt das Pathogen mit Hilfe einer dünnen Penetrationshyphe in die Epidermiszellen ein und bildet Infektionsvesikel. Ausgehend von der infizierten Epidermiszelle erfolgen das interzelluläre Wachstum der sich verzweigenden Hyphen und die Ausbildung von Haustorien (f+B). Im Laufe der Infektion entstehen nekrotische Bereiche im befallenen Pflanzengewebe (g+h) und Sekundärhyphen aus denen sich neue Sporangienträger mit Sporangien entwickeln (i). Bildquellen: a, www.archive.bio.ed.ac.uk/jdeacon/FungalBiology/Fig5_17; e, f, i, http://www.burnheads.de/images/illustration/illus_med_phytophthora_3-5; g, plantpath.cornell.edu; h, www.blog.savatree.com/wp-content/uploads/potatolb_tuber_johnson2x1200, [ag.ndsu.edu content.ces.ncsu.edu](http://ag.ndsu.edu/content.ces.ncsu.edu)

(B) Struktur eines Haustoriums biotropher und hemibiotropher filamentöser Pathogene (verändert nach Catanzariti *et al.* 2007). Haustorien entstehen während der Infektion, nach Penetration der Zellwand und Einstülpen der Plasmamembran der Wirtszelle. Durch eine extrahaustorielle Matrix und -Membran bleiben sie vom Wirtscytoplasma separiert. Die Haustorien sekretieren Effektorproteine in die extrahaustorielle Matrix. Von dort aus werden sie vermutlich über wirtseigene Aufnahmemechanismen direkt oder über Vesikel in die Pflanzenzelle transportiert. Im Cytoplasma verändern sie den Metabolismus und die Abwehrmechanismen der Wirtspflanze.

1.5 DIE PFLANZLICHE IMMUNANTWORT

Pflanzen sind gegenüber der Mehrheit der Pathogene resistent, so dass ein Befall und die oft damit verbundene Pathogenese nur selten erfolgt (Prell *et al.* 2001). Die pflanzliche *Nichtwirtsresistenz* (Basisresistenz oder Basisinkompatibilität) ist eine Form der Resistenz, bei der alle Ökotypen einer Pflanzenart gegenüber aller Isolate einer bestimmten Mikrobenspezies resistent sind (Nürnberger & Lipka 2005). Eine der Hauptkomponenten der Resistenz bildet die basale Abwehr. In anfälligen Pflanzen limitiert diese rassenunspezifische Wirtsresistenz die Schwere der Erkrankung (Hückelhoven 2007). Die basale Resistenz umfasst neben konstitutiv präformierten physikalischen und chemischen Barrieren auch induzierte Abwehrmechanismen. Zu den präformierten physikalischen Barrieren gehören die pflanzliche Zellwand, die wachshaltige Kutikula, das Periderm, aber auch die schützenden Barrieren der Wurzel, wie die Exo- und Endodermis. Diese physikalischen Barrieren schützen die Pflanze nicht nur vor dem Eindringen der Pathogene, sondern geben der Pflanze auch Halt und Festigkeit (Freeman & Beattie 2008, De Coninck *et al.* 2015). Präformierte chemische Barrieren umfassen antimikrobiell wirkende Substanzen wie z. B. Phenole, Saponine, Lactone, cyanogene Glykoside oder in *S. tuberosum* auch Glykoalkaloide (Osbourn 1996, Freeman & Beattie 2008). Induzierte Mechanismen dieser Abwehr sind u.a. die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), die Synthese sekundärer Metaboliten und die Akkumulation antimikrobieller Komponenten, wie Phytoalexine. Beispiele für letztere sind unter anderem das Alkaloid Camalexin in *Arabidopsis* oder in *S. tuberosum* die Sesquiterpene Lubimin und Rishitin (Ward & Stoessl 1977, Noritake *et al.* 1996, Bednarek & Osbourn 2009, Bednarek *et al.* 2009, 2014). Zusätzlich sind die Reorganisation und Polarisierung der Aktinfilamente, Zellwandverstärkungen u.a. durch die Auflagerung von Kallose an der Penetrationsstelle des Pathogens und Stomataverschluss als induzierte Abwehrmechanismen zu nennen (Kobayashi *et al.* 1997, Melotto *et al.* 2008, Schwessinger & Zipfel 2008, Yang *et al.* 2014).

Wichtig für die Initiation der aktiven Pathogenabwehr ist die Erkennung des Pathogens durch pflanzliche Perzeptionssysteme. Die Erkennung beruht vor allem auf Pathogen-/Mikroben-assoziierten Oberflächenstrukturen, sogenannten *Pathogen/Microbe-Associated Molecular Patterns* (PAMPs), durch Rezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs). Die daraus resultierende Resistenz verhindert eine weitere Kolonisierung der Pflanze und wird *PAMP-Triggered Immunity* (PTI) genannt (Jones & Dangl 2006; Abbildung 1.6 Punkt 1). PAMPs sind i.d.R. charakteristisch für eine bestimmte Mikrobenspezies, kommen jedoch nicht in ihrem

potentiellen Wirt vor. Sie sind entweder oberflächenexponierte Strukturen oder können vom Pathogen sekretiert werden. Für die mikrobiellen Organismen sind PAMPs von funktioneller Bedeutung und daher evolutionär stark konserviert (Nürnberg & Lipka 2005, Ingle *et al.* 2006, Bent & Mackey 2007, Schwessinger & Zipfel 2008). Ist das Pathogen nicht in der Lage, die PTI zu umgehen, wird die Vermehrung des Erregers im Apoplasten verhindert. In diesem Stadium sind keine bzw. kaum Krankheitssymptome makroskopisch sichtbar. Pflanzen mit Defekt in der PAMP-Perzeption zeigen eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber virulenten Bakterien (Zipfel *et al.* 2004, Gimenez-Ibanez *et al.* 2009) wie auch gegenüber pilzlichen Pathogenen (Miya *et al.* 2007) und unterstreichen die Bedeutung der PTI in der basalen Resistenz.

PAMPs, die als generelle exogene Elicitoren der Abwehrreaktion fungieren, umfassen (Poly)peptide, Glykoproteine, Lipide und Oligosaccharide. Repräsentative Beispiele für PAMPs der gram-negativen Bakterien sind Lipopolysaccharide (LPS), Peptidoglycane (PGN), Flagellin und der Elongationsfaktor EF-TU (Felix *et al.* 1999, Newman *et al.* 2002, Kunze *et al.* 2004, Nürnberg & Lipka 2005, Willmann *et al.* 2011). Des Weiteren fungieren Ergosterol und Zellwandbestandteile wie Chitin, als Elicitoren der Pilze (Kaku *et al.* 2006, Lochman & Mikes 2006, Shinya *et al.* 2014). Einige Nekrose-induzierende Elicitoren phytopathogener Oomyceten sind Sterol-bindende Elicitine (Bsp. Infestin1) und PiNPP1 (Nekrosen-induzierendes Protein aus *Phytophthora*), CBELs (*Cellulose-Binding Elicitor Lectins*), β -Glucane und sekretierte Transglutaminasen (Gijzen & Nürnberg 2006, Qutob *et al.* 2006, Kawamura *et al.* 2009, Newman *et al.* 2013). Neben exogenen Elicitoren fungieren auch endogene Abbauprodukte der pflanzlichen Zellwand infolge eines Pathogenbefalls, sogenannte *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), als Elicitoren. Ein prominentes Beispiel für degradierte Zellwände sind Oligogalacturonide (Ridley *et al.* 2001, Ferrari *et al.* 2013) oder Kutinmonomere (Fauth *et al.* 1998). Kürzlich wurde PpOPEL als ein die basale Abwehr induzierendes Elicitorprotein von *Phytophthora parasitica* beschrieben (Chang *et al.* 2015).

Innerhalb der PAMPs existieren kurze Epitope mit einer Länge von 10 bis 30 Aminosäuren, die eine stärkere Abwehrreaktion elicitieren als das gesamte Protein, darunter das flg22-Peptid von Flagellin, elf13, elf18 und elf26 des Elongationsfaktors EF-TU, Chitin Oligosaccharide sowie das Peptid Pep-13 (Felix *et al.* 1999, Brunner *et al.* 2002, Kunze *et al.* 2004, Ingle *et al.* 2006).

Die pflanzlichen Abwehrreaktionen gegen mikrobielle Infektionen basieren wie die angeborenen Immunreaktionen in tierischen Systemen auf die Erkennung der mikrobiellen Strukturen durch membrangebundene PRRs (Zipfel & Felix 2005). Diese bilden plasmamembranlokalisierte Rezeptorkomplexe mit einer spezifischen ligandenbindenden extrazellulären Domäne, die eine sensitive und schnelle Perzeption potentieller PAMPs an der Zelloberfläche ermöglicht (Albert 2013). In *A. thaliana* beispielsweise erfolgt die Erkennung von Flagellin über flg22 durch die Rezeptorkinase (*Receptor-Like Kinase*, RLK) FLS2 (*FLAGELLIN-SENSITIVE 2*) und elf18 des *Escherichia coli* Elongationsfaktors TU durch den EFR (EF-TU Rezeptor) (Gomez-Gomez & Boller 2000, Kunze *et al.* 2004, Chinchilla *et al.* 2006). Nach der Ligandenbindung hetero-dimerisieren die Rezeptoren mit BAK1 (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1 (BRI1)-Associated Kinase1*), einem Co-Rezeptor zur Erhöhung der Kinase-Aktivität und zur Initialisierung der Signaltransduktion (Schulze *et al.* 2010, Roux *et al.* 2011). Als Co-Rezeptor reguliert BAK1 neben der FLS2- und EFR-vermittelten Pathogenabwehr u.a. die Kontrolle des Pflanzenwachstums (Li *et al.* 2002, Chinchilla *et al.* 2009), fungiert als negativer Regulator des pflanzlichen Zelltods (Kemmerling *et al.* 2007) und fungiert vor allem als positiver Regulator der PTI. So werden BAK1 vermittelte Abwehrantworten nicht nur durch flg22 und elf18 ausgelöst sondern ebenso durch die PAMPs LPS, PGN und das Oomyceten-PAMP INF1 (Heese *et al.* 2007, Chaparro-Garcia *et al.* 2011, Roux *et al.* 2011, Chaparro-Garcia *et al.* 2015). Weitere PRRs unterscheiden sich strukturell von den bereits erwähnten und perzipieren pilzliches Chitin, Xylanasen aber auch Glucane der Oomyceten. In *A. thaliana* bildet die Rezeptorkinase CERK1 (*CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1*) ein Homo-Dimer-Rezeptorkomplex durch die Perzeption von Chitin-Oligomeren (Miya *et al.* 2007, Liu *et al.* 2012), die anders als bei FLS2 und ERF unabhängig von BAK1 erfolgt (Gimenez-Ibanez *et al.* 2009).

Die PAMP-aktivierten PRRs initiieren intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden, die schließlich die Abwehrreaktionen gegen Pathogene vermitteln. Eine der frühesten physiologischen Reaktionen nach PAMP-Perzeption sind Ionenflüsse an der Membran, im Speziellen der Einstrom extrazellulären Calciums (Ca^{2+}) in das Cytosol und die damit verbundene Aktivierung anderer Membrantransporter (H^+ -Einstrom; K^+ -, Cl^- - und NO_3^- -Ausstrom), welche in einer Depolarisation der Plasmamembran resultieren (Boller & Felix 2009, Jeworutzki *et al.* 2010, Ranf *et al.* 2011). Diese rezeptorvermittelte Aktivierung der Ionenkanäle ist notwendig für die nachfolgende Signalweiterleitung und die Induktion der Abwehrreaktionen (Zimmermann *et al.* 1997, Ma *et al.* 2013). Neben der Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinasen (CDPKs; Romeis *et al.* 2001) beinhalten diese die Generierung von

ROS (z. B. Superoxid-Anionen, Wasserstoffperoxid) und Stickstoffmonoxid (NO; Nürnberger & Scheel 2001, Ranf *et al.* 2011). Diese können gegen die Ausbreitung von Pathogenen, sowohl durch ihre toxische Wirkung als auch mit der Etablierung physiologischer Barrieren wie der Papillenbildung im Bereich der Penetrationsstelle und der Verstärkung der Zellwand (wie Suberin und Lignin) oder ihrer Funktion als Signalmolekül beitragen (Torres *et al.* 2006, Torres 2010, Lehmann *et al.* 2015). Papillen sind Zellwandverdickungen unterhalb des Keimschlauches auf der Innenseite der Epidermiszellwand und werden größtenteils durch die Einlagerung von Kallose gebildet (Schmelzer 2002, Voigt 2014). Zusätzlich können ROS und NO einen HR (*Hypersensitiven Response*)-ähnlichen Zelltod induzieren (Bellin *et al.* 2012). Eine weitere frühe PAMP-induzierte Reaktion ist die Aktivierung von MAPK-Kaskaden (*Mitogen-activated protein kinase*, MAPK), wie beispielsweise in *Petroselinum crispum* (Petersilie) durch Pep-13 (Ligterink *et al.* 1997). Die MAPK-Signalkaskaden involvieren mindestens drei funktionelle Proteinkinasen, die nacheinander phosphoryliert werden (Rodriguez *et al.* 2010, Wu *et al.* 2014). MAPKs stellen die terminalen Elemente dieser Signalketten dar und regulieren u.a. durch die (In)Aktivierung verschiedener Substrate metabolische Prozesse oder die Expression von Abwehrgenen (Zipfel *et al.* 2006, Nicaise *et al.* 2009, Bigeard *et al.* 2015). Darüber hinaus haben MAPK-Kaskaden eine entscheidende Funktion in der pflanzlichen Signaltransduktion u. a. in der Pflanzenentwicklung und der pflanzlichen Antwort gegenüber abiotischem Stress (Rodriguez *et al.* 2010, Meng *et al.* 2013). Eine späte Reaktion und klassischer Marker der PTI ist die lokale Synthese von Kallose zur Verstärkung der Zellwände (Gómez-Gómez *et al.* 1999, Nicaise *et al.* 2009). Späte Ereignisse sind weiterhin Hormon-gerichtete metabolische Veränderungen und induzierte Resistenz (Hückelhoven 2007).

Im Laufe der Evolution entwickelten sich in den Pathogenen diverse Mechanismen, die eine PRR-vermittelte Pathogen-Perzeption verhinderten. Beispielsweise kam es zur Maskierung oder zum Verlust bestimmter PAMPs. (Abramovitch *et al.* 2006, Bent & Mackey 2007). Darüber hinaus sind manche Pathogene zur Sekretion von Effektormolekülen in der Lage (Abbildung 1.6 Punkt 2). Diese von den Pathogenen synthetisierten und in den Apoplasten oder ins Cytoplasma der Pflanzenzelle sekretierten niedermolekularen Proteine fördern als Toxine oder Virulenzfaktoren die Penetration und Infektion der Wirtszelle. Sie unterdrücken oder manipulieren gezielt die PTI auf Ebene der Signalperzeption und -transduktion oder modifizieren den Wirtsmetabolismus und die pflanzliche Abwehrantwort, um zur Fitness des Pathogens und dessen Vermehrung beizutragen (Abbildung 1.6 Punkt 3; Grant *et al.* 2006, Kamoun 2006, Birch *et al.* 2009, Bozkurt *et al.* 2012, Kuhn & Panstruga 2014). Pflanzen, die

nicht in der Lage sind Effektoren zu erkennen, werden zu Wirtspflanzen und sind suszeptibel gegenüber diesen Pathogenen (Wirtssuszeptibilität oder Basiskompatibilität). So wird nach PAMP-Perzeption eines virulenten Pathogens zwar zunächst die basale Abwehr aktiviert, nur reicht diese Antwort aufgrund der Funktion der Effektoren nicht aus, um in suszeptiblen Pflanzen die Resistenz aufrecht zu erhalten (Jones & Dangl 2006). Das virulente Pathogen ist in diesen (suszeptiblen) Pflanzen in der Lage, bis zur Vollendung seines Lebenszyklus die Wirtspflanze zu besiedeln – einhergehend mit der Ausprägung von Krankheitssymptomen. Diese kompatible Interaktion wird auch als *effector-triggered susceptibility* (ETS) bezeichnet (Abbildung 1.6 Punkt 3; Jones & Dangl 2006).

Die meisten Effektorproteine sind innerhalb des Wirtscytoplasmas aktiv, wo sie gezielt die PTI inhibieren. Sie werden durch spezifische Sekretionssignale vom Pathogen transloziert. Die Sekretionssysteme der Bakterien sind gut bekannt, wobei für viele gram-negative pflanzenpathogene Bakterien das Typ-III-Sekretionssystem entscheidend für deren Pathogenität ist. Dabei werden die bakteriell kodierte Effektor-Proteine über eine hoch konservierte, Nadel-ähnliche Struktur, dem Pilus, in das Cytosol eukaryotischer Zellen sekretiert (Bent & Mackey 2007, Schornack *et al.* 2010, Büttner 2012).

Im Vergleich zu den Bakterien, sind die Mechanismen zur Translokation pilzlicher und Oomyceten Effektoren noch relativ unbekannt (Petre & Kamoun 2014). Viele filamentöse Pathogene sekretieren cytoplasmatische Effektoren über Haustorien in das Cytoplasma pflanzlicher Wirtszellen (siehe Abschnitt 1.4). Charakteristisch für cytoplasmatische Effektoren ist ein kurzes N-terminales Signalpeptid gefolgt von einer Translokationsdomäne, welche den Eintritt in die Wirtszelle ermöglicht. Die Virulenzfunktion der Effektoren wird von der C-terminalen Region kodiert (Kamoun 2006). Die zwei bedeutendsten Familien translozierter Effektoren der Oomyceten sind die Familien der RXLR-Effektoren und die der Crinkler-Effektoren (CRN-Proteine; Schornack *et al.* 2010, Wawra *et al.* 2012, Petre & Kamoun 2014). Ein Beispiel für einen RXLR Effektor ist Avr3a von *P. infestans*. In suszeptiblen Wirtspflanzen blockiert Avr3a die an der Plasmamembran durch PAMP ausgelösten Signaltransduktionskaskaden, unterdrückt den *oxidative burst* und den durch *Phytophthora* INF1 ausgelösten Zelltod aufgrund der Interaktion mit der Pflanzen E3 Ubiquitin Ligase CMPG1, wodurch Avr3a während der Infektion zur Virulenz des Pathogens beiträgt (Bos *et al.* 2010, Chaparro-Garcia *et al.* 2015).

Neben den cytoplasmatischen Effektoren gibt es zusätzlich apoplastische Effektoren. Diese beeinträchtigen pflanzliche apoplastische Proteine, die in die Pathogenabwehr involviert sind und stören u. a. durch Inhibierung von Glucanasen, Serin- und Cysteinproteasen die PTI

(Kamoun 2006, Schornack *et al.* 2009). Ihre Sekretion erfolgt über Appressorien bzw. interzelluläre Hyphen (Chaudhari *et al.* 2014). Zwei effiziente Serin-Protease-Inhibitoren von *P. infestans* sind z. B. EPI1 und EPI10. Ebenso inhibieren die von *P. infestans* sekretierten Cystein-Protease Inhibitoren EPIC1 bis EPIC4 die Proteasen des Wirts, um die Infektion zu fördern (Tian *et al.* 2007).

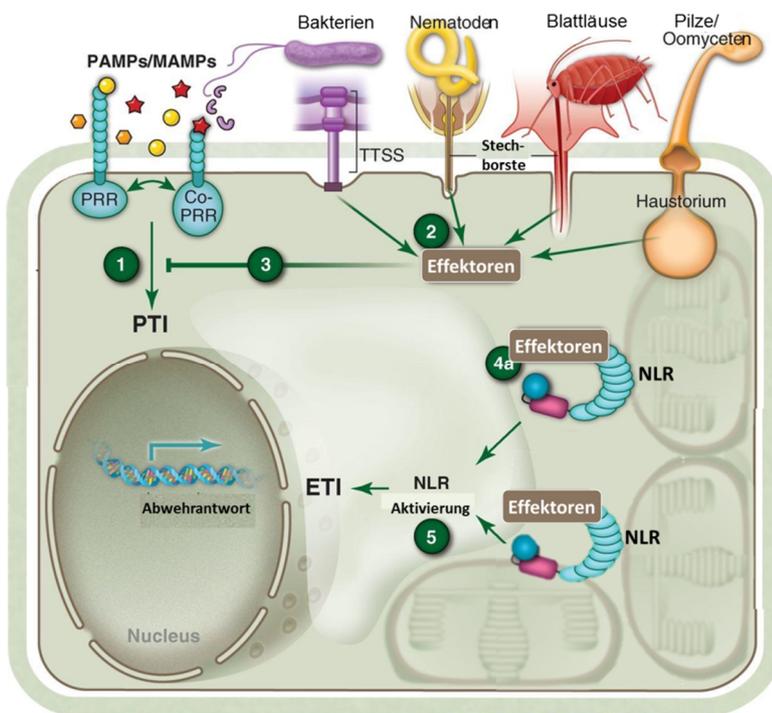


Abbildung 1.6: Modell der pflanzlichen Abwehrsysteme (verändert nach Dangl *et al.* 2013).

Pathogenspezifische Moleküle (PAMPs/MAMPs) verschiedener Pathogene (Farbcodierung) werden durch membranständige Rezeptoren (PRRs) erkannt und induzieren die PAMP-triggered immunity (PTI; 1). Häufig erfordert die Signalfunktion der PRRs eine Liganden-abhängige Rezeptor-Komplexbildung mit einem Co-Rezeptor (Co-PRR). Erfolgreiche Pathogene verursachen Virulenz, *effector-triggered susceptibility* (ETS; 3) durch die Sekretion virulenter Effektoren in den Apoplasten und in die Pflanzenzelle (2), um zum einen die PAMP/MAMP-Perzeption zu blockieren (nicht abgebildet) und zum anderen die PTI zu unterdrücken (3). Die Effektoren bzw. deren Aktivität

wird von co-evolutiven R-Genen, kodierend für intrazelluläre Rezeptoren (NLR-Proteine), wahrgenommen (4a) und induzieren Effektor-triggered immunity (ETI, 5). Die Aktivierung der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktionen, der PRRs und NLRs, führen zur transkriptionellen Umprogrammierung und Initiierung komplexer Abwehrantworten, die die Pathogen-Vermehrung limitieren und zur Resistenz der Pflanzen beitragen (Dangl *et al.* 2013).

Anders als zuvor genannte Beispiele kann ein Effektor mit Virulenzfunktion auch avirulent sein. Die genetische Basis dafür beruht auf der *Gen-für-Gen*-Hypothese von (Flor 1971). In diesem Falle erwerben Pflanzen Resistenzgene (*R*-Gene), deren Genprodukte- die Resistenzproteine (*R*-Proteine)- die Effektoren als Virulenzfaktoren entweder direkt oder u.a. die Effektor-bedingten Modifikationen von pflanzlichen Zielproteinen („*guard hypothesis*“) erkennen und pflanzliche Resistenzreaktionen ermöglichen (Dangl & Jones 2001, van der Hoorn & Kamoun 2008). Diese Effektoren, auch *Avr*-Proteine genannt, sind Produkte der Avirulenz (*Avr*)-Gene (van den Ackerveken 1996, Chaudhari *et al.* 2014). Die durch die Interaktion eines *Avr*-Proteins mit einem entsprechend komplementären *R*-Protein ausgelöste Abwehrreaktion und resultierende Resistenz wird als *Effector-Triggered Immunity* (ETI) bezeichnet (Abbildung 1.6 Punkt 5). Die ETI ist rassenspezifisch (Thomma *et al.* 2011).

Fehlt eines der beiden komplementären Gene oder ist eines der beiden Genprodukte nicht funktionell, resultiert dies in einer krankheitsauslösenden kompatiblen Interaktion (Chisholm 2006, Jones & Dangl 2006). *R*-Gene stellen häufig cytoplasmatische rezeptorähnliche Proteine dar, die meist zur Gruppe der NB-LRR-Proteine (*Nucleotide Binding-Leucine Rich Repeat*-Proteine; auch NLR-Proteine genannt) gehören (Abbildung 1.6 Punkt 4a; (Hammond-Kosack & Jones 1997, Vidhyasekaran 2007). Beispielsweise kodiert das Resistenzgen *RI* der Wildkartoffel *S. demissum* für einen Vertreter der NB-LRR-Proteine, welches die Erkennung von *PiAvr1* und Resistenz gegen *P. infestans* vermittelt (van der Lee *et al.* 2001, Ballvora *et al.* 2002). Ebenso führt die Erkennung des bereits erwähnten Effektors *Avr3a* aus *P. infestans* durch das Kartoffel Resistenzprotein *R3a*, ein Mitglied der CC (*coiled coiled*)-NB-LRR Proteinfamilie, zu einer ETI (Chapman *et al.* 2014).

Die *R*-Gen-vermittelten Signalmechanismen und Abwehrantworten ähneln denen der PTI, weshalb angenommen wird, dass die ETI eine Verstärkung der PTI-Antwort ist (Henry *et al.* 2013). Neben der Aktivierung und Akkumulation gemeinsamer Abwehrgene nach PAMP- oder Effektor-Perzeption umfassen die Abwehrreaktionen der ETI ähnlich der PTI, die Generierung von ROS bzw. NO, die Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Signalkaskaden und von MAPKs, die transkriptionelle Reprogrammierung und die Synthese der Stresshormone Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA) und Ethylen (ET) (Navarro *et al.* 2004, Cui *et al.* 2015). SA vermittelt vor allem die Abwehr von biotrophen und hemibiotrophen Pathogenen, JA und ET hingegen eher die Resistenz gegenüber Insekten und einigen nekrotrophen Pathogenen (Robert-Seilaniantz *et al.* 2007). Je nach Pathogen wird eine antagonistische Wirkung zur Feinabstimmung der Reaktionen oder ein synergistisches Zusammenwirken der SA- und JA/ET-vermittelten Abwehrreaktionen vermutet (Durrant & Dong 2004). Außerdem scheinen weitere Phytohormone wie z. B. Gibberellin und Abscisinsäure (ABA) zur pflanzlichen Immunantwort beizutragen (Robert-Seilaniantz *et al.* 2007, Naseem *et al.* 2015).

Die Resistenzreaktionen der ETI sind dabei meist stärker und länger anhaltend als die der PTI (Thomma *et al.* 2011). Zudem kennzeichnet ein schneller und lokaler programmierter Zelltod des infizierten Gewebes in Form einer HR (hypersensitive Reaktion), die *R*-Gen-vermittelte Abwehrantwort (Greenberg & Yao 2004, Abramovitch *et al.* 2006). Diese HR wird generell nicht mit der PTI assoziiert und dient zur Limitierung der Ausbreitung des Pathogens (Abramovitch *et al.* 2006). Die HR induziert eine lokale Resistenz an der Stelle der Infektion und kann zur SAR (*Systemic Acquired Resistance*) führen (Sanabria *et al.* 2010, Henry *et al.* 2013). Die SAR vermittelt einen dauerhaften Schutz gegen Pathogene über das gesamte Pflanzengewebe, verbunden mit der Akkumulation von *pathogenesis-related* (PR)-Proteinen

und SA als essentielles Signalmolekül für die Induktion von SAR (Durrant & Dong 2004). Aufgrund der ähnlichen Abwehrreaktionen der PTI und ETI wird eine Überlappung der *downstream* Signalwege angenommen (Shen & Schulze-Lefert 2007). So induziert die PAMP Erkennung von LPS nicht nur lokale Antworten sondern auch SAR und Flagellin bzw. flg22 eine HR (Mishina & Zeier 2007, Naito *et al.* 2008, Bari & Jones 2009).

1.6 DIE ROLLE DES PAMPS PEP-13 IN DER ABWEHR VON *SOLANUM TUBEROSUM* UND IDENTIFIZIERUNG DES KANDIDATENGENS *ABCG1*

Das PAMP Pep-13 (VWNQPVRGFKVYE), ein 13 Aminosäuren umfassendes Peptidfragment, wurde als Bestandteil des C-Terminus einer extrazellulären Zellwand-Transglutaminase aus *Phytophthora sojae* identifiziert (Nürnberger *et al.* 1994, Brunner *et al.* 2002). Pep-13 ist stark konserviert in den Transglutaminasen der Gattung *Phytophthora* und kommt nicht in Pflanzen vor. Das 13 Aminosäure-Sequenzmotiv, vor allem Tryptophan und Prolin, ist von entscheidender Bedeutung für die Enzymaktivität der Transglutaminasen und ebenso essentiell und ausreichend für die Elicitoraktivität in *P. crispum* und *S. tuberosum* (Parker 1991, Nürnberger *et al.* 1994, Brunner *et al.* 2002, Halim *et al.* 2004). Das Peptid W2A (VANQPVRGFKVYE) enthält eine Mutation des Pep-13-Motivs mit einem Aminosäureaustausch von Tryptophan gegen Alanin an der Position 2 („W2A“) und zeigt gegenüber dem Pep-13-Peptid eine drastische Reduktion der Elicitor- und Enzymaktivität (Brunner *et al.* 2002).

In früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die exogene Applikation von Pep-13, durch Infiltration in Kartoffelzellen, zu SA- und JA-abhängigen lokalen Abwehrantworten führt (Abbildung 1.7; Halim *et al.* 2004, 2009). Diese umfassen u.a. die Generierung von ROS sowie einen HR-ähnlichen Zelltod und die Aktivierung von Abwehrgenen (Halim *et al.* 2004). So zeigen transgene Kartoffelpflanzen mit verändertem SA- bzw. JA-Gehalten eine verminderte Abwehrantwort nach Pep-13-Behandlung (Halim *et al.* 2004, 2009). Dazu gehören *NahG*-exprimierende Pflanzen, die aufgrund der konstitutiven Expression der bakteriellen Salicylat-Hydroxylase einen geringeren SA-Level aufweisen (Halim *et al.* 2004), sowie Kartoffelpflanzen, die RNAi-Konstrukte gegen *StOPR3* (12-Oxophytodiensäure-Reduktase 3), *StAOC* (Allenoxidcyclase) oder *StCOI1* (Coronatine-insensitive 1) exprimieren, was in einer verminderten JA-Biosynthese bzw. verminderter Funktion der JA-Perzeption resultiert (Halim *et al.* 2006, 2009).

Der nach Pep-13-Infiltration beobachtete HR-ähnliche Zelltod in *S. tuberosum* scheint spezifisch zu sein, da u. a. *P. crispum*, *S. lycopersicum* und *Arabidopsis* keine Nekrosen oder Anzeichen von Zelltod nach Infiltration des PAMPs aufweisen (Brunner *et al.* 2002, Halim *et al.* 2004). Zudem führt eine Infektion mit *P. infestans* von anfälligen und zuvor mit Pep-13 behandelten Kartoffelpflanzen zu einem reduzierten Pathogenwachstum und zur systemischen Resistenz (Halim 2006).

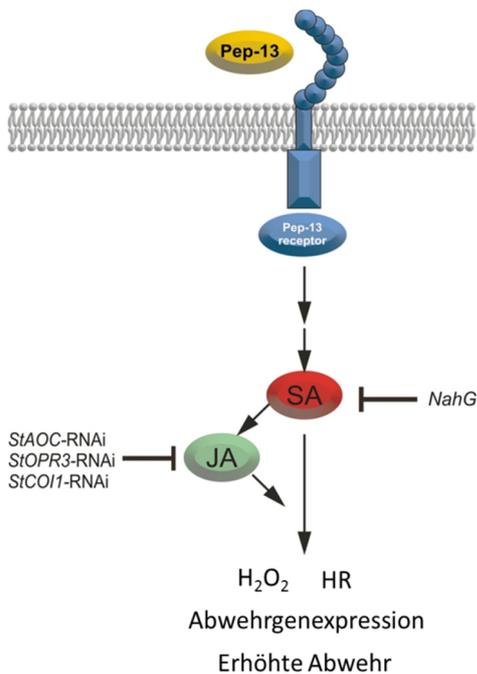


Abbildung 1.7: Modell der Pep-13-induzierten Abwehrreaktionen in *S. tuberosum*.

Nach Infiltration von Kartoffelblättern induziert die rezeptorvermittelte Bindung von Pep-13 die Akkumulation von SA. Dieses Signalmolekül liegt upstream der induzierten JA-Akkumulation und ist notwendig für die Generierung von H₂O₂ sowie einem HR-ähnlichen Zelltod. Eine Reduktion der JA-Gehalte resultiert in einer verminderten Akkumulation von H₂O₂ sowie auch einem weniger ausgeprägten HR-ähnlichen Zelltod.

Um die molekularen Mechanismen weiter aufzuklären, die zu einer erhöhten Resistenz in der anfälligen Kartoffelsorte Désirée beitragen, wurden in einer vorangegangenen Promotionsarbeit von Simone Altmann, Microarray-Analysen durchgeführt. Es sollten Pep-13-induzierte, JA-abhängig exprimierte Gene identifiziert werden, die in diese PAMP-vermittelte Abwehr involviert sind (Altmann 2009). Dafür wurden Arrays der *Potato Oligo Chip Initiative* (POCI) mit 42.000 EST-Sequenzen aus *S. tuberosum* verwendet (Kloosterman *et al.* 2008). Die Hybridisierung der POCI-Chips erfolgte mit cDNA aus Kartoffelblättern von *StAOC*-, *StOPR3*- und *StCOI1*-RNAi-Pflanzen, wie auch aus Wildtyppflanzen (WT) nach Infiltration mit Pep-13 bzw. mit dem inaktiven Analogon W2A (Altmann 2009). Es wurden mehr als 700 ESTs mit einer im WT mindestens 2-fach erhöhten Expression nach Pep-13-Behandlung identifiziert, von denen 65 eine JA-Abhängigkeit zeigten (Altmann 2009).

Eine der hoch Pep-13-responsiven und JA-abhängig exprimierten EST-Sequenzen aus dem Microarray wurde dem Gen eines möglichen ABC-Transporters der Unterfamilie G zugeordnet und dieses, im nachfolgenden *ABCG1* genannt, für eine weitere Charakterisierung im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit ausgewählt. Die Abbildung 1.8 fasst die Ergebnisse der *ABCG1*-Expression entsprechend der Microarray-Analysen von Simone Altmann zusammen.

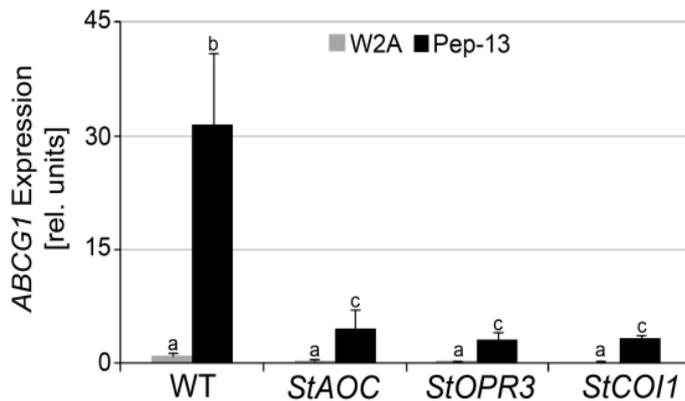


Abbildung 1.8: Ergebnisse der vorausgegangenen Microarray-Analyse von *ABCG1*.

Hybridisierung des POCI-Microarrays mit cDNA, generiert aus Blatt-RNA drei Wochen alter Wildtyp- und transgener *AOC*-RNAi-, *OPR3*-RNAi- und *COI1*-RNAi-Pflanzen, nach Behandlung mit 100 μ M Pep-13 (schwarze Balken) und dem inaktiven Analogon W2A (graue Balken). Die Ernte der Blätter erfolgte jeweils acht Stunden nach Behandlung. Die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen

statistisch signifikante Unterschiede (Student's T-test, $p \leq 0,03$) (Altmann 2009).

1.7 ZIELSTELLUNG

Bislang ist noch kein Mitglied der Unterfamilie der ABCG-Halbtransporter aus *S. tuberosum* näher charakterisiert. Das ausgewählte Kandidatengens *ABCG1* zeigte in Vorarbeiten Hinweise auf eine JA-abhängige Induktion durch Pep-13-Infiltration in Blättern susceptibler Kartoffelpflanzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Regulation und Funktion dieses möglichen ABCG-Halbtransporter-Gens näher untersucht werden. So galt es zunächst die Genexpression in Wildtyp-Kartoffelpflanzen zu analysieren, um erste Merkmale des Transporters zu charakterisieren. Anschließend war über einen RNAi-Ansatz die funktionelle Charakterisierung des Kandidatengens *ABCG1* in *S. tuberosum* cv. Désirée vorgesehen. Die hierfür verwendeten ABCG-RNAi-Pflanzen standen bereits zur Verfügung.

Zudem sollten Infektionsanalysen mit *P. infestans* neue Kenntnisse über die Bedeutung des ABCG-Halbtransporters für die Abwehr von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* erzielen, da Transportmechanismen, der für die in der Abwehrantwort involvierten Komponenten, von zentraler Bedeutung sind (Davies & Coleman 2000, Luo *et al.* 2007).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN, ENZYME UND OLIGONUKLEOTIDE

Sämtliche in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden in Analysequalität (p.a.) verwendet und sofern nicht anders vermerkt von den Firmen Sigma-Aldrich, Carl Roth, Serva, Merck, Bio-Rad und GE Healthcare bezogen. Die Inhaltsstoffe der Nährmedien als auch die Antibiotika stammten von Biozym, Duchefa Biochemie, Difco, Carl Roth, Sigma und Serva. Diverse Enzyme und Nukleotide wurden von den Firmen Invitrogen, Fermentas, New England Biolabs, Promega, Serva und Roche erworben. Die verwendeten Isotope [$\alpha^{32}\text{P}$]dATP- und [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP wurden von der Hartmann Analytik GmbH bezogen. Die Synthese von Oligonukleotiden (s. Anhang 7.1) wie auch die Sequenzierungen erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon.

2.1.2 MEDIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die Medien, Puffer und Lösungen mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$ angesetzt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer sind jeweils in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 gelistet.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung verwendeter Medien

| | |
|---|---|
| 2MS-/3MS-Medium (Murashige & Skoog 1962) 20 % (w/v) bzw. 30 % (w/v) Saccharose 4,41 % (w/v) MS-Salze, pH 5,8 (6 % (w/v) <i>plant agar</i>) | Vitaminlösung 0,5 g/l Nicotinsäure 0,5 g/l Pyridoxin-HCl 0,1 g/l Thiamin-HCl, pH 5,8 (KOH) |
| 2C-Medium 2MS-Agar 0,25 g/l Carbenicillin oder 0,25 g/l Cefotaxim | LB-Medium 10 % (w/v) Bacto-Trypton 5 % (w/v) Bacto-Yeast-Extract 5 % (w/v) NaCl, pH 7,0 (15 % (w/v) Agarose) |
| Hafer-Bohne-Medium 34 % (w/v) Bohnenmehl 17 % (w/v) Hafermehl 85 % (w/v) Saccharose 15 % (w/v) Agarose | CG76-Kallusinduktionsmedium GMS-Agar 2 g/l Glycin 0,1 % (v/v) Vitaminlösung 0,25 g/l Carbenicillin oder 0,25 g/l Cefotaxim 5 g/l Naphthyllessigsäure (NAA) 0,1 g/l Benzylaminopurin (BAP) |

| | |
|--|---|
| CG75-Sprossinduktionsmedium GMS-Agar 0,1 % (v/v) Vitaminlösung 0,25 g/l Carbenicillin oder 0,25 g/l Cefotaxim 2 g/l Zeatinriboside (ZAA) 0,02 g/l NAA 0,02 g/l Gibberellin A ₃ (GA ₃) | GMS-Medium 1,6 % (w/v) Glucose 4,41 % (w/v) MS-Salze (Duchefa), pH 5,8 (6 % (w/v) <i>plant agar</i>) |
|--|---|

Tabelle 2.2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen

| | |
|--|--|
| DNA-Extraktionspuffer: 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 50 mM EDTA, pH 8,0 500 mM NaCl 1,5 % (w/v) SDS | 10x MOPS-Puffer 200 mM Morpholinopropansulfonsäure (MOPS) 50 mM Natriumacetat 5 mM EDTA, pH 7,0 |
| RNA-Probenpuffer 50 % (v/v) Formamid 6 % (v/v) Formaldehyd 6 % (v/v) Glycerin 10 % (v/v) 10x MOPS 0,04 % (w/v) Bromphenolblau | MEN-Puffer 20 mM MOPS 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA, pH 7,0 |
| 20x SSC 3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat, pH 7,0 | Denaturierungspuffer 1,5 M NaCl 0,5 M NaOH |
| Neutralisierungspuffer 1,5 M NaCl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,0 | Hybridisierungspuffer 0,9 M NaCl 50 mM NaH ₂ PO ₄ 5 mM EDTA 0,1 % (w/v) SDS 50 % (v/v) Formamid 0,2 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon PVP 40 0,2 % (w/v) Ficoll 400 0,2 % (w/v) Rinderserumalbumin BSA >100 µg/ml hitzedenaturierte Heringssperma-DANN |
| TAE-Puffer 40 mM Tris 20 mM Essigsäure 2 mM EDTA | 10x DNA-Probenpuffer 50 % (v/v) Glycerin 120 mM EDTA pH 8,0 20 mM Tris/HCl pH 8,0 0,1 % (w/v) Bromphenolblau |
| Trizol-Lösung 87 % (v/v) Phenol 1,4 M Guanidiniumthiocyanat 0,7 M Ammoniumthiocyanat 183 mM Na-Acetat, pH 5,0 7 % (w/v) Glycerin | |

2.1.3 KLONIERUNGSVEKTOREN

Die Klonierungen basieren auf der Gateway®-Technology (Invitrogen). Alle verwendeten Klonierungsvektoren sind in Tabelle 2.3 gelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete Klonierungsvektoren

| Gateway®-System | Vektorbezeichnung | Promotor | Resistenz | Quelle/Referenz |
|-----------------|-------------------|----------|-----------|-------------------------------|
| - | pCR®2.1-TOPO® | T7 | Kan, Amp | Invitrogen |
| Entry-Vektor | pCR®8/GW/TOPO® TA | T7 | Spec | Invitrogen |
| Zielvektor | pUGW15 CFP | 35S | Kan, Hyg | (Nakagawa <i>et al.</i> 2007) |
| | pGWB14 | 35S | Kan, Hyg | (Nakagawa <i>et al.</i> 2007) |
| | pUBC-DEST-RFP | UBQ10 | Spec | (Grefen <i>et al.</i> 2010) |

Kan, Kanamycin; Amp, Ampicillin; Spec, Spectinomycin; Hyg, Hygromycin

2.1.4 BAKTERIENSTÄMME

Für Klonierungsarbeiten wurden chemokompetente *E. coli* DH5 α und *One Shot*® *Top10*-Zellen (Invitrogen) verwendet. Für die Agrobakterium-vermittelte Transformation von *S. tuberosum* wurde der *A. tumefaciens*-Stamm AGL0 (Lazo *et al.* 1991) verwendet.

2.1.5 PFLANZEN

Alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit der gegenüber *Phytophthora infestans* anfälligen Wildtyp (WT)-Kartoffelsorte *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée durchgeführt.

Für die funktionellen Analysen wurden suszeptible Désirée-Pflanzen mit einem *ABCG1*-RNAi-Konstrukt (s. Anhang 7.6) transformiert. Solche transgenen Linien standen zum einen bereits zur Verfügung (U. Smolka, IPB Halle) und wurden außerdem im Rahmen dieser Arbeit neu generiert. Darüber hinaus wurden Désirée-Linien generiert, welche die kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS) des *ABCG1*-Gens (s. Anhang 7.5) unter der Kontrolle eines 35S-Promotors überexprimieren. Für die funktionellen Analysen dienten Kartoffelpflanzen, die mit dem Vektor pGPTV (ohne Insert) transformiert wurden (A. Weinel, IPB Halle), als Empty Vektor (EV)-Kontrolle. Weiterhin wurden transgene Jasmonat-defiziente Pflanzen der Sorte Désirée, die RNAi-Konstrukte gegen *StAOC*, *StOPR3* und *StCO11* exprimieren (Halim *et al.* 2009), genutzt. Für die Isolierung von

Mesophyllprotoplasten wurden *Arabidopsis thaliana* L. Akzession Columbia (Col-0)-Pflanzen verwendet, dessen Saatgut vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen wurde.

2.1.6 *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Die Infektionsexperimente wurden unter Verwendung eines mit GFP-markierten *P. infestans*-Isolates, CRA208m2 (F. Mauch, Universität Fribourg, Schweiz; Si-Ammour *et al.* 2003), durchgeführt.

2.1.7 PEP-13

Die Peptide Pep-13 (VWNQPVRGFKVYE) und sein inaktives Analogon W2A (VANQPVRGFKVYE) wurden von S. Krüger (IPB Halle) mittels Festphasensynthese mit einem *Economy Peptide Synthesizer EPS221* (Abimed) hergestellt.

2.2 METHODEN

2.2.1 KULTIVIERUNG VON ORGANISMEN

2.2.1.1 BAKTERIENKULTIVIERUNG

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte auf LB-Agar (37 °C) oder als Schüttelkultur in LB-Medium (180-200 rpm, 37 °C) jeweils unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (für Resistenzen siehe Tabelle 2.3) bei 37 °C über Nacht. Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte auf LB-Agarplatten (28 °C) wie auch als Schüttelkultur in LB-Medium (120 rpm, 28 °C) unter Zugabe entsprechender Antibiotika (pHELLSGATE8 50 µg/ml Spectinomycin, pGWB14 50 µg/ml Kanamycin) bei 28 °C für zwei Tage.

2.2.1.2 PFLANZENKULTIVIERUNG

Die Vermehrung als auch die Kultivierung der verwendeten Kartoffelpflanzen erfolgten als Gewebekultur unter sterilen Bedingungen in einer Phytokammer (Langtagbedingungen mit 16 h Licht und einer Intensität von $\sim 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ bei 20 °C, 8 h Dunkel bei 18 °C, 60 % relative Luftfeuchte) auf 2C-Medium. Für die Etablierung dieser Kulturen wurden Sprossteklinge genutzt. Das 2C-Medium enthielt Antibiotika (Carbenicillin [250 µg/ml] oder Cefotaxim [250 µg/ml]), um einer Kontamination mit Agrobakterien vorzubeugen.

Die Selektion der transgenen Pflanzen erfolgte auf 2C-Medium, dem zusätzlich Kanamycin (Endkonzentration 50 µg/ml) zugegeben wurde.

Für die jeweiligen Experimente wurden ca. vier Wochen alte bewurzelte Stecklinge in gedämpfte Erde und Sand (1:1-Gemisch, v/v) getopft und für weitere drei bis vier Wochen in einer Phytokammer (Langtagbedingungen mit 16 h Licht [Intensität: $\sim 200 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$] bei 20 °C, 8 h Dunkel bei 18 °C, 60 % relative Luftfeuchte) angezogen. Für die Knollenexperimente und die Analyse des Periderms wurden 3 Monate alte Kartoffeln aus dem Gewächshaus verwendet. Zur Isolierung von Mesophyllprotoplasten wurden *A. thaliana* Col-0-Pflanzen auf einem Gemisch aus gedämpfter Einheitserde (GS90) und Vermiculit im Verhältnis 3:1 unter kontrollierten Kurztagbedingungen in einer Phytokammer (8 h Licht [Intensität: $\sim 160 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$], 20 °C bzw. 16 h Dunkel, 18 °C, 60 % relative Luftfeuchtigkeit) angezogen.

2.2.1.3 *PHYTOPHTHORA INFESTANS*-KULTIVIERUNG

Für Infektionsexperimente (s. Abschnitt 2.2.2.2) und die Herstellung von Dauerkulturen von *P. infestans* wurde Hafer-Bohne-Medium (Tabelle 1.1) verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 18 °C im Dunkeln auf Schrägagar in Erlenmeyerkolben bzw. auf Petrischalen. Zur Anfertigung der Dauerkulturen wurden zum einen etwa 0,5 cm große, von einer Kulturplatte ausgestochene Myzelstücke mit einem sterilem Glycerin-Wasser-Gemisch (1:1, v/v) versetzt, zum anderen wurden Dauerkulturen aus Sporangien angefertigt. Dafür wurde eine Schrägagarkultur mit elf Tage altem Myzel mit einem sterilen Gemisch aus Glycerin-Wasser (1:1, v/v) überschichtet und aliquotiert. Die Lagerung der Dauerkulturen erfolgte in flüssigem Stickstoff nach langsamen Abkühlen (30 min 4 °C, 30 min -20°C und über Nacht bei -80 °C, L. Westphal, IPB Halle).

2.2.2 EXPERIMENTE MIT PFLANZENBEHANDLUNGEN

2.2.2.1 BLATTVERWUNDUNGSEXPERIMENTE

Die Verwundung drei Wochen alter Pflanzen erfolgte durch 8-maliges Quetschen der Blätter der obersten Blattetage (zwei Blätter pro Pflanze) über die Mittelrippe mit einer Pinzette. Für die Analysen wurden ganze Blätter mit einem Skalpell geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bis zur Aufarbeitung für die qRT-PCR-Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.2.2 INFEKTIONSEXPERIMENTE MIT *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Für die Infektionsexperimente wurden zunächst von Dauerkulturen (s. Abschnitt 2.2.1.3) frische Kulturplatten angeimpft (Inkubation: 10-14 d, 18 °C im Dunkeln). Von einer *P. infestans*-Frischkultur wurde ein etwa 0,5 cm großes, myzelhaltiges Medium auf frisches Hafer-Bohne-Medium im Erlenmeyerkolben (liegend) transferiert und für weitere elf Tage (18 °C, im Dunkeln) inkubiert. Für die Gewinnung von Zoosporen wurde das Myzel mit 4 ml sterilem H₂O_{dd} überschichtet und bei 4 °C für 3,5 h (stehend) inkubiert. Anschließend erfolgte das Filtrieren der Sporensuspension über eine Gaze (Polyestergewebe mit 20 µm Porengröße, Durocas; (Lipka *et al.* 2005). Die Sporenkonzentration wurde, sofern nicht anders angegeben, auf 1x10⁵ Sporen/ml sterilem H₂O_{dd} eingestellt. Für die *P. infestans*-Infektionen wurden jeweils zwei Blätter der obersten Blattetage auf der Blattunterseite mit Tröpfchen (10 µl der Zoosporensuspension, 8-12 Tropfen/Blatt) inokuliert. Die für die *P. infestans*-Keimung und -Infektion nötige 100 %ige Luftfeuchte wurde durch Eintüten der inokulierten Blätter mit einem Kordelzugbeutel (160 x 240 mm, 50 µm Materialstärke; Roth) über 3 Tage gewährleistet (Halim *et al.* 2007). Die Inokulationsstellen wurden pro Pflanze mit einem Korkbohrer (Größe 3) ausgestanzt, vereinigt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bis zur Aufarbeitung bei -80 °C eingefroren.

2.2.2.3 EXPERIMENTE MIT PAMP-BEHANDLUNG

Für PAMP-Analysen wurden zwei Blätter der obersten Blattetage drei Wochen alter Kartoffelpflanzen über der Blattunterseite mit Pep-13, entsprechend den angegebenen Konzentrationen und als Kontrolle das inaktive Pep-13-Analogon W2A (100 µM), mittels einer nadellosen 1 ml-Spritze infiltriert. Die Einstellung der Konzentration der Peptide erfolgte spektroskopisch mit einer OD₂₈₀ von 0,688 für Pep-13 bzw. 0,149 für W2A.

Für die Analysen mittels quantitativer qRT-PCR (s. Abschnitt 2.2.3.10) wurden ganze Blätter mittels Skalpell jeweils 0 h, 4 h, 8 h, 12 h und 24 h nach Behandlung mit Pep-13 bzw. W2A geerntet, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die Blätter für die Analysen der Suberineinlagerung in den die Nekrosen umgebenden Zellen durch Färbung der Infiltrationsstellen mit Sudan III (s. Abschnitt 2.2.4.4), erfolgte sieben Tage nach Behandlung. Dazu wurden die Infiltrationsstellen weiträumig mittels Skalpell ausgeschnitten, in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen überführt und sofort für die Färbung verwendet.

2.2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.3.1 ISOLATION VON NUKLEINSÄUREN

Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von pDNA einzelner *E. coli*-Klone erfolgte entweder als Mini-Präparation aus 2 ml bzw. als Midi-Präparation aus 50 ml einer Übernachtskultur (Inkubation bei 37 °C). Für die Transformation von Protoplasten wurde pDNA aus einer 100 ml Übernachtskultur extrahiert. Für die Mini-Präparationen wurde der *NucleoSpin® Plasmid*-Kit (Macherey-Nagel), für die Midi- bzw. Maxi-Präparationen wurden jeweils der *Plasmid Midi*- bzw. der *Plasmid Maxi*-Kit der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Die Extraktion von pDNA aus 2 ml *A. tumefaciens*-Übernachtskulturen erfolgte mittels *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) mit verändertem Protokoll. So wurden die Proben nach Zugabe von Puffer P2 für 5 min bei RT inkubiert. Des Weiteren wurde die Zentrifugation nach Zugabe von Puffer N3 von 10 min auf 20 min verlängert; außerdem wurde die isolierte pDNA mit nur 20 µl vorgewärmten (70 °C) EB-Puffer von der Säule eluiert.

Isolation genomischer DNA

Die genomische DNA (gDNA) aus Kartoffel wurde mittels des *DNeasy® Plant Mini-Kits* (Qiagen) oder für Southern Blot-Analysen (s. Abschnitt 2.2.3.9) nach folgendem Protokoll isoliert. Dafür wurden etwa 200 mg des tiefgefrorenen, gemörserten Blattmaterials mit 1 ml DNA-Extraktionspuffer versetzt und für 10 min bei 65 °C inkubiert. Nach der Neutralisation durch Zugabe von 300 µl 5 M Kaliumacetat-Lösung und einer Inkubation für 10 min auf Eis folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Anschließend wurden dem Überstand 800 µl einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung (25:24:1, v/v/v) hinzugefügt und 1 h bei RT geschwenkt. Nach 5 min Zentrifugation (12.000 rpm, RT) wurde die DNA enthaltende, obere wässrige Phase entnommen und die Nukleinsäuren mit 800 µl Isopropanol und 15 min Inkubation bei RT gefällt. Danach wurde die DNA durch Zentrifugieren (10 min, 15.000 rpm, RT) pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 15.000 rpm, RT) und nach Entfernen und Abdampfen des Alkohols in 20 µl H₂O_{dd} resuspendiert.

Die Isolierung von gDNA aus infizierten Blättern für die Quantifizierung der *P. infestans*-Biomasse mittels qPCR (s. Abschnitt 2.2.3.10), erfolgte aus einem Pool von 10 Blattscheiben (3 mm, s. Abschnitt 2.2.2.2), mittels des *GenElute Plant Genomic DNA Miniprep-Kits* (Sigma-

Aldrich) nach Herstellerprotokoll. Zusätzlich wurde im ersten Protokollschritt, unmittelbar nach der Zugabe des Lysispuffers, ein externer Standard in Form von gDNA der *NADPH-Oxidase (NOX)* von *S. tuberosum* hinzugegeben (Eschen-Lippold *et al.* 2007).

Isolation von Gesamt-RNA

Für Northern-Blot-Analysen wurde Gesamt-RNA unter Verwendung von Trizol-Lösung nach dem Protokoll von (Chomczynski & Sacchi 1987) isoliert. Dazu wurden je Probe ca. 100 mg gefrorenes, homogenisiertes Pflanzenmaterial verwendet. Die Aufarbeitung der RNA für qRT-PCR-Analysen erfolgte mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers. Zur Entfernung von DNA-Verunreinigungen wurde die RNA zusätzlich mit RNase-freier DNaseI (*RNase-free DNase Set*, Qiagen) behandelt. Gesamt-RNA aus Knollen wurde, zur Erhöhung der Konzentration, zunächst mittels Trizol isoliert und danach mit dem *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellangaben aufgereinigt.

2.2.3.2 REVERSE TRANSKRIPTION (RT)

Die cDNA-Synthese von 1 µg/µl DNase I-behandelter RNA erfolgte durch RT mittels des *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis-Kits* (Fermentas) unter Einsatz von Oligo-dT-Primern entsprechend der Herstellerangaben in einem 20 µl-Ansatz. Für die anschließende qPCR wurde 1:10 (v/v) mit H₂O_{dd} verdünnte cDNA verwendet.

2.2.3.3 POLYMERASE-KETTENREAKTION (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten aus gDNA oder komplementärer DNA (*complementary DNA*, cDNA) erfolgte standardgemäß mit der *DreamTaq*TM-DNA-Polymerase (Fermentas) entsprechend den Herstellerangaben. Für die Amplifikation der Vollängen-CDS von *ABCG1* wurde eine *Pfu*-DNA-Polymerase (Fermentas) eingesetzt. Die PCR wurde in 50 µl-Ansätzen entsprechend dem nachfolgend aufgeführten Protokoll angesetzt. Die Vollängen-CDS wurde mit einem Touchdown-Programm amplifiziert. Die anderen Amplifikationen wurden mit dem angegebenen Standardprogramm durchgeführt. Die als Primer verwendeten Oligonukleotide sind im Anhang gelistet (s. Abschnitt 7.1).

PCR-Ansatz (50 µl):

| | |
|--|-----------|
| Matrizen-DNA (50 - 200 ng/µl) oder Bakterienkolonie | 1 µl |
| 5'-Primer (100 µM) | 1 µl |
| 3'-Primer (100 µM) | 1 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 5 µl |
| 10x PCR-Puffer (inkl. 15 mM Magnesiumchlorid) | 5 µl |
| DNA-Polymerase | 1 U/µl |
| H ₂ O _{dd} | add 50 µl |

Touchdown-Programm:

| <u>Temperatur</u> | <u>Dauer</u> | <u>Zyklenzahl</u> |
|----------------------------|--------------|-------------------|
| 94 °C | 2 min | |
| 94 °C | 15 s | } 10 |
| 60-62 °C; -1 °C pro Zyklus | 30 s | |
| 72 °C | 1-2,5 min | |
| 94 °C | 1,5 min | } 35 |
| 50-52 °C | 30 s | |
| 72 °C | 1-2,5 min | |
| 72 °C | 7 min | |
| 4 °C | ∞ | |

Standardprogramm:

| <u>Temperatur</u> | <u>Dauer</u> | <u>Zyklenzahl</u> |
|-------------------|--------------|-------------------|
| 94 °C | 2 min | |
| 94 °C | 15 s | } 35 |
| 50-62 °C | 30 s | |
| 72 °C | 1-2,5 min | |
| 72 °C | 7 min | |
| 4 °C | ∞ | |

2.2.3.4 ELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN UND DEREN AUFREINIGUNG

DNA-Gele

Die elektrophoretische Trennung der DNA erfolgte mit 1-2 %igen Agarosegelen (w/v; *SeaKem LE Agarose*, Biozym) in 1x TAE-Puffer. Hierfür wurden die Proben mit DNA-Ladepuffer versetzt und zusammen mit einem λ -*PstI*-DNA-Größenmarker (mit *PstI*-gespaltene λ -Phagen-DNA; Fermentas) aufgetrennt. Nach anschließender Färbung der Gele im Ethidiumbromid-Bad (80 μ l 1 %ige Ethidiumbromidlösung auf 500 ml dest. H₂O) erfolgte die Detektion und Dokumentation der Fragmente unter UV-Licht mit einem Transilluminator (UVT 2020; Herolab) bzw. eines Geldokumentationssystems (Gene Genius Bio Imaging System, Syngene).

Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction-Kits* (Qiagen).

Denaturierende RNA-Gele

Die elektrophoretische Trennung von 10 μ g Gesamt-RNA erfolgte nach 10 min Denaturierung (65 °C) in 1 %igen (w/v) Agarosegelen mit 5 % (v/v) Formaldehyd in 1x MEN-Puffer. Hierfür wurden die Proben mit 4 μ l RNA-Probenpuffer und 0,3 μ l Ethidiumbromid (100 μ g/ml) versetzt und im Gel mit 1 x MEN als Laufpuffer aufgetrennt und die Fragmente unter UV-Licht mittels Geldokumentationssystem festgehalten.

