

Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie
der Pflanze (IMBIO)

***Sclerotinia*-induzierte differentielle Genexpression
in resistenten *Helianthus*-Wildarten**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften
(Dr. agr.)

der
Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt

am
7.10.2008

von
Dipl.-Ing. agr. Carmen Müllenborn

aus
Wolfach

Referent: Prof. Dr. H. Schnabl

Korreferent: PD Dr. U. Steiner

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2008

Erscheinungsjahr: 2009

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

***Sclerotinia*-induzierte differentielle Genexpression in resistenten *Helianthus*-Wildarten**

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary ist ein peritropher Pilzerreger, der bei der Kultursonnenblume, *Helianthus annuus* L., verheerende Ertragsverluste verursacht. Resistenzen gegen dieses Phytopathogen sind hingegen in einigen Wildarten der Gattung *Helianthus* vorzufinden. Bis heute sind die molekularen Hintergründe dieser Resistenz jedoch weitestgehend ungeklärt. Um die Resistenzausprägung von *Helianthus*-Wildarten näher zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit zwei Wildartaccessionen, AC 7 und AC M, phänotypisch, phytochemisch und transkriptomisch auf ihre Resistenz gegen das Pathogen *S. sclerotiorum* in Gewächshausversuchen untersucht. In diesem Zusammenhang konnte im Vergleich zu der *Sclerotinia*-anfälligen Kultursorte Albena gezeigt werden, dass in dem untersuchten Zeitraum nach artifizieller Inokulation eine signifikante Reduktion der Läsionslängen in den infizierten Blättern der Wildarten, insbesondere in den ersten 48 h, für die phänotypische Resistenzausprägung der untersuchten Wildarten entscheidend ist. Es konnte weiterhin anhand von qualitativen und quantitativen Analysen chromatographisch demonstriert werden, dass die Wildarten AC 7 und AC M, im Gegensatz zu der Kultursonnenblume, über hohe Konzentrationen an phenolischen Inhaltsstoffen verfügen. Zudem resultierte eine Induktion spezifischer phenolischer Verbindungen aus der Infektion durch das Pathogen. In beiden Wildarten erfolgte ein Nachweis von überwiegend Kaffeoylsäurederivaten in den Blättern der Wildarten AC 7 und AC M, von denen nach Infektion Mono- und Di-Kaffeoylchinasäuren stark vertreten waren. Die Bedeutung des Phenolstoffwechsels für die Interaktion zwischen den Wildarten und dem Pathogen konnte zudem durch den Nachweis der differentiellen Genexpression einer 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) bestätigt werden. Als weitere hochexprimierte Transkripte wurden eine Cysteinprotease (CP) aus dem Proteinstoffwechsel und das Schlüsselenzym S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (SAMS) aus dem Methioninstoffwechsel nachgewiesen. Eine postinfektionelle Suppression wurde für ein Chlorophyll-*a/b*-bindendes Protein (CAB) aus dem Lichtsammelkomplex des Photosynthesestoffwechsels belegt. In der Gesamtheit der transkriptomischen Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass eine frühzeitige pathogen-induzierte Genexpression in den Blättern der Wildarten für eine erfolgreiche Pathogenabwehr entscheidend ist. Weiterhin konnten, trotz ähnlichen phänotypischen Läsionsausprägungen, genotypische Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Wildartaccessionen hinsichtlich der Anzahl differentiell exprimierter Transkripte nachgewiesen werden. Durch den Einsatz der Differential Display-Methodik und der kapillargelektrophoretischen Auftrennung der generierten cDNA-Fragmente konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Isolation der vier Transkripte (CAB, 4-CL, CP, SAMS) in den Wildarten der Gattung *Helianthus* erfolgen. Die Verwendung von Datenreduktionsalgorithmen zur statistischen Auswertung von Expressionsdaten wurde etabliert, um eine computer-gestützte Auswahl von signifikant differentiell exprimierten Transkripten aus dem mRNA-Pool der Wildarten zu ermöglichen.

Sclerotinia*-induced differential gene expression in resistant wild species of *Helianthus

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary is a necrotrophic pathogen causing devastating yield losses in cultivated sunflower (*Helianthus annuus* L.). However, resistance to this phytopathogenic fungus exists in some wild sunflower species. Up to date, there is still marginal information on the molecular background of this resistance phenomenon.

In order to go into detail according to the traits of this resistance, two wild sunflower accessions, AC 7 and AC M, were examined in the greenhouse with a major consideration on phenotypical, phytochemical and transcriptomic characteristics. In this regard and in comparison to a *Sclerotinia*-susceptible cultivated sunflower, it was possible to point out that a significant reduction of the lesion length and delayed disease development, particularly within 24 h, was decisive for resistance in wild species after artificial inoculation with the pathogen. It was demonstrated by means of qualitative and quantitative chromatographic analyses that the leaves of the wild sunflower species, AC 7 and AC M, comprise high concentrations of phenolic compounds in comparison to leaves of the susceptible cultivar Albena. Furthermore, it was shown that the synthesis of specific phenolic substances was induced by the pathogen *S. sclerotiorum*. The leaves of both wild sunflower accessions mainly included caffeoylic compounds with high concentrations of mono- and di-caffeoyl quinic acids after the infection with *S. sclerotiorum*.

In addition, the transcriptomic approach revealing differential expression of a transcript with homology to a 4-coumarat-CoA-ligase (4CL) in the wild sunflower species confirmed the importance of the phenolic pathway for the interaction with *S. sclerotiorum*. An up-regulation after inoculation with *S. sclerotiorum* was determined for two more transcripts which were isolated and characterised as a cysteine protease (CP) responsible for protein degradation and as an S-adenosyl-methionine-synthetase (SAMS), the key enzyme of the methionine pathway. One down-regulated transcript was confirmed as a chlorophyll-*a/b*-binding protein (CAB) originating from the light harvesting complex which is involved in photosynthesis. In consideration of the transcriptomic approach the evidence was given that an initial pathogen-induced gene expression is critical for successful pathogen defence in leaves of wild sunflower species. Furthermore, it was shown that despite similar phenotypical characteristics of the lesions, genotypic differences concerning the number of differential expressed transcripts between the two wild sunflower species AC 7 and AC M were detected. By means of the method of differential display combined with the separation of the generated cDNA-fragments via capillary gel electrophoresis the isolation of the four transcripts (CAB, 4-CL, CP, SAMS) from wild sunflower species was first accomplished in this study. The application of data reduction algorithms for the statistical analysis of gene expression data was established to enable the computer-assisted selection of significant differentially expressed transcripts from the mRNA-pool of the wild sunflower species.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro
ABA	Abscisic acid
Abb.	Abbildung
arb.	Arbitrary unit
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CAB	Chlorophyll- <i>a/b</i> -bindendes Protein
CAE	Chlorogenic acid equivalent
cDNA	complementary Desoxyribonucleic acid
CIP	Alkalische Phosphatase
4CL	4-Coumarat-CoA-Ligase
cm	Zentimeter
CP	Cysteinprotease
DAD	Diodenarraydetektor
DC	Dünnschichtchromatographie
DCQA	Di-Kaffeoylchinasäure
DD	Differential display
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPI	Days post inoculum
ESI	Electrospray ionization
F	Forward
FDR	False discovery rate
FG	Frischgewicht
fmol	Fentomol
g	Gramm
GAE	Gallic acid equivalent
GITC	Guanidinisothiocyanat
h	Stunde
HCT	HydroxycinnamoylCoA:Shikimat/Quinat Hydroxycinnamoyl-Transferase
HR	Hypersensitive response

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

HPLC	High pressure liquid chromatography
HPTLC	High performance thin layer chromatography
HQT	HydroxycinnamoylCoA:Quinat-Transferase
ITS	Internal transcribed spacer
kb	Kilobasen
kV	Kilovolt
L	Liter
LIF	Laser-induzierte Fluoreszenz
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
m	Meter bzw. Milli
M	Molar
MCQA	Mono-Kaffeoylchinasäure
min	Minute
mod	modifiziert
n	Nano
NO	Nitric oxide
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
PAL	Phenylalaninlyase
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Polygalacturonase
PME	Pektinmethylesterasen
pmol	Pikomol
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
R	Reverse
R _f	Retentionsfaktor
rfu	relative fluorescence unit
R _t	Retentionszeit
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
rLF	Relative Luftfeuchte
rpm	rounds per minute

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

s	Sekunde
SA	Salicylic acid
SAMS	S-Adenosyl-Methionin-Synthetase
SAR	Systemic acquired resistance
SLS	Sample loading solution
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TG	Trockengewicht
T _m	Schmelztemperatur
QTL	Quantitative trait loci
U	units
UV	Ultraviolett
v	volume
V	Volt
Vol	Volumina
w	weight

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL & METHODEN	8
2.1	Chemikalien, Kits und Enzyme	8
2.2	Medien und Puffer	11
2.3	Wirt-Pathogen-System	14
2.3.1	<i>Helianthus</i> spp.	14
2.3.1.1	<i>In vitro</i> -Vermehrung	14
2.3.1.2	Pflanzenanzucht im Gewächshaus	15
2.3.2	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	15
2.3.2.1	Kultivierung von <i>S. sclerotiorum</i>	15
2.3.3	Inokulationsversuche	16
2.3.4	Histologische Untersuchungen	16
2.3.5	Befallsermittlung und statistische Auswertung	17
2.4	Analyse des Phenolstoffwechsels	17
2.4.1	Extraktion von phenolischen Verbindungen	17
2.4.2	Bestimmung des Gesamtphenolgehalts	17
2.4.3	Nachweis von phenolischen Verbindungen mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)	18
2.4.4	Nachweis von Hydroxyzimtsäuren mittels Hochdruck- Flüssigchromatographie (HPLC)	18
2.4.5	Analyse der phenolischen Inhaltsstoffe mittels LC- Massenspektrometrie (LC-MS)	19
2.5	Molekularbiologische Methoden	21
2.5.1	Oligonukleotide	21
2.5.2	Isolierung von Nukleinsäuren	23
2.5.2.1	Gewinnung von genomischer DNA aus Pflanzenmesophyll	23
2.5.2.2	Gewinnung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmesophyll	24
2.5.2.3	Isolierung von poly(A) ⁺ -RNA aus Gesamt-RNA	25
2.5.2.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	25
2.5.2.5	Aufreinigung von DNA zur Sequenzierung	25
2.5.2.6	Aufreinigung von Plasmid-DNA	26
2.5.2.7	Elution von DNA aus Agarosegelen	26

2.5.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren	26
2.5.4	PCR-Verfahren	27
2.5.4.1	PCR zur Amplifikation der ITS-Region	27
2.5.4.2	Reverse Transkriptase (RT)-PCR	28
2.5.4.3	Differential Display (DD)-PCR	29
2.5.4.4	Screening-PCR zum Nachweis rekombinanter Plasmide	30
2.5.4.5	Cycle Sequenzierungs-PCR	31
2.5.4.6	Semiquantitative Real-Time PCR	32
2.5.5	Elektrophoretische Auftrennung von DNA	33
2.5.5.1	Analytische Agarosegelelektrophorese	33
2.5.5.2	Kapillargelelektrophorese	33
2.5.5.2.1	Auftrennung von fluoreszenzmarkierten cDNA-Fragmenten	34
2.5.5.2.2	Auftrennung von Sequenzierungsprodukten	34
2.5.6	Blunt-End Klonierung	34
2.5.6.1	Phosphorylierung von cDNA-Fragmenten	35
2.5.6.2	Plasmidpräparation	35
2.5.6.3	Herstellung kompetenter Zellen	36
2.5.6.4	Ligation	36
2.5.6.5	Heat-Shock Transformation	37
2.5.7	Statistische Auswertung der Expressionsdaten	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Interspezifische Variation in der ITS-Region von <i>Helianthus</i>-Wildarten	38
3.1.1	Amplifikation und Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region 1 und 2	38
3.1.2	Homologievergleich mittels BLAST	39
3.1.3	Distanzverfahren zur phylogenetischen Analyse	42
3.2	Phänotypische Reaktionen von <i>Sclerotinia</i>-infiziertem Blattgewebe	43
3.2.1	Ausprägung von Läsionen unter Gewächshausbedingungen	43
3.2.2	Histologische Untersuchung der Infektionsstellen	47
3.3	Phytochemische Untersuchungen von <i>Sclerotinia</i>-infiziertem Blattgewebe	49
3.3.1	Bestimmung des Gesamtphenolgehalts von infiziertem Blattgewebe	49
3.3.2	Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Phenolextrakte	50
3.3.2.1	Auftrennung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels DC	52

3.3.2.2	Auftrennung und Quantifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels HPLC	54
3.3.2.3	Charakterisierungen von Mono- und Di-Estern der Hydroxyzimtsäuren mittels LC-MS	58
3.4	Differentielle Genexpression in <i>Sclerotinia</i>-infiziertem Blattgewebe	61
3.4.1	Kapillargelelektrophoretischer Nachweis und Detektion von DDRT-PCR generierten cDNA-Fragmenten	61
3.4.2	Statistische Auswertung der Expressionsdaten und Auswahl von cDNA-Fragmenten differentiell exprimierter Gene	66
3.4.2.1	Qualitätsprüfung und Standardisierung der Expressionsdaten	68
3.4.2.2	Klassifizierungen anhand von Expressionsmustern	68
3.4.2.3	Etablierung einer Varianzanalyse zum Screenen von Kandidatenfragmenten	70
3.4.3	Klonierung, Sequenzierung und Sequenzhomologievergleich von Kandidatenfragmenten	74
3.4.4	Überprüfung und Verifizierung der differentiellen Expression mittels semiquantitativer Real Time-PCR	78
4.	DISKUSSION	80
4.1	Molekulare Klassifizierung der untersuchten Sonnenblumenwildarten in der Systematik <i>Helianthus</i>	80
4.2	Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung von Blattsymptomen zwischen <i>Sclerotinia</i> -resistenten und –anfälligen Arten der Gattung <i>Helianthus</i>	82
4.3	Bedeutung des Pathogen-induzierten Phenolstoffwechsels in resistenten Wildarten	87
4.4	Durchführung und Bewertung der Differential-Display Methodik zum Screenen differentiell exprimierter Gene in <i>Helianthus</i>	96
4.5	Bedeutung von <i>Sclerotinia</i> -induzierten und differentiell exprimierten Transkripten in resistenten <i>Helianthus</i> -Wildarten	99
5.	ZUSAMMENFASSUNG	112
6.	LITERATURVERZEICHNIS	114
7.	ANHANG	137

1. EINLEITUNG

Die Koinzidenz zwischen einer Pflanze und einem pilzlichen Phytopathogen bleibt für die Pflanze vorwiegend folgenlos. Dies liegt darin begründet, dass Pflanzen von den meisten Pathogenen aufgrund ihrer chemischen und strukturellen Barrieren nicht parasitiert werden können und somit als Nicht-Wirtspflanzen auftreten. Zwischen der Pflanze und dem Pathogen besteht in einem solchen Fall eine Basisinkompatibilität bzw. Basisresistenz (Prell & Day, 2001). Liegt demgegenüber eine Basiskompatibilität vor, so kann in Abhängigkeit von der genetischen Disposition der Pflanze und der Aggressivität des Pathogens, sowie unter optimalen Rahmenbedingungen (Klima, Witterung), ein Befall durch das Pathogen erfolgen. Das Pathogen ist dann in der Lage, die Basisresistenz der Pflanze mit dem Vorliegen von Pathogenitätsfaktoren grundsätzlich zu überwinden. Die phänotypische Reaktion von Pflanzen auf einen Parasitismus äußert sich generell in späteren Phasen der Pathogenese in der Ausprägung von Symptomen, deren phänologische Erscheinung oftmals charakteristisch für die entsprechende Wirt-Pathogen-Interaktion ist. Ob es der Wirtspflanze nach einer Besiedelung durch das Pathogen gelingt, die Ausbreitung und Vermehrung des Pathogens zu unterbinden, liegt in ihrer Befähigung begründet, physiologische und biochemische Abwehrstrategien zu entwickeln, die durchaus auch nach Infektion noch zu einer Ausprägung von Resistenzen führen können. Eine Pathogenabwehr der Pflanze erfolgt jedoch nur dann, wenn exogene oder endogene Signale erkannt werden (Dixon & Lamb, 1990; de Wit, 2007). Die Mechanismen, die Pflanzen zur Abwehr von u.a. pilzlichen Schaderregern entwickelt haben, sind divers und komplexer Natur (Baker *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997; Hutcheson, 1998).

Erste messbare Reaktionen einer pflanzlichen Pathogenabwehr sind im Allgemeinen die Öffnung spezieller Ionenkanäle und die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), wie beispielsweise $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ im Zuge der Aktivität von membran-assoziierten NAD(P)H Oxidasen, Lipoxygenasen und im Apoplasten lokalisierten Peroxidasen (Somssich & Hahlbrock, 1998; Bolwell *et al.*, 2002; Babitha *et al.*, 2004). Reaktive Sauerstoffspezies wie das relativ langlebige H_2O_2 können in geringeren Konzentrationen zur Aktivierung von u.a. antioxidativen Enzymen und Signalkaskaden beitragen (Solomon *et al.*, 1999; Vranová *et al.*, 2002). Der bei Interaktion durch Elicitoren induzierte „oxidative burst“ in den Pflanzen kann im Zuge einer Pathogenabwehr zu einer genetisch bedingten und lokal begrenzten hypersensitiven Reaktion (HR) führen (Lamb & Dixon, 1997; Lu & Higgins, 1999). Diese

Reaktion ist eine der wahrscheinlich bedeutendsten Mechanismen im Kontext mit der Abwehr gegen biotrophe Krankheitserreger (Tenhaken *et al.*, 1995; Wojtaszek, 1997). Seit geraumer Zeit ist zudem mehrfach belegt worden, dass auch das Radikalgas Stickstoffoxid (NO) als Signalmolekül im Zusammenspiel mit ROS in der Regulation der HR aktiv ist (Clarke *et al.*, 2000; McDowell & Dangl, 2000; Delledonne *et al.*, 2003). Dieses Modell kann jedoch nicht grundsätzlich als Erklärungsansatz für die Pathogenabwehr gegen alle Pathogene dienen, da das Auslösen einer HR für die Ausbreitung von z.B. peritrophen Pathogenen im Pflanzengewebe förderlich und somit für die Pathogenabwehr kontraproduktiv ist (Govrin & Levine, 2000; Mayer *et al.*, 2001).

Weitere Möglichkeiten der generellen Pathogenabwehr sind die Verstärkung von Zellwänden, die Synthese von antimikrobiellen Metaboliten (Phytoalexine) und die Induktion einer pathogenabwehr-relevanten Genexpression (Hammond-Kosack & Jones, 1996). Der Phenylpropanoidstoffwechsel in Pflanzen spielt bei der konstitutiven und induzierten Pathogenabwehr eine bedeutende Rolle, da eine Vielzahl von Phenylpropanoidderivaten, wie z.B. die Protocatechusäure, antifungale Wirkung besitzen oder wie diverse Monomere als strukturelle Komponenten des Polymers Lignin zur Verstärkung von Zellwänden dienen (Dixon *et al.*, 1996, 2002; Vermerris & Nicholson, 2006). Im Zuge einer Pathogeninfektion und der damit verbundenen Aktivierung von Abwehrmechanismen wird in manchen Wirt-Pathogen-Interaktionen die systemisch erworbene Resistenz (SAR, engl. systemic acquired resistance) ausgelöst, die in Abhängigkeit von Salicylsäure (SA) zu einer Pathogenresistenz in der gesamten Pflanze führen kann (Ryals *et al.*, 1996; Hammerschmidt, 1999). Weitere Pflanzenhormone, wie Jasmonat und Ethylen, sind auch bei der Pathogenabwehr von Bedeutung. Sie agieren jedoch als Signalmoleküle alternativ in einer SA-unabhängigen Signaltransduktion (Dong, 1998; Kunkel & Brooks, 2002). Es wird vermutet, dass der Erfolg einer Pathogenabwehr stark von der Art des Abwehrmechanismus, SA-abhängig oder SA-unabhängig, und der biotrophen oder peritrophen Ernährungsweise des Pathogens abhängig ist (Glazebrook, 2005).

Der bodenbürtige Ascomycet *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary aus der Klasse Discomycetes ist weltweit ein bedeutsamer Schaderreger vieler landwirtschaftlich genutzter dikotyler Pflanzen, wie z.B. Raps, Ackerbohne, Salat und Sojabohne (Purdy, 1979; Boland & Hall, 1994). Auch in der Kultursonnenblume, *Helianthus annuus* L., verursacht *S. sclerotiorum* verheerende Ertragsverluste, da unter optimalen Bedingungen für das Pathogen

eine Infektion in allen Entwicklungsstadien der Wirtspflanze und an allen Pflanzenorganen auftreten kann (Masirevic & Gulya, 1992). Eine *Sclerotinia*-Fäule an der Sonnenblume äußert sich, wie auch bei vielen weiteren Wirtspflanzen, in Form von wässrigen Läsionen an den Infektionsstellen, die als sog. Weißfäulen an Stängelbereichen, am Blattorgan und am Blütenkorb beschrieben sind. Etwa 90 % seines Lebenszyklus verbringt *S. sclerotiorum* im Boden als asexuell, melanisiertes Sklerotium. Das Sklerotium ist dabei auch die häufigste Überwinterungsform des Pathogens. Die Ausbildung von infektiösen Sporenformen bzw. Hyphenformen geht von diesen Überdauerungsformen aus (Agrios, 2005). Dabei sind die Infektion und der Infektionsverlauf stark von Umweltbedingungen abhängig (Tores & Moreno, 1987).

Die Infektion von *H. annuus* erfolgt meist in Form von sexuell gebildeten Ascosporen, die nach carpogener Keimung des Sklerotiums aus dem Apothezium hervorgehen und mit dem Wind auf oberirdische Pflanzenorgane gelangen. Bei einer Kolonisierung des Blattes oder des Stängels wachsen die Hyphen inter- und intrazellulär und treten teilweise durch die Spaltöffnungen auf der Blattober- und Blattunterseite aus (Jamaux *et al.*, 1995). Die Keimung der Ascosporen auf der Wirtsoberfläche, die Ausbildung eines Appressoriums und die Penetration in das Wirtsgewebe erfolgt in den meisten Fällen auf seneszentem Gewebe, da die Keimung der Ascosporen einen hohen Energieaufwand darstellt und die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Keimung entscheidend ist (Lumsden, 1979). Sedun & Brown (1987) beobachteten jedoch auch, dass die Ausbildung eines Appressoriums begleitet von einer Sucrosesekretion zur Infektion von gesundem Pflanzengewebe am Übergang der Lamina zur Petiole über die Ascosporen möglich ist. Findet unter natürlichen Bedingungen eine myzeliogene Keimung des Sklerotiums statt, dann sind insbesondere die unterirdischen Pflanzenteile und die Stängelbasis von einer Infektion betroffen. Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, welche Faktoren die myzeliogene oder carpogene Keimung jeweils begünstigen. Sicher ist nur, dass die Keimung der Sklerotien durch chemische Signale der Wirtspflanze stimuliert wird (Masirevic & Gulya, 1992).