2.2.3.5 KLONIERUNGEN

Die Klonierungen erfolgten mit Hilfe des Gateway®-Systems (Invitrogen) entsprechend der Protokolle des Herstellers. Dazu wurden PCR-amplifizierte Genfragmente zunächst in den Vektor pCR®2.1-TOPO® mittels TA-Cloning®-Kit (Invitrogen) inseriert. Das RNAi-Konstrukt gegen das Kandidatengen *ABCG1* (s. Anhang 7.6) wurde im Rahmen einer vorangegangenen Dissertation von Simone Altmann hergestellt und für die gegenwärtige Arbeit genutzt. Die Klonierung der Vollängen-CDS von *ABCG1* aus *S. tuberosum* cv. Désirée (s. Anhang 7.5) erfolgte nach Amplifikation mittels RT-PCR. Die Klonierung der *ABCG1*-CDS wurde von

N. Frolova (IPB Halle) durchgeführt und erfolgte zunächst in den Gateway[®]-Entry-Vektor pCR[®]8 (Invitrogen) und anschließend über Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme-Mix (Invitrogen) in pGWB14 (Invitrogen; (Nakagawa *et al.* 2007). Für die subzelluläre Lokalisierung von ABCG1 wurde ein ABCG1-RFP (*red fluorescent protein*)-Fusionskonstrukt unter der Kontrolle eines Ubiquitin-Promotors generiert. Dazu wurde die CDS von *ABCG1* – ohne Stop-Codon – mittels genspezifischer Primer aus pGWB14-*ABCG1* amplifiziert und dann in pCR[®]8 kloniert. Nach Entfernung der Spectinomycin-Resistenzkassette durch DNA-Restriktion mit *Xba*I und *Xho*I erfolgte die Rekombination mit dem Expressionsvektor pUBC-RFP (Grefen *et al.* 2010) mittels Gateway[®] LR Clonase[™] II Enzyme-Mix. Zusätzlich dazu wurde der binäre Vektor pXCSG-YFP (Feys *et al.* 2005) genutzt, welcher für das membranlokalisierte FLS2-YFP (*yellow fluorescent protein*)-Fusionskonstrukt kodiert (Robatzek *et al.* 2006). Freies CFP (*cyan fluorescent protein*) (pUGW15-CFP; Nakagawa *et al.* 2007) wurde als weitere Kontrolle für eine mögliche Kern-/Cytosol-Lokalisierung verwendet. Die für die Klonierungen genutzten Primer und Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (s. Abschnitt 7.1).

2.2.3.6 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN UND PFLANZEN

Bakterientransformation

Die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen und deren Transformation erfolgte entsprechend der Methode von (Inoue *et al.* 1990) Die Herstellung und Transformation chemokompetenter *A. tumefaciens*-Zellen erfolgte nach (Höfgen & Willmitzer 1988).

Stabile Transformation von Kartoffelpflanzen

Stabil transformierte *S. tuberosum*-Pflanzen wurden durch die „Kartoffel-Leaf-Disk“-Transformation drei bis vier Wochen alter Kartoffelpflanzen (Anzucht auf 2MS-Agar) in Anlehnung an (Feltkamp 1995) wie nachfolgend beschrieben unter sterilen Bedingungen generiert. Dafür wurden 20 ml einer zwei Tage alten Agrobakterienkultur mit dem entsprechenden Konstrukt (pHELLSGATE8-*ABCG1*-RNAi bzw. pGWB14-*ABCG1*) pelletiert (Zentrifugation für 10 min bei 5.000 rpm, 4 °C), in 20 ml steril filtrierter 10 mM MgSO₄-Lösung gewaschen und erneut pelletiert (10 min, 5.000 rpm, 4 °C). Das Lösen der Pellets erfolgte durch vorsichtiges Resuspendieren der Zellen in 10 ml 3MS-Medium (Tabelle 2.1). Die Zellen wurden bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Transformation

wurden 12-14 Kartoffelblätter (Stengelansatz zuvor entfernt) mit einem Skalpell mehrfach eingeritzt und in eine Petrischale mit 10 ml 3MS-Medium mit der Blattunterseite nach oben gelegt. Anschließend wurde das Medium mit 100 μ l der *A. tumefaciens*-Zellen versetzt und die Ansätze für zwei Tage abgedunkelt inkubiert. Für jedes Konstrukt wurden mind. fünf Petrischalen angesetzt. Die Induktion des Kalluswachstums erfolgte durch einwöchiges Umbetten mit der Blattoberseite auf CG76-Kallusinduktionsmedium (Tabelle 2.1). Durch anschließendes Umsetzen der Blätter auf CG75-Sprossinduktionsmedium (Tabelle 2.1) wurde das Sprosswachstum induziert. Das Umsetzen der Blätter erfolgte im 14-tägigen Rhythmus bis zum Austrieb einzelner Sprosse. Diese wurden vorsichtig abgeschnitten und auf 2MS-Medium mit 50 μ g/ml Kanamycin kultiviert. Die Kultivierung erfolgte durchgängig in einer Phytokammer bei 16 h Licht, 22 °C und 8 h im Dunkeln bei 18 °C.

Transiente Transformation von *A. thaliana*-Protoplasten

Die Isolation und Transformation der Mesophyllprotoplasten wurde wie bei (Yoo *et al.* 2007) beschrieben durchgeführt. Für die Transformation wurde Plasmid-DNA (pDNA) in einer Konzentration von 10 μ g des pUBC-DEST-*ABCG1-RFP*-Vektors auf 100 μ l Protoplasten eingesetzt. Die Analyse erfolgte 16 h nach Transformation.

2.2.3.7 RESTRIKTIONSSPALTUNG

Zur Identifizierung positiver Klone bzw. zur Herstellung von Sonden für die Northern-Blot-Analyse wurden 0,5-1 μ g pDNA mittels je 1 U Restriktionsendonuklease in einem 20 μ l-Ansatz für mindestens 4 h und maximal über Nacht entsprechend den Herstellerangaben gespalten. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Fragmentgrößen mittels Gelelektrophorese. Die verwendeten Restriktionsenzyme sind im Anhang 7.3 aufgelistet.

2.2.3.8 DNA-SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung der Inserts selektierter Klone wurde von der Firma Eurofins MWG Operon durchgeführt. Für die Sequenzierung wurden 100 ng/ μ l pDNA entsprechend den Vorgaben der Firma vorbereitet.

2.2.3.9 SOUTHERN- UND NORTHERN-BLOT-ANALYSEN

Northern-Blotting

Für die Northern-Blot-Analyse wurde zunächst in Anlehnung an (Lehrach *et al.* 1977) ein Kapillar-Blot durchgeführt. Dabei wurde die im denaturierenden Gel (s. Abschnitt 2.2.3.4) aufgetrennte Gesamt-RNA (10 µg, s. Abschnitt 2.2.3.1) mittels Blottingpapier und 20 x SSC auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche) über Nacht bei Raumtemperatur transferiert. Anschließend erfolgte die kovalente RNA-Bindung an die Membran („Cross Linking“) durch UV-Licht mit einem Stratalinker® UV Crosslinker (Stratagene).

Southern-Blotting

Für die Southern-Blot-Analysen nach (Schmidt *et al.* 1999) wurden zunächst 20 µl gDNA (s. Abschnitt 2.2.3.1) mittels des *Pst*I-Restriktionsenzym und unter Zusatz von RNase H über Nacht verdaut und danach in einem 1 %igem (w/v) Agarosegel (in TAE) aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel jeweils für 45 min erst im Denaturierungspuffer und danach im Neutralisierungspuffer geschwenkt und anschließend mit H₂O_{dd} gewaschen. Der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte analog dem für das Northern-Blotting beschriebenen.

Herstellung radioaktiv-markierter Sonden

Für die Hybridisierung der Southern- bzw. Northern-Blots zum Nachweis spezifischer Nukleinsäuren wurden [α^{32} P]dATP- und [α^{32} P]dCTP-markierte DNA-Sonden unter Anwendung des *Megaprime™ DNA labelling-Kits* (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Dafür sind jeweils 25-50 ng des DNA-Fragments eingesetzt worden. Anschließend wurden die Sonden über eine Mikrocephadexsäule (ProbeQuant™ G-50 Micro-Columns, GE Healthcare) gereinigt, 50 µl eluiert und 5 min bei 95 °C denaturiert.

Hybridisierung

Nach dem Blotten wurden die Membranen zunächst für mindestens 1 Stunde in Hybridisierungspuffer bei 42 °C inkubiert, 25-50 ng denaturierte DNA-Sonde hinzugefügt und anschließend mind 16 h bei 42 °C in einem Hybridisierungsöfen hybridisiert. Danach ist die Membran dreimal nacheinander bei 65 °C mit 3x SSC und 0,1 % (w/v) SDS gewaschen und schließlich auf einen *Storage Phosphor-Screen* (Molecular Dynamics) gelegt worden.

Die durch diesen Screen eingefangene und gespeicherte Radioaktivität der im Blot gebundenen Sonde wurde mit Hilfe des *Typhoon 9410 Variable Mode Imagers* (GE Healthcare) ausgelesen.

2.2.3.10 QUANTITATIVE PCR (QPCR)

Die Quantifizierung von *ABCG1*-Transkriptgehalten erfolgte mittels qRT-PCR und die von *P. infestans*-DNA mittels qPCR unter Verwendung spezifischer Primer und Taqman-Sonden der Firma Roche (siehe Anhang 7.2) sowie dem *Maxima™ Probe qPCR Master Mix (2x)* (Fermentas), der den Referenzfarbstoff *ROX* enthielt. Für jede Reaktion wurden etwa 100 ng revers-transkribierter RNA oder 100 ng gDNA in einem Reaktionsvolumen von 20 µl eingesetzt. Die Reaktion erfolgte nach dem unten angegebenen Temperaturprogramm in einem qPCR-Cycler (*Mx3005P*, Agilent Technologies, www.agilent.com). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der *MxPro*-Software (Agilent Technologies). Die Bestimmung der relativen *ABCG1*-Transkriptgehalte erfolgte durch Normalisierung der Ct-Werte des Zielgens auf die Ct-Werte des endogenen Referenzgens *StEF1α* (GenBank-Accession-Number AB061263.1) durch Berechnung des ΔCT -Werts und nachfolgend des $2^{-\Delta\text{CT}}$ -Werts in Anlehnung an (Pfaffl 2001). Die Quantifizierung der *P. infestans* Biomasse durch qPCR erfolgte unter Einbeziehung des externen Standards *NOX* und einer Standardkurve wie von (Eschen-Lippold *et al.* 2007) beschrieben. Für jedes Experiment wurden mindestens zwei biologische und für die qRT-PCR Analysen drei technische Replikate verwendet.

qPCR-Programm:

| <u>Temperatur</u> | <u>Dauer</u> | <u>Zyklenzahl</u> |
|-------------------|--------------|-------------------|
| 50 °C | 2 min | |
| 95 °C | 10 min | |
| 95 °C | 15 s | } 40 |
| 60 °C | 1 min | |

2.2.4 MIKROSKOPISCHE ANALYSEN

2.2.4.1 FIXIERUNG, EINBETTUNG UND SCHNEIDEN VON PFLANZENMATERIAL

Die Einbettung von Blatt-, Wurzel- und Knollensegmenten erfolgte in den 2-Hydroxyethylmethacrylat-Kunststoff Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer, Wehrheim). Dazu wurden Gewebestücke von max. 0,5 cm Größe mit einem Skalpell entnommen. Die Entnahme

der Wurzelproben erfolgte 15 cm von der Wurzelspitze. Für die Anfertigung der Semidünnschnitte von Nekrosen der Pep-13- bzw. W2A-behandelten Blätter wurden 2 mm x 5 mm kleine Segmente vom Übergang vom gesunden zum nekrotischen Gewebe entnommen. Alle Proben wurden unmittelbar nach Entnahme für 4 h bei RT in 3 % (w/v) Glutaraldehyd (Sigma-Aldrich) in 0,1 M Natriumcacodylatpuffer (NCP, Dimethylarsensäure-Natriumsalz-Trihydrat in Wasser, pH 7,2) fixiert und anschließend mit NCP gewaschen. Die anschließende Entwässerung in einer Ethanolreihe, die sukzessive Infiltration mit Technovit 7100 und Einbettung in Einmal-Einbettmulden durch Polymerisation bei 4 °C im Vakuum sowie die Herstellung von Semidünnschnitten (3 µm-Stärke) erfolgte durch G. Hause (MLU Halle).

2.2.4.2 ÜBERSICHTSFÄRBUNG MIT TOLUIDINBLAU

Die Färbung der Semidünnschnitte erfolgte mit einer 1 %igen Toluidinblau-Lösung (w/v; nach Böck 1984, G. Hause, MLU Halle).

2.2.4.3 SUBERINFÄRBUNG MIT FLUOROL-YELLOW-088

Die Färbung von Suberin mit Fluorol-Yellow-088 (Advance Scientific & Chemical Inc) in Periderm-, Wurzel- und Blatt-Semidünnschnitten wurde nach dem Protokoll von (Brundrett 1991) durchgeführt.

Fluorol-Yellow-088-Lösung

0,01 % (w/v) Fluorol-Yellow-088

50 % (v/v) PEG 400

50 % (v/v) Glycerol

2.2.4.4 SUBERINFÄRBUNG MIT SUDANROT (SUDAN III)

Die Sudan III-Färbung von Kartoffelblättern erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von A.L. Smit 2000, durch Inkubation in einer gesättigten Lösung aus Sudan III (Roth) und 96 %igem Ethanol für mind. 1 h bei 70 °C.

2.2.4.5 LICHT- UND FLUORESZENZMIKROSKOPIE

Die toluidinblaugefärbten Schnitte der Gewebeproben wurden mit einem *Axioskop20*-Lichtmikroskop (Zeiss, www.zeiss.de) hinsichtlich ihrer Morphologie ausgewertet.

Die licht- und fluoreszenzmikroskopischen Analysen der Sudan III-gefärbten Objekte erfolgten mit dem Nikon AZ100-Stereomikroskop (www.nikon.de). Die gefärbten Infektionsstellen wurden zum einem im Hellfeld und zum anderen die Fluoreszenz unter UV-Anregung (Standard-Filterblock UV-2A, Anregung 330-380 nm, Kaltlicht 400 nm, Emission 420 nm) analysiert. Die fotografischen Aufnahmen wurden mit einer Nikon Digital sight DS-Fi1c-Kamera und mit dem NIS-ElementsViewer erstellt.

Die subzelluläre Lokalisierung der Fusionsproteine ABCG1-RFP und FLS2-YFP und des freien CFP, als auch die Detektion der Fluorol-Yellow-Fluoreszenz und der Autofluoreszenz der Semidünnschnitte erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM; Geräte: LSM 700 und LSM 710, Zeiss). Die Anregungswellenlängen der jeweiligen Fluorochrome sind der Tabelle 2.4 zu entnehmen. Die Emission von RFP wurde bei einer Filtereinstellung von 561-595 nm, die von YFP bei 505-557 nm, die von Chlorophyll bei 633-688 nm, die von CFP bei 405-485 nm, die von Fluorol-Yellow bei 520-588 nm und die der Autofluoreszenz bei 418-480 nm detektiert. Die Bildbearbeitung wurde mit der Zen 2010-Software durchgeführt.

Tabelle 2.4: Anregungswellenlängen der verwendeten Fluorochrome

| Fluorochrom | Wellenlänge [nm] |
|-----------------|------------------|
| | Anregung |
| RFP | 561 |
| YFP | 514 |
| CFP | 405 |
| Chlorophyll | 633 |
| Fluorol-Yellow | 405 |
| Autofluoreszenz | 488 |

2.2.5 QUANTIFIZIERUNG DER LÄSIONSENTENSITÄT UND DER SUBERINFÄRBUNG

Die relative Quantifizierung der Intensitäten der Blattläsionen nach *P. infestans*-Infektion erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ. Dazu wurde von jeder Blattläsion die Läsionsintensität innerhalb einer festen Fläche bestimmt und auf den nicht infizierten Hintergrund desselben Blattes normalisiert.

Die Quantifizierung der Suberinfärbung nach Behandlung mit Sudan III erfolgte anhand einer Einteilung der Infektionsstellen bzw. Nekrosen in Klassen. Infektionsstellen/Nekrosen, die eine durchgehende Sudan III-Färbung zeigten oder fluoreszierten, wurden mit „2“ klassifiziert. Infektionsstellen/Nekrosen, die nur teilweise eine Rotfärbung bzw. Fluoreszenz zeigten, wurden mit „1“, und die, die weder Rotfärbung noch Fluoreszenz aufwiesen, mit „0“ klassifiziert.

2.2.6 CHEMISCHE ANALYSE VON KARTOFFELPERIDERM

Für die chemische Analyse des Kartoffelperiderms wurden Knollen drei Monate alter Gewächshauspflanzen (mind. zehn Knollen pro Pflanze, jeweils vier Pflanzen pro Genotyp) zunächst geerntet, vorsichtig gereinigt und bei 4 °C für 1 Woche im Dunkeln gelagert.

Die Präparation von unverdaulichem Periderm erfolgte von vier uniformen Knollen pro Pflanze. Dafür wurden mit einem Kork-Bohrer (Ø 6 mm) jeweils zwei Peridermscheiben pro Knolle ausgestanzt, das Kartoffelparenchym so gut wie möglich mittels Skalpell entfernt und schließlich alle acht Peridermdisks der Knollen pro Pflanze vereinigt. Die Proben wurden anschließend in flüssigen Stickstoff mit einem Pistill gemörsert und bei -80 °C bis zur Extraktion gelagert.

Die Präparation von verdaulichem Periderm erfolgte nach Entnahme der Peridermscheiben. Hierfür wurden die Knollen jeweils zusammen mit den anderen sechs Kartoffeln von jeder Pflanze als Mischprobe für 10-15 min gekocht und vorsichtig geschält, wobei das komplette Parenchymgewebe von der Kartoffelschale entfernt wurde. In einer Petrischale erfolgte dann der Verdau des Kartoffelperiderms in einer Lösung aus Cellulase (v/v, *Trichoderma reesei* ATCC 26921, Sigma-Aldrich), Pektinase (v/v, Trenolin® Super DF, Rekrü GmbH) und Zitronensäure (0,01 M, pH 3,0, Sigma-Aldrich), mit 1 mM Natriumazid (Sigma-Aldrich) als Konservierungsmittel, wie zuvor beschrieben (Kolattukudy & Dean 1974a, Schreiber *et al.* 2005). Nach sieben Tagen bei RT im Dunkeln wurde die verdaute Kartoffelschale (Phellem)

vorsichtig durch Waschen mit H_2O_{dd} vom Phellogen, Phelloderm und dem restlichen Parenchymgewebe befreit. Die so erhaltenen Phellemproben wurden danach im Exsikkator über CaCl_2 im Vakuum getrocknet, mit Hilfe einer Kugelmühle (eine Kugel $\text{\O} 20$ mm; 2 min, 30 Hz; MM301, Retsch) homogenisiert und bis zur Analyse im Dunkeln bei RT in einem verschlossenen Gefäß aufbewahrt.

2.2.6.1 EXTRAKTION UND ANALYSE SEMIPOLARER VERBINDUNGEN

Für die Extraktion der semipolaren Verbindungen des Knollenperiderms wurden ca. 50 mg unverdautes Periderm (s. Abschnitt 2.2.6) mit 500 μl eines eiskalten 80 %igen (v/v) Methanol-Wasser-Gemischs versetzt und unter gelegentlichem Vortexen innerhalb von 15 min auf RT erwärmt. Nach Homogenisieren in einer Kugelmühle (mit zwei Kugeln $\text{\O} 5$ mm; 3 min, 30 Hz; MM301, Retsch) wurden die Proben für 15 min bei 20 °C im Ultraschallbad extrahiert und zentrifugiert (10 min, 16000 rpm, RT) und der Überstand abgenommen. Für die Analyse der Hauptglykoalkaloide wurden jeweils 20 μl des Extraktes mit 580 μl 30 %igen (v/v) Methanol verdünnt, zentrifugiert (10 min, 16000 rpm, RT) und der Überstand in Vials überführt. Für die Analyse aller anderen Verbindungen wurden 100 μl des Extraktes mit 200 μl Wasser (LichroSolv) verdünnt, zentrifugiert (10 min, 16000 rpm, RT) und ebenfalls in Vials überführt. Im Anschluss erfolgte die chromatographische Trennung der Proben bei 40 °C auf einem *Acquity UPLC* System (Waters) ausgestattet mit einer 1,8 μm -Partikeln gepakten *HSS T3* Säule (100 x 1.0 mm, Waters) unter Verwendung der folgenden Gradientenzeiten bei einer Flussrate von 150 $\mu\text{l min}^{-1}$: 0-5 min, isokratisch 99 % A (Wasser/Ameisensäure; 99,9/0,1 [v/v]), 1 % B (Acetonitril/Ameisensäure, 99,9/0,1 [v/v]); 0,5-10 min, linear von 1-60 % B; 10-12 min, isokratisch 95 % B. Das Injektionsvolumen betrug 2,3 μl . Die eluierten Verbindungen wurden nacheinander mit einem *Photodiode Array Detector* (Waters) in einem Wellenlängenbereich von 200-500 nm und unter Verwendung eines *micrQTOF-Q I hybrid quadrupole time-of-flight* Massenspektrometers (Bruker Daltonics) ausgestattet mit einer *Apollo II electrospray ion source* in einem positiven Ionen Modus, im Bereich m/z von 100 bis 1000 detektiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Inertgas (Stickstoff), Gasströmung zu dem Vernebler, 1,6 bar; Trocknungsgasströmung (Trockengas:Stickstoff) 6 l/min, Trocknungstemperatur, 190 °C; Kapillare Spannung, 4000 V; Endplatten Offset, ~ 500 V, Funnel 1 RF, 200 V; Funnel 2 RF, 200 V; *in-source* CID Energie, 0 V; Hexapole RF Spannung, 100 V; Quadrupole Ionenenergie, 3 eV; Kollisionsgas, Argon; Kollisions RF 200/350 V (timing 50/50); Transferzeit, 70 μs ; Vorimpuls Lagerzeit, 5 μs ;

Impulsfrequenz, 10 kHz; Spektrenrate, 3 Hz. Die Analyten wurden durch Integration von extrahierten Ionen-Chromatogrammen, welche für die entsprechenden Quantifizierungen generiert wurden (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.14), relativ quantifiziert. Die resultierenden Peak-Flächen wurden auf das Frischgewicht der jeweiligen Probe normalisiert und \log_2 -transformiert.

2.2.6.2 EXTRAKTION UND ANALYSE APOLARER VERBINDUNGEN

Für die Analyse apolarer Verbindungen wurden ca. 50 mg unverdautes Periderm (2.2.6) mit 1 ml eiskaltem Methanol/Methyl-tertiär-butylether (1/3, v/v) versetzt, unter gelegentlichem Vortexen innerhalb von 15 min auf RT erwärmt und mit einer Kugelmühle (mit zwei Kugeln Ø 5 mm; 3 min, 30 Hz; MM301, Retsch) homogenisiert. Nach 15 min Inkubation im Ultraschallbad wurden jeder Probe 500 µl Methanol/Wasser (1/3, v/v) hinzugefügt, gevortext und zentrifugiert (4 min, 9000 rpm, RT). Anschließend wurden 500 µl der unpolaren oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die flüchtigen Bestandteile bei 40°C in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac) entfernt. Nach 2 h erfolgte das Rücklösen der Proben in 200 µl Methanol durch Behandlung im Ultraschallbad (10 min, 20 °C), zentrifugiert (5 min, 13.200 rpm, RT) und anschließend chromatografisch aufgetrennt. Die Analyse bzw. chromatographische Trennung der apolaren Verbindungen erfolgte bei 40 °C auf einem *Acquity UPLC* System (Waters) ausgestattet mit einer BEH C8 Säule (100 x 1.0 mm, Partikelgröße, 1,7 µm; Waters) unter Verwendung der folgenden Gradientenzeiten bei einer Flussrate von 150 µl min⁻¹: 0-1 min, isokratisch 50 % A (Wasser/Ameisensäure; 99,9/0,1 [v/v]), 50 % B (Acetonitril/Ameisensäure, 99,9/0,1 [v/v]); 1-16 min, linear von 50-100 % B; 16-22 min, isokratisch 100 % B. Das Injektionsvolumen betrug 2,3 µl. Die eluierten Verbindungen wurden nacheinander mit einem *Photodiode Array Detector* (Waters) in einem Wellenlängenbereich von 200-500 nm und unter Verwendung eines *micrQTOF-Q I hybrid quadrupole time-of-flight* Massenspektrometers (Bruker Daltonics) ausgestattet mit einer *Apollo II electrospray ion source* in einem positiven Ionen Modus, im Bereich *m/z* von 90 bis 1200 detektiert. Folgende Einstellungen wurden verwendet: Inertgas (Stickstoff), Gasströmung zu dem Vernebler, 1,6 bar; Trocknungsgasströmung (Trockengas:Stickstoff) 6 l/min, Trocknungstemperatur, 190 °C; Kapillare Spannung, 4000 V; Endplatten Offset, ~ 500 V, Funnel 1 RF, 200 V; Funnel 2 RF, 200 V; *in-source* CID Energie, 0 V; Hexapole RF Spannung, 100 V; Quadrupole Ionenenergie, 3 eV; Kollisionsgas, Argon; Kollisionsenergie,

10 eV; Kollisions RF 200/400/600/800 V (timing 25/25/25/25); Transferzeit, 70 μ s; Vorimpuls Lagerzeit, 5 μ s; Impulsfrequenz, 10 kHz; Spektrenrate, 3 Hz.

Die Massenspektren wurden im *centroid mode* erworben. Die Quantifizierung der Analyten erfolgte wie in Abschnitt 2.2.6.1. beschrieben und sind mit entsprechenden Retentionszeiten den Tabelle 7.6 bis 7.13 (s. Anhang 7.9, 7.10) zu entnehmen.

2.2.6.3 ANALYSE VON VERDAUTEM DEPOLYMERISIERTEM PERIDERM

Für die Analyse wurden zunächst 200 mg enzymatisch verdauten Periderms mit jeweils 2 x 5 ml Methanol (MeOH), 2 x 5 ml CHCl₃/MeOH (1:2) und 2 x 5 ml CHCl₃/MeOH (2:1) Lösungsmittel nacheinander durch Inkubation im Ultraschallbad (jeweils 10 min, 50 °C) entfettet. Danach wurden die Proben in der Speedvac bei 40 °C im Vakuum über Nacht getrocknet. Am darauffolgenden Tag wurde 10 mg Probe in 2 ml Eppendorfgäße eingewogen und mit 25 μ l Interne-Standard-Lösung versetzt. Die Depolymerisation erfolgte durch Zugabe von 1 ml Bortrifluorid-Methanol-Lösung (BF₃-MeOH, 10 % (w/w); Sigma-Aldrich) und Inkubation im Thermomixer für 24 h bei 55°C. Das Reaktionsgemisch wurde in ein konisches 15 ml-Glaszentrifugenröhrchen überführt und mit 2 ml Chloroform und 1 ml Wasser versetzt und geschüttelt. Nach der Phasentrennung wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette die obere organische Phase möglichst vollständig in ein neues Röhrchen überführt und die verbliebende wässrige Phase erneut mit 2 ml Chloroform extrahiert. Anschließend wurden die vereinten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Für die Quantifizierung der Hauptverbindungen wurde 1 ml des Chloroformextrakts in der Speedvac bei 30 °C bis zur Trocknung eingedampft, dann mit 40 μ l Pyridin und 80 μ l N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA, Macherey-Nagel, www.mn-net.com) für eine Stunde bei 40 °C derivatisiert und anschließend mittels *Gaschromatographie (GC) gekoppelt* mit Elektronenionisation (EI) und Quadrupol-Massenspektrometrie (QMS) nach Split-Injektion (1:10) analysiert. Zur Analyse der Nebenverbindungen wurden 2 ml des Chloroformextraktes in der Speedvac bei 30 °C bis zur Trocknung eingedampft, wie oben beschrieben derivatisiert und mittels GC-EI-QMS analysiert. Die Analyten wurden durch Integration von extrahierten Ionen-Chromatogrammen unter Nutzung der entsprechenden Quantifizierungs-/Qualifizierungsionen-Verhältnisse und Retentionszeiten relativ quantifiziert (s. Anhang 7.8, Tabelle 7.1 bis 7.5). Die sich ergebenden Peak-Flächen wurden auf das Trockengewicht der jeweiligen Probe und den entsprechenden internen Standard normalisiert.

Interne Standard-Lösung:

n-Heptadecansäure (25 µg/ml; Sigama-Aldrich)

15-Hydroxypentadecansäure (25 µg/ml: ABCR GmbH, www.abcr.de)

1-Pentadecanol (25 µg/ml; Sigma-Aldrich)

2.2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG UND BIOINFORMATISCHE ANALYSEN

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Excel (Microsoft office.microsoft.com/de-de/excel) und Prism5 (GraphPad Software, www.graphpad.com). Die Kartoffelgenomsequenzen wurden mit den unter <http://solgenomics.net/> und <http://solanaceae.plantbiology.msu.edu/> verfügbaren Sequenzen verglichen; Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit den Sequenzdatenbanken des National Center for Biotechnology Information (ncbi; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mittels BLAST abgeglichen. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mit den Programmen Chromas Lite (www.chromas-lite.software.informer.com/2.1/), ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools /msa /clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) bzw. BLAST (NCBI).

3 ERGEBNISSE

In einer vorausgegangenen Microarray-Analyse wurde *ABCG1* als ein JA-abhängig exprimiertes, Pep-13-responsives Kandidatengen aus *Solanum tuberosum* cv. Désirée identifiziert (Altmann 2009). *ABCG1* kodiert für einen ABC-Halbtransporter der Unterfamilie G mit noch unbekannter Funktion. Die vorliegende Arbeit umfasst die funktionelle Charakterisierung von *ABCG1* und dessen mögliche Rolle in der basalen Abwehr von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans*.

3.1 STRUKTUR VON ABCG1 AUS *SOLANUM TUBEROSUM* UND PHYLOGENIE ZU *ARABIDOPSIS THALIANA* ABCG PROTEINEN

Die Basis für den vollständigen Erhalt der Nukleotidsequenz von *ABCG1* stellte der in der *Expressed Sequence Tag* (EST)-Datenbank der *Potato Oligo Chip Initiative* (POCI) vorhandene MICRO.15286.C1, dar (siehe auch Einleitung Abschnitt 1.6). Die komplette Nukleotidsequenz von *ABCG1* wurde über BLAST-basierten Sequenzabgleich der EST-Sequenz mit dem Referenzgenom von *Solanum tuberosum* L. Gruppe Phureja (<http://www.solgenomics.net>; Xu *et al.* 2011) und der NCBI-Nukleotiddatenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov; NCBI-Referenzsequenz: XM_006345853.1) ermittelt. Die Abbildung 3.1A zeigt die schematische Darstellung von *ABCG1* bestehend aus der kodierenden Region mit 2 Exons von 744 bp bzw. 1509 bp und einem nicht kodierenden Abschnitt, einem Intron von 97 bp.

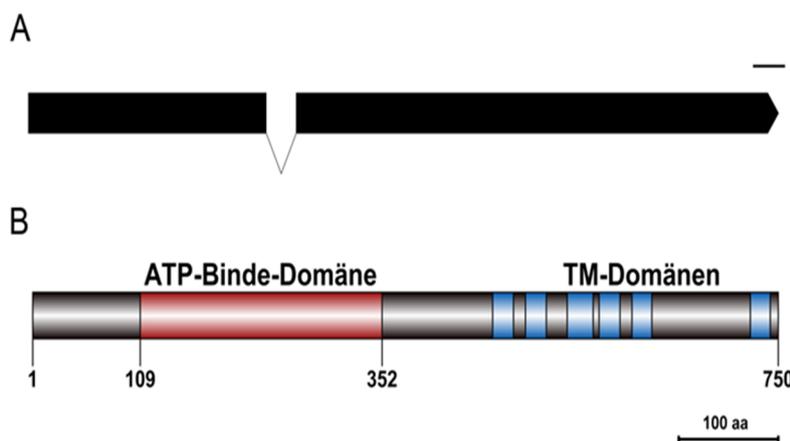


Abbildung 3.1: Schematische Struktur des *ABCG1*-Gens bzw. des ABCG1-Proteins.

(A) Schematische Struktur des *ABCG1*-Gens. Die kodierende Region besteht aus zwei Exons von insgesamt 2253 bp Länge, separiert von einer nicht kodierenden Region, einem Intron von 97 bp. Das Schema wurde mit Hilfe des über die Website www.wormweb.org verfügbaren Exon-Intron Graphic Makers erstellt. Der Maßstabalken entspricht 100 bp.

(B) Schematische Struktur des ABCG1-Proteins. Das Protein von 750 AS besteht aus einer ATP-bindenden Kasette (rot) und sechs putativen TM-Domänen (blau). Das Schema wurde mit Hilfe des über die Website www.dog.biocuckoo.org/faq.php verfügbaren Programms zur Protein Domain Structure Visualization erstellt (Ren *et al.* 2009).

Die Nukleotidsequenz von *ABCG1* ist dem Anhang (s. Abschnitt 7.5) zu entnehmen. Das als ABCG Halb-Transporter vorhergesagte Protein (www.ebi.ac.uk/interpro/; Abbildung 3.1B) bestehend aus 750 Aminosäuren, umfasst eine N-terminale ATP-bindende Domäne (*ATP binding cassette*, ABC) mit ATP-Hydrolyse-Funktion und eine C-terminale Transmembran-Domäne (TM-Domänen) bestehend aus sechs membrandurchspannenden α -Helices. Um eine mögliche Funktion bzw. Homologe in der Modellpflanze *A. thaliana* herzuleiten, wurden Aminosäuresequenzen (Analyse mittels BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) im Zusammenhang mit phylogenetischen Analysen des Kartoffel-*ABCG1*-Transporters mit den 43 ABC-Transportern der Unterfamilie G aus *Arabidopsis* (Akzessionsnummern der für die Analyse verwendeten Gene s. Anhang 7.4) verglichen. Diese zeigte mit jeweils 72 % und 73 % die höchste Homologie von *StABCG1* zu *AtABCG1* und *AtABCG16* (Abbildung 3.2).

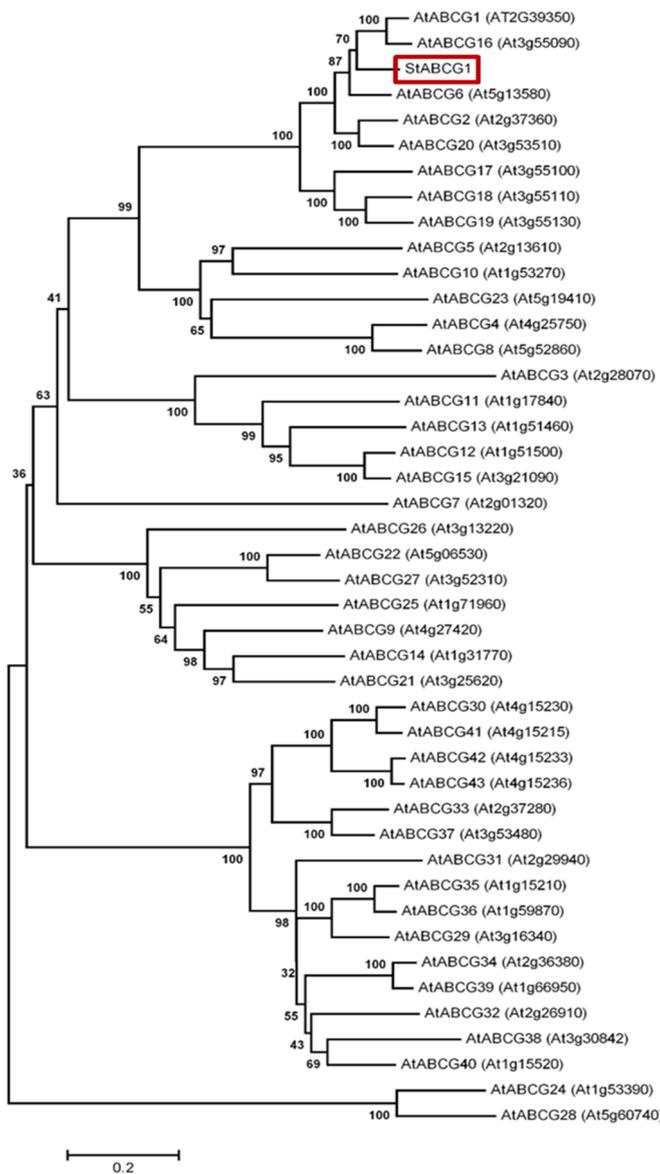


Abbildung 3.2: Phylogenetische Sequenzanalyse von *StABCG1* und *AtABCG1* bis *AtABCG43*

Die Aminosäuresequenzen von *StABCG1* und *AtABCG1* bis *AtABCG43* wurden verglichen.

Die Phylogenie wurde mit der Neighbor-Joining-Methode (Saitou & Nei 1987) abgeleitet. Neben den Verzweigungen ist die Zuverlässigkeit des abgeleiteten Baums, in dem die zugeordneten Taxa mittels Bootstrap-Test (1000 Wiederholungen; (Felsenstein 1985) gruppieren, angegeben. Der Maßstab entspricht dem relativen Distanzmaß und gibt die Entfernung zwischen den Sequenzen an, anhand derer der phylogenetische Baum abgeleitet wurde. Die Analyse involvierte 44 Aminosäuresequenzen mit insgesamt 453 Positionen; Positionen mit Lücken wurden ausgeschlossen (*complete deletion option*). Die phylogenetische Beziehung wurde mit Hilfe des Programms MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) erstellt.

3.2 CHARAKTERISIERUNG VON *ABCG1* IN WILDTYP-KARTOFFELPFLANZEN

3.2.1 *ABCG1*-EXPRESSION NACH PEP-13-INFILTRATION

Zunächst erfolgte die Verifizierung der Microarray-Analyse, da die JA-abhängige und durch den Elicitor Pep-13 induzierte *ABCG1*-Expression im Array ein wichtiges Kriterium für die Auswahl als Kandidatengen war. Diese Verifizierung wurde zuvor schon in zwei Experimenten von S. Altmann (2009) mittels qRT-PCR überprüft und sollte in einem weiteren Experiment statistisch abgesichert werden. Für die Validierung der Microarray-Ergebnisse mittels qRT-PCR wurden neben den Kontrollen (Wildtyp (WT)- und Empty-Vektor (EV)-Pflanzen), JA-defiziente Kartoffellinien verwendet, deren RNAi-Konstrukte spezifisch die JA-Biosynthesegene *Allenoxidcyclase* (*AOC*) oder *12-Oxophytodiensäurereductase 3* (*OPR3*) bzw. das JA-Rezeptorgen *COII* herunterregulierten. Die RNAi-Linien wurden in einer vorangegangenen Arbeit generiert (Halim *et al.* 2009) und zur Verfügung gestellt. Die Infiltration der Blätter von WT- und EV-Kontrollpflanzen und von den Jasmonat-defizienten Pflanzen (*AOC*-RNAi, *OPR3*-RNAi, *COII*-RNAi) erfolgte mit 100 μ M Pep-13. Da eine Blattinfiltration mit einer nadellosen Spritze zu Verwundungseffekten führen kann, wurden zur Kontrolle Pflanzen mit dem inaktiven Pep-13-Analogon W2A (100 μ M) infiltriert. Die qRT-PCR-Expressionsanalyse bestätigte die von S. Altmann (2009) generierten Microarray-Daten (siehe Einleitung Abbildung 1.8).

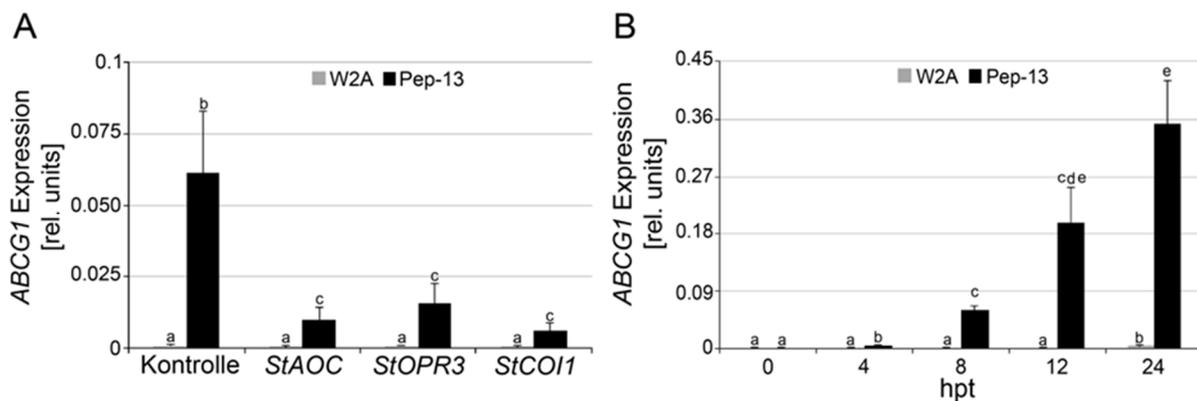


Abbildung 3.3: Einfluss von Pep-13 auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern.

Abgebildet sind die mittels qRT-PCR gemessenen relativen *ABCG1*-Transkriptgehalte in Kartoffelblättern nach Infiltration mit Pep-13 (100 μ M; schwarze Balken) und W2A (100 μ M; graue Balken). Als Referenzgen diente *EF1 α* .

(A) Verifizierung der Microarray-Daten. Für die cDNA-Synthese wurde die RNA von Blättern (die Ernte erfolgte 8 h nach Behandlung mit Pep-13 bzw. W2A) drei Wochen alter WT- und EV-Pflanzen (Kontrolle) und JA-defizienter Pflanzen (*StAOC*: *AOC*-RNAi, *StOPR3*: *OPR3*-RNAi, *StCOII*: *COII*-RNAi) genutzt.

(B) Zeitkinetik Pep-13-induzierter *ABCG1*-Expression. Die für die qRT-PCR eingesetzte cDNA wurde aus RNA infiltrierter Blätter drei Wochen alter WT-Pflanzen synthetisiert. Die Ernte der Blätter erfolgte zum angegebenen Zeitpunkt (hpt: Stunden nach Behandlung).

Dargestellt sind die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von zwei (**A**, $n \geq 6$) bzw. drei (**B**, $n \geq 6$) unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede nach dem Student'schen t-Test mit Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$ (**A** und **B**).

Pep-13 induzierte eine signifikant erhöhte Transkriptakkumulation von *ABCG1* in den Kontrollpflanzen (WT+EV) gegenüber der W2A-Kontrolle und den JA-defizienten Pflanzen (Abbildung 3.3A). Um das *ABCG1*-Expressionmuster nach Pep-13-Applikation zeitlich aufzulösen, erfolgte eine Kinetik mit WT-Pflanzen. Dabei wurde ein Anstieg in der Akkumulation des Transkripts innerhalb von 24 Stunden detektiert (Abbildung 3.3B). Leichte, aber signifikant erhöhte Transkriptgehalte im Vergleich zur Analogon-Kontrolle zeigten sich ab vier Stunden nach Pep-13-Behandlung; spätere Zeitpunkte nach Pep-13-Behandlung hingegen wiesen deutlich höhere Transkriptgehalte auf. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit denen vorangegangener semiquantitativen RT-PCR (sqRT-PCR)-Analysen (Altmann 2009) und bestätigen, dass die Expression von *ABCG1* in Kartoffelblättern durch Pep-13 induziert werden kann.

3.2.2 *ABCG1*-EXPRESSION NACH *PHYTOPHTHORA*-INFEKTION

Um *ABCG1* nicht nur nach Behandlung mit dem PAMP Pep-13 sondern auch nach direkter Interaktion von *S. tuberosum* mit dem Oomyceten *P. infestans* zu analysieren, wurde die Genexpression nach Infektion der Blätter von WT-Kartoffelpflanzen mit *P. infestans* zeitlich aufgelöst. Die Behandlung bewirkte eine Akkumulation des Transkripts 96 Stunden nach Infektion (Abbildung 3.4) und deutete darauf hin, dass das Pathogen die Genexpression von *ABCG1* induziert.

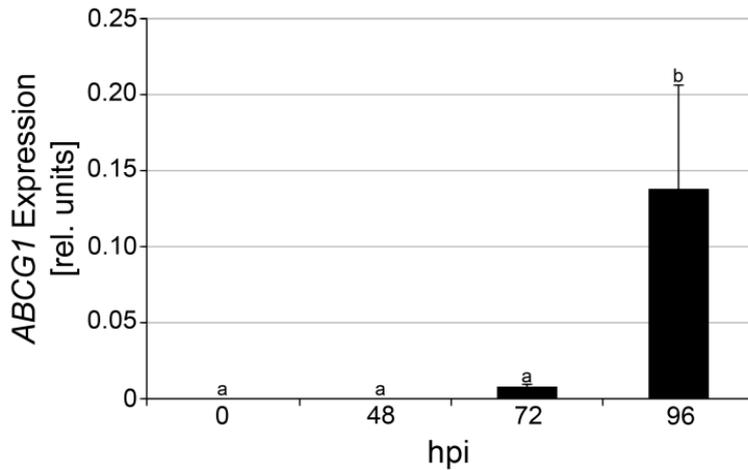


Abbildung 3.4: Einfluss von *P. infestans* auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern

Die Blätter von WT-Kartoffelpflanzen wurden mit 10 µl-Tropfen (10 Tropfen/Blatt) einer Zoosporensuspension (1×10^5 Zoosporen/ml) inokuliert. Die Ernte der Inokulationsstellen infizierter Blätter erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi: Stunden nach Inokulation) mittels Korkbohrer. Anschließend wurde aus den inokulierten Blattscheiben RNA isoliert, cDNA synthetisiert und mittels qRT-PCR der Transkriptgehalt von *ABCG1*

bestimmt. Als Referenzgen diente *EF1α* aus *S. tuberosum*. Dargestellt sind die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten ($n=8$ für 0 h und 48 h; $n=27$ für 72 h; $n=6$ für 96 h). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Test, $p < 0,05$).

3.2.3 *ABCG1*-EXPRESSION NACH BLATTVERWUNDUNG

In den Microarrays wurde *ABCG1* als JA-abhängig exprimiertes Gen identifiziert. Für JA ist bekannt, dass es neben der Interaktion der Pflanze mit Mikroorganismen auch in der Wundantwort involviert ist (Ryan & Moura 2002). Zudem sind einige Pathogen-induzierte Gene auch wundinduziert, wie z. B. das Peptid *StSnakin-2* (*StSN2*) mit antimikrobieller Wirkung gegenüber Pathogene (Berrocal-Lobo *et al.* 2002). Um zu untersuchen, ob eine Akkumulation des Transkripts durch Verwundung ausgelöst wird, wurde das Expressionsmuster von *ABCG1* in verwundeten Blättern von WT-Pflanzen in Abhängigkeit von der Zeit untersucht.

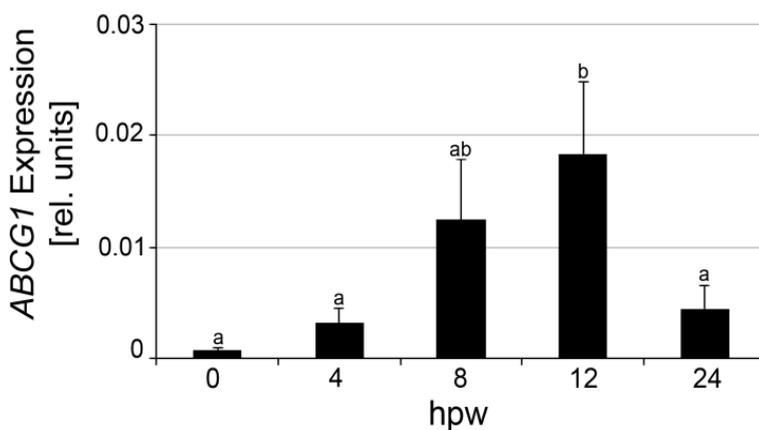


Abbildung 3.5: Einfluss von Verwundung auf die *ABCG1*-Transkriptakkumulation in Kartoffelblättern.

Die Blätter von WT-Kartoffelpflanzen wurden mittels Pinzette durch Quetschen über die Mittelrippe verwundet und zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet (hpw: Stunden nach Verwundung). Die Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte mittels qRT-PCR. Als Referenzgen diente *EF1α*. Dargestellt sind die Mittelwerte der $2^{-\Delta CT}$ -Werte von drei unabhängigen Experimenten ($n=6$). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Test, $p < 0,05$).

Die qRT-PCR-Analysen zeigten einen signifikanten Anstieg in der *ABCG1*-Transkriptakkumulation 12 h nach Verwundung (Abbildung 3.5). Nach 24 h war eine Abnahme des *ABCG1*-Transkriptgehalts zu verzeichnen. Diese Daten verifizieren vorangegangene, durch sqRT-PCR-Analysen ermittelten Ergebnisse (Altmann 2009) und verdeutlichen, dass die Expression von *ABCG1* nicht nur durch Pep-13 und *P. infestans*, sondern auch durch Blattverwundung induziert werden kann.

3.2.4 *ABCG1*-EXPRESSION IN VERSCHIEDENEN GEWEBEN

Für eine weitere Charakterisierung des *ABCG1*-Transportergens wurde das basale *ABCG1*-Expressionslevel in verschiedenen Organen fünf Wochen alter Kartoffelpflanzen untersucht. Die Anzucht erfolgte in einer Phytokammer. Anders als in einer vorausgegangenen Analyse (Altmann 2009) zeigten die qRT-PCR-Analysen eine gegenüber den Blättern hohe Aktivität des Gens in Wurzeln und Knollen von WT-Kartoffelpflanzen (Abbildung 3.6A). Die sqRT-PCR-Analyse von Altmann (2009) deutete auf eine geringe Expression von *ABCG1* in den Knollen (keine Differenzierung zwischen Mark und Schale) hin. Eine detailliertere Untersuchung von Knollen drei Monate alter Gewächshauspflanzen ergab eine starke Akkumulation von *ABCG1*-Transkripten in der Knollenschale und eine schwache Expression in den Markzellen (Abbildung 3.6B) und bestätigte die beobachtete hohe Transkriptmenge im Knollengewebe.

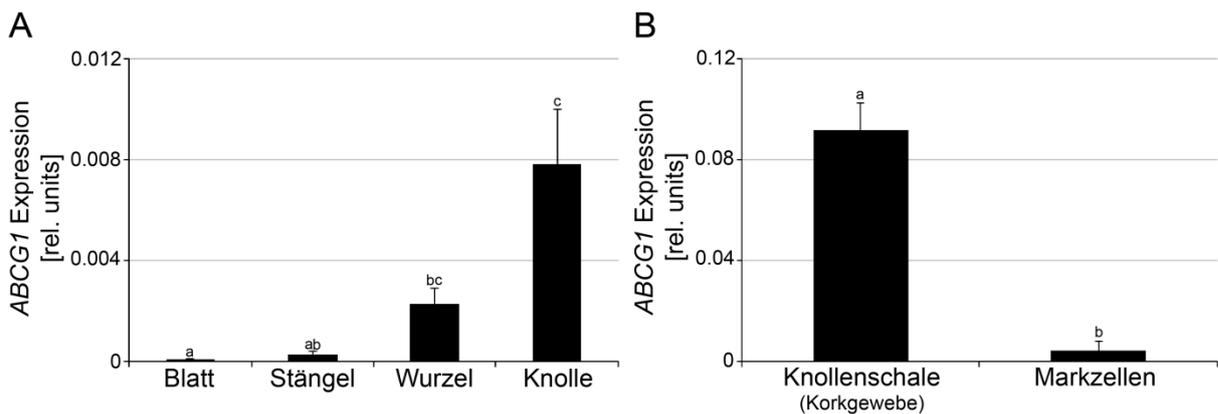


Abbildung 3.6: Organ-/Gewebespezifische *ABCG1*-Expression in WT-Kartoffelpflanzen.

qRT-PCR-Analyse der *ABCG1*-Transkriptakkumulation in verschiedenen Organen und Gewebe von WT-Kartoffelpflanzen. Als Referenzgen diente *EF1a*.

(A) Basale *ABCG1*-Expression in diversen Pflanzenorganen.

(B) Basale *ABCG1*-Expression in der Knollenschale und den Markzellen.

Dargestellt sind die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von drei (A, $n \geq 6$) bzw. zwei (B, $n = 8$) unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (A: Student'scher t-Test mit Bonferroni-Korrektur, $p < 0,05$; B: paarweiser Vergleich mittels t-Test, $p < 0,01$).

3.2.5 SUBZELLULÄRE LOKALISATION DES ABCG1-PROTEINS

Für die subzelluläre Lokalisierung des ABCG1-Proteins wurde die Vollängen-cDNA von *ABCG1* in den RFP-exprimierenden binären Vektor pUBC-DEST-RFP (Grefen *et al.* 2010) unter der Kontrolle eines Ubiquitin-10-Promotors kloniert. Die Expression des Konstrukts erfolgte nach transienter Transformation von Mesophyllprotoplasten von *A. thaliana*. Zusätzlich wurden als Referenz Vektoren genutzt, die ein plasmamembranlokalisiertes FLS2-YFP-Fusionkonstrukt (Robatzek *et al.* 2006) bzw. freies CFP, welches im Zellkern und Cytosol lokalisiert (Nakagawa *et al.* 2007), exprimieren. Die Visualisierung der subzellulären Proteinlokalisierung wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (LSM) durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass ABCG1-RFP mit dem FLS2-YFP-Fusionsprotein co-lokalisiert (Abbildung 3.7A) und nicht mit dem freien CFP im Cytosol oder Zellkern (Abbildung 3.7B), was auf eine Lokalisation an der Plasmamembran hindeutet.

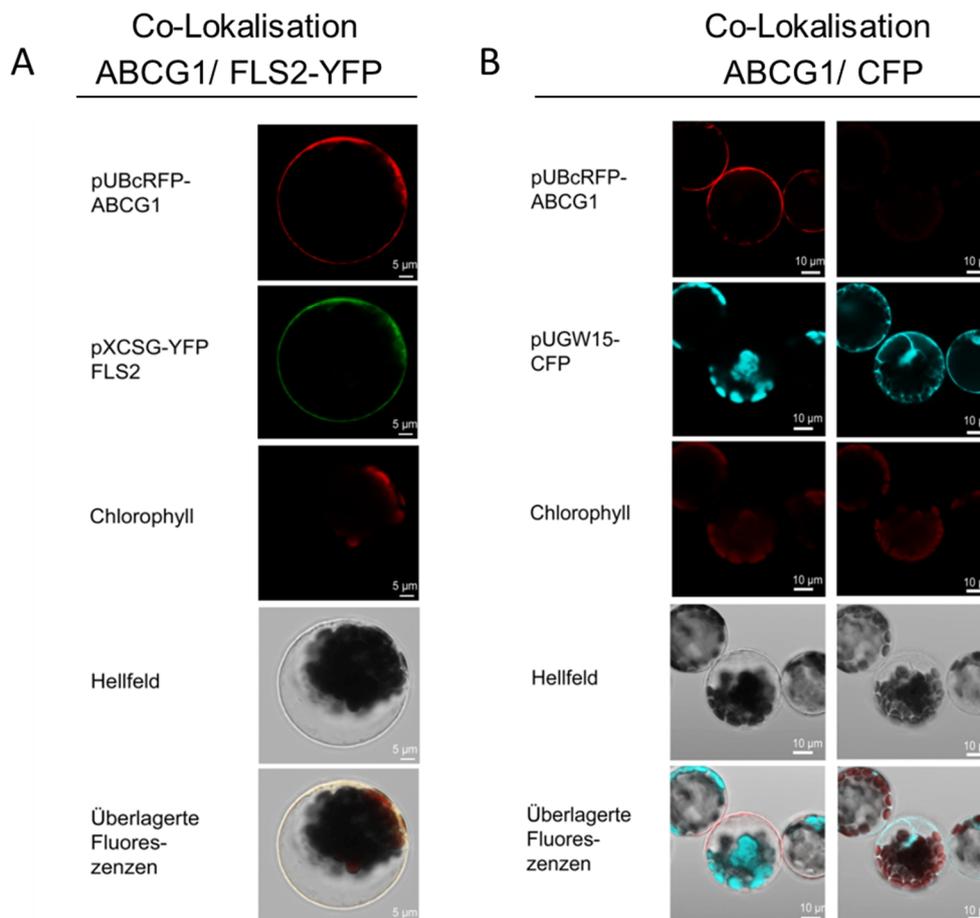


Abbildung 3.7: Lokalisation des ABCG1-RFP-Fusionsproteins in Mesophyllprotoplasten von *A. thaliana*.

A. thaliana-Mesophyllprotoplasten wurden mit ABCG1-RFP und FLS2-YFP (**A**) bzw. ABCG1-RFP und CFP (**B**) co-transformiert. Die Analyse erfolgte 16 Stunden nach Transformation. Dargestellt von oben nach unten sind jeweils die Aufnahmen der Fluoreszenzen von ABCG1-RFP (**A+B**, rot fluoreszierend), des Plasmamembran-Markers FLS2-YFP (**A**, grün fluoreszierend), des Kern- und Cytosolmarkers CFP (**B**, türkis fluoreszierend), der Chlorophyllfluoreszenz (rot) und des Hellfelds zur Verdeutlichung der aufgenommenen Ebene sowie die Überlagerung der jeweiligen Fluoreszenzen im Hellfeld.

Zusammenfassend zeigten die Analysen der WT-Kartoffelpflanzen, dass *ABCG1* insbesondere in Knollenschalen und Wurzeln exprimiert wird; die Expression kann exogen in den Blättern sowohl durch Behandlung mit Pep-13, *P. infestans* als auch durch Blattverwundung induziert werden. Das ABCG1-Protein lokalisiert an der Plasmamembran.

3.3 FUNKTIONELLE ANALYSE

3.3.1 CHARAKTERISIERUNG VON *ABCG*-RNAI-KARTOFFELPFLANZEN

Für die funktionelle Analyse des *ABCG1*-Transportergens standen Kartoffelpflanzen, die ein RNAi-Konstrukt gegen *ABCG1* tragen, bereits zur Verfügung. Zur Verifizierung wurden in einem weiteren Transformationsexperiment mit Hilfe *A. tumefaciens*-vermittelter „Kartoffel-Leaf-Disk“-Transformation, neue transgene Kartoffellinien generiert.

Hierfür wurde dasselbe RNAi-Konstrukt verwendet, das von S. Altmann unter Nutzung eines 413 bp-Fragments von *ABCG1* in den binären Vektor pHELLSGATE8 (Wesley *et al.* 2001) kloniert worden war. Die Nukleotidsequenz des 413 bp großen RNAi-Fragments entstammt von der Kartoffel EST-Sequenz des POCl-Mikroarrays (MICRO.15286.C1). Die Abbildung 3.8 zeigt schematisch die Struktur des *ABCG1*-Gens im unteren Teil (Analog zur Abbildung 3.1; siehe auch Abschnitt 3.1) zur Verdeutlichung der Position der schematischen Struktur des RNAi-Konstrukts (Abbildung 3.8, oben dargestellt). Dieses umfasst die letzten 210 bp des ersten Exons (744 bp) und die ersten 203 bp des zweiten Exons von 1509 bp.

Abbildung 3.8: Schematische Struktur von *ABCG1* mit Position des für das RNAi-Konstrukt genutzten Fragmentes.



Das *ABCG1*-Gen (unten dargestellt; Analog zu Abbildung 3.1A) besteht aus zwei Exons und einem Intron. Das verwendete RNAi-Fragment (oben dargestellt) umfasst die letzten 210 bp des ersten Exons (744 bp) und die ersten 203 bp des zweiten Exons (1509 bp). Das Schema wurde mit

Hilfe des über die Website www.wormweb.org verfügbaren Exon-Intron Graphic Makers erstellt. Die Maßstabbalken entsprechen 100 bp.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Genomsequenz der Kartoffel nicht bekannt. Auf dem heutigen Stand der Kartoffelgenomsequenz-Datenbank wurde ein kurzer Sequenzbereich von 39 Nukleotiden des in dieser Doktorarbeit verwendeten RNAi-Fragments identifiziert, das Homologien zum *ABCG20* Transkript aufweist (s. Anhang 7.7; www.ncbi.nlm.nih.gov; NCBI-Referenzsequenz: XM_006345622.2). Damit könnte neben *ABCG1* auch das Gen *ABCG20* ein Target für den RNAi-Effekt sein. Aus diesem Grund wurde die Nomenklatur von *ABCG1* in den Analysen, die die Suppression des Transporters betreffen, *ABCG* genannt. Inwiefern *ABCG20* in gleichen Mechanismen wie *ABCG1* involviert ist und einen potentiellen Dimerisierungspartner für *ABCG1* darstellt, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Gegenwärtige und außerhalb dieser Doktorarbeit durchgeführte Experimente zeigten, dass das verwendete RNAi-Konstrukt *ABCG20* nicht in allen generierten *ABCG*-RNAi-Linien supprimiert (Daten nicht gezeigt).