Da sich *S. sclerotiorum* peritroph und somit im Gegensatz zu obligat biotrophen Pathogenen von abgestorbenem Gewebe ernährt, werden spezifische Mechanismen eingesetzt, die es dem Pathogen ermöglichen, in das Pflanzengewebe aktiv einzudringen. Diese Mechanismen beinhalten eine Mazeration des Gewebes durch die Sekretion von zellulolytischen und pektinolytischen Enzymen, wie z.B. Endo- und Exogalacturonasen, Pektinmethylesterasen

und sauren Proteasen (Riou *et al.*, 1991; Waksman *et al.*, 1991; Billon-Grand *et al.*, 2002; Reignault *et al.*, 2008). Diese Enzyme sind weitestgehend in einem sauren Milieu aktiv, welches durch die kontinuierliche Pathogensekretion des Phytotoxins Oxalsäure aufrechterhalten wird (Cotton *et al.*, 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Kombination aus Sekretion von Oxalsäure und die Funktionalität der zellwandabbauenden Enzyme maßgeblich zum Grad der Pathogenität bzw. Virulenz beiträgt (Ziman *et al.*, 1998; Favaron *et al.*, 2004). Studien mit Oxalsäure-defizienten *Sclerotinia*-Mutanten haben gezeigt, dass eine Absenz von Oxalsäure die Funktionalität der pathogenrelevanten lytischen Enzyme negativ beeinflusst (Godoy *et al.*, 1990). In der Sonnenblume konnte zudem gezeigt werden, dass in *Sclerotinia*-infizierten Hypokotylen die Oxalsäure durch ihre systemische Verteilung in der Pflanze mitunter die Ausprägung von Welkesymptomen verursacht (Noyes & Hancock, 1981). Da die Sekretion von Oxalsäure für das Pathogen als Pathogenitätsfaktor von hoher Relevanz ist, wurden bereits Oxalsäure-Behandlungen von Pflanzen zur Selektion von resistenten Genotypen eingesetzt (Kolkman & Kelly, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass Oxalsäure-degradierende Genotypen eine geringere Anfälligkeit gegen *S. sclerotiorum* aufweisen (Thompson *et al.*, 1995; Kesarwani *et al.*, 2000; Donaldson *et al.*, 2001). In transgenen Sonnenblumen konnte die Degradierung von Oxalsäure durch eine konstitutive Expression eines aus Weizen isolierten Oxalatoxidase (OXO)-Gens herbeigeführt werden (Hu *et al.*, 2003). Es konnte auch hier gezeigt werden, dass die Pflanzen eine Resistenz gegen *S. sclerotiorum* aufweisen.

In jüngster Zeit konnte der Einsatz von transkriptomischen Methoden zur Analyse von molekularen Grundlagen von Wirt-Pathogen-Interaktionen einen Einblick in die Mechanismen der Pathogenabwehr und Resistenzausprägung gewähren. Ein Großteil dieser Untersuchungen ermöglichte insbesondere molekulare Einblicke zur Interaktion zwischen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* und diversen Pathogenen (van der Biezen *et al.*, 2000; Roland & Jones, 2001; Narusaka *et al.*, 2003). Hinreichende Sequenzinformationen, wie sie beispielsweise für *A. thaliana* vorliegen, sind dennoch für die meisten Pflanzenarten und für viele Pathogene nicht verfügbar. Untersuchungen zur Interaktion zwischen *S. sclerotiorum* und diversen Wirtspflanzen auf molekularer Ebene liegen beispielweise für Raps vor (Liu *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007). Es sind bisher keine transkriptomischen Untersuchungen zur Interaktion zwischen *S. sclerotiorum* und der Sonnenblume als Wirtspflanze beschrieben worden. Weitere Untersuchungen zur Isolation und Charakterisierung von Pathogen-induzierten Genen in *Helianthus* sind z.B. für die Interaktion mit

Plasmopara halstedii in der Literatur beschrieben (Mazeyrat *et al.*, 1998; Mazeyrat *et al.*, 1999; Alignan *et al.*, 2006; Darvishzadeh *et al.*, 2008). Bisher beruhen die Mehrzahl an Analysen in der Gattung *Helianthus* zur Interaktion mit *S. sclerotiorum* primär auf biochemischen, physiologischen und insbesondere populationsgenetischen Untersuchungen in Feldversuchen zur Ermittlung potentieller Quantitative Trait Loci (QTL) (Tal & Robeson, 1986; Bazzalo *et al.*, 1991; Achbani *et al.*, 1996; Degener *et al.*, 1998; Micic *et al.*, 2005; Reimonte & Castano, 2008).

Im Pflanzenreich verfügen Wildarten über zahlreiche Resistenzen und Toleranzen gegen abiotische und biotische Stressoren (Singh *et al.*, 1998; Langridge *et al.*, 2006; Proite *et al.*, 2007), deren Resistenzmechanismen jedoch oftmals nicht hinreichend charakterisiert sind. Eine hohe genetische Diversität, welche eine potentielle Quelle für wertvolle, agronomische Merkmale darstellt, liegt im speziellen auch in der Gattung *Helianthus* vor (Seiler, 1992). Insbesondere die perennierenden Wildarten stellen ein reichhaltiges Genreservoir für diverse Resistenzen und Toleranzen gegen abiotische und biotische Faktoren dar (Seiler, 1992; Skoric, 1993; Lexer *et al.* 2003). Die Gattung *Helianthus*, Familie *Asteraceae*, Tribus *Heliantheae*, besteht aus insgesamt 49 distinkten Arten mit 37 perennierenden und 12 annualen Spezies (Heiser *et al.*, 1969; Schilling & Heiser, 1981; Sossey-Alaoui *et al.*, 1998). Eine weitere Unterteilung der Arten wird in Form von Sektionen vorgenommen, von denen in der Sektion *Helianthus* die meisten annualen Arten enthalten sind und die heterogene Sektion *Divaricati* überwiegend durch perennierende Arten repräsentiert wird. Die engste Verwandtschaft besitzt die Gattung *Helianthus* innerhalb der *Asteraceae* zu der Pflanzengattung *Phoebanthus* (Schilling, 2001). Die meisten *Helianthus*-Arten besitzen eine Chromosomenzahl von $n = 17$ und sind durch einen diploiden Chromosomensatz gekennzeichnet (Robinson, 1979). Es existieren aber auch polyploide Formen, wie z.B. *H. californicus* (6x), *H. tuberosus* (6x) oder *H. schweinitzii* (4x). Bis heute ist noch nicht eindeutig geklärt, ob die zugrundeliegende Chromosomenzahl von $n = 17$ die karyotypische Basiszahl darstellt oder gar durch Polyploidie aus einer Urform entstanden ist. Die genetische Variabilität der Sonnenblumenwildarten liegt primär in der Diversität der Habitate, an welche die Wildarten adaptiert sind, sowie in ihrer starken Modifizierbarkeit durch Umwelteinflüsse und in dem Auftreten von Introgression begründet (Heiser *et al.*, 1969; Seiler & Rieseberg, 1997; Sambatti & Rice, 2006).

Trotz der hohen Diversität des Wildartgenpools der Gattung *Helianthus* sind Quellen für abiotische und biotische Resistenzen bislang selten aus diesem Genreservoir in der Züchtung von Kultursonnenblumen genutzt worden. Begründet ist dies insbesondere in somatischen und physiologischen Inkompatibilitäten zwischen den annualen und den perennierenden Formen der Gattung *Helianthus* (Schuster, 1993). Neuere pflanzenbiotechnologische Verfahren, wie das Embryo Rescue sowie die somatische, symmetrische und asymmetrische Hybridisierung (Jan, 1997; Henn *et al.*, 1997; Sukno *et al.*, 1999; Binsfeld *et al.*, 2000; Binsfeld & Schnabl, 2002; Schnabl *et al.*, 2002; Rönicke *et al.*, 2004) ermöglichen eine stabile Introgression von Wildartgenom in die Kultursonnenblume. Insofern erlangt die Evaluierung, Detektion und Aufklärung diverser Resistenzmechanismen aus dem perennierenden Genpool eine besondere Bedeutung. In der Kultursonnenblume sind keine Genotypen mit dauerhafter Resistenz gegen das Pathogen *S. sclerotiorum* bekannt, lediglich unterschiedliche Suszeptibilitäten sind detektierbar. Das Merkmal der *Sclerotinia*-Resistenz in *Helianthus annuus* ist polygen determiniert, wobei der additive Charakter überwiegt (Vear & Tourvieille, 1988; Castano *et al.*, 1993; Castano *et al.*, 2001). In den Wildarten sind die Resistenzen gegen *S. sclerotiorum* zwar schon seit längerem bekannt (Skoric, 1987; Henn *et al.*, 1997; Cerboncini *et al.*, 2002), aber bis heute sind die molekularen Mechanismen, auf denen die Resistenz beruht, noch weitestgehend unbekannt. Da pflanzenbauliche Maßnahmen, biologische Maßnahmen und insbesondere chemische Bekämpfungsmaßnahmen gegen *S. sclerotiorum* oft unwirksam und/oder unökonomisch sind (Mestries *et al.*, 1998; von Tiedemann, 2001), besitzt die Züchtung und Bereitstellung von *Sclerotinia*-resistenten Sonnenblumensorten aus ökologischen und ökonomischen Aspekten auch heute noch besondere Bedeutung.

Die Entwicklung erfolgreicher Strategien gegen Pathogene erfordert ein detailliertes Verständnis physiologischer und molekularer Prozesse, die zur Ausprägung von Resistenzmechanismen in den Pflanzen führen. Für die Interaktion zwischen dem Pathogen *S. sclerotiorum* und diversen resistenten Sonnenblumenwildarten existieren bisher nur wenige Informationen zu den molekularen Hintergründen der Resistenzausprägung. Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit eine umfassende Untersuchung der Interaktion zwischen dem Pathogen *S. sclerotiorum* und zwei resistenten *Helianthus*-Genotypen AC 7 und AC M unter kontrollierten Bedingungen zu gewährleisten. Es soll eine Evaluierung der phänotypischen Symptomausprägung der *Sclerotinia*-infizierten Wildarten anhand von biometrischen und phytochemischen Daten erfolgen, um im Weiteren transkriptomische Analysen der Interaktion zwischen *S. sclerotiorum* und resistenten *Helianthus*-Wildarten vorzunehmen. Mit

der Verwendung der sensitiven Differential Display (DD)-Methodik gekoppelt an eine kapillargelelektrophoretische Auftrennung der cDNA-Fragmente, soll das Transkriptom der resistenten Genotypen postinfektionell untersucht werden. Dabei steht die Isolierung und Charakterisierung von differentiell exprimierten Transkripten, die potentiell an der Resistenzausprägung beteiligt sein könnten, im Vordergrund. Da noch keine etablierten Tools zur statistischen Auswertung von kapillargelelektrophoretischen Daten zur Verfügung stehen, ist die Etablierung und Evaluierung von Datenreduktionsalgorithmen zur Selektion differentiell exprimierter Kandidatengene aus den resistenten *Helianthus*-Arten ein weiteres Ziel dieser Arbeit.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN, KITS UND ENZYME

Chemikalien

Acetonitril	Promochem
Mikro-Agar	Duchefa
Phyto-Agar	Duchefa
Agarose	Peqlab
Ameisensäure	Merck
Ampicillin	Sigma
Benzen	Merck
Calciumcarbonat	Merck
Calciumchlorid	Roth
Chloralhydrat	Merck
Chlorogensäure	Chromadex
Chlortetracyclin	Sigma
dNTP Set	GE Healthcare
EDTA	Roth
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Electran
Ethylacetat	Merck
Ethylmethylketon	Merck
Folin-Ciocalteau´s phenol reagent	Fluka
Gallussäure	Merck
Glucose	Roth
Glycerin	Roth
100 bp Größenstandard	Genecraft
1 kb Größenstandard	Genecraft
Hefeextrakt	Roth
Isopropanol	Merck
Kaffeesäure	Fluka
Kaliumchlorid (KCl)	Applichem

Kaliumhydroxid (KOH)	Roth
Loading Dye solution	Fermentas
Magnesiumchlorid ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Magnesiumsulfat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Merck
β -Mercaptoethanol	Applichem
MES (2-N-Morpholino-Ethansulfonsäure)	Duchefa
Methanol	Merck
Murashige&Skoog (MS)-Salze	Duchefa
Naphthylessigsäure (NAA)	Duchefa
Natriumcarbonat	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth
Natriumhypochlorit (NaOCl)	Roth
Natriumsulfit	Merck
Penicillin	Sigma
Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1)	Amresco
Potato Dextrose Agar	Duchefa
Potato Dextrose Broth	Duchefa
PVP	Merck
PVPP	Merck
Saccharose	Duchefa
Sample Loading Solution (SLS)	Beckman-Coulter
SDS	Applichem
Streptomycinsulfat	Roth
Tomatensaft	Albi
Tris-HCl	Applichem
Tris-HAc	Applichem
Trypton	Merck
Tween 20	Applichem
Urea	Calbioch
Kits	
CleanSeq Kit	Agencourt
DNA Size Standard Kit (600 bp)	Beckman-Coulter

Oligotex mRNA Kit	Qiagen
1st strand cDNA-Synthesis Kit for RT-PCR	Roche
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
RNeasy Plant Mini Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
RNA 6000 Lab Chip Kit	Agilent Technologies
Plasmid DNA Purification, NucleoBond®Xtra Midi	Macherey-Nagel
QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix	Qiagen
Quick Ligation™ Kit	New England BioLabs
Quick Start Kit	Beckman-Coulter
QuickLyse Kit	Qiagen
Oligotex mRNA Mini Kit	Qiagen
Gelextraktionskit	Qiagen

Enzyme

Taq DNA Polymerase	Fermentas
Phusion High Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes
Exonuclease I	NEB
DNase I	Novagen
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England BioLabs
EcoRV	New England BioLabs
RNase H	Applichem

2.2 MEDIEN UND PUFFER

MS-Anzuchtmedium:	30	g	Saccharose
	2,5	g	MS-Salze
	0,6	g	MES
	8	g	Phyto-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Einstellung des pH-Wertes mit KOH auf pH 5,7.

½ MS-Anzuchtmedium:	10	g	Saccharose
	1,25	g	MS-Salze
	0,6	g	MES
	8	g	Phyto-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Einstellung des pH-Wertes mit KOH auf pH 5,7.

Potato Dextrose Agar (PDA):	39	g	Potato Dextrose Agar
	5	g	Micro-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Potato Dextrose Agar⁺ (PDA⁺):	39	g	Potato Dextrose Agar
	5	g	Mikro-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Nach dem Autoklavieren (121°C, 20 min) wurden steril hinzugefügt:

50	mg	Streptomycin
50	mg	Penicillin
50	mg	Chlortetracyclin

Tomatensaft-Agar:	12	g	Potato Dextrose Broth (PDB)
	3	g	CaCO ₃
	200	mL	Tomatensaft
	20	g	Mikro-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

LB-Festmedium:	10	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
	15	g	Micro-Agar
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf pH 7,5.

Nach dem Autoklavieren (121°C, 20 min) wurden bei Bedarf steril hinzugefügt:

100	mg	Ampicillin
-----	----	------------

LB-Flüssigmedium:	10	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	5	g	NaCl
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Einstellung des pH-Wertes mit NaOH auf pH 7,5.

Nach dem Autoklavieren (121°C, 20 min) wurden bei Bedarf steril hinzugefügt:

100	mg	Ampicillin
-----	----	------------

SOC-Medium:	20	g	Trypton
	5	g	Hefeextrakt
	10	mM	NaCl
	2,5	mM	KCl
	ad 1000	mL	Aqua bidest.

Nach dem Autoklavieren (121°C, 20 min) wurden steril hinzugefügt:

	10	mM	MgCl ₂ x 6H ₂ O
	10	mM	MgSO ₄ x 7H ₂ O
	20	mM	Glucose
DNA-Extraktionspuffer:	0,3	M	NaCl
	50	mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	20	mM	EDTA
	5	M	Urea
	0,5	%	SDS (w/v)
	2	%	PVP (w/v)
	5	%	β-Mercaptoethanol (v/v)
	0,12	%	Natriumsulfit (w/v)
TAE-Puffer:	40	mM	Tris-HAc (pH 8,5)
	1	mM	EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer:	10	mM	Tris-HCl (pH 8,0)
	1	mM	EDTA (pH 8,0)

2.3 WIRT-PATHOGEN-SYSTEM

2.3.1 *Helianthus* spp.

Für die Anzucht *in vitro* und zur Durchführung der Gewächshausversuche standen Achänen der annualen *Sclerotinia*-anfälligen *Helianthus annuus* L. cv. Albena (KWS, Einbeck), sowie Rhizome und *In vitro*-Pflanzen aus schon bestehenden Kulturen der perennierenden *Sclerotinia*-resistenten *Helianthus*-Arten Accession M und Accession 7 aus dem Nutzpflanzengarten (Botanische Gärten, Uni Bonn) und dem Institut für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanze (IMBIO, Uni Bonn) zur Verfügung.

2.3.1.1 *In vitro*-Vermehrung

Rhizome von unsterilen Mutterpflanzen der Wildsonnenblumenart *H. maximiliani* wurden im Frühjahr aus Feldbeständen gesammelt und *in vitro* als Vorbereitung zur Oberflächendesinfektion mit sterilem Leitungswasser gründlich abgewaschen. Es folgte eine Behandlung der Rhizome mit 0,5 %igem NaOCl für 30 min und anschließend ein 2-maliges Waschen mit sterilem Leitungswasser. Zum Trocknen wurden die Rhizome auf einem sterilen Filtertuch ausgelegt und nach dem Trocknen auf ½ MS-Medium ausgelegt. Nach Ausbildung von Wurzeln und Sproß innerhalb von 4 Wochen wurden die *in vitro* Pflanzen zur Weiterkultivierung in Nodienabschnitte geteilt und auf MS-Anzuchtmedium gesetzt. Für die *In vitro*-Vermehrung von AC M wurden die Segmente nach Teilung zusätzlich kurz in NAA (1 mg/ml) getaucht, um die Wurzelbildung zu induzieren.

Bei der *In vitro*-Anzucht der Sorte Albena wurde eine Oberflächendesinfektion der Achänen durchgeführt. Dafür wurden die Achänen mit Aqua dest. gründlich abgewaschen und zur Entfernung der Beizung in 70 %iges Ethanol getaucht. Anschließend wurden die Samenoberflächen in einer 4,5 %igen Natriumhypochloritlösung unter Zusatz von einem Tropfen Tween 20, für 30 min unter ständigem Rühren desinfiziert. Zur Entfernung der Natriumhypochloritlösung wurden die Achänen abschließend 2x mit Aqua dest. gewaschen und zur sterilen Anzucht auf MS-Anzuchtmedium ausgelegt. Die Kultivierung aller *In vitro*-Pflanzen fand in einem Pflanzenwachstumsschrank (B3-400E, Snijders, Niederlande) mit Tag-Nacht-Rhythmus (14 h Licht, 26 °C und 10 h Dunkelheit, 24°C) und unter kontrollierter Lichtintensität von $210 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-2}$ statt.

2.3.1.2 Pflanzenanzucht im Gewächshaus

Die Aussaat und Keimung der Achänen der annuellen Sonnenblumensorte Albena erfolgte in Pflanzschalen (60x40x6 cm) in einem Substrat zusammengesetzt aus Muttererde, Torf und Sand im Verhältnis 2:1:1 (w:w:w). Die Keimung fand im Gewächshaus bei einer Temperatur von 24°C und bei 70 % rLF statt. Nach 10-14 Tagen wurden die gekeimten Pflanzen pikiert und vereinzelt in Plastiktöpfe (Ø 20 cm) mit Muttererde und Torf in einem Verhältnis 1:1 (w:w) gepflanzt. Bei der Anzucht der Sonnenblumenwildarten wurden *In vitro*-Pflanzen schrittweise an die klimatischen Bedingungen im Gewächshaus angepasst und ebenfalls vereinzelt in Plastiktöpfe (Ø 20 cm) mit Muttererde und Torf in einem Verhältnis 1:1 (w:w) angezogen. Die Pflanzenanzucht der annuellen und perennierenden Pflanzen wurde gleichermaßen im Gewächshaus bei einem Tag-Nacht-Rhythmus mit Tagestemperaturen von 22 ± 4 °C und Nachttemperaturen von 19 ± 4 °C bei relativen Luftfeuchten von 70 ± 10 % durchgeführt.

2.3.2 *Sclerotinia sclerotiorum*

Ein Isolat des pertotrophen Ascomyceten *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) De Bary (gesammelt 1997 in Sindelfingen, Baden-Württemberg) wurden für die Kultivierung *in vitro* und die Inokulationsversuche im Gewächshaus verwendet.

2.3.2.1 Kultivierung von *S. sclerotiorum*

Die *In vitro*-Kultivierung von *S. sclerotiorum* wurde ausschließlich auf Festmedium vorgenommen. Dabei wurde für die Dauerkultivierung das Standardmedium Tomatensaft-Agar verwendet. Die beimpften Platten wurden bei 21 °C im Dunkeln inkubiert. Eine Überimpfung auf frische Tomatensaft-Agarplatten fand alle 8 Wochen statt. Zur Erhaltung der Virulenz wurde halbjährlich eine Wirtspassage an der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena durchgeführt. Dafür wurden die von Agarplatten abgesammelten Sklerotien mit 1,4 %-igem Natriumhypochlorit 30 s oberflächendesinfiziert, 2 x in Aqua dest. gewaschen und zum Trocknen auf sterilem Filterpapier ausgelegt. Die Sklerotien wurden direkt zur Inokulation der Sonnenblumenstängel verwendet. Dafür wurde jeweils der Stängel einer Pflanze im Blühstadium mit einem Skalpell leicht angeritzt und ein oberflächendesinfiziertes Sklerotium eingeführt. Zur Erhaltung der Feuchtigkeit wurde die Infektionsstelle vorsichtig mit Parafilm umwickelt und zur Befeuchtung nach Bedarf mit Wasser besprüht. Nach vier Tagen wurden

die infizierten Stängelabschnitte von der Pflanze abgetrennt, in kleinere etwa 1 cm lange Segmente geteilt und auf antibiotikahaltiges Nährmedium (PDA⁺) ausgelegt. Die Inkubation fand bei 21 °C im Dunkeln statt. Nach 24 - 48 h wurden einzeln auswachsende Hyphen auf PDA überimpft und ebenfalls bei 21 °C im Dunkeln für 7 Tage inkubiert. Bei Reinheit und zur Dauerkultivierung wurden die Isolate entsprechend auf das Standardmedium Tomatensaft-Agar überimpft.

2.3.3 Inokulationsversuche

Zur Durchführung der Inokulationsversuche wurde der nach Bertrand & Tourvieille (1987) und Achbani *et al.* (1994) beschriebene Myzel-Blatttest mit geringer Modifikation verwendet. Bei den Versuchen im Gewächshaus wurden Blatinokulationen mit den *Sclerotinia*-resistenten Wildartaccessionen AC M und AC 7 und dem Hybrid cv. Albena durchgeführt. Zur Inokulation wurden von 7 Tage alten mit *S. sclerotiorum* bewachsenen Agarplatten ein gleichmäßig bewachsenes Agarstück (Ø 1 cm) mit der Myzelseite nach unten auf die Hauptader eines vollständig ausgewachsenen Blattes gelegt und mit einem Stück Parafilm umwickelt. Es wurden 10 - 20 Pflanzen pro Variante für die Gewächshausuntersuchungen eingesetzt. Die Versuche wurden jeweils 2 - 4 Mal wiederholt. Um eine *Sclerotinia*-Infektion unter kontrollierten Bedingungen zu gewährleisten, wurde der Inokulationsversuch im Gewächshaus 7 Tage lang bei 23 °C/20 °C (Tag/Nacht) und 90-100 % rLF durchgeführt. Die Bestimmung des Infektionszeitpunkts und die Messung der Läsionslängen erfolgten jeweils in einem 24h-Rhythmus an 1, 2, 3, 4, 5 und 6 DPI (Days Post Inokulum).

2.3.4 Histologische Untersuchungen

Zur mikroskopischen Untersuchung von *Sclerotinia*-infizierten Blattgewebe wurden mit Hilfe eines Korkbohrers (Ø 2 cm) infizierte Pflanzensegmente ausgestanzt und zur Entfärbung in 20 %igem Chloralhydrat fixiert. Um die pilzlichen Strukturen von dem pflanzlichen Gewebe zu differenzieren, wurde das fixierte Blattgewebe zur Färbung von Kohlenhydraten mit Säurefuchsin-Lactophenol gefärbt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem konfokalen Laser-Scan-Mikroskop LSM 300 (CLSM) von Zeiss (Göttingen, Deutschland).

2.3.5 Befallsermittlung und statistische Auswertung

Die Bonitur der inokulierten Blätter erfolgte nach 1, 2, 3, 4, 5 und 6 DPI anhand einer visuellen Beurteilung des Zeitpunktes der Infektion und durch Messung der Läsionslängen für alle untersuchten Pflanzenarten. Zur Detektion von signifikanten Unterschieden zwischen den Läsionslängen der untersuchten Pflanzenarten, wurde eine Varianzanalyse mit anschließendem multiplen Mittelwertsvergleich nach Tukey-Kramer (HSD) für $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) durchgeführt. Die Voraussetzungen für die Durchführung der Varianzanalyse wurden mit dem Varianzhomogenitätstest nach Levene überprüft. Alle statistischen Tests wurden mit Hilfe des Statistikprogramms Jmp7 (SAS, Deutschland) durchgeführt.

2.4 ANALYSE DES PHENOLSTOFFWECHSELS

2.4.1 Extraktion von phenolischen Verbindungen

Das frisch geerntete Blattmaterial wurde einzeln in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Zur Gewinnung von phenolischen Verbindungen wurde das gefrorene Pflanzengewebe mit Mörser und Pistill in flüssigem Stickstoff fein zerrieben und gefriergetrocknet (Christ, Alpha 2-4 LSC). 50 mg (TG) des pulverisierten Pflanzenmaterials wurden mit 1 mL 50 %igem Methanol aufgenommen und 90 s bei RT gevortext. Zur Sedimentation wurde das Homogenat bei 4 °C und 15.000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der flüssige Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und als Rohextrakt zur qualitativen und quantitativen Analyse von phenolischen Inhaltsstoffen verwendet.

2.4.2 Bestimmung des Gesamtphenolgehalts

Um den Gesamtphenolgehalt von infizierten und nicht infizierten Pflanzenproben zu bestimmen, wurde der colorimetrische Assay unter Verwendung des Folin-Ciocalteu Reagenz nach Singleton & Rossi (1965) durchgeführt. Es wurden 20 μL des Rohextrakts (s. 2.4.1) mit 1,59 mL Aqua bidest. und 100 μL Folin-Ciocalteu Reagenz vermischt. Nach etwa 1 min wurden 300 μL einer gesättigten Natriumcarbonatlösung hinzugefügt und nochmals gründlich gemischt. Nach einer Inkubation von 2 h bei RT im Dunkeln wurde die Absorption

der Proben photometrisch bei 765 nm gemessen. Als Referenzsubstanz wurde Gallussäure in Konzentrationen von 50, 100, 150, 250, 500 und 1000 mg/L eingesetzt. Die Konzentrationen der Proben wurden anhand der erstellten Eichreihe ermittelt und als Gallussäureequivalente (GAE) angegeben.

2.4.3 Nachweis von phenolischen Verbindungen mittels Dünnschichtchromatographie (HPTLC)

Die Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie diente zur qualitativen Analyse und zum Nachweis von phenolischen Inhaltsstoffen aus *Helianthus* sp. 10 µL der Rohextrakte (s. 2.4.1), sowie der Standards (0,5 mg/mL) wurden mit einer automatisierten Probenapplikation (Linomat 5, Camag, Deutschland) auf Silikagelplatten (Camag, 60 F 254, 20x10 cm) als 8 mm-Bande aufgesprüht. Eine Auftrennung der phenolischen Substanzen erfolgte nach 10-minütiger Sättigung der DC-Platte mit dem Fließmittelgemisch in einer Horizontalentwicklungskammer (20x10 cm, Camag, Deutschland). Als mobile Phase dienten entweder Fließmittelgemisch A (Benzen:Essigsäure:Wasser, 10:7:3 (v:v:v)) oder Fließmittelgemisch B (Ethylacetat:Ethylmethylketon:Ameisensäure:Wasser, 15:9:3:3 (v:v:v:v)). Als Referenzsubstanzen wurden je Platte reine Kaffeesäure und reine Chlorogensäure eingesetzt. Vor der Entwicklung mittels mobiler Phase wurde die DC-Platte für 10 min mit dem entsprechenden Fließmittel in der Horizontalkammer gesättigt. Nach der Trennung wurden die DC-Platten mit UV-Licht (366 nm) im 90° Winkel bestrahlt und ausgewertet. Zur Identifizierung von phenolischen Verbindungen wurden die DC-Platten zusätzlich mit Folin-Ciocalteu-Lösung und anschließend mit Natriumcarbonatlösung gleichmäßig besprüht. Zur weiteren Charakterisierung der sichtbaren Banden wurden die jeweiligen Retentionsfaktoren (R_f -Wert) ermittelt.

2.4.4 Nachweis von Hydroxyzimtsäuren mittels Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC)

Die Trennung und Analyse von phenolischen Pflanzeninhaltsstoffen erfolgte mit der klassischen Hochleistungs-Säulenflüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography) (Shimadzu, Deutschland) und mit einem an das System gekoppelten mehrdimensionalen UV/VIS Photodioden-Array-Detektor (DAD) (LC-20A). Die Injektion des aufbereiteten Rohextrakts erfolgte manuell in eine Probenschleife mit einem definierten Injektionsvolumen von 20 µL. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Synergi Polar-RP-Säule (Phenomenex, 150 x 3,0 mm) mit Vorsäule (Phenomenex, 4,0 x 2,0 mm) unter Verwendung eines binären Gradienten mit einer Flussrate von 0,3 mL/min und einer

konstanten Säulentemperatur ($T_k = 30^\circ\text{C}$). Das Laufmittelsystem bestand aus Fließmittel A ($\text{H}_2\text{O}:\text{Acetonitril}:\text{Essigsäure}$, 1000:20:5 (v:v:v)) und Fließmittel B ($\text{Acetonitril}:\text{Essigsäure}$, 1000:5 (v:v)) und erfolgte mit dem in Tab. 1 dargestellten Gradienten.

Tab. 1: Lösungsmittel-Gradient für die Auftrennung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels HPLC.

Zeit [min]	Laufmittel B [%]	
0	4	isokratisch
0 - 90	33	Gradient
90 - 95	33	isokratisch
95 - 100	100	Gradient
105	4	Gradient

Phenolische Substanzen wurden nach ihrer Retentionszeit und ihrem UV-Spektrum ausgewertet. Die Konzentrationen der aufgetrennten phenolischen Substanzen wurden anhand der erstellten Eichreihe mit Chlorogensäure als Referenz ermittelt und als Chlorogensäureequivalente (CAE) angegeben.

2.4.5 Analyse der phenolischen Inhaltstoffe mittels LC-Massenspektrometrie (LC-MS)

Zur Strukturaufklärung der phenolischen Inhaltsstoffe aus den *Helianthus*-Wildarten wurde ein HPLC-System (Dionex, Idstein, Deutschland), ausgestattet mit einem UV/VIS Photodioden-Array-Detektor (UVD-340S), an ein LCQ classic Ionenfallen-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) gekoppelt. Die Datenermittlung und -auswertung erfolgte mit der Auswertungssoftware Xcalibur 2.0 SR 2. Die Fließmittel zur Auftrennung der Inhaltsstoffe mit HPLC setzten sich zusammen aus Fließmittel A ($\text{H}_2\text{O}:\text{Essigsäure}$, 1000:10 (v:v)) und Fließmittel B ($\text{Acetonitril}:\text{Essigsäure}$, 1000:10 (v:v)). Die Auftrennung erfolgte in einer C18-Säule (Phenomenex, 150 x 2 mm) mit Vorsäule (Phenomenex, 4,0 x 2 mm). 10 μL des aufbereiteten Rohextrakts wurden zur Analytik der phenolischen Inhaltsstoffe eingesetzt und mit einer Flussrate von 0,3 mL/min und einer konstanten Säulentemperatur von 35 $^\circ\text{C}$ zu den in Tab. 2 aufgeführten Konditionen aufgetrennt.

Tab. 2: Lösungsmittel-Gradient für die Auftrennung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels LC-MS.

Zeit [min]	Laufmittel B [%]	
0	0	isokratisch
0 - 60	30	Gradient
60 - 61	100	Gradient
61 - 70	100	isokratisch
70 - 71	0	Gradient
71 - 80	0	isokratisch

Die Massenspektrometrie wurde mit einer Ionisierung mit „Electrospray ionisation“ (ESI) im negativen Modus durchgeführt. Zur Verbesserung der Ionisierung polarer Substanzen wurde Methanol in den HPLC-Eluenten während einer Flussrate von 0,1 mL/min über eine T-Verbindung eingeführt. Die Parameter zur massenspektrometrischen Analytik wurden wie folgt eingestellt:

Source Spray Spannung:	- 4,0 kV
Sheathgasfluss:	90 arb
Auxiliarygasfluss:	5 arb
Kapillarenspannung:	- 10 V
Kapillarentemperatur:	310 °C
Tube Lens Offset	+ 20 V
First Octapole Offset	+ 4 V
Second Octapole Offset	+ 10 V
Trap DC Offset	+ 10 V
Fragmentationszeit	30 ms

2.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.5.1 Oligonukleotide

Tab. 3: Primersequenzen zur phylogenetischen Analyse der Internal Transcribed Spacer Regionen 1 und 2 von *Helianthus* spp.

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m [°C]	Quelle
ITS 1	5' -TCCGTAGGTGAACCTGCCG-3'	58	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 2-mod	5' -GCTACGTTCTTCATCGATGC-3'	58	Schilling <i>et al.</i> , 1998
ITS 3-mod	5' -GCATCGATGAAGAACGTAGC-3'	58	Schilling <i>et al.</i> , 1998
ITS 4	5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	58	White <i>et al.</i> , 1990
ITS 5-mod	5' -GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG-3'	58	Eckenrode <i>et al.</i> , 1985

Tab. 4: Sequenzen der Anchor-Primer für die RT-PCR und Differential Display-PCR.

Primer	Sequenz (5' → 3')
Oligo-dT ₁₇ -A-mod-Cy5	5' -Cy5-CGGGCCTCTTCGCTAT17A-3'
Oligo-dT ₁₇ -A-mod	5' -CGGGCCTCTTCGCTAT17A-3'
Oligo-dT ₁₇ -C-mod-Cy5	5' -Cy5-CGGGCCTCTTCGCTAT17C-3'
Oligo-dT ₁₇ -C-mod	5' -CGGGCCTCTTCGCTAT17C-3'
Oligo-dT ₁₇ -G-mod-Cy5	5' -Cy5-CGGGCCTCTTCGCTAT17G-3'
Oligo-dT ₁₇ -G-mod	5' -CGGGCCTCTTCGCTAT17G-3'

Tab. 5: Sequenzen der Arbitrary-Primer für die Differential Display-PCR.

Primer	Sequenz (5' → 3')
B01-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGTTTCGCTCC-3'
B02-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTGATCCCTGG-3'
B03-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGCATCCCCCTG-3'
B04-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGGACTGGAGT-3'
B05-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTGCGCCCTTC-3'
B06-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTGCTCTGCCC-3'
B07-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGGTGACGCAG-3'
B08-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGTCCACACGG-3'
B09-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTGGGGGACTC-3'
B10-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGCTGCTGGGAC-3'
B11-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGTAGACCCGT-3'
B12-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGCCTTGACGCA-3'
B13-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTTCCCCCGCT-3'
B14-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTCCGCTCTGG-3'
B15-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGGAGGGTGTT-3'
B16-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGTTTGCCCGGA-3'
B17-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGAGGGAACGAG-3'
B18-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGCCACAGCAGT-3'
B19-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGACCCCCGAAG-3'
B20-mod	5' -TTAGCTCACTCATTAGGGGACCCTTAC-3'

Tab. 6: Primersequenzen für die Sequenzierung von cDNA-Kandidatenfragmenten.

Primer	Sequenz (5' → 3')
CMV-F	5' -CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'
BGH-R	5' -TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
Oligo-dT ₁₇ -C-mod	5' -CGGGCCTCTTCGCTAT17V-3'

Tab. 7: Spezifische Primer für die Verifizierung der differentiellen Genexpression mit semiquantitativer Real-Time PCR.

Primer	Sequenz (5'→3')	T _m [°C]	Quelle
Ha-Act-F	5'-GCTAACAGGGAAAAGATGACTC-3'	52	Thomas <i>et al.</i> , 2003
Ha-Act-R	5'-ACTGGCATAAAGAGAAAGCACG-3'	52	Thomas <i>et al.</i> , 2003
SAMS-F	5'-ACGGTGATGCAGGTTTGAC-3'	55	/
SAMS-R	5'-CTGATGCCACAATGCTCTTG-3'	55	/
CP-F	5'-TACAATGCTTGTGGGATGGA-3'	52	/
CP-R	5'-AGCAGACATTCCTCTAGGTCACA-3'	52	/
CBP-F	5'-GAGTGGGGCCTTACCAGAAC-3'	52	/
CBP-R	5'-TCTCAAAGAAATTCTGCACATGA-3'	52	/
CCL-F	5'-GGCCACCTGATATCCTTTGT-3'	52	/
CCL-R	5'-TTGACAAGGATGGATGGCTA-3'	52	/

2.5.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.5.2.1 Gewinnung von genomischer DNA aus Pflanzenmesophyll

Die genomische DNA wurde aus den *in vitro* kultivierten Pflanzen von AC M, AC 7 und von 8 Tage alten *In-vitro*-Pflanzen der Sorte Albena gewonnen. Der Aufschluss von Pflanzenzellen (20 mg FG) erfolgte in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill. Das pulverisierte Pflanzenmaterial wurde in ein gekühltes 2 mL Eppendorf-Cap überführt, 400 µL Extraktionspuffer hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend wurden 400 µL Phenol-Chloroform-Isoamyl (25:24:1) beigefügt und für 10 min bei höchster Stufe gevortext. Zur Abzentrifugation von pflanzlichen Zellfragmenten wurden die Proben bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Cap überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden 0,7 Vol Isopropanol (100 %) hinzugefügt und bei 12.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen, das Pellet kurz luftgetrocknet und mit 70 %igem Ethanol 2x gewaschen. Nach

kurzer Lufttrocknung wurde das Pellet mit 40 μ L TE-Puffer mit RNase (10 μ g/mL) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.2.2 Gewinnung von Gesamt-RNA aus Pflanzemesophyll

Ribonucleinsäuren (RNA's) besitzen vergleichend zu Desoxyribonucleinsäuren eine zusätzliche 2'-Hydroxylgruppe im Ribosering und sind weitestgehend einzelsträngig. Diese Eigenschaften machen sie besonders anfällig hinsichtlich des exo- und endonucleolytischen Abbaus. Eine sachgerechte Lagerung von geerntetem Pflanzenmaterial, die Stabilisierung von RNA und die Inaktivierung von RNasen nach Aufschluss der Zellen sind für die Ausbeute und Qualität von RNA bedeutend. Für die Genexpressionsanalyse der *Helianthus-Sclerotinia*-Interaktion wurden Blattscheiben (~100 mg) mittels Korkbohrer (\varnothing 2,5 cm) aus infiziertem und nicht infiziertem Blattgewebe ausgestanzt, unmittelbar in flüssigen Stickstoff Schock gefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert, um Veränderungen im Genexpressionsmuster zu verhindern. Bei der Ernte von infiziertem Blattgewebe wurde besonders darauf geachtet, dass das entnommene Blattgewebe an die Läsion angrenzte.

Die Blattscheiben wurden in flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill pulverisiert, um einen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Damit eine maximale Ausbeute an mRNA (1-5 % der Gesamt-RNA) aus geringen Mengen an Pflanzengewebe erzielt werden konnte, wurde unmittelbar nach Zellaufschluss zuerst eine Isolation von Gesamt-RNA durchgeführt. Der RNeasy Plant Mini Kit mit Einsatz eines Guanidinisothiocyanat (GITC)-haltigen Denaturierungspuffer wurde zur RNA-Isolation gewählt. Die Methode basiert nach Homogenisierung der Gewebeproben auf einer Technik zur Bindung von RNA an eine Silikagelmembran. Diese Technik ermöglicht eine Isolierung von RNA-Spezies > 200 bp. Eine Trennung von RNA und anderen zellulären Bestandteilen und die Homogenisierung der Proben erfolgten mit dem QIAshredder (Qiagen, Deutschland) in einem Zentrifugationsschritt mittels einer Tischzentrifuge (Eppendorf, Deutschland). Die Handhabung und Aufreinigung von RNA erfolgte entsprechend nach Angaben des Herstellers. Die Gesamt-RNA wurde mit 50 μ L RNase-freiem H₂O eluiert. Die quantitative und qualitative Bestimmung der Gesamt-RNA-Gehalte wurde photometrisch mit Einsatz eines Bioanalyzers (Agilent 2100, USA) durchgeführt (s. 2.5.3). Zur Beseitigung von DNA-Kontaminationen wurden die Proben bei Bedarf mit RNase-freier DNase I (10 U, Novagen, Deutschland) für 15 min bei 37 °C behandelt. Eine Lagerung der Gesamt-RNA fand bis zur mRNA-Isolation bei -80 °C statt.

2.5.2.3 Isolierung von poly(A)⁺-RNA aus Gesamt-RNA

Aus der bereits isolierten Gesamt-RNA wurde die poly(A)⁺-RNA unter Verwendung des Oligotex mRNA Mini Kit gewonnen. Die Isolierung von poly(A)⁺-RNA nach dem Oligotex-Prinzip basiert auf einer kovalenten Bindung von Polystyren-Latex-Partikeln an den poly-A-Schwanz eukaryotischer mRNA und gewährleistet die selektive Trennung der mRNA von anderen nicht polyadenylierten RNA-Spezies (t-RNA, rRNA). Um einen Vergleich von cDNA-Fragmenten unterschiedlicher Proben innerhalb einer Pflanzenart und somit differentiell exprimierte Kandidaten zu ermitteln, wurden jeweils 6 µg Gesamt-RNA zur Isolation von poly(A)⁺-RNA verwendet. Um eine weitere Nivellierung zu erzielen, wurden bei der Isolation von poly(A)⁺-RNA jeweils 15 µL der Oligotexsuspension eingesetzt. Ansonsten erfolgte die Isolation nach Angaben des Herstellers. Abschließend wurde die angereicherte mRNA 2x mit jeweils 100 µL OEB-Puffer von der Säule eluiert. Die Lagerung der mRNA erfolgte bis zur cDNA-Synthese bei -20 °C.

2.5.2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR mit Verwendung des Qiaquick PCR Purification Kit beruht auf einer säulengestützten selektiven Bindung von DNA an eine Silikamembran. Die Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Je nach Bandenstärke (weniger stark – stark) wurde die Elution der aufgereinigten DNA mit einem entsprechenden H₂O-Volumen (30 – 50 µL) durchgeführt.

2.5.2.5 Aufreinigung von DNA zur Sequenzierung

Für optimale Sequenzierungsergebnisse ist u.a. die Reinheit der DNA entscheidend. Folglich wurde zur Aufreinigung der Sequenzierungs-PCR die SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization)-Technologie (CleanSeq-Kit) angewandt. Die Technik basiert auf einer Aufreinigung durch Immobilisierung von Nukleinsäuren an paramagnetische Mikropartikel (magnetic beads, Ø 1 µm). Es wurden 20 µL Sequenzierungsansatz mit 10 µL magnetic beads und 62 µL 85 %igem Ethanol gründlich vermischt und auf eine Magnetplatte (Agencourt Bioscience Corporation, USA) gestellt. Nach 3 min wurde die Lösung abpipettiert, zum Waschen durch 100 µL 85 %igem Ethanol ersetzt und innerhalb von 1 min wurde die Lösung wiederum abpipettiert und verworfen. Die Proben wurden nun von der Magnetplatte genommen, für 3 min luftgetrocknet und zur Elution für 5 min mit 40 µL SLS (Sample

Loading Solution) versetzt. Die nun ungebundene in SLS gelöste DNA wurde, um die Bindung der Mikropartikel an die Magnetplatte zu gewährleisten, wiederum auf die Magnetplatte gestellt. Nach 3 min wurden 35 µl der Lösung vorsichtig abpipettiert. Der gesamte Ansatz diente zur Sequenzierung mittels Kapillargelelektrophorese (s. 2.5.5.2.2).

2.5.2.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung von größeren Plasmidmengen, die zum Einsatz für die Klonierung benötigt wurden, wurde der Plasmid DNA Purification NucleoBond® Xtra Midi Kit nach Standardvorschrift verwendet. Aus 100 mL einer Übernachtskultur wurden bis zu 300 µg Plasmid-DNA isoliert und nach Aufreinigung bei -20°C gelagert.

Die Mini-Prep von Plasmid-DNA aus DH5α erfolgte mit Hilfe des QuickLyse Plasmid-Aufreinigungskits. 1,5 mL einer Übernachtskultur (16 h) wurden bei 15.000 rpm für 1 min zentrifugiert, das Medium verworfen und das Pellet mit 400 µL eiskaltem QLL-Puffer zur Lyse der *E. coli*-Zellen gründlich gevortext. Die nachfolgenden Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zur Elution der Plasmid-DNA wurden 50 µL EB-Puffer eingesetzt und die Plasmid-DNA nach Aufreinigung bei -20 °C gelagert. Mit diesem Verfahren wurden bis zu 5 µg Plasmid-DNA gewonnen, die zur Sequenzierung eingesetzt werden konnten.

2.5.2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Trennung wurden ausgewählte Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel präparativ herausgeschnitten und in 1,5 mL Eppendorf-Caps überführt. Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorschrift des Herstellers. Je nach Bandenstärke (weniger stark – stark) wurde die DNA aus der Silikamembran mit einem entsprechenden H₂O-Volumen (30 – 50 µL) eluiert.

2.5.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Alle Quantifizierungen von DNA bzw. cDNA erfolgten photometrisch bei A₂₆₀ mit einem Nano Drop UV-VIS Spektrophotometer (ND-1000, Peqlab). Die Reinheit der DNA wurde durch die Errechnung des Verhältnisses von A₂₆₀/A₂₈₀ ermittelt.

Zur Quantifizierung von Gesamt-RNA aus Pflanzenmesophyll wurde der Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA) eingesetzt. Die Bestimmung von RNA-Konzentrationen beruht

auf einer nanogeoelektrophoretischen Auftrennung und ermöglicht die Quantifizierung von geringen Probenmengen. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe eines Größenstandards durchgeführt und beruht auf der Errechnung der Gesamt-RNA aus dem ribosomalen Verhältnis, da diese 80 – 90 % der Gesamt-RNA beträgt und den Hauptteil der zellulären RNA darstellt.

2.5.4 PCR-Verfahren

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde zur präparativen und analytischen Amplifikation von DNA-Molekülen eingesetzt. Je nach Verwendungszweck der Amplifikate wurde eine entsprechende PCR-Methode gewählt. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem Thermocycler (Biorad, Deutschland) durchgeführt.

2.5.4.1 PCR zur Amplifikation der ITS-Region

Zur phylogenetischen Analyse und Charakterisierung der verschiedenen *Helianthus*-Arten wurden Regionen des Internal Transcribed Spacer (ITS) amplifiziert und sequenziert. Für die Amplifikation der Region ITS 1 und ITS 2 wurden die ITS 4 und ITS 5-mod nach Schilling *et al.* (1998) eingesetzt (s. Tab.3, S. 21).