3.3.1.1 RNAI-VERMITTELTE SUPPRESSION DER *ABCG1*-EXPRESSION IN KARTOFFELPFLANZEN

Zum Nachweis des RNAi-Effektes in Pflanzen der erzeugten Linien wurden Blätter mit einer Pinzette verwundet und der *ABCG*-Transkriptgehalt mittels qRT-PCR analysiert. Von den 20 unabhängigen Transformanten wiesen im Vergleich zum WT wie auch zur EV-Kontrolle 16 Linien eine reduzierte *ABCG*-Transkriptakkumulation nach Verwundung auf (Abbildung 3.9A). Eine verminderte Induktion der *ABCG*-Transkriptakkumulation wurde ebenso nach Behandlung der Blätter mit Pep-13 (Abbildung 3.9B) festgestellt. Bei Betrachtung der mit dem inaktiven Analogon W2A behandelten Blätter war ein signifikant reduzierter Grundlevel der *ABCG*-Transkripte in den RNAi-Pflanzen im Vergleich zur Kontrolle (WT+EV) ersichtlich (Abbildung 3.9B). Wurzeln (Abbildung 3.9C) und Knollenschalen (Abbildung 3.9D) wiesen ebenfalls deutlich reduzierte *ABCG*-Transkriptgehalte auf. Zusammengefasst bestätigen die durchgeführten qRT-PCR-Analysen eine erfolgreiche Suppression des *ABCG*-Transkriptes und somit der erzeugten RNAi-Linien.

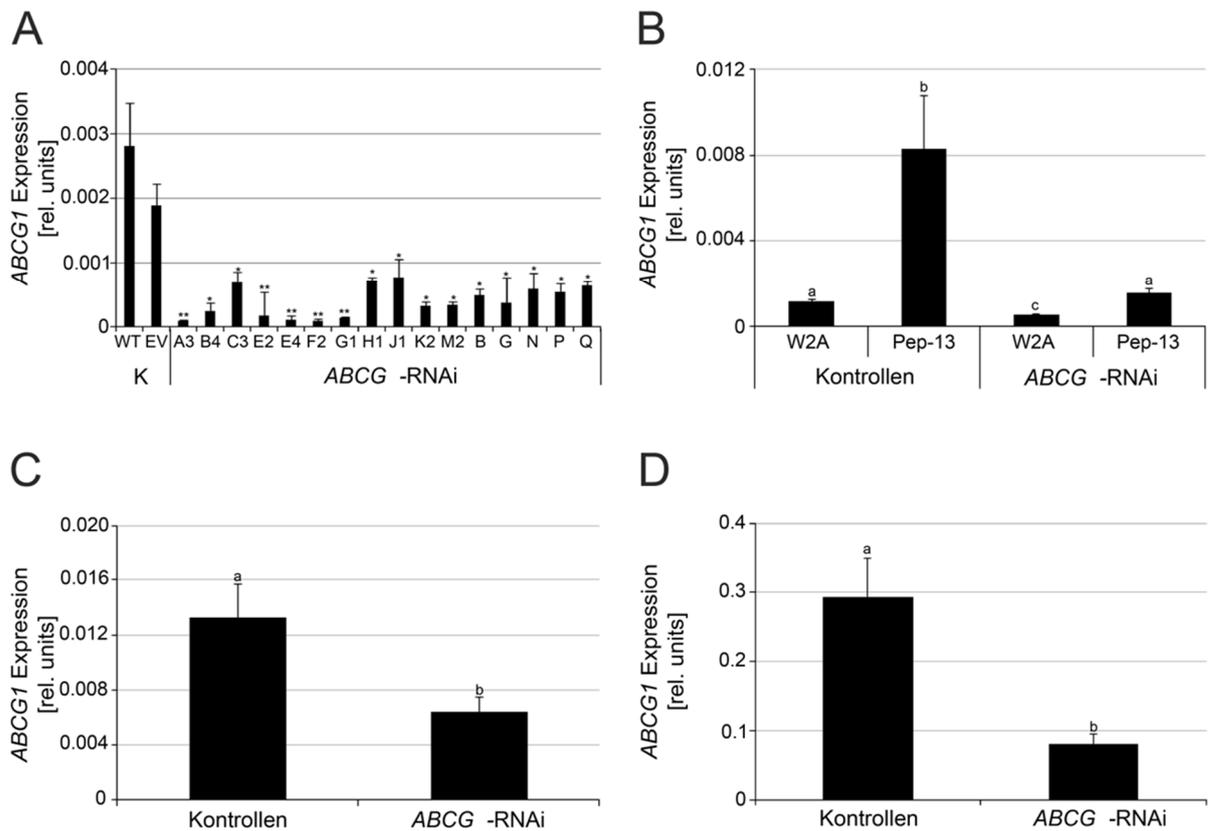


Abbildung 3.9: *ABCG1*-Transkriptakkumulation in *ABCG*-RNAi-Linien

Aus RNA drei Wochen alten Pflanzen wurde cDNA synthetisiert und mittels qRT-PCR der Transkriptgehalt von *ABCG1* analysiert. Als Referenzgen diente *EF1a*. Alle Diagramme zeigen Mittelwerte mit Standardfehler von Kontrollpflanzen (WT, EV) und Pflanzen unabhängiger RNAi-Linien; Letztere sind in **A** einzeln und in **C-D** als Gesamtmittel dargestellt.

(A) *ABCG1*-Expression in verwundeten Blättern. Die Isolierung der Blatt-RNA aus Kontrollpflanzen (K: [WT/EV]) und RNAi-Linien erfolgte 6 Stunden nach Verwundung. Die Daten repräsentieren die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten (WT: n=12; EV: n=12; *ABCG*-RNAi-Pflanzen: n=6). Die Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und *ABCG*-RNAi-Linien (Student'scher t-Test, * p < 0,05, ** p < 0,01).

(B) *ABCG1*-Expression in Pep-13-behandelten Blättern. Blätter von Kontroll- (WT/EV) und RNAi-Pflanzen wurden mit 100 μ M Pep-13 oder 100 μ M W2A infiltriert. Die Isolierung der RNA erfolgte 8 Stunden nach Behandlung. Dargestellt sind die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten (Kontrollen [WT+EV]: W2A: n=15, Pep-13: n=16; *ABCG*-RNAi: Mittel aus sechs unabhängigen Linien [B4, C, E4, F2, K, M]: W2A: n=18, Pep-13: n= 24). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und *ABCG*-RNAi-Linien (Student'scher t-Test, p<0,05).

(C) *ABCG1*-Expression in Wurzeln. Dargestellt sind die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten (Kontrollen [WT+EV]: n=18, *ABCG*-RNAi: [Mittel der Linien A, B4, C, E2, F2, K2, M2]: n=45). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollen und *ABCG*-RNAi-Linien (Student'scher t-Test, p<0,05).

(D) *ABCG1*-Expression in Kartoffelschalen. Das Diagramm zeigt die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten (Kontrollen [WT+EV]: n=12; *ABCG*-RNAi: n=27). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (Student'scher t-Test, p<0,001)

3.3.1.2 PHÄNOTYP DER *ABCG*-RNAI-PFLANZEN

Im Hinblick auf die oberirdischen Pflanzenteile zeigten die *ABCG*-RNAi-Pflanzen eine normale, mit dem WT und der EV-Kontrolle vergleichbare morphologische Entwicklung. Im Zuge der Ernte von Knollen aus der Erde fiel jedoch auf, dass die RNAi-Pflanzen einen veränderten Phänotyp in der Knollen- und Wurzelmorphologie im Vergleich zu den Kontrollen, sowohl zum WT als auch zur EV-Kontrolle, aufwiesen (Abbildung 3.10, 3.11). Die Anzahl und Größe der Knollen der RNAi-Pflanzen, nachfolgend auch RNAi-Knollen genannt, ähnelte den Kontrollen, aber die Knollenschale der RNAi-Pflanzen zeigten einen deutlichen Phänotyp. Diese war rau, rissig, schuppig und z. T. extrem verkorkt, auch war die Farbe der Schale bräunlich im Vergleich zu den Kontrollknollen mit ihren glatten, ebenen und rötlichen Schalen (Abbildung 3.10a-f). Einige RNAi-Knollen waren ausgetrocknet und fühlten sich bei der Ernte entweder sehr hart oder sehr weich an. Zudem wiesen die Knollen z. T. eine starke Faltenbildung auf. Das Periderm einiger Knollen ließ sich, im Gegensatz zum Periderm der Knollen der WT-Pflanzen, vergleichsweise einfach vom darunterliegenden Parenchymgewebe lösen. Der veränderte Knollenphänotyp konnte auch in Gewebekultur beobachtet werden (s. Anhang 7.13, Abbildung 7.2). Um die Phänotypen genauer zu untersuchen, wurden von Dr. G. Hause (MLU Halle) Semidünnschnitte sowohl vom Knollenperiderm als auch von Wurzeln hergestellt und eine Übersichtsfärbung mit Toluidinblau angefertigt. Die mikroskopische Analyse dieser gefärbten Dünnschnitte der Knollen verdeutlichte einen morphologischen Defekt in den Knollenschalen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.10i-l). Das Periderm der RNAi-Knollen kennzeichnete vor allem im Bereich des Phellems kollabierte und unstrukturierte Zellen (Pfeile; Abbildung 3.10j-l) im Vergleich zu den Kontrollen, bei denen insbesondere das Phellem deutlich strukturierte und klar geschichtete Zellen aufwies (Abbildung 3.10g+h). Zudem war das Phellemgewebe der RNAi-Knollen z. T. gerissen und wirkte dicker als das des Wildtyps. Die Bestimmung der Zellzahl und der Zellgröße war aufgrund der Phellemstruktur der RNAi-Knollen (kollabierte Zellen, zerrissenes Phellemgewebe) nicht möglich.

Neben der veränderten Knollenmorphologie hatten die RNAi-Pflanzen weniger und deutlich geringer verzweigte Wurzeln (Abbildung 3.11c-f). Diese waren zudem strohig, unelastisch, verdorrt, luftgefüllt und grob im Vergleich zu den eher filigranen Wurzeln der Kontrollpflanzen (Abbildung 3.11a+b). Die Wurzeldünnschnitte der *ABCG*-RNAi-Pflanzen wiesen z. T. erhebliche Schäden in der äußeren Zellschicht auf (Abbildung 3.11i-l). Zum einen hielt das Wurzelgewebe bei den RNAi-Linien, anders als bei den Kontrollen, der mechanischen Belastung des Schneidens, trotz vorheriger Einbettung in Technovit, weniger stand, so dass

einige Schnitte komplett zerrissenes Gewebe aus Exodermis- und Cortezzellen aufwiesen (Abbildung 3.11i+k). Zum anderen zeigten die RNAi-Linien teilweise kollabierte Exodermiszellen (Abbildung 3.11p+r).

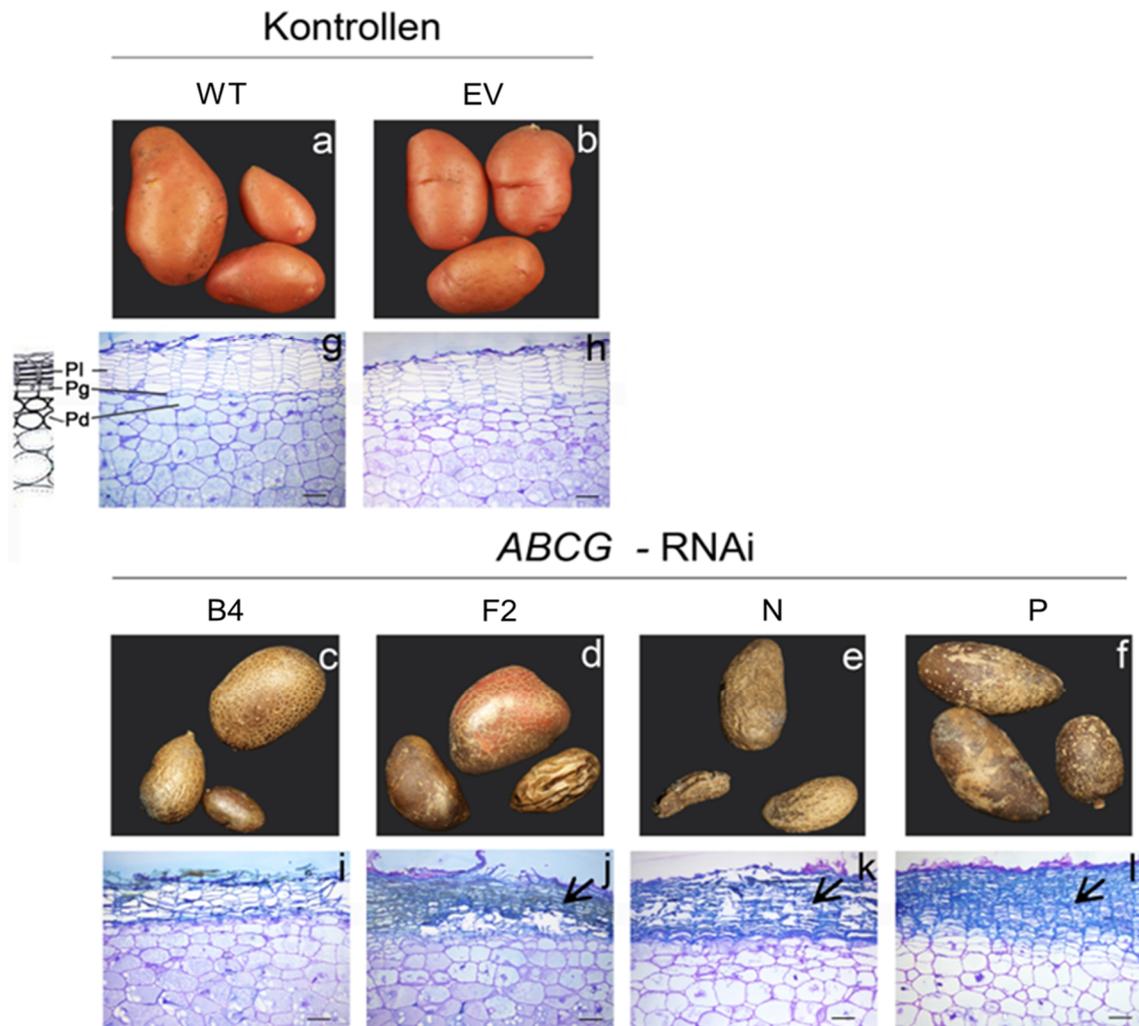


Abbildung 3.10: Veränderte Knollenmorphologie von *ABCG*-RNAi-Pflanzen.

Semidünnschnitte von Knollenperiderm und Wurzelmaterial (Abbildung 3.11) wurden nach Einbettung in Technovit angefertigt und anschließend mit Toluidinblau angefärbt. Die Färbung der Schnitte diente der besseren Visualisierung der Strukturen und hat keine qualitative Aussage.

(3.10) Knollenphänotyp von Kontrollpflanzen (WT: a; EV: b) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (B4: c, F2: d, N: e, P: f) nach der Ernte mit den jeweiligen mikroskopischen Aufnahmen von Knollendünnschnitten mit Fokus auf das Periderm von Kontroll- (WT: g, EV: h) und *ABCG*-RNAi-Knollen (B4: i, F2: j, N: k, P: l). Pl, Phellem; Pg, Phellogen; Pd, Phelloderm (Periderm-Grafik modifiziert nach www.apsnet.org). Maßstabsbalken entsprechen 80 µm.

Des Weiteren war der Zentralzylinder der RNAi-Linien von einer z. T. aus mehreren Zellschichten bestehenden Endodermis (Pfeil; Abbildung 3.11o) mit stellenweise kollabierten Zellen umgeben (Pfeil; Abbildung 3.11q).

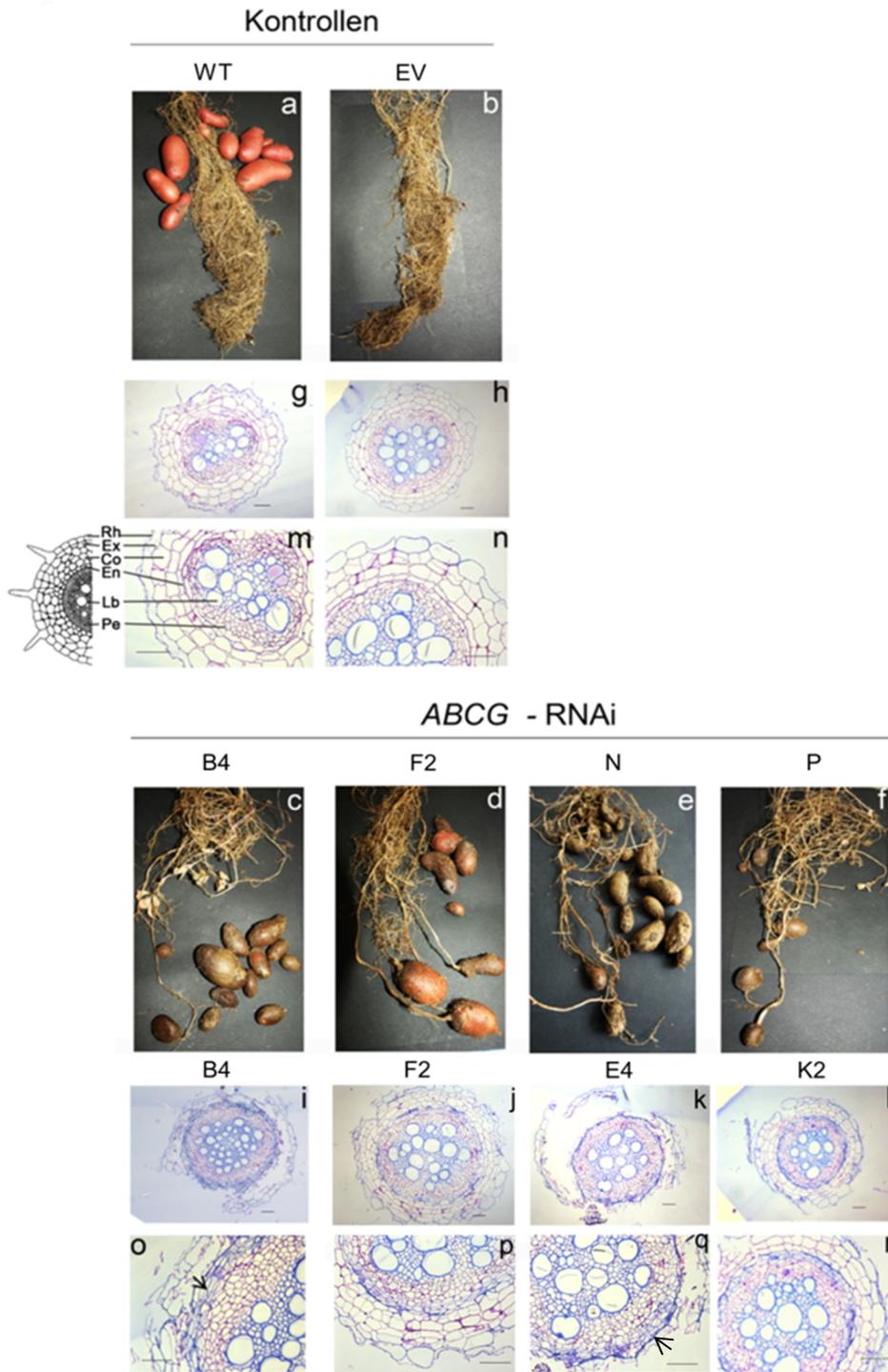


Abbildung 3.11: Veränderte Wurzelmorphologie von *ABCG*-RNAi-Pflanzen.

Wurzelphänotyp von Kontrollpflanzen (WT: **a**; EV: **b**) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (B4: **c**, F2: **d**, N: **e**, P: **f**) mit den jeweiligen mikroskopischen Aufnahmen der Wurzelquerschnitte von Kontroll- (WT: **g**, EV: **h**) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (B4: **i**, F2: **j**, E4: **k**, K2: **l**). Rh, Rhizodermis; Ex, Exodermis; Co, Cortex; En, Endodermis; Lb, Leitbündel; Pe, Perizykel (Grafik modifiziert nach www.digitalefolien.de). Maßstabsbalken entsprechen 100 μm (**g-l**) bzw. 50 μm (**m-r**).

Die Endodermiszellen der WT-Pflanzen hingegen waren einschichtig und die äußeren Zellschichten intakt (Abbildung 3.11m+n).

Die durchgeführten Analysen der RNAi-Pflanzen zeigten einen veränderten Phänotyp in der äußeren Wurzel- und Peridermschicht. Die Zellwände der Phellemzellen des Periderms der Knollenschale und der Exo- bzw. Endodermiszellen der Wurzel enthalten das Polymer Suberin (Schreiber 2010). Aufgrund der nachgewiesenen morphologischen Defekte, spezifisch in den suberinhaltigen Geweben der Knollenschale und den Wurzeln der RNAi-Pflanzen, wurde eine Rolle von Suberin in der Ausprägung der Phänotypen der RNAi-Linien vermutet.

3.3.1.3 WASSERVERLUST VON *ABCG*-RNAi-KNOLLEN

Eine wesentliche Funktion der Suberinisierung (Verkorkung) ist die Versiegelung der Pflanzenoberfläche zum Schutz vor Austrocknung durch Wasserverlust. Aufgrund des Knollenphänotyps der *ABCG*-RNAi-Pflanzen mit dem z. T. ausgetrocknet wirkenden Knollen und ihren faltigen Knollenschalen stellte sich die Frage, ob die Suppression des *ABCG*-Gens die Eigenschaften des Periderms hinsichtlich des Schutzes der Knolle vor Wasserverlust beeinflusst. Um zu testen, ob bzw. wie gut die Knollenschalen der RNAi-Pflanzen ihre Funktion erfüllen und die Knollen vor Austrocknung schützen, wurde das Frischgewicht von Knollen der WT- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen in einer Kinetik von 20 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln bestimmt. Zum Zeitpunkt der Ernte wurde bei gleicher Anzahl von Knollen (Abbildung 3.12C) ein reduziertes Gewicht bei den *ABCG*-RNAi-Knollen festgestellt (Abbildung 3.12A). Nach 20-tägiger Lagerung verloren die Knollen der RNAi-Pflanzen knapp 50 % ihres Anfangsgewichts, hingegen konnte bei den Knollen der WT-Pflanzen kein Gewichtsverlust nachgewiesen werden (Abbildung 3.12A). Die Reduktion des Gewichts der RNAi-Knollen wurde zusätzlich von einer extremen Faltenbildung der Knollenschale begleitet (Abbildung 3.12B), deren Ausprägung mit Zunahme des Gewichtsverlusts korrelierte. Auffällig war zudem, dass die Knollen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen z. T. starken Pathogenbefall aufwiesen, welcher bei den Knollen der WT-Pflanzen nicht auftrat (s. auch Abschnitt 3.4.1; Abbildung 3.25).

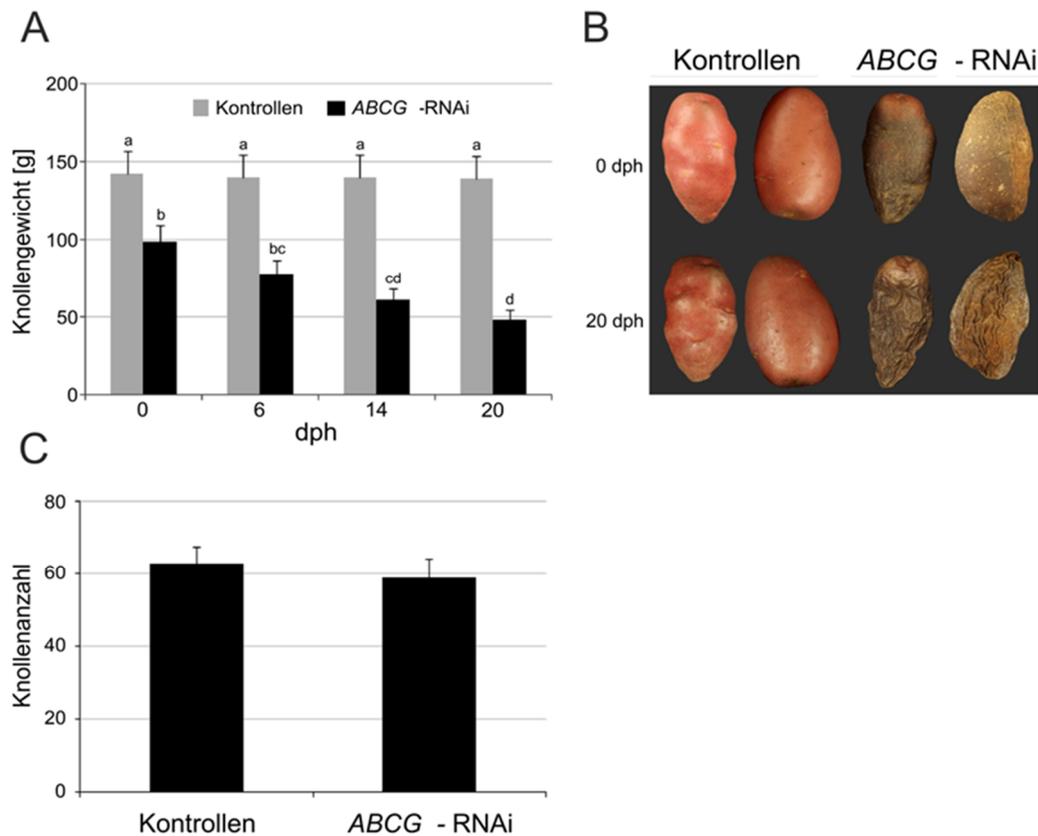


Abbildung 3.12: Knollengewichtsverlust von *ABCG*-RNAi-Pflanzen.

(A) Wasserverlust von Knollen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen. Für die Analyse wurden Knollen drei Monate alter Kontroll- (Mittel von WT und EV; graue Balken) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (RNAi-Linien: N, P; schwarze Balken) geerntet und bei RT im Dunkeln gelagert. Die Bestimmung des Knollengewichts erfolgte jeweils zum angegebenen Zeitpunkt (dph: Tage nach der Ernte). Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (n=39). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

(B) Repräsentativer Knollenphänotyp von Kontroll- (rechts: WT, links: EV) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Linien: rechts: N, links: P) zum Zeitpunkt der Ernte (0 dph) und 20 Tage nach Lagerung bei RT im Dunkeln (20 dph).

(C) Knollenanzahl von WT- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen. Die Bestimmung der Anzahl der Knollen erfolgte aus der unter (A) beschriebenen Ernte. Dargestellt sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten (n=39). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Der Lagerversuch bestätigte, dass zusätzlich zum phänotypischen Defekt in der Periderm- und äußeren Wurzelschicht (Abbildung 3.10, 3.11) ein Defekt in der Wasserbarriere der *ABCG*-RNAi-Knollen vorlag. Dies weist darauf hin, dass die Reduktion der Genexpression des Transporters die Barriereigenschaften beeinflusst.

3.3.1.4 VISUALISIERUNG DER SUBERINEINLAGERUNG IN DEN ZELLWÄNDEN DES *ABCG*-RNAI-KNOLLENPERIDERMS UND DER WURZELEXODERMIS

Die aliphatischen Substanzen von Suberin können spezifisch mit Hilfe des lipophilen Farbstoffs Fluorol-Yellow-088 angefärbt und so visualisiert werden (Machado *et al.* 2013). Um festzustellen, ob die reduzierte *ABCG1*-Expression in der Knollenschale und Wurzel (Abbildung 3.9C, D) einen Einfluss auf die Einlagerung von Suberin in den Zellwänden des Knollenperiderms bzw. der Wurzelexo- und -endodermis hat, wurden Semidünnschnitte angefertigt (durchgeführt von Dr. G. Hause, MLU Halle), diese anschließend mit Fluorol-Yellow-088 gefärbt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Im Vergleich zu den Kontrollen war die gelbe Fluorol-Yellow-Fluoreszenz des gefärbten Suberins in den Wänden von Knollenperidermzellen (Abbildung 3.13Ag-r) und vor allem in den Zellen der Wurzelexodermis der *ABCG*-RNAi-Pflanzen stark reduziert (Abbildung 3.13Bg-r). Zudem wurde eine erhöhte Autofluoreszenz, möglicherweise aufgrund einer Akkumulation phenolischer Verbindungen in den Zellwänden des Knollenperiderms der RNAi-Pflanzen, detektiert (blau fluoreszierend; Abbildung 3.13Ag, Aj, Am, Ap). Die überlagerten Fluoreszenzbilder verdeutlichten die Reduktion der Fluorol-Yellow-Fluoreszenz bzw. die Erhöhung der Autofluoreszenz (Abbildung 3.13Ai, Al, Ao, Ar). Entgegen der Fluoreszenz der Wurzelexodermiszellen wurden leicht gelb fluoreszierende Zellwände der bereits unter Abschnitt 3.3.1.2 erwähnten, mehrschichtigen -endodermis um den Zentralzylinder der *ABCG*-RNAi-Pflanzen erkennbar (Abbildung 3.13Bg-Br). Zudem war die Autofluoreszenz in diesem Gewebe im Vergleich zu den Kontrollen stark erhöht (Abbildung 3.13Bg, Bj, Bm, Bp).

Die mikroskopischen Analysen deuteten auf eine reduzierte Suberineinlagerung in den Zellen von Knollenperiderm und Wurzeln der *ABCG*-RNAi-Pflanzen und somit auf einen Zusammenhang zwischen *ABCG*-Expression und Suberinsynthese bzw. -translokation hin. Um dies zu untersuchen, wurde die Monomierzusammensetzung von depolymerisiertem Periderm von *ABCG*-RNAi- und Kontrollpflanzen mittels GC-MS-basiertem Metabolitenprofiling in Kooperation mit N. Strehmel (IPB Halle) und C. Böttcher (IPB Halle) analysiert.

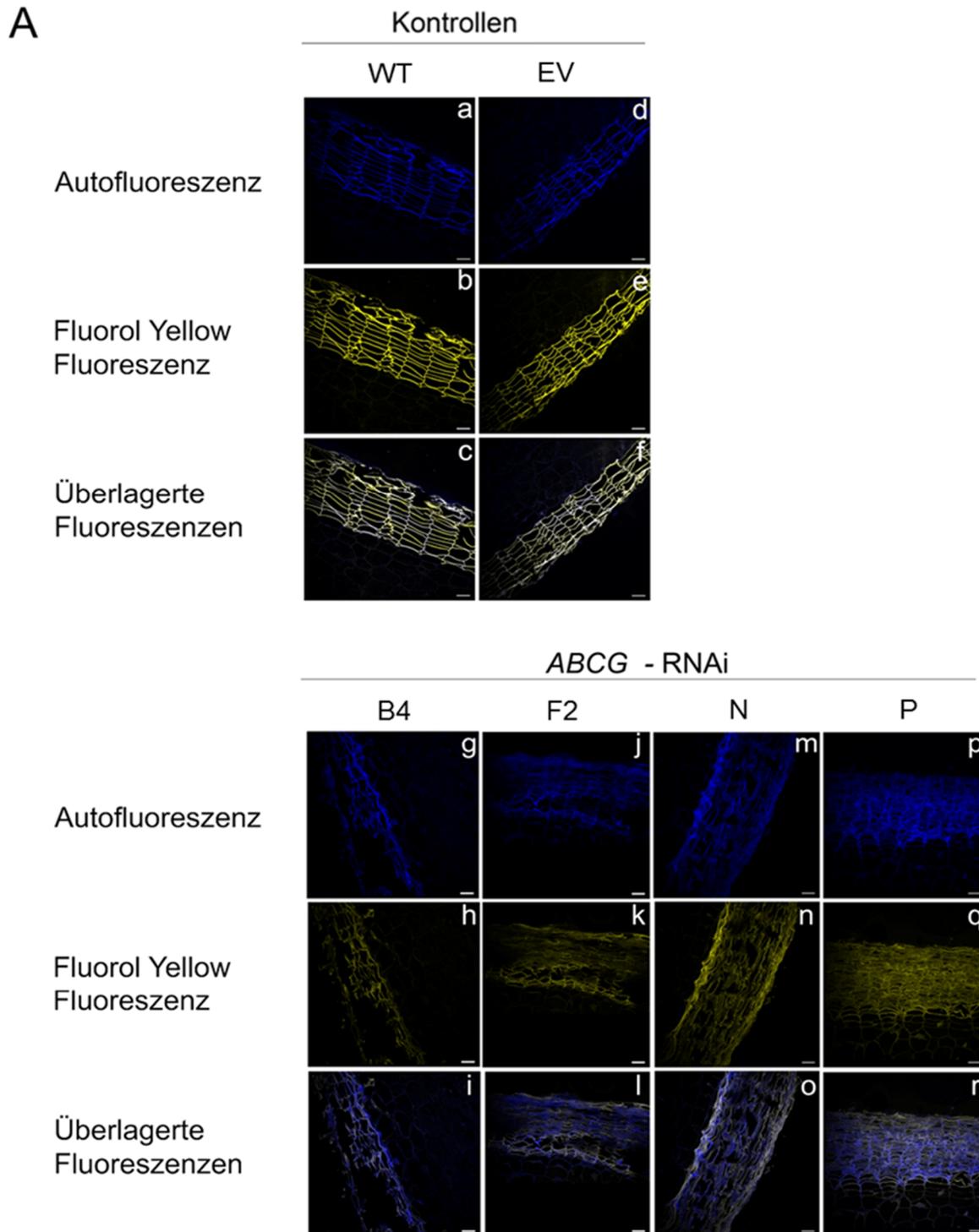
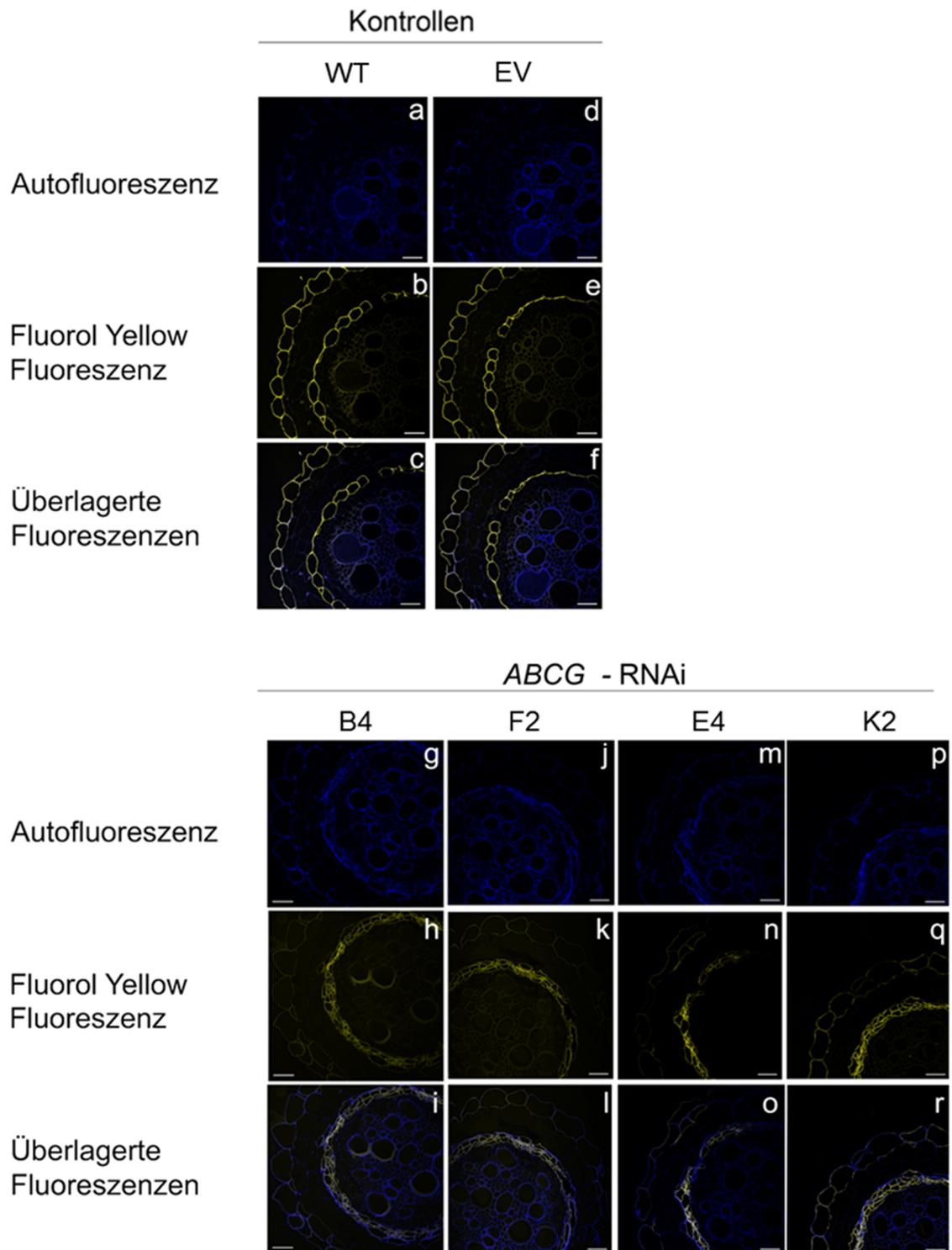


Abbildung 3.13: Fluorol-Yellow-088-Färbung von Knollenperiderm und Wurzeln der Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen.

Semidünnschnitte von Knollenperiderm und Wurzeln drei Monate alter Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen wurden nach Einbettung in Technovit angefertigt (durchgeführt von Dr. G. Hause, MLU Halle) und das eingelagerte Suberin spezifisch mit Fluorol-Yellow-088 angefärbt. Die Analyse der Dünnschnitte erfolgte mittels LSM. Maßstabalken entsprechen 50 μ m.

(A) Knollenperidermdünnschnitte von Kontroll- (WT: **Aa-c**; EV: **Ad-f**) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Linien B4: **Ag-i**; F2: **Aj-l**; N: **Am-o**; P: **Ap-r**).

B



(B) Wurzelquerschnitte von Kontroll- (WT: **Ba-c**; EV: **Bd-f**) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Linien B4: **Bg-i**; F2: **Bj-l**; E4: **Bm-o**; K2: **Bp-r**).

3.3.1.5 SUBERINZUSAMMENSETZUNG IM KNOLLENPERIDERM VON *ABCG*-RNAI-PFLANZEN

Um zu untersuchen, ob die Suppression der *ABCG*-Expression die quantitative Zusammensetzung der aliphatischen Monomere des Suberins beeinflusst, wurde zunächst das Periderm von Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Knollen isoliert. Nach enzymatischer Entfernung der Zellwände und Mittellammellen der Peridermzellen, wurde das verdaute Material entfettet und durch säurekatalysierte Methanolyse depolymerisiert. Die Monomerquantifizierung erfolgte nach Trimethylsilylierung mittels GC-MS (s. Anhang 7.8, Tabelle 7.1 bis 7.5). Im aliphatischen Suberin werden nach der Derivatisierung durch die GC-MS zwei OH-C18:1-Hauptverbindungen unterschieden, die C18:1- ω -Hydroxyfettsäure (ω -OH-C18:1) und C18:1- α,ω -Dicarbonsäure (α,ω -DCA-C18:1). Zudem liegen typische Nebenverbindungen wie andere ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren, weitere gesättigte Fettsäuren, Fettalkohole wie auch Ferulasäure und Cumarsäure vor (Schreiber *et al.* 2005, Serra *et al.* 2010). Der Gehalt der aliphatischen Hauptmonomere ω -OH-C18:1 und α,ω -DCA-C18:1 des Knollenperiderms war im Vergleich zu den Kontrollpflanzen einheitlich über die vier *ABCG*-RNAi-Linien um 91 und 88 % reduziert (Abbildung 3.14F und G). Dabei schwankte die Reduktion innerhalb der vier RNAi-Linien in einem Bereich von 84-92 % bei ω -OH-C18:1 und von 78-91 % bei α,ω -DCA-C18:1 im Vergleich zur WT-Kontrolle; die EV-Kontrolle zeigte keine reduzierten Gehalte (Abbildung 3.14F, G). Eine ähnlich starke Reduktion der Gehalte, wie sie auch für die Hauptmonomere festgestellt wurden (Abbildung 3.14F, G), zeigten die aliphatischen Nebenverbindungen ω -Hydroxyfettsäuren, Fettsäuren und Fettalkohole in den Kettenlängen C24, C26, C28 und C30 im Periderm der *ABCG*-RNAi-Knollen im Vergleich zu den C24, C26, C28 und C30-Kontrollen (Abbildung 3.14A, C, D). Im Gegensatz dazu wurden im Knollenperiderm der RNAi-Pflanzen erhöhte Gehalte der Nebenverbindungen ω -Hydroxyfettsäuren, Fettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren für die Monomerkettenlängen C16 bis C22 gegenüber den entsprechenden Kontrollen nachgewiesen (Abbildung 3.14A, B, C). Zudem verfügt das Knollenperiderm bei *ABCG*-RNAi-Pflanzen über einen geringeren Ferulasäuregehalt als bei Kontrollpflanzen, wohingegen keine Unterschiede im Cumarsäuregehalt festgestellt werden konnten (Abbildung 3.14E).

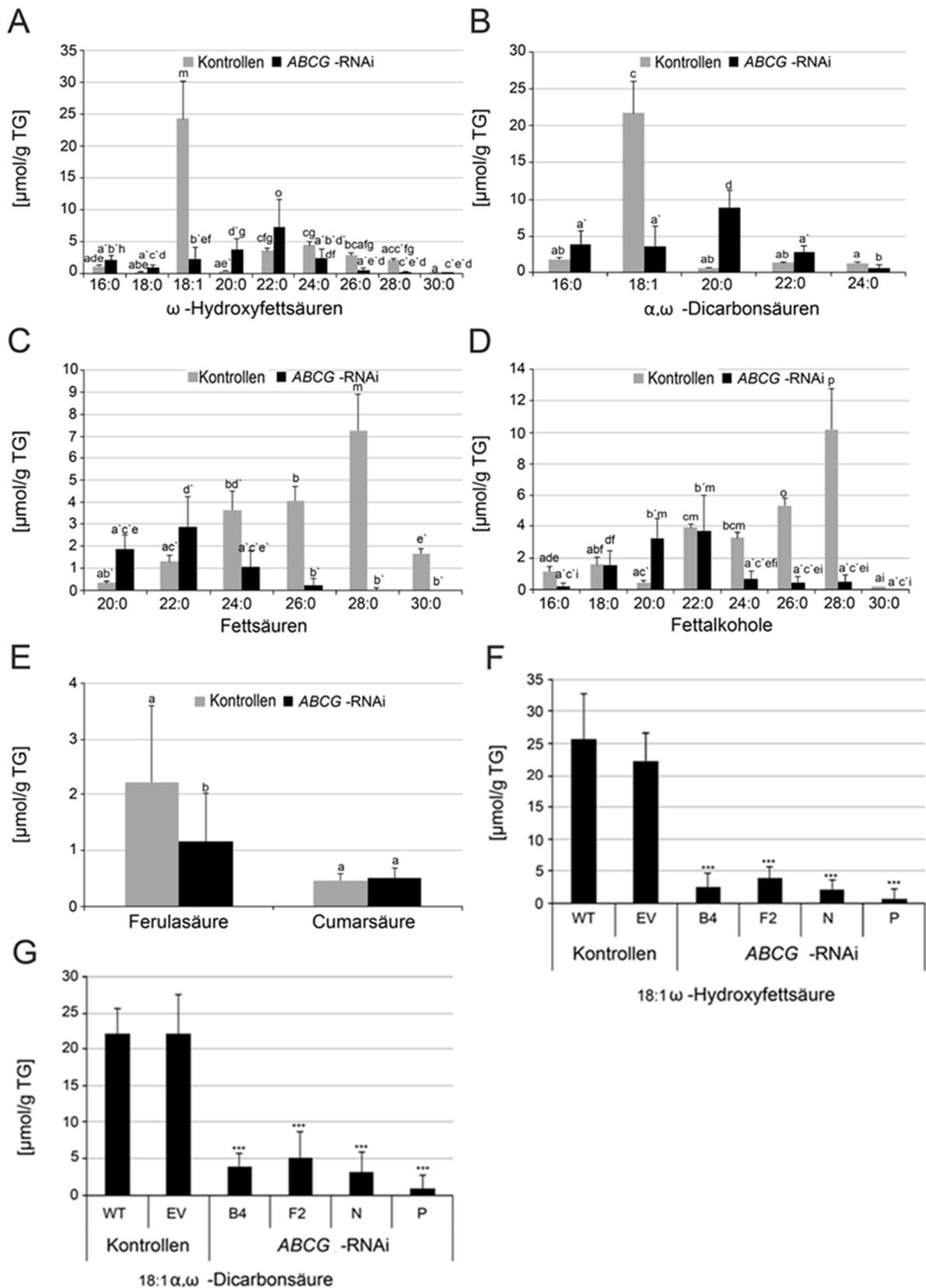


Abbildung 3.14: Quantitative Zusammensetzung aliphatischer Suberinmonomere von Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Knollenperiderm.

Periderm von WT-, EV- und *ABCG*-RNAi-Knollen wurde enzymatisch verdaut und entfettet. Nach Depolymerisierung erfolgte die Analyse der freigesetzten Monomere mittels GC-MS. Die Monomere wurden über QuantifierIon/QualifierIon/

Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.8, Tabelle 7.1 bis 7.5) und die resultierenden Peakflächen unter Verwendung von drei internen Standards (Pentadecanol, Methyl-Heptadecanoat, Methyl-15-Hydroxy-Pentadecanoat) in Bezug auf das Trockengewicht (TG) quantifiziert. Die Daten stammen von zwei unabhängigen Experimenten.

(A-E) Gehalte von ω -Hydroxyfettsäuren **(A)**, α,ω -Dicarbonsäuren **(B)**, gesättigten Fettsäuren **(C)**, Fettalkohole **(D)** sowie Ferula- und Cumarsäure **(E)**. Dargestellt ist jeweils der Median der Kontrollen (WT+EV; n=16) und von vier zusammengefassten *ABCG*-RNAi-Linien (B4, F2, N, P; n=32) mit den Standardabweichungen. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Verbindung (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$)

(F+G) Gehalte der aliphatischen Hauptmonomere C18:1- ω -Hydroxyfettsäure **(F)** und C18:1- α,ω -Dicarbonsäure **(G)** in den einzelnen *ABCG*-RNAi-Linien. Dargestellt ist jeweils der Median mit Standardabweichung des WT, der EV-Kontrolle und der untersuchten *ABCG*-RNAi-Linien B4, F2, N, P (jeweils n=8). Sternchen kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede im paarweisen Vergleich zum WT (Student'scher t-Test, *** $p < 0,001$).

Die quantitative Analyse des Knollenperiderms mittels GC-MS ergab, dass die Suppression von *ABCG* mit einer Reduktion in den Gehalten der aliphatischen Hauptmonomere des Suberins und mit einer Veränderung der quantitativen Zusammensetzung aliphatischer Nebenmonomere einhergeht. Diese Daten verifizieren die mikroskopischen Analysen und lassen auf einen reduzierten Suberingehalt in den Zellen des Knollenperiderms der RNAi-Pflanzen schließen.

3.3.1.6 APOLARE VERBINDUNGEN IM KNOLLENPERIDERM VON *ABCG*-RNAI-PFLANZEN

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der polymerisierten Suberinmonomere des Knollenperiderms bei *ABCG*-RNAi-Pflanzen mit einer Akkumulation von monomeren Suberinvorstufen korreliert, wurde eine auf *Ultrapformance liquid chromatography (UPLC)/photodiode array (PDA)/electrospray ionization (ESI)-quantitative time-of-flight (QTOF)-mass spectrometry (MS)*- basierende Analyse von apolaren Peridermextrakten in Kooperation mit C. Böttcher (IPB Halle) durchgeführt. Beim Vergleichen der UV-Chromatogramme der Kontroll- und der RNAi-Pflanzen konnten zahlreiche Verbindungen mit wesentlich höheren Peak-Intensitäten, mit einem Absorptionsmaximum von 324 nm bzw. zusätzliche Verbindungen monomerer Suberinvorläufer im Periderm von RNAi-Knollen detektiert werden (Abbildung 3.15). Auf Basis ihrer UV-Absorption und Charakterisierung durch ESI-QTOF-MS war es möglich, eine Reihe von Ferulasäurekonjugaten (s. Anhang 7.9; 7.12) u.a. als Feruloyloxyfettsäuren (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.6) aber auch Feruloyloxyfettsäuren verestert mit Glycerol (FOFAG) jeweils in den Kettenlängen von C16-C28 in den Peridermextrakten zu identifizieren (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.7). Neben diesen wurden noch weitere Ferulasäurekonjugate wie Alkylferulate (C16-

C28), Hydroxyalkylferulate (C16-C24) und Feruloyloxyalkylferulate (in den Kettenlängen C16-24) identifiziert (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.8 bis 7.10).

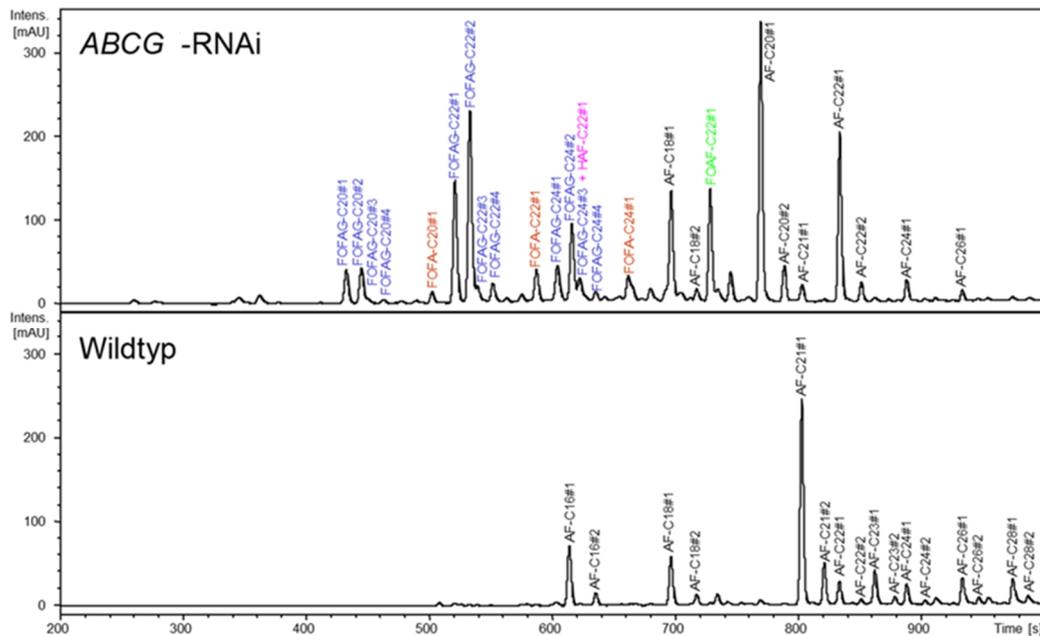


Abbildung 3.15: UV-Chromatogramm der apolaren Peridermextrakte von Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Knollen

Dargestellt ist ein Beispiel UV-Chromatogramm (324 nm) der apolaren Extrakte vom Knollenperiderm der *ABCG*-RNAi-Linie P und des Periderms der WT-Kontrolle.

Identifizierte Haupt-Ferulasäurekonjugate: AF, Alkylferulate; HAF, Hydroxyalkylferulate; FOAF, Feruloyloxyalkylferulate; FOFA, Feruloyloxyfettsäuren; FOFAG, Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester.

Nach relativer Quantifizierung dieser Verbindungen wurden erhöhte Gehalte der Hydroxyalkylferulate (mit Ausnahme von C21) und Feruloyloxyalkylferulate (außer C16) in den Peridermextrakten der *ABCG*-RNAi-Linien detektiert (s. Anhang 7.10, Tabelle 7.15A, inklusive ungeraden Kettenlängen; Abbildung 3.16D, E jeweils mit geraden Kettenlängen). In den Peridermextrakten der Kontrollen wurden keine Hydroxyalkylferulate in den Kettenlängen C18 und C20 nachgewiesen (Abbildung 3.16D). Zudem hyperakkumulierten vor allem Feruloyloxyfettsäuren (C16-C28) und ihre Glycerolester in den Kettenlängen von C16-C27 in den *ABCG*-RNAi-Peridermextrakten im Vergleich zur Kontrolle (s. Anhang 7.10, Tabelle 7.15A, inklusive ungeraden Kettenlängen und Abbildung 3.16A+B zeigt die jeweiligen Verbindungen mit geraden Kettenlängen). Neben den erwähnten Verbindungen wurden noch weitere mögliche monomere Suberinpräkursoren in den apolaren Peridermextrakten, wie ω -Hydroxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren, detektiert. Die relative Quantifizierung ergab eine Hyperakkumulation für beide Verbindungen jeweils in den Kettenlängen C20-C26 in den

ABCG-RNAi-Peridermextrakten im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle (Abbildung 3.16F, G und Anhang 7.10, Tabelle 7.15A). Zudem wurde weder die C20- ω -Hydroxyfettsäure noch die C20- α,ω -Dicarbonsäure in den Peridermextrakten der Kontrollen nachgewiesen (Abbildung 3.16F, G). Signifikant erhöhte Gehalte der Alkylferulate wurden für die Kettenlängen C18, C19, C20 und C22 im Vergleich zu der jeweiligen C18, C19, C20 und C22-Kontrolle detektiert (Abbildung 3.16C). Die Fettsäuren akkumulierten in den Kettenlängen C16-C24, mit Ausnahme von C18:2, in verstärktem Maße in den Peridermextrakten der RNAi-Knollen gegenüber den Kontrollknollen mit analoger Kettenlänge, wobei eine starke Akkumulation bei der C18:1-Fettsäure entgegen der C18:1-Kontrolle detektiert werden konnte; C28- und C30-Fettsäuren waren leicht reduziert verglichen mit den C28- und C30-Kontrollen (Abbildung 3.16H und Anhang 7.10, Tabelle 7.15A). Die höchste Abundanz der Feruloyloxyfettsäuren und α,ω -Dicarbonsäuren wurden für die Kettenlängen C20 bis C24 verzeichnet (Abbildung 3.16A, G). Sowohl die Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester als auch ω -Hydroxyfettsäuren zeigten eine maximale Akkumulation bei C22 (Abbildung 3.16B, D).

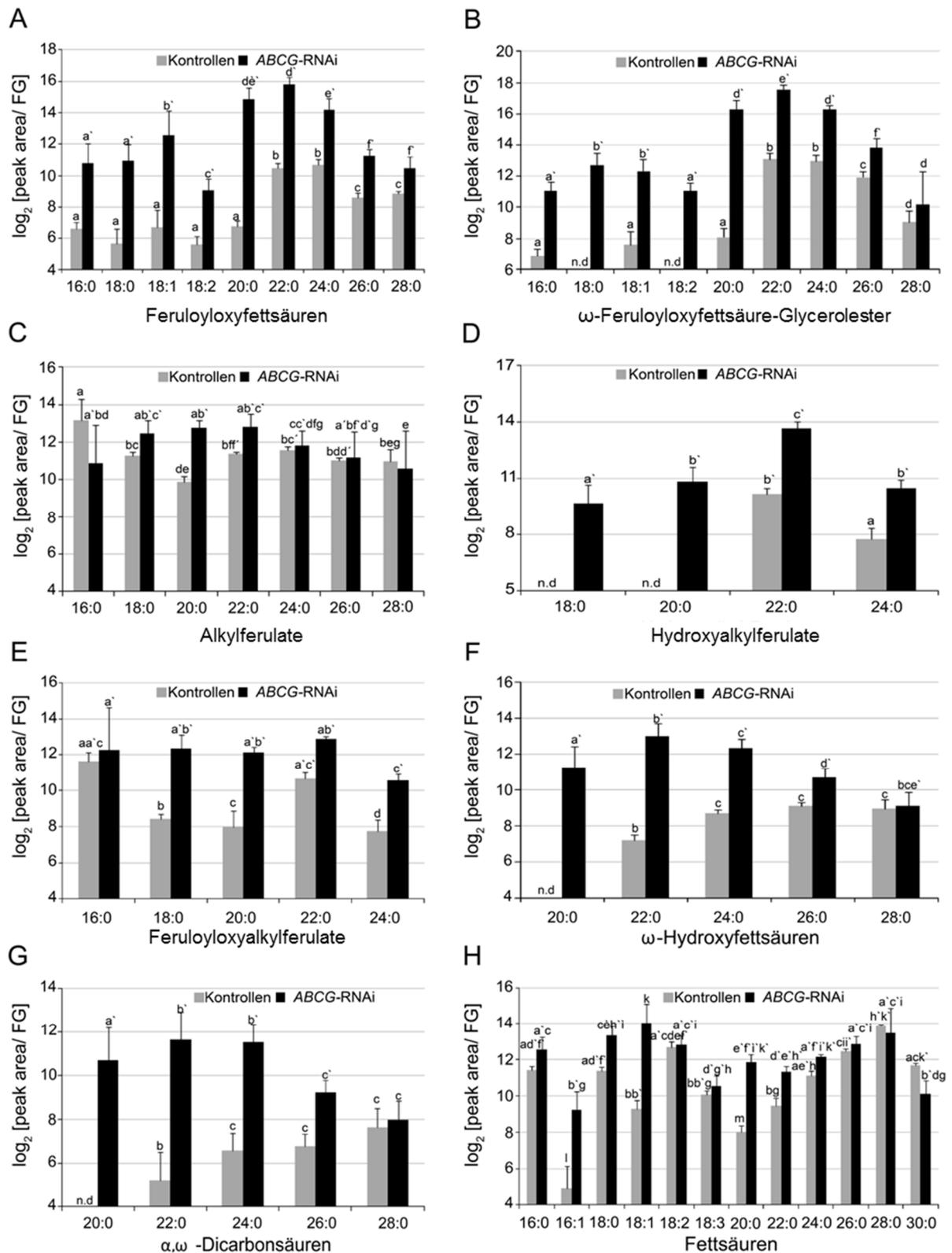


Abbildung 3.16: Relative Quantifizierung monomerer Vorstufen von Suberin in apolaren Peridermextrakten von Kontroll- und ABCG-RNAi-Knollen.

Frisches, unverdautes Periderm von Kontroll- (WT+EV; n=16) und ABCG-RNAi-Knollen (RNAi-Linien B4, F2, N, P; gesamt n=32) wurden mit Methyl-*tert*-butylether extrahiert und die apolaren Extrakte im Anschluss mittels UPLC/PDA/ESI(-)-QTOF-MS analysiert. Die Monomere wurden über QuantifierIon/ QualifierIon/ Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.6 bis 7.13), die resultierenden Peakflächen auf Frischgewicht (FG) normalisiert und log₂ transformiert. Dargestellt ist der

Median der Daten von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Verbindung (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$) n.d.: nicht detektierbar.

(A) Feruloyloxyfettsäure; (B) Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester; (C) Alkylferulate; (D) Hydroxyalkylferulate; (E) Feruloylhydroxyalkylferulate; (F) ω -Hydroxyfettsäuren; (G) α,ω -Dicarbonsäuren; (D) gesättigte Fettsäuren.

Die Suppression von *ABCG* bedingt die Akkumulation monomerer Suberinvorstufen und diese korreliert mit der Reduktion polymerisierter Suberinmonomere im Knollenperiderm.