<u>PCR-Ansatz:</u>	2 µL	Template-DNA (20 ng/µL)
	5 µL	Puffer (10x)
	5 µL	MgCl ₂ (25 mM)
	1 µL	dNTP's (10 mM)
	0,5 µL	Taq-Polymerase (2,5 u)
	2,8 µL	Primer F (10 pmol/µL)
	2,8 µL	Primer R (10 pmol/µL)
	30,9 µL	H ₂ O

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	300	1
Denaturierung	95	30	} 35
Annealing	55	30	
Extension	72	120	
Finale Extension	72	600	1

Eine anschließende Sequenzierung der ITS-Region 1 und 2 fand mit den Primern ITS 1, ITS 2-mod, ITS 3-mod und ITS 4 statt. Ein multipler Sequenzvergleich erfolgte mit einer öffentlich zugänglichen ClustalW-Alinierung (NCBI, BLAST). Die phylogenetische Analyse zur Konstruktion eines ultrametrischen Stammbaums erfolgte mit dem frei verfügbaren Programm MEGA Version 4 (Tamura *et al.*, 2007).

2.5.4.2 Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

Poly(A)⁺-RNA eignet sich nicht direkt als Template für die Amplifikation mittels PCR, da sie einer hohen Gefahr der Degradation durch endogene und exogene RNasen unterliegt und nicht als Matrize für die Taq-Polymerasen dient. Die Reverse Transkriptase-PCR hingegen, ermöglicht das Umschreiben der RNA-Sequenz in einen komplementären cDNA (complementary DNA)-Strang mit Hilfe der Reversen Transkriptase und einem Oligo-dT-Primer, der im Bereich des Poly-A-Schwanzes am 3'-Ende der mRNA hybridisiert.

Zur Synthese von cDNA aus poly(A)⁺-RNA wurde der 1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV) (Roche, Deutschland) verwendet. Bei dieser hochspezifischen Reversen Transkription entsteht mit Hilfe der AMV-RT aus dem Avian-Myeloblastosis-Virus einzelsträngige cDNA, die ohne Aufreinigung direkt als Template für die Random-PCR eingesetzt werden kann. Die RT-PCR mit AMV-RT ermöglicht zum einen den Nachweis von gering vorhandenen Transkripten, da die Technik eine hohe Sensitivität aufweist und des weiteren wird eine hohe Prozessivität gewährleistet, da Transkripte bis zu 10 kb generiert werden können. Für die RT-PCR wurden 6,9 µL der bereits aus Blattgewebe isolierten

poly(A)⁺-RNA, 3,3 µL Oligo-dT₁₇-Primer (30 µM), bestehend zu je gleichen Anteilen aus modifizierten Oligo-dT₁₇-A, Oligo-dT₁₇-C und Oligo-dT₁₇-G, 2 µL dNTP's (1mM), 2 µL Reaktionspuffer (10x), 4 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL RNase-Inhibitor (50 units) und 0,8 µL AMV Reverse Transkriptase (20 units) eingesetzt. Die Anlagerung des Primers fand für 10 min bei 25°C statt. Die darauf folgende Reverse Transkription wurde bei einer Temperatur von 42°C durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Inaktivierung der AMV Reversen Transkriptase für 5 min bei 99°C erreicht.

2.5.4.3 Differential Display (DD)-PCR

Die Methode der Differential Display (DD)-PCR, erstmals durchgeführt von Liang & Pardee (1992), ist eine Technik, die eine Analyse von differentiell exprimierten mRNA-Populationen ermöglicht. Im Gegensatz zu anderen mRNA-Fingerprint Methoden, wie z.B. Substraktive Hybridisierung, ist bei dem Differential Display ein Vergleich von mehr als 2 Proben simultan möglich und ein geringes Probenmaterial meist ausreichend.

Der erste Schritt des Differential Display ist die RT-PCR (s. 2.5.4.2). Die revers transkribierte cDNA dient dann als Template für die Random-PCR-Reaktion. Als Arbitrary-Primer wurden Random-Primer eingesetzt, die mit Einsatz eines zu dem Poly(A)-Schwanz der mRNA komplementären Oligo-dT-Primers (Anchor-Primer) einen Bereich innerhalb der cDNA flankieren (s. Tab. 4 und Tab. 5, S. 21/22).

<u>DD-PCR-Ansatz:</u>	1 µL	Template-cDNA
	2 µL	Puffer (10x)
	1,5 µL	MgCl ₂ (25 mM)
	0,4 µL	dNTP's (10 mM)
	0,2 µL	Taq-Polymerase (2,5 u)
	1,4 µL	Arbitrary Primer (10 pmol/µL)
	1,4 µL	Oligo-dT-Primer-mod-Cy5 (10 pmol/µL)
	12,1 µL	H ₂ O

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	92	300	1
Denaturierung	92	30	} 10
Annealing	33	60	
Extension	72	60	
Denaturierung	95	30	} 30
Annealing	64	60	
Extension	72	60	
Finale Extension	72	600	1

Die Produkte der Amplifikation wurden zur Ermittlung differentiell exprimierter cDNA-Fragmente mit Einsatz der Kapillargelelektrophorese (s. 2.5.5.2.1) hinsichtlich ihrer Größe voneinander getrennt und anhand ihrer Cy5-Fluoreszenzmarkierung detektiert. Zur Sequenzanalyse von Kandidatenfragmenten wurden die Proben in einem 2 % Agarosegel nochmals aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt und ausgewählte Banden präparativ aus dem Agarosegel herausgeschnitten. Die cDNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel eluiert (s. 2.5.2.7), reamplifiziert (s. 2.5.6.1), kloniert (s. 2.5.6) und sequenziert (s. 2.5.4.5).

2.5.4.4 Screening-PCR zum Nachweis rekombinanter Plasmide

Um die Größe des Inserts zu ermitteln und somit die Klone mit rekombinanten Plasmiden zu überprüfen und auszuwählen, wurde eine Screening-PCR nach dem Klonierungsschritt durchgeführt. Dafür wurden zuerst 20 Klone randomisiert vom Selektivmedium gepickt und in 100 µL LB-Flüssigmedium mit Ampicillin über Nacht kultiviert. 1 µL dieser Bakterienkultur wurde in 100 µL sterilen Aqua bidest. verdünnt und 1 µL der Verdünnung für die Screening PCR als Template verwendet. Des Weiteren wurden für die Durchführung der PCR 5 µL Puffer (10x), 5 µL MgCl₂ (25 mM), 1 µL dNTP's (10 mM), 0,5 µL Taq-Polymerase (2,5 u, Fermentas Life Sciences), 2,8 µL CMV F (10 pmol/µL), 2,8 µL BGH R

(10 pmol/ μL) und 30,9 μL H_2O vermischt und dem folgenden PCR-Programm unterzogen:

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	} 35
Annealing	60	30	
Extension	72	30	
Finale Extension	72	600	1

Die Auswahl der Kandidatenklone erfolgte mit Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 1 %-igem Agarosegel (s. 2.5.5.1).

2.5.4.5 Cycle Sequenzierungs-PCR

Eine Sequenzierung von DNA-Molekülen erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger *et al.* (1977). Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung des Quick Start Kits (Beckman-Coulter, Deutschland). Zuvor aufgereinigte spezifische PCR-Produkte wurden als Template für die Sequenzierungs-PCR eingesetzt. Die Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer Region wurde mit den Primern aus Tab. 3 (S. 21) durchgeführt. Für die Sequenzierung der klonierten cDNA-Kandidatenfragmente aus der DDRT-PCR wurden die vektorspezifischen Primer CMV-F und BGH-R bzw. der Oligo-dT-Primer (Tab. 6, S. 22) eingesetzt. Für die Sequenzierungs-PCR wurden 50 fmol Template-DNA, 2 μL Primer (10pmol/ μL), 6 μL Quick Start Mix (Beckman-Coulter, Deutschland) vermischt und mit Aqua bidest. auf ein Endvolumen von 20 μL aufgefüllt. Die PCR wurde wie folgt programmiert:

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Denaturierung	96	20	} 30
Annealing	50	20	
Extension	60	240	

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte nach Aufreinigung der Fragmente (s. 2.5.2.5) kapillargelelektrophoretisch.

2.5.4.6 Semiquantitative Real-Time PCR

Zur Verifizierung der differentiellen Expression der cDNA-Kandidatenfragmente wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die Primer-Konstruktion für die Amplifikation spezifischer cDNA-Sequenzen mit einer optimalen Target-Länge von 100-150 bp erfolgte mit dem frei verfügbaren Programm Primer3 von Rozen & Skaletsky (2000). Zur Durchführung der qPCR wurden 1 µl cDNA-Template (s. 2.5.4.2), 1,2 µL Primer F und Primer R (10 µM) (s. Tab. 7, S. 23), 20 µL QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix und 16,6 µL RNase-freiem Wasser gründlich vermischt. Als Referenz dienten *Helianthus*-spezifische Primer zur Amplifikation des Referenzgens Actin (Thomas *et al.*, 2003). Die qPCR wurde in einem Real-Time-Block-Thermocyclersystem (MJ-Research, Deutschland) mit dem folgenden Programm durchgeführt:

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Aktivierung	95	900	1
Denaturierung	94	15	} 35
Annealing	60	30	
Extension	72	30	

Die PCR-Amplifikation wurde anhand einer Schmelzkurven-Analyse und mit Auftrennung des PCR-Produkts auf einem 1 %igen Agarosegel auf die Spezifität der Amplifikation überprüft. Die relative Quantifizierung erfolgte anhand der $\Delta\Delta C_T$ -Methode zum direkten Vergleich der C_T -Schwellenwerte nach Livak & Schmittgen (2001).

2.5.5 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

2.5.5.1 Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese mit Einsatz von Agarosegelen wurde in horizontalen Systemen zur Auftrennung von genomischer DNA, cDNA-Fragmenten und Plasmid-DNA eingesetzt. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden entsprechende Agarosekonzentrationen verwendet. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten > 300 kb und Plasmid-DNA (bis zu 6 kb) erfolgte mit 1 % Agarosegelen. Für die präparative Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle, wie z.B. cDNA-Fragmente, wurde Agarose mit einer Konzentration von 1,5 – 2 % eingesetzt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer und durch Erhitzen in der Mikrowelle geschmolzen und nach Abkühlen auf 50 °C mit Ethidiumbromid (50 ng/mL) versetzt. Das Ausgießen des Agarosegels erfolgte in eine mit einem Probenkamm versehene Gelkammer (Peqlab-Systeme S und L). Nach Aushärten wurde das Gel mit TAE-Puffer übergossen. Die Proben wurden jeweils mit Ladepuffer (2 μ L Ladepuffer auf 10 μ L Probe) versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Zur späteren Größenbestimmung wurde in Abhängigkeit des aufzutrennenden Fragmentgrößenbereichs ein 100 bp oder ein 1 kb Größenstandard mit aufgetrennt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte je nach Größe und Konzentration des Gels bei 80-120 V für 60-180 min.

2.5.5.2 Kapillargelelektrophorese

Die Auftrennung von cDNA-Fragmenten für die Fragmentanalyse, sowie die Auftrennung von DNA-Fragmenten zur Sequenzierung, erfolgte mit Hilfe einer hoch sensitiven 8-Kapillargelelektrophorese (CEQ 8800, Beckman-Coulter, Deutschland). Ähnlich der üblichen elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel als Träger, findet während der Kapillargelelektrophorese die Auftrennung der DNA-Fragmente durch Wanderung der negativ geladenen Moleküle in einem elektrischen Feld statt. Durch den Einsatz von hochauflösenden, mit linearem Polyacrylamid (LPA) gefüllte Kapillaren (33 cm x 75 μ m) wird eine Trennung von kleinen Nukleinsäuremolekülen (< 100 bp) mit einer hohen Trennleistung von Fragmenten mit 1 nt Größenunterschied möglich. Der Nachweis von Nukleinsäurefragmenten

erfolgte anhand einer Laser-induzierten Fluoreszenz (LIF) Detektion.

2.5.5.2.1 Auftrennung von fluoreszenzmarkierten cDNA-Fragmenten

Die während der Random-PCR amplifizierten und Cy5-gelabelten cDNA-Fragmente wurden mit Hilfe der Polyacrylamid-gefüllten Kapillaren elektrophoretisch getrennt und durch Laser-induzierte Fluoreszenz detektiert. 1 µL der amplifizierten cDNA wurde einheitlich mit 40 µL SLS und 0,5 µL Größenstandard (WellRed, 600 bp) in Mikrotiterplatten vermischt. Zur Vermeidung von Verdunstung während der elektrophoretischen Trennung wurden die Proben mit 1 Tropfen Mineralöl überschichtet. Mit einer Injektionsspannung von 2,0 kV wurden die DNA-Moleküle für 30 s auf die Kapillaren geladen und bei einer kontinuierlichen Kapillartemperatur von 50 °C und mit einer Spannung von 5,0 kV für 70 min anhand ihrer Größe aufgetrennt. Die von Beckman-Coulter angebotene CEQ-Software wurde zur Größenordnung der Fragmente, Visualisierung, Evaluierung und zur Binning-Analyse der Fragmentdaten genutzt. Der Detektionsbereich von Fragmenten lag zwischen 55 und 650 bp. Zur statistischen Auswertung wurden die Fragmentdaten als ASCII-Tabellen exportiert und mit der Software ImpGenomics 3 (SAS, Deutschland) ausgewertet.

2.5.5.2.2 Auftrennung von Sequenzierungsprodukten

Alle Sequenzierungen von DNA-Molekülen erfolgten kapillargelelektrophoretisch. Die bereits während der Cycle Sequenzierungsreaktion (s. 2.6.4.5) fluoreszenz-markierten DNA-Fragmente wurden zur Entfernung von Primerresten aufgereinigt (s. 2.5.2.4.2). Die Sequenzierung wurde mit dem gesamten aufgereinigten PCR-Ansatz durchgeführt. Die Trennung der Fragmente erfolgte nach einer Denaturierungsphase bei 90 °C von 120 s und Injektion bei 2,0 kV für 15 s je nach zu erwartender Sequenzlänge bei 7,4 /6,0/4,2 kV für 45/60/85 min für Moleküle bis zu 400/600/800 bp. Zur Auswertung der Rohdaten, zum Alignment mit Vektorsequenz und zur Analyse der Sequenzdaten wurde die von Beckman-Coulter angebotene Software verwendet.

2.5.6 Blunt-End Klonierung von cDNA-Fragmenten

Zur Klonierung von potentiell differentiellen cDNA-Fragmenten wurde die ungerichtete Blunt-End Klonierung gewählt und diente zur Replikation von cDNA-Fragmenten für die anschließende Sequenzierung. Die Klonierung wurde mit dem high-copy Plasmid pcDNA3

als Vektor durchgeführt.

2.5.6.1 Phosphorylierung von cDNA-Fragmenten

Die Präsenz von 5'-Phosphat-Resten ist eine Voraussetzung für die Verknüpfung von Insert und Vektor durch das Enzym Ligase. Insofern fand eine Phosphorylierung, gleichzeitige Reamplifikation und Generierung von Blunt-Ends der cDNA-Fragmente mit dem Einsatz von phosphorylierten Primern (MOD-F-P, 5'-TTAGCTCACTCATTAGG-3'; MOD-R-P, 5'-ATAGCGAAGAGGCCCG-3') und der Phusion High-Fidelity DNA Polymerase mit Exonukleaseaktivität statt. Für die PCR wurden in einem 50 µL Ansatz 20 ng cDNA-Template, 10 µL Phusion HF Puffer (5x), 1 µL dNTP's (10 mM), 2,5 µL je Primer F bzw. R (10 pmol) und 0,5 µL Phusion DNA Polymerase (2 u/µL) mit H₂O aufgefüllt und mit folgendem Programm durchlaufen:

PCR-Programm:

Vorgang	Temp. [°C]	Dauer [s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	98	30	1
Denaturierung	98	10	} 35
Annealing	45	30	
Extension	72	30	
Finale Extension	72	600	1

2.5.6.2 Plasmidpräparation

Um den Einbau von Fremd-DNA in den Vektor zu ermöglichen, wurden 20 µg Plasmid-DNA mit 10 units EcoRV in NE-Puffer 3 (1x) und 1x BSA (1x) vermischt, mit H₂O auf 100 µL aufgefüllt und über Nacht bei 37 °C verdaut. Es folgte eine Inaktivierung des Enzyms bei 80 °C für 20 min. Eine Dephosphorylierung der 5'-DNA-Enden wurde durchgeführt, um eine Selbstligation des linearisierten Vektors pcDNA3 bei der Klonierung zu verhindern und den Einbau der Fremd-DNA zu fördern. Dies erfolgte mit dem Enzym Alkalische Phosphatase

(CIP). 50 μL des Restriktionsansatz mit EcoRV wurden mit 3 μL CIP (10 $\text{u}/\mu\text{L}$) vermischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Eine Inaktivierung des Enzyms erfolgte nicht. Das linearisierte und dephosphorylierte Plasmid wurde auf einem 1 % Agarosegel mit 0,01 % Kristallviolett bei 100 V für 90 min aufgetrennt, präparativ aus dem Gel geschnitten und, wie unter 2.5.2.7 beschrieben, aufgereinigt.

2.5.6.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Transformation und Vermehrung von rekombinanten Plasmiden in den *E. coli* Stamm DH5 α wurden die Zellen mit Hilfe der CaCl₂-Methode nach Hanahan (1983) mit leichten Modifikationen chemisch kompetent gemacht. Von einer frisch mit DH5 α bewachsenen LB-Platte wurde eine einzelne Kolonie gepickt und für 16 h bei 37 °C über Nacht in 100 mL LB-Flüssigmedium bei 250 rpm geschüttelt. 50 mL LB-Flüssigmedium wurden dann mit der Übernachtskultur angeimpft (1:1000) und bis zu einem OD₆₀₀ von 0,4 unter ständigem Schütteln bei 250 rpm kultiviert. Die vollständige Bakteriensuspension wurde für 10 min auf Eis gestellt und danach bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde das Medium dekantiert und das trockene Pellet mit 10 mL eiskaltem CaCl₂ (100 mM) vorsichtig in einem Eisbad resuspendiert und 1 h lang auf Eis gestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4 °C und 4000 rpm für 5 min. Die Zellen wurden mit 2 mL eines eiskalten CaCl₂-Glycerin-Gemisch (100 mM CaCl₂, 20% Glycerin) resuspendiert und zu je 100 μL -Aliquots rasch in flüssigem Stickstoff Schock gefroren, um die Transformationskompetenz zu erhalten. Die Lagerung bis zur Transformation erfolgte bei -80 °C.

2.5.6.4 Ligation

Die Ligation von Vektor und Insert wurde für die Blunt-End Klonierung mit dem Quick Ligation™ Kit in einem molaren Verhältnis von 1:3 (Vektor:Insert) nach folgender Berechnung durchgeführt:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} * \text{Größe Insert [kb]}}{\text{Größe Vektor [kb]}} * 3 = \text{Insert [ng]}$$

Für den 20 μL Ligationsansatz wurden 10 μL Quick Ligation Reaktionspuffer (2x), 1 μL Quick T4 DNA Ligase, 1 μL Plasmid pcDNA3 (50 ng/ μL) und die entsprechend errechnete Insertmenge gut vermischt und mit H_2O auf das Endvolumen aufgefüllt. Als Kontrollansatz diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Ansatz bei RT für 10 min inkubiert. Für die direkte Transformation wurde der Ligationsansatz auf Eis gekühlt oder zur Lagerung bis zum Gebrauch bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.5.6.5 Heat-Shock Transformation

Die kompetenten DH5 α -Zellen wurden zur Transformation auf Eis aufgetaut. Nach kurzer Zentrifugation wurden 4 μL des gekühlten Ligationsansatzes den Zellen zugegeben, vorsichtig vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Für den Heat-Shock wurden die Zellen für 30 s in einem Wasserbad ($42\text{ }^\circ\text{C}$) inkubiert und anschließend direkt auf Eis für 5 min abgekühlt. Zur Vermehrung der transformierten Zellen wurden jeweils 450 μL SOC-Medium hinzugegeben und für 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 250 rpm geschüttelt. Eine Ausplattierung von je 100 μL des Transformationsansatzes erfolgte auf vorgewärmte LB-Festmediumplatten mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Inkubation der Platten fand für 16 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ statt. Mit den weißen Kolonien erfolgte dann zur Isolierung rekombinanter Plasmide die Screening-PCR (s. 2.5.4.4). Die Transformationskompetenz bzw. die Anzahl der colony forming units (cfu) wurde unter Berücksichtigung des Kontrollansatzes berechnet.

2.5.7 Statistische Auswertung der Expressionsdaten

Die statistische Auswertung der Differential Display Expressionsdaten wurde anhand der über die Peakhöhen definierten Fluoreszenzsignale der Cy5-gelabelten cDNA-Fragmente aller untersuchten Proben (infiziert/nicht infiziert) und Pflanzenarten (AC 7, AC M, Albena) mit Hilfe der von SAS zur Verfügung gestellten Jmp Genomics3 Software (SAS, Deutschland) durchgeführt. Zum Vergleich der distinkten Expressionsmuster der diversen Proben untereinander wurde eine agglomerative hierarchische Clusteranalyse nach Ward eingesetzt. Für die Auswahl von Kandidatenfragmente wurden die Expressionsdaten zuerst einer Qualitätsüberprüfung mittels eindimensionaler Verteilungsanalyse und einer anschließenden Standardisierung über die Standardabweichung unterzogen. Die Signifikanz von Fragmenten mit differentiell exprimiertem Charakter wurde anhand einer Varianzanalyse (One-Way ANOVA) bei $\alpha < 0,05$ mit Verminderung des Fehler Typ I (α -Fehler) durch die Verwendung des FDR-Anpassung (False Discovery Rate) nach Benjamini & Hochberg (1995) ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Interspezifische Variation in der ITS-Region von *Helianthus*-Wildarten

3.1.1 Amplifikation und Sequenzierung der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region 1 und 2

Die *Helianthus*-Wildarten weisen eine Vielzahl an Variationen bezüglich ihrer Morphologie auf. Dies erschwert die Differenzierung und Bestimmung anhand von morphologischen Charakteristika und führt oftmals zu falschen Schlüssen hinsichtlich ihrer phylogenetischen Beziehungen. Übliche Schlüssel zur Bestimmung von Blütenpflanzen sind zur Zuordnung von Pflanzen der Gattung *Helianthus* aufgrund von hohen intraspezifischen Variationen oftmals ungeeignet. Da die Versuchspflanzen der Accession 7 (AC 7) und Accession M (AC M) starke Unterschiede im Hinblick auf morphologische Merkmale, wie z.B. Blattform, Anzahl der Blütenblätter, Wuchsform und Art der Verzweigung aufwiesen, wurde eine molekulare Artenbestimmung mit Hilfe des Internal Transcribed Spacer (ITS) vorgenommen. Dies ermöglichte weiterhin, ergänzende Aussagen über die verwandtschaftlichen Verhältnisse zu der Gattung *Helianthus* zu treffen. Die ITS-Region weist auf der Artenebene einen hohen Grad an interspezifischen Sequenz-Variabilitäten auf und wird aufgrund dieser Divergenzen zur Bestimmung von Pflanzenarten und zur interspezifischen phylogenetischen Analyse genutzt. Eine molekulare Bestimmung der Sonnenblumenwildarten AC 7 und AC M wurde mit Hilfe der Sequenz des ITS 1, der 5.8S ribosomale RNA codierenden Region und des ITS 2 durchgeführt. Dafür wurde aus dem frischen Blattgewebe der zu bestimmenden Art die Gesamt-DNA gewonnen und als Template für die Amplifikation eingesetzt. Da insbesondere bei den Wildarten ein hoher Anteil an Sekundärmetaboliten im Pflanzenextrakt zu erwarten war, wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamyl-Extraktion mit dem Additiv PVP ausgewählt. Eine spezifische Amplifikation der gesamten ITS-Region wurde in Anlehnung an Schilling *et al.* (1998) mit den Primern ITS 4 und ITS-5-mod durchgeführt. Nach Auftrennung auf einem 1 %-Agarose-Gel konnte für AC 7, AC M und Albena jeweils ein Amplifikationsprodukt von etwa 650 bp detektiert werden.

Die DNA wurde zur Sequenzierung aus dem Gel herauspräpariert und aufgereinigt. Zur Entschlüsselung der ITS-Sequenz wurde die Sequenz des ITS 1 und die Sequenz des ITS 2 wiederum in Anlehnung an Schilling *et al.* (1998) getrennt voneinander sequenziert. Die Sequenzierung des ITS 1 erfolgte jeweils mit den Primern ITS1 und ITS2-mod und ergab eine Sequenz von 267 bp für AC 7 und 268 bp für AC M. Bei der Sequenzierung des ITS 1 der

annuellen *Helianthus*-Art Albena wurde eine Sequenz mit einer Länge von 263 bp ermittelt, da die ersten Nukleotide der Sequenz trotz wiederholender Sequenzierung nicht eindeutig zu identifizieren waren. Die Sequenzierung von ITS 2 mit den Primern ITS3-mod und ITS4 ergab für AC 7, AC M und Albena eine Sequenz mit einer einheitlichen Länge von 223 bp. Da ITS 1 und ITS 2 die 5.8S rRNA-Region flankieren, konnte auch der kodierende Bereich der ITS-Sequenz anhand der Sequenzierungsdaten ermittelt werden. Bei allen untersuchten Pflanzen wurde für die ribosomale RNA ein Produkt von 159 bp sequenziert. Die Addition der Längen von ITS 1, 5.8S und ITS 2 ergab abschließend eine Sequenz von insgesamt 650 bp für AC 7, 651 bp für AC M und 642 bp für Albena.

3.1.2 Homologievergleich mittels BLAST

Der Vergleich der Sequenzen mittels multiplen Sequenzvergleich (Abb. 1) und ClustalW-Alinierung ergab zusätzlich zu den Unterschieden in der Sequenzlänge auch Variabilitäten innerhalb der Sequenzen. Eine geringe Variabilität von 1,1% und somit ein hoher Grad der Homologie ergab sich aus dem Vergleich der Sequenzen von AC 7 und AC M. Die ITS-Sequenz der annuellen Sorte Albena war weniger homolog zu der Sequenz der perennierenden Wildarten. Der prozentuale Anteil der Variabilität lag beim Vergleich zwischen den Sequenzen von AC 7 und Albena bei 2,6 % und beim Vergleich zwischen den Sequenzen von AC M und Albena bei 2,5 %. Ferner wurden neben dem Sequenzvergleich der Versuchspflanzen zueinander die Sequenzen bezüglich ihrer Homologien zu den *Helianthus*-Arten aus der Genbank mit Hilfe des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) nach Altschul *et al.* (1997) aliniert. Die Sequenzdaten der ITS-Region der Wildart AC 7 wiesen eine hohe Homologie mit zwei in der Datenbank aufgeführten ITS-Sequenzen von *Helianthus maximiliani* auf. Weitere starke Sequenzhomologien (99 % homolog) wurden für *H. nuttallii*, *H. grosseserratus*, *H. verticillatus*, *H. divaricatus* und *H. giganteus* festgehalten. Die ITS-Sequenz von AC M war mit 99% homolog zu *H. microcephalus*, *H. decapetalus*, *H. giganteus*, *H. glaucophyllus*, *H. occidentalis*, *H. longifolius* und *H. verticillatus*. Die Sequenz des ITS 1, 5.8 S rRNA und des ITS 2 der Wildart *H. maximiliani* AC 7 wurden in die Sequenzdatenbank NCBI (accession no. EU645480) eingetragen und veröffentlicht.

		1	60
AC 7	EU645480	TCGAACCCCTGCACAGCAGAACGACCCCGTGAACAAGTTAACTACATCTGGCCTTGCTGGGA	
AC M	C.....	
Albena		*****.....C.....	
<i>H. max</i>	AF047949-	
<i>H. dec</i>	AF047942-	
<i>H. mic</i>	AF047943-	
<i>H. nut</i>	AF047950-	
<i>H. gro</i>	AF047951-	
<i>H. gig</i>	AF047939-	

		61	120
AC 7	EU645480	CCGAAGCATTGTTCGGCCCTTGTGAGTCCTTGTGACGTGCGTTATGCATGGACCATA	
AC M	C.....C.....	
Albena	C.....C...G.....	
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942C.....C.....	
<i>H. mic</i>	AF047943C.....C.....	
<i>H. nut</i>	AF047950C.....	
<i>H. gro</i>	AF047951C.....	
<i>H. gig</i>	AF047939C.....C.....	

		121	180
AC 7	EU645480	CCTTTGGTTT-GTCATGGATGTCATGTTGACAAAA-TAACAAACCCCGGCACGAGATGT	
AC M	-.....C...A.....	
Albena	T.....-.....	
<i>H. max</i>	AF047949-.....-	
<i>H. dec</i>	AF047942-.....G.....-	
<i>H. mic</i>	AF047943-.....-	
<i>H. nut</i>	AF047950-.....-	
<i>H. gro</i>	AF047951-.....-	
<i>H. gig</i>	AF047939-.....G.....-	

		181	240
AC 7	EU645480	GCCAAGGAAAACCAAATTAAGAACCCGTGCTGTTGCGCCCGTTCGCGGTGTGCGCGC	
AC M		
Albena	A.....A	
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939	

		241	300
AC 7	EU645480	TGTTTCGTGGCTTCTTTGTAAACTAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGC	
AC M		
Albena		
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939	

		301	360
AC 7	EU645480	ATCGATGAAGAACGTAGCAAAATGCGATACTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCA	
AC M		
Albena		
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939	

		361	420
AC 7	EU645480	TCGAGTTTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCCGGTTGAGGGCACGTCTGCCTGGG	
AC M		
Albena	T.....	
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939Y.....	
		421	480
AC 7	EU645480	CGTCACGCATCACGTGCCCCCACCAGGCATCCCTTGTAGGGCTGTCTTTTGTGGGGCG	
AC M	C.A.....T.....	
Albena	C.A.....G.....	
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942C.A.....	
<i>H. mic</i>	AF047943C.A.....T.....	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939C.A.....Y.....	
		481	540
AC 7	EU645480	GAGATTGGTCTCCCGTGCCCATGGCGTGGTTGGCCTAAATAGGAGTCTCCTCACGAGGGA	
AC M		
Albena	G.....	
<i>H. max</i>	AF047949Y.....	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939	
		541	600
AC 7	EU645480	CGCACGGCTAGTGGTGGTTGATAAGACAGTCGTCCTCGTGTGCGGTTACTTCTTGAG	
AC M		
Albena		
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950	
<i>H. gro</i>	AF047951	
<i>H. gig</i>	AF047939	
		601	652
AC 7	EU645480	AGTAGATGCTCTTAAAGTACCCC-GATGTGTTGTCTTATGACGATGCTTCGA	
AC M		
Albena	-T.....	
<i>H. max</i>	AF047949	
<i>H. dec</i>	AF047942-K.....	
<i>H. mic</i>	AF047943	
<i>H. nut</i>	AF047950T.....	
<i>H. gro</i>	AF047951Y.....	
<i>H. gig</i>	AF047939	

Abb. 1: Multipler Sequenzvergleich der ITS-Region (ITS1, 5.8S rRNA und ITS2) zwischen den perennierenden *Helianthus*-Arten AC 7 und AC M, der annualen *Helianthus*-Art Albena und *Helianthus*-Wildarten aus der Genbank (BLAST, NCBI).
H. max = *H. maximiliani*, *H. dec* = *H. decapetalus*, *H. mic* = *H. microcephallus*, *H. nut* = *H. nuttallii*,
H. gro = *H. grosseserratus*, *H. gig* = *H. giganteus*.

3.1.3 Distanzverfahren zur phylogenetischen Analyse

Um die Beziehungen der Wildarten untereinander zu beschreiben und um eine Einordnung der beiden Versuchspflanzenaccessionen AC 7 und AC M in die Systematik der Wildarten anhand der ITS-Sequenzdaten zu gewährleisten, wurde ein molekularer Stammbaum konstruiert (Abb.2).

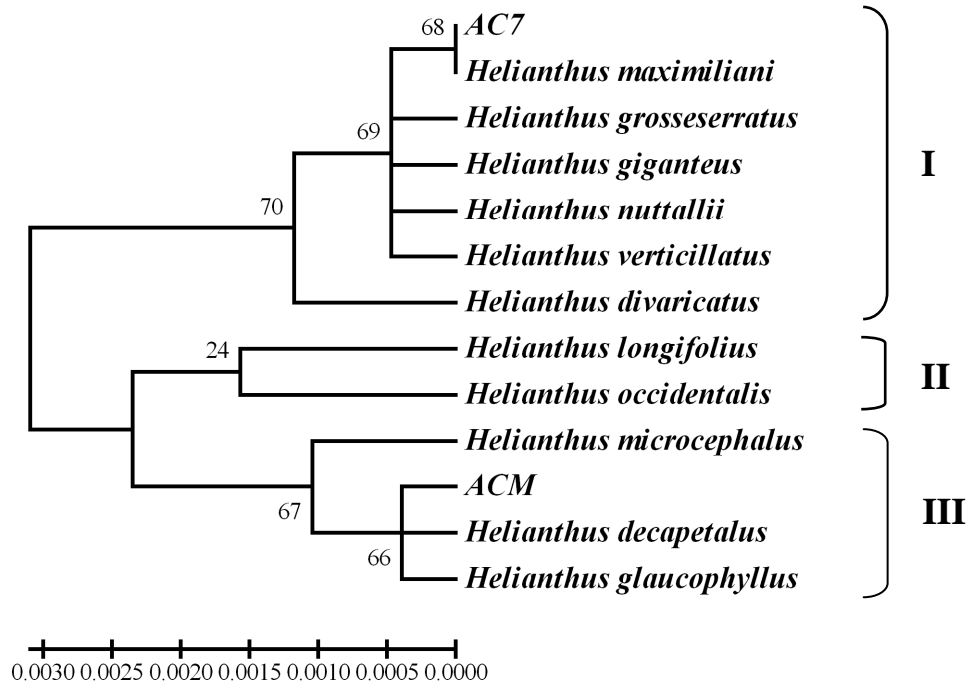


Abb. 2: Rekonstruktion eines ultrametrischen Stammbaums aus den Sequenzdaten der Internal Transcribed Spacer (ITS) Region 1 und 2 von *Helianthus*-Wildarten aus der öffentlichen Genbank und der Accessionen AC 7 und AC M. Zahlen an den Nodien stellen die Bootstrap-Werte (%) für 500 Wiederholungen dar. Die Werteskala gibt die Werte der Distanzberechnung der Neighbor-Joining Methode wieder.

Es wurden nur diejenigen Wildarten miteinander verglichen, die starke Homologien innerhalb der ITS-Region zu den beiden Accessionen AC 7 und AC M nach Sequenz-Alinierung aufwiesen. Zur Erstellung des Stammbaums erfolgte der Einsatz der Clustermethode mit Neighbor Joining und unkorrigierter *p*-Distanz. Die phylogenetische Analyse identifizierte anhand der ITS-Sequenzdaten drei endständige Klade (I, II, III). Klade 1 enthielt die Arten *H. maximiliani*, *H. grosseserratus*, *H. giganteus*, *H. nuttallii*, *H. verticillatus*, *H. divaricatus* und die Accession AC 7. Eine Zuordnung von AC 7 zu *H. maximiliani* konnte auch mit der phylogenetischen Analyse nochmals bestätigt werden. Zu Klade 2 wurden *H. longifolius* und *H. occidentalis* gruppiert. Die dritte Klade enthielt die Arten *H. microcephalus*, *H. decapetalus*, *H. glaucophyllus* sowie AC M. Die Accession AC M trat mit *H. decapetalus* und *H. glaucophyllus* in einer Gruppierung auf, die durch starke Homologien der Sequenzdaten

gekennzeichnet sind. Eine weitere Differenzierung von AC M war anhand der ITS-Sequenz jedoch nicht möglich.

3.2 Phänotypische Reaktionen von *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe

Eine Infektion mit dem pertotrophen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* kann bei Anfälligkeit der Wirtspflanze und optimalen klimatischen Bedingungen zu einem organunspezifischen Befall und Absterben der ganzen Pflanze führen. Typische Krankheitssymptome an den infizierten Organen von *Helianthus*-Arten sind insbesondere Welkeerscheinungen und die Entstehung von nekrotischem Gewebe, sog. Läsionen, an den lokalen Infektionsstellen. Zur Untersuchung von Resistenzeigenschaften gegenüber dem Pathogen *S. sclerotiorum* wurden zwei *Sclerotinia*-resistente Accessionen AC M und AC 7 ausgewählt, die bereits als resistent charakterisiert wurden (Henn *et al.*, 1997; Cerboncini, 2003). Zum Vergleich wurde gesondert die *Sclerotinia*-anfällige annuelle Kultursonnenblumensorte Albena untersucht. Alle untersuchten *Helianthus*-Arten wurden im Gewächshaus kultiviert.

3.2.1 Ausprägung von Läsionen unter Gewächshausbedingungen

Es wurden ausgewachsene Blätter von 8-Wochen alten *Helianthus*-Pflanzen mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* inokuliert. Die Inokulation der Blätter wurde in Anlehnung an den von Bertrand & Tourvieille (1987) beschriebenen Myzel-Blatttest durchgeführt. Da besonders die Temperatur und die Feuchtigkeit einen starken Einfluss auf die Befallsstärke und den Verlauf der Infektion nehmen können, wurde, um die einzelnen Pflanzen auf ihre Reaktion auf den Pilz hin zu untersuchen, die Inokulation unter diurnalen und klimatisch relativ kontrollierten Bedingungen durchgeführt. In Abb. 3 sind Raumtemperatur und -feuchte eines Zeitraumes während der Inokulationsversuche exemplarisch dargestellt. Durchschnittlich betrug die Temperatur mit leichten Schwankungen tagsüber 24 °C und nachts 20 °C. Bezüglich der Raumfeuchte wurden tagsüber Werte von durchschnittlich 75% rLF und in der Nacht fast kontinuierlich 100 % rLF erreicht. Da somit insbesondere nachts optimale Bedingungen für die *Sclerotinia*-Infektion erreicht werden konnten, wurde eine artifizielle Inokulation der Blätter in den späten Abendstunden durchgeführt. Das Eintüten der Blätter war für den Infektionserfolg nicht erforderlich, da eine automatisierte Gewächshaussteuerung, sowie eine Befeuchtung mittels Sprühflasche zu einer ausreichenden Feuchtigkeit führten. Die Bonitur einzelner inokulierter Blätter wurde in einem 24 h-Takt bis zu 6 Tagen durchgeführt (1 – 6 Days Post Inoculum (DPI)).

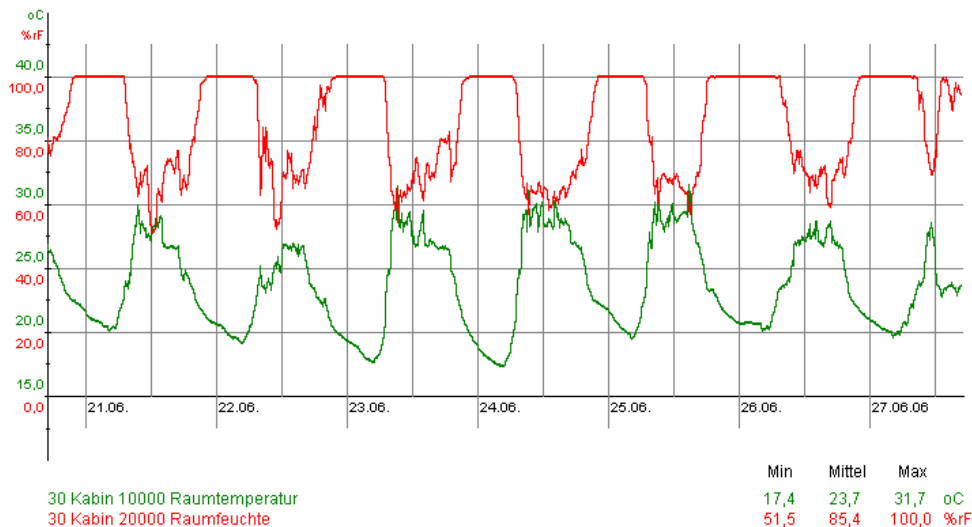


Abb. 3: Klimadaten des Gewächshauses an sieben aufeinanderfolgenden Tagen im Zeitraum der Inokulationsreihen.

Bei allen untersuchten Pflanzen äußerten sich die ersten Symptome in Form von wässrigen hellbraunen nekrotischen Flecken, die sich bei Fortschreiten der Infektion vergrößerten. Wie in Abb. 4 (E) beispielhaft zu sehen, waren ausschließlich an den Wildarten nach spätestens 96 h verstärkt dunkelbraune, scharf abgetrennte Ränder zu erkennen. Teilweise konnten um die Läsionen vermehrt bei AC M leichte bis starke Chlorosen beobachtet werden. Die annuelle Sorte Albena hingegen zeigte sich deutlich anfälliger (Abb. 4, D, F). Die Läsionen nach Infektion waren meist hell- bis dunkelbraun gefleckt und größtenteils wurden zyklisch auftretende konzentrische Ringe sichtbar. Häufig waren die Läsionen in ihrer Erscheinung nach 5 Tagen weiterhin stark wässrig und Grenzbereiche der Läsionen weniger definiert. Bei Albena waren je nach Befallsstärke zudem Welkeerscheinungen der befallenen Blätter nach 4 DPI sichtbar. Ein Wachstum des Pilzes in die Petiole und in den Stängel (Abb. 4, F) konnte oft ab DPI 7 beobachtet werden.

Während der Versuchsreihen konnte vermehrt beobachtet werden, dass sich ungeachtet der Pflanzenart die Läsionen hauptsächlich parallel der Hauptblattader formierten und die Ränder der Blattspreite erst an späteren Zeitpunkten der Pathogenausbreitung nekrotisierten. Bei AC 7 und AC M wurde trotz Infektion und Vergrößerung der Läsion kein Wachstum des Pilzes in den Stängel beobachtet. Da sich die Läsionen bevorzugt entlang der Hauptblattader des Blattes ausdehnten, wurden die Läsionslängen als phänotypisches Merkmal vermessen (Tab. 8). Im Gegensatz zu den Blättern der Wildarten waren bei der Sorte Albena bereits nach einem Tag makroskopisch sichtbare Veränderungen bei 40 % der Blätter zu beobachten. Die Befallshäufigkeit nach 24 h lag im Vergleich bei 14 % für AC 7 und bei 17 % für AC M niedriger als bei der annuellen Sorte. Eine höhere Befallsrate als bei den Wildarten wurde bei

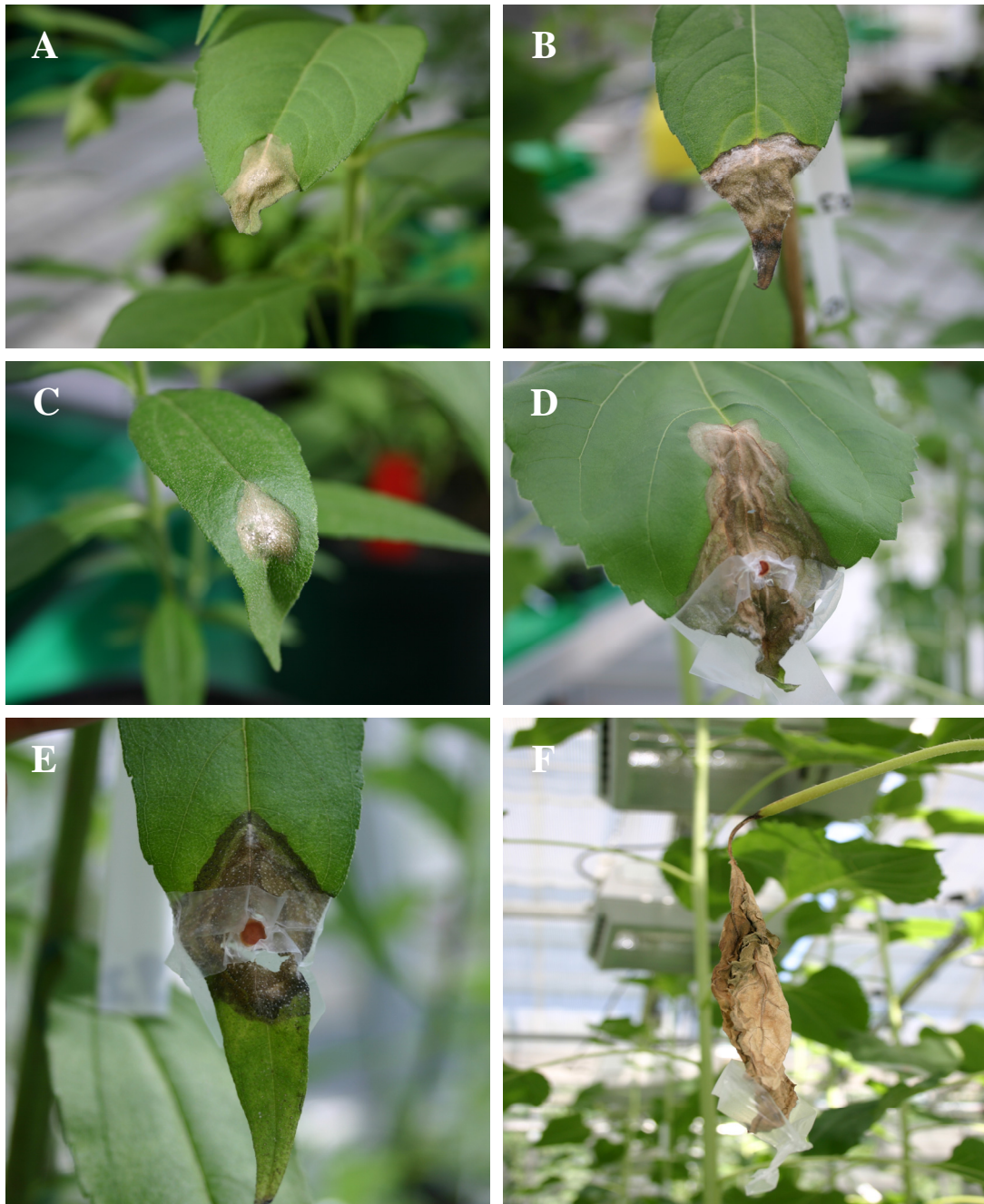


Abb. 4: Läsionen an *Sclerotinia*-infizierten Blättern der Wildarten AC 7 an DPI 3 (A) und DPI 4 (B) und AC M an DPI 3 (C) und DPI 6 (E) und cv. Albena an DPI 3 (D) und DPI 7 (F). DPI: Days Post Inoculum.

Albena auch noch nach 48 h noch ermittelt (Albena: 80 %, AC 7: 69 %, AC M: 73 %). Nach 62 h waren jedoch ungeachtet der Pflanzenart bei 99 % der inokulierten Blättern Symptome ausgeprägt. Bei der Betrachtung der durchschnittlichen Läsionslängen (Tab. 8) zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den resistenten Pflanzen und der anfälligen Sorte hinsichtlich ihrer phänotypischen Reaktion auf *S. sclerotiorum* an den infizierten Blättern.

Tab. 8: Durchschnittliche Läsionslängen der untersuchten *Helianthus*-Wildarten AC 7 und AC M und der anfälligen *Helianthus*-Sorte Albena nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* an DPI (Days Post Inoculum) 1-6.