3.3.1.7 SEMIPOLARE VERBINDUNGEN IM KNOLLENPERIDERM VON *ABCG-RNAi*-PFLANZEN

Weiterhin wurden methanolische Extrakte mittels UPLC/PDA/ESI(+)-QTOF-MS analysiert, um zu untersuchen, ob der *ABCG-RNAi*-Effekt neben dem Profil der apolaren Verbindungen auch das Profil der semipolaren Verbindungen des Knollenperiderms beeinflusst. In den semipolaren Peridermextrakten von *RNAi*-Knollen wurden stark erhöhte Hydroxyzimtsäureamidgehalte gegenüber den Peridermextrakten von Kontrollknollen detektiert (Tabelle 3.1). Vor allem Cinnamoyl- und Coumaroylputrescin und das Dehydrodimer von Feruloyltyramin-Feruloyloctopamin konnten in den Kontrollperidermextrakten der Kontrollen nicht nachgewiesen werden, akkumulierten jedoch sehr stark im *RNAi*-Periderm. Dagegen war der Kaffeesäuregehalt um ca. 37 % und der Chlorogensäuregehalt um ca. 13 % in den *RNAi*-Knollen reduziert. Die Chlorogensäure war die Hauptphenolverbindung, die in den Kontrollperidermextrakten detektiert wurde. Des Weiteren waren die Aminosäuren Tyrosin und Phenylalanin mit jeweils um ca. 18 % und 7 % im *RNAi*-Knollenperiderm im Vergleich zu den Kontrollen reduziert; keine Unterschiede wurden für den Tryptophangehalt festgestellt. Der im Vergleich zur Kontrolle um ca. 18 % geringere Gehalt der Anthocyan-Glycoside des Pelargonidins im *RNAi*-Knollenperiderm könnte die bräunliche Schale der *RNAi*-Knollen im Vergleich zu den rot-braunen Knollenschalen der Kontrollen erklären.

Tabelle 3.1: Relative Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren, Phenole, Anthocyane und Glykoalkaloide in semipolaren Peridermextrakten von *ABCG*-RNAi- und Kontrollknollen.

| Verbindungen | Log ₂ (Peakfläche/ Frischgewicht) Median±Standardabweichung | |
|--|---|-------------------|
| | Kontrollen | <i>ABCG</i> -RNAi |
| Phenylalanin | 11.9 ± 0.5 | 9.9 ± 0.8*** |
| Tyrosin | 12.5 ± 0.4 | 11.7 ± 1.0*** |
| Tryptophan | 11.8 ± 0.4 | 11.4 ± 1.1 |
| Kaffeensäure | 9.6 ± 0.9 | 6.7 ± 1.6*** |
| Chlorogensäure | 14.2 ± 0.3 | 12.8 ± 0.6*** |
| Cinnamoylputrescin | n.d. | 9.5 ± 1.3 |
| Coumaroylputrescin | n.d. | 10.9 ± 1.5 |
| Caffeoylputrescin | 7.4 ± 0.5 | 14.4 ± 1.4*** |
| Dihydrocaffeoylputrescin | 7.0 ± 0.7 | 14.3 ± 1.9*** |
| Feruloylputrescin | 9.8 ± 0.6 | 14.9 ± 1.0*** |
| Dihydroferuloylputrescin | 9.7 ± 0.6 | 12.2 ± 1.0*** |
| Vanilloylputrescin | 7.7 ± 0.3 | 9.3 ± 0.5*** |
| Feruloyltyramin (FT) | 9.1 ± 0.5 | 8.3 ± 0.9*** |
| Feruloyloctopamin (FO) | 9.0 ± 1.1 | 9.5 ± 1.3 |
| FT-FT-Dehydrodimer | 5.4 ± 0.8 | 12.7 ± 0.8*** |
| FT-FO-Dehydrodimer | n.d. | 10.4 ± 1.0 |
| Pelargonidin-3-(Coumaroyl-Rha-Glc)-5-Glc | 11.3 ± 0.9 | 9.5 ± 2.0*** |
| Pelargonidin-3-(Feruloyl-Rha-Glc)-5-Glc | 9.7 ± 0.7 | 8.4 ± 2.0*** |
| α-Chaconin | 13.6 ± 0.3 | 13.2 ± 1.2** |
| α-Solanine | 10.6 ± 0.4 | 10.2 ± 1.0** |

Aus Periderm von Kontroll- (WT+EV: n=16) und *ABCG*-RNAi-Knollen (RNAi-Linien B4, F2, N, P; gesamt n= 32) wurden methanolische Extrakte hergestellt und die semipolaren Verbindungen mittels UPLC/PDA/ESI(+)-QTOF-MS analysiert. Die Monomere wurden über QuantifierIon/ QualifierIon/ Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.9, Tabelle 7.14), die resultierenden Peakflächen auf Frischgewicht normalisiert und log₂ transformiert. Dargestellt ist der Median der Daten von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung. Die Sternchen zeigen die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und *ABCG*-RNAi (Student'scher t-Test, *p≤0,05, **p≤0,01, ***p≤0,001). n.d.: nicht detektierbar. Rha: Rhamnose; Glc: Glucose

Geringe Unterschiede wurden für die Glykoalkaloide α-Chaconin und α-Solanin verzeichnet. Zusammengefasst verdeutlichen die LC-MS-Daten, dass die Suppression von *ABCG1* neben der Akkumulation von monomeren Suberinvorstufen auch eine Akkumulation von Hydroxyzimtsäurekonjugaten im Knollenperiderm bedingt.

Der nach mikroskopischer Analyse vermutete Defekt in der Suberinbildung bei supprimierter *ABCG1*-Expression konnte somit durch die GC-bzw. LC-MS-Analysen bestätigt werden.

3.3.2 CHARAKTERISIERUNG VON *ABCG1*-ÜBEREXPRIMIERENDEN KARTOFFELPFLANZEN

Neben der Suppression des *ABCG1*-Transporters wurde zur weiteren Charakterisierung auch der Effekt der Überexpression von *ABCG1* analysiert. Dazu wurde die kodierende Sequenz von *ABCG1* unter der Kontrolle eines 35S-Promotors (N. Frolova, s. Anhang 7.5) in die anfällige Kartoffelsorte Désirée (*S. tuberosum* L. cv. Désirée) eingebracht. Abbildung 3.17A zeigt die Southern-Blot-Analyse von sechs unabhängigen Linien. Die nach Hybridisierung mit einer spezifischen Sonde gegen *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase II; s. Anhang 7.3) resultierenden Banden, bei einer Größe von ca. 2 kb zeigte die Integration der T-DNA bei fünf Transformanten an. Das Enzym Neomycin-Phosphotransferase II ermöglicht den transformierten Pflanzen die Antibiotika Neomycin und Kanamycin während der Selektion zu metabolisieren. Northern-Blot-Analysen bestätigten eine *ABCG1*-Überexpression bei diesen fünf 35S-*ABCG1*-Transformanten (Abbildung 3.17B).

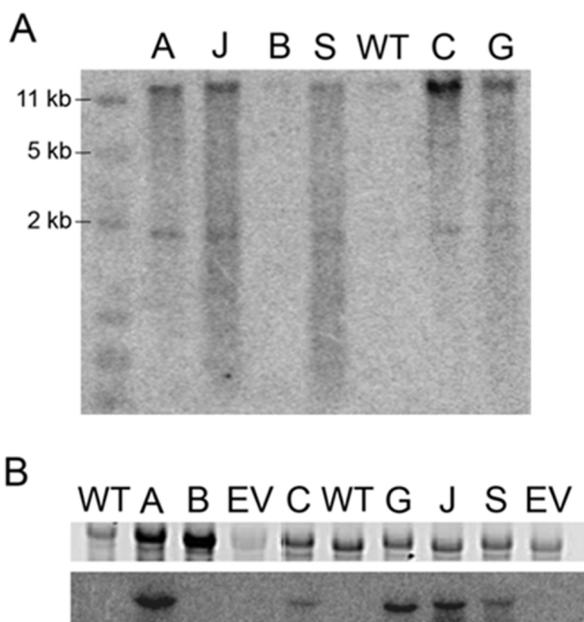


Abbildung 3.17: Southern- und Northern-Blot-Analyse von 35S-*ABCG1*-Kartoffellinien.

(A) Southern-Blot-Analyse zum Nachweis der T-DNA. Die Hybridisierung der gespaltenen und auf einer Nylonmembran geblohteten DNA aus Kartoffelblättern erfolgte mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *nptII* (Neomycin-Phosphotransferase II). Kontrolle: WT; mögliche transgene Linien: A, B, C, G, J, S.

(B) Northern-Blot-Analyse der *ABCG1*-Transkripte. Die Hybridisierung der isolierten und auf einer Nylonmembran geblohteten RNA aus Kartoffelblättern erfolgte mit einer *ABCG1*-spezifischen, radioaktiv markierten Sonde (s. Anhang 7.3). Die obere Reihe zeigt die jeweils aufgetragene Menge an Gesamt-RNA; die untere das durch die an *ABCG1*-mRNA gebundene Sonde hervorgerufene Signal. Kontrollen: WT, EV; transgene Linien: A, B, C, G, J, S.

Zur weiteren Charakterisierung wurden Pflanzen der Überexpressionslinien und der Kontrollen (WT und EV) über drei Monate im Gewächshaus kultiviert. Anders als bei den *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.10, 3.11) konnten zunächst keine morphologischen Unterschiede zwischen den Kontrollpflanzen (WT, EV-Kontrolle) und den Überexpressionslinien bei der Ernte der unterirdischen Organe festgestellt werden. Stattdessen wurde darauf fokussiert zu untersuchen, welche funktionelle Relevanz die Überexpression von *ABCG1* auf die Suberinbildung, wie sie zuvor bei den Analysen der RNAi-Pflanzen gezeigt werden konnte (Abbildung 3.14 bis 3.16; Tabelle 3.1), hat.

3.3.2.1 WASSERVERLUST UND FLUOROL-YELLOW-FÄRBUNG BEI *ABCG1*-ÜBEREXPRESSIONSPFLANZEN

Bei den RNAi-Knollen waren der große Wasserverlust während der Lagerung und die reduzierte Fluoreszenz der aliphatischen Bestandteile von Suberin im Knollenperiderm erste Hinweise auf einen Defekt in der Suberinbildung (Abbildung 3.12, 3.13). Aus diesem Grund wurde bei den *ABCG1*-Überexpressionslinien zunächst die Funktion der Knollenschale bezüglich des Schutzes vor Austrocknung der Knollen untersucht. Allerdings konnten selbst nach einer Lagerung von fünf Monaten bei Raumtemperatur im Dunkeln keine signifikanten Veränderungen im Knollengewicht, bei den Knollen der Kontrollpflanzen (WT und EV-Kontrolle) im Vergleich zu den Knollen der 35S-*ABCG1*-Pflanzen, festgestellt werden (Abbildung 3.18A). Des Weiteren wurden keine Unterschiede in der Knollenanzahl oder im Phänotyp der Knollen nach Lagerung zwischen 35S-*ABCG1*- und Kontrollpflanzen detektiert (Abbildung 3.18B, C).

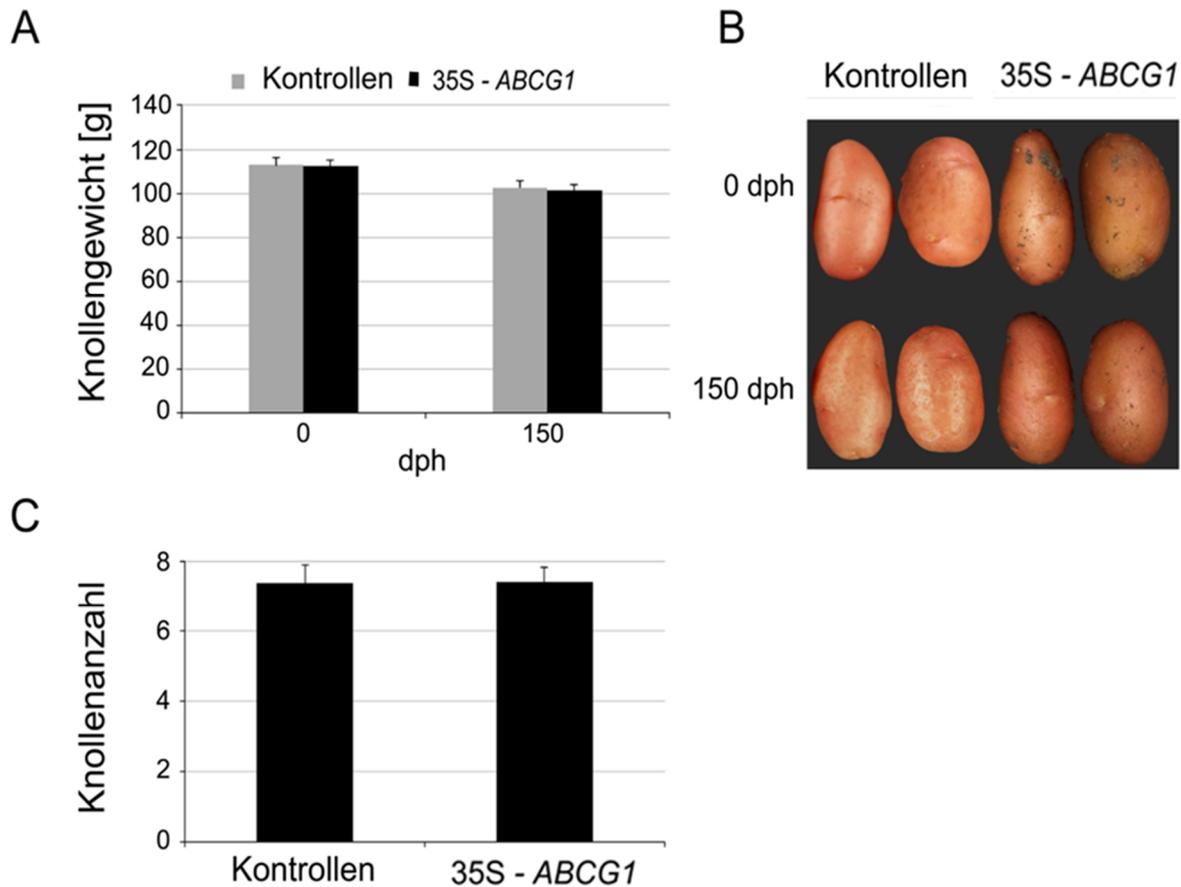


Abbildung 3.18: Knollengewicht und -phänotyp nach Lagerung von 35S-*ABCG1*-Knollen.

(A) Gewicht der Knollen drei Monate alter, im Gewächshaus kultivierter Kontrollpflanzen (WT+EV; graue Balken) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Linien A, J, S; schwarze Balken) nach 150 Tagen Lagerung bei RT im Dunkeln. Die Bestimmung des Knollengewichts erfolgte jeweils nach der Ernte (0 dph) und nach 150 dph. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (Kontrollen: n=37; 35S-*ABCG1*: n=50). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

(B) Repräsentativer Knollenphänotyp von Kontrollpflanzen (rechts: WT, links: EV) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Linien: rechts: A, links J) zum Zeitpunkt der Ernte (0 dph) und 150 dph nach Lagerung bei RT im Dunkeln.

(C) Knollenanzahl von WT- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen. Die Bestimmung der Anzahl der Knollen erfolgte aus der unter (A) beschriebenen Ernte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten (Kontrollen: n=37; 35S-*ABCG1*: n=50). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler.

Semidünnschnitte des Knollenperiderms von 35S-*ABCG1*-Pflanzen zeigten nach Fluorol-Yellow-Färbung, zur Visualisierung des Suberins, eine ähnlich starke Fluoreszenz wie die von Kontrollpflanzen (WT+EV) (Abbildung 3.19). Weiterhin war keine erhöhte Autofluoreszenz im Knollenperiderm von 35S-*ABCG1*-Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen, wie sie bei den RNAi-Pflanzen detektiert wurde (Abbildung 3.13Ag-p), erkennbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Überexpression des Transporters zu keiner verstärkten Suberineinlagerung im Knollenperiderm führte.

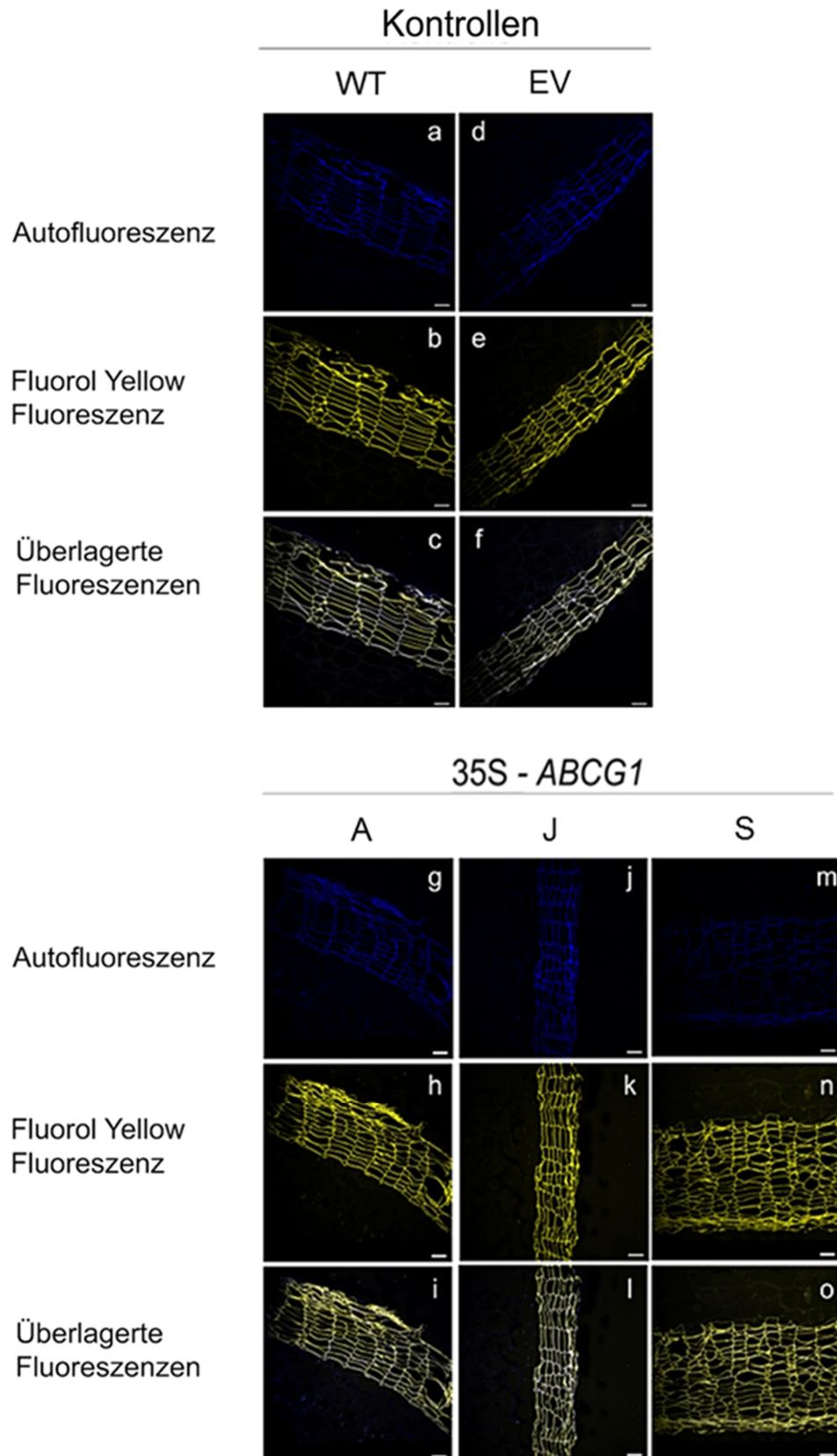


Abbildung 3.19: Fluorol-Yellow-088-Färbung von Kontroll- und 35S-ABCG1-Knollenperiderm.

Semidünnschnitte, hergestellt von Dr. G. Hause (MLU, Halle), von Knollenperiderm drei Monate alter Gewächshaus-Kontroll- (WT: a-c; EV: d-f) und 35S-ABCG1-Pflanzen (Linien A: g-i; J: j-l; S: m-o) nach Färbung mit Fluorol-Yellow-088. Die Analyse der Dünnschnitte erfolgte mittels LSM. Maßstabballen entsprechen 50 µm

3.3.2.2 SUBERINZUSAMMENSETZUNG IM KNOLLENPERIDERM VON *ABCG1*-ÜBEREXPRESSIONSPFLANZEN

Die quantitativen Analysen der aliphatischen Suberinverbindungen mittels GC-MS (s. Anhang 7.8; Tabelle 7.1 bis 7.5) ergaben, dass das Suberinmonomerprofil des Knollenperiderms der Überexpressionslinien im Wesentlichen dem der Kontrollen (WT und EV) entsprach (Abbildung 3.20). Nur einige Verbindungen zeigten geringe Unterschiede. So war der Gehalt der C18:1- ω -Hydroxyfettsäure im Periderm der 35S-*ABCG1*-Pflanzen gegenüber dem der Kontrollpflanzen im Mittel um ca. 25 % reduziert (Abbildung 3.20A), der Gehalt lag dennoch siebenfach über dem der *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.14A). Dabei schwankte die Reduktion der Linie S in einem Bereich von 28-35 % im Vergleich zur WT- und EV-Kontrolle (Abbildung 3.20F). In der Akkumulation des Hauptmonomers C18:1- α,ω -Dicarbonsäure wurden keine Unterschiede zwischen Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Abbildung 3.20B, G) festgestellt. Des Weiteren zeigte die Nebenverbindung C22-Fettsäure im Knollenperiderm der 35S-*ABCG1*-Pflanzen im Vergleich zur C22-Kontrolle eine um ca. 44 % erhöhte, im Vergleich zu den Suppressionspflanzen dagegen eine ca. 20 % geringere Akkumulation (Abbildung 3.20C, 3.14C). Umgekehrt sind die Gehalte der C28-Fettsäure und C28-Fettalkohole im Knollenperiderm der 35S-*ABCG1*-Pflanzen um ca. 30 % bzw. 35 % im Vergleich zu den entsprechenden C28-Kontrollen reduziert, aber gegenüber den *ABCG*-RNAi-Pflanzen um ein Vielfaches erhöht (Abbildung 3.20C, D, 3.14). Keine Unterschiede zeigten die Ferula- und der Cumarsäuregehalte im Knollenperiderm von 35S-*ABCG1*- und Kontrollpflanzen (Abbildung 3.20E).

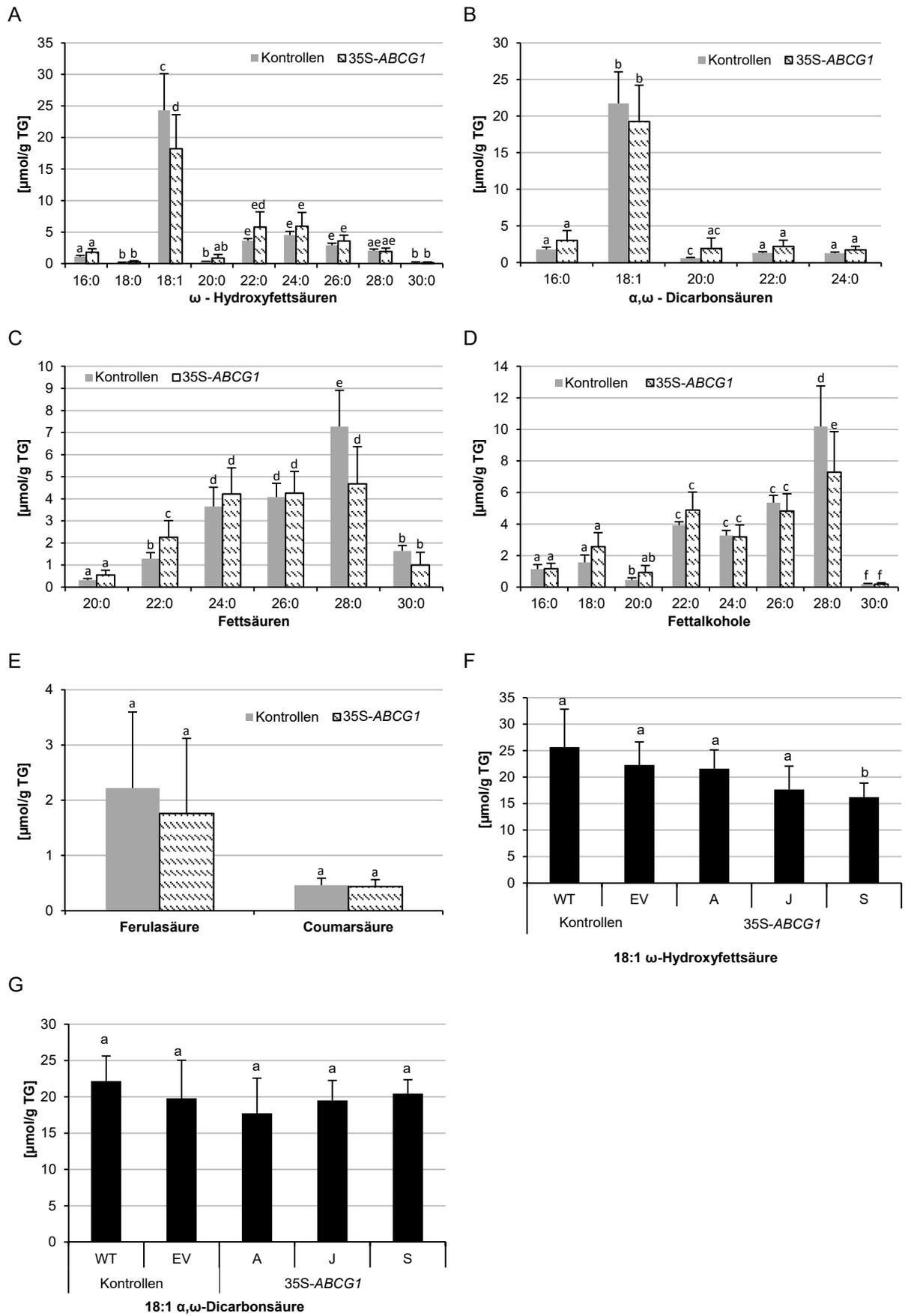


Abbildung 3.20: Quantitative Zusammensetzung aliphatischer Suberinmonomere im Knollenperiderm von Kontroll- und 35S-ABCG1-Pflanzen.

Knollenperiderm von Kontrollpflanzen (graue Balken; WT+EV: n=16) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (gestreifte Balken; Linien A, J, S; insgesamt n=24) wurde enzymatisch verdaut und entfettet. Nach Depolymerisierung erfolgte die Analyse der freigesetzten Monomere mittels GC-MS. Die Monomere wurden über QuantifierIon/ QualifierIon/ Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.8, Tabellen 7.1-7.5) und die resultierenden Peakflächen unter Verwendung von drei internen Standards (Pentadecanol, Methylheptadecanoat, Methyl-15-Hydroxypentadecanoat) in Bezug auf das Trockengewicht (TG) quantifiziert. Dargestellt ist der Median von Daten aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Verbindung (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

(A) ω -Hydroxyfettsäuren; (B) α, ω -Dicarbonsäuren; (C) gesättigte Fettsäuren; (D) Fettalkohole; (E) Ferulasäure und Cumarsäure.

(F+G) Gehalte der aliphatischen Hauptmonomere 18:1- ω -Hydroxyfettsäure (F) und 18:1- α, ω -Dicarbonsäure (G) in den einzelnen 35S-*ABCG1*-Linien. Dargestellt ist jeweils der Median mit Standardabweichung des WT, der EV-Kontrolle und der untersuchten 35S-*ABCG1*-Linien A, J, S (jeweils n=8). Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Verbindung (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

3.3.2.3 APOLARE VERBINDUNGEN IM KNOLLENPERIDERM VON

ABCG1-ÜBEREXPRESSIONSPFLANZEN

Analog zu der Analyse apolarer Peridermextrakte der *ABCG*-RNAi- und Kontrollpflanzen wurde das Suberinmonomerprofil apolarer Peridermextrakte von 35S-*ABCG1*-Pflanzen analysiert. Nach der Quantifizierung wurden für einige Verbindungen Unterschiede festgestellt. So zeigten die apolaren Peridermextrakte der Überexpressionspflanzen 2- bis 6-fach erhöhte Gehalte der Feruloyloxyfettsäuren in den Kettenlängen C20-, C22- und C24- relativ zu den C20-, C22- und C24-Kontrollen (Abbildung 3.21A). Erhöhte Akkumulationen wurden ebenso für die C18:1- und C28-Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester (FOFAG) in den apolaren Peridermextrakten der Überexpressionspflanzen relativ zu den C18:1- und C28-Kontrollen festgestellt (Abbildung 3.21B, E). Verglichen zur Akkumulation dieser Komponenten in den *ABCG*-RNAi-Linien, die mit Ausnahme der C28-FOFAG um den Faktor 16 bis 340 gegenüber den Kontrollen akkumulierten (Abbildung 3.16), sind die Effekte bei den Überexpressionslinien gering. Für alle anderen Monomere wurden keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle festgestellt, so dass das Profil der apolaren Peridermextrakte der 35S-*ABCG1*-Linien, ähnlich wie bei den polaren Extrakten im Wesentlichen dem Profil der Kontrollpflanzen entsprach (Abbildung 3.21). Ebenso ähnelte das Profil der Hydroxyzimtsäurekonjugate der semipolaren Fraktion der Knollenperidermextrakte von 35S-*ABCG1*-Pflanzen dem Hydroxyzimtsäurekonjugatprofil der Kontrollen (s. Anhang 7.11, Tabelle 7.16).

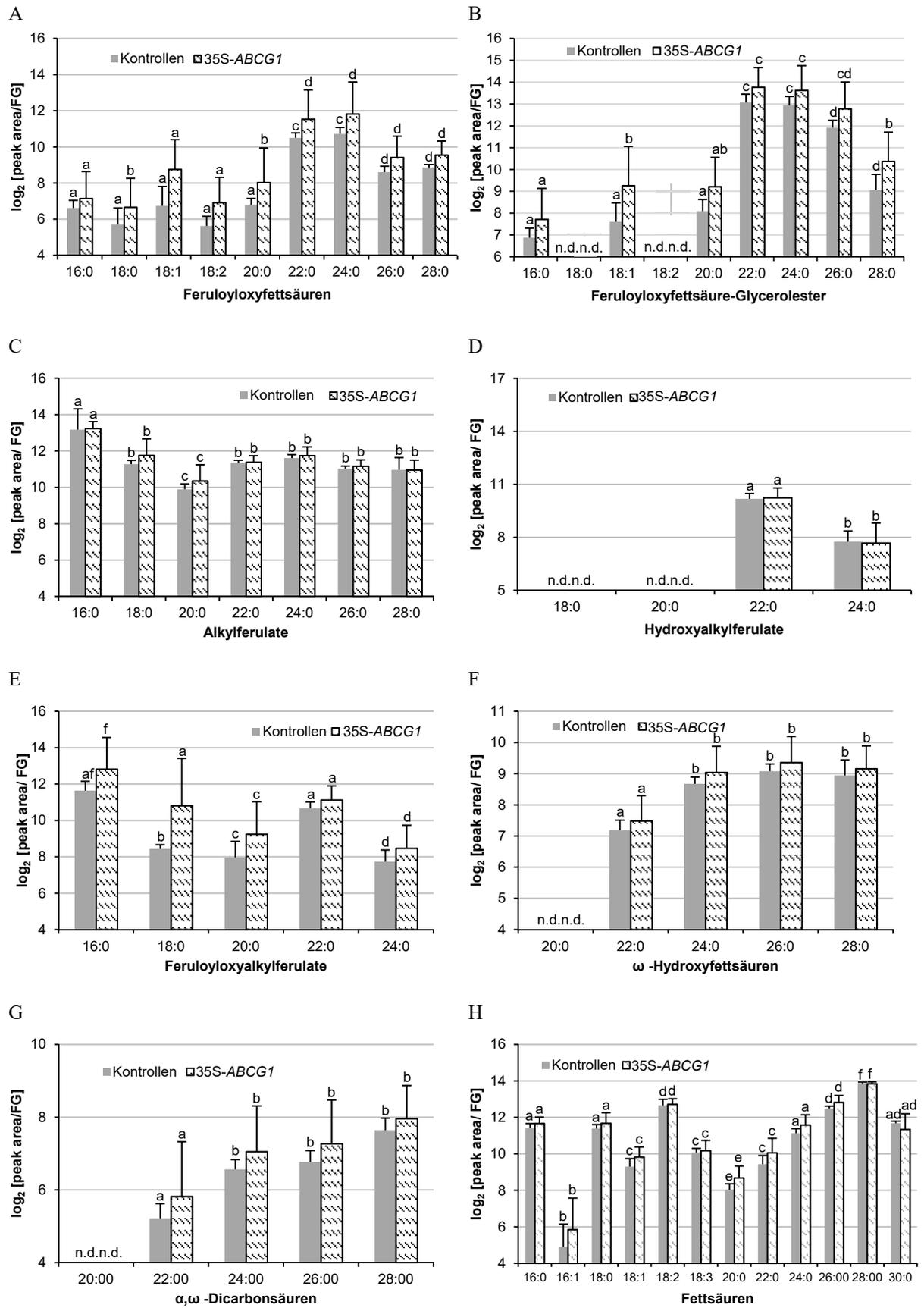


Abbildung 3.21: Quantifizierung monomerer Vorstufen von Suberin in apolaren Knollenperidermextrakten von Kontroll- und 35S-ABCG1-Pflanzen.

Frisches, unverdautes Knollenperiderm von Kontrollpflanzen (WT+EV: n=16) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (gestreifte Balken; Linien A, J, S: insgesamt n=24) wurden mit Methyl-*tert*-butylether extrahiert und die apolaren Extrakte im Anschluss mittels UPLC/PDA/ESI(-)-QTOF-MS analysiert. Die Monomere wurden über QuantifierIon/ QualifierIon/ Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.9; Tabelle 7.6 bis 7.13), die resultierenden Peakflächen auf Frischgewicht (FG) normalisiert und log₂ transformiert. Dargestellt ist der Median der Daten von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben zeigen statistisch signifikante Unterschiede innerhalb einer Verbindung (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, p<0,05).

(A) Feruloyloxyfettsäure; (B) Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester; (C) Alkylferulate; (D) Hydroxyalkylferulate; (E) Feruloylhydroxyalkylferulate; (F) ω-Hydroxyfettsäuren; (G) α,ω-Dicarbonsäuren; (D) Fettsäuren.

Es zeigte sich, zusätzlich zu den Ergebnissen der mikroskopischen Analyse nach Suberinfärbung (Abbildung 3.19), dass die Überexpression des *ABCG1*-Gens keinen Effekt auf die Suberinbildung im Knollenperiderm hatte.

3.4 DIE ROLLE VON *ABCG1* IN DER BASALEN ABWEHR VON *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Bei Betrachtung der zuvor beschriebenen Ergebnisse wird ein Zusammenhang zwischen *ABCG1* und der Bildung von Suberin deutlich. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Suberinbildung über Verwundung oder einer Pathogeninfektion induziert werden kann (Li *et al.* 2007a, Lulai & Suttle 2009, Li-Beisson *et al.* 2010, Bienert *et al.* 2014). Die Genexpression von *ABCG1* wird durch den Elicitor Pep-13 und durch Inokulation mit *P. infestans* induziert (Abbildung 3.3, 3.4). Daher wurde in ersten Untersuchungen der Frage nachgegangen, ob *ABCG1* eine Funktion in der Pathogenabwehr von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* und der Reaktion auf den Elicitor Pep-13 hat.

3.4.1 DIE AUSWIRKUNG DER *ABCG1*-SUPPRESSION AUF DIE BASALE ABWEHR VON *SOLANUM TUBEROSUM* GEGEN *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Zunächst wurden die Blätter von Kontroll- bzw. *ABCG*-RNAi-Pflanzen mit Pep-13 in einer Konzentration von jeweils 0,1 μM und der Verwundungskontrolle W2A (100 μM) infiltriert und die Nekrosenbildung nach sieben Tagen beobachtet (Abbildung 3.22A). Im Vergleich zu den WT- und EV-Kontrollpflanzen waren die Nekrosen in allen RNAi-Linien nach Behandlung mit Pep-13 ausgeprägter. Größere Nekrosen konnten vereinzelt bereits bei den W2A-behandelten Blättern festgestellt werden (Abbildung 3.22A, weiße Pfeile). Die Blätter der Kontrollpflanzen wiesen nach Behandlung mit 0,1 μM Pep-13 fast nie Nekrosen auf und

zeigten kaum Unterschiede im Vergleich zur W2A-Behandlung. Das lässt die Vermutung zu, dass die Suppression von *ABCG* scheinbar einen Einfluss auf die Ausprägung von Nekrosen nach Behandlung mit Pep-13 hat. Des Weiteren stellte sich die Frage, inwiefern ein Zusammenhang zwischen diesem Phänotyp und der Einlagerung von Suberin besteht. Aus diesem Grund wurden Blätter von Kontroll- und RNAi-Pflanzen mit 0,1 μ M Pep-13 infiltriert und nach sieben Tagen mit Sudan III gefärbt und mikroskopisch analysiert. Mit dem lipophilen Farbstoff Sudan III können die aliphatischen Bestandteile des Suberins und folglich die Einlagerung von Suberin in pflanzlichen Geweben als rote Färbung oder unter UV-Licht als weiße Fluoreszenz sichtbar gemacht werden (de Neergaard *et al.* 2000). Nach Färbung der Blätter war eine klare Rotfärbung sowie eine Fluoreszenz in den die Nekrosen umgebenden Zellen in Pep-13-infiltrierten Blättern von WT- und EV-Kontrollpflanzen zu erkennen (Abbildung 3.22B, links). Eine Sudan III-Färbung und Suberinfluoreszenz wurde bei Nekrosen von *ABCG*-RNAi-Pflanzen nicht oder nur sehr schwach ausgeprägt beobachtet (Abbildung 3.22B, rechts und Abbildung 3.22C). Die Abbildung 3.22C zeigt die statistische Evaluierung der Suberinfärbung in den an die Nekrosen angrenzenden Zellwänden. Dabei wurden insgesamt 151 Nekrosen analysiert. Die Analyse ergab, dass die Rotfärbung bzw. Fluoreszenz bei den Nekrosen der RNAi-Linien um 80 % gegenüber denen der Kontrollen reduziert war. Zudem korrelierte die Suppression von *ABCG* (siehe auch Abbildung 3.9B) deutlich mit der stark verringerten Einlagerung von Suberin in Blattzellwänden und diese wiederum mit ausgeprägten Nekrosen nach lokaler Pep-13-Infiltration (Abbildung 3.22A, weiße Pfeile).

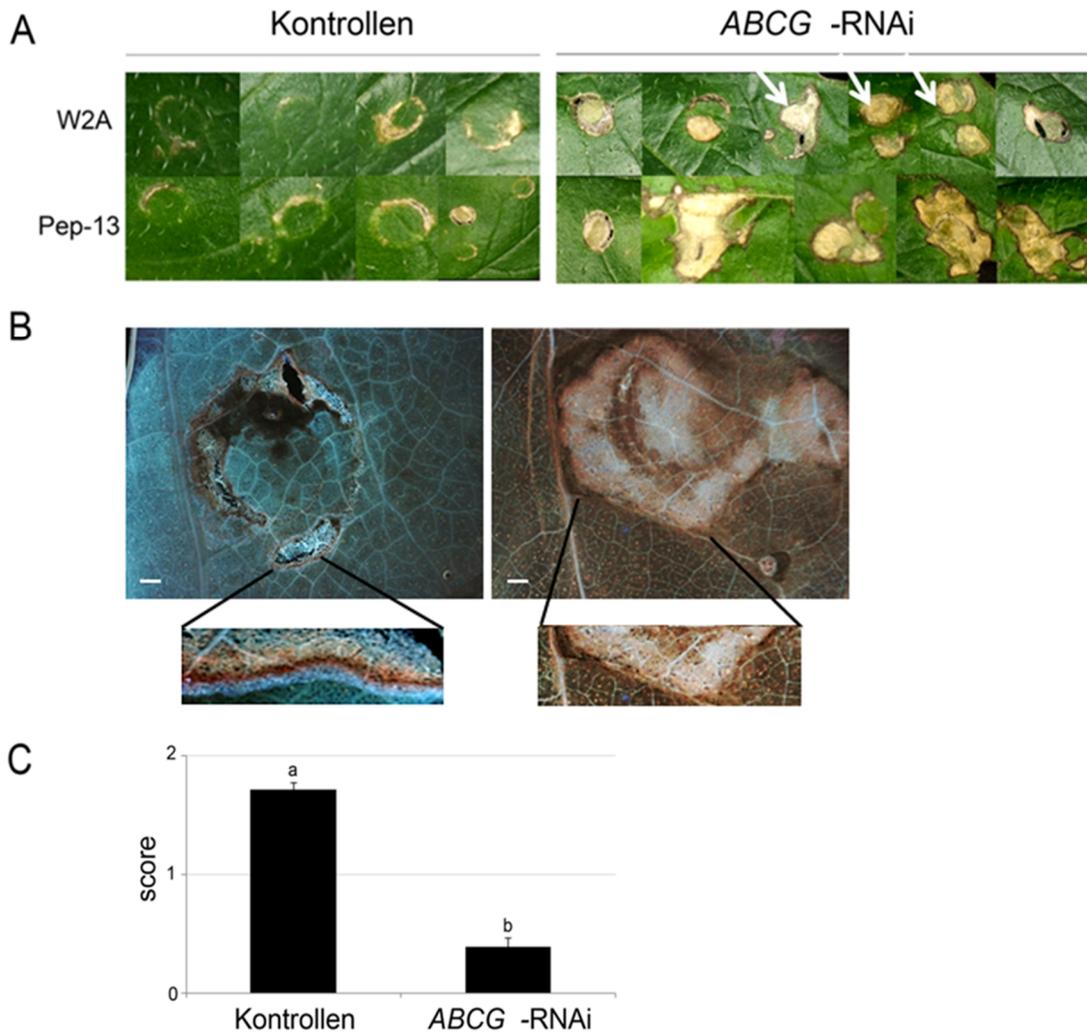


Abbildung 3.22: Nekrosenbildung und Suberineinlagerung in Blättern von *ABCG*-RNAi-Pflanzen nach Infiltration mit Pep-13.

Als Kontrollpflanzen dienten WT- und EV-Pflanzen; als Verwundungskontrolle wurde das inaktive Pep-13-Analogon W2A genutzt.

(A) Nekrosen von Kontroll- (links) und RNAi-Blättern (rechts) sieben Tage nach Infiltration mit 0,1 μM Pep-13 bzw. 100 μM W2A **(A)**. Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(B+C) Suberineinlagerung in Zellen um die Nekrosen in Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen. Suberin wurde sieben Tage nach Pep13-Infiltration (0,1 μM) mit Sudan III angefärbt und die resultierende Rotfärbung und Fluoreszenz mikroskopisch ausgewertet (Nikon AZ-100; Belichtungszeit: Kontrollen: 0,4-1 s; *ABCG*-RNAi-Linien: 4-8 s).

(B) Repräsentative Aufnahme der Suberinfärbung bei einer EV-Pflanze (links) und einer *ABCG*-RNAi-Pflanzen (rechts). Maßstabbalken entsprechen 50 μm . Repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(C) Statistische Evaluierung der Suberinfärbung bei Kontroll- und RNAi-Pflanzen. Es wurden insgesamt 68 Nekrosen von vier unabhängigen RNAi-Linien (Linien B4, F2, N, P) und 83 infiltrierten Stellen von WT- und EV-Pflanzen analysiert. Dabei wurden Nekrosen, die eine Sudan III-Färbung oder -Fluoreszenz zeigten, mit „2“ klassifiziert, die Infektionsstellen, die nur teilweise eine Rotfärbung bzw. Fluoreszenz zeigten, mit „1“ und die, die weder Rotfärbung noch Fluoreszenz zeigten, mit „0“ klassifiziert. Das Diagramm zeigt das Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert + Standardfehler). Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und *ABCG*-RNAi-Linien (Student'scher t-Test, $p < 0,001$).

Basierend auf diesen Resultaten sollte analysiert werden, ob die Herunterregulierung von *ABCG* die Einlagerung von Suberin, ähnlich wie nach Behandlung mit Pep-13, auch nach Infektion der Blätter mit *P. infestans* beeinflusst. Für die Untersuchung wurden die Blätter sieben Tage nach Tropfen-Inokulation (1000 Sporen/ 10µl Tropfen) der Kontroll- und RNAi-Pflanzen mit Sudan III gefärbt und mikroskopisch analysiert. Nach Färbung der *P. infestans*-Inokulationsstellen von WT- und EV-Kontrollpflanzen waren deutlich ein bis zwei suberinisierte Zellschichten um die Infektionsstellen zu erkennen (Abbildung 3.23A, links, und weiße Pfeile). Hingegen wurde weder eine Rotfärbung noch Fluoreszenz bei den *P. infestans*-Läsionen umgebenden Zellschichten der *ABCG*-RNAi-Pflanzen beobachtet (Abbildung 3.23A, rechts). Die Abbildung 3.23B zeigt die Evaluierung der Suberinfärbung um die Infektionsstellen. Dabei wurde die Rotfärbung bzw. Fluoreszenz in angrenzenden Zellen von insgesamt 338 Läsionen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Rotfärbung oder Fluoreszenz bei den Läsionen der RNAi-Linien im Vergleich zu den Kontrollen um 90 % reduziert war. Dies deutet auf ein Fehlen bzw. eine drastische Reduktion von eingelagerten aliphatischen Suberinkomponenten in den die Läsionen umgebenden Zellen hin.

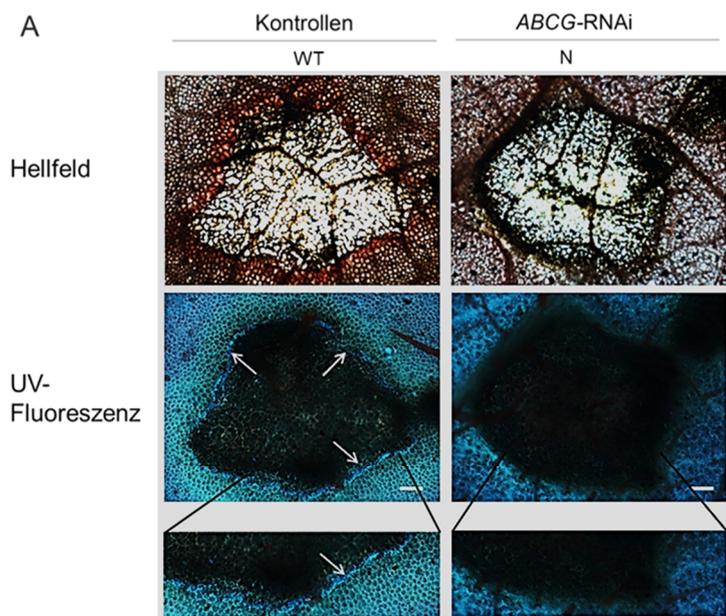


Abbildung 3.23: Suberineinlagerung um *P. infestans*-Inokulationsstellen bei Blättern von *ABCG*-RNAi- und Kontroll-Pflanzen.

(A) Repräsentative Inokulationsstellen von Kontroll- (exemplarisch: WT)- und RNAi-Blättern (exemplarisch Linie: N) wurden sieben Tage nach Infektion mit *P. infestans* (1.000 Sporen pro Infektionsstelle) mit Sudan III gefärbt und die Färbung von Suberin unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon AZ-100) analysiert. Hellfeldaufnahmen sind jeweils oben und UV-Fluoreszenzaufnahmen (Belichtungszeit: Kontrollen: 0,4-1 s; *ABCG*-RNAi:4-8 s) unten dargestellt. Maßstabbalken entsprechen 250 µm.

(B) Statistische Evaluierung der Suberinfärbung um die Inokulationsstellen von Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen. Es wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils WT- und EV-Kontrollen und vier unabhängigen RNAi-Linien (Linien B4, F2, N, P) insgesamt 189 Infektionsstellen an 16 RNAi-Pflanzen und 139 infizierte Stellen von insgesamt 10 Kontrollpflanzen analysiert. Dabei wurden Läsionen, die eine rote Sudan III-Färbung zeigten und/oder fluoreszierten, mit „2“ klassifiziert, die Infektionsstellen, die nur teilweise eine Rotfärbung bzw.

Fluoreszenz zeigten, mit „1“ und die, welche weder Rotfärbung noch Fluoreszenz zeigten, mit „0“. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und die Fehlerbalken mit Standardabweichung. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und *ABCG*-RNAi-Linien (Student'scher t-Test, $p < 0,001$).

Aus den mikroskopischen Analysen der gefärbten Infektionsstellen wird ersichtlich, dass die Suppression von *ABCG1* wahrscheinlich nicht nur die Einlagerung von Suberin in den Blattzellwänden von *S. tuberosum* nach lokaler Pep-13-Infiltration, sondern auch nach Blattinfektion mit *P. infestans* beeinflusst.

Weitere Infektionsexperimente wurden durchgeführt, um zu untersuchen, ob die *P. infestans*-induzierte Expression von *ABCG1* in WT-Pflanzen (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 3.4) und die reduzierte Einlagerung von Suberin in den Blättern der RNAi-Pflanzen das Pathogenwachstum von *P. infestans* im Blatt von *S. tuberosum* beeinflusst. Dafür wurden die Blätter von *ABCG*-RNAi- und Kontrollpflanzen durch Tropfen-Inokulation (1000 *P. infestans*-Sporen/ 10 µl Tropfen) infiziert und das *Phytophthora*-Wachstum in einem Zeitraum von vier Tagen untersucht. Zuvor erfolgte die Überprüfung der Wirkung des RNAi-Konstruktes mittels qRT-PCR. 96 Stunden nach Infektion der *ABCG*-RNAi- und Kontrollpflanzen wurde eine signifikant reduzierte Akkumulation von *ABCG1*-Transkripten in den Blättern der RNAi-Linien detektiert (Abbildung 3.24A), welche die Wirksamkeit des RNAi-Konstrukts bestätigt. Die Quantifizierung der *P. infestans*-DNA mittels qPCR deutete in vier unabhängigen Experimenten auf ein erhöhtes Wachstum des Oomyceten in den Blättern der RNAi-Pflanzen 96 Stunden nach Infektion im Vergleich zu den Kontrollpflanzen (WT+EV) hin (Abbildung 3.24B). Leider konnte zu einem späteren Zeitpunkt von unabhängigen Experimentatoren das signifikant erhöhte *Phytophthora*-Wachstum im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr reproduziert werden.

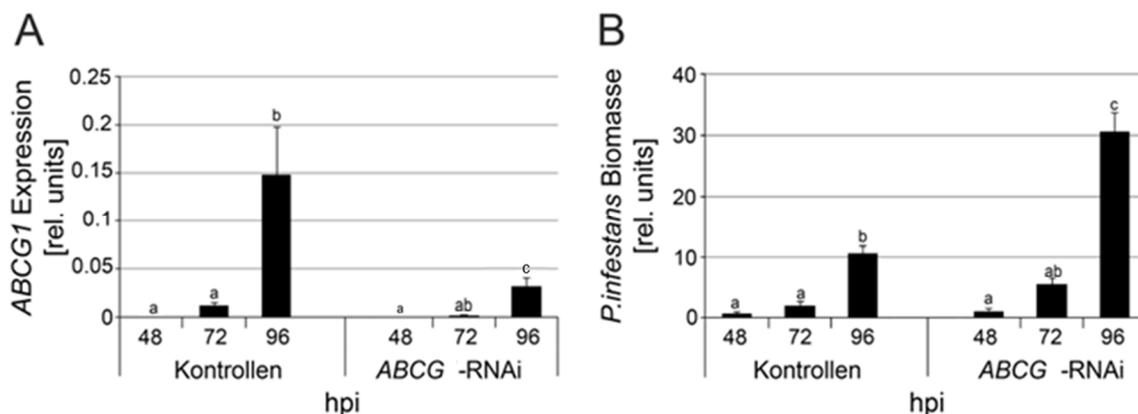


Abbildung 3.24: Anfälligkeit der *ABCG*-RNAi-Pflanzen gegenüber *P. infestans*.

Blätter drei Wochen alter Kontroll- (WT, EV) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (RNAi-Linien: B4, F2, N und P) wurden mit *P. infestans* durch das Applizieren von je 10 µl Sporensuspension mit einer Konzentration von $1 \cdot 10^5$ Sporen/ml infiziert.

(A) *ABCG1*-Expression nach *P. infestans*-Infektion in Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen. RNA aus infizierten Blättern wurde zum angegebenen Zeitpunkten isoliert (hpi: Stunden nach Infektion) und mittels qRT-PCR der Transkriptgehalt von *ABCG1* analysiert. Als Referenzgen diente *EF1a*. Die Daten zeigen die $2^{-\Delta CT}$ -Werte als Mittelwert von drei unabhängigen

Experimenten (Kontrollen [WT+EV]: n=12; *ABCG*-RNAi-Linien: n=24). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

(B) Quantitative Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse in Kontroll- und *ABCG*-RNAi-Pflanzen. Aus *P. infestans*-inokulierten Blättern wurde zu den angegebenen Zeitpunkten (hpi: Stunden nach Infektion) gDNA isoliert und die Pathogenbiomasse mittels qPCR analysiert. Die Daten zeigen den Mittelwert von vier unabhängigen Experimenten (Kontrollen [WT+EV]: n>16; *ABCG*-RNAi-Linien: n>32). Die Fehlerbalken repräsentieren Standardfehler. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$)

Zusätzlich zu diesen Analysen wurde damit begonnen die *P. infestans*-Infektionsstellen phänotypisch nach Unterschieden zwischen den Blattinfektionen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen und den Kontrollpflanzen näher zu untersuchen. Nach visueller Analyse waren zunächst keine deutlichen Unterschiede zwischen den Kontroll- und RNAi-Pflanzen nach vier Tagen der Infektion erkennbar. Allerdings waren die Infektionsstellen der *ABCG*-RNAi-Linien teilweise großflächiger und intensiver (s. Anhang 7.14, Abbildung 7.3A und 7.4C). Für eine genauere Untersuchung wurden in einem ersten Experiment Semidünnschnitte von vier Tage alten Infektionsstellen im Übergangsbereich vom infizierten zum gesunden Gewebe angefertigt. Diese Arbeiten wurden von Dr. G. Hause (MLU, Halle) durchgeführt. So zeigten sich bei genauerer Betrachtung aller untersuchten Blattquerschnitte, die Zellen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen im infizierten Bereich im Vergleich zur Kontrolle stärker kollabiert (s. Anhang 7.14, Abbildung 7.3B und 7.4D).

Interessanterweise zeigten teilweise auch die Knollen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber unbekanntem Pathogenen. So wiesen viele Knollen nicht-inokulierter RNAi-Pflanzen schon nach kurzer Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln einen Pathogenbefall auf. Hingegen wurde weder bei den Knollen der Kontrollpflanzen (WT- und EV-Pflanzen) noch bei den Pflanzen die *ABCG1* überexprimieren (Knollen nicht gezeigt), selbst nach 20 Tagen kein makroskopisch sichtbarer Pathogenbefall festgestellt (Abbildung 3.25, obere Fotografien). Eine Inokulation von Knollen mit *P. infestans* führte zu einer ähnlichen Beobachtung (Abbildung 3.25, untere Fotografien). Aufgrund des Pathogenbefalls war eine quantitative Analyse der Knollen nach Infektion leider nicht möglich, da nicht komplett ausgeschlossen werden konnte, dass neben *Phytophthora* noch andere Erreger die Knollen besiedelten.

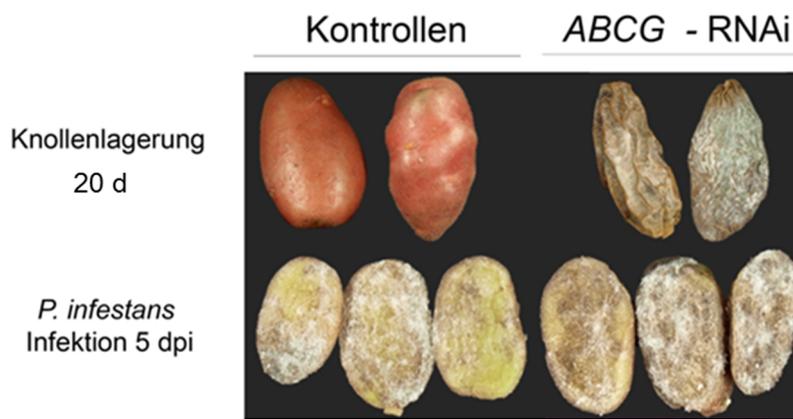


Abbildung 3.25: Anfälligkeit der ABCG-RNAi-Knollen gegenüber unbekanntem Pathogenen.

Fotografien von Knollen der Kontroll- (WT+EV; rechts) bzw. der ABCG-RNAi-Pflanzen (links) die zur Veranschaulichung der erhöhten Anfälligkeit der RNAi-Knollen gegenüber unbekanntem Pathogenen dienen sollen. Die oberen Fotografien zeigen

Schimmelbefall bei den RNAi-Knollen nach 20 Tagen Lagerung der Knollen bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der untere Bereich zeigt Knollen von Kontroll- und RNAi-Pflanzen nach 5-tägiger Infektion mit *P. infestans* (pro Knolle Zugabe von 50 µl einer Suspension von 1×10^5 Sporen/ml). Repräsentativ für mindestens 3 Experimente.

Dies lässt die Vermutung zu, dass die Suppression der *ABCG1*-Genexpression, die mit einer reduzierten Suberineinlagerung in den die Nekrosen bzw. Inokulationsstellen umgebenden Zellen korrelierte, in einer erhöhten Anfälligkeit der RNAi-Pflanzen gegenüber *P. infestans* bzw. Pathogenen führt.

3.4.2 EINFLUSS DER *ABCG1*-ÜBEREXPRESSION AUF DIE SUBERINEINLAGERUNG UND DIE BASALE ABWEHR IN BLÄTTERN VON *SOLANUM TUBEROSUM*

Die Charakterisierung der ABCG-RNAi-Pflanzen deutete auf einen Zusammenhang zwischen *ABCG1*, der Suberinsynthese und der Abwehr gegenüber *P. infestans* in Blättern von *S. tuberosum* hin. Daher wurde der Einfluss einer *ABCG1*-Überexpression hinsichtlich der Suberinbildung im Blatt zum einen als Reaktion auf den Elicitor Pep-13 und zum anderen nach der Infektion mit *P. infestans* untersucht.

Zunächst wurden für die Analyse, Blätter von Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen, mit Pep-13 infiltriert. Nach sieben Tagen erfolgte eine Färbung der Nekrosen mit Sudan III. Die mikroskopische Analyse Sudan III-gefärbter Blätter zeigte eine Rotfärbung bzw. silberweiße Fluoreszenz von eingelagertem Suberin in den Wänden der Nekrose-umgebenden Zellen – sowohl bei Kontroll- als auch bei 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Abbildung 3.26). Um den Übergangsbereich vom gesunden zum nekrotischen Gewebe besser aufzulösen wurden in einem ersten Experiment Semidünnschnitte angefertigt und anschließend mit Fluorol-Yellow gefärbt. Die Herstellung der Semidünnschnitte wurde von Dr. G. Hause (MLU, Halle)

übernommen. Die Fluorol-Yellow-gefärbten Semidünnschnitte verdeutlichten die Suberineinlagerung (gelb fluoreszierend) in Wänden gesunder Zellen angrenzend zum nekrotischen Gewebe in den Blättern von Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen nach Infiltration mit Pep-13 (s. Anhang 7.15, Abbildung 7.5 und 7.6). Die nähere Betrachtung der 35S-*ABCG1*-Semidünnschnitte zeigte eine weitläufigere gelbe Fluoreszenz in den Wänden der angrenzenden Zellen über mehrere Zellschichten im Vergleich zu den WT-Kontrollen (s. Anhang 7.15, Abbildung 7.6) und zusätzlich auch zu den Verwundungskontrollen (Infiltration von W2A, s. Anhang 7.15, Abbildung 7.7A, 7.8A und Wasser, s. Anhang 7.15, Abbildung 7.7B, 7.8B). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass die Überexpression von *ABCG1* zu einer verstärkten Suberineinlagerung als Reaktion auf Pep-13 um das nekrotische Gewebe führt.