	LÄSIONSLÄNGE [cm]					
	1 DPI	2 DPI	3 DPI	4 DPI	5 DPI	6 DPI
AC 7	0,09 ± 0,28a	0,75 ± 1,13a	1,20 ± 1,28a	1,56 ± 1,35a	1,83 ± 1,52a	2,11 ± 1,68a
AC M	0,11 ± 0,31a	0,78 ± 0,86a	1,29 ± 0,94a	1,73 ± 1,23a	2,11 ± 1,41ab	2,60 ± 1,71ab
Albena	0,43 ± 0,65b**	1,97 ± 1,79b***	2,78 ± 2,20b***	3,27 ± 2,53b***	3,20 ± 2,34b**	4,18 ± 3,42b**

Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede an einzelnen DPI bei $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) (Tukey-Kramer HSD).

Insgesamt konnten eine Nekrotisierung des Blattgewebes und eine Zunahme der Läsionslängen innerhalb der Messzeitpunkte bis zu 6 Tagen nach Infektion bei allen untersuchten Pflanzenarten beobachtet werden. Die Variabilität aller gemessenen Läsionslängen in den 6 Tagen war bei der Sorte Albena mit Längen zwischen 0,1 und 9,4 cm sehr hoch. Bei AC 7 und AC M wurden vergleichsweise ähnliche Variabilitäten bezüglich der Läsionslängen ermittelt. Im Gegensatz zu Albena lagen diese in Bereichen zwischen 0,1 und 5,7 cm für AC 7 und 0,1 bis 6,2 für AC M. Die Schwankungen innerhalb der Messreihen waren bei Albena stärker als bei den beiden Wildarten, was darauf hinweisen könnte, dass u.a. der Infektionsverlauf in der anfälligen Art stärker von den äußeren Umweltbedingungen beeinflusst wurde, als in den Wildarten. Bereits am ersten Messzeitpunkt, 24 h nach Infektion, wiesen die bei den Wildarten ermittelten Läsionslängen durchschnittlich signifikante Unterschiede zu der durchschnittlichen Läsionslängen der annuellen Art bei $p < 0,01$ und $p < 0,001$ (Tukey-Kramer, HSD) auf. Signifikante Unterschiede der Läsionslängen zwischen der annuellen und den perennierenden Arten wurden zudem für alle weiteren Messzeitpunkte bis DPI 4 festgehalten. Anhand der Messung der Läsionslängen konnte der durchschnittliche Zuwachs der Läsionen pro Tag ermittelt werden. Bei Vergleich der drei errechneten Zuwachsraten, die in Abb. 5 dargestellt sind, ist ein starker Unterschied zwischen dem Kurvenverlauf der annuellen Art Albena und der Wildarten erkennbar. Dabei konnte ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten des Pathogens im Blattgewebe der beiden Wildartaccessionen

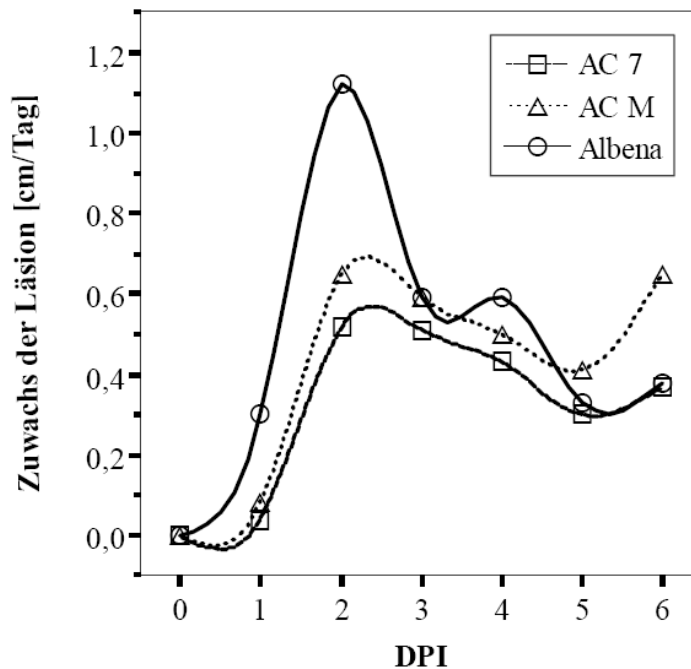


Abb. 5: Zuwachs der Läsionen pro Tag für die Wildarten der Accession 7 und Accession M M und der annuellen Sorte Albena nach Inokulation mit *S. sclerotiorum*.
DPI: Days post inoculum.

festgehalten werden. Besonders auffällig erscheint jedoch die durchschnittliche Zuwachsrate in den ersten 48 h nach Inokulation bei cv. Albena. Im Gegensatz zu AC 7 und AC M wurde in diesen ersten zwei Tagen ein sehr starker Zuwachs der Läsionslänge pro Tag ermittelt. Tendenziell waren die Zuwachsraten der Läsionen unter gleichen Bedingungen bis zum 5. Tag nach Inokulation bei Albena höher als in den Wildarten. Da sich bei den Wildarten somit eine deutlich langsamer verlaufende Infektion zeigte, kann auf eine Inhibierung der Penetration des Pilzes durch das Blattgewebe geschlossen werden. Die stark unterschiedlichen Zuwachsraten in den ersten 48 h nach Inokulation könnten zudem einen spezifischen Hinweis auf die relative Penetrationsgeschwindigkeit des Pilzes im pflanzlichen Gewebe geben und eventuell eine Prognose für das Ausmaß und den Verlauf eines Befalls liefern.

3.2.2 Histologische Untersuchungen der Infektionsstellen

Die mikroskopischen Untersuchungen an *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe von im Gewächshaus kultivierten Versuchspflanzen erfolgten nach Fixierung in Chloralhydrat und mit anschließender Färbung mit Säure-Fuchsin zur Beobachtung des Hyphenwachstums an den Infektionsstellen und in angrenzenden Bereichen der nekrotischen Läsionen (Abb. 6). Die Untersuchungen zeigten keine mikroskopisch differenzierbaren Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens des Pathogens an den unterschiedlichen *Helianthus*-Arten.

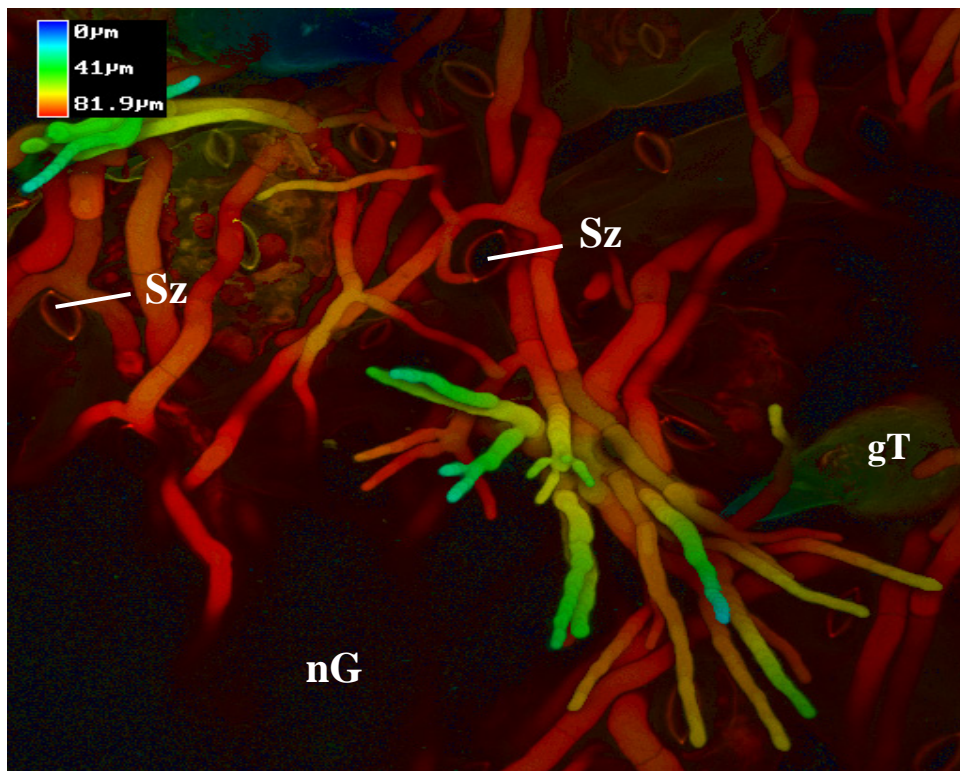
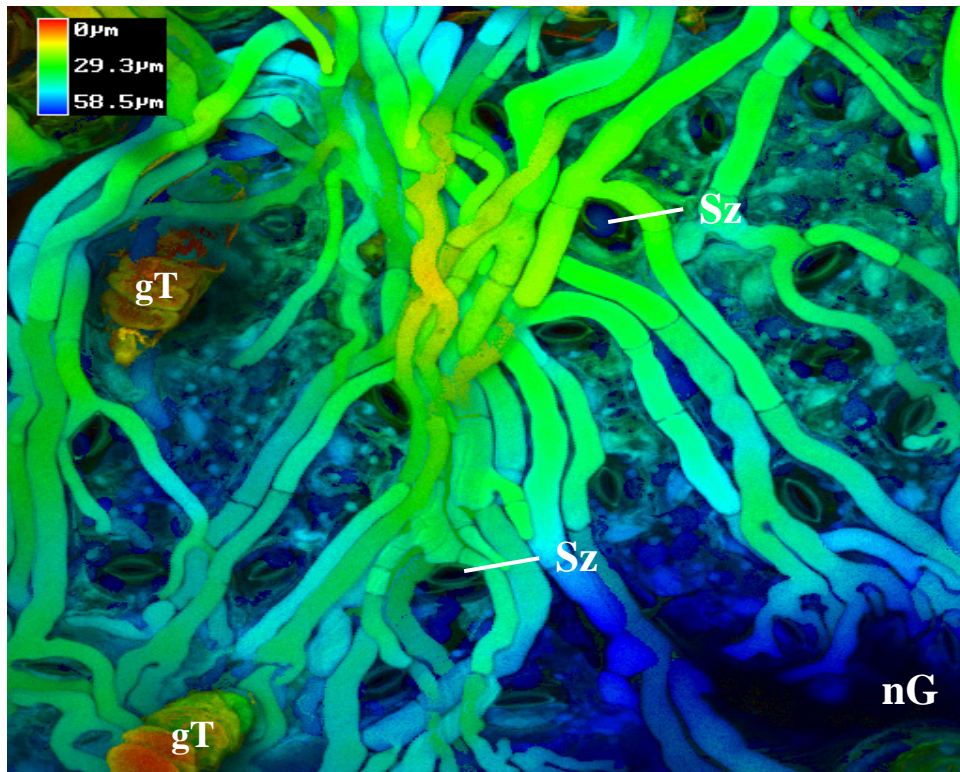


Abb. 6: Topographische Darstellungen des Hyphenwachstums von *S. sclerotiorum* auf der Blattoberfläche angrenzend an das nekrotisierte Gewebe der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena. nG = nekrotisiertes Gewebe, Sz = Schließzellen, gT = glanduläres Trichom

Die Morphologie der Pilzhypen wies eine einheitlich starke Verzweigung auf. Potentielle Penetrationsstellen, die einen Hinweis auf das Eindringen des Pilzes in das Blattgewebe hätten geben können, wurden nicht erfasst. In mikroskopischen Untersuchungen der anfälligen Sorte Albena wurde beobachtet, dass sich in Richtung Petiole das Wachstum der Pilzhypen auf den Umkreis des nekrotischen Gewebes beschränkte. Interessanterweise erfolgte auch vermehrt ein dichotomes Wachstum der Pilzhypen an den Spaltöffnungen auf der gesamten Oberfläche des besiedelten Blattes (s. Abb. 6).

3.3 Phytochemische Untersuchungen von *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe

Pflanzen sind in der Lage, eine Vielzahl an zum Teil artenspezifischen phenolischen Verbindungen zu produzieren, die u.a. eine Rolle in der Pflanzenabwehr besitzen können. Davon werden einige Substanzen konstitutiv synthetisiert, andere wiederum durch abiotische oder biotische Faktoren induziert. Um eine mögliche Bedeutung von phenolischen Substanzen bei der Abwehrreaktion bzw. Resistenz der Wildarten AC M und AC 7 gegen den pertotrophen Pilz *S. sclerotiorum* zu ermitteln, wurde das Phenolspektrum von *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe in unterschiedlichen Infektionsstadien untersucht. Zur Isolierung der phenolischen Inhaltsstoffe aus den *Helianthus*-Blättern wurden aus gefriergetrockneten Blattproben Methanol-Extrakte hergestellt, die als Rohextrakt für alle qualitativen und quantitativen Analysen der enthaltenen phenolischen Verbindungen Verwendung fanden.

3.3.1 Bestimmung des Gesamtphenolgehalts von infiziertem Blattgewebe

An fünf unterschiedlichen Infektionszeitpunkten (1, 2, 3, 4 und 6 DPI) wurden *Sclerotinia*-infizierte Blätter von den *Sclerotinia*-resistenten Wildarten AC 7 und AC M und der *Sclerotinia*-anfälligen Kultursonnenblume *H. annuus* cv. Albena geerntet und im Vergleich zu nicht infizierten Blättern bezüglich ihres Gesamtphenolgehalts untersucht. Das Blattmaterial wurde nach dem Pulverisieren in verschiedenen Methanolkonzentrationen (0, 20, 50, 80 und 100 %) aufgenommen, um eine optimale Konzentration für die Phenolextraktion zu ermitteln. Die Proben wurden mit Folin-Ciocalteu-Reagenz versetzt und nach dem colorimetrischen Assay von Singleton & Rossi (1965) photometrisch gemessen. Zur Bestimmung des Gesamtphenolgehalts wurde der Phenolgehalt der Blattextrakte mit Hilfe von Gallussäure als Standard in mg GAE (Gallussäureequivalente)/100 mg TG ermittelt. Da die höchsten Phenolkonzentrationen unter Verwendung von 50 %igem Methanol erzielt wurden, erfolgten alle Phenolextraktionen für weitere Gesamtphenolbestimmungen mit 50 %igem Methanol.

In Abb. 7 sind die Gesamtphenolgehalte der untersuchten Pflanzenarten an verschiedenen Messzeitpunkten dargestellt. Insgesamt wiesen die Messwerte große Schwankungen in den Messreihen auf, welches in der Sensitivität des Assays begründet erschien. Dennoch wurden Unterschiede zwischen den Versuchspflanzen festgehalten. Die Wildart AC M wies, im Vergleich zu den übrigen untersuchten Pflanzenarten bis auf DPI 6, an allen Messzeitpunkten die höchsten durchschnittlichen Gesamtphenolgehalte auf. Interessanterweise wurden selbst in den nicht infizierten Blättern von AC M relativ hohe Gehalte von 119 mg GAE/100 mg TG gemessen. Der höchste Durchschnittswert konnte mit 153 mg GAE/100 mg TG für Tag 4 nach Inokulation ermittelt werden. Im Vergleich zu den Gesamtphenolgehalten in den Kontrollblättern konnten keine signifikanten Änderungen der Gesamtphenolgehalte nach Infektion nachgewiesen werden.

Im Vergleich zu AC M wurden für die Kultursonnenblumensorte Albena und für die Wildart AC 7 signifikant niedrigere Phenolgehalte mit Konzentrationen zwischen 10 und 80 mg GAE/100 mg TG bei den nicht infizierten Kontrollblättern ermittelt. Dennoch lagen die Gesamtphenolgehalte in der Wildart AC 7 höher als in den infizierten Blättern von Albena. Die Ermittlung der Gesamtphenolgehalte der Blätter von AC 7 nach Infektion mit *S. sclerotiorum* ergaben an jedem erfassten Messzeitpunkt (DPI 1, 2, 4 und 6) weiterhin höhere Gesamtphenolgehalte als in der annuellen Art *H. annuus*. Im Vergleich zu den Kontrollblättern konnte in der Wildart AC 7 sogar ein signifikanter Anstieg auf 113 mg GAE/100 mg TG für DPI 6 festgehalten werden. Insgesamt blieben die Blattphenolgehalte der Sorte Albena bis DPI 6 deutlich niedriger, wobei am letzten Messzeitpunkt auch ein signifikant höherer Phenolgehalt ermittelt wurde, der jedoch mit 57 mg GAE/100 mg TG deutlich unter den bei den Wildarten ermittelten Durchschnittswerten lag.

3.3.2 Qualitative und quantitative Zusammensetzung der Phenolextrakte

Zur qualitativen Charakterisierung von phenolischen Verbindungen der infizierten und nicht infizierten *Helianthus*-Blätter wurden drei unterschiedliche chromatographische Systeme verwendet. Die Dünnschichtchromatographie (DC) wurde zur qualitativen Analyse angewandt. Um zusätzlich Aussagen über die Quantität einzelner Verbindungen zu machen, wurde eine Auftrennung mittels analytischer Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC) und Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) durchgeführt. Für alle chromatographischen Analysen wurde der Methanol-Rohextrakt zur Analyse auf phenolische Inhaltsstoffe eingesetzt.

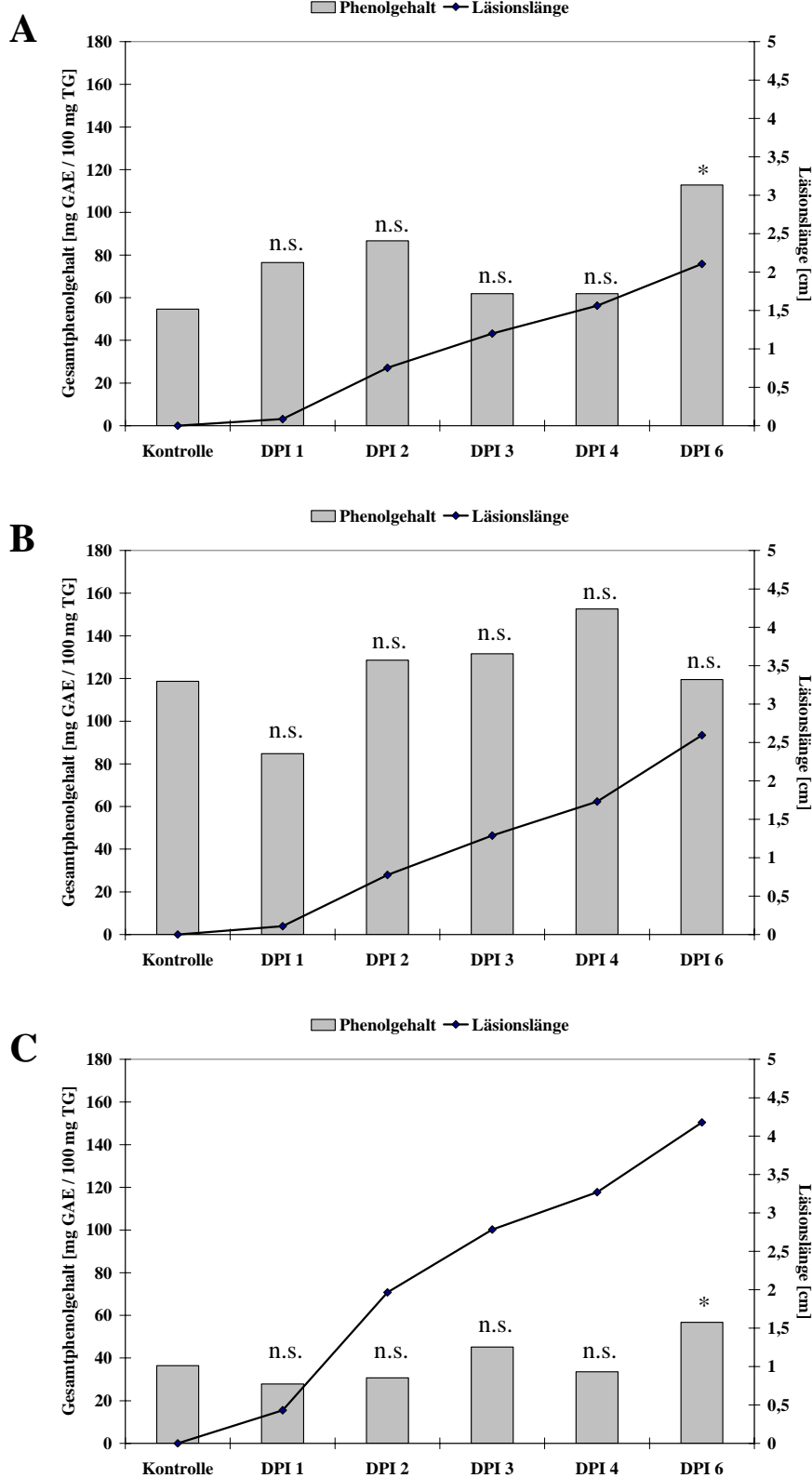


Abb. 7: Gesamtphenolgehalte und Läsionslängen von infiziertem und nicht infiziertem Blattgewebe von AC 7 (A), AC M (B) und Albena (C) an unterschiedlichen Zeitpunkten nach *Sclerotinia*-Infektion im Vergleich zu Kontrollblättern. GAE = Gallic acid equivalent
Nicht signifikant (n.s.) und signifikant (*) bei $p < 0,05$ (Tukey-Kramer HSD).

3.3.2.1 Auftrennung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels DC

Bei der qualitativen Analyse der Methanol-Rohextrakte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) wurden Kontrollblätter und infizierte Blätter an DPI 6 der annualen *H. annuus* cv. Albena und den perennierenden Wildarten AC 7 und AC M miteinander hinsichtlich ihrer Zusammensetzung von methanol-löslichen phenolischen Inhaltsstoffen untersucht. Dafür wurden zwei unterschiedliche Fließmittelgemische (A und B, s. 2.4.3), die zur Auftrennung von phenolischen Verbindungen bereits beschrieben sind, eingesetzt (s. Abb 8 A und B). Das Auftragen der Probenbanden konnte semi-automatisch mit Einsatz eines DC-Applikationsautomaten gewährleistet werden und führte nach Entwicklung in einer Horizontalkammer zu einer gleichmäßigen und reproduzierbaren Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe. Für alle Proben wurden gleiche Konzentrationen zur Auftrennung eingesetzt. Insgesamt erzeugte die Auftrennung mit Fließmittelgemisch B schärfere Banden und die mobile Phase wies bessere Trenneigenschaften auf als die Auftrennung mit Fließmittelgemisch A. Mit beiden Fließmitteln wurden einzelne Banden anhand ihres fluoreszierenden Charakters unter langwelliger UV-Bestrahlung (365 nm) detektiert. Für fast alle detektierten Banden war eine fluoreszierende Hellblaufärbung und ein R_f -Wert $> 0,4$ charakteristisch. Die Fluoreszenzeigenschaften der beiden Referenzsubstanzen (Kaffeensäure und Chlorogensäure) waren ähnlich denen der Probenbanden (Abb. 8 B) und deuteten damit darauf hin, dass alle detektierbaren Substanzen ähnliche physikochemische Eigenschaften besitzen und in die Klasse der Hydroxycimtsäuren und deren Derivate zuzuordnen sind.

Die Retentionsfaktoren der käuflichen Standards lagen bei 0,87 für Kaffeensäure und 0,36 für Chlorogensäure mit Fließmittelgemisch A und 0,88 für Kaffeensäure und 0,50 für Chlorogensäure mit Fließmittelgemisch B. Aus dem Methanolrohextrakt der Wildart AC M waren mit Fließmittelgemisch B sieben Banden in den Kontrollblättern und acht Banden in den infizierten Blättern nachweisbar. Davon waren in den unbehandelten und behandelten Proben zwei Banden mit Retentionsfaktoren von 0,50 und 0,78 aufgrund ihrer starken Fluoreszenz besonders auffällig. Die Wildart AC 7 wies größere Unterschiede im Bandenmuster zwischen den Kontrollblättern (5 Banden) und den infizierten Blättern (6 Banden) auf. In den infizierten Blattproben konnten ebenfalls zwei Banden mit R_f -Werten von 0,50 und 0,78 detektiert werden. In den Kontrollproben trat jedoch die Bande mit dem Retentionsfaktor von 0,78 nur sehr schwach auf. Insgesamt war die Stärke der Banden mit gleichen Retentionsfaktoren der infizierten Blattextrakten der Wildart AC 7 deutlich intensiver, welches auf eine Induktion von phenolischen Verbindungen in den inokulierten Blättern hinweist. Reine Kaffeensäure konnte, außer in den infizierten Blattproben von AC M

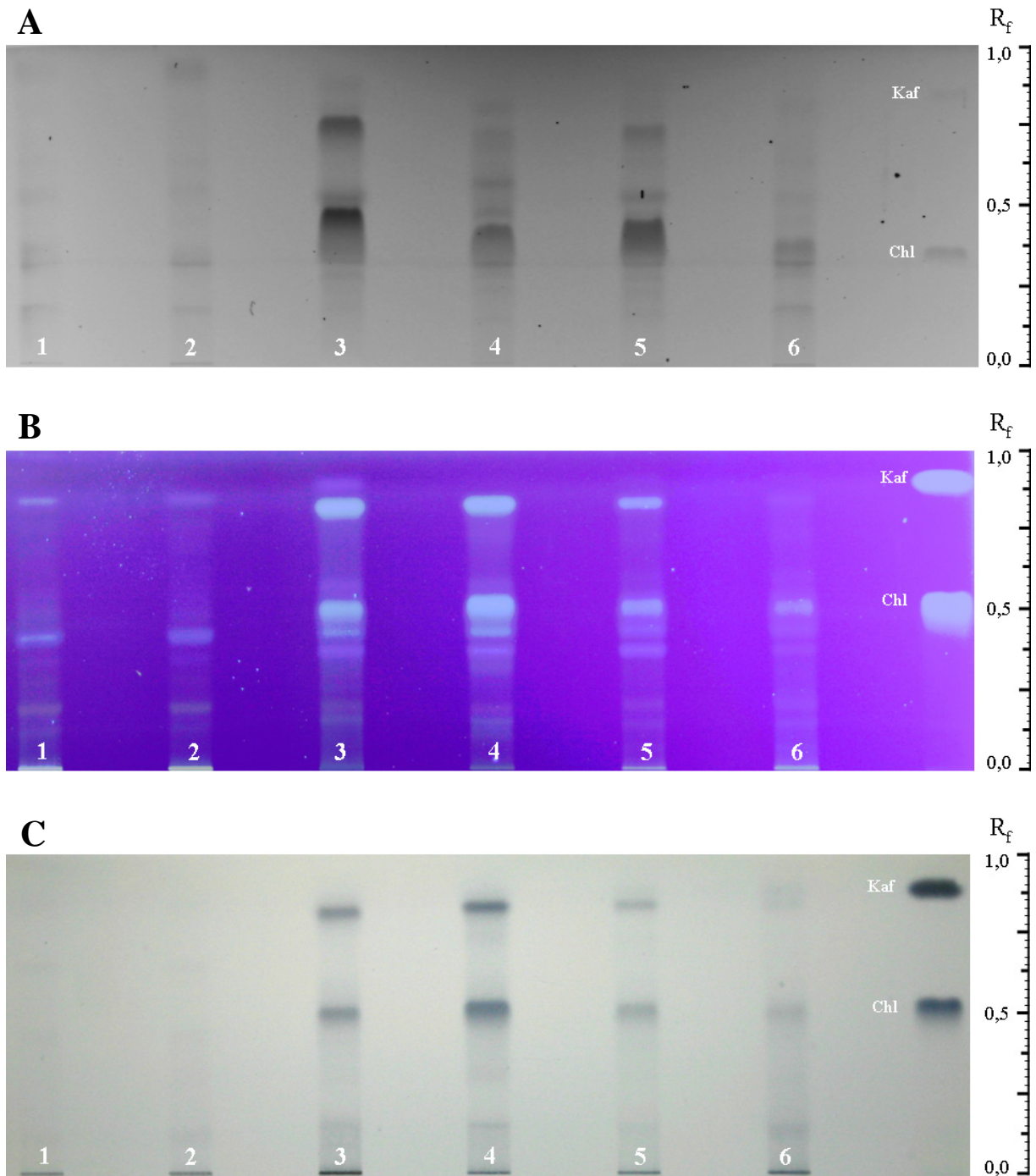


Abb. 8: Fotodokumentation der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der phenolischen Inhaltsstoffe der Kontrollblätter von Albena (2), AC M (4) und AC 7 (6) und infizierten Blättern (DPI 6) von Albena (1), AC M (3) und AC 7 (5) mit Fließmittel A (A) und Fließmittel B (B, C) bei Visualisierung unter UV-Bestrahlung (366 nm) (A, B) und Anfärbung mit Folin-Ciocalteu-Reagenz (C). **Chl:** Chlorogensäure, **Kaf:** Kaffeesäure, **R_f :** Retentionsfaktor.

(Abb. 8 A und B), in keiner weiteren Probe nachgewiesen werden. Ein ähnliches Laufverhalten wie die Probenbanden mit einem R_f -Wert von 0,50 wies reine Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure) als Referenzsubstanz mit Fließmittelgemisch B auf. Mit Fließmittelgemisch A konnte jedoch keine Ko-elution mit dem Referenzstandard Chlorogensäure (R_f 0,39) ermittelt werden.

Die Auftrennung der Methanol-Rohextrakte der annuellen *H. annuus* cv. Albena ergab mit beiden Fließmitteln ein völlig anderes Bandenmuster als in den Blattextrakten der Wildarten. Insgesamt wurden auch weniger detektierbare Banden nachgewiesen. Zudem konnte aufgrund geringer Variabilität im Bandenmuster kein eindeutiger Unterschied zwischen Kontrollblättern und infizierten Blättern hinsichtlich ihrer phenolischen Inhaltsstoffe ermittelt werden. In Abb. 8 B sind mit Fließmittelgemisch B lediglich drei intensivere Banden mit R_f -Werten von 0,2; 0,4 und 0,8 zu erkennen, die sowohl in den Kontrollblättern als auch in den mit *Sclerotinia*-infizierten Blättern detektiert wurden.

Um phenolische Verbindungen nachzuweisen, wurden die DC-Platten mit Folin-Ciocalteu-Reagenz besprüht (Abb. 8 C). Das Besprühen ergab bei phenolischen Verbindungen eine dunkelblaue Färbung, wobei die Stärke der Anfärbung sehr stark mit der Intensität der Bande korrelierte. In den untersuchten Blattextrakten ließen sich somit lediglich die Banden anfärben, die schon unter UV-Bestrahlung eine starke Fluoreszenz aufwiesen. Interessanterweise konnte in der Kultursorte Albena im Vergleich zu den Wildarten weder prä- noch postinfektionale eine Detektion von phenolischen Inhaltsstoffen mittels Folin-Ciocalteu-Reagenz erfolgen.

3.3.2.2 Auftrennung und Quantifizierung von phenolischen Inhaltsstoffen mittels HPLC

In Ergänzung zu der chromatographischen Analyse mittels Dünnschichtchromatographie wurden die methanol-löslichen phenolischen Substanzen aus den Rohextrakten der Kontrollblätter und der *Sclerotinia*-infizierten Blätter mittels Umkehrphasen-Flüssigkeitschromatographie (Reversed Phase-HPLC) aufgetrennt. Hierfür wurden wiederum Blattproben an definierten Zeitpunkten nach *Sclerotinia*-Inokulation (1, 2, 3, 4 und 6 DPI) untersucht. Die chromatographische Trennung erfolgte mit einem Fließmittelgradienten von abnehmender Polarität. Zur umfassenden Bestimmung der aufgetrennten Verbindungen wurden die UV-Spektren mit Hilfe eines UV-Vis Photodiodenarray-Detektors im ultravioletten Bereich zwischen 250-370 nm aufgenommen. Bei der Auswertung der HPLC-Chromatogramme wurden nur diejenigen Peaks in die Auswertung mit einbezogen, die, wie bereits in anderen Studien beschrieben, anhand ihres UV-Spektrums der Gruppe der Phenole

zugeordnet werden konnten (Baran & Schwedt, 1993; Bengoechea *et al.*, 1995). Die Quantifizierung der einzelnen Verbindungen wurde mit reiner Chlorogensäure (5-Kaffeoylchinasäure) als externer Standard durchgeführt. Da die Höhe der Peaks mit unterschiedlichen Konzentrationen proportional zur aufgegebenen Stoffkonzentration ($r^2 = 0,9977$) war, erfolgte die Quantifizierung anhand dieses Parameters. Insgesamt wurde mit dem eingesetzten Trennverfahren eine gute Trennleistung für die phenolischen Inhaltsstoffe der Rohextrakte der Wildarten AC 7 und AC M erreicht (Abb. 9). Die Untersuchungen der Blattextrakte der annuellen Sonnenblume *H. annuus* cv. Albena wurden jedoch nicht weiter berücksichtigt, da die Konzentrationen der mittels HPLC aufgetrennten phenolischen Substanzen aus infizierten und nicht infizierten Blättern zu gering waren, um eine qualitative oder quantitative Auswertung zu ermöglichen.

Während der qualitativen Analyse der Kontrollblätter der Wildarten zeigten die Chromatogramme vergleichsweise wenig Variation, da die meisten Peaks mit ähnlichen Retentionszeiten detektiert wurden und die untersuchten Blätter ein sehr ähnliches Phenolmuster im Chromatogramm aufwiesen. Bei den detektierten Verbindungen handelte es sich überwiegend um phenolische Substanzen, die anhand ihres detektierten UV-Spektrums und der ermittelten Absorptionsmaxima (λ max) zu den Hydroxyzimtsäuren und deren Derivaten gruppiert werden konnten. Um die Substanzen noch weiter zu charakterisieren, erfolgte eine weitere Unterteilung der Hydroxyzimtsäurederivate in Kaffeoyle Säurederivate mit λ max zwischen 321 und 329 und in Coumarylsäurederivate mit λ max zwischen 301 und 319. In Abbildung 9 sind exemplarisch HPLC-Chromatogramme für AC 7 und AC M von nicht infizierten und infizierten Blättern an unterschiedlichen Zeitpunkten im Vergleich dargestellt. Die meisten phenolischen Substanzen im Chromatogramm wiesen ein für die Kaffeoyle Säurederivate (Abb. 9, Peak 1A, 2A, 3A, 5A, 1B, 2B, 3B und 5B) und einzelne für die Coumarylsäurederivate (Abb. 9, Peak 4A und 4B) typisches UV-Spektrum auf.

Die Quantifizierung der detektierten Verbindungen zeigte, wie bereits bei der Gesamtphenolbestimmung festgehalten wurde (s. 3.3.1), dass, im Gegensatz zu den Blättern der anderen Wildart, die Blätter der Wildart AC M nach Auswertung der HPLC-Daten vergleichsweise höhere Gesamtphenolgehalte aufwiesen. In Tab. 9 sind die Anteile an Kaffeoyle Säurederivaten, Coumarylsäurederivaten und weiteren phenolischen Inhaltsstoffen aus den HPLC-Daten zusammengefasst dargestellt. Die Auswertung zeigte in allen untersuchten Blättern einen fast ausschließlichen Anteil an Hydroxyzimtsäurederivaten mit 18,07 mg CAE (Chlorogensäureequivalente)/100 mg TG in den Kontrollblättern der Wildart AC 7 und 61,94 mg CAE/100 mg TG in den Kontrollblättern von AC M. Nach 6 Tagen (DPI 6) wurde in

beiden Sonnenblumenwildarten zudem ein Anstieg an Hydroxyzimtsäurederivate im Blattgewebe nach Infektion mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* beobachtet. Dieser Anstieg von durchschnittlich 45,55 mg CAE/100 mg TG in AC 7 und durchschnittlich 40,99 mg CAE/100 mg TG in AC M 6 Tage nach Inokulation konnte jedoch nicht statistisch abgesichert werden.

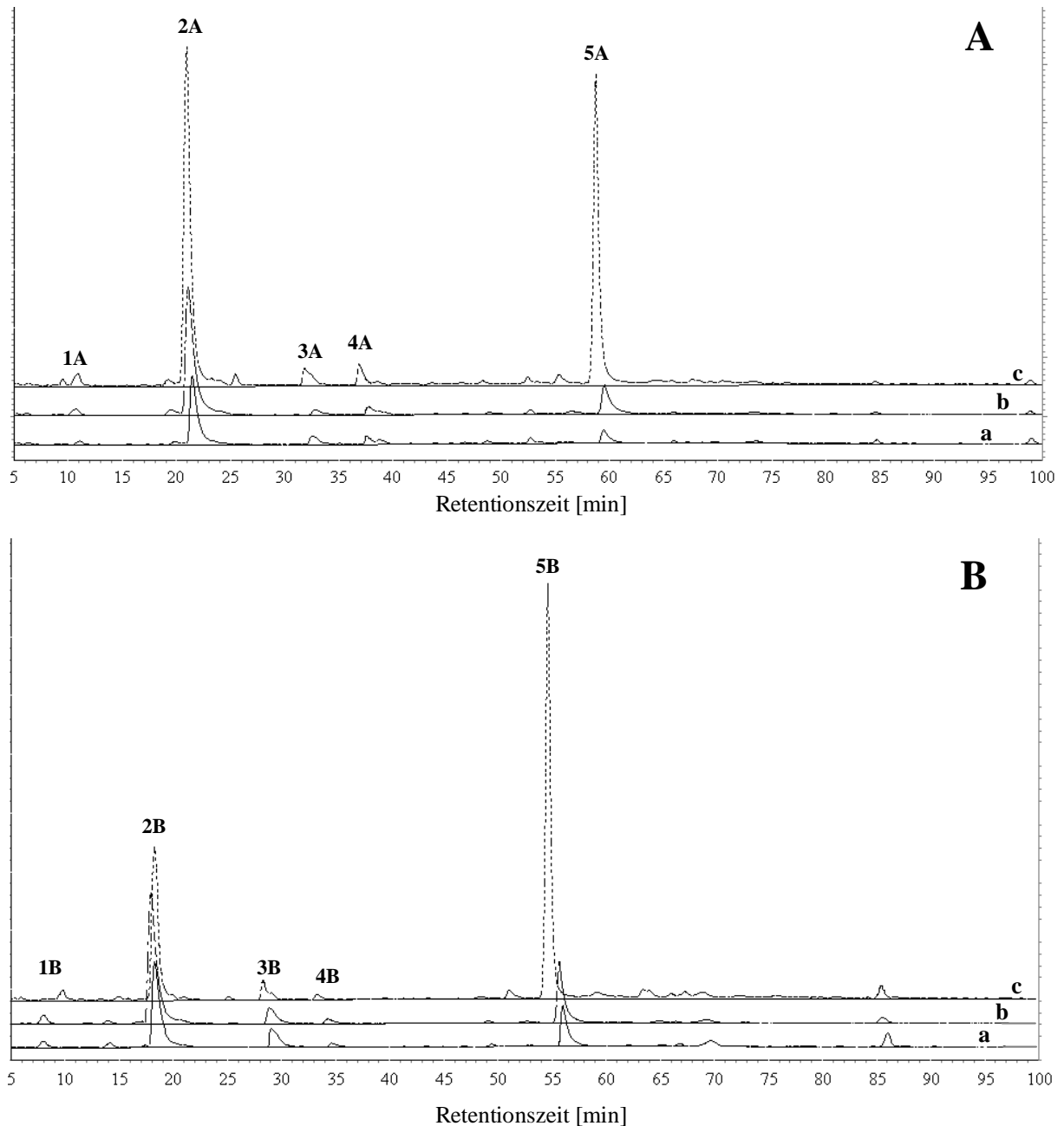


Abb. 9: HPLC-Chromatogramme von methanolischen Blattextrakten der Wildarten AC 7 (A) und AC M (B) vor (a) und nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* an DPI 1 (b) und DPI 6 (c).

Tab. 9: Zusammenstellung der Phenolgehalte, Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der charakteristisch auftretenden phenolischen Inhaltsstoffen aus nicht infizierten und infizierten Blättern (DPI 6) von AC 7 und AC M sowie Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der co-chromatographierten Referenzsubstanzen. CAE: Chlorogensäureequivalente, DPI: Days Post Inoculum, HZS: Hydroxyzimtsäurederivate, R_t : Retentionszeit, λ_{max} : Absorptionsmaximum.

	phenolische Verbindung	Phenolgehalt				Charakteristika	
		Kontrolle		DPI 6		Ø R_t [min]	λ_{max} [nm]
		mg CAE / 100 mg TG	% HZS	mg CAE / 100 mg TG	% HZS		
Standard	Chlorogensäure	-	-	-	-	21,74	325
	p-Coumarsäure	-	-	-	-	32,00	309
	Ferulasäure	-	-	-	-	38,12	323
	Kaffeensäure	-	-	-	-	18,81	324
	Sinapinsäure	-	-	-	-	46,70	324
	Rosmarinsäure	-	-	-	-	54,01	327
AC 7	Kaffeoylsäure - derivate	16,66	92,19	62,04	97,52	-	321 - 329
	Coumarylsäure - derivate	1,41	7,81	1,58	2,48	-	301 - 320
	Peak 1A	0,00	0,02	0,04	0,06	11,01	324
	Peak 2A	10,09	55,86	31,72	49,85	20,76	325
	Peak 3A	0,01	0,03	0,01	0,01	32,12	310
	Peak 4A	0,01	0,04	0,01	0,02	36,42	324
	Peak 5A	3,32	18,38	22,53	35,42	58,14	327
AC M	Kaffeoylsäure - derivate	57,18	92,31	97,86	95,08	-	321 - 329
	Coumarylsäure - derivate	4,76	7,69	5,07	4,92	-	301 - 320
	Peak 1B	0,01	0,02	0,01	0,01	10,42	324
	Peak 2B	35,10	56,67	28,20	27,40	18,95	325
	Peak 3B	0,02	0,03	0,02	0,02	30,47	310
	Peak 4B	0,01	0,01	0,00	0,00	35,82	324
	Peak 5B	17,68	28,54	62,54*	60,76	56,52	327

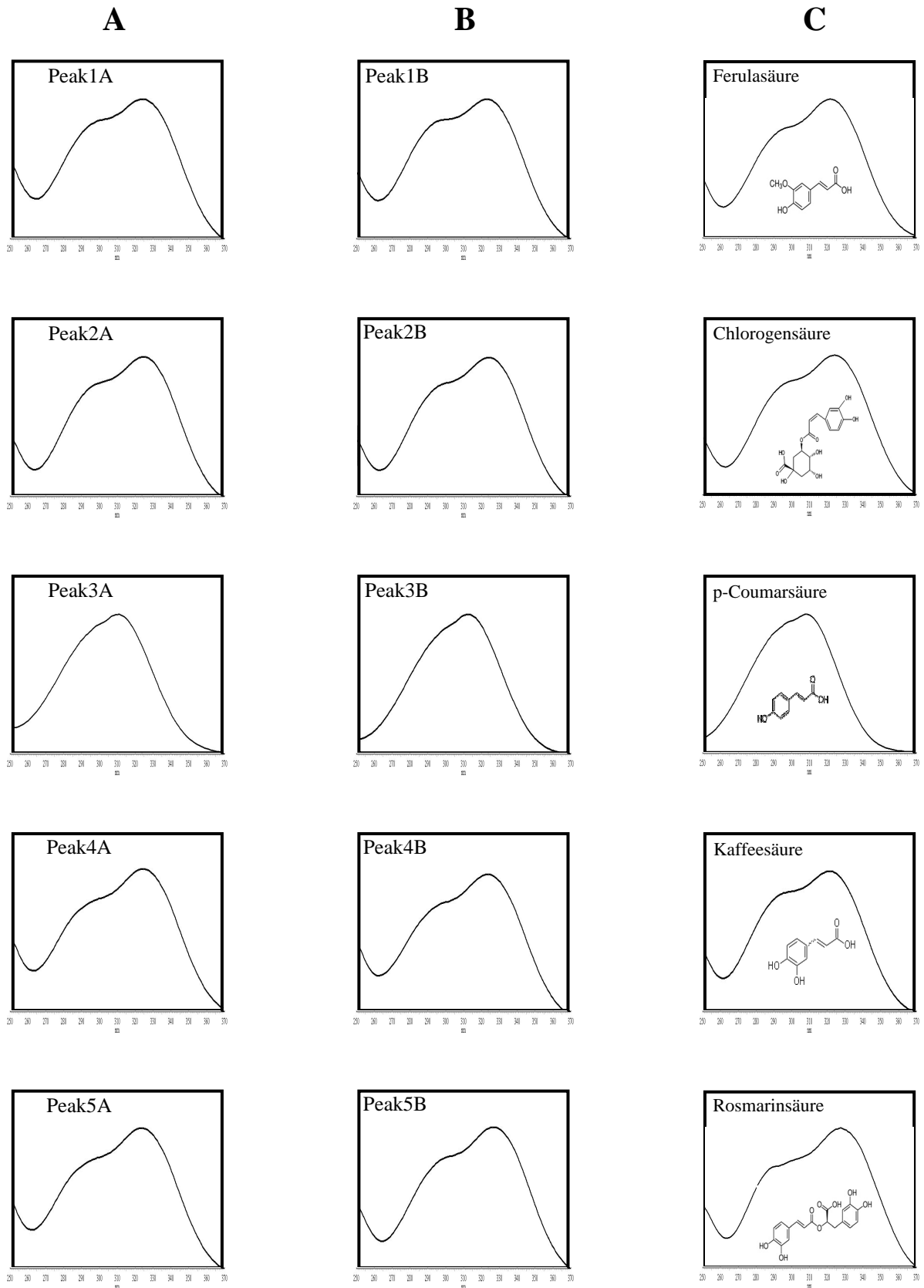
Die erhöhten Konzentrationen an Hydroxyzimtsäuren im Blattextrakt nach Infektion mit *S. sclerotiorum* waren mit einem erhöhten Gehalt an Kaffeoyle Säurederivate in Zusammenhang zu bringen. Coumarylsäurederivate spielten dabei quantitativ eine geringere Bedeutung. Weitere Inhaltsstoffe, die anhand ihres UV-Spektrums nicht den Hydroxyzimtsäuren zugeordnet werden konnten, waren in den Kontrollblättern in sehr geringen Mengen vorhanden und traten in leicht erhöhten Anteilen erst nach Infektion mit *S. sclerotiorum* und mit steigenden Gesamtphenolgehalten in den Chromatogrammen auf. Diese phenolischen Verbindungen konnten jedoch weder anhand des UV-Spektrums, noch mit Hilfe des Absorptionsmaximums eingehend charakterisiert werden.

Mit der Untersuchung der Blattohextrakte waren in beiden Wildarten zwei Substanzen besonders auffällig, da sie vor Infektion zwar vertreten waren, jedoch nach Infektion in deutlich höherer Konzentration auftraten (Abb. 10, A Peak 2A und 5A; B Peak 2B und 5B). Mit Retentionszeiten von durchschnittlich 20,76 und 58,14 min für AC 7 (Tab. 9, Peak 2A und 5A) und von 18,95 und 56,52 min für AC M (Tab. 9, Peak 2B und 5B) waren diese Verbindungen die am häufigsten auftretenden phenolischen Verbindungen in Blättern der Sonnenblumenwildarten. Trotz ähnlicher UV-Spektren, wie in Abb. 10 zu sehen, unterschieden sich Peak 2A bzw. 2B von Peak 5A bzw. 5B aufgrund ihrer stark unterschiedlicher Retentionszeiten (Tab. 9). Peak 2A und Peak 2B zeigten bezüglich ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren starke Ähnlichkeiten mit 5-Kaffeoylechinasäure. Peak 5A und 5B konnten zwar auch zu den Kaffeoyle Säurederivaten gezählt werden, konnten jedoch anhand des UV-Spektrums weder als Chlorogensäure (5-Kaffeoylechinasäure) noch als Kaffeesäure (3,4-Dihydroxyzimtsäure) identifiziert werden. Weiterhin traten noch zwei Substanzen im Chromatogramm auf, die ein für p-Coumarsäure typisches UV-Spektrum und simultane Retentionszeiten aufwiesen (Tab. 9, Peak 3A und Peak 3B). Für beide detektierten Peaks lag das Absorptionsmaximum bei 310 nm.