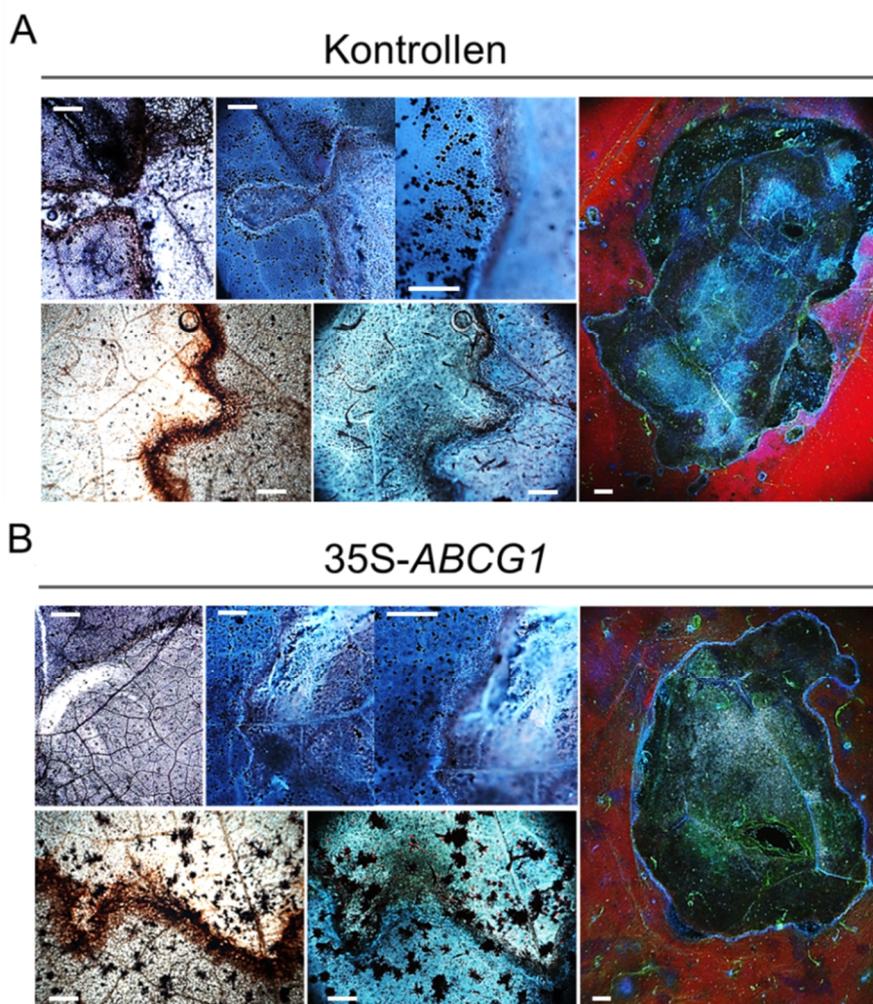


Abbildung 3.26: Suberinfärbung Pep-13-infiltrierter Blätter von Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen.

(A+B) Sudan III-Färbung Pep-13 (100 μ M)-infiltrierter Blätter von Kontroll- (A) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (B), sieben Tage nach Behandlung. Die Analyse der Nekrosen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon AZ-100) im Hellfeld (jeweils links) und unter UV-Anregung (jeweils rechts; Belichtungszeit von Kontrollen (WT und EV) und 35S-*ABCG1* (Linien A, J, S): 0,8 s). Die Aufnahmen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Maßstabballen entsprechen 100 μ m.

Um zu untersuchen ob die Überexpression von *ABCG1* die Einlagerung von Suberin in die pflanzliche Zellwand nach Infektion mit *Phytophthora* beeinflusst, wurden Infektionsexperimente durchgeführt. Blätter von Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen wurden mit *P. infestans* inokuliert und die resultierenden Infektionsstellen mit dem suberinspezifischen Farbstoff Sudan III gefärbt (Abbildung 3.27). Zudem erfolgte die quantitative Bestimmung der Pathogen-Biomasse anhand gDNA mittels qPCR nach Blatinfektion (Abbildung 3.28C).

Die mikroskopische Analyse zeigte eine deutliche Rotfärbung bzw. Fluoreszenz von eingelagertem Suberin in den Wänden der die Infektionsstellen umgebenden Zellen bei den Kontroll- und den 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Abbildung 3.27). Zum Teil schien die Fluoreszenz bzw. Färbung der Infektionsstellen der *ABCG1* überexprimierenden Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen ausgeprägter zu sein.

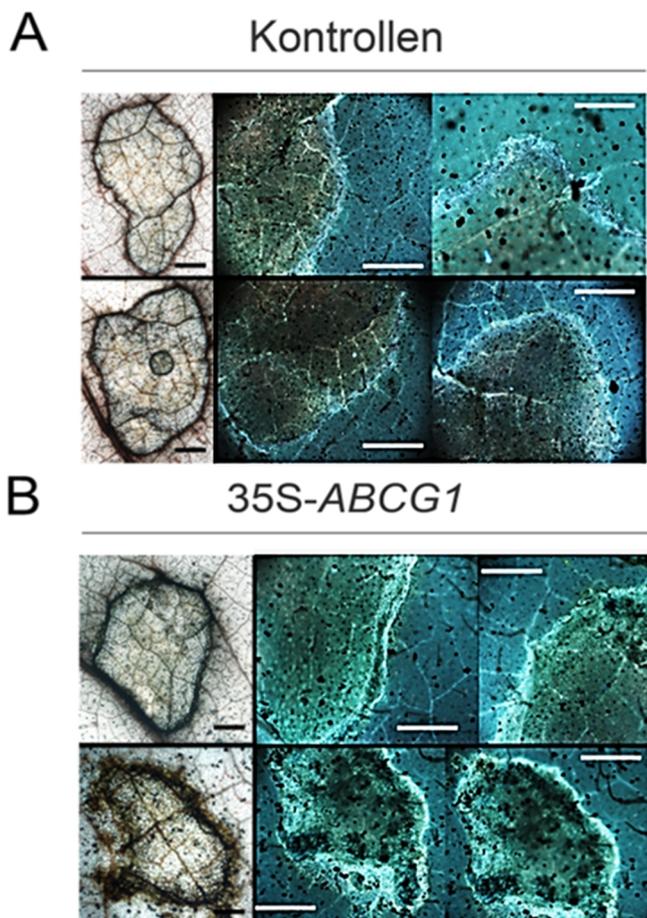


Abbildung 3.27: Suberinfärbung *P. infestans*-infizierter Blätter von Kontroll- und 35S-*ABCG1* -Pflanzen.

Infektionsstellen Sudan III-gefärbter Blätter sieben Tage nach Inokulation mit *P. infestans* (je Inokulationsstelle 1.000 Sporen). Die Färbung wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop (Nikon AZ-100) analysiert. Aufnahmen im Hellfeld (jeweils links) und unter UV-Anregung (jeweils rechts; Belichtungszeit: Kontrollen (WT und EV) und 35S-*ABCG1*: 0,4-1 s. Die Aufnahmen sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. Maßstabbalken entsprechen 100 µm.

Eine Quantifizierung der Färbung erfolgte nicht, sollte jedoch in weiterführenden Untersuchungen vorgenommen werden um eine sichere Aussage treffen zu können.

Des Weiteren ergab die Analyse von Infektionsstellen in drei von fünf Experimenten geringere Läsionsintensitäten bei infizierten Blättern von 35S-*ABCG1*-Pflanzen gegenüber den WT- und EV- Kontrollen (Abbildung 3.28A, B, C). Nach zeitlicher Auflösung zeigten die *ABCG1*-Überexpressionspflanzen 96 Stunden nach Infektion ein reduziertes *P. infestans*-Wachstum auf infizierten Blättern im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 3.28D, für die gesamte Kinetik s. Anhang 7.16, Abbildung 7.9).

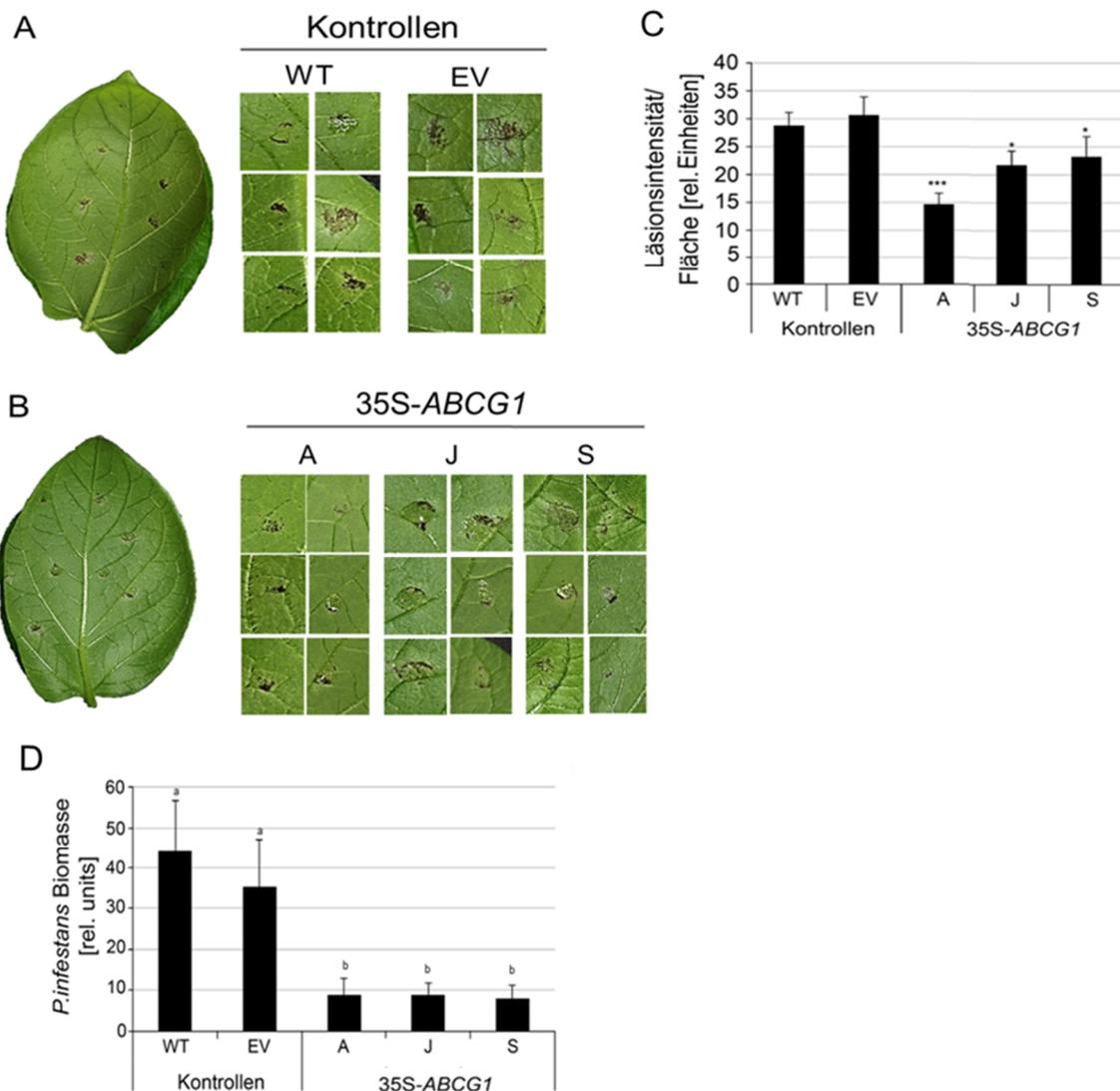


Abbildung 3.28: Blattinfektion von 35S-*ABCG1*- und Kontrollpflanzen nach Behandlung mit *P. infestans*.

Die Blätter drei Wochen alter Überexpressions- und Kontrollpflanzen wurden mit *P. infestans* durch das Applizieren von je 10 µl einer Sporensuspension (1x10⁵ Sporen/ml) infiziert.

(A+B) Repräsentative Bilder von Blattinfektionen der Kontrollpflanzen (A) und der 35S-*ABCG1*-Pflanzen (B).

(C) Relative Quantifizierung der Läsionsintensität infizierter Blätter vier Tage nach Infektion. Die Intensitäten der Läsionen an den Inokulationsstellen wurde mit Hilfe der Software Image J ermittelt und auf die Hintergrundfärbung des Blattes normalisiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und die Fehlerbalken den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten (Kontrollen: WT, n=93; EV, n=89; 35S-*ABCG1*-Linien: A, n=68; J, n=64; S, n=68). Die Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT-Kontrolle und 35S-*ABCG1*-Linien (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

(D) Quantitative Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse in Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen. Aus *P. infestans*-inokulierten Blättern wurde vier Tage nach Infektion gDNA isoliert und die Pathogenbiomasse mittels qPCR analysiert. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Fehlerbalken den Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten (Kontrollen: jeweils n=14; 35S-*ABCG1*-Linien: jeweils n=19). Die Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT bzw. EV-Kontrolle und *ABCG*-RNAi-Linien (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

In später durchgeführten Versuchen konnte jedoch aufgrund der hohen Variabilität der Infektion zwischen den einzelnen Linien zum Zeitpunkt 96 Stunden nach Inokulation kein signifikant reduziertes Pathogenwachstum in den Blättern der 35S-*ABCG1*-Linien reproduziert werden.

Die Beobachtungen zeigten Tendenzen einer verstärkten Suberineinlagerung nach Färbung der Infiltrations- bzw. Inokulationsstellen von Pep-13 oder *P. infestans*-behandelten Kartoffelblättern von *ABCG1* überexprimierenden Pflanzen und einer reduzierten Läsionsintensität.

Um aussagekräftige Ergebnisse über einen Zusammenhang zwischen der Genexpression von *ABCG1*, der Suberineinlagerung und der Suszeptibilität von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* bestätigen zu können, sind weiterführende quantitative Untersuchungen an Pflanzen die *ABCG1* supprimieren bzw. überexprimieren notwendig.

4 DISKUSSION

4.1 ABCG1 BILDET EINE PHYLOGENETISCHE GRUPPE MIT ANDEREN ABC-HALBTRANSPORTERN MIT FUNKTION IN DER SUBERINISIERUNG

Eukaryotische, ATP-abhängige ABC-Transporter-Proteine haben eine wichtige Funktion für den Transport einer Vielzahl von Substraten über zelluläre Membranen (Higgins & Linton 2004). In Pflanzen wurden sie zunächst als Transporter identifiziert, die in der abschließenden Entgiftung von toxischen Komponenten, z. B. in der vakuolären Ablagerung, involviert sind (Dudler & Hertig 1992, Martinoia *et al.* 1993). Seitdem wurde gezeigt, dass sie an einer Reihe von physiologischen Prozessen in der Pflanze beteiligt sind (zur Übersicht siehe Kretschmar *et al.* 2011 und darin enthaltene Referenzen). Derzeit sind die genauen Substrate und/-oder die physiologischen Funktionen der meisten Transporter noch nicht bekannt. Auf Grundlage der im Jahre 2011 veröffentlichten Kartoffel-Genomsequenz (Xu *et al.* 2011) wurden 2015 für *S. tuberosum* 250 ABC-Transporter, davon 137 in der Unterfamilie G, annotiert (Andolfo *et al.* 2015). Von den 137 Transportern dieser Unterfamilie wurden 25 den PDR/ABCG-Volllängentransportern und 112 den ABCG-Halbtransportern zugeordnet. Gegenwärtig sind nur vier (*StPDR1* bis *StPDR4*) der 25 Volllängentransportern in Kartoffel durch Expressionsanalysen näher charakterisiert. So wird z. B. nach Infektion mit *P. infestans* in Blättern von *S. tuberosum* die Genexpression dieser Transporter induziert oder die Expression von *StPDR1* in Kartoffel-Gewebekultur nach Behandlung mit Natriumchlorid herunter- hingegen die von *StPDR2* und *StPDR3* hoch reguliert (Ruocco *et al.* 2011).

In dieser Arbeit wurde erstmalig einer der 112 annotierten ABC-Halbtransporter in *S. tuberosum* mit einer funktionellen Bedeutung für die Suberinbildung identifiziert.

Aufgrund der starken hydrophoben Eigenschaften der Fettsäuresubstrate, lagern sie sich bevorzugt in Lipidmembranen ein, wodurch biochemische Ansätze zur Durchführung von Transportassays mit künstlichen Membranen problematisch sind (Hamilton 1998, Bird *et al.* 2007). Deshalb kann über mögliche transportierte Substrate derzeit nur spekuliert werden.

Im Zeitraum dieser Arbeit publizierten Yadav und Kollegen (2014) eine phylogenetische Gruppe von *Arabidopsis*-ABCG-Halbtransporterproteinen mit Funktion in der Bildung einer Suberinbarriere. Ebenso beschrieben Shiono *et al.* 2014 mit RCN1/*OsABCG5*, einen ABCG-Halbtransporter aus *Oryza sativa*, ein Mitglied der selben phylogenetischen Gruppe der erwähnten *Arabidopsis*-ABCG-Halbtransporter (Matsuda *et al.* 2012) ebenfalls mit Funktion in

der Suberinisierung. Die von Yadav und Kollegen identifizierte homologen Transporter *AtABCG1* und *AtABCG16*, denen eine Funktion in der Bildung einer intakten Pollenwand zugesprochen wird, sind auf Aminosäureebene mit *ABCG1* aus *S. tuberosum* zu 72 % bzw. 73 % identisch (Analyse mittels BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); s. auch Abbildung 3.2). Ebenso wurden in dieser Studie die Halbtransporter *AtABCG2*, *AtABCG6* und *AtABCG20* untersucht, die für die Suberinisierung der Wurzeln und der Samenschale benötigt werden (Yadav *et al.* 2014). Deren Aminosäuresequenzen sind jeweils mit 69 %, 72 % beziehungsweise 70 % zu *StABCG1* identisch. Die hohe Homologie dieser Transporter und die Gruppierung in einer phylogenetischen Gruppe von Transportern, die zur Einlagerung von Suberin beitragen, lassen einen funktionellen Zusammenhang von *ABCG*-Transportern, insbesondere der Halbtransporter und Suberinisierung vermuten.

In *A. thaliana* besteht die Unterfamilie G der *ABC*-Membrantransporter-Familien aus mehr als 40 Mitgliedern (Verrier *et al.* 2008). Sehr prominente, eng miteinander verwandte Halbtransporter sind *AtABCG11*, *AtABCG12* und *AtABCG13*. Diese sind für den Transport von Kutin- und Wachsvorstufen in die Blüten und Sprossepidermis notwendig (Pighin *et al.* 2004, Bird *et al.* 2007, Panikashvili *et al.* 2007, 2011). *ABCG1* aus *S. tuberosum* zeigt zu *AtABCG11*, *AtABCG12* und *AtABCG13* auf Aminosäureebene eine Sequenzidentität von jeweils nur 33 %, 31 % und 30 % (Analyse mittels BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>); s. auch Abbildung 3.2). Interessanterweise wird *AtABCG11* mit einer veränderten Suberinbildung in den Wurzeln transgener Pflanzen mit reduzierter *AtABCG11*-Genexpression in Verbindung gebracht (Panikashvili *et al.* 2010). Dabei waren die Monomergehalte von C20-Fettsäuren, C18-Fettalkoholen, C16- und C18:1- ω -Hydroxyfettsäure im Vergleich zur Kontrolle in diesen Pflanzen zweifach reduziert, die restlichen Monomere blieben unverändert. Die Genexpression von *AtABCG11* in nicht suberinierten Geweben im unterirdischen Teil der Pflanzen sowie in den oberirdischen kutinhaltigen Organen (Bird *et al.* 2007), deuteten nicht auf eine Rolle von *ABCG11* in der Suberinbildung hin. Kutin und Suberin haben gemeinsame Fettsäurepräkursoren

(Li *et al.* 2007a, Panikashvili *et al.* 2010). So könnte der veränderte Suberingehalt in den *AtABCG11*-defizienten Pflanzen ein Sekundäreffekt aufgrund der Konkurrenz um gemeinsame Kutin- und Suberinvorstufen sein (Panikashvili *et al.* 2010).

Aufgrund der gemeinsamen Vorläufer der beiden Polymere, könnte neben dem Export von Suberinmonomeren *ABCG1* auch im Export von Kutinmonomeren bedeutsam sein. Aus diesem Grund wurden die Blätter und Blüten von *ABCG*-RNAi-Pflanzen durch Färbung mit

Toluidinblau auf eine defekte Kutikula untersucht. Dabei wurden keine Unterschiede in der Permeabilität der Blätter und Blüten der *ABCG*-RNAi-Pflanzen im Vergleich zu den WT- und EV-Kontrollen festgestellt (Daten nicht gezeigt). Die intakte Kutikula der Blätter und Blüten von *ABCG*-RNAi-Pflanzen und die starke basale Expression von *ABCG1* in suberinisierten Geweben in der Knollenschale und in den Wurzeln (Abbildung 3.6) spricht mehr für einen Export, der spezifisch für Suberin- und nicht für Kutinmonomere ist.

4.2 MÖGLICHE FUNKTION VON *ABCG1* IN DER SUBERINBIOSYNTHESE

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Suppression von *ABCG1* zu einer defekten Suberinisierung des Knollenperiderms und der Wurzelexodermis führt. Diese Erkenntnisse resultierten aus der mikroskopischen Analyse von Semidünnschnitten nach Fluorol-Yellow-Färbung (Abbildung 3.13) und den GC-MS-Analysen des Knollenperiderms (Abbildung 3.14). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Suberinmonomere in einem *ABCG* abhängigen Prozess transportiert werden an dem *ABCG1* beteiligt ist. Diese Annahme steht im Einklang mit der Lokalisation des Transporters an der Plasmamembran (Abbildung 3.7) und damit, dass *ABCG1* insbesondere in der Knollenschale und in der Wurzel, in den Geweben, in denen eine Suberineinlagerung stattfindet (Schreiber *et al.* 2005), exprimiert wird (Abbildung 3.6).

Die GC-MS-Analysen von depolymerisiertem Knollenperiderm ergaben, dass die Suppression des Transportergens einen signifikanten Effekt auf fast alle aliphatischen Suberinmonomere hatte (s. Kapitel 3.3.1.5, Abbildung 3.14). Die Gehalte der aliphatischen Suberinverbindungen im depolymerisierten Knollenperiderm der Kontrollpflanzen waren dabei mit den Daten aus anderen Studien vergleichbar (Schreiber *et al.* 2005, Serra *et al.* 2010). Die starke Reduktion der Hauptmonomere, der C18:1- ω -Hydroxyfettsäure und C18:1- α,ω -Dicarbonsäure (Serra *et al.* 2010) des Peridermsuberins der *ABCG*-RNAi-Pflanzen, sowie der Nebenmonomere aus der Klasse der ω -Hydroxyfettsäuren, α,ω -Dicarbonsäuren, Fettalkohole als auch der Fettsäuren ab einer Kettenlänge von C24 und länger lässt vermuten, dass der Export kettenlängen-spezifisch beeinflusst wird (Abbildung 3.14A, B, C, D).

Das Profil der nicht polymerisierten Monomere, resultierend aus den LC-MS-Analysen apolarer und semipolarer Peridermextrakte von frischen Knollen der *ABCG*-RNAi-Linien, (Abbildung 3.16, Tabelle 3.1) unterstützt die Ergebnisse der GC-MS-Analysen und untermauert die Behauptung einer defekten Suberinisierung des Knollenperiderms. Dabei umfassten die präparierten apolaren Fraktionen alle extra- und intrazellulären Lipide.

Die transkriptionelle Suppression des Transportergens bewirkte im Vergleich zu den Kontrollen sowie den 35S-*ABCG1*-Überexpressionslinien eine Hyperakkumulation mutmaßlicher Suberinvorstufen, vor allem der Ferulasäurekonjugate ω -Feruloyloxyfettsäuren und ω -Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester (Abbildung 3.16A, B). Diese, in Korkeiche (*Quercus suber*) als Suberinkomponenten identifizierten Monomere, stellen wahrscheinlich die Hauptkomponenten des Suberinpolymers dar (Graça & Santos 2006, Santos & Graça 2006). Des Weiteren akkumulieren langkettige α,ω -Dicarbonsäuren und deren Vorläufer, die ω -Hydroxyfettsäuren (Agrawal & Kolattukudy 1977). Zudem akkumulieren Fettsäuren, vor allem die C18:1-Fettsäure, welche wiederum Präkursor der C18:1- ω -Hydroxyfettsäure bzw. C18:1- α,ω -Dicarbonsäure ist und Alkylferulate. Die erhöhten Gehalte der eben genannten Komponenten könnten Suberin-assoziierte Vorläufer, Abbauprodukte oder nicht polymerisierte Suberinmonomere darstellen. *ABCG1* könnte demnach beim Transport von Komponenten, die für die Suberinpolymerisation benötigt werden, involviert sein. Die Alkylferulate und Fettsäuren werden auch als Bestandteile Suberin-assoziiierter Wachse beschrieben (Schreiber *et al.* 2005, Li *et al.* 2007a, Serra *et al.* 2010). Folglich ist eine Beteiligung von *ABCG1* nicht nur am Transport von Suberin- sondern auch am Export von Wachsbestandteilen nicht ausgeschlossen. Eine Analyse der Peridermwachse wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, stellt aber einen Ausblick für zukünftige Untersuchungen dar.

Sowohl die starke Reduktion der Suberinhauptkomponenten als auch der aliphatischen Nebenverbindungen ab einer Kettenlänge von C24 und höher im depolymerisierten Periderm der *ABCG*-RNAi-Linien (Abbildung 3.14), lässt eine gleichzeitige Akkumulation der korrespondierenden, nicht polymerisierten Verbindungen vermuten. So würde man erwarten, dass insbesondere ω -Hydroxy-C18:1-Monomere akkumulieren. Jedoch zeigten die Gehalte der Komponenten in den RNAi-Linien, entgegen der Vermutung, eine Hyperakkumulation fast aller identifizierten Verbindungen nach der LC-MS-Analyse (Abbildung 3.16).

Die Ergebnisse führen zu der Annahme, dass die Synthese der Suberinpräkursoren in den *ABCG*-RNAi-Linien funktionell zu sein scheint und durch die Suppression des *ABCG*-vermittelten Transports zum Zeitpunkt des Exports in den Apoplasten unterbrochen wird. Der fehlende Transport verursacht wahrscheinlich eine Akkumulation von Suberinmonomeren und ihrer Präkusoren, was wiederum zu einer *Feedback*-Inhibierung der beteiligten Enzyme und folglich zur kompletten Störung des gesamten Monomerbiosynthesenetzwerks innerhalb der Zelle führt (Abbildung 4.1B). Die Konsequenzen sind in den großen Unterschieden zwischen den depolymerisierten und nicht polymerisierten Monomerprofilen

der Peridermextrakte von Kontrollen und den *ABCG*-RNAi-Linien zu sehen. Die starke Akkumulation der C18:1-Fettsäuren könnte eine Folge der fehlenden C18:1- ω -Hydroxyfettsäure und C18:1- α,ω -Dicarbonsäure der apolaren RNAi-Peridermfraction sein.

Die Suppression des Transportergens führte außerdem zu Veränderungen im Gehalt und im Profil von semipolaren Verbindungen (Tabelle 3.1). Im Kartoffelperiderm zählen zu diesen hauptsächlich Chlorogensäure, Kaffeesäure und Hydroxyzimtsäureamide (Negrel *et al.* 1996, Helmja 2007, Dastmalchi *et al.* 2014). Interessanterweise war der Gehalt von Chlorogensäure und einigen detektierten Vorläufern wie Kaffeesäure und den Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin im Vergleich zu den Kontrollen in den methanolischen Extrakten des RNAi-Periderms reduziert. Im Gegensatz dazu waren die Hydroxyzimtsäureamide mit Ausnahme von Feruloyltyramin in den semipolaren Fraktionen der RNAi-Linien stark erhöht und der Gehalt von Feruloyltyramin reduziert. Diese akkumulierenden Verbindungen könnten ebenso eine Konsequenz der gestörten Suberinmonomerbiosynthese und demzufolge Detoxifikationsprodukte der angestauten Suberinpräkursoren darstellen (Abbildung 4.1B). Ferulasäueramide wie Feruloyltyramin und Feruloyloctopamin tragen zur Zellwandquervernetzung von natürlichem und wundinduziertem Periderm bei und stellen dadurch wichtige Komponenten des Suberinpolymers dar (Borg-Olivier & Monties 1993, Negrel *et al.* 1996, Graça 2010). Einige Ferulasäueramide, wie z. B. Feruloyltyramin oder Feruloylputrescin, werden als bevorzugte Substrate Suberin-assoziiertes anionischer Peroxidasen im Apoplasten angenommen. In der H₂O₂-abhängigen Polymerisation werden diese phenolischen Komponenten in die suberinisierte Zellwand eingebaut (Bernards *et al.* 1999). Die überwiegende Akkumulation dieser Substanzen in den methanolischen Extrakten des RNAi-Periderms könnten nicht transportierte Suberinpräkursoren, aber auch ein Sekundäreffekt sein, welcher entweder auf die Neuformierung vom Periderm abzielt oder eine Stressreaktion darstellt. Als frühe Antwort auf biotischen und mechanischen Stress spielt die Synthese und Integration von Hydroxyzimtsäureamiden in die Zellwand von Kartoffelknollen eine große Rolle (Clarke 1982, Negrel *et al.* 1993, King & Calhoun 2010). Demzufolge kann nicht ausgeschlossen werden, dass die veränderte Peridermmorphologie der RNAi-Knollen (Abbildung 3.10) und dem folglich veränderten Metabolismus ein anderes Spektrum der Metaboliten reflektiert. So könnte die Akkumulation der Hydroxyzimtsäureamide im RNAi-Knollenperiderm mit der Neuformierung eines Wundperiderms in Verbindung gebracht werden (Dastmalchi *et al.* 2014). Eine Akkumulation von Hydroxyzimtsäureamiden im Knollenperiderm wurde auch für *FHT*-RNAi-Linien, vermutlich als Stressantwort oder in Verbindung mit der Entstehung eines Wundperiderms, beschrieben (Serra *et al.* 2010).

In strukturellen Modellen des Kartoffelperiderms und Korksuberin wird als Hauptbestandteil der Suberinstruktur ein Konjugat aus Glycerol, ω -Hydroxyfettsäuren und Ferulasäure (ω -Feruloyloxy-Acyl-Glycerol) angenommen (Graça & Pereira 2000, Graça & Santos 2006, Santos & Graça 2006).

In *A. thaliana* katalysieren die Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferasen GPAT4 und GPAT6 die Synthese von 2-Monoacylglycerol Estern (2-MAGs, Yang *et al.* 2010). 2-MAGs sind strukturelle Bestandteile sowohl von Kutin als auch Suberin (Graça & Pereira 2000, Graça *et al.* 2002). Für Kutin wurde die Kutinsynthese CD1 identifiziert, die die direkte Polymerisation von extrazellulären 2-MAGs zu Kutin katalysiert (Yeats *et al.* 2012). So konnten in kuticulären Wachsextrakten aus Tomate (*Solanum lycopersicum*) von *cd1*-Mutanten 2-MAGs nachgewiesen werden, in Pflanzen mit intaktem CD1-Gen hingegen nicht. In *A. thaliana* führt die Überexpression der Suberinbiosynthese-assoziierten *GPAT5* und *GPAT7* zu erhöhten Gehalten von 2-Monoacylglycerolen sowohl in kutikulären Wachsen als auch in Wurzel-Wachsen (Li *et al.* 2007a, Yang *et al.* 2012). Die Monoacylglycerole könnten somit exportierte Monomere, für die anschließende Polymerisation darstellen. Santos und Graça (2006) konnten im partiell depolymerisierten Suberin von Rinden- und Knollenperiderm Monoacylglycerole von ω -Hydroxyfettsäuren, α,ω -Dicarbonsäuren und die Oligomere ω -Feruloyloxy-Acyl-Glycerole identifizieren. Interessanterweise lag die höchste Abundanz dieser Verbindungen bei einer Kettenlänge von C22 (Santos & Graça 2006). Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte deutliche Anstieg von Feruloyloxyfettsäuren und ω -Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester in den Kettenlängen C20 bis C24 in den apolaren Peridermextrakten der transportdefizienten *ABCG*-RNAi Pflanzen deutet darauf hin, dass *ABCG1* am Export dieser Verbindungen beteiligt sein könnte. Das wiederum verursacht möglicherweise den geringen Gehalt an Ferulasäure, Fettsäuren und Fettalkoholen im depolymerisierten Suberin des Knollenperiderms der *ABCG*-RNAi-Pflanzen.

In allen gegenwärtig existierenden Studien über die Struktur von Suberin wird Ferulasäure meistens als oligomere Spezies in Form von Feruloyloxyfettsäuren und Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester gefunden (Graça & Pereira 2000, Graça & Santos 2006, Santos & Graça 2006). Das lässt vermuten das Ferulasäure in Form dieser Verbindungen exportiert wird. Unterstützt wird diese Hypothese für *S. tuberosum* durch die Funktion des Suberinbiosynthesegens *FHT*, welches die Esterbindung zwischen Ferulasäure und ω -Hydroxyfettsäure katalysiert (Serra *et al.* 2010). Der Funktionsverlust dieses Feruloyltransferasengens resultiert in verminderten Gehalten der Suberin-Hauptkomponente C18:1- ω -Hydroxyfettsäure und

Ferulasäure im depolymerisierten Knollenperiderm. Die FHT katalysiert die Bildung von ω -Feruloyloxypalmitinsäure *in vitro* (Serra *et al.* 2010), so dass eine Funktion in der Bildung weiterer ω -Feruloyloxyfettsäuren sowie von ω -Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester *in vivo* denkbar ist. Einen weiteren Hinweis für den Export von Ferulasäure in Form von oligomeren Estern gibt die Suppression des Suberinbiosynthesegens *Cyp86A33*, das Kartoffelorthologe des *Arabidopsis*-Fettsäure- ω -Hydroxylasegens *Cyp86A1*, welche in *S. tuberosum* zu stark reduzierten Gehalten der beiden Suberin-Hauptkomponenten C18:1- ω -Hydroxyfettsäure und C18:1- α,ω -Dicarbonsäure sowie zur Reduktion der Aromaten und Glycerol im aliphatischen Suberin führt (Serra *et al.* 2009b). Dies bestätigt die im Übersichtsartikel von (Graça 2015) beschriebene Notwendigkeit der ω -Hydroxylierung für die Bildung aliphatischer Ester.

Die Überexpression von *ABCG1* hatte keinen wesentlichen Effekt - weder auf das Profil der depolymerisierten-, der apolaren- und der semipolaren Verbindungen noch auf den Phänotyp (Abbildung 3.20, 3.21, Tabelle 7.16). Alle Profile waren mit denen der Kontrollpflanzen vergleichbar. Die Überexpression von nur einer Hälfte eines funktionellen ABC-Transporters könnte die Konsequenz der geringen Verschiebung in den Profilen der Überexpressionslinien im Vergleich zu den Kontrollen erklären.

ABCG1 könnte als Homo- und/oder Heterodimer u.a. mit einem noch nicht identifizierten ABCG-Transporter bzw. mit *ABCG20* in dem Transport von Suberinmonomeren involviert sein. Aufgrund des kurzen homologen Abschnittes von 39 Nukleotiden in den Sequenzen von *ABCG1* und *ABCG20* (s. Anhang Punkt 7.7) ist es möglich, dass zu jedem der durch eine fehlerhafte Suberinablagerung verursachten, beschriebenen Effekte entweder *ABCG1* oder *ABCG20* oder beide Transporter beitragen. Ob und inwiefern *ABCG20* am Transport von aliphatischen Suberinmonomeren im Knollenperiderm von *S. tuberosum* beteiligt sein könnte und einen potentiellen Dimerisierungspartner für *ABCG1* darstellt, ist Gegenstand weiterführender Untersuchungen. Gegenwärtige und außerhalb dieser Arbeit durchgeführte Experimente zeigten, dass das verwendete RNAi-Konstrukt *ABCG20* nicht in allen *ABCG*-RNAi-Linien supprimiert. Folglich ist der aufgeführte Suberinphänotyp der *ABCG*-RNAi-Linien nicht ausschließlich auf *ABCG20* zurückzuführen. Aufgrund einer möglichen Redundanz der Transporter kann zudem nicht ausgeschlossen werden, dass weitere homologe Transporter an dem ausgeprägten Suberinphänotyp der *ABCG*-RNAi-Pflanzen beteiligt sind.

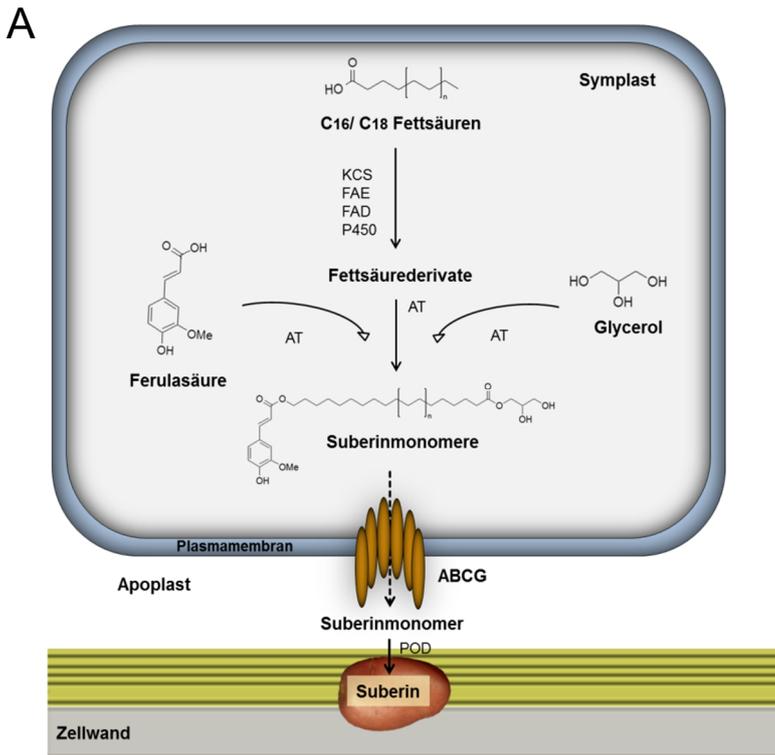
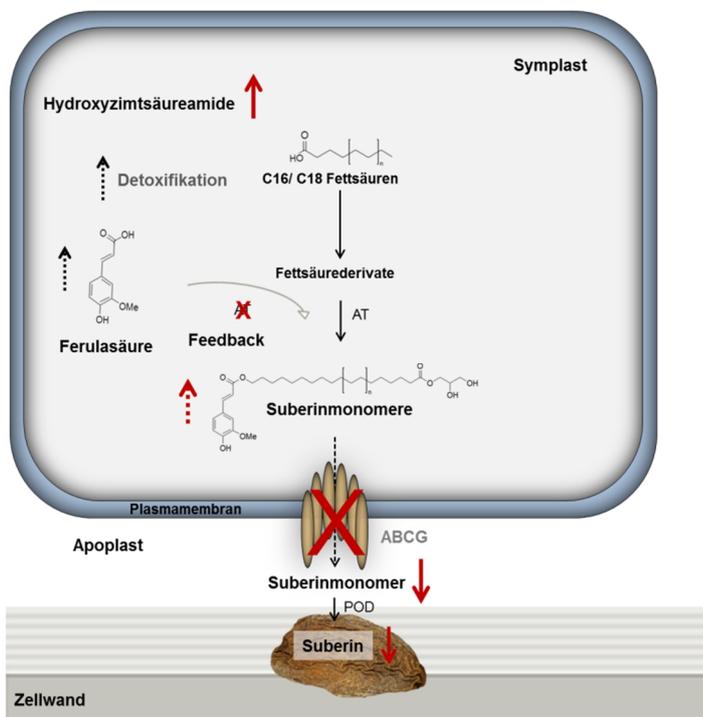


Abbildung 4.1: Vereinfachte Modelle über die Funktion von ABCG-Halbtransportern in der Suberinbiosynthese in WT- und ABCG-RNAi-Pflanzen von *S. tuberosum*.

(A) Mechanismus der Funktion von ABCG in WT-Kartoffel-Pflanzen (verändert nach Franke & Schreiber 2007, Fleck 2010). Die Grundbausteine zur Synthese der Polymerbestandteile von Suberin sind Glycerol, C16- bzw. C18-Fettsäuren und Ferulasäure. Die Fettsäuren werden durch Elongasen zu langkettigen Fettsäuren und anschließender ω -Oxidation zu langkettigen Fettsäurederivaten modifiziert. Acyl-transferasen verknüpfen die monomeren Präkursoren mit Glycerol und/oder Ferulasäure zu Estern oligomerer Suberinvorstufen, die im Anschluss durch ABCG Halbtransporter in den Apoplasten exportiert werden. Nach dem Export werden die Mono- bzw. Oligomere vermutlich durch Peroxidasen und Hydrolasen zu einem Suberin-Makromolekül polymerisiert.



(B) Hypothetisches Modell zur gestörten Suberinmonomer-Biosynthese in Pflanzen mit supprimierter ABCG Transporterfunktion. In ABCG-RNAi-Pflanzen ist die Synthese der Suberinvorläufer funktionell und wird zum Zeitpunkt des Exports in den Apoplasten, durch die Suppression des ABCG-vermittelten Transports, unterbrochen. Der fehlende Transport verursacht eine Anstauung von Suberinmonomeren und deren Vorläufern. Die Akkumulation dieser Komponenten führt wiederum zu einer *Feedback*-Inhibierung der Enzyme, zur Akkumulation von Ferulasäure und folglich zur kompletten Störung des gesamten Monomerbiosynthese-Netzwerks innerhalb der Zelle. Die angestauten Suberinpräkursoren werden detoxifiziert und sind als Detoxifikationsprodukte in Form von akkumulierenden Hydroxyzimtsäureamiden,

eine Konsequenz der gestörten Suberinmonomer-Biosynthese. Eine weitere Folge sind fehlende Suberinmonomere im Apoplasten und folglich mangelnde Suberineinlagerung in den Zellwänden suberinhaltiger Gewebe-resultierend im ABCG-RNAi-Suberinphänotyp. AT, Acyltransferase; ABCG, ATP-bindende Kasette (ABC)-Transporter der Unterfamilie G; FAE, Fettsäure-Elongations-Komplex; FAD, Fettsäuredesaturase; KCS, β -Ketoacyl-Coenzym A-Synthase; P450, Cytochrom P450-Monooxygenase; POD, Peroxidase

4.3 DER EINFLUSS EINER REDUZIERTEN *ABCG1*-GENEXPRESSION AUF DIE MORPHOLOGIE DER UNTERIRDISCHEN ORGANE UND DIE BARRIEREEIGENSCHAFTEN DES KARTOFFELKNOLLENPERIDERMS VON *SOLANUM TUBEROSUM*

Die transkriptionelle Suppression von *ABCG1* und die damit verbundene Änderung im aliphatischen Suberin im Knollenperiderm, hat starke Auswirkungen auf die Wasserbarriere-Eigenschaften und Morphologie des Knollenperiderms der *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.10, 3.11, 3.12). Das bei gleicher Anzahl von Knollen reduzierte Knollengewicht der *ABCG*-RNAi Pflanzen zum Zeitpunkt der Ernte im Vergleich zu den Kontrollen und der Gewichtsverlust von fast 50 % nach einer 20-tägigen Lagerung lassen auf eine defekte Wasserbarriere schließen. Zudem war der Wasserverlust mit einer starken Faltenbildung sowie auch mit einer kollabierten Phellemzellschicht des Knollenperiderms verbunden und korrelierte mit einer spröden und leicht zerbrechlichen Knollenschale (Abbildung 3.10, 3.11). Der Mangel an aliphatischem Suberin im Knollenperiderm verursacht wahrscheinlich das Fehlen einer funktionellen Wasserbarriere und verdeutlicht die bedeutende Rolle von *ABCG1* für eine ungestörte Suberinablagerung und Funktion von Suberinbarrieren. Eine erhöhte Wasserpermeabilität zeigen auch Knollen von Kartoffelpflanzen mit Suppression von Suberinbiosynthesegenen. Die Wasserdurchlässigkeit des Periderms von Pflanzen mit reduzierter Expression der *FHT*, *CYP86A33* und *KCS6* (β -Ketoacyl-CoA-Synthase), ist jeweils 15-, 3,5- und 1,5-fach höher als im WT (Serra *et al.* 2009a, 2009b, Serra *et al.* 2010). Die hohe Wasserdurchlässigkeit des Knollenperiderms der *FHT*-RNAi-Linien korreliert zudem mit einem ähnlichen Phänotyp von unstrukturierten und kollabierten Phellemzellschichten (Serra *et al.* 2010) wie es auch für das Knollenperiderm der *ABCG*-RNAi-Pflanzen detektiert wurde. Folglich könnten die kollabierten Phellemzellen, die spröden und leicht zerbrechlichen Knollenschalen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen, Resultat einer fehlenden, funktionellen Wasserbarriere sein. Ebenso sind *A. thaliana gpat5*-Mutanten mit reduzierten aliphatischen Suberinmonomergehalten durch eine im Vergleich zu WT-Pflanzen permeablere und fragilere Samenschale gekennzeichnet (Beisson *et al.* 2007).

Die charakteristische rötliche Schale der in dieser Arbeit verwendeten Kartoffelsorte Désirée ist auf die Akkumulation von Anthocyanen zurückzuführen (Fogelman *et al.* 2015). Die überwiegend bräunlich verfärbten Schalen der RNAi-Knollen hingegen korrelierten mit reduzierten Anthocyangehalten im Knollenperiderm der RNAi-Linien (Tabelle 3.1). Ein Verlust der Pigmentierung wird im Zusammenhang mit einer reduzierten Expression von

Genen des Anthocyanbiosyntheseweges und der Entstehung eines suberinisierten Wundperiderms in Kartoffelknollen beschrieben (Fogelman *et al.* 2015). Es ist möglich, dass die veränderte Peridermmorphologie und der Wasserverlust der RNAi-Knollen auf die Neuformierung eines Wundperiderms bzw. auf unterschiedliche Entwicklungsstadien der Phellemzellen zurückzuführen sind. Die Suppression des *ABCG1*-Transportergens könnte zur Verzögerung oder Verhinderung der Peridermreifung, dem sogenannten „Skin-set“, beitragen. Während des „Skin-sets“ (innerhalb von zwei bis drei Wochen nach der Ernte) vollendet das Kartoffelperiderm die Suberinisierung, die Zellen des Phellems werden dicker und haften sich fest an die innerste Schicht des Periderms, das Phelloderm an (Lulai & Freeman 2001, Serra *et al.* 2010). Dadurch wird das Periderm unempfindlicher gegenüber Verwundung, Abrieb und Pathogenbefall und erhält die vollen Wasserbarriere-Eigenschaften, welche im Wesentlichen mit der Suberinisierung der Peridermzellen einhergeht (Lulai & Freeman 2001, Schreiber *et al.* 2005, Lenzian 2006, Serra *et al.* 2010).

Die Suppression von *ABCG1* korrelierte mit einem veränderten Wurzelphänotyp und einer reduzierten Suberinfärbung der Wurzelexodermis (Abbildung 3.11, 3.13B), was auf einen geringeren Suberingehalt in den Exodermiszellen und eventuell auf eine nicht funktionelle Wurzelbarriere der *ABCG*-RNAi-Linien hindeutet. Zudem wurde eine erhöhte basale Transkriptakkumulation von *ABCG1* in den Wurzeln von *S. tuberosum* detektiert (Abbildung 3.6). *ABCG1* könnte neben der Suberinisierung von Phellemzellen eine Rolle in der Suberinisierung von Wurzelexodermiszellwänden in *S. tuberosum* haben. Der Phänotyp der *ABCG*-RNAi-Wurzeln ähnelte dem veränderten Wurzelphänotyp von Reispflanzen mit Verlust der Transporterfunktion von *RCN1/OsABCG5* (Shiono *et al.* 2014). Für diesen ABC-Halbtransporter wird eine Funktion in der Suberinisierung von Exodermiszellwänden angenommen (Shiono *et al.* 2014). Die *rcn1*-Mutanten zeigten unter sauerstoffarmen Bedingungen eine veränderte Zusammensetzung des Suberins in den Wurzelexodermiszellen verbunden mit einem veränderten Wurzelphänotyp von starren und unverzweigten Wurzeln und einer beeinträchtigten Barrierefunktion. Des Weiteren wird *RCN1/OsABCG5* spezifisch in Wurzelexodermis- und -endodermiszellen von *O. sativa* exprimiert (Shiono *et al.* 2014).

Die reduzierte Suberinfärbung in den Zellwänden der Wurzelexodermis der *ABCG*-RNAi-Pflanzen korrelierte mit mehrlagigen, leicht gelb fluoreszierenden Zellschichten um den Zentralzylinder (Abbildung 3.13B). Eine typische Endodermis besteht aus einer einzelnen Zellschicht (Miyashima & Nakajima 2011), wie sie auch in den Wurzeln von den Kontrollpflanzen zu sehen war. Der durch die Suppression von *ABCG1* bedingte Wurzelphänotyp

könnte Folge eines Differenzierungseffektes bzw. Entwicklungsdefektes sein. Das stimmt mit Analysen von Semidünnschnitten alternder *Quercus subur*-Wurzeln überein. Diese zeigen ähnlich dem Phänotyp der *ABCG*-RNAi-Wurzeln, eine komplett zerrissene Cortexschicht und ein aus mehreren Zellschichten bestehendes Phellem anstelle der Endodermis (Machado *et al.* 2013). So wird beschrieben, dass die Endodermis infolge von Umweltstress oder im Laufe der Wurzelalterung durch ein suberinisiertes, mehrlagiges sekundäres Periderm ausgetauscht wird (Geldner 2013). Demnach stellen die mehrlagigen Zellschichten um den Zentralzylinder möglicherweise eine neugenerierte Barriere dar, vermutlich um die geschädigte Exodermissschicht zu kompensieren und die Wurzeln vor dem Austrocknen oder vor eindringenden Pathogenen zu schützen. In Annäherung dieser Hypothese korrelierte die Infektion junger Wurzeln von *Pelargonium hortorum* durch den pathogenen Pilz *Pythium* mit der Bildung einer mehrschichtigen, suberinisierten Phellemschicht im Endodermisbereich und einem verringerten Pathogenbefall (Machado *et al.* 2013). Weiterhin zeigten die Wurzeln der *ABCG*-RNAi-Linien eine erhöhte Autofluoreszenz, möglicherweise hervorgerufen durch die Einlagerung phenolischer Komponenten. So ist der Prozess der sekundären Peridermbildung in den Wurzeln häufig mit einer Lignifizierung des Gewebes verbunden (Geldner 2013).

4.4 MÖGLICHE BEDEUTUNG DES *ABCG*-HALBTRANSPORTERS UND VON SUBERIN IN DER ABWEHR VON *SOLANUM TUBEROSUM* GEGEN *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

Es ist bekannt, dass die Suberinisierung von Zellwänden durch Verwundung und Pathogenbefall induziert werden kann (Alt 1980, Lulai 2005, Lulai & Suttle 2009, Lulai & Neubauer 2014). Die Ablagerung von Suberin wird als essentieller Bestandteil des entstehenden Periderms angesehen, welches wiederum für die physikalische Pathogenabwehr von Bedeutung ist (Lulai & Corsini 1998, Barel & Ginzberg 2008). Daraus abgeleitet wird eine Rolle für Suberin in der Pathogenabwehr vermutet, allerdings sind derzeit noch keine funktionellen Daten bekannt.

Nach Behandlung von Kartoffelblättern mit Pep-13 zeigten Pflanzen mit reduzierter *ABCG1* Genexpression, im Vergleich zu den Kontrollen eine deutlich geringere Suberineinlagerung in den die Nekrosen umgebenden Zellwänden (Abbildung 3.22B, C). Diese korrelierte mit einer ausgeprägten Nekrosenbildung der Blätter der *ABCG*-RNAi-Pflanzen (Abbildung 3.22A). Das könnte darauf hindeuten, dass *ABCG1* am Transport von Suberinkomponenten in die Blätter

beteiligt ist und Suberin möglicherweise zur Eingrenzung der sich ausbreitenden Nekrosen beiträgt. Unterstützt wird diese Annahme, dass Suberin nicht konstitutiv im Blatt (Kosma *et al.* 2014), sondern an den betroffenen Stellen einer beschädigten Kutikula gebildet wird, um diese zu ersetzen (Nawrath *et al.* 2013). Weiterhin konnten Dean und Kolattukudy (1976) nach Verwundung von Jade-Blättern (*Crassula argentea*) und Achor und Kollegen (1997) nach Fraß durch die Larve der Miniermotte *Phyllocnistis citrella* an *Citrus*-Blättern suberinisierte Zellwände in den angrenzenden Zellen der Wundoberfläche bzw. im regenerierten Gewebe nachweisen.

Auch nach Blattinfektion mit *P. infestans* zeigten *ABCG*-RNAi-Pflanzen eine deutlich geringere Suberinisierung in den die Krankheitsläsionen umgebenden Zellen (Abbildung 3.23). Diese korrelierte z.T. mit stärkeren Läsionsintensitäten (s. Anhang, Abbildung 7.3A und 7.4A) und in einer ersten Analyse von Blattquerschnitten von Blättern nach *P. infestans*-Infektion, mit einem stärker kollabiertem Blattgewebe im infizierten Bereich der *ABCG*-RNAi-Linien im Vergleich zu den Kontrollen (s. Anhang Abbildung 7.3B und 7.4D). Um die Beobachtungen statistisch abzusichern müssen diese Experimente wiederholt werden.

Pflanzen, die *ABCG1* überexprimieren, zeigten in drei von fünf Experimenten nach Behandlung mit *P. infestans* verglichen zum WT und zur EV-Kontrolle eine geringere Läsionsintensität (Abbildung 3.28B, C). Möglicherweise könnte eine Rolle von Suberin in der Abwehr von Kartoffel gegenüber *P. infestans* darin bestehen, sowohl zur Eingrenzung der sich ausbreitenden Nekrosen beizutragen, als auch die Ausbreitung des Pathogens zu begrenzen. Die Suberrinfärbungen der Blätter von 35S-*ABCG1*-Pflanzen deuteten nach Infektion mit *P. infestans* und in Blattquerschnitten nach Behandlung mit Pep-13 im Vergleich zu den Kontrollen, auf mehr suberinisierte Zellen im Bereich des gesunden Gewebes, das dem nekrotischen angrenzt, hin (Abbildung 3.27B, s. Anhang 7.15, Abbildung 7.5, 7.6). Um eine sichere Aussage treffen zu können, sind jedoch analoge Experimente nötig.

Derzeit deuten nur korrelative Daten auf eine mögliche Rolle von Suberin in der Abwehr gegen Pathogene hin. Tippett und Hill (1984) konnten eine suberinisierte Grenzflächenbildung zwischen totem und lebendem Gewebe in Eukalyptus-Wurzeln (*Eucalyptus marginata*) nach Infektion mit *Phytophthora cinnamomi* beobachten. Dabei wurde die Peridermbildung mit einer limitierten Vermehrung des Oomyceten bis zu den Zellen des Xylems in Verbindung gebracht. Zudem korrelierte in verschiedenen Sojabohnen-Kultivaren (*Glycine max*) mit

unterschiedlicher partieller Resistenz gegenüber *Phytophthora sojae*, der Suberinisierungsgrad der Wurzeln sowohl mit der Stärke der partiellen Resistenz, als auch mit einer limitierten Hyphenausbreitung (Thomas *et al.* 2007, Ranathunge *et al.* 2008).

Die Überexpression von *ABCG1* könnte im Blatt von suszeptiblen Kartoffelpflanzen dazu beitragen, dass Suberinkomponenten verstärkt in räumlicher Nähe an die Seite der Läsionen transportiert werden und folglich zu einem höheren Grad an suberinierten Zellen führen. Diese wiederum könnten das Wachstum der Hyphen und damit die Ausbreitung des Pathogens verstärkt behindern, was möglicherweise zu einem geringeren Ausmaß der Läsionen im Vergleich zu denen der Kontrollen führte.

Die nach 96-stündiger Infektion durch *P. infestans* induzierte Genexpression von *ABCG1* in den Blättern von WT-Kartoffelpflanzen korrelierte mit einer erhöhten *Phytophthora*-Infektion zum gleichen Zeitpunkt (Abbildung 3.4, 3.24A). In diesem Zeitraum erfolgt auch die Suberinisierung des Gewebes (Lulai, 2007). *P. infestans* benötigt als hemibiotrophes Pathogen in der biotrophen Phase (bis 24 Stunden nach Infektion) seines Entwicklungszyklusses lebende Zellen (Wang *et al.* 2005, Fry 2008). Beim Wechsel zur nekrotrophen Phase, die Phase der Vermehrung (36 bis 96 Stunden nach Infektion), beginnt die extensive Kolonisierung der intra- und interzellulären Bereiche des Gewebes durch den Erreger (Stevenson *et al.* 2001, Wang *et al.* 2005). Die Phase der Infektion entspricht dem beschriebenen Zeitraum, in dem die Zellen verwundeter und infizierter Gewebe suberinisieren (Lulai & Corsini 1998, Strange 2006, Lulai & Neubauer 2014). Dieses Stadium der Infektion wird zudem durch die Expression des Nep1 (Nekrose und Ethylen induzierendes Protein 1)-ähnlichen Proteins *PiNPP1.1* (Nekrose induzierendes *Phytophthora* Protein), welches einen Zelltod induziert und so das Pathogenwachstum begünstigt, begleitet (Gijzen & Nürnberger 2006, Feng *et al.* 2014). In *S. tuberosum* könnte eine Antwort auf diesen Zelltod die ausgeprägte Suberinisierung der Krankheitsläsionen-umgebenden Zellen in den WT-Kartoffelpflanzen sein (Abbildung 3.22A). Das stützt die Hypothese, dass eine vom Pathogen induzierte Expression von *ABCG1* zur Suberinisierung in den Blättern von *S. tuberosum* beitragen könnte und dass die Krankheitsläsionen-umgebenden suberinierten Zellen nicht nur daran beteiligt sind, das Eindringen von *P. infestans* zu verhindern, sondern eher die kontinuierliche Ausbreitung des Pathogens zu limitieren und damit zur Abwehr von *S. tuberosum* gegen *P. infestans* beizutragen.

Im Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen der Pathogenbiomasse von *P. infestans*, korrelierte die Suppression von *ABCG1* mit einer erhöhten

Suszeptibilität der *ABCG*-RNAi-Pflanzen gegenüber *P. infestans* in vier unabhängigen Experimenten (Abbildung 3.24B). Hingegen wiesen die Blätter der *ABCG1* überexprimierenden Pflanzen, in drei unabhängigen Experimenten ein reduziertes Pathogenwachstum im Vergleich zu WT- und EV-Kontrollen jeweils 96 Stunden nach der Infektion, auf (Abbildung 3.28D, s. Anhang 7.16, Abbildung 7.9). Allerdings konnten diese Ergebnisse in zwischenzeitlich durchgeführten Untersuchungen nicht mehr reproduziert werden. So zeigten die Pathogenbiomassen starke Unterschiede, sowohl zwischen den untersuchten *ABCG*-RNAi- und Überexpressionslinien als auch innerhalb der jeweiligen Experimente. Das kann verschiedene Ursachen haben. Die Interaktion zwischen *S. tuberosum* und *P. infestans* ist sehr variabel. So könnten geringfügige Änderungen einen Einfluss auf die Interaktion und den Infektionsverlauf haben. Ein Faktor könnte eine veränderte Luftfeuchtigkeit sein, denn für die direkte Sporenkeimung benötigt *P. infestans* warme und feuchte Bedingungen (Judelson & Blanco 2005). Diese sollten in den durchgeführten Experimenten durch die Verwendung von Plastiktüten mit Kordeln zum Verschließen gewährleistet werden. Bei einer geringen Luftfeuchte sinkt die Keimungsrate von *P. infestans* (Sunseri *et al.* 2002), welche zum einen das Ausmaß der Infektion und/oder zum anderen den Zeitpunkt der Blattinfektion beeinflussen könnte. Hohe Luftfeuchtigkeit, scheint zudem entscheidend für eine schnelle Suberinisierung während des Wundheilungsprozesses zu sein (Wigginton 1974). So korrelierte eine schnelle wundinduzierte Peridermbildung in Knollen mit Luftfechtigkeiten von über 90 % im Gegensatz zu einer verzögerten Suberinisierung bei geringen Luftfeuchten (Wigginton 1974, Morris *et al.* 1989). In der Annahme, dass Suberin die Vermehrung von *P. infestans* in den Blättern von *S. tuberosum* begrenzt, könnte eine veränderte Luftfeuchtigkeit einhergehend mit einer veränderten Sporenkeimung und/oder Suberinisierung zu Abweichungen in den Ergebnissen führen.

Es ist bekannt, dass das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), ein potentieller Regulator der die Evapotranspiration in Pflanzen reduziert, die Synthese und Ablagerung von Suberin in Kartoffel-Gewebekulturen und wundinduziertem Suberin im Knollenperiderm fördert (Soliday *et al.* 1978, Lulai *et al.* 2008, Suttle *et al.* 2013). Ob ABA in der vorliegenden Wirt-Pathogen-Interaktion zwischen *S. tuberosum* und *P. infestans* Ursache für die beobachtete Variabilität der Ergebnisse sein könnte, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, stellt aber einen interessanten Ansatz für weitere Analysen dar.

Ein weiterer Einflussfaktor ist neben den klimatischen Anzucht-/Kultivierungsbedingungen z. B. auch das Alter des *P. infestans*-Isolats bzw. des verwendeten Myzeliums, welches die

Zoosporenproduktion beeinflussen könnte (Eye *et al.* 1978, Lipka *et al.* 2005, Raftoyannis & Dick 2006). Eine möglichst einheitliche Qualität des Inokulums ist ebenfalls entscheidend, um Experimente unter weitgehend konstanten Bedingungen und mit geringer Varianz reproduzieren zu können. Die Keimfähigkeit der *P. infestans*-Sporen des Inokulums lässt sich jedoch aufgrund der initialen biotrophen Phase des Erregers nicht vorab testen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei verschiedenen Inokula trotz identischer Sporenkonzentration ein ungleicher Anteil an Sporen keimt. Auch eine unterschiedliche Handhabung von *P. infestans* beim Inokulieren der Blätter können die Infektion beeinflussen.

Diese beschriebenen Einflussfaktoren können u. a. zu Abweichungen in den Ergebnissen führen und die Zeitpunkte, an denen Unterschiede in der Pathogenbiomasse zwischen Kontrollpflanzen und Pflanzen mit veränderter *ABCG1*-Expression detektiert werden können, verschieben. Es sind weiterführende Experimente nötig, um eine aussagekräftige Schlussfolgerung treffen zu können.

Ein Zusammenhang zwischen Pathogenbefall und Suberinisierung ist neben oberirdischen Pflanzenorganen auch für Kartoffelknollen beschrieben. Lulai (2005) konnte eine induzierte Suberinisierung der benachbarten Parenchymzellwände um den Infektionsbereich infizierter Knollen mit dem pathogenen Pilz *Verticillium dahliae* beobachten. Ebenso übersuberinisieren Kartoffelknollen im Infektionsbereich als Antwort auf den Befall durch den Pilz *Rhizoctonia solani* (Buskila *et al.* 2011) und zusätzlich sowohl bei Befall durch den Pilz *Fusarium*-Trockenfäule-Erreger als auch dem Bakterium *Erwinia carotovora* (Lulai & Corsini 1998). Es wird angenommen, dass Parenchymzellen suberinisieren, um Wundoberflächen in Kartoffelknollen zu begrenzen (Lulai & Neubauer 2014). Interessanterweise zeigten bei Raumtemperatur trocken gelagerte Kartoffelknollen der *ABCG*-RNAi-Linien vermehrt einen starken Pathogenbefall (Abbildung 3.25). Dieser trat ebenso während laufender Infektionsexperimente mit *P. infestans* bei den Knollen der RNAi-Pflanzen auf. Aufgrund einer möglichen Konkurrenz, vielleicht um Nährstoffe zwischen den angesiedelten Mikroorganismen und *P. infestans*, kann ein Einfluss der anderen Pathogenen auf das Wachstum von *Phytophthora* nicht ausgeschlossen werden. Um kein falsch-positives Ergebnis zu erhalten, wurde die Biomasse in infizierten Knollen nicht untersucht. Die Suppression von *ABCG1* und dem resultierenden Mangel an Suberin könnte mit dem Schimmelbefall im Zusammenhang stehen.

Hohe Luftfeuchtigkeit fördert die Keimung von Sporen und die Ausbreitung von Pathogenen auf ihren Substraten (Hannusch & Boland 1996, Agrios 2005). Unter Abschnitt 4.3 wurde das Fehlen einer funktionellen Wasserbarriere im Periderm der *ABCG*-RNAi-Pflanzen im

Zusammenhang mit dem Verlust der *ABCG*-Transporterfunktion und Suberin diskutiert. Möglicherweise resultiert ein erhöhter Pathogenbefall auf den Knollen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen aus dem Verlust ihrer Peridermfunktion. Der daraus resultierende erhöhte Wasserverlust könnte zu einer erhöhten, oberflächennahen Feuchtigkeit der RNAi-Knollen führen, die die Sporenkeimung von Pathogenen begünstigt.

Inwiefern die Expression von *ABCG1* von anderen Pathogenen beeinflusst wird, wurde nicht untersucht, bietet aber einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Analysen.

Die hier vorgestellten Ergebnisse aus der Untersuchung von *S. tuberosum* mit veränderter *ABCG1*-Expression, deuten auf eine Rolle von Suberin und des ABC-Halbtransporters *ABCG1* für eine funktionelle Barriere gegenüber Pathogenen in ober- und unterirdischen Organen hin.

In Pflanzen konnten inzwischen einige ABCG/PDR-Volllängentransporter, hauptsächlich in *A. thaliana* und *Nicotiana*-Spezies, mit der Antwort auf biotischen und abiotischen Stress in Verbindung gebracht werden (zur Übersicht siehe Muhovski *et al.* 2014). Darunter *NpPDR1*, der zur basalen Abwehr gegen Pilze und den Oomyceten *Phytophthora nicotianae* durch den Transport von Terpenoiden beiträgt (Stukkens *et al.* 2005, Bultreys *et al.* 2009, Remy & Duque 2014). Ruocco und Kollegen (2011) identifizierten die ersten vier ABCG/PDR-Volllängentransporter (*StPDR1* bis *StPDR4*) von *S. tuberosum*, die aufgrund ihres Expressionsmusters mit der Abwehr von Pathogenen, u. a. von *P. infestans* und *Botrytis cinerea*, in Verbindung gebracht werden. Weiterhin wird eine mögliche Rolle für ABCG-Halbtransporter in der basalen Abwehr und/oder im *cross-talk* zwischen Pflanzen und Mikroorganismen vermutet (Kang *et al.* 2011). Einen ersten Hinweis auf eine Involvierung in der Pathogenabwehr konnte erst kürzlich für *AtABCG16* in *A. thaliana* gezeigt werden (Ji *et al.* 2014). So waren T-DNA *knockout*-Linien des *Arabidopsis* Halbtransporters anfälliger gegenüber dem virulenten Pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* DC3000 als die Kontrollen.

Um die Rolle von *ABCG1* in der Pathogenabwehr weiter zu charakterisieren und eine sichere Aussage bezüglich seiner Funktion treffen zu können, sind zusätzliche Untersuchungen wie u.a. die Validierung der Infektionsexperimente zur Bestimmung der Pathogenbiomasse oder auch Metabolitanalysen von infizierten Blättern zur Bestimmung des Suberingehalts, notwendig.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzen sind in der Lage, anhand hochkonservierter Molekülstrukturen, den sogenannten PAMPs, Mikroorganismen zu erkennen und eine Abwehrantwort auszulösen. In *Solanum tuberosum* induziert die exogene Applikation von Pep-13, ein PAMP der Gattung *Phytophthora*, JA- und SA-abhängige Abwehrreaktionen und führt in anfälligen Kartoffelpflanzen zu einem reduzierten Wachstum des Erregers der Kraut- und Knollenfäule *Phytophthora infestans*.

Mit dem Ziel, weitere Kenntnisse in die molekularen Mechanismen einer PAMP-induzierten Abwehrreaktion von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* zu erhalten und involvierte Gene zu identifizieren, wurden in einer vorangegangenen Arbeit Microarray-Analysen durchgeführt. Das Kandidatengen *ABCG1* wurde dabei als eines von 700 differentiell exprimierten Genen identifiziert, welches nach Behandlung mit Pep-13 transkriptionell induziert wurde und als eines von 65 Genen, welches dabei eine JA-Abhängigkeit zeigte.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Kandidatengen *ABCG1* in Wildtyp-Kartoffelpflanzen und in Pflanzen mit RNAi-vermittelter Suppression der *ABCG1*-Expression sowie in *ABCG1*-überexprimierenden Kartoffelpflanzen funktionell charakterisiert und die mögliche Rolle dieses Gens in der Abwehr von *S. tuberosum* gegenüber *P. infestans* untersucht. Dabei konnten insbesondere die folgenden Erkenntnisse gewonnen werden:

- *ABCG1* kodiert für einen ABC (ATP-bindende Kasette)-Halbtransporter der Unterfamilie G, dessen Genexpression als Reaktion auf Pep-13, Blattverwundung und Infektion mit *P. infestans* induziert wird. Die basale Expression von *ABCG1* erfolgt vor allem im Knollenperiderm und in den Wurzeln. Das konstitutiv exprimierte ABCG1-RFP-Fusionsprotein lokalisiert an der Plasmamembran.
- *ABCG*-RNAi-Pflanzen mit herunterregulierter *ABCG1*-Expression zeigen eine veränderte Morphologie des Wurzel- und Knollenperiderms mit teilweise kollabierten und unorganisierten Zellschichten. Der oberirdische Teil der Pflanzen weist hingegen keine phänotypischen Veränderungen auf. Zudem zeigen die Knollen der *ABCG*-RNAi-Pflanzen nach Lagerung eine verstärkte Reduktion ihres Gewichts im Vergleich zu Knollen von Kontrollpflanzen (WT und EV).
- Pflanzen mit supprimierter *ABCG1*-Expression weisen eine starke Reduktion der aliphatischen Haupt- und Nebenkomponenten im Suberinpolymer und erhöhte Mengen

von möglichen Suberinvorstufen in den Lösungsmittelextrakten der Knollenperiderme auf. Darüber hinaus zeigen die Zellen der Wurzelexodermis von *ABCG*-RNAi-Pflanzen eine reduzierte Suberinfärbung.

- Pflanzen mit konstitutiver *ABCG1*-Expression hingegen zeigen weder im Knollenperiderm eine veränderte Morphologie noch weisen sie einen veränderten Suberingehalt auf. Dies könnte, zumindest für das Knollengewebe, auf eine Heteromerbildung mit einem anderen ABCG-Halbtransporter hindeuten.
- Die lokale Pep-13-Infiltration und ebenso die Infektion mit *P. infestans* führen bei *ABCG*-RNAi-Pflanzen zu einer stark verringerten Suberineinlagerung in die Blattzellwände im Vergleich zu infiltrierten bzw. inokulierten Kontrollpflanzen. Zudem zeigen Pep-13-behandelte Blätter der RNAi-Linien im Vergleich zu den behandelten Wildtyp- und *Empty Vector*-Kontrollen ausgeprägtere Nekrosen.
- In *ABCG1*-überexprimierenden Pflanzen deutet die durchgeführte Suberinfärbung aus vorläufigen Experimenten auf eine im Vergleich zu den Wildtyp- und *Empty Vector*-Kontrollen verstärkte Suberineinlagerung in den Blattzellen nach Infiltration mit Pep-13 wie auch nach *P. infestans*-Infektion hin.
- Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Infektionsexperimente zeigten im Vergleich zu den Wildtyp- und *Empty Vektor*-Kontrollpflanzen ein erhöhtes *P. infestans*-Wachstum in Pflanzen mit supprimierter *ABCG1*-Expression; in *ABCG1*-überexprimierenden Pflanzen war das Wachstum hingegen verringert.

Bisher wurden Mitglieder der ABC-Transporter mit Funktion in der Kutikulabildung beschrieben und nur sehr wenige mit Beteiligung an der Bildung von Suberin. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten auf eine Rolle von *ABCG1* in der Suberinisierung von Phellemzellwänden des Kartoffelperiderms hin. Dabei werden die Suberinmonomere und ihre Vorläufer wahrscheinlich in einem ABCG-abhängigen Prozess transportiert. Eine Korrelation zwischen ABCG-Transportern und der Suberinisierung von Phellemzellen des Knollenperiderms in *S. tuberosum* wurde bisher nicht gezeigt. Eine Suberinisierung ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Funktion des Periderms. Umso mehr könnte *ABCG1* von wichtiger Bedeutung für eine normale Suberinisierung und damit für die Peridermfunktion, u. a. dem Schutz vor Wasserverlust, und entscheidend für die Morphologie der unterirdischen Organe von *S. tuberosum* sein.

Einige der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente deuten auf eine Rolle von *ABCG1* in der Modulation von Suberineinlagerungen in den Blättern anfälliger *S. tuberosum*-Pflanzen während biotischem Stress, verursacht durch *P. infestans*, hin. Aufbauend auf den Ergebnissen dieser Arbeit ist die Annahme einer ABCG-abhängigen Suberinisierung in Blättern anfälliger *S. tuberosum*-Pflanzen nach Infektion mit *P. infestans* in weiterführenden Untersuchungen zu überprüfen sowie für andere Organe zu analysieren, um die Rolle von *ABCG1* und anderen ABCG-(Halb-)Transportern für die Pflanze-Pathogen-Interaktion von *S. tuberosum* und *P. infestans* näher zu charakterisieren.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Abramovitch, R.B., J.C. Anderson & G.B. Martin (2006). "Bacterial elicitation and evasion of plant innate immunity." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(8): 601-611.
- Achor, D.S., H. Browning & L.G. Albrigo (1997). "Anatomical and histochemical effects of feeding by *Citrus* Leafminer Larvae (*Phyllocnistis citrella* Stainton) in *Citrus* leaves." *Journal of the American Society for Horticultural Science* **122**(6): 829-836.
- Agrawal, V.P. & P.E. Kolattukudy (1977). "Biochemistry of suberization: ω -hydroxyacid oxidation in enzyme preparations from suberizing potato tuber disks." *Plant Physiology* **59**(4): 667-672.
- Agrios, G.N. (2005). Chapter eleven-"Plant diseases caused by fungi." *Plant Pathology* (fifth edition). G.N. Agrios. San Diego, Academic Press: 385-614.
- Albert, M. (2013). "Peptides as triggers of plant defence." *Journal of Experimental Botany* **65**: 5269-5279.
- Alt, D. (1980). "Histological studies on the bark of apple trees after infection with *Phytophthora cactorum* (leb. Et cohn)." *Schroet. Angew. Botanik* **54**: 393-401.
- Altmann, S. (2009). "Funktionelle Analyse von 13-Lipoxygenase-abgeleiteten Oxylipinen in der Pathogenabwehr von *Solanum tuberosum* L." Dissertation.
- Anderson, B. (2007). "Sexual reproduction in *Phytophthora infestans* epidemiological consequences." Dissertation.
- Andolfo, G., M. Ruocco, A. Di Donato, L. Frusciante, M. Lorito, F. Scala & M.R. Ercolano (2015). "Genetic variability and evolutionary diversification of membrane ABC transporters in plants." *BMC Plant Biology* **15**: 51.
- Ballvora, A., M.R. Ercolano, J. Weiss, K. Meksem, C.A. Bormann, P. Oberhagemann, F. Salamini & C. Gebhardt (2002). "The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes." *Plant J* **30**(3): 361-371.
- Barel, G. & I. Ginzberg (2008). "Potato skin proteome is enriched with plant defence components." *Journal of Experimental Botany* **59**(12): 3347-3357.
- Bari, R. & J.G. Jones (2009). "Role of plant hormones in plant defence responses." *Plant Molecular Biology* **69**(4): 473-488.
- Bednarek, P. (2014). "The Role of Phytochemicals in Relationships of Plants with Other Organisms." *Natural Products*. John Wiley & Sons, Inc: 1-21 DOI 10.1002/9781118794623.ch1
- Bednarek, P. & A. Osbourn (2009). "Plant-microbe interactions: Chemical diversity in plant defense." *Science* **324**(5928): 746-748.

- Bednarek, P., M. Piślewska-Bednarek, A. Svatoš, B. Schneider, J. Doubský, M. Mansurova, M. Humphry, C. Consonni, R. Panstruga, A. Sanchez-Vallet, A. Molina & P. Schulze-Lefert (2009). "A glucosinolate metabolism pathway in living plant cells mediates broad-spectrum antifungal defense." *Science* **323**(5910): 101-106.
- Beisson, F., Y. Li-Beisson & M. Pollard (2012). "Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis." *Current Opinion in Plant Biology* **15**(3): 329-337.
- Beisson, F., Y. Li, G. Bonaventure, M. Pollard & J.B. Ohlrogge (2007). "The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of arabidopsis." *The Plant Cell* **19**(1): 351-368.
- Bellin, D., S. Asai, M. Delledonne & H. Yoshioka (2012). "Nitric oxide as a mediator for defense responses." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **26**(3): 271-277.
- Bent, A.F. & D. Mackey (2007). "Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions." *Annual Review of Phytopathology* **45**(1): 399-436.
- Bernards, M.A. (2002). "Demystifying suberin." *Canadian Journal of Botany* **80**(3): 227-240.
- Bernards, M.A., W.D. Fleming, D.B. Llewellyn, R. Priefer, X. Yang, A. Sabatino & G.L. Plourde (1999). "Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato." *Plant Physiology* **121**(1): 135-146.
- Berrocal-Lobo, M., A. Segura, M. Moreno, G. López, F. García-Olmedo & A. Molina (2002). "Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection." *Plant Physiology* **128**(3): 951-961.
- Bienert, M., A. Baijot & M. Boutry (2014). "ABCG transporters and their role in the biotic stress response." *Plant ABC transporters*. M. Geisler, Springer International Publishing. **22**: 137-162.
- Bigeard, J., J. Colcombet & H. Hirt (2015). "Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI)." *Molecular Plant* **8**(4): 521-539.
- Birch, P.R.J., M. Armstrong, J. Bos, P. Boevink, E.M. Gilroy, R.M. Taylor, S. Wawra, L. Pritchard, L. Conti, R. Ewan, S.C. Whisson, P. van West, A. Sadanandom & S. Kamoun (2009). "Towards understanding the virulence functions of RxLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans*." *Journal of Experimental Botany* **60**(4): 1133-1140.
- Bird, D., F. Beisson, A. Brigham, J. Shin, S. Greer, R. Jetter, L. Kunst, X. Wu, A. Yephremov & L. Samuels (2007). "Characterization of arabidopsis ABCG11/WBC11, an ATP binding cassette (ABC) transporter that is required for cuticular lipid secretion†." *The Plant Journal* **52**(3): 485-498.
- Böck, P. (1984). "Der Semidünnschnitt." Bergmann Verlag, München.
- Boher, P., O. Serra, M. Soler, M. Molinas & M. Figueras (2013). "The potato suberin feruloyl transferase FHT which accumulates in the phellogen is induced by wounding and regulated by abscisic and salicylic acids." *Journal of Experimental Botany* **64**(11): 3225-3236.

- Boller, T. & G. Felix (2009). "A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors." *Annual Review of Plant Biology* **60**(1): 379-406.
- Borg-Olivier, O. & B. Monties (1993). "Lignin, suberin, phenolic acids and tyramine in the suberized, wound-induced potato periderm." *Phytochemistry* **32**(3): 601-606.
- Bos, J.I., M.R. Armstrong, E.M. Gilroy, P.C. Boevink, I. Hein, R.M. Taylor, T. Zhendong, S. Engelhardt, R.R. Vetukuri, B. Harrower, C. Dixelius, G. Bryan, A. Sadanandom, S.C. Whisson, S. Kamoun & P.R. Birch (2010). "*Phytophthora infestans* effector Avr3a is essential for virulence and manipulates plant immunity by stabilizing host E3 ligase CMPG1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(21): 9909-9914.
- Bozkurt, T.O., S. Schornack, M.J. Banfield & S. Kamoun (2012). "Oomycetes, effectors, and all that jazz." *Current Opinion in Plant Biology* **15**(4): 483-492.
- Brieskorn, C. & P. Binnemann (1974). "Chemische Zusammensetzung des Suberins der Kartoffelschale." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **154**(4): 213-222.
- Brundrett, M. (1991). "Mycorrhizas in natural ecosystems in: Macfayden, A., Begon, M. & Fitter, A. H., eds. *Advances in ecological research*." London, UK: Academic Press **21**: 171-313.
- Brunner, F., S. Rosahl, J. Lee, J.J. Rudd, C. Geiler, S. Kauppinen, G. Rasmussen, D. Scheel & T. Nurnberger (2002). "Pep-13, a plant defense-inducing pathogen-associated pattern from *Phytophthora* transglutaminases." *EMBO J* **21**(24): 6681-6688.
- Bultreys, A., T. Trombik, A. Drozak & M. Boutry (2009). "*Nicotiana plumbaginifolia* plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene *NpPDR1* show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens." *Molecular Plant Pathology* **10**(5): 651-663.
- Buskila, Y., L. Tsrer, M. Sharon, P. Teper-Bamnolker, O. Holczer-Erich, S. Warshavsky, I. Ginzberg, S. Burdman & D. Eshel (2011). "Postharvest dark skin spots in potato tubers are an oversuberation response to rhizoctonia solani infection." *Phytopathology* **101**(4): 436-444.
- Büttner, D. (2012). "Protein export according to schedule: Architecture, assembly, and regulation of type iii secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR **76**(2): 262-310.
- Catanzariti, A.-M., P.N. Dodds & J.G. Ellis (2007). "Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens." *FEMS Microbiology Letters* **269**(2): 181-188.
- Chang, Y.-H., H.-Z. Yan & R.-F. Liou (2015). "A novel elicitor protein from *Phytophthora parasitica* induces plant basal immunity and systemic acquired resistance." *Molecular Plant Pathology* **16**(2): 123-136.

- Chaparro-Garcia, A., S. Schwizer, J. Sklenar, K. Yoshida, J.I.B. Bos, S. Schornack, A.M.E. Jones, T.O. Bozkurt & S. Kamoun (2015). "*Phytophthora infestans* RXLR-WY effector AVR3a associates with a dynamin-related protein involved in endocytosis of a plant pattern recognition receptor." PLoS ONE **10**(9): e0137071
- Chaparro-Garcia, A., R.C. Wilkinson, S. Gimenez-Ibanez, K. Findlay, M.D. Coffey, C. Zipfel, J.P. Rathjen, S. Kamoun & S. Schornack (2011). "The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is required for basal resistance against the late blight pathogen *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*." PLoS ONE **6**(1): e16608.
- Chapman, S., L.J. Stevens, P.C. Boevink, S. Engelhardt, C.J. Alexander, B. Harrower, N. Champouret, K. McGeachy, P.S.M. Van Weymers, X. Chen, P.R.J. Birch & I. Hein (2014). "Detection of the virulent form of AVR3a from *Phytophthora infestans* following artificial evolution of potato resistance gene R3a." PLoS ONE **9**(10): e110158.
- Chaudhari, P., B. Ahmed, D.L. Joly & H. Germain (2014). "Effector biology during biotrophic invasion of plant cells." Virulence **5**(7): 703-709.
- Chinchilla, D., Z. Bauer, M. Regenass, T. Boller & G. Felix (2006). "The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception." The Plant Cell **18**(2): 465-476.
- Chinchilla, D., L. Shan, P. He, S. de Vries & B. Kemmerling (2009). "One for all: The receptor-associated kinase BAK1." Trends in Plant Science **14**(10): 535-541.
- Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006). "Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response." Cell **124**: 803-814.
- Chomczynski, P. & N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- Clarke, D. (1982). "The accumulation of cinnamic acid amides in the cell walls of potato tissue as an early response to fungal attack." Active defense mechanisms in plants **37**: 321-322.
- Cui, H., K. Tsuda & J.E. Parker (2015). "Effector-triggered immunity: From pathogen perception to robust defense." Annual Review of Plant Biology **66**(1): 487-511.
- Dangl, J.L., D.M. Horvath & B.J. Staskawicz (2013). "Pivoting the plant immune system from dissection to deployment." Science **341**(6147): 746-751.
- Dangl, J.L. & J.D.G. Jones (2001). "Plant pathogens and integrated defence responses to infection." Nature **411**(6839): 826-833.
- Dastmalchi, K., Q. Cai, K. Zhou, W. Huang, O. Serra & R.E. Stark (2014). "Solving the jigsaw puzzle of wound-healing potato cultivars: Metabolite profiling and antioxidant activity of polar extracts." Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(31): 7963-7975.
- Davies, T.G.E. & J.O.D. Coleman (2000). "The *Arabidopsis thaliana* ATP-binding cassette proteins: An emerging superfamily." Plant, Cell & Environment **23**(5): 431-443.

- De Coninck, B., P. Timmermans, C. Vos, B.P.A. Cammue & K. Kazan (2015). "What lies beneath: Belowground defense strategies in plants." *Trends in Plant Science* **20**(2): 91-101.
- de Neergaard, E., O.B. Lyshede, T.S. Gahoonia, D. Care & J.E. Hooker (2000). Anatomy and histology of roots and root-soil boundary. *Root methods*. A. Smit, A.G. Bengough, C. Engels, M. van Noordwijk, S. Pellerin & S. van de Geijn, Springer Berlin Heidelberg: 33-73.
- Dean, B.B. & P.E. Kolattukudy (1976). "Synthesis of suberin during wound-healing in jade leaves, tomato fruit, and bean pods." *Plant Physiology* **58**(3): 411-416.
- Dudler, R. & C. Hertig (1992). "Structure of an MDR-like gene from *Arabidopsis thaliana*. Evolutionary implications." *Journal of Biological Chemistry* **267**(9): 5882-5888.
- Durrant, W.E. & X. Dong (2004). "Systemic acquired resistance." *Annual Review of Phytopathology* **42**(1): 185-209.
- Enstone, D.E., C.A. Peterson & F. Ma (2003). "Root endodermis and exodermis: Structure, function, and responses to the environment." *Journal of Plant Growth Regulation* **21**(4): 335-351.
- Eschen-Lippold, L., G. Rothe, M. Stumpe, C. Göbel, I. Feussner & S. Rosahl (2007). "Reduction of divinyl ether-containing polyunsaturated fatty acids in transgenic potato plants." *Phytochemistry* **68**(6): 797-801.
- Eye, L.L., B. Sneh & J. L. Lockwood (1978). "Factors affecting zoospore production by *Phytophthora megasperma* var. Sojae." *Phytopathology* **68**: 1766-1768.
- Fauth, M., P. Schweizer, A. Buchala, C. Markstädter, M. Riederer, T. Kato & H. Kauss (1998). "Cutin monomers and surface wax constituents elicit h₂O₂ in conditioned cucumber hypocotyl segments and enhance the activity of other h₂O₂ elicitors." *Plant Physiology* **117**(4): 1373-1380.
- Felix, G., J.D. Duran, S. Volko & T. Boller (1999). "Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin." *Plant J* **18**(3): 265-276.
- Felsenstein, J. (1985). "Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap." *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **39**: 783-791.
- Feltkamp, D., E. Baumann, W. Schmalenbach, R. Masterson & S. Rosahl (1995). "Expression of the mannopine synthase promoter in roots is dependent on the mas elements and correlates with high transcript levels of mas-binding factor." *Plant Sci*, **109**(1): 57-65.
- Feng, B.-Z., X.-P. Zhu, L. Fu, R.-F. Lv, D. Storey, P. Tooley & X.-G. Zhang (2014). "Characterization of necrosis-inducing NLP proteins in *Phytophthora capsici*." *BMC Plant Biology* **14**: 126-126.
- Ferrari, S., D.V. Savatin, F. Sicilia, G. Gramegna, F. Cervone & G.D. Lorenzo (2013). "Oligogalacturonides: Plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development." *Front Plant Sci* **4**: 49.

- Feys, B.J., M. Wiermer, R.A. Bhat, L.J. Moisan, N. Medina-Escobar, C. Neu, A. Cabral & J.E. Parker (2005). "*Arabidopsis* Senescence-Associated Gene101 stabilizes and signals within an Enhanced Disease Susceptibility1 complex in plant innate immunity." *The Plant Cell* **17**(9): 2601-2613.
- Fleck, A.T., T. Nye; C. Repenning, F. Stahl, M. Zahn & M. K. Schenk (2010). "Silicon enhances suberization and lignification in roots of rice (*Oryza sativa*)." *J Exp Bot* **62**(6): 2001-2011.
- Flor, H.H. (1971). "Current status of the gene-for-gene concept." *Annual Review of Phytopathology* **9**(1): 275-296.
- Fogelman, E., S. Tanami & I. Ginzberg (2015). "Anthocyanin synthesis in native and wound periderms of potato." *Physiologia Plantarum* **153**(4): 616-626.
- Franke, R. & L. Schreiber (2007). "Suberin — a biopolyester forming apoplastic plant interfaces." *Current Opinion in Plant Biology* **10**(3): 252-259.
- Freeman, B.C. & G.A. Beattie (2008). "An overview of plant defenses against pathogens and herbivores." *The Plant Health Instructor*. DOI: 10.1094/PHI-I-2008-0226-01 (<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Pages/OverviewOfPlantDiseases.aspx>)
- Fry, W. (2008). "*Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer." *Molecular Plant Pathology* **9**(3): 385-402.
- Fry, W.E. & N.J. Grünwald (2010). "Introduction to oomycetes." *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2010-1207-01 (<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/PathogenGroups/Pages/IntroOomycetes.aspx>)
- Geldner, N. (2013). "The endodermis." *Annual Review of Plant Biology* **64**(1): 531-558.
- Gijzen, M. & T. Nürnberger (2006). "Nep1-like proteins from plant pathogens: Recruitment and diversification of the NPP1 domain across taxa." *Phytochemistry* **67**(16): 1800-1807.
- Gimenez-Ibanez, S., V. Ntoukakis & J.P. Rathjen (2009). "The LysM receptor kinase CERK1 mediates bacterial perception in *Arabidopsis*." *Plant Signaling & Behavior* **4**(6): 539-541.
- Gomez-Gomez, L. & T. Boller (2000). "FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*." *Mol Cell* **5**(6): 1003-1011.
- Gómez-Gómez, L., G. Felix & T. Boller (1999). "A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal* **18**(3): 277-284.
- Gomes, L.H., K.M.R. Duarte, F.G. Andriano, A.L.Jr. Gildemberg; L.M. Garcia, A. Figueira & S.P. de Lira (2014). "Alpha-tomatoin against witches' broom disease." *American Journal of Plant Sciences* **5**(5): 596.
- Graça, J. (2010). "Hydroxycinnamates in suberin formation." *Phytochemistry Reviews* **9**(1): 85-91.
- Graça, J. (2015). "Suberin: The biopolyester at the frontier of plants." *Frontiers in Chemistry* **3**: 62.

- Graça, J. & H. Pereira (2000a). "Diglycerol alkenedioates in suberin: Building units of a poly(acylglycerol) polyester." *Biomacromolecules* **1**(4): 519-522.
- Graça, J. & H. Pereira (2000b). "Suberin structure in potato periderm: Glycerol, long-chain monomers, and glyceryl and feruloyl dimers." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **48**(11): 5476-5483.
- Graça, J. & S. Santos (2006). "Glycerol-derived ester oligomers from cork suberin." *Chemistry and Physics of Lipids* **144**(1): 96-107.
- Graça, J. & S. Santos (2007). "Suberin: A biopolyester of plants' skin." *Macromolecular Bioscience* **7**(2): 128-135.
- Graça, J., L. Schreiber, J. Rodrigues & H. Pereira (2002). "Glycerol and glyceryl esters of ω -hydroxyacids in cutins." *Phytochemistry* **61**(2): 205-215.
- Grant, S.R., E.J. Fisher, J.H. Chang, B.M. Mole & J.L. Dangl (2006). "Subterfuge and manipulation: Type III effector proteins of phytopathogenic bacteria." *Annual Review of Microbiology* **60**(1): 425-449.
- Greenberg, J.T. & N. Yao (2004). "The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions." *Cellular Microbiology* **6**(3): 201-211.
- Grefen, C., N. Donald, K. Hashimoto, J. Kudla, K. Schumacher & M.R. Blatt (2010). "A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies." *The Plant Journal* **64**(2): 355-365.
- Halim, V.A. (2006). "The Role of Salicylic Acid and Octadecanoids for Pathogen Defense in Potato." Dissertation
- Halim, V.A., S. Altmann, D. Ellinger, L. Eschen-Lippold, O. Miersch, D. Scheel & S. Rosahl (2009). "Pamp-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid." *The Plant Journal* **57**(2): 230-242.
- Halim, V.A., L. Eschen-Lippold, S. Altmann, M. Birschwilks, D. Scheel & S. Rosahl (2007). "Salicylic acid is important for basal defense of solanum tuberosum against *Phytophthora infestans*." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**(11): 1346-1352.
- Halim, V.A., A. Hunger, V. Macioszek, P. Landgraf, T. Nürnberger, D. Scheel & S. Rosahl (2004). "The oligopeptide elicitor PEP-13 induces salicylic acid-dependent and -independent defense reactions in potato." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **64**(6): 311-318.
- Halim, V.A., A. Vess, D. Scheel & S. Rosahl (2006). "The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence." *Plant Biology* **8**(3): 307-313.
- Hamilton, J.A. (1998). "Fatty acid transport: Difficult or easy?" *Journal of Lipid Research* **39**(3): 467-481.
- Hammond-Kosack, K.E. & J.D.G. Jones (1997). "Plant disease resistance genes." *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**(1): 575-607.

- Hannusch, D.J. & G.J. Boland (1996). "Interactions of air temperature, relative humidity and biological control agents on grey mold of bean." *European Journal of Plant Pathology* **102**(2): 133-142.
- Heckman, D.S., D.M. Geiser, B.R. Eidell, R.L. Stauffer, N.L. Kardos & S.B. Hedges (2001). "Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants." *Science* **293**(5532): 1129-1133.
- Heese, A., D.R. Hann, S. Gimenez-Ibanez, A.M.E. Jones, K. He, J. Li, J.I. Schroeder, S.C. Peck & J.P. Rathjen (2007). "The receptor-like kinase serk3/bak1 is a central regulator of innate immunity in plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**(29): 12217-12222.
- Helmja K., M.Vaher, J. Gorbatsšova & M. Kaljurand (2007). "Characterization of bioactive compounds contained in vegetables of the solanaceae family by capillary electrophoresis." *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem* **172–186**.
- Henry, E., K.A. Yadeta & G. Coaker (2013). "Recognition of bacterial plant pathogens: Local, systemic and transgenerational immunity." *The New phytologist* **199**(4): 908-915.
- Higgins, C.F. & K.J. Linton (2004). "The ATP switch model for ABC transporters." *Nat Struct Mol Biol* **11**(10): 918-926.
- Höfgen, R. & L. Willmitzer (1988). "Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation." *Nucleic Acids Research* **16**(20): 9877.
- Hückelhoven, R. (2007). "Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility." *Annual Review of Phytopathology* **45**(1): 101-127.
- Ingle, R.A., M. Carstens & K.J. Denby (2006). "Pamp recognition and the plant-pathogen arms race." *Bioessays* **28**(9): 880-889.
- Inoue, H., H. Nojima & H. Okayama (1990). "High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids." *Gene* **96**(1): 23-28.
- Jeworutzki, E., M.R.G. Roelfsema, U. Anschütz, E. Krol, J.T.M. Elzenga, G. Felix, T. Boller, R. Hedrich & D. Becker (2010). "Early signaling through the *Arabidopsis* pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves CA2+-associated opening of plasma membrane anion channels." *The Plant Journal* **62**(3): 367-378.
- Ji, H., Y. Peng, N. Meckes, S. Allen, C.N. Stewart & M.B. Traw (2014). "ATP-dependent binding cassette transporter g family member 16 increases plant tolerance to abscisic acid and assists in basal resistance against *Pseudomonas syringae* DC3000." *Plant Physiology* **166**(2): 879-888.
- Jones, J.D.G. & J.L. Dangl (2006). "The plant immune system." *Nature* **444**(7117): 323-329.
- Judelson, H.S. & F.A. Blanco (2005). "The spores of *Phytophthora*: Weapons of the plant destroyer." *Nat Rev Microbiol* **3**(1): 47-58.
- Kaku, H., Y. Nishizawa, N. Ishii-Minami, C. Akimoto-Tomiyama, N. Dohmae, K. Takio, E. Minami & N. Shibuya (2006). "Plant cells recognize chitin fragments for defense

- signaling through a plasma membrane receptor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(29): 11086-11091.
- Kamoun, S. (2006). "A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes." Annual Review of Phytopathology **44**(1): 41-60.
- Kamoun, S. & C.D. Smart (2005). "Late blight of potato and tomato in the genomics era." Plant Disease **89**(7): 692-699.
- Kamoun, S., P. van West, A.J. de Jong, K.E. de Groot, V.G.A.A. Vleeshouwers & F. Govers (1997). "A gene encoding a protein elicitor of *Phytophthora infestans* is down-regulated during infection of potato." Molecular Plant-Microbe Interactions **10**(1): 13-20.
- Kang, J., J. Park, H. Choi, B. Burla, T. Kretschmar, Y. Lee & E. Martinoia (2011). "Plant ABC transporters." The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists **9**: e0153.
- Kanneganti, T.-D., E. Huitema, C. Cakir & S. Kamoun (2006). "Synergistic interactions of the plant cell death pathways induced by *Phytophthora infestans* NEP1-like protein PINPP1.1 and INF1 elicitor." Molecular Plant-Microbe Interactions **19**(8): 854-863.
- Kawamura, Y., S. Hase, S. Takenaka, Y. Kanayama, H. Yoshioka, S. Kamoun & H. Takahashi (2009). "Inf1 elicitor activates jasmonic acid- and ethylene-mediated signalling pathways and induces resistance to bacterial wilt disease in tomato." Journal of Phytopathology **157**(5): 287-297.
- Kelley, B.S., S.-J. Lee, C.M.B. Damasceno, S. Chakravarthy, B.-D. Kim, G.B. Martin & J.K.C. Rose (2010). "A secreted effector protein (SNE1) from *Phytophthora infestans* is a broadly acting suppressor of programmed cell death." The Plant Journal **62**(3): 357-366.
- Kemmerling, B., A. Schwedt, P. Rodriguez, S. Mazzotta, M. Frank, S.A. Qamar, T. Mengiste, S. Betsuyaku, J.E. Parker, C. Müssig, B.P.H.J. Thomma, C. Albrecht, S.C. de Vries, H. Hirt & T. Nürnberger (2007). "The BRI1-associated kinase 1, BAK1, has a brassinolide-independent role in plant cell-death control." Current Biology **17**(13): 1116-1122.
- King, R.R. & L.A. Calhoun (2010). "A feruloyltyramine trimer isolated from potato common scab lesions." Phytochemistry **71**(17-18): 2187-2189.
- Kloosterman, B., D. Koeyer, R. Griffiths, B. Flinn, B. Steuernagel, U. Scholz, S. Sonnewald, U. Sonnewald, G. Bryan, S. Prat, Z. Bánfalvi, J. Hammond, P. Geigenberger, K. Nielsen, R.F. Visser & C.B. Bachem (2008). "Genes driving potato tuber initiation and growth: Identification based on transcriptional changes using the poci array." Functional & Integrative Genomics **8**(4): 329-340.
- Kobayashi, Y., I. Kobayashi, Y. Funaki, S. Fujimoto, T. Takemoto & H. Kunoh (1997). "Dynamic reorganization of microfilaments and microtubules is necessary for the expression of non-host resistance in barley coleoptile cells." The Plant Journal **11**(3): 525-537.
- Kolattukudy, P.E. (1987). "11 - lipid-derived defensive polymers and waxes and their role in plant-microbe interaction." Lipids: Structure and function. P.K. Stumpf. San Diego, Academic Press. **9**: 291-314.

- Kolattukudy, P.E. & V.P. Agrawal (1974a). "Structure and composition of aliphatic constituents of potato tuber skin (suberin)." *Lipids* **9**(9): 682-691.
- Kolattukudy, P.E. & B.B. Dean (1974b). "Structure, gas chromatographic measurement, and function of suberin synthesized by potato tuber tissue slices." *Plant Physiology* **54**(1): 116-121.
- Kosma, D.K., J. Murmu, F.M. Razeq, P. Santos, R. Bourgault, I. Molina & O. Rowland (2014). "AtMYB41 activates ectopic suberin synthesis and assembly in multiple plant species and cell types." *The Plant Journal* **80**(2): 216-229.
- Kretschmar, T., B. Burla, Y. Lee, E. Martinoia & R. Nagy (2011). "Functions of ABC transporters in plants." *Essays In Biochemistry* **50**: 145-160.
- Kuhn, H. & R. Panstruga (2014). "Introduction to a virtual special issue on phytopathogen effector proteins." *New Phytologist* **202**(3): 727-730.
- Kunze, G., C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller & G. Felix (2004). "The n terminus of bacterial Elongation Factor TU elicits innate immunity in *Arabidopsis* plants." *The Plant Cell* **16**(12): 3496-3507.
- Lazo, G.R., P.A. Stein & R.A. Ludwig (1991). "A DNA transformation-competent *Arabidopsis* genomic library in *Agrobacterium*." *Biotechnology (N Y)* **9**(10): 963-967.
- Lehmann, S., M. Serrano, F. L'Haridon, S.E. Tjamos & J.-P. Metraux (2015). "Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens." *Phytochemistry* **112**: 54-62.
- Lehrach, H., D. Diamond, J.M. Wozney & H. Boedtke (1977). "RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination." *Biochemistry* **16**(21): 4743-4751.
- Lendzian, K.J. (2006). "Survival strategies of plants during secondary growth: Barrier properties of phellements and lenticels towards water, oxygen, and carbon dioxide." *Journal of Experimental Botany* **57**(11): 2535-2546.
- Lewis, C.E., J.R.L. Walker, J.E. Lancaster & K.H. Sutton (1998). "Determination of anthocyanins, flavonoids and phenolic acids in potatoes. I: Coloured cultivars of *Solanum tuberosum* L." *Journal of the Science of Food and Agriculture* **77**(1): 45-57.

- Li-Beisson, Y., B. Shorrosh, F. Beisson, M.X. Andersson, V. Arondel, P.D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, R.B. Franke, I.A. Graham, K. Katayama, A.A. Kelly, T. Larson, J.E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K.M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot & J. Ohlrogge (2010). "Acyl-lipid metabolism." *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **8**: e0133.
- Li-Beisson, Y., B. Shorrosh, F. Beisson, M.X. Andersson, V. Arondel, P.D. Bates, S. Baud, D. Bird, A. DeBono, T.P. Durrett, R.B. Franke, I.A. Graham, K. Katayama, A.A. Kelly, T. Larson, J.E. Markham, M. Miquel, I. Molina, I. Nishida, O. Rowland, L. Samuels, K.M. Schmid, H. Wada, R. Welti, C. Xu, R. Zallot & J. Ohlrogge (2013). "Acyl-lipid metabolism." *The Arabidopsis Book*: e0161.
- Li, J., J. Wen, K.A. Lease, J.T. Doke, F.E. Tax & J.C. Walker (2002). "BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling." *Cell* **110**(2): 213-222.
- Li, Y., F. Beisson, J. Ohlrogge & M. Pollard (2007a). "Monoacylglycerols are components of root waxes and can be produced in the aerial cuticle by ectopic expression of a suberin-associated acyltransferase." *Plant Physiology* **144**(3): 1267-1277.
- Ligterink, W., T. Kroj, U.z. Nieden, H. Hirt & D. Scheel (1997). "Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants." *Science* **276**(5321): 2054-2057.
- Lipka, V., J. Dittgen, P. Bednarek, R. Bhat, M. Wiermer, M. Stein, J. Landtag, W. Brandt, S. Rosahl, D. Scheel, F. Llorente, A. Molina, J. Parker, S. Somerville & P. Schulze-Lefert (2005). "Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*." *Science* **310**(5751): 1180-1183.
- Liu, T., Z. Liu, C. Song, Y. Hu, Z. Han, J. She, F. Fan, J. Wang, C. Jin, J. Chang, J.-M. Zhou & J. Chai (2012). "Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor." *Science* **336**(6085): 1160-1164.
- Lochman, J. & V. Mikes (2006). "Ergosterol treatment leads to the expression of a specific set of defence-related genes in tobacco." *Plant Molecular Biology* **62**(1-2): 43-51.
- Lulai, E. (2005). "Non-wound-induced suberization of tuber parenchyma cells: A physiological response to the wilt disease pathogen *Verticillium dahliae*." *American Journal of Potato Research* **82**(6): 433-440.
- Lulai, E.C. (2007). "Skin-set, wound-healing and related defects " *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives*. 1st Edition. **ch 22**: 471-496.
- Lulai, E.C. & T.P. Freeman (2001). "The importance of phellogen cells and their structural characteristics in susceptibility and resistance to excoriation in immature and mature potato tuber (*solanum tuberosum* l.) periderm." *Annals of Botany* **88**(4): 555-561.
- Lulai, E.C. & J.D. Neubauer (2014). "Wound-induced suberization genes are differentially expressed, spatially and temporally, during closing layer and wound periderm formation." *Postharvest Biology and Technology* **90**: 24-33.
- Lulai, E.C. & J.C. Suttle (2009). "Signals involved in tuber wound-healing." *Plant Signaling & Behavior* **4**(7): 620-622.

- Lulai, E.C., J.C. Suttle & S.M. Pederson (2008). "Regulatory involvement of abscisic acid in potato tuber wound-healing." *Journal of Experimental Botany* **59**(6): 1175-1186.
- Lulai, E.C. & D.L. Corsini (1998). "Differential deposition of suberin phenolic and aliphatic domains and their roles in resistance to infection during potato tuber (*Solanum tuberosum* L.) wound-healing." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **53**: 209-222.
- Luo, B., X.-Y. Xue, W.-L. Hu, L.-J. Wang & X.-Y. Chen (2007). "An ABC transporter gene of *Arabidopsis thaliana*, AtWBC11, is involved in cuticle development and prevention of organ fusion." *Plant and Cell Physiology* **48**(12): 1790-1802.
- Ma, Y., Y. Zhao, R.K. Walker & G.A. Berkowitz (2013). "Molecular steps in the immune signaling pathway evoked by plant elicitor peptides: Ca(2+)-dependent protein kinases, nitric oxide, and reactive oxygen species are downstream from the early Ca(2+) signal." *Plant Physiology* **163**(3): 1459-1471.
- Machado, A., H. Pereira & R.T. Teixeira (2013). "Anatomy and development of the endodermis and phellem of *Quercus suber* L. Roots." *Microscopy and Microanalysis* **19**(03): 525-534.
- Martinoia, E., E. Grill, R. Tommasini, K. Kreuz & N. Amrhein (1993). "ATP-dependent glutathione s-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants." *Nature* **364**(6434): 247-249.
- Matsuda, S., A. Funabiki, K. Furukawa, N. Komori, M. Koike, Y. Tokuji, I. Takamura & K. Kato (2012). "Genome-wide analysis and expression profiling of half-size ABC protein subgroup G in rice in response to abiotic stress and phytohormone treatments." *Molecular Genetics and Genomics* **287**(10): 819-835.
- Mattinen, M.-L., I. Filpponen, R. Järvinen, B. Li, H. Kallio, P. Lehtinen & D. Argyropoulos (2009). "Structure of the polyphenolic component of suberin isolated from potato (*Solanum tuberosum* var. Nikola)." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**(20): 9747-9753.
- McFarlane, H.E., J.J.H. Shin, D.A. Bird & A.L. Samuels (2010). "Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations." *The Plant Cell* **22**(9): 3066-3075.
- Melotto, M., W. Underwood & S.Y. He (2008). "Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases." *Annual Review of Phytopathology* **46**: 101-122.
- Meng, X., J. Xu, Y. He, K.-Y. Yang, B. Mordorski, Y. Liu & S. Zhang (2013). "Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance." *The Plant Cell Online*.
- Mishina, T.E. & J. Zeier (2007). "Pathogen-associated molecular pattern recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in arabidopsis." *The Plant Journal* **50**(3): 500-513.
- Miya, A., P. Albert, T. Shinya, Y. Desaki, K. Ichimura, K. Shirasu, Y. Narusaka, N. Kawakami, H. Kaku & N. Shibuya (2007). "Cerk1, a lysM receptor kinase, is essential for chitin

- elicitor signaling in *Arabidopsis*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(49): 19613-19618.
- Miyashima, S. & K. Nakajima (2011). "The root endodermis: A hub of developmental signals and nutrient flow." *Plant Signaling & Behavior* **6**(12): 1954-1958.
- Morris, S.C., M.R. Forbes-Smith & F.M. Scriven (1989). "Determination of optimum conditions for suberization, wound periderm formation, cellular desiccation and pathogen resistance in wounded *Solanum tuberosum* tubers." *Physiological and Molecular Plant Pathology* **35**(2): 177-190.
- Muhovski, Y., J.-M. Jacquemin & H. Batoko (2014). "Identification and differential induction of ABCG transporter genes in wheat cultivars challenged by a deoxynivalenol-producing *Fusarium graminearum* strain." *Molecular Biology Reports* **41**(9): 6181-6194.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473-497.
- Naito, K., F. Taguchi, T. Suzuki, Y. Inagaki, K. Toyoda, T. Shiraishi & Y. Ichinose (2008). "Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**(9): 1165-1174.
- Nakagawa, T., T. Kurose, T. Hino, K. Tanaka, M. Kawamukai, Y. Niwa, K. Toyooka, K. Matsuoka, T. Jinbo & T. Kimura (2007). "Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation." *Journal of Bioscience and Bioengineering* **104**(1): 34-41.
- Naseem, M., M. Kaldorf & T. Dandekar (2015). "The nexus between growth and defence signalling: Auxin and cytokinin modulate plant immune response pathways." *Journal of Experimental Botany* **66**(16): 4885-96.
- Navarro, L., C. Zipfel, O. Rowland, I. Keller, S. Robatzek, T. Boller & J.D.G. Jones (2004). "The transcriptional innate immune response to flg22. Interplay and overlap with AVR gene-dependent defense responses and bacterial pathogenesis." *Plant Physiology* **135**(2): 1113-1128.
- Nawrath, C. (2006). "Unraveling the complex network of cuticular structure and function." *Current Opinion in Plant Biology* **9**(3): 281-287.
- Nawrath, C., L. Schreiber, R.B. Franke, N. Geldner, J.J. Reina-Pinto & L. Kunst (2013). "Apoplastic diffusion barriers in *Arabidopsis*." *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **11**: e0167.
- Negrel, J., F. Javelle & M. Paynot (1993). "Wound-induced tyramine hydroxycinnamoyl transferase in potato (*Solanum tuberosum*) tuber discs." *Journal of Plant Physiology* **142**(5): 518-524.
- Negrel, J., B. Pollet & C. Lapierre (1996). "Ether-linked ferulic acid amides in natural and wound periderms of potato tuber." *Phytochemistry* **43**(6): 1195-1199.

- Neubauer, J.D., E.C. Lulai, A.L. Thompson, J.C. Suttle, M.D. Bolton & L.G. Campbell (2013). "Molecular and cytological aspects of native periderm maturation in potato tubers." *Journal of Plant Physiology* **170**(4): 413-423.
- Newman, M.A., T. Sundelin, J.T. Nielsen & G. Erbs (2013). "Mamp (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants." *Front Plant Sci* **4**: 139.
- Newman, M.A., E. von Roepenack-Lahaye, A. Parr, M.J. Daniels & J.M. Dow (2002). "Prior exposure to lipopolysaccharide potentiates expression of plant defenses in response to bacteria." *Plant J* **29**(4): 487-495.
- Nicaise, V., M. Roux & C. Zipfel (2009). "Recent advances in pamp-triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm." *Plant Physiology* **150**(4): 1638-1647.
- Noritake, T., K. Kawakita & N. Doke (1996). "Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues." *Plant and Cell Physiology* **37**(1): 113-116.
- Nürnbergger, T. & V. Lipka (2005). "Non-host resistance in plants: New insights into an old phenomenon." *Molecular Plant Pathology* **6**(3): 335-345.
- Nürnbergger, T., D. Nennstiel, T. Jabs, W.R. Sacks, K. Hahlbrock & D. Scheel (1994). "High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses." *Cell* **78**(3): 449-460.
- Nürnbergger, T. & D. Scheel (2001). "Signal transmission in the plant immune response." *Trends in Plant Science* **6**(8): 372-379.
- O'Gara, E., K. Howard, I.J. Colquhoun, B. Dell, J. McComb & G.S.E.J. Hardy (2009). "The development and characteristics of periderm and rhytidome in *Eucalyptus marginata*." *Australian Journal of Botany* **57**(3): 221-228.
- Osbourn, A.E. (1996). "Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack." *The Plant Cell* **8**(10): 1821-1831.
- Panikashvili, D., S. Savaldi-Goldstein, T. Mandel, T. Yifhar, R.B. Franke, R. Höfer, L. Schreiber, J. Chory & A. Aharoni (2007). "The *Arabidopsis* Desperado/AtWBC11 transporter is required for cutin and wax secretion." *Plant Physiology* **145**(4): 1345-1360.
- Panikashvili, D., J.X. Shi, S. Bocobza, R.B. Franke, L. Schreiber & A. Aharoni (2010). "The *Arabidopsis* DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots." *Molecular Plant* **3**(3): 563-575.
- Panikashvili, D., J.X. Shi, L. Schreiber & A. Aharoni (2011). "The *Arabidopsis* ABCG13 transporter is required for flower cuticle secretion and patterning of the petal epidermis." *New Phytologist* **190**(1): 113-124.
- Parker, J. (1991). "An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f. Sp. Glycinea elicits phytoalexin synthesis in cultured parsley cells and protoplasts." *MPMI* **4**: 19-27.

- Percival, Karim & Dixon (1999). "Pathogen resistance in aerial tubers of potato cultivars." *Plant Pathology* **48**(6): 768-776.
- Petre, B. & S. Kamoun (2014). "How do filamentous pathogens deliver effector proteins into plant cells?" *PLoS Biology* **12**(2): e1001801.
- Pfaffl, M.W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Research* **29**(9): e45.
- Pighin, J.A., H. Zheng, L.J. Balakshin, I.P. Goodman, T.L. Western, R. Jetter, L. Kunst & A.L. Samuels (2004). "Plant cuticular lipid export requires an ABC transporter." *Science* **306**(5696): 702-704.
- Pollard, M., F. Beisson, Y. Li & J.B. Ohlrogge (2008). "Building lipid barriers: Biosynthesis of cutin and suberin." *Trends in Plant Science* **13**(5): 236-246.
- Prell, H.H. & P. Day (2001). "Plant-fungal pathogen interaction." Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York: ISBN 3-540-66727-X
- Qin, P., B. Tu, Y. Wang, L. Deng, T.D. Quilichini, T. Li, H. Wang, B. Ma & S. Li (2013). "ABCG15 encodes an ABC transporter protein, and is essential for post-meiotic anther and pollen exine development in rice." *Plant and Cell Physiology* **54**(1): 138-154.
- Qutob, D., B. Kemmerling, F. Brunner, I. K ufner, S. Engelhardt, A.A. Gust, B. Luberacki, H.U. Seitz, D. Stahl, T. Rauhut, E. Glawischnig, G. Schween, B. Lacombe, N. Watanabe, E. Lam, R. Schlichting, D. Scheel, K. Nau, G. Dodt, D. Hubert, M. Gijzen & T. N urnberger (2006). "Phytotoxicity and innate immune responses induced by NEP1-like proteins." *The Plant Cell* **18**(12): 3721-3744.
- Raftoyannis, Y. & M.W. Dick (2006). "Zoospore encystment and pathogenicity of phytophthora and pythium species on plant roots." *Microbiological Research* **161**(1): 1-8.
- Ranathunge, K. & L. Schreiber (2011). "Water and solute permeabilities of *Arabidopsis* roots in relation to the amount and composition of aliphatic suberin." *Journal of Experimental Botany* **62**(6): 1961-1974.
- Ranathunge, K., R.H. Thomas, X. Fang, C.A. Peterson, M. Gijzen & M.A. Bernards (2008). "Soybean root suberin and partial resistance to root rot caused by *Phytophthora sojae*." *Phytopathology* **98**(11): 1179-1189.
- Ranf, S., L. Eschen-Lippold, P. Pecher, J. Lee & D. Scheel (2011). "Interplay between calcium signalling and early signalling elements during defence responses to microbe- or damage-associated molecular patterns." *The Plant Journal* **68**(1): 100-113.
- Rea, P.A. (2007). "Plant ATP-binding cassette transporters." *Annual Review of Plant Biology* **58**(1): 347-375.
- Reeve, R.M., E. Hautala & M.L. Weaver (1969). "Anatomy and compositional variation within potatoes." *American Potato Journal* **46**(10): 361-373.

- Remaley, A.T., S. Rust, M. Rosier, C. Knapper, L. Naudin, C. Broccardo, K.M. Peterson, C. Koch, I. Arnould, C. Prades, N. Duverger, H. Funke, G. Assman, M. Dinger, M. Dean, G. Chimini, S. Santamarina-Fojo, D.S. Fredrickson, P. Deneffe & H.B. Brewer (1999). "Human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1): Genomic organization and identification of the genetic defect in the original tangier disease kindred." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**(22): 12685-12690.
- Remy, E. & P. Duque (2014). "Beyond cellular detoxification: A plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants." *Frontiers in Physiology* **5**: 201.
- Ren, J., L. Wen, X. Gao, C. Jin, Y. Xue & X. Yao (2009). "Dog 1.0: Illustrator of protein domain structures." *Cell Res* **19**(2): 271-273.
- Ridley, B.L., M.A. O'Neill & D. Mohnen (2001). "Pectins: Structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling." *Phytochemistry* **57**(6): 929-967.
- Riederer, M. (1991). "Die Kutikula als Barriere zwischen terrestrischen Pflanzen und der Atmosphäre." *Naturwissenschaften* **78**(5): 201-208.
- Riederer, M. & L. Schreiber (2001). "Protecting against water loss: Analysis of the barrier properties of plant cuticles." *Journal of Experimental Botany* **52**(363): 2023-2032.
- Robatzek, S., D. Chinchilla & T. Boller (2006). "Ligand-induced endocytosis of the pattern recognition receptor FLS2 in *Arabidopsis*." *Genes & Development* **20**(5): 537-542.
- Robert-Seilaniantz, A., L. Navarro, R. Bari & J.D.G. Jones (2007). "Pathological hormone imbalances." *Current Opinion in Plant Biology* **10**(4): 372-379.
- Rodriguez, M.C., M. Petersen & J. Mundy (2010). "Mitogen-activated protein kinase signaling in plants." *Annu Rev Plant Biol* **61**: 621-649.
- Romeis, T., A.A. Ludwig, R. Martin & J.D.G. Jones (2001). "Calcium-dependent protein kinases play an essential role in a plant defence response." *The EMBO Journal* **20**(20): 5556-5567.
- Roux, M., B. Schwessinger, C. Albrecht, D. Chinchilla, A. Jones, N. Holton, F.G. Malinovsky, M. Tör, S. de Vries & C. Zipfel (2011). "The *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases BAK1/SERK3 and BKK1/SERK4 are required for innate immunity to hemibiotrophic and biotrophic pathogens." *The Plant Cell* **23**(6): 2440-2455.
- Ruocco, M., P. Ambrosino, S. Lanzuise, S.L. Woo, M. Lorito & F. Scala (2011). "Four potato (*Solanum tuberosum*) ABCG transporters and their expression in response to abiotic factors and *Phytophthora infestans* infection." *Journal of Plant Physiology* **168**(18): 2225-2233.
- Ryan, C.A. & D.S. Moura (2002). "Systemic wound signaling in plants: A new perception." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(10): 6519-6520.
- Sachse, J. (1973). "Anthocyane in den Kartoffelsorten Urgenta und Desirée (*Solanum tuberosum* L.)." *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung* **153**(5): 294-300.

- Saitou, N. & M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees." *Molecular Biology and Evolution* **4**(4): 406-425.
- Sanabria, N.M., J.-C. Huang & I.A. Dubery (2010). "Self/nonsel perception in plants in innate immunity and defense." *Self Nonsel* **1**(1): 40-54.
- Sánchez-Fernández, R.o., T.G.E. Davies, J.O.D. Coleman & P.A. Rea (2001). "The arabidopsis thaliana ABC protein superfamily, a complete inventory." *Journal of Biological Chemistry* **276**(32): 30231-30244.
- Santos, S., V. Cabral & J. Graça (2013). "Cork suberin molecular structure: Stereochemistry of the c18 epoxy and vic-diol ω -hydroxyacids and α,ω -diacids analyzed by NMR." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(29): 7038-7047.
- Santos, S. & J. Graça (2006). "Glycerol- ω -hydroxyacid-ferulic acid oligomers in cork suberin structur." *Holzforchung* **60**: 171-177.
- Schiesel, S., M. Lammerhofer & W. Lindner (2010). "Quantitative LC-ESI-MS/MS metabolic profiling method for fatty acids and lipophilic metabolites in fermentation broths from beta-lactam antibiotics production." *Anal Bioanal Chem* **397**(1): 147-160.
- Schmelzer, E. (2002). "Cell polarization, a crucial process in fungal defence." *Trends in Plant Science* **7**(9): 411-415.
- Schmidt, A., R. Grimm, J. Schmidt, D. Scheel, D. Strack & S. Rosahl (1999). "Cloning and expression of a potato cDNA encoding hydroxycinnamoyl-coa:Tyraminen-(hydroxycinnamoyl)transferase." *Journal of Biological Chemistry* **274**(7): 4273-4280.
- Schmidt, H.W. & J. Schönherr (1982). "Fine structure of isolated and non-isolated potato tuber periderm." *Planta*: Vol. 154, No. 151 (1982), p. 1976-1980.
- Smit, A.L., A.G. Bengough, C. Engels, M. van Noordwijk, S. Pellerin, S.C. van de Geijn (2000). "Root methods: A handbook." Springer-Verlag Berlin Heideberg.
- Schornack, S., E. Huitema, L.M. Cano, T.O. Bozkurt, R. Oliva, M. Van Damme, S. Schwizer, S. Raffaele, A. Chaparro-Garcia, R. Farrer, M.E. Segretin, J. Bos, B.J. Haas, M.C. Zody, C. Nusbaum, J.O.E. Win, M. Thines & S. Kamoun (2009). "Ten things to know about oomycete effectors." *Molecular Plant Pathology* **10**(6): 795-803.
- Schornack, S., M. van Damme, T.O. Bozkurt, L.M. Cano, M. Smoker, M. Thines, E. Gaulin, S. Kamoun & E. Huitema (2010). "Ancient class of translocated oomycete effectors targets the host nucleus." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(40): 17421-17426.
- Schreiber, K. (1963). "Über die Alkaloidglykoside Knollen tragender *Solanum*-Arten *Solanum*-alkaloide. Xxvii. Mitteilung." *Die Kulturpflanze* **11**(1): 422-450.
- Schreiber, L. (2010). "Transport barriers made of cutin, suberin and associated waxes." *Trends in Plant Science* **15**(10): 546-553.
- Schreiber, L., R. Franke & K. Hartmann (2005). "Wax and suberin development of native and wound periderm of potato (*Solanum tuberosum* L.) and its relation to peridermal transpiration." *Planta* **220**(4): 520-530.

- Schulz, B. & H.U. Kolukisaoglu (2006). "Genomics of plant ABC transporters: The alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes?" *FEBS Lett* **580**(4): 1010-1016.
- Schulze, B., T. Mentzel, A.K. Jehle, K. Mueller, S. Beeler, T. Boller, G. Felix & D. Chinchilla (2010). "Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1." *J Biol Chem* **285**(13): 9444-9451.
- Schwessinger, B. & C. Zipfel (2008). "News from the frontline: Recent insights into pamp-triggered immunity in plants." *Curr Opin Plant Biol* **11**(4): 389-395.
- Selosse, M.A. & F. Le Tacon (1998). "The land flora: A phototroph-fungus partnership?" *Trends in Ecology & Evolution* **13**(1): 15-20.
- Serra, O., S. Chatterjee, M. Figueras, M. Molinas & R.E. Stark (2014). "Deconstructing a plant macromolecular assembly: Chemical architecture, molecular flexibility, and mechanical performance of natural and engineered potato suberins." *Biomacromolecules* **15**(3): 799-811.
- Serra, O., C. Hohn, R. Franke, S. Prat, M. Molinas & M. Figueras (2010). "A feruloyl transferase involved in the biosynthesis of suberin and suberin-associated wax is required for maturation and sealing properties of potato periderm." *The Plant Journal* **62**(2): 277-290.
- Serra, O., M. Soler, C. Hohn, R. Franke, L. Schreiber, S. Prat, M. Molinas & M. Figueras (2009a). "Silencing of StKCS6 in potato periderm leads to reduced chain lengths of suberin and wax compounds and increased peridermal transpiration." *Journal of Experimental Botany* **60**(2): 697-707.
- Serra, O., M. Soler, C. Hohn, V. Sauveplane, F. Pinot, R. Franke, L. Schreiber, S. Prat, M. Molinas & M. Figueras (2009b). "Cyp86a33-targeted gene silencing in potato tuber alters suberin composition, distorts suberin lamellae, and impairs the periderm's water barrier function." *Plant Physiology* **149**(2): 1050-1060.
- Shen, Q.-H. & P. Schulze-Lefert (2007). "Rumble in the nuclear jungle: Compartmentalization, trafficking, and nuclear action of plant immune receptors." *The EMBO Journal* **26**(20): 4293-4301.
- Shinya, T., K. Yamaguchi, Y. Desaki, K. Yamada, T. Narisawa, Y. Kobayashi, K. Maeda, M. Suzuki, T. Tanimoto, J. Takeda, M. Nakashima, R. Funama, M. Narusaka, Y. Narusaka, H. Kaku, T. Kawasaki & N. Shibuya (2014). "Selective regulation of the chitin-induced defense response by the arabidopsis receptor-like cytoplasmic kinase PBL27." *Plant J* **79**(1): 56-66.
- Shiono, K., M. Ando, S. Nishiuchi, H. Takahashi, K. Watanabe, M. Nakamura, Y. Matsuo, N. Yasuno, U. Yamanouchi, M. Fujimoto, H. Takanashi, K. Ranathunge, R. Franke, N. Shitan, N.K. Nishizawa, I. Takamura, M. Yano, N. Tsutsumi, L. Schreiber, K. Yazaki, M. Nakazono & K. Kato (2014). "RCN1/OSABCG5, an ATP-binding cassette (ABC) transporter, is required for hypodermal suberization of roots in rice (*Oryza Sativa*)." *The Plant Journal* **80**(1): n/a-n/a.

- Shoji, T. (2014). Chapter six - "ATP-binding cassette and multidrug and toxic compound extrusion transporters in plants: A common theme among diverse detoxification mechanisms." International review of cell and molecular biology. W.J. Kwang, Academic Press **309**: 303-346.
- Si-Ammour, A., B. Mauch-Mani & F. Mauch (2003). "Quantification of induced resistance against *Phytophthora* species expressing GFP as a vital marker: B-Aminobutyric acid but not BTH protects potato and *Arabidopsis* from infection." Molecular Plant Pathology **4**(4): 237-248.
- Soliday, C.L., B.B. Dean & P.E. Kolattukudy (1978). "Suberization: Inhibition by washing and stimulation by abscisic acid in potato disks and tissue culture." Plant Physiology **61**(2): 170-174.
- Stevenson WR, L. Rosemary, G.D. Franc & D.P. Weingartner (2001). "Compendium of potato diseases" 2nd edn. St Paul, MN, USA:APS Press. ISBN 978-0-89054-275-0 <http://www.apsnet.org/apsstore/shopapspress/Pages/42759.aspx>
- Strange, R.N. (2006). "Introduction to plant pathology." Wiley: 480. ISBN: 978-0-470-84972-9 <http://eu.wiley.com/WileyCDA/WileyTitle/productCd-047084972X.html>
- Stukkens, Y., A. Bultreys, S. Grec, T. Trombik, D. Vanham & M. Boutry (2005). "NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana glumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense." Plant Physiology **139**(1): 341-352.
- Sunseri, M., D. Johnson & N. Dasgupta (2002). "Survival of detached sporangia of *Phytophthora infestans* exposed to ambient, relatively dry atmospheric conditions." American Journal of Potato Research **79**(6): 443-450.
- Suttle, J.C., E.C. Lulai, L.L. Huckle & J.D. Neubauer (2013). "Wounding of potato tubers induces increases in aba biosynthesis and catabolism and alters expression of ABA metabolic genes." J Plant Physiol **170**(6): 560-566.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei & S. Kumar (2007). "Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0." Molecular Biology and Evolution **24**(8): 1596-1599.
- Thomas, R., X. Fang, K. Ranathunge, T.R. Anderson, C.A. Peterson & M.A. Bernards (2007). "Soybean root suberin: Anatomical distribution, chemical composition, and relationship to partial resistance to *Phytophthora sojae*." Plant Physiology **144**(1): 299-311.
- Thomma, B.P.H.J., T. Nürnberger & M.H.A.J. Joosten (2011). "Of pamps and effectors: The blurred PTI-ETI dichotomy." The Plant Cell **23**(1): 4-15.
- Tian, M., J. Win, J. Song, R. van der Hoorn, E. van der Knaap & S. Kamoun (2007). "A *Phytophthora infestans* cystatin-like protein targets a novel tomato papain-like apoplasmic protease." Plant Physiology **143**(1): 364-377.
- Tippett, J.T. & T.C. Hill (1984). "Role of periderm in resistance of *Eucalyptus marginata* roots against *Phytophthora cinnamomi*." European Journal of Forest Pathology **14**(7): 431-439.

- Torres, M.A. (2010). "ROS in biotic interactions." *Physiologia Plantarum* **138**(4): 414-429.
- Torres, M.A., J.D.G. Jones & J.L. Dangi (2006). "Reactive oxygen species signaling in response to pathogens." *Plant Physiology* **141**(2): 373-378.
- van den Ackerveken, G., E. Marois & U. Bonas (1996). "Recognition of the bacterial avirulence protein AvrBs3 occurs inside the host plant cell." *Cell* **87**: 1307-1316.
- van der Hoorn, R.A.L. & S. Kamoun (2008). "From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors." *The Plant Cell* **20**(8): 2009-2017.
- van der Lee, T., A. Robold, A. Testa, J.W. van 't Klooster & F. Govers (2001). "Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis." *Genetics* **157**(3): 949-956.
- Verrier, P.J., D. Bird, B. Burla, E. Dassa, C. Forestier, M. Geisler, M. Klein, Ü. Kolukisaoglu, Y. Lee, E. Martinoia, A. Murphy, P.A. Rea, L. Samuels, B. Schulz, E.P. Spalding, K. Yazaki & F.L. Theodoulou (2008). "Plant ABC proteins – a unified nomenclature and updated inventory." *Trends in Plant Science* **13**(4): 151-159.
- Vidhyasekaran, P. (2007). "Fungal pathogenesis in plants and crops." CRC Pres: 1-536.
- Vishwanath, S., C. Delude, F. Domergue & O. Rowland (2015). "Suberin: Biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier." *Plant Cell Reports* **34**(4): 573-586.
- Vogt, E., J. Schonherr & H.W. Schmidt (1983). "Water permeability of periderm membranes isolated enzymatically from potato tubers (*solanum tuberosum* l.)." *Planta* **158**(4): 294-301.
- Voigt, C.A. (2014). "Callose-mediated resistance to pathogenic intruders in plant defense-related papillae." *Frontiers in Plant Science* **5**: 168.
- Wang, B., J. Liu, Z. Tian, B. Song & C. Xie (2005). "Monitoring the expression patterns of potato genes associated with quantitative resistance to late blight during *Phytophthora infestans* infection using cDNA microarrays." *Plant Science* **169**(6): 1155-1167.
- Ward E.W.B & A. Stoessl (1977). "Phytoalexins from potatoes: Evidence for the conversion of lubimin to 15-dihydrolubimin by fungi." *Phytopathology* **67**: 468-471.
- Wawra, S., R. Belmonte, L. Löbach, M. Saraiva, A. Willems & P. van West (2012). "Secretion, delivery and function of oomycete effector proteins." *Current Opinion in Microbiology* **15**(6): 685-691.
- Wesley, S.V., C.A. Helliwell, N.A. Smith, M. Wang, D.T. Rouse, Q. Liu, P.S. Gooding, S.P. Singh, D. Abbott, P.A. Stoutjesdijk, S.P. Robinson, A.P. Gleave, A.G. Green & P.M. Waterhouse (2001). "Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants." *The Plant Journal* **27**(6): 581-590.
- Wigginton, M.J. (1974). "Effects of temperature, oxygen tension and relative humidity on the wound-healing process in the potato tuber." *Potato Research* **17**(2): 200-214.

- Willmann, R., H.M. Lajunen, G. Erbs, M.-A. Newman, D. Kolb, K. Tsuda, F. Katagiri, J. Fliegmann, J.-J. Bono, J.V. Cullimore, A.K. Jehle, F. Götz, A. Kulik, A. Molinaro, V. Lipka, A.A. Gust & T. Nürnberger (2011). "*Arabidopsis* lysin-motif proteins LYM1 LYM3 CERK1 mediate bacterial peptidoglycan sensing and immunity to bacterial infection." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**(49): 19824-19829.
- Wu, S., L. Shan & P. He (2014). "Microbial signature-triggered plant defense responses and early signaling mechanisms." *Plant Science* **228**: 118-126.
- Xu, X., et al (2011). "Genome sequence and analysis of the tuber crop potato." *Nature* **475**(7355): 189-195.
- Yadav, V., I. Molina, K. Ranathunge, I.Q. Castillo, S.J. Rothstein & J.W. Reed (2014). "ABCG transporters are required for suberin and pollen wall extracellular barriers in *Arabidopsis*." *The Plant Cell* **26**(9): 3569-3588.
- Yang, L., L. Qin, G. Liu, V.V. Peremyslov, V.V. Dolja & Y. Wei (2014). "Myosins XI modulate host cellular responses and penetration resistance to fungal pathogens." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**(38): 13996-14001.
- Yang, W., M. Pollard, Y. Li-Beisson, F. Beisson, M. Feig & J. Ohlrogge (2010). "A distinct type of glycerol-3-phosphate acyltransferase with sn-2 preference and phosphatase activity producing 2-monoacylglycerol." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(26): 12040-12045.
- Yang, W., J.P. Simpson, Y. Li-Beisson, F. Beisson, M. Pollard & J.B. Ohlrogge (2012). "A land-plant-specific glycerol-3-phosphate acyltransferase family in *Arabidopsis*: Substrate specificity, sn-2 preference, and evolution." *Plant Physiology* **160**(2): 638-652.
- Yeats, T.H., L.B.B. Martin, H.M.F. Viart, T. Isaacson, Y. He, L. Zhao, A.J. Matas, G.J. Buda, D.S. Domozych, M.H. Clausen & J.K.C. Rose (2012). "The identification of cutin synthase: Formation of the plant polyester cutin." *Nat Chem Biol* **8**(7): 609-611.
- Yoo, S.-D., Y.-H. Cho & J. Sheen (2007). "*Arabidopsis* mesophyll protoplasts: A versatile cell system for transient gene expression analysis." *Nat. Protocols* **2**(7): 1565-1572.
- Zimmermann, S., T. Nürnberger, J.-M. Frachisse, W. Wirtz, J. Guern, R. Hedrich & D. Scheel (1997). "Receptor-mediated activation of a plant Ca(2+)-permeable ion channel involved in pathogen defense." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(6): 2751-2755.
- Zipfel, C. & G. Felix (2005). "Plants and animals: A different taste for microbes?" *Current Opinion in Plant Biology* **8**(4): 353-360.
- Zipfel, C., G. Kunze, D. Chinchilla, A. Caniard, J.D.G. Jones, T. Boller & G. Felix (2006). "Perception of the bacterial pamp EF-TU by the receptor EFR restricts agrobacterium-mediated transformation." *Cell* **125**(4): 749-760.
- Zipfel, C., S. Robatzek, L. Navarro, E.J. Oakeley, J.D.G. Jones, G. Felix & T. Boller (2004). "Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception." *Nature* **428**(6984): 764-767.

7 ANHANG

7.1 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN PRIMER

| Primer Bezeichnung | Oligonukleotidsequenz in 5'→3' Orientierung | Anwendung | Fragmente (bp) | AT (°C) |
|---------------------------|---|---|----------------|---------|
| <i>StABCG1-fl-5</i> | ATGTCAAGGATAGTGGCGGAA | Klonierung mit C-terminaler Fusion | 2250 | 56 |
| <i>StABC-oSt-3</i> | CCTTCTCTTGTCTTACTTCCA | | | |
| <i>StABCG1-5-intern1</i> | GTCTGGTGGTGAAAGACGACGA | Sequenzierung/ Nachweis T-DNA Insertion in transgenen Pflanzen und Fragment in Kombination mit <i>StABC-oSt-3</i> und <i>StABCG1-fl-3</i> | 1492; 1495 | 62 |
| <i>StABCG1-5-intern2</i> | GTCACGGGGTTCATCCTAGCTA | | | |
| <i>StABCG1-fl-3</i> | TCACCTCCGCTTGTGTCTTGGCTTCC | | | |
| <i>StABCG1-3-intern-3</i> | GCTAGGGTTGTGGTGTGGT | Nachweis Fragment mit <i>StABCG1-fl-5</i> | 1217; 1438 | |
| Roche- <i>NOX#73-F</i> | TCAATGCATAGGTATGAAGGAATC | qPCR | | 50 |
| Roche- <i>NOX#73-R</i> | TCTCTTCTAGCTAGAGCATCAAAT | | | |
| Roche- <i>Pi#4-F</i> | CGTACGGCCAATGTAGTTCC | qPCR | | 50 |
| Roche- <i>Pi#4-R</i> | TTTGCACAGTATCACGCAAGT | | | |
| <i>StEF1a_RT_5</i> | CACTGCCCAGGTCATCATC | qRT-PCR | | 50 |
| <i>StEF1a_RT_3</i> | GTCGAGCACTGGTGCATATC | | | |
| <i>StABC_RT5-Roche</i> | ATCCTATCGCGATTGATGAAG | qRT-PCR | | 50 |
| <i>StABC_RT3-Roche</i> | GGTCGCGATCCTAGCCTATT | | | |

bp, Basenpaare; AT, *Annealing* Temperatur; F, *forward*; R, *reverse*; oSt, ohne Stop

7.2 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN SONDEN FÜR DIE QPCR-ANALYSEN

| Gen-bezeichnung | Sonden Nr./ ¹ (Katalog Nr) | <i>Forward</i> und <i>Reverse Primer</i> |
|-----------------|---------------------------------------|--|
| <i>StEF1α</i> | #162/(04694490001) | 5'-CACTGCCCAGGTCATCATC-3' 5'-GTCGAGCACTGGTGCATATC-3' |
| <i>StABCG1</i> | #35/(04687680001) | 5'-GGTCGCGATCCTAGCCTATT-3' 5'-ATCCTATCGCGATTGATGAAG-3' |
| <i>StNOX</i> | #73/(04688961001) | 5'-TCAATGCATAGGTATGAAGGAATC-3' 5'-TCTCTTCTAGCTAGAGCATCAAAT-3' |
| <i>Pi</i> | #4/(04685016001) | 5'-CGTACGGCCAATGTAGTTCC-3' 5'-TTTGCACAGTATCACGCAAGT-3' |

¹ ROCHE Universal ProbelLibrary (www.roche-applied-science.com)

7.3 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN RESTRIKTIONSENZYME

| Vektoren/Konstrukte | Anwendung | Restriktionsenzyme | Fragmente (bp) |
|--|--|--|-------------------------------------|
| pUBC-DEST- <i>ABCG1cRFP</i> | Lokalisation | <i>SmaI</i> <i>XbaI, HindIII</i> | ~2870, ~9240 ~8700, ~2580, ~ 820 |
| pCR8- <i>StABCG1</i> (ohne Spectomycin- Kassette, ohne Stop) | Klonierung in pUBC-DEST- RFP | <i>BglII, HindIII</i> | ~ 4200, ~910 |
| pGWB14- <i>StABCG1</i> - full lenght | Herstellung transgener Linien | <i>BglII, NdeI</i> <i>BglII, AvrII</i> <i>HindIII, BamHI</i> | ~1090 ~1480 ~1480, ~1622 |
| pGPTV- <i>Kan</i> | Sonde- Nachweis T- DNA Insertion | <i>BglII, BamHI</i> | ~800 |
| pCR2.1- <i>StABCG1</i> - full-lenght | Sonde- Nachweis T DNA-Insertion | <i>EcoRI</i> | ~1130, ~400, ~ 420, ~ 310, |

7.4 AKZESSIONSNUMMERN FÜR DIE STAMMBAUMANALYSE

Die Sequenzdaten für die Stammbaumanalyse sind der GenBank/EMBL Datenbank unter den folgenden Akzessionsnummern zu entnehmen:

St-*ABCG1*:XP_006345915, At-*ABCG1*: O80946.1, At-*ABCG2*: Q9ZUT0, At-*ABCG3*:Q9ZUU9, At-*ABCG4*: Q9SW08, At-*ABCG5*: Q9SIT6.1, At-*ABCG6*:Q9FNB5.1, At-*ABCG7*: Q9ZU35.1, At-*ABCG8*: Q9FLX5.1, At-*ABCG9*:Q9SZR9.2, At-*ABCG10*: Q9MAH4.1, At-*ABCG11*: Q8RXN0.1, At-*ABCG12*:Q9C8K2.1, At-*ABCG13*: Q9C8J8.1, At-*ABCG14*: Q9C6W5.1, At-*ABCG15*:Q8RWI9.2, At-*ABCG16*: Q9M2V7.2, At-*ABCG17*: Q9M2V6.1, At-*ABCG18*:Q9M2V5.1, At-*ABCG19*: Q9M3D6.1, At-*ABCG20*: Q9LFG8.1, At-*ABCG21*:Q7XA72.2, At-*ABCG22*: Q93YS4.1, At-*ABCG23*: Q3E9B8.1; At-*ABCG24*:Q9MAG3.2, At-*ABCG25*: Q84TH5.1, At-*ABCG26*: Q9LK50.2, At-*ABCG27*:Q9FT51.1, At-*ABCG28*: Q9FF46.1, At-*ABCG29*: Q94A18.2, At-*ABCG30*:Q8GZ52.2; At-*ABCG31*: Q7PC88.1, At-*ABCG32*: O81016.1, At-*ABCG* Q9ZUT8.1, At-*ABCG34*: Q7PC87.1, At-*ABCG35*: Q7PC86.1, At-*ABCG36*:Q9XIE2.1, At-*ABCG37*: Q9LFH0.1, At-*ABCG38*: Q7PC85.1, At-*ABCG39*:Q7PC84.1, At-*ABCG40*: Q9M9E1.1, At-*ABCG41*: Q7PC83.1, At-*ABCG42*:Q7PC82.1, und At-*ABCG43*: Q7PC81.

7.5 NUKLEOTIDSEQUENZ VON *ABCG1*

Die Sequenz wurde von der Genomsequenz von *Solanum tuberosum* L. Gruppe Phureja abgeleitet (Xu *et al.* 2011; XM_006345853.1, www.ncbi.nlm.nih.gov/). Das Intron von 97 bp kennzeichnet kursive und unterstrichene Buchstaben.

```
ATGTCAAGGATAGTAGCGGAAAATATGTTACAAGGGGGAGAAAATGTACAATTTTATGATCAAAGAGTACAACAA
GCCATGGAGATGTCACAAGCCAGCGCGTACTCTTACCCACCCTAGGCCAAATGCTAAAGCGCGTGGGAGACGTG
AGAAAAGAAGTCACCGGCGACGAAACTCCGGTGCACCGGATTCTCGATATGAGTGATACTCAAAGCATATCATCT
CACTCTCTTCCTTTTGTACTCTCCTTCAACAACCTCACCTACAGCGTAAAAGTCCGCCGAAAATGTCTTTTCCG
GCGATACTCCGGCAACCGGCCCGGAGTTTCCACCGGTGATCCCGTCGCCGGAGAAAATCTGTTTACGAACACA
AAATTCCTCCTGAACAATATCTCCGGTGAGGCCGGGACGGCGAGATAGTCGCCGTCTGGGTGCATCAGGGTCCG
```

GGGAAATCGACCCTGATCGATGCCCTCGCAAATAGGATCGCGAAGGAGAGTTTAAAAGGAACGATAACGTTGAAC
 GGAGAGCCACTCGATTGAGATTGTTGAAAGTAATCTCAGCATATGTAATGCAAGATGATCTTTTATATCCAATG
 TTGACAGTTGAAAGAAACGTTAATGTTTGCAGCTGAATTCAGATTGCCACGTAGTTTATCAAAATCAAAAAAGAAA
 ATGAGAGTTCAAGCTTTGATTGATCAATTAGGACTACGAAATGCTGCAAAAACAATCATTGGTGATGAGG**TAACG**
TTATATATACAGTATAATTTTTTATCGATGCCCTACAACTGATCATATTTTTTTTTTAACATTTAATAATAATTTA
CTATTTTGAACAACAGGTCATCGTGGAGTGTCTGGTGGTGAAAGACGACGAGTTTCTATTGGAATTGATATTAT
 TCATGACCCTATCATATTGTTTCTAGACGAACCAACCTCAGGCTTTGATTGACTAGTGCATACATGGTGGTGAA
 AGTTCTTCAACGAATTGCTCAAAGTGGAAGTATTGTGATCATGTCAATTCATCAGCCAAGTTATCGAATTCTCGG
 GTTATTGGATCGGATGCTCTTCTTGTCCCGTGGTCAAACGGTTTATAGCGGGTCACCTATGAACCTCCCACATTT
 TTTTTCTGATTTTGGTCAACCAATTCGGGATAGTGAAAATAGAACAGAGTTTGCCTCTGGATCTGATTCGCGA
 AGAAGGGTCCCCTGGAGGGACAAAAAGTTGGTTGAGTTCAACAAAACATGGGAAAATACGAAAAGGAGTAATGA
 AAATCCTGAAATCCAAACACCTACTCATGGATTGTCATTGAAAGAAGCGATTAGCGCGAGTATTTCAAGAGGGAA
 GTTGGTTTTCAGGGACAACGAGTGATATTCATACTAGTCCAGCATCAATGGTTCCAACCTTACGCGAATCCATTTG
 GATTGAAATGCTTGTGTTGTCCAAGAGATCATTACGAATTCCTGGAGGGTGCCAGAGTTATTTGGTATCCGTCT
 AGGGGCAATCGTGGTCACGGGGTTCATCCTAGCTACCATGTTTTGGCAACTTGATGATTTCCCCTAAAGGGGTTCA
 AGAAAGGCTTGGTTCTTTCATTTGCTATGTCAACAACCTTCTATACTTGC CGGACGCGTTGCCTGTGTTCT
 CCAAGAGAGGTACATTTTCATGAGGGAGACAGCTTATAATGCTTATAGGAGATCTTCTTATTGTCTATCTCATGC
 TATAGTTTCTTTGCCAGCATTGATCTTTCTTAGCTTTGCATTTGCTGCTATAACTTTTTGGGCTGTAGGCCCTTGT
 AGGTGGATTTTCGGGCTTTTTGTTCTATTTTCGCGATAAATACTAGCCTCCTTCTGGGCCGGAATTCATTTGTCAC
 GTTCTCTCCGGTGTAGTTTCTTAGTGTGATGTTAGGTTACACCATAGTGGTTCGCGATCCTAGCATATTTCTCCT
 CTTCTCAGGATTCTTCATCAATCGCGATAGGATTCCACCTTATTGGATATGGTTTCACTACCTATCTCTGGTGAA
 ATATCCTTATGAAGCTGTGTTACAAAAATGAATTTGATGATGCAACAAAGTGTGTTTGTCAAAGGGATTCAATTGTT
 TGATAATTCAACACTTGGAAATGTGCCTAATGCATTGAAGGAAAAATGTTGAGTACAATGAGTAACACATTTAA
 TGCAAAAATTACAAGTTCAACATGTGTGACTACTGGGGCTGATATATTGGTTCAACAAGGGATTACTGATTTAAG
 TAAGTGAATTTGTTGTGGATTACTATTGCATGGGGTTTTTCTTTAGGGTTTTGTTTTACTTTAGCTTGTGCT
 TGAAGTAAGAACAAGAGAAGGTGA

7.6 NUKLEOTIDSEQUENZ DES *ABCG1*-RNAI-FRAGMENTES (ALTMANN 2009)

Das Intron von 97 bp kennzeichnet kursive und unterstrichene Buchstaben.

TCGATTGAGATTGTTGAAAGTAATCTCAGCATATGTAATGCAAGATGATCTTTTATATCCAATGTTGACAGTTG
 AAGAAACGTTAATGTTTGCAGCTGAATTCAGATTGCCACGTAGTTTATCAAAATCAAAAAAGAAAATGAGAGTTC
 AAGCTTTGATTGATCAATTAGGACTACGAAATGCTGCAAAAACAATCATTGGTGATGAGG**TAACGTTATATATAC**
AGTATAATTTTTTATCGATGCCCTACAACTGATCATATTTTTTTTTTAACATTTAATAATAATTTACTATTTTGA
CAACAGGTCATCGTGGAGTGTCTGGTGGTGAAAGACGACGAGTTTCTATTGGAATTGATATTATTCATGACCCT
 ATCATATTGTTTCTAGACGAACCAACCTCAGGCTTTGATTGACTAGTGCATACATGGTGGTGAAAGTTCTTCAA
 CGAATTGCTCAAAGTGGAAGTATTGTGATCATGTCAATTCATCAGCCAAGTTATCGAAT

7.7 HOMOLOGIE DER NUKLEOTIDSEQUENZ DES *ABCG1*-RNAI-FRAGMENTS ZU *ABCG20*

Die Sequenzvergleiche wurden mittels der *Sol Genomics Network* Datenbank *Potato PGSC DM v3.4 CDS sequences* durchgeführt. Der Sequenzvergleich des *ABCG1*-RNAi-Fragments mit der Nukleotidsequenzdatenbank des Kartoffelgenoms, erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms *BLASTn* (*nucleotid to nucleotid database*). Dargestellt sind die Sequenzalignments mit den höchsten Identitäten zum *ABCG1*-RNAi-Fragment.

Im Nukleotidsequenzvergleich ist das RNAi-Fragment **(A)** mit *ABCG1* zu 100 % und **(B)** mit *ABCG20* zu 82 % identisch. Die in **(B)** markierten Nukleotide (Rot: *ABCG1*-RNAi-Fragment; Blau: *ABCG20*) weisen auf einen nacheinander folgenden Sequenzbereich von 39 Nukleotiden ohne *Mismatch*-Positionen.

(A) > PGSC0003DMT400060438 ATP-binding cassette transporter

Score = 819 bits (413), Expect = 0.0
Identities = 413/413 (100%), Frame = +1 / +1

```

ABCG1-RNAi: 1   tcgattcgagattggtgaaagtaatctcagcatatgtaatgcaagatgatcttttatatc 60
|
|
|
ABCG1:      458 tcgattcgagattggtgaaagtaatctcagcatatgtaatgcaagatgatcttttatatc 517

ABCG1-RNAi: 61   caatggtgacagttgaagaaacgttaatgttgacagctgaattcagattgccacgtagtt 120
|
|
|
ABCG1:      518   caatggtgacagttgaagaaacgttaatgttgacagctgaattcagattgccacgtagtt 577

ABCG1-RNAi: 121  tatcaaaatcaaaaaagaaaatgagagttcaagctttgattgatcaattaggactacgaa 180
|
|
|
ABCG1:      578  tatcaaaatcaaaaaagaaaatgagagttcaagctttgattgatcaattaggactacgaa 637

ABCG1-RNAi: 181  atgctgcaaaaacaatcattggtgatgagggatcatcgtggagtgtctggtggtgaaagac 240
|
|
|
ABCG1:      638  atgctgcaaaaacaatcattggtgatgagggatcatcgtggagtgtctggtggtgaaagac 697

ABCG1-RNAi: 241  gacgagtttctattggaattgatattattcatgaccctatcatattgtttctagacgaac 300
|
|
|
ABCG1:      698  gacgagtttctattggaattgatattattcatgaccctatcatattgtttctagacgaac 757

ABCG1-RNAi: 301  caacctcaggtccttgattcgactagtgcatacatggtggtgaaagttcttcaacgaattg 360
|
|
|
ABCG1:      758  caacctcaggtccttgattcgactagtgcatacatggtggtgaaagttcttcaacgaattg 817

ABCG1-RNAi: 361  ctcaaagtggaagtattgtgatcatgtcaattcatcagccaagttatcgaatt 413
|
|
|
ABCG1:      818  ctcaaagtggaagtattgtgatcatgtcaattcatcagccaagttatcgaatt 870

```

(B) > PGSC0003DMT400061466 ATP-binding cassette transporter

Score = 218 bits (110), Expect = 3e-56
 Identities = 320/390 (82%), Frame = +1 / +1

```

ABCG1-RNAi: 24 atctcagcatatgtaatgcaagatgatcttttatatccaatgttgacagttgaagaaacg 83
                |||
ABCG20:      532 atctcagcatatgttatgcaagatgatctttgttcccaatgttaacagttgaagaaaca 591

ABCG1-RNAi: 84 ttaatgtttgagctgaattcagattgccacgtagtttatcaaaatcaaaaagaaaatg 143
                |||
ABCG20:      592 ctcatgttctcagccgagtttcgtcttccaaggactttatctaagtccaagaagaatgct 651

ABCG1-RNAi: 144 agagttcaagctttgattgatcaattaggactacgaaatgctgcaaaaacaatcattggt 203
                |||
ABCG20:      652 agagttcaagcattgatcgatcaactaggccttagaaatgctgccaagacagtgattggt 711

ABCG1-RNAi: 204 gatgagggtcatcgaggagtgtctgggtgaaagacgacgagtttctattggaattgat 263
                |||
ABCG20:      712 gatgaaggccatagaggagtttctgggtggcgaagaaggcgtgttctattggtattgac 771

ABCG1-RNAi: 264 attattcatgaccctatcatattgttctagacgaaccaacctcaggtcttgattcgact 323
                |||
ABCG20:      772 ataattcatgaccctattgtcctgttcttgatgagccaacttcaggacttgattccact 831

ABCG1-RNAi: 324 agtgcatacatggtggtgaaagtcttcaacgaattgctcaaagtggaagtattgtgac 383
                |||
ABCG20:      832 agtgcatacatggtggtgaaagtcttgcgaagaatagcacaaagcggaagtattgtgac 891

ABCG1-RNAi: 384 atgtcaattcatcagccaagttatcgaaatt 413
                |||
ABCG20:      892 atgtcaattcatcagccaagttatagaatt 921
  
```

7.8 ANALYTISCHE DATEN DER MITTELS GC/EI-QMS IDENTIFIZIERTEN MONOMERE NACH TRIMETHYLSILYLIERUNG

Tabelle 7.1: Analytische Daten der 1-Trimethylsilyloxy-Alkane

| Analyt | Element-zusammen- setzung | Molekül- masse | Retentions- zeit [min] | Quantifier Ion m/z (rel. int.[%]) | Qualifier Ionen m/z (rel. int.[%]) | | MF ^a | Interner Standard zur Quanti- fizierung |
|--------|-------------------------------------|-------------------|---------------------------|---|---|---------|------------------|--|
| C15:0 | C ₁₈ H ₄₀ OSi | 300 | 10.78 | 285 (100) | 103 (17) | 75 (49) | 885 | Interner Standard |
| C16:0 | C ₁₉ H ₄₂ OSi | 314 | 11.87 | 299 (100) | 103 (25) | - | _b | Pentadecanol (1TMS) |
| C18:0 | C ₂₁ H ₄₆ OSi | 342 | 13.94 | 327 (100) | 103 (19) | 75 (51) | 925 | Pentadecanol (1TMS) |
| C20:0 | C ₂₃ H ₅₀ OSi | 370 | 15.89 | 355 (100) | 103 (21) | 75 (60) | 899 | Pentadecanol (1TMS) |
| C22:0 | C ₂₅ H ₅₄ OSi | 398 | 17.73 | 383 (100) | 103 (18) | 75 (40) | 910 | Pentadecanol (1TMS) |
| C24:0 | C ₂₇ H ₅₈ OSi | 426 | 19.37 | 411 (100) | 103 (22) | 75 (48) | 910 | Pentadecanol (1TMS) |
| C26:0 | C ₂₉ H ₆₂ OSi | 454 | 20.89 | 439 (100) | 103 (19) | 75 (40) | 942 | Pentadecanol (1TMS) |
| C28:0 | C ₃₁ H ₆₆ OSi | 482 | 22.35 | 467 (100) | 103 (14) | 75 (22) | 918 | Pentadecanol (1TMS) |
| C30:0 | C ₃₃ H ₇₀ OSi | 510 | 23.64 | 495 (100) | 103 (17) | - | 692 ^c | Pentadecanol (1TMS) |

^a *match factor* (MF) von NIST MS Search 2.0 unter Verwendung der NIST/EPA/NIH - Massenspektrometrische Bibliothek 2011

^b Co-Elution mit dem Hauptisomer von Methylferulat (1TMS);

^c Co-Elution mit Methyltricontanoat

Tabelle 7.2: Analytische Daten der α,ω -Dicarbonsäuredimethylester

| Analyt | Element- zusammen- setzung | Molekül- masse | Retentions- zeit [min] | Quantifier Ion m/z (rel. int.[%]) | Qualifier Ionen m/z (rel. int.[%]) | | MF ^a | Interner Standard zur Quanti- fizierung |
|---------------------|--|-------------------|---------------------------|---|---|----------|-----------------|--|
| C16:0 | C ₁₈ H ₃₄ O ₄ | 314 | 14.94 | 98 (87) | 283 (16) | 74 (100) | 823 | Methylhepta- decanoat |
| C18:1 Δ^9 | C ₂₀ H ₃₆ O ₄ | 340 | 16.64 | 276 (43) | 309 (21) | 340 (3) | _b,c | Methylhepta- decanoat |
| C20:0 | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | 370 | 18.64 | 98 (64) | 339 (17) | 74 (100) | 805 | Methylhepta- decanoat |
| C22:0 | C ₂₄ H ₄₆ O ₄ | 398 | 20.25 | 98 (64) | 367 (13) | 74 (100) | 882 | Methylhepta- decanoat |
| C24:0 | C ₂₆ H ₅₀ O ₄ | 426 | 21.77 | 98 (59) | 395 (12) | 74 (100) | _b | Methylhepta- decanoat |

^a *match factor* (MF) von NIST MS Search 2.0 unter Verwendung der NIST/EPA/NIH - Massenspektrometrische Bibliothek 2011

^b Spektren nicht in der NIST/EPA/NIH Massenspektrometrische Bibliothek 2011 enthalten

^c Referenzspektrum siehe (Kolattukudy & Agrawal 1974b)

Tabelle 7.3: Analytische Daten der Fettsäuremethylester

| Analyt | Element-zusammensetzung | Molekül-masse | Retentionszeit [min] | Quantifizier Ion <i>m/z</i> (rel. int.[%]) | Qualifizier Ionen <i>m/z</i> (rel. int.[%]) | | MF ^a | Interner Standard zur Quantifizierung |
|--------|--|---------------|----------------------|--|---|----------|-----------------|---------------------------------------|
| C17:0 | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 284 | 12.56 | 74 (100) | 87 (68) | 284 (8) | 908 | Interner Standard |
| C20:0 | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ | 326 | 15.64 | 74 (100) | 87 (71) | 326 (13) | 798 | Methylheptadecanoat |
| C22:0 | C ₂₃ H ₄₆ O ₂ | 354 | 17.54 | 74 (100) | 87 (72) | 354 (18) | 872 | Methylheptadecanoat |
| C24:0 | C ₂₅ H ₅₀ O ₂ | 382 | 19.23 | 74 (100) | 87 (74) | 382 (20) | 852 | Methylheptadecanoat |
| C26:0 | C ₂₇ H ₅₄ O ₂ | 410 | 20.80 | 74 (100) | 87 (73) | 410 (25) | 898 | Methylheptadecanoat |
| C28:0 | C ₂₉ H ₅₈ O ₂ | 438 | 22.28 | 74 (100) | 87 (79) | 438 (40) | 880 | Methylheptadecanoat |
| C30:0 | C ₃₁ H ₆₂ O ₂ | 466 | 23.62 | 74 (100) | 87 (82) | 466 (40) | 856 | Methylheptadecanoat |

^a *match factor* (MF) von NIST MS Search 2.0 unter Verwendung der NIST/EPA/NIH - Massenspektrometrische Bibliothek 2011

Tabelle 7.4: Analytische Daten der ω-Trimethylsilyloxy-Fettsäuremethylester

| Analyt | Element-zusammensetzung | Molekül-masse | Retentionszeit [min] | Quantifizier Ion <i>m/z</i> (rel. int.[%]) | Qualifizier Ionen <i>m/z</i> (rel. int.[%]) | | MF ^a | Interner Standard zur Quantifizierung |
|-------------------------|---|---------------|----------------------|--|---|----------|------------------|---------------------------------------|
| C15:0 | C ₁₉ H ₄₀ O ₃ Si | 344 | 14.23 | 297 (100) | 329 (43) | 146 (9) | - ^b | Interner Standard |
| C16:0 | C ₂₀ H ₄₂ O ₃ Si | 358 | 15.22 | 311 (100) | 343 (26) | 146 (10) | 860 | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C18:0 | C ₂₂ H ₄₆ O ₃ Si | 386 | 17.14 | 339 (100) | 371 (32) | 146 (13) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C18:1 Δ ₉ | C ₂₂ H ₄₄ O ₃ Si | 384 | 16.94 | 337 (52) | 369 (94) | 146 (14) | 824 ^c | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C20:0 | C ₂₄ H ₅₀ O ₃ Si | 414 | 18.80 | 367 (100) | 399 (55) | 146 (18) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C22:0 | C ₂₆ H ₅₄ O ₃ Si | 442 | 20.39 | 395 (100) | 427 (44) | 146 (24) | 801 | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C24:0 | C ₂₈ H ₅₈ O ₃ Si | 470 | 21.86 | 423 (100) | 455 (53) | 146 (24) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C26:0 | C ₃₀ H ₆₂ O ₃ Si | 498 | 23.24 | 451 (100) | 483 (63) | 146 (29) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C28:0 | C ₃₂ H ₆₆ O ₃ Si | 526 | 24.53 | 479 (100) | 511 (80) | 146 (36) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |
| C30:0 | C ₃₄ H ₇₀ O ₃ Si | 554 | 25.74 | 507 (100) | 539 (77) | 146 (25) | - ^b | Methyl-15-hydroxypentadecanoat (1TMS) |

^a *match factor* (MF) von NIST MS Search 2.0 unter Verwendung der NIST/EPA/NIH - Massenspektrometrische Bibliothek 2011

^b Spektren nicht in der NIST/EPA/NIH Massenspektrometrische Bibliothek 2011 enthalten

^c Referenzspektrum siehe (Brieskorn & Binnemann 1974)

Tabelle 7.5: Analytische Daten der Trimethylsilyloxy-Zimtsäuremethylester

| Analyt | Element-zusammen- setzung | Molekül- masse | Retentions- zeit [min] | Quantifier Ion m/z (rel. int.[%]) | Qualifier Ionen m/z (rel. int.[%]) | | MF ^a | Interner Standard zur Quanti- fizierung |
|--|---|-------------------|---------------------------|---|---|----------|-----------------|--|
| | | | | | | | | |
| Methyl coumarate (1TMS) ^b | C ₁₃ H ₁₈ O ₃ Si | 250 | 9.11 | 250 (100) | 235 (70) | 219 (40) | 642 | Methylhepta- decanoat |
| Methyl coumarate (1TMS) ^c | C ₁₃ H ₁₈ O ₃ Si | 250 | 10.13 | 250 (100) | 235 (70) | 219 (40) | 869 | Methylhepta- decanoat |
| Methyl ferulat (1TMS) ^b | C ₁₄ H ₂₀ O ₄ Si | 280 | 10.54 | 250 (100) | 280 (40) | 265 (16) | 870 | Methylhepta- decanoat |
| Methyl ferulate (1TMS) ^c | C ₁₄ H ₂₀ O ₄ Si | 280 | 11.92 | 250 (100) | 280 (40) | 265 (16) | 882 | Methylhepta- decanoat |

^a match factor (MF) von NIST MS Search 2.0 unter Verwendung der NIST/EPA/NIH - Massenspektrometrische Bibliothek 2011

^b Nebenisomer; ^c Hauptisomer

7.9 ANALYTISCHE DATEN DER MITTELS UPLC/ESI(-)-QTOFMS IDENTIFIZIERTEN MONOMERE

Tabelle 7.6: Analytische Daten der Feruloyloxyfettsäuren

| Analyt | Element- zusammen- setzung | Retentions- zeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|----------------------------|---------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen m/z | Fehler im ppm | mSigma ^a |
| C16:0 | C ₂₆ H ₄₀ O ₆ | 316 ^b | [M-H] ^{-c} | 447.2753 | 0.2 | 19 |
| C18:0 | C ₂₈ H ₄₄ O ₆ | 410 ^b | [M-H] ^{-c} | 475.3056 | 1.9 | 9.7 |
| C18:1 | C ₂₈ H ₄₂ O ₆ | 347 ^b | [M-H] ^{-c} | 473.2895 | 2.9 | 6.4 |
| C18:2 | C ₂₈ H ₄₀ O ₆ | 288 ^b | [M-H] ^{-c} | 471.2757 | 1.0 | 16 |
| C19:0 | C ₂₉ H ₄₆ O ₆ | 456 ^b | [M-H] ^{-c} | 489.3205 | 3.4 | 28 |
| C20:0 | C ₃₀ H ₄₈ O ₆ | 501 ^b | [M-H] ^{-c} | 503.3372 | 1.2 | 9.2 |
| C21:0 | C ₃₁ H ₅₀ O ₆ | 544 ^b | [M-H] ^{-c} | 517.3527 | 1.5 | 6.4 |
| C22:0 | C ₃₂ H ₅₂ O ₆ | 585 ^b | [M-H] ^{-c} | 531.3707 | 3.0 | 9.7 |
| C23:0 | C ₃₃ H ₅₄ O ₆ | 625 ^b | [M-H] ^{-c} | 545.3832 | 2.9 | 13 |
| C24:0 | C ₃₄ H ₅₆ O ₆ | 663 ^b | [M-H] ^{-c} | 559.3992 | 2.2 | 5.1 |
| C25:0 | C ₃₅ H ₅₈ O ₆ | 700 ^b | [M-H] ^{-c} | 573.4138 | 3.9 | 9.4 |
| C26:0 | C ₃₆ H ₆₀ O ₆ | 735 ^b | [M-H] ^{-c} | 587.4313 | 0.7 | 18 |
| C28:0 | C ₃₈ H ₆₄ O ₆ | 796 ^b | [M-H] ^{-c} | 615.4612 | 2.9 | 21 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Haupt (*E*)-Isomer, Neben (*Z*)-Isomer eluierte 16 s später, Isomerenverhältnis (*E*)/(*Z*) \approx 10:1

^c Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 30 eV bekannte Fragmentionen [M-H-CH₄O]⁻, [M-H-C₁₀H₈O₃]⁻, [C₁₀H₉O₄]⁻ (m/z 193) und [C₁₀H₇O₃]⁻ (m/z 175)

Tabelle 7.7: Analytische Daten der Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester

| Analyt | Element-zusammen- setzung | Retentions- zeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|----------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen <i>m/z</i> | Fehler im <i>ppm</i> | mSigma ^a |
| C16:0 | C ₂₉ H ₄₆ O ₈ | 246/257 ^b | [M-H] ^{-c} | 521.3106 | 2.7 | 11 |
| C18:0 | C ₃₁ H ₅₀ O ₈ | 339/350 ^b | [M-H] ^{-c} | 549.3433 | 0.0 | 4.2 |
| C18:1 | C ₃₁ H ₄₈ O ₈ | 280/290 ^b | [M-H] ^{-c} | 547.3277 | 0.1 | 4.2 |
| C18:2 | C ₃₁ H ₄₆ O ₈ | 225/233 ^b | [M-H] ^{-c} | 545.3119 | 0.2 | 11 |
| C19:0 | C ₃₂ H ₅₂ O ₈ | 385/397 ^b | [M-H] ^{-c} | 563.3576 | 2.4 | 21 |
| C20:0 | C ₃₃ H ₅₄ O ₈ | 431/443 ^b | [M-H] ^{-c} | 577.3750 | 0.7 | 6.3 |
| C21:0 | C ₃₄ H ₅₆ O ₈ | 476/488 ^b | [M-H] ^{-c} | 591.3894 | 1.4 | 1.9 |
| C22:0 | C ₃₅ H ₅₈ O ₈ | 519/531 ^b | [M-H] ^{-c} | 605.4058 | 0.2 | 2.0 |
| C23:0 | C ₃₆ H ₆₀ O ₈ | 561/573 ^b | [M-H] ^{-c} | 619.4206 | 1.5 | 4.1 |
| C24:0 | C ₃₇ H ₆₂ O ₈ | 601/614 ^b | [M-H] ^{-c} | 633.4355 | 2.7 | 4.4 |
| C25:0 | C ₃₈ H ₆₄ O ₈ | 641/653 ^b | [M-H] ^{-c} | 647.4517 | 1.8 | 8.0 |
| C26:0 | C ₃₉ H ₆₆ O ₈ | 679/690 ^b | [M-H] ^{-c} | 661.4672 | 2.0 | 3.0 |
| C28:0 | C ₄₁ H ₇₀ O ₈ | 747/759 ^b | [M-H] ^{-c} | 689.4998 | 0.0 | 36 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0)

^b wahrscheinlich Konstitutionsisomere mit verschiedenen Verbindungen zwischen Fettsäure und Glycerol, Isomerenverhältnis im Bereich von 3:1 bis 1:1

^c Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 30 eV bekannte Fragmentionen [M-H-CH₃]^{-*}, [M-H-C₃H₆O₂]⁻, [M-H-C₃H₈O₃]⁻, [M-H-C₃H₆O₂-C₁₀H₈O₃]⁻, [C₁₀H₉O₄]⁻ (*m/z* 193), [C₁₀H₇O₃]⁻ (*m/z* 175), siehe auch (Santos & Graça 2006)

Tabelle 7.8: Analytische Daten der Alkylferulate

| Analyt | Element-zusammen- setzung | Retentions- zeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|----------------------------|---------------------|------------------------|-------------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen <i>m/z</i> | Fehler im <i>ppm</i> | mSigma ^a |
| C16:0 | C ₂₆ H ₄₂ O ₄ | 612 ^b | [M-H] ^{-c} | 417.2988 | 5.3 | 6.5 |
| C18:0 | C ₂₈ H ₄₆ O ₄ | 695 ^b | [M-H] ^{-c} | 445.3306 | 3.9 | 4.8 |
| C19:0 | C ₂₉ H ₄₈ O ₄ | 732 ^b | [M-H] ^{-c} | 459.3462 | 3.9 | 4.1 |
| C20:0 | C ₃₀ H ₅₀ O ₄ | 767 ^b | [M-H] ^{-c} | 473.3618 | 3.9 | 4.4 |
| C21:0 | C ₃₁ H ₅₂ O ₄ | 800 ^b | [M-H] ^{-c} | 487.3773 | 4.1 | 1.3 |
| C22:0 | C ₃₂ H ₅₄ O ₄ | 832 ^b | [M-H] ^{-c} | 501.3925 | 4.8 | 1.0 |
| C23:0 | C ₃₃ H ₅₆ O ₄ | 859 ^b | [M-H] ^{-c} | 515.4094 | 2.3 | 9.7 |
| C24:0 | C ₃₄ H ₅₈ O ₄ | 886 ^b | [M-H] ^{-c} | 529.4250 | 2.3 | 3.9 |
| C25:0 | C ₃₅ H ₆₀ O ₄ | 910 ^b | [M-H] ^{-c} | 543.4404 | 2.7 | 14 |
| C26:0 | C ₃₆ H ₆₂ O ₄ | 930 ^b | [M-H] ^{-c} | 557.4558 | 3.1 | 11 |
| C27:0 | C ₃₇ H ₆₄ O ₄ | 952 ^b | [M-H] ^{-c} | 571.4722 | 1.7 | 29 |
| C28:0 | C ₃₈ H ₆₆ O ₄ | 973 ^b | [M-H] ^{-c} | 585.4867 | 3.6 | 4.1 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Haupt (*E*)-Isomer, Neben (*Z*)-Isomer eluierte 20 s später, Isomerenverhältnis (*E*)/(*Z*) im Bereich von 8:1 bis 12:1;

^c Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 30/40 eV bekannte Fragmentionen [M-H-CH₃]^{-*}, [C₉H₅O₄]⁻ (*m/z* 177) und [C₈H₅O₂]⁻ (*m/z* 133).

Tabelle 7.9: Analytische Daten der Hydroxyalkylferulate

| Analyt | Element-zusammensetzung | Retentionszeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen <i>m/z</i> | Fehler im <i>ppm</i> | mSigma ^a |
| C18:0 | C ₂₈ H ₄₆ O ₅ | 441 ^b | [M-H] ^{-c} | 461.3262 | 2.3 | 18 |
| C20:0 | C ₃₀ H ₅₀ O ₅ | 535 ^b | [M-H] ^{-c} | 489.3569 | 3.4 | 9.3 |
| C21:0 | C ₃₁ H ₅₂ O ₅ | 577 ^b | [M-H] ^{-c} | 503.3734 | 1.6 | 4.3 |
| C22:0 | C ₃₂ H ₅₄ O ₅ | 620 ^b | [M-H] ^{-c} | 517.3892 | 1.3 | 1.9 |
| C24:0 | C ₃₄ H ₅₈ O ₅ | 699 ^b | [M-H] ^{-c} | 545.4175 | 6.7 | 21 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Haupt (*E*)-Isomer, Neben (*Z*)-Isomer eluierte 20 s später, Isomerenverhältnis (*E*)/(*Z*) im Bereich von 10:1 bis 20:1

^c Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 40 eV bekannte Fragmentionen [M-H-CH₃]⁺, [C₉H₅O₄]⁻ (*m/z* 177) und [C₈H₅O₂]⁻ (*m/z* 133).

Tabelle 7.10: Analytische Daten der Feruloyloxyalkylferulate

| Analyt | Element-zusammensetzung | Retentionszeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen <i>m/z</i> | Fehler im <i>ppm</i> | mSigma ^a |
| C16:0 | C ₃₆ H ₅₀ O ₈ | 507 ^b | [M-H] ^{-c} | 609.3446 | 2.1 | 9.3 |
| C18:0 | C ₃₈ H ₅₄ O ₈ | 587 ^b | [M-H] ^{-c} | 637.3746 | 0.0 | 6.2 |
| C20:0 | C ₄₀ H ₅₈ O ₈ | 660 ^b | [M-H] ^{-c} | 665.4037 | 3.3 | 30 |
| C22:0 | C ₄₂ H ₆₂ O ₈ | 727 ^b | [M-H] ^{-c} | 693.4365 | 1.0 | 12 |
| C24:0 | C ₄₄ H ₆₆ O ₈ | 786 ^b | [M-H] ^{-c} | 721.4671 | 1.9 | 12 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Haupt (*E*)-Isomer, Neben (*Z*)-Isomer eluierte 18 s später, Isomerenverhältnis (*E*)/(*Z*) im Bereich von 10:1 bis 20:1;

^c Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 30 eV bekannte Fragmentionen [M-H-CH₃]⁺, [M-H-C₁₀H₈O₃]⁻, [M-H-C₁₀H₈O₃-CH₃]⁺, [M-H-C₁₀H₈O₃-CH₄O]⁻, [C₁₀H₉O₄]⁻ (*m/z* 193), [C₁₀H₇O₃]⁻ (*m/z* 175).

Tabelle 7.11: Analytische Daten der ω-Hydroxyfettsäuren

| Analyt | Element-zusammensetzung | Retentionszeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|--------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen <i>m/z</i> | Fehler im <i>ppm</i> | mSigma ^a |
| C20:0 | C ₂₀ H ₄₀ O ₃ | 326 | [M-H] ^{-b} | 327.2902 | 0.8 | 6.0 |
| C21:0 | C ₂₁ H ₄₂ O ₃ | 379 | [M-H] ^{-b} | 341.3075 | 4.0 | 8.7 |
| C22:0 | C ₂₂ H ₄₄ O ₃ | 430 | [M-H] ^{-b} | 355.3214 | 1.0 | 4.1 |
| C23:0 | C ₂₃ H ₄₆ O ₃ | 481 | [M-H] ^{-b} | 369.3372 | 0.6 | 2.7 |
| C24:0 | C ₂₄ H ₄₈ O ₃ | 529 | [M-H] ^{-b} | 383.3524 | 1.7 | 2.5 |
| C26:0 | C ₂₆ H ₅₂ O ₃ | 622 | [M-H] ^{-b} | 411.3837 | 1.6 | 8.5 |
| C28:0 | C ₂₈ H ₅₆ O ₃ | 707 | [M-H] ^{-b} | 439.4131 | 5.8 | 6.1 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0)

^b Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 20 eV bekannte Fragmentionen [M-H-H₂O]⁻, [M-H-HCOOH]⁻; Die im Handel erhältlichen Standards 15-Hydroxypentadecansäure und 16-Hydroxydecansäure zeigten vergleichbare CID Massenspektren.

Tabelle 7.12: Analytische Daten der α,ω -Dicarbonsäuren

| Analyt | Element-zusammensetzung | Retentionszeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------|--|--------------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen m/z | Fehler im ppm | mSigma ^a |
| C20:0 | C ₂₀ H ₃₈ O ₄ | 297 | [M-H] ^b | 341.2694 | 1.0 | 4.1 |
| C21:0 | C ₂₁ H ₄₀ O ₄ | 347 | [M-H] ^b | 355.2842 | 3.3 | 15 |
| C22:0 | C ₂₂ H ₄₂ O ₄ | 398 | [M-H] ^b | 369.3011 | 0.2 | 4.2 |
| C23:0 | C ₂₃ H ₄₄ O ₄ | 447 | [M-H] ^b | 383.3156 | 2.8 | 31 |
| C24:0 | C ₂₄ H ₄₆ O ₄ | 494 | [M-H] ^b | 397.3308 | 3.9 | 10 |
| C26:0 | C ₂₆ H ₅₀ O ₄ | 584 | [M-H] ^b | 425.3634 | 0.5 | 30 |
| C28:0 | C ₂₈ H ₅₄ O ₄ | 668 | [M-H] ^b | 453.3924 | 5.6 | 32 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ zeigt bei 20 eV bekannte Fragmentionen [M-H-H₂O]⁻, [M-H-CO₂]⁻, [M-H-H₂O-CO₂]⁻; Die im Handel erhältlichen Standards 15-Hydroxypentadecansäure und 16-Hydroxydekansäure zeigten gleiche CID Massenspektren.

Tabelle 7.13: Analytische Daten der Fettsäuren

| Analyt | Element-zusammensetzung | Retentionszeit [s] | Quantifier Ion | | | |
|--------------------|--|--------------------|--------------------|----------------|-----------------|---------------------|
| | | | Typ | gemessen m/z | Fehler im ppm | mSigma ^a |
| C16:0 ^c | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | 407 | [M-H] ^b | 255.2332 | 1.0 | 4.2 |
| C16:1 | C ₁₆ H ₃₀ O ₂ | 340 | [M-H] ^b | 253.2171 | 0.8 | 4.9 |
| C17:0 ^c | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 461 | [M-H] ^b | 269.2486 | 0.0 | 4.4 |
| C18:0 ^c | C ₁₈ H ₃₆ O ₂ | 513 | [M-H] ^b | 283.2641 | 0.5 | 6.1 |
| C18:1 | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | 439 | [M-H] ^b | 281.2483 | 1.1 | 5.6 |
| C18:2 | C ₁₈ H ₃₂ O ₂ | 371 | [M-H] ^b | 279.2333 | 1.3 | 2.0 |
| C18:3 | C ₁₈ H ₃₀ O ₂ | 312 | [M-H] ^b | 277.2170 | 1.1 | 10 |
| C19:0 ^c | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 563 | [M-H] ^b | 297.2789 | 3.4 | 7.7 |
| C20:0 ^c | C ₂₀ H ₄₀ O ₂ | 610 | [M-H] ^b | 311.2946 | 3.1 | 9.9 |
| C21:0 ^c | C ₂₁ H ₄₂ O ₂ | 657 | [M-H] ^b | 325.3108 | 1.2 | 7.9 |
| C22:0 ^c | C ₂₂ H ₄₄ O ₂ | 700 | [M-H] ^b | 339.3263 | 1.6 | 2.0 |
| C23:0 ^c | C ₂₃ H ₄₆ O ₂ | 739 | [M-H] ^b | 353.3411 | 4.0 | 2.4 |
| C24:0 ^c | C ₂₄ H ₄₈ O ₂ | 778 | [M-H] ^b | 367.3569 | 3.4 | 3.0 |
| C25:0 ^c | C ₂₅ H ₅₀ O ₂ | 813 | [M-H] ^b | 381.3721 | 4.5 | 8.0 |
| C26:0 ^c | C ₂₆ H ₅₂ O ₂ | 846 | [M-H] ^b | 395.3887 | 1.9 | 4.3 |
| C27:0 ^c | C ₂₇ H ₅₄ O ₂ | 875 | [M-H] ^b | 409.4039 | 3.0 | 10 |
| C28:0 ^c | C ₂₈ H ₅₆ O ₂ | 901 | [M-H] ^b | 423.4191 | 3.9 | 6.6 |
| C29:0 ^c | C ₂₉ H ₅₈ O ₂ | 925 | [M-H] ^b | 437.4349 | 3.5 | 13 |
| C30:0 ^c | C ₃₀ H ₆₀ O ₂ | 950 | [M-H] ^b | 451.4501 | 4.3 | 34 |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmustern (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0); ^b In Übereinstimmung mit der Literatur (Schiesel *et al.* 2010), zeigt das CID Massenspektrum von [M-H]⁻ in einem Kollisionsenergie-Bereich von 10 bis 40 eV keine bekannten Fragmentionen; ^c mit einer handelsüblichen Referenzverbindung identifiziert

Tabelle 7.14: Analytische Daten der aromatischen Aminosäuren, Phenylpropanoide, Anthocyane und Glycoalkaloide

| Analyt | Element-zusammen-setzung | Retentions-zeit [s] | Quantifizier Ion | | Fehler im gemessenen m/z | mSigma ^a | Beobachtete Fragmentationen über CID Vorläuferion@Kollisionsenergie: m/z (rel. int. [%], Elementarzusammensetzung) |
|---|---|---------------------|-------------------------------------|----------|--------------------------|---------------------|--|
| | | | Art | gemessen | | | |
| Phe ^c | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | 135 | [M+H] ⁺ | 166.0859 | 2.1 | 1.8 | 166@10eV : 166 (8, C ₈ H ₁₂ NO ₂ ⁺), 149 (3, C ₈ H ₆ O ₂ ⁺), 131 (5, C ₈ H ₇ O ⁺), 120 (100, C ₈ H ₁₀ N ⁺), 107 (1, C ₇ H ₇ O ⁺), 103 (3, C ₈ H ₇ ⁺) |
| Tyr ^c | C ₉ H ₉ NO ₃ | 79 | [M+H] ⁺ | 182.0804 | 4.1 | 5.1 | 182@10eV : 182 (9, C ₈ H ₁₂ NO ₃ ⁺), 165 (66, C ₉ H ₉ O ₃ ⁺), 147 (19, C ₉ H ₇ O ₂ ⁺), 136 (100, C ₉ H ₁₀ NO ⁺), 123 (26, C ₇ H ₇ O ₂ ⁺), 119 (12, C ₈ H ₇ O ⁺), 91 (2, C ₇ H ₇ ⁺) |
| Trp ^c | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | 175 | [M+H] ⁺ | 205.0970 | 0.9 | 2.2 | 205@10eV : 205 (2, C ₁₁ H ₁₃ N ₂ O ₂ ⁺), 188 (100, C ₁₁ H ₁₀ N ₂ O ₂ ⁺), 159 (4, C ₁₀ H ₁₁ N ₂ ⁺), 132 (2, C ₉ H ₉ N ₁₀ ⁺) |
| Kaffeesäure | C ₉ H ₈ O ₄ | 219 | [M+H] ⁺ | 181.0496 | 0.4 | 5.6 | 181@15eV : 163 (100, C ₉ H ₇ O ₂ ⁺), 145 (55, C ₉ H ₅ O ₂ ⁺), 135 (50, C ₉ H ₇ O ₂ ⁺), 117 (19, C ₈ H ₅ O ⁺), |
| Chlorogensäure | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 204/210 | [M+H] ⁺ | 355.1010 | 3.9 | 6.9 | 355@15eV : 337 (1, C ₁₆ H ₁₇ O ₈ ⁺), 181 (1, C ₉ H ₉ O ₄ ⁺), 163 (100, C ₉ H ₇ O ₃ ⁺), 145 (2, C ₉ H ₅ O ₂ ⁺) |
| Cinnamoyl Putrescine | C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O | 242 | [M+H] ⁺ | 219.1480 | 5.4 | 11.0 | 219@10eV : 219 (81, C ₁₃ H ₁₈ N ₂ O ⁺), 202 (100, C ₁₃ H ₁₆ NO ⁺), 131 (42, C ₉ H ₇ O ⁺) |
| Coumaroyl Putrescine | C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂ | 182 | [M+H] ⁺ | 235.1428 | 5.6 | 3.2 | 235@10eV : 235 (100, C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₂ ⁺), 218 (100, C ₁₃ H ₁₄ NO ₂ ⁺), 147 (97, C ₉ H ₇ O ₂ ⁺) |
| Caffeoyl Putrescine ^d | C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 163 | [M+H] ⁺ | 251.1397 | 2.6 | 2.5 | 251@15eV : 251 (4, C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₃ ⁺), 234 (13, C ₁₃ H ₁₆ NO ₃ ⁺), 163 (100, C ₉ H ₇ O ₃ ⁺), 145 (4, C ₉ H ₅ O ₂ ⁺), 135 (2, C ₈ H ₇ O ₂ ⁺) |
| Dihydrocaffeoyl Putrescine | C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₃ | 138 | [M+H] ⁺ | 253.1542 | 1.7 | 2.8 | 253@15eV : 253 (20, C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₃ ⁺), 236 (100, C ₁₃ H ₁₈ NO ₃ ⁺), 165 (20, C ₉ H ₉ O ₃ ⁺), 123 (7, C ₇ H ₇ O ₂ ⁺) |
| Feruloyl Putrescine ^d | C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃ | 197 | [M+H] ⁺ | 265.1546 | 0.4 | 1.5 | 265@15eV : 265 (3, C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃ ⁺), 248 (5, C ₁₄ H ₁₈ NO ₃ ⁺), 177 (100, C ₁₀ H ₉ O ₃ ⁺), 149 (1, C ₉ H ₉ O ₂ ⁺), 145 (9, C ₈ H ₅ O ₂ ⁺) |
| Dihydroferuloyl Putrescine | C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ | 174 | [M+H] ⁺ | 267.1695 | 3.2 | 1.8 | 267@15eV : 267 (29, C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃ ⁺), 250 (100, C ₁₄ H ₂₀ NO ₃ ⁺), 179 (15, C ₁₀ H ₁₁ O ₃ ⁺), 137 (15, C ₈ H ₉ O ₂ ⁺) |
| Vanilloyl Putrescin | C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃ | 153 | [M+H] ⁺ | 239.1390 | 0.2 | 5.0 | 239@15eV : 239 (5, C ₁₂ H ₁₆ N ₂ O ₃ ⁺), 222(30, C ₁₂ H ₁₆ NO ₃ ⁺), 151(100, C ₈ H ₇ O ₃ ⁺) |
| Feruloyl Tyramin (FT) ^d | C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ | 353 | [M+H] ⁺ | 314.1363 | 1.3 | 2.5 | 314@15eV : 314 (24, C ₁₈ H ₂₀ NO ₄ ⁺), 194 (2, C ₁₀ H ₁₂ NO ₃ ⁺), 177 (100, C ₁₀ H ₆ O ₃ ⁺), 145 (5, C ₁₀ H ₅ O ₂ ⁺), 121 (6, C ₉ H ₉ O ⁺) |
| Feruloyl Octopamin (FO) ^d | C ₁₈ H ₁₉ NO ₅ | 290 | [M+H-H ₂ O] ⁺ | 312.1212 | 5.8 | 6.7 | 312@15eV : 312 (6, C ₁₈ H ₁₉ NO ₄ ⁺), 177 (100, C ₁₀ H ₉ O ₃ ⁺), 145 (5, C ₁₀ H ₉ O ₂ ⁺) |
| FT-FT Dehydrodimer ^d | C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₈ | 458 | [M+H] ⁺ | 625.2531 | 2.2 | 5.7 | 625@15eV : 625 (99, C ₃₆ H ₃₇ N ₂ O ₈ ⁺), 488 (21, C ₂₈ H ₂₈ NO ₇ ⁺), 462 (100, C ₂₇ H ₂₈ NO ₆ ⁺), 351 (17, C ₂₀ H ₁₅ O ₆ ⁺), 325 (45, C ₁₉ H ₁₇ O ₅ ⁺), 299 (2, C ₁₈ H ₁₉ O ₄ ⁺) |
| FT-FO Dehydrodimer ^d | C ₃₆ H ₃₆ N ₂ O ₉ | 407 | [M+H] ⁺ | 641.2598 | 0.7 | . ^b | 641@15eV : 623 (28, C ₃₆ H ₃₅ N ₂ O ₉ ⁺), 517 (3, C ₂₉ H ₂₉ N ₂ O ₇ ⁺), 488 (26, C ₂₈ H ₂₈ NO ₇ ⁺), 466 (33, C ₂₈ H ₂₄ NO ₇ ⁺), 462 (100, C ₂₇ H ₂₈ NO ₆ ⁺), 460 (33, C ₂₇ H ₂₈ NO ₆ ⁺), 380 (5, C ₂₁ H ₁₈ NO ₆ ⁺), 351 (58, C ₂₀ H ₁₅ O ₆ ⁺), 325 (97, C ₁₉ H ₁₇ O ₅ ⁺) |
| Pelargonidin-3-(Coumaroyl-Rha-Glc)-5-Glc ^{c,f} | C ₆₂ H ₄₇ O ₂₁ ⁺ | 272 | [M] ⁺ | 887.2567 | 4.2 | 9.0 | 887@40eV : 887 (1), 725 (12, C ₃₈ H ₃₇ O ₁₆ ⁺), 433 (61, C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁺), 271 (100, C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁺) |
| Pelargonidin-3-(Feruloyl-Rha-Glc)-5-Glc ^{c,f} | C ₆₃ H ₄₉ O ₂₂ ⁺ | 277 | [M] ⁺ | 917.2659 | 5.5 | 7.5 | 917@40eV : 917 (1), 755 (10, C ₃₇ H ₃₉ O ₁₇ ⁺), 433 (70, C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁺), 271 (100, C ₁₅ H ₁₁ O ₅ ⁺) |
| α-Solanin | C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅ | 358 | [M+H] ⁺ | 868.5041 | 1.4 | 4.7 | in-source CID : 868 (73), 850 (1, C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄ ⁺), 722 (5, C ₃₈ H ₆₄ NO ₁₁ ⁺), 706 (1, C ₃₈ H ₆₄ NO ₁₀ ⁺), 560 (47, C ₃₃ H ₅₄ NO ₆ ⁺), 446 (100, C ₄₄ H ₇₄ NO ₁₄ Na ²⁺), 398 (67, C ₂₇ H ₄₄ NO ⁺), 309 (29, C ₁₂ H ₂₇ O ₉ ⁺) |
| α-Chaconin | C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄ | 361 | [M+H] ⁺ | 852.5112 | 1.0 | 6.1 | in-source CID : 852 (100), 706 (67, C ₃₈ H ₆₄ NO ₁₀ ⁺), 560 (41, C ₃₃ H ₅₄ NO ₆ ⁺), 438 (29, C ₁₆ H ₁₇ NO ₁₄ Na ²⁺), 398 (11, C ₂₇ H ₄₄ NO ⁺) |

^a Maß für die Übereinstimmung von berechneten und gemessenen Isotopenmuster (Bruker Daltonics, Data Analysis 4.0);

^b Interferenz durch co-eluierte Verbindungen; ^c mit einer handelsüblichen Referenzverbindung identifiziert; ^d (Serra *et al.* 2010)^e (Sachse 1973)^f (Lewis *et al.* 1998); Phe: Phenylalanin; Tyr: Tyrosin; Trp: Tryptophan; Rha: Rhamnose; Glc: Glucose

7.10 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER MITTELS UPLC/ESI(-)-QTOFMS IDENTIFIZIERTEN APOLAREN MONOMERE

Methyl *tert*-butyl Ether Periderm-Extrakte wurden mittels UPLC/PDA/ESI(-)-QTOFMS analysiert. Die Monomere wurden über QuantifierIon/QualifierIon/Retentionszeit der Tabellen 7.6 bis 7.13 identifiziert. Die resultierenden Peakflächen wurden auf das Frischgewicht (FG) normalisiert und \log_2 transformiert. Die angezeigten Werte repräsentieren den Median \pm Standardabweichung. Die Sternchen kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen *ABCG*-RNAi und Kontrollen (Student's t-Test (*two-tailed*, ungleiche Varianzen): * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$).

(A) *ABCG*-RNAi [Linie N (n=8), Linie P (n=8), Linie B (n=8), Linie F (n=8)] und Kontrollen [WT (n=8), EV (n=8)]

(B) 35S-*ABCG1* [Linie A (n=8), Linie J (n=8), Linie S (n=8)] und Kontrollen [WT (n=8), EV (n=8)]

A

| Verbindungsklasse / Median \pm Standardabweichung | | | | | | | | | | | | |
|---|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------------------|--|--|--|--|
| Kettenlänge | Feruloyloxyalkyl-ferulates | | ω -Hydroxy-fettsäuren | | α,ω -Dicarbonsäuren | | Fettsäuren | | | | | |
| | Kontrollen | ABCG-RNAi | Kontrollen | ABCG-RNAi | Kontrollen | ABCG-RNAi | Kontrollen | ABCG-RNAi | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |
| C16:0 | 11.6 \pm 0.5 | 12.3 \pm 2.4 | - | - | - | - | 11.4 \pm 0.3 | 12.6 \pm 0.7 ^{***} | | | | |
| C16:1 | - | - | - | - | - | - | 4.9 \pm 1.2 | 9.2 \pm 1.0 ^{***} | | | | |
| C17:0 | - | - | - | - | - | - | 5.7 \pm 1.0 | 9.9 \pm 1.0 ^{***} | | | | |
| C18:0 | 8.4 \pm 0.2 | 12.3 \pm 0.8 ^{***} | - | - | - | - | 11.4 \pm 0.2 | 13.4 \pm 0.5 ^{***} | | | | |
| C18:1 | - | - | - | - | - | - | 9.3 \pm 0.5 | 14.0 \pm 1.0 ^{***} | | | | |
| C18:2 | - | - | - | - | - | - | 12.7 \pm 0.3 | 12.8 \pm 0.5 | | | | |
| C18:3 | - | - | - | - | - | - | 10.1 \pm 0.2 | 10.5 \pm 0.6 ^{***} | | | | |
| C19:0 | - | - | - | - | - | - | 4.8 \pm 0.5 | 8.8 \pm 0.7 ^{***} | | | | |
| C20:0 | 8.0 \pm 0.9 | 12.1 \pm 0.3 ^{***} | - | 11.3 \pm 1.1 | - | 10.7 \pm 1.5 | 8.0 \pm 0.3 | 11.9 \pm 0.4 ^{***} | | | | |
| C21:0 | - | - | - | 8.2 \pm 1.0 | - | 7.6 \pm 1.1 | 5.8 \pm 0.5 | 9.5 \pm 0.5 ^{***} | | | | |
| C22:0 | 10.7 \pm 0.3 | 12.9 \pm 0.1 ^{***} | 7.2 \pm 0.3 | 13.0 \pm 0.7 ^{***} | 5.2 \pm 0.4 | 11.7 \pm 1.3 ^{***} | 9.4 \pm 0.5 | 11.3 \pm 0.3 ^{***} | | | | |
| C23:0 | - | - | - | 9.0 \pm 0.8 | - | 7.9 \pm 1.0 | 6.8 \pm 0.5 | 10.01 \pm 0.2 ^{***} | | | | |
| C24:0 | 7.7 \pm 0.6 | 10.6 \pm 0.4 ^{***} | 8.7 \pm 0.2 | 12.3 \pm 0.5 ^{***} | 6.6 \pm 0.3 | 11.5 \pm 0.8 ^{***} | 11.1 \pm 0.2 | 12.1 \pm 0.1 ^{***} | | | | |
| C25:0 | - | - | - | - | - | - | 8.9 \pm 0.3 | 11.1 \pm 0.2 ^{***} | | | | |
| C26:0 | - | - | 9.1 \pm 0.2 | 10.7 \pm 0.5 ^{***} | 6.8 \pm 0.3 | 9.2 \pm 0.6 ^{***} | 12.5 \pm 0.1 | 12.9 \pm 0.5 | | | | |
| C27:0 | - | - | - | - | - | - | 9.9 \pm 0.2 | 10.7 \pm 1.2 | | | | |
| C28:0 | - | - | 8.9 \pm 0.5 | 9.1 \pm 0.8 | 7.6 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.9 [*] | 13.9 \pm 0.1 | 13.5 \pm 1.4 ^{***} | | | | |
| C29:0 | - | - | - | - | - | - | 12.8 \pm 0.1 | 10.7 \pm 1.3 ^{***} | | | | |
| C30:0 | - | - | - | - | - | - | 11.7 \pm 0.1 | 10.1 \pm 0.7 ^{***} | | | | |

B

| Chain Length | Verbindungsklasse / Median \pm Standardabweichung | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|------------------|------------------------------|-----------------|----------------------------------|----------------|----------------|------------------|--|--|--|--|
| | Feruloyloxyalkyl-ferulates | | ω -Hydroxy-fettsäuren | | α, ω -Dicarbonsäuren | | Fettsäuren | | | | | |
| | Kontrollen | 35S-ABCG1 | Kontrollen | 35S-ABCG1 | Kontrollen | 35S-ABCG1 | Kontrollen | 35S-ABCG1 | | | | |
| C16:0 | 11.6 \pm 0.5 | 12.8 \pm 1.7 | - | - | - | - | 11.4 \pm 0.3 | 11.7 \pm 0.4* | | | | |
| C16:1 | - | - | - | - | - | - | 4.9 \pm 1.2 | 5.8 \pm 1.7 | | | | |
| C17:0 | - | - | - | - | - | - | 5.7 \pm 1.0 | 6.5 \pm 1.0* | | | | |
| C18:0 | 8.4 \pm 0.2 | 10.8 \pm 2.6** | - | - | - | - | 11.4 \pm 0.2 | 11.7 \pm 0.6* | | | | |
| C18:1 | - | - | - | - | - | - | 9.3 \pm 0.5 | 9.8 \pm 0.5* | | | | |
| C18:2 | - | - | - | - | - | - | 12.7 \pm 0.3 | 12.7 \pm 0.3 | | | | |
| C18:3 | - | - | - | - | - | - | 10.1 \pm 0.2 | 10.2 \pm 0.6 | | | | |
| C19:0 | - | - | - | - | - | - | 4.8 \pm 0.5 | 5.2 \pm 0.8** | | | | |
| C20:0 | 8.0 \pm 0.9 | 9.3 \pm 1.8* | - | - | - | - | 8.0 \pm 0.3 | 8.7 \pm 0.7*** | | | | |
| C21:0 | - | - | - | - | - | - | 5.8 \pm 0.5 | 6.8 \pm 1.4*** | | | | |
| C22:0 | 10.7 \pm 0.3 | 11.1 \pm 0.8** | 7.2 \pm 0.3 | 7.5 \pm 0.8* | 5.2 \pm 0.4 | 5.9 \pm 1.5 | 9.4 \pm 0.5 | 10.0 \pm 0.8** | | | | |
| C23:0 | - | - | - | - | - | - | 6.8 \pm 0.6 | 7.8 \pm 1.1*** | | | | |
| C24:0 | 7.7 \pm 0.6 | 8.5 \pm 1.3** | 8.7 \pm 0.2 | 9.0 \pm 0.8** | 6.6 \pm 0.3 | 7.0 \pm 1.3* | 11.1 \pm 0.2 | 11.6 \pm 0.6** | | | | |
| C25:0 | - | - | - | - | - | - | 8.9 \pm 0.3 | 9.7 \pm 1.0*** | | | | |
| C26:0 | - | - | 9.1 \pm 0.2 | 9.4 \pm 0.8* | 6.8 \pm 0.3 | 7.3 \pm 1.2* | 12.5 \pm 0.1 | 12.8 \pm 0.4** | | | | |
| C27:0 | - | - | - | - | - | - | 9.9 \pm 0.2 | 10.5 \pm 0.9** | | | | |
| C28:0 | - | - | 8.9 \pm 0.5 | 9.2 \pm 0.7 | 7.6 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.9* | 13.9 \pm 0.1 | 13.9 \pm 0.1 | | | | |
| C29:0 | - | - | - | - | - | - | 12.8 \pm 0.1 | 12.6 \pm 0.4** | | | | |
| C30:0 | - | - | - | - | - | - | 11.7 \pm 0.1 | 11.3 \pm 0.9** | | | | |

7.11 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER MITTELS UPLC/ESI(-)-QTOFMS IDENTIFIZIERTEN SEMIPOLAREN MONOMERE IM KNOLLENPERIDERM DER 35S-*ABCG1*-LINIEN

Aus dem Periderm von Kontroll- (WT+EV: n=16) und 35S-*ABCG1* -Knollen (Linien A, J, S; gesamt n= 24) wurden methanolische Extrakte hergestellt und die semipolaren Verbindungen mittels UPLC/PDA/ESI(+)-QTOF-MS analysiert. Die Monomere wurden über QuantifierIon/QualifierIon/ Retentionszeit identifiziert (s. Anhang 7.9, Tabelle 7.14), die resultierenden Peakflächen auf Frischgewicht normalisiert und \log_2 transformiert. Dargestellt ist der Median der Daten von zwei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichung. Die Sternchen zeigen die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollen und 35S-*ABCG1* (Student'scher t-Test, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$). n.d.: nicht detektierbar. Phe: Phenylalanin; Tyr: Tyrosin; Trp: Tryptophan; Rha: Rhamnose; Glc: Glucose

Tabelle 7.16: Relative Quantifizierung der aromatischen Aminosäuren, Phenole, Anthocyane und Glykoalkaloide in semipolaren Peridermextrakten von 35S-*ABCG1* - und Kontrollknollen.

| Verbindung | $\log_2(\text{Peakfläche/ Frischgewicht})$ Median \pm Standardabweichung | |
|--|---|-------------------|
| | Kontrollen | 35S- <i>ABCG1</i> |
| Phe | 11.9 \pm 0.5 | 10.5 \pm 1.3** |
| Tyr | 12.5 \pm 0.4 | 12.2 \pm 1.0 |
| Trp | 11.8 \pm 0.4 | 11.5 \pm 0.9 |
| Kaffeesäure | 9.6 \pm 0.9 | 10.8 \pm 0.7** |
| Chlorogensäure | 14.2 \pm 0.3 | 14.1 \pm 0.4 |
| Cinnamoylputrescin | n.d. | n.d. |
| Coumaroylputrescin | n.d. | n.d. |
| Caffeoylputrescin | 7.4 \pm 0.5 | 12.1 \pm 0.5** |
| Dihydrocaffeoylputrescin | 7.0 \pm 0.7 | 12.4 \pm 2.9** |
| Feruloylputrescin | 9.8 \pm 0.6 | 11.7 \pm 1.4** |
| Dihydroferuloylputrescin | 9.7 \pm 0.6 | 10.5 \pm 0.7** |
| Vanilloylputrescin | 7.7 \pm 0.3 | 8.0 \pm 0.2 |
| Feruloyltyramin (FT) | 9.1 \pm 0.5 | 9.9 \pm 0.9 |
| Feruloyloctopamin (FO) | 9.0 \pm 1.1 | 9.9 \pm 1.5 |
| FT-FT-Dehydrodimer | 5.4 \pm 0.8 | 6.6 \pm 1.5* |
| FT-FO-Dehydrodimer | n.d. | n.d. |
| Pelargonidin-3-(Coumaroyl-Rha-Glc)-5-Glc | 11.3 \pm 0.9 | 10.9 \pm 0.9 |
| Pelargonidin-3-(Feruloyl-Rha-Glc)-5-Glc | 9.7 \pm 0.7 | 9.6 \pm 0.6 |
| α -Chaconin | 13.6 \pm 0.3 | 13.5 \pm 0.4 |
| α -Solanin | 10.6 \pm 0.4 | 10.4 \pm 0.4 |

7.12 MOLEKULARE STRUKTUREN MÖGLICHER FERULASÄUREKONJUGATE

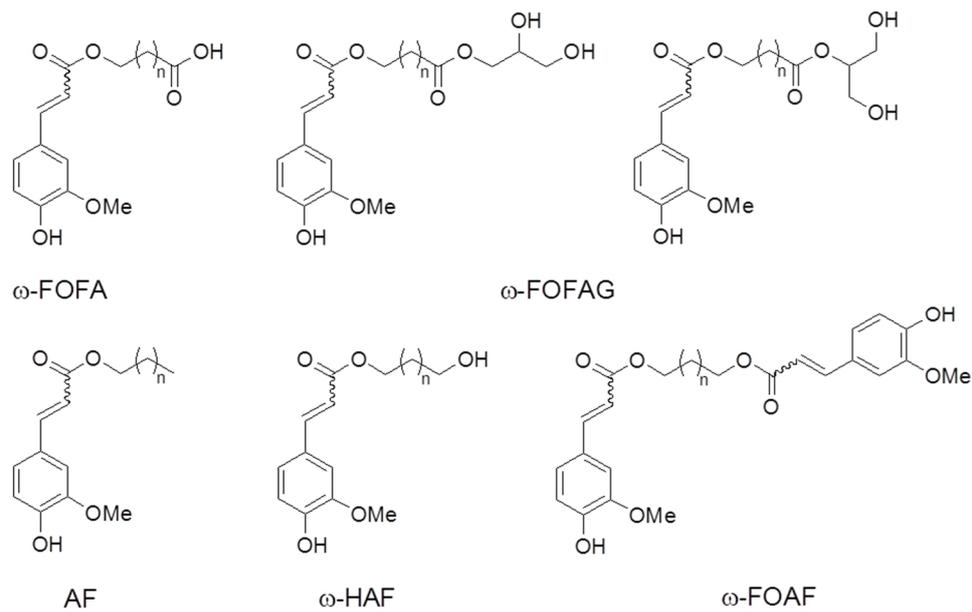


Abbildung 7.1: Molekulare Struktur detektierter Ferulasäurekonjugate in den apolaren Peridermextrakten der *ABCG-RNAi*-Linien.

ω-FOFA, ω-Feruloyloxyfettsäuren, ω-FOFAG, ω-Feruloyloxyfettsäure-Glycerolester; AF, Alkylferulate; ω-HAF, ω-Hydroxyalkylferulate; ω-FOAF, ω-Feruloyloxyalkylferulate.

7.13 KNOLLENPHÄNOTYP IN GEWEBEKULTUR

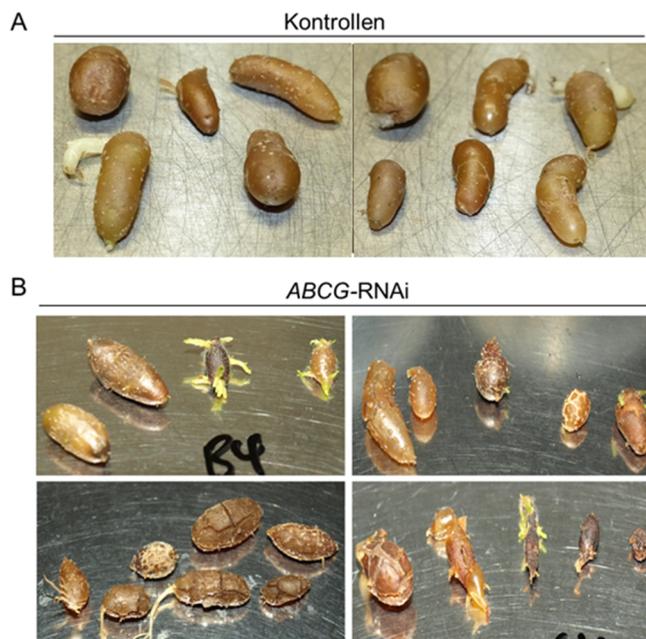


Abbildung 7.2: Repräsentative Knollen von ca. drei Monate alten *in vitro* gewachsenen Gewebekulturpflanzen. (A) Knollenphänotyp von Kontrollpflanzen (WT, EV) und (B) *ABCG-RNAi*-Pflanzen (Linie: B4, K2, A3 und G4).

7.14 BLATTINFEKTION VON *ABCG*-RNAI-LINIEN IM VERGLEICH ZU DEN KONTROLLPFLANZEN

Blattläsionen in Aufsicht und im Querschnitt bei Kontroll- (**A+B**) und *ABCG*-RNAi-Pflanzen (**C+D**). **A+C**: repräsentative Infektionsstellen vier Tage nach Inokulation mit *P. infestans* (1.000 Sporen pro Infektionsstelle; 2 unabh. Exp.). Unterschiede im Blattgrün sind auf verschiedene Belichtungszeiten zurückzuführen. **B+D**: repräsentative Blattquerschnitte von Infektionsstellen vier Tage nach Inokulation, welche jeweils den Übergang vom infiziertem zum gesunden Gewebe zeigen. Maßstabbalken der Blattquerschnitte entsprechen 100 μm (Übersicht) bzw. 50 μm (Ausschnitt).

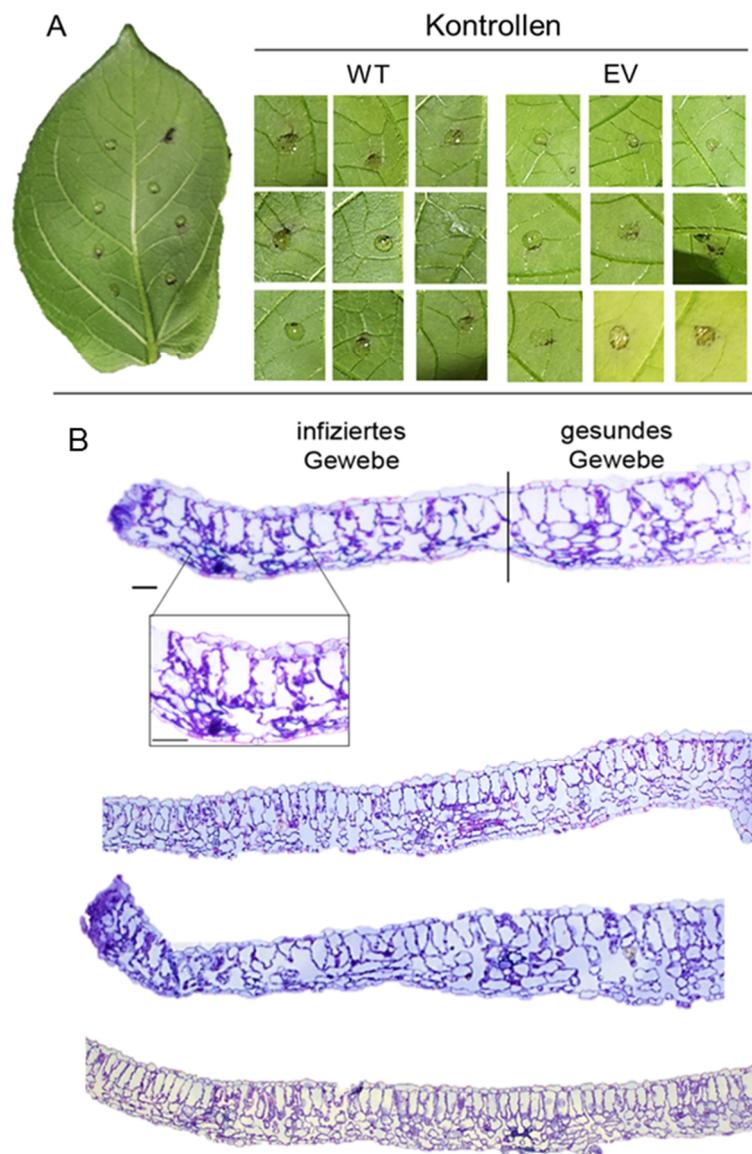


Abbildung 7.3: Blattläsionen in Aufsicht und im Querschnitt von Kontrollpflanzen (A+B)

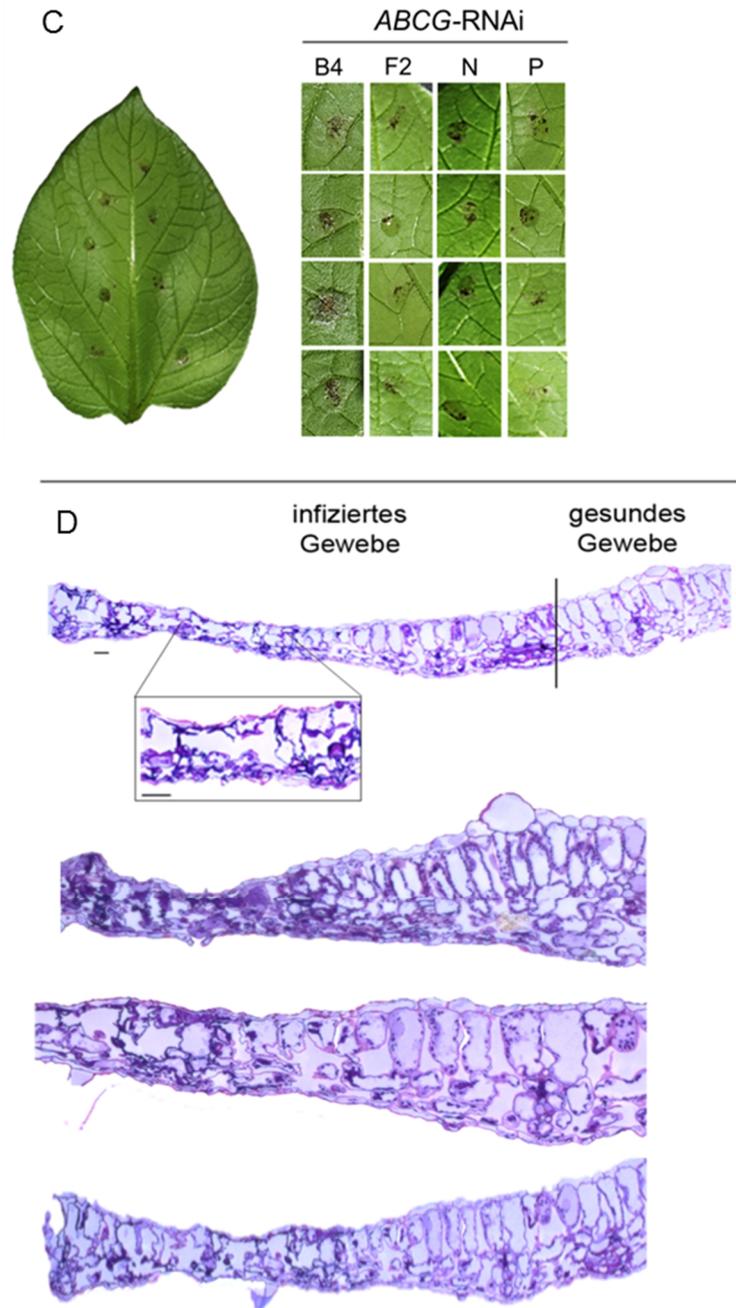


Abbildung 7.4: Blattläsionen in Aufsicht und im Querschnitt von *ABCG-RNAi*-Pflanzen (C+D)

7.15 SUBERINFÄRBUNG PEP-13-INFILTRIERTER BLÄTTER VON KONTROLL- UND 35S-*ABCG1*-PFLANZEN

Von Blättern der Kontroll- (Abbildung 7.5 und 7.7) und 35S-*ABCG1*-Pflanzen (Abbildung 7.6 und 7.8) wurden nach 7 Tagen unter den angegebenen Behandlungen Semidünnschnitte angefertigt und diese mit Fluorol-Yellow-088 gefärbt. Die Analyse der Schnitte erfolgte mittels LSM. Zu sehen ist der Übergangsbereich vom gesunden zum, je nach Behandlung, nekrotischen Gewebe. Maßstabbalken entsprechen 50 μm .

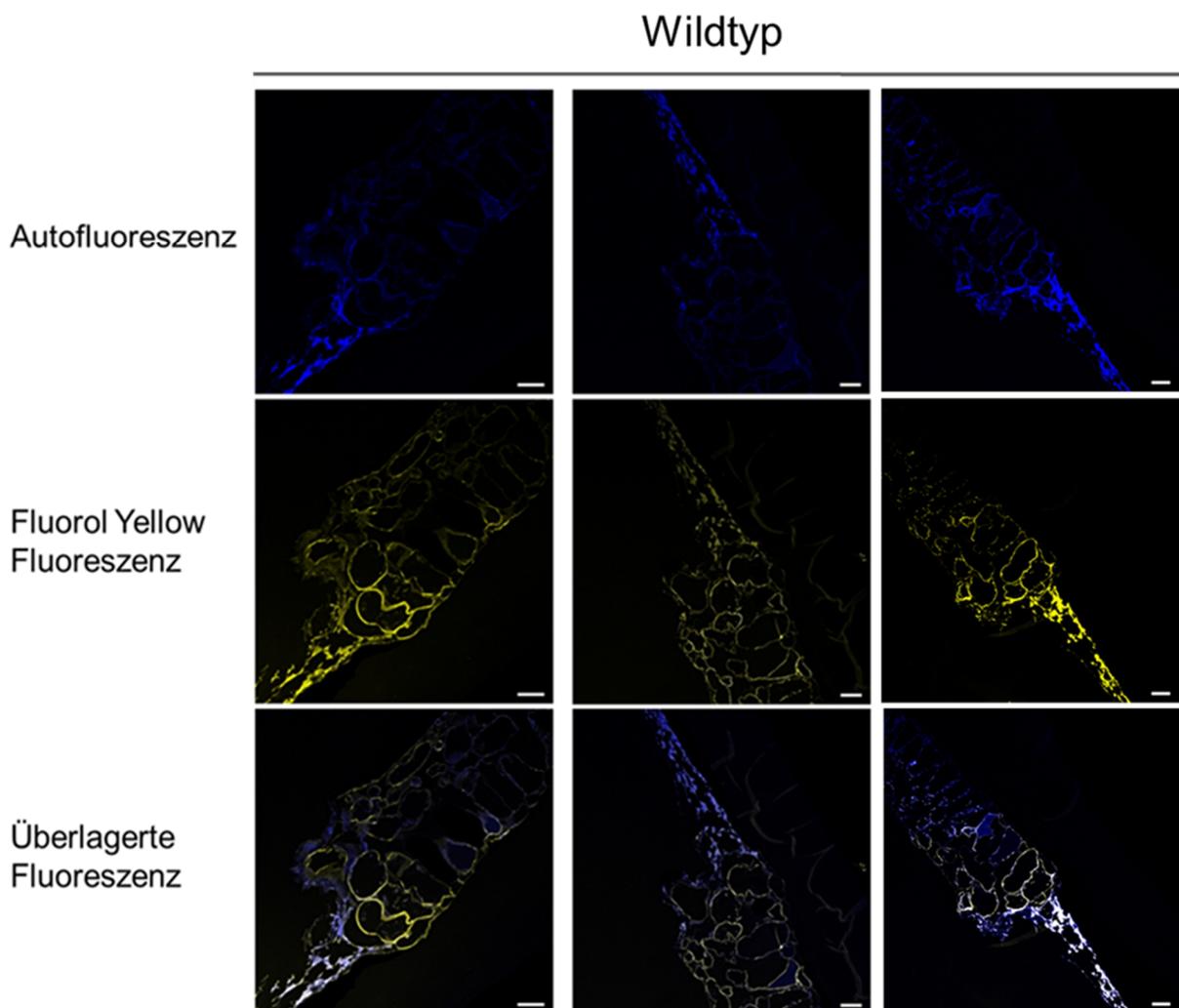


Abbildung 7.5: Semidünnschnitte Pep-13 (100 μM)-infiltrierter Blätter von Kontrollpflanzen (WT)

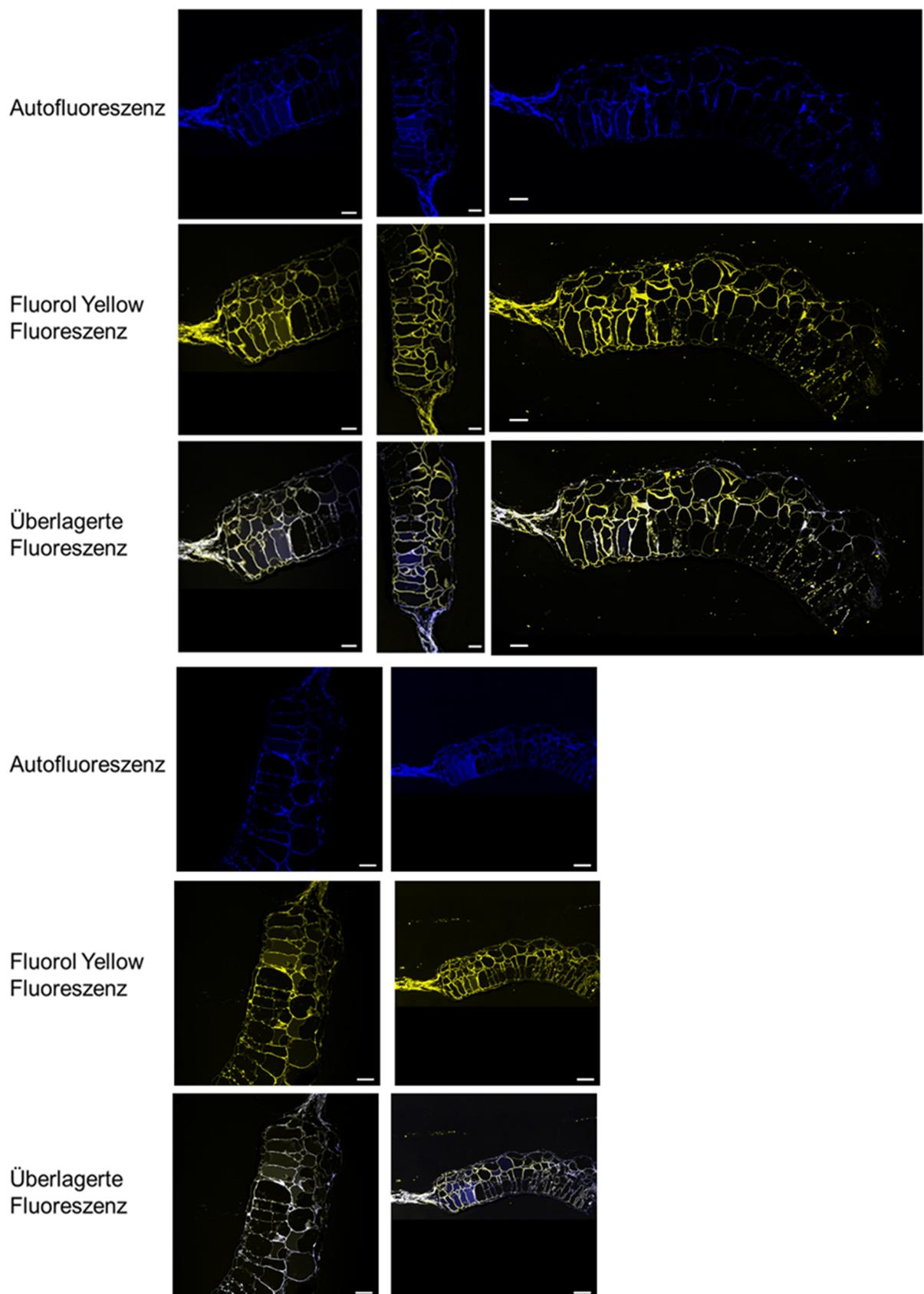
35S-*ABCG1*

Abbildung 7.6: Semidünnschnitte Pep-13 (100 μ M)-infiltrierter Blätter von 35S-*ABCG1*-Pflanzen

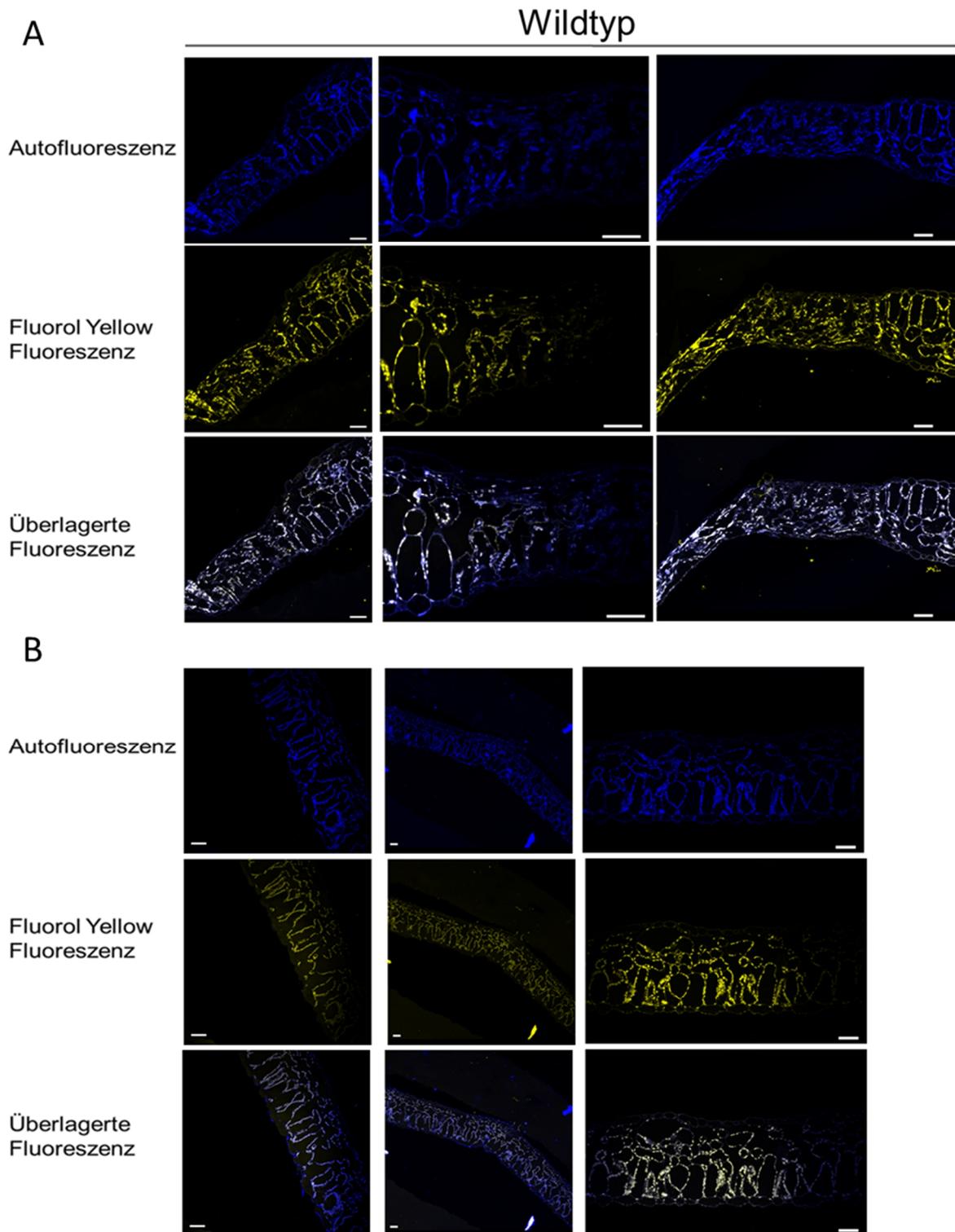


Abbildung 7.7: Semidünnschnitte von Kontrollblättern (WT) nach Infiltration mit W2A- (A) bzw. Wasser (B).

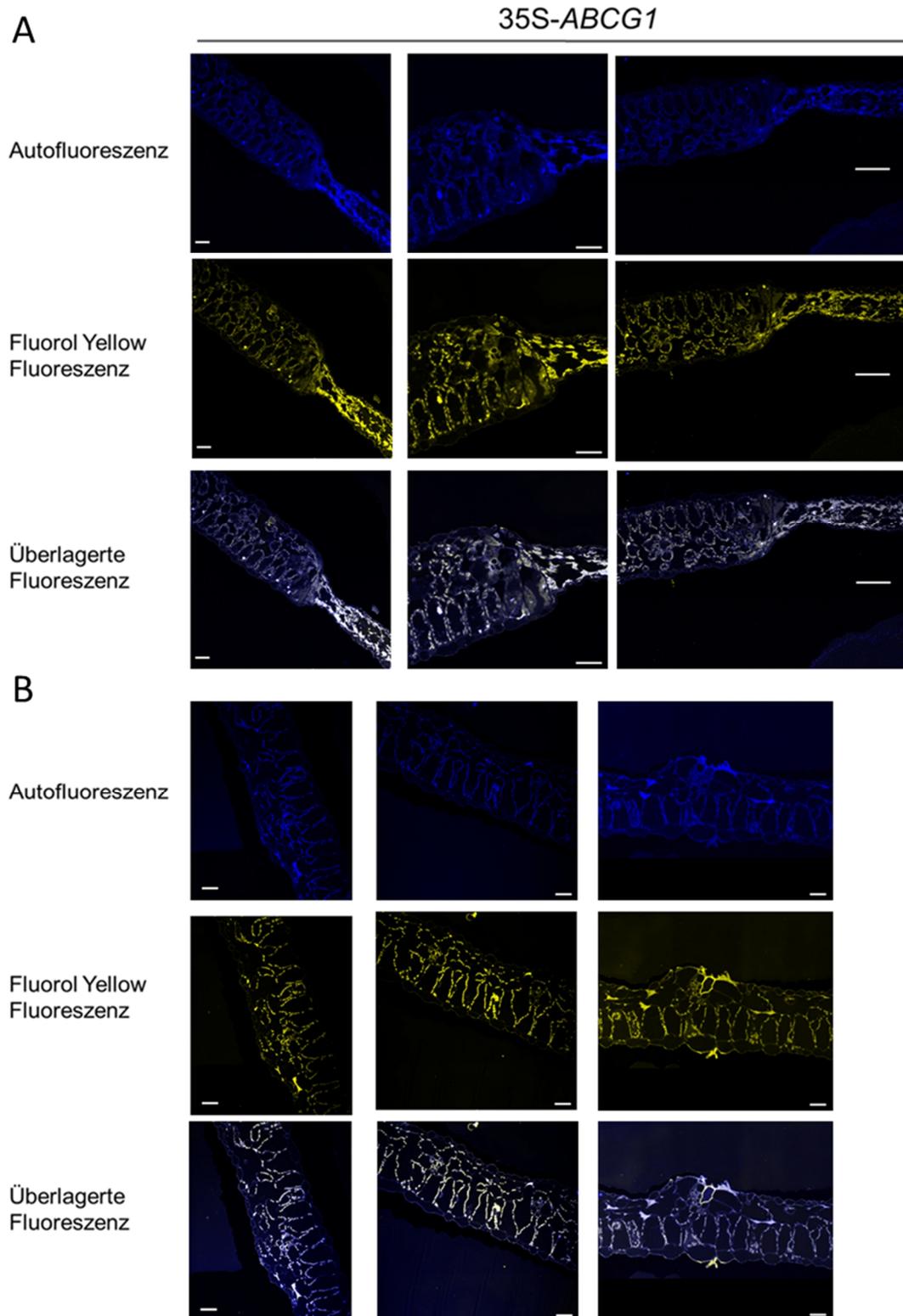


Abbildung 7.8: Semidünnschnitte von 35S-*ABCG1*-Pflanzen nach Infiltration mit W2A- (A) bzw. Wasser (B)

7.16 *PHYTOPHTHORA INFESTANS*-BIOMASSEBESTIMMUNG IN 35S-*ABCG1*-PFLANZEN

Quantitative Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse in Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen. Aus *P. infestans*-inokulierten Blättern wurde vier Tage nach Infektion gDNA isoliert und die Pathogenbiomasse mittels qPCR analysiert. Die Daten zeigen den Mittelwert und die Fehlerbalken der Standardfehler jeweils von drei unabhängigen Experimenten für 96 Stunden (WT: n=7; EV: n=7; 35S-*ABCG1*-Linien A+J, n=7; Linie S: n=5); vier unabhängige Experimenten für 72 Stunden (WT+EV: jeweils n=13; 35S-*ABCG1*-Linien A, J, S: jeweils n=13) und ein Experiment für 48 Stunden (jeweils: n=2). Die Buchstaben kennzeichnen statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT-bzw. EV-Kontrolle und 35S-*ABCG1*-Linien (einfaktorielle ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0,05$).

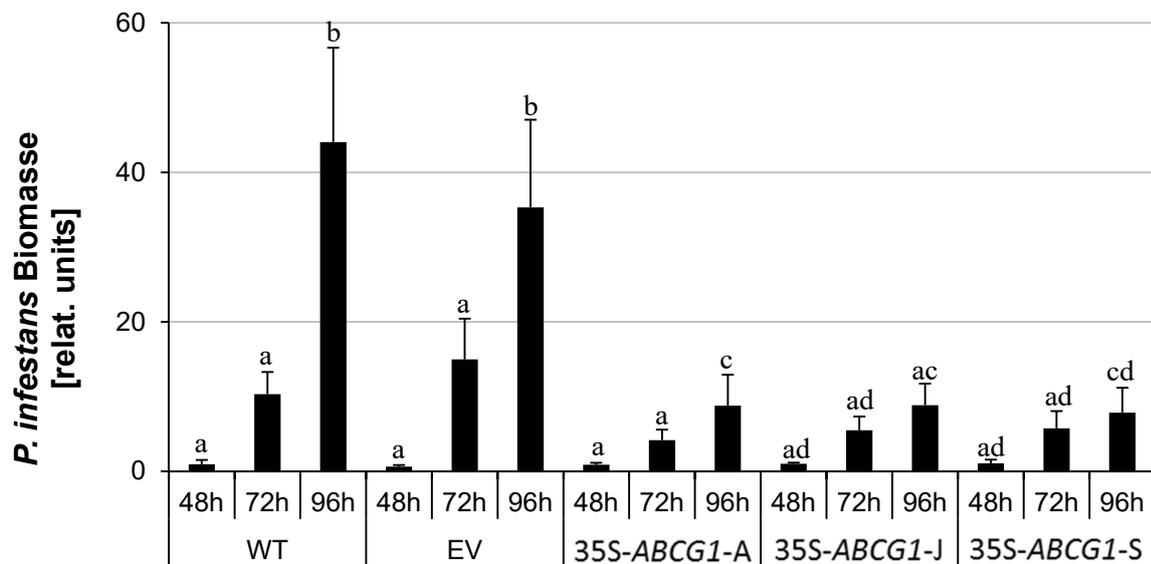


Abbildung 7.9: Quantitative Bestimmung der *P. infestans*-Biomasse in Kontroll- und 35S-*ABCG1*-Pflanzen

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all denen, die mir beim Entstehen dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Allen voran danke ich herzlichst **PROF. DR. DIERK SCHEEL** und **PROF. DR. SABINE ROSAHL**, die mir die Möglichkeit gaben, in ihrer Arbeitsgruppe zu einem sehr interessanten und vielfältigen Thema meine Promotionsarbeit anzufertigen. Vielen Dank für die stete Unterstützung und Betreuung. Vor allem danke ich Prof. Dr. Rosahl für die anregenden Diskussionen, der Offenheit gegenüber allen Fragen, Ideen und Experimenten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, für die nötige Geduld und die vielen Ratschläge in den vergangenen Jahren. Außerdem danke ich Prof. Dr. Scheel für die Übernahme des ersten Gutachtens.

Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei **PROF. DR. HOLGER B. DEISING** von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg und **DR. CHRISTIANE NAWRATH** von der Universität Lausanne für die freundliche Übernahme der weiteren Gutachten bedanken.

DR. GERD HAUSE danke ich besonders für die Herstellung der Semidünnschnitte.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung *Stress- und Entwicklungsbiologie* und der Arbeitsgruppe *Induzierte Pathogenabwehr* für die angenehme Atmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt vor allem **DR. CHRISTOPH BÖTTCHER** für die UPLC/PDA/ESI-QTOFMS-Analysen, für die Etablierung der Methode für die Messung der Peridermextrakte, für die Geduld, mir die „Chemie“ für die Auswertung der Daten zu erklären und für die anregenden Diskussionen. Zudem möchte ich mich besonders bei **DR. NADINE STREHMEL** für die GC-MS-Analysen und für die Hilfe bei der Einführung in die Datenauswertung recht herzlich bedanken. Weiterhin danke ich **DR. LENNART ESCHEN-LIPPOLD** für die Einführung in die Methode zur Isolation von Protoplasten aus Arabidopsis-Blättern und für den steten Rat bei methodischen Fragen. Der lieben **ULRIKE SMOLKA** danke ich besonders für die vielfältige Unterstützung im Labor. Zudem gilt mein Dank **Dr. Nadezhda Frolova** für die Klonierung des Volllängentransporters, **PROF. DR. FELIX MAUCH** für das *P. infestans* –Isolat CRA208m sowie **PROF. DR. IVO FEUSSNER** und **DR. KIRSTEN FEUSSNER** für die Bereitstellung der Standards für die GC-MS-Analysen. Außerdem danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung *Administration und Infrastruktur*, vor allem **HOLGER BARTZ**.

Für die mentale und fachliche Unterstützung möchte ich mich außerdem bei meinen ehemaligen Arbeitskolleginnen und -kollegen und mittlerweile auch guten Freunden - besonders bei **DR. SARA SCHAARSCHMIDT, DR. KATI MIELKE, DR. KATRIN GEIBLER, PASCAL PECHER, DR. MARTIN DIPPE, DR. LENNART ESCHEN-LIPPOLD, DR. ANJA RASCHKE, DR. MICHAELA KOPISCHKE** und **MELANIE DOBRITZSCH** bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt allen voran meiner lieben **FAMILIE**, meinem Freund **JAN** sowie all denen, die mich begleitet und in jeder Lebenslage verständnisvoll unterstützt haben.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet. Alle den benutzen Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Ferner erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation an keiner anderen Einrichtung zur Begutachtung eingereicht worden ist.

Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmalig um die Erlangung des Doktorgrades.

Leipzig, März 2016

Ramona Landgraf

LEBENS LAUF

Name: Ramona Landgraf
Staatsangehörigkeit: deutsch
Geburtsdatum/-Ort: 02.11.1982 in Leipzig
Familienstand: ledig

Schulbildung

1989 –1993 108. Oberschule in Leipzig
1993 –2001 Gustav-Hertz-Gymnasium, Leipzig
2001 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Tätigkeiten vor dem Studium

2001 –2002 Kinder- und Jugendwerk Ost, Leipzig
Freiwilliges soziales Jahr

Studium

2002 –2009 Studium der Biologie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (MLU):
Abschluss: *Diplom*; Hauptfächer: Genetik und Pflanzenphysiologie
Nebenfächer: Phytopathologie und Biochemie
Diplomarbeit am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) unter wissenschaftlicher Anleitung von Prof. Dr. Dr. Bettina Hause in der Abteilung für *Stoffwechsel- und Zellbiologie (Forschungsgruppe: Jasmonatfunktion und Mykorrhiza)* zum Thema:
Einfluss von Blattverwundung auf die Ausprägung biotischer Interaktionen von *Medicago truncatula*
2010-2014 Doktorand am Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle (Saale) unter wissenschaftlicher Anleitung von Prof. Dr. Sabine Rosahl und Prof. Dr. Dierk Scheel in der Abteilung *Stress- und Entwicklungsbiologie (Forschungsgruppe: Induzierte Pathogenabwehr)* zum Thema: Charakterisierung des PAMP-induzierbaren ABC-Transporters *ABCG1* aus *Solanum tuberosum*

Beruflicher Werdegang

seit 2014 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz Institut für Gemüse und Zierpflanzenbau, Großbeeren bei Prof. Dr. Frederik Börnke in der Abteilung *Nutzung biologischer Systeme im Gartenbau (Forschungsgruppe: Zell- und Molekularfunktionen)*

Publikationen

Eschen-Lippold L., Landgraf R., Smolka U., Schulze S., Heilmann M., Heilmann I., Hause G., Rosahl S. (2012). “Activation of defense against *Phytophthora infestans* in potato by down-regulation of syntaxin gene expression.” *New Phytologist*. **193(4)**:985-96

Landgraf R., Schaarschmidt S., Hause B. (2012). “Repeated leaf wounding alters the colonization of *Medicago truncatula* roots by beneficial and pathogenic microorganisms. “ *Plant Cell & Environment*. **35(7)**: 1344-57

Landgraf R., Smolka U., Altmann S., Eschen-Lippold L., Senning M., Sonnewald S., Weigel B., Frolova N., Strehmel N., Hause G., Scheel D., Böttcher C., Rosahl S. (2014). “The ABC Transporter ABCG1 is required for Suberin Formation in Potato Tuber Periderm.“ *Plant Cell*. **26(8)**: 3403-15

Nietzsche M., Landgraf R., Tohge T., Börnke F. (2015). “A protein–protein interaction network linking the energy-sensor kinase SnRK1 to multiple signaling pathways in *Arabidopsis thaliana*.” *Curr. Plant Biol*. ISSN: 2214-6628; DOI:10.1016/j.cpb.2015.10.004

Leipzig, März 2016

Ramona Landgraf