3.3.2.3 Charakterisierungen von Mono- und Di-Estern der Hydroxyzimtsäuren mittels LC-MS

Für die ergänzende Strukturaufklärung der phenolischen Inhaltsstoffe wurden mittels Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS) eine Kontrollprobe und eine *Sclerotinia*-infizierte Blattprobe der Wildarten analysiert. Die Ergebnisse der Massenspektren zur Identifikation und die Zugehörigkeiten sind in Tab. 10 dargestellt. Wie bereits chromatographisch anhand der Absorptionsspektren mit HPLC gezeigt wurde, konnte anhand

Abb. 10: UV-Spektren der detektierten phenolischen Verbindungen aus methanolischen Blattextrakten von AC 7 (**A**) und AC M (**B**) und UV-Spektren mit zugehöriger Strukturformeln der Referenzsubstanzen (**C**).



Tab. 10: Nachweis und Charakterisierung von Mono- und Di-Estern von Hydroxyzimtsäuren anhand von Massenspuren aus LC-MS-Analysen in nicht infizierten Kontrollblattproben und infizierten Blattproben der Wildart AC 7.
 - = nicht nachweisbar, + = nachweisbar, ++ = erhöht nachweisbar, +++ = stark erhöht nachweisbar

	Identifikation	<i>m/z</i> [M-H]	<i>R_t</i> [min]	Kontroll- probe	infizierte Probe
Mono-Ester	5-Coumaroyl-Chinasäure	337	24,1	++	++
	5-Coumaroyl-Chinasäure	337	26,5	++	++
	?-Kaffeoyl-Chinasäure	353	12,8	+	++
	3-Kaffeoyl-Chinasäure	353	11,1	-	++
	3-Kaffeoyl-Chinasäure	353	19,2	-	+++
	5-Kaffeoylchinasäure	353	19,4	++	-
	5-Kaffeoyl-Chinasäure	353	22,0	-	++
	5-Feruloyl-Chinasäure	367	27,1	++	++
	5-Feruloyl-Chinasäure	367	29,3	+	+
	?-Feruloyl-Chinasäure	367	42,5	+	-
Di-Ester	Kaffeoyl-Coumaroyl-Chinasäure	499	36,5	-	+
	Kaffeoyl-Coumaroyl-Chinasäure	499	43,0	+	+
	Kaffeoyl-Feruloyl-Chinasäure	529	37,3	+	+
	3,5-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	16,1	-	+
	3,5-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	25,8	-	+
	?-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	18,6	+	+
	?-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	22,8	-	+
	?-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	37,6	-	++
	?-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	38,5	-	+++
?-Di-Kaffeoyl-Chinasäure	515	41,9	-	++	

der MS-Daten bestätigt werden, dass der größte Anteil an phenolischen Substanzen im Rohextrakt aus Kaffeoylsäurederivaten zusammengesetzt ist. Ergänzend zu den HPLC-Daten konnten anhand von Massenspuren zwischen Mono-Estern und Di-Estern der Hydroxyzimtsäuren differenziert werden (s. Anhang). Zudem wurden in der Kontrollprobe, sowie in der infizierten Probe Feruloylchinasäuren, Kaffeoyl-Feruloyl-Chinasäure und Kaffeoyl-Coumaroyl-Chinasäure nachgewiesen. Hinsichtlich der Differenzierung war auffällig, dass in den Kontrollblättern primär Mono-Kaffeoylchinasäuren (MCQA's) und geringe Anteile an Di-Kaffeoylchinasäuren (DCQA's) detektiert wurden. Demgegenüber wurden in den Blättern nach Infektion vermehrt auftretende DCQA's nachgewiesen.

Höchstwahrscheinlich handelt es sich hierbei um unterschiedliche Isomere, da sich die detektierten DCQA's in ihren Retentionszeiten teilweise stark voneinander unterscheiden. Anhand der Massenspuren und mit Hilfe des MS-Schlüssels von Clifford *et al.* (2003, 2005) konnten die 5- und 3-Kaffeoylchinasäure und 3,5-Di-Kaffeoylchinasäuren charakterisiert werden. Für die übrigen MCQA's und DCQA's konnten anhand des Schlüssels keine weiteren Charakterisierungen erfolgen. Während der LC-MS wurden die in den HPLC-Analysen (s. 3.3.2.2) auffälligen Peaks 2A und 5A ebenfalls mit relativ hohen Anteilen detektiert, wobei Peak 5A in der Kontrollprobe nicht nachzuweisen war. Die MS-Auswertung ermöglichte zudem eine Zuordnung der charakterisierten Hydroxyzimtsäurederivate. Interessanterweise ergaben die Ergebnisse, dass in der Kontrollprobe Peak 2A (R_t : 19,4 min) als eine 5-Kaffeoyl-Chinasäure und in der *Sclerotinia*-infizierten Probe Peak 2A (R_t : 19,1 min) als eine 3-Kaffeoyl-Chinasäure charakterisiert wurde. Bei Peak 5A (R_t : 38,5 min), welches nur in der infizierten Blattprobe nachgewiesen werden konnte, handelt es sich um eine DCQA, die pathogen-induziert in hohen Konzentrationen nachzuweisen war.

3.4 Differentielle Genexpression in *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe

Am Beispiel der Interaktion zwischen *Helianthus* spp. und dem peritrophen phytopathogenen Pilz *S. sclerotiorum* wurde eine Genexpressionsstudie durchgeführt. In diesem Zusammenhang wurde *Sclerotinia*-infiziertes Blattgewebe einer anfälligen Sonnenblumenart *H. annuus* (cv. Albena), sowie zweier *Sclerotinia*-resistenter Sonnenblumenwildart-accessionen (AC M und AC 7) im Vergleich zu nicht infiziertem Blattgewebe verglichen. Die Interaktion wurde auf transkriptomischer Ebene innerhalb der ersten 4 Tage nach initialem Kontakt mit dem Pathogen untersucht. Mithilfe der DDRT-PCR-Methodik wurden cDNA-Fragmente generiert. Anschließend wurden die signifikant differentiell exprimierten cDNA-Fragmente, die mit einer Pathogeninduktion in Zusammenhang standen, charakterisiert. Die Auswahl von Kandidatenfragmenten erfolgte anhand von bioinformatischen Datenreduktionsalgorithmen.

3.4.1 Kapillargelelektrophoretischer Nachweis und Detektion von DDRT-PCR generierten cDNA-Fragmenten

Zum Nachweis einer *Sclerotinia*-induzierten Veränderung des Genexpressionsmusters sowie zum Screenen von cDNA-Fragmenten differentiell exprimierter Gene wurde ein Vergleich

zwischen infiziertem und nicht infiziertem Blattgewebe vorgenommen. Die Inokulationsversuche wurden, wie zuvor beschrieben, unter moderat kontrollierten Bedingungen im Gewächshaus durchgeführt. Die Ergebnisse der zuvor durchgeführten Inokulationsversuche wurden zum Versuchsaufbau der Genexpressionsstudien herangezogen. Die Auswertung dieser Inokulationsdaten zeigte, dass eine Penetration des Pilzes in der Hauptsache erst nach 48 h (DPI 2) stattfand. Deshalb wurde zur Untersuchung dieser frühe Zeitpunkt als Penetrationszeitpunkt festgelegt. Um weitere differenzierte Aussagen über den Verlauf der Pathogenese auf transkriptomischer Ebene zu konkretisieren, wurden ein Zeitpunkt früher Kolonisation (DPI 3) und ein späterer Infektionszeitpunkt (DPI 4) zur Beobachtung hinzugefügt. Diese drei Zeitpunkte wurden mit den Ergebnissen des nicht infizierten Blattgewebes als Kontrollzeitpunkt verglichen.

Bei der Gewinnung der mRNA aus dem zu untersuchenden Blattgewebe war es besonders entscheidend, ausreichende und vergleichbare Mengen an mRNA aus den untersuchten Blättern zu isolieren. Da die Blattgrößen selbst innerhalb der Pflanzenart stark variierten, wurden Blattstücke der beiden Wildarten AC M und AC 7 bzw. der annualen Art *H. annuus* cv. Albena mit jeweils einheitlichem Durchmesser am äußeren Rand der Infektionsstellen ausgestanzt. Das zu untersuchende Gewebe beinhaltete ausschließlich gesundes Blattgewebe, welches entweder an die Penetrationsstelle für DPI 2 oder an die bereits nekrotisierten Infektionsstellen für DPI 3 und 4 grenzte. Da sich aus den zuvor ermittelten Inokulationsdaten ebenfalls gezeigt hatte, dass der Verlauf der Infektion durch *S. sclerotiorum* bevorzugt in Richtung Blatthauptader und Petiole richtete, wurde das zu untersuchende Pflanzenmaterial zudem einheitlich für jede zu untersuchende Probe aus diesem zentralen Bereich der Lamina entnommen. Eine erste Aufarbeitung der Blattsegmente erfolgte mit Aufschluss der Zellen und einer anschließenden Gewinnung der Gesamt-RNA. Die Quantität und Qualität der isolierten RNA wurde mit Hilfe der elektrophoretischen Auftrennung von RNA-Proben überprüft (Abb. 11).

Im Gegensatz zu anderen eukaryontischen Zellen besitzen die pflanzlichen Zellen zusätzlich zu den cytoplasmatischen und mitochondrialen rRNA-Spezies (28/25S und 18S) noch eine weitere Gruppe an rRNA-Spezies aus den Plastiden (23S, 16s und 5S). Wie in Abb. 11 anhand der Vielzahl von Banden zu erkennen ist, setzte sich auch der Großteil der Gesamt-RNA der zu untersuchenden *Helianthus*-Blattsegmente aus mehreren rRNA-Spezies zusammen. Die Gesamt-RNA-Mengen der einzelnen Blätter der untersuchten Pflanzenarten zeigten im Vergleich, dass in den Wildarten geringere Gesamt-RNA-Mengen aus den

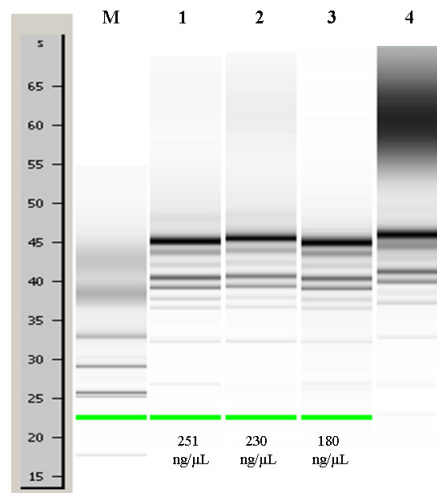


Abb. 11: Elektrophoretisch ermittelte Qualität und Quantität der Gesamt-RNA aus Blattsegmenten von AC 7, Kontrolle (nicht infiziert, **1**) und Probe (infiziert, **2**), und von AC M, Kontrolle (nicht infiziert, **3**) und einer DNA kontaminierten Probe (infiziert, **4**). Die Gesamt-RNA einer infizierten Probe der Wildart ACM wurde nicht dargestellt.

Blattsegmenten mit durchschnittlich 7,6 μg für AC 7 und 6,2 μg für AC M gewonnen wurden, als bei der anfälligen Sonnenblumenart *H. annuus* cv. Albena mit durchschnittlich 13,5 μg Gesamt-RNA. Eine geringere Ausbeute an RNA aus pflanzlichem Blattmaterial ist meist verbunden mit hohen Konzentrationen an Sekundärmetaboliten und Polysacchariden, die in vielen Fällen eine RNA-Isolation erschweren. Bei den *Helianthus*-Arten hatten Untersuchungen zum Phenolgehalt in Blättern bereits gezeigt, dass die Wildarten im Vergleich zu der annuellen Sorte Albena höhere Anteile an phenolischen Verbindungen enthielten. Diese Beobachtung könnte ein Erklärungsansatz für die Unterschiede in der RNA-Ausbeute darstellen. Die Reinheit der gewonnenen RNA war in den meisten Fällen hoch, was dafür sprach, dass die gewählte RNA-Isolationmethode für die Isolation von RNA aus *Helianthus*-Blattgewebe eingesetzt werden kann und zu einer Eliminierung von Sekundärmetaboliten beitragen konnte. Weiterhin wurden in keiner der untersuchten RNA-Proben Degenerationen der RNA festgestellt, welche besonders bei der DDRT-PCR-Methodik qualitätsentscheidend ist, da RNA-Degenerationen u.a. zur Amplifikation von Falsch-Positiven führen können. Vereinzelt traten Kontaminationen mit genomischer DNA auf (s. Abb. 11, Lane 4). Diese wurden jedoch durch Behandlung mit DNasen beseitigt. Die Quantifizierung von Gesamt-RNA stellte lediglich einen Anhaltspunkt zur Konzentrationsbestimmung von mRNA dar, da sich die Ermittlung der RNA-Mengen an dem Gehalt der

ribosomalen RNA orientiert und somit lediglich eine begrenzte Aussage über die Quantität der poly(A)⁺-RNA in den jeweiligen Proben getroffen werden kann.

Um eine konfidente Vergleichbarkeit der Genexpressionsmuster an unterschiedlichen Infektionszeitpunkten zu gewährleisten, wurden für die Genexpressionsstudie einheitlich 6 µg Gesamt-RNA zur Isolation der poly(A)⁺-RNA eingesetzt. Zudem wurden bei der Gewinnung vergleichbare poly(A)⁺-RNA-Ausbeuten über einheitliche Volumina des Oligotex-Säulenmaterials gewonnen. Die gewonnene poly(A)⁺-RNA der einzelnen Blattproben wurde mit Einsatz des Oligo-dT-Primers und definierten mRNA-Mengen in einem RT-PCR-Ansatz in cDNA revers transkribiert. Die gewonnene cDNA wurde anschließend als Template in der Differential Display Random-PCR eingesetzt. Zur Erstellung eines cDNA-Fragmente-Pools standen 20 Random-Primer in Kombination mit einem fluoreszenz-gelabelten Oligo-dT-Primer zur Verfügung. Die generierten Fragmente stellen in der hier implementierten Technik einen Ausschnitt des mRNA-Pools der untersuchten Zellen dar. Des Weiteren rekrutierten sich die amplifizierten Fragmente meist aus untranslatierten Bereichen der poly(A)⁺-RNA, da die Kombination aus Arbitrary-Primer und Anchor-Primer in der Hauptsache nur Sequenzen aus diesem Bereich flankieren. Da zur Durchführung der Technik des Differential Display im Gegensatz zu dem Einsatz von anderen Techniken keine vorherigen Sequenz-Informationen benötigt werden, wurde diese Technik zur Untersuchung des Transkriptoms in *Helianthus* spp. eingesetzt. Dabei wurde die DDRT-PCR in dieser Arbeit in Anlehnung an Arbeiten von Kriegs *et al.* (2006) mit Modifikationen durchgeführt.

Die Größenauftrennung und Peakdetektion der bei der DDRT-PCR Cy5-gelabelten cDNA-Fragmente erfolgte mit einer 8-Kapillargelelektrophorese. Die in dieser Arbeit eingesetzte kapillargelelektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren zeichnet sich im Vergleich zu üblichen cDNA-Auftrennungstechniken, wie z.B. Gel-slab und Polyacrylamidgel, durch eine automatisierte hochauflösende Auftrennung und eine hohe Sensitivität in der Detektion von Cy5-gelabelten cDNA-Molekülen mit jeweils nur einem Nucleotid Größenunterschied und geringen Konzentrationen aus. Eine Größenordnung der cDNA-Fragmente wurde mit dem Einsatz eines internen Größenstandards erzielt. Mit Hilfe der von Beckman-Coulter eingeführten Software wurde zur Auswahl der Kandidatenfragmente zum einen ein Schwellenwert der Signalstärke von 1000 rfu angesetzt, da sich Peaks unter diesem Wert nicht eindeutig vom Signal-Rausch-Verhältnis differenzieren ließen. Zusätzlich wurden die detektierten Peaks aller Elektropherogramme durch ein Binning mit höchstens 2 Nucleotiden (nt) pro Bin klassifiziert, welches die Einteilung in einzelne Fragmente gewährleistete und eine Komparibilität distinkter Proben zuließ. Die zunächst visuelle Betrachtung der Elektro-

pherogramme zeigte, dass bei allen Fragment-Auftrennungen in dem Bereich zwischen 50 und 100 bp ein stark überladenes Peaksignal auftrat. Da sich dieses Phänomen bei Anwesenheit von Primerresten sowie mit Überlagerung extrem vieler kleiner Fragmente nicht verhindern ließ und der Größenstandard lediglich einen Größenbereich bis zu 600 bp abdeckte, wurden diejenigen Peaks in die Auswertung miteinbezogen, die in einem Bereich zwischen 100 und 600 bp lagen. Ein Einfluss auf die restliche Auftrennung von Kandidatenfragmenten durch das überladene Peaksignal wurde nicht festgestellt. In Abb. 12 sind die Größenverteilungen der amplifizierten cDNA-Fragmente für alle Primerkombinationen und Pflanzenarten zusammenfassend dargestellt. Das Histogramm weist eine für die DDRT-PCR typische Größenverteilung auf, da bei der Random-PCR-Reaktion vermehrt kleinere Fragmente mit Längen bis zu 300 bp generiert wurden. Insgesamt lagen 75 % der amplifizierten Fragmente in einer Größenordnung zwischen 100 und 334 bp.

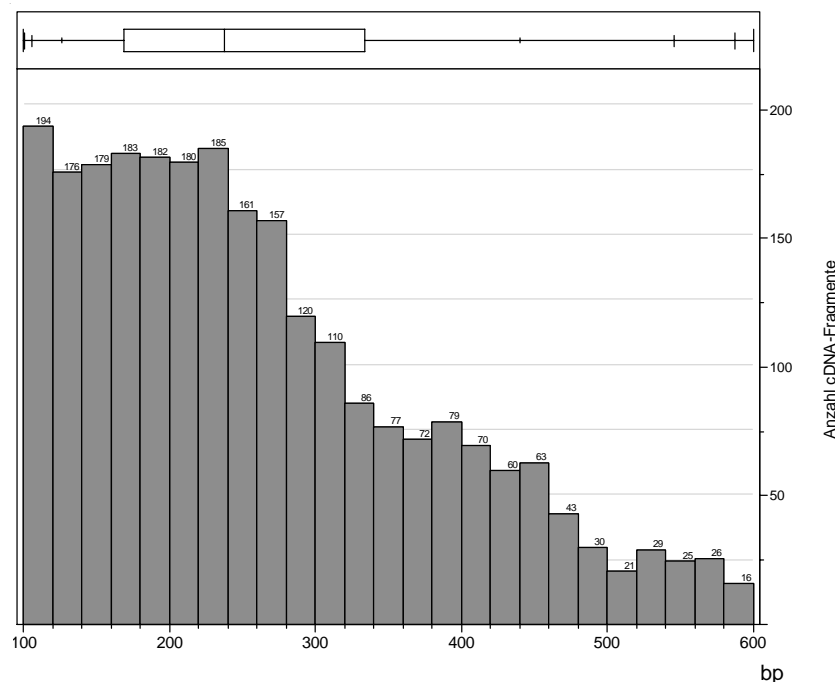


Abb. 12: Häufigkeitsverteilungen aller detektierten Cy5-gelabelten cDNA-Fragmente unterschiedlicher Nukleotidlänge zwischen 100 und 600 bp.

Mit einer Überlagerung von unterschiedlichen Elektropherogrammen unter Verwendung des gleichen Random-Primers konnte gezeigt werden, dass lediglich geringe Variabilitäten im Peakmuster bestanden, was auf eine gute Reproduzierbarkeit der Methode hindeutete (Abb. 13). Die hohe Reproduzierbarkeit ist gegebenenfalls auf die höhere Annealing-Temperatur von 64 °C im zweiten Schritt der Random-PCR nach der Hybridisierung bei einer geringeren

Annealing-Temperatur und auf eine hohe Qualität der isolierten polyA⁺-RNA zurückzuführen. Eine Ausnahme stellten die Ergebnisse der Primer-Kombination B07-OligodT dar, die aus der Auswertung ausgeschlossen wurden. Hierbei wurde bei allen untersuchten Proben eine zu geringe Amplifikationsausbeute mit zusätzlich niedrigen Signalstärken detektiert, welches höchstwahrscheinlich an einer geringen Hybridisierungsspezifität der Primersequenz lag. Unter Berücksichtigung aller Primer-Kombinationen konnten im Durchschnitt 490 cDNA-Fragmente pro Probe klassifiziert werden. Die Anzahl von Fragmenten pro Primerkombination lag innerhalb des analysierten Bereiches von 100 und 600 bp zwischen 0 und 116 Fragmenten mit einer durchschnittlichen Anzahl von 26 Fragmenten. Dabei wurden Peakhöhsensignale bis zu 170.000 rfu erreicht. Bei Vergleich der Peak-Lanes zwischen den Pflanzenarten konnte gezeigt werden, dass das Peak-Muster der einzelnen Primerkombinationen teilweise stark variierte. Dies galt besonders bei Vergleich der Peakmuster der Wildarten mit dem Peakmuster von *H. annuus* cv. Albena.

3.4.2 Statistische Auswertung der Expressionsdaten und Auswahl von cDNA-Fragmenten differentiell exprimierter Gene

Die Methode der DDRT-PCR ermöglicht den Vergleich der Expressionsdaten von mehr als zwei Proben und gestattet somit Gene zu identifizieren, die entweder hoch- oder herunterreguliert sind. In diesem Zusammenhang sollte der Einsatz dieser Methode in dieser Arbeit dazu dienen, cDNA-Fragmente differentiell exprimierter Gene an unterschiedlichen Infektionszeitpunkten aus infiziertem und nicht infiziertem Blattgewebe zu identifizieren. Dabei sollte zwischen resistenten und anfälligen *Helianthus*-Arten unterschieden werden, um potentielle Unterschiede festzustellen. In der Literatur sind viele Beispiele an Differential Display-Experimenten beschrieben, in der die Kandidatenfragmente meist visuell oder über Differenzrechnung zwischen behandelten und nicht behandelten Proben zur weiteren Charakterisierung ausgewählt werden. Die gel-basierten Methoden stellen eine wenig implementierbare Methode dar und eignen sich nicht als Hochdurchsatzverfahren, da insbesondere durch eine visuelle Auswertung eine hohe Arbeitsintensität erforderlich ist und oftmals bei der Auswahl an Kandidatenfragmenten ein hoher Anteil Falsch-Positiver existiert. Sie erlauben auch nicht die Auswertung anhand von biometrischen Algorithmen. Die kapillargelelektrophoretische Auftrennung von Expressionsdaten ermöglicht dagegen aufgrund der Detektion von Fluoreszenzsignalen eine datenbankgenerierte Auswertung, die jedoch noch weitestgehend etabliert werden muss. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein erster Ansatz zur statistischen Auswertung und Analyse von Expressionsprofilen anhand

eines hierarchischen Clusterverfahrens, sowie zur Auswahl von Kandidatenfragmenten für weitere Charakterisierungen über eine Varianzanalyse von Cy5-gelabelten cDNA-Fragmenten durchgeführt.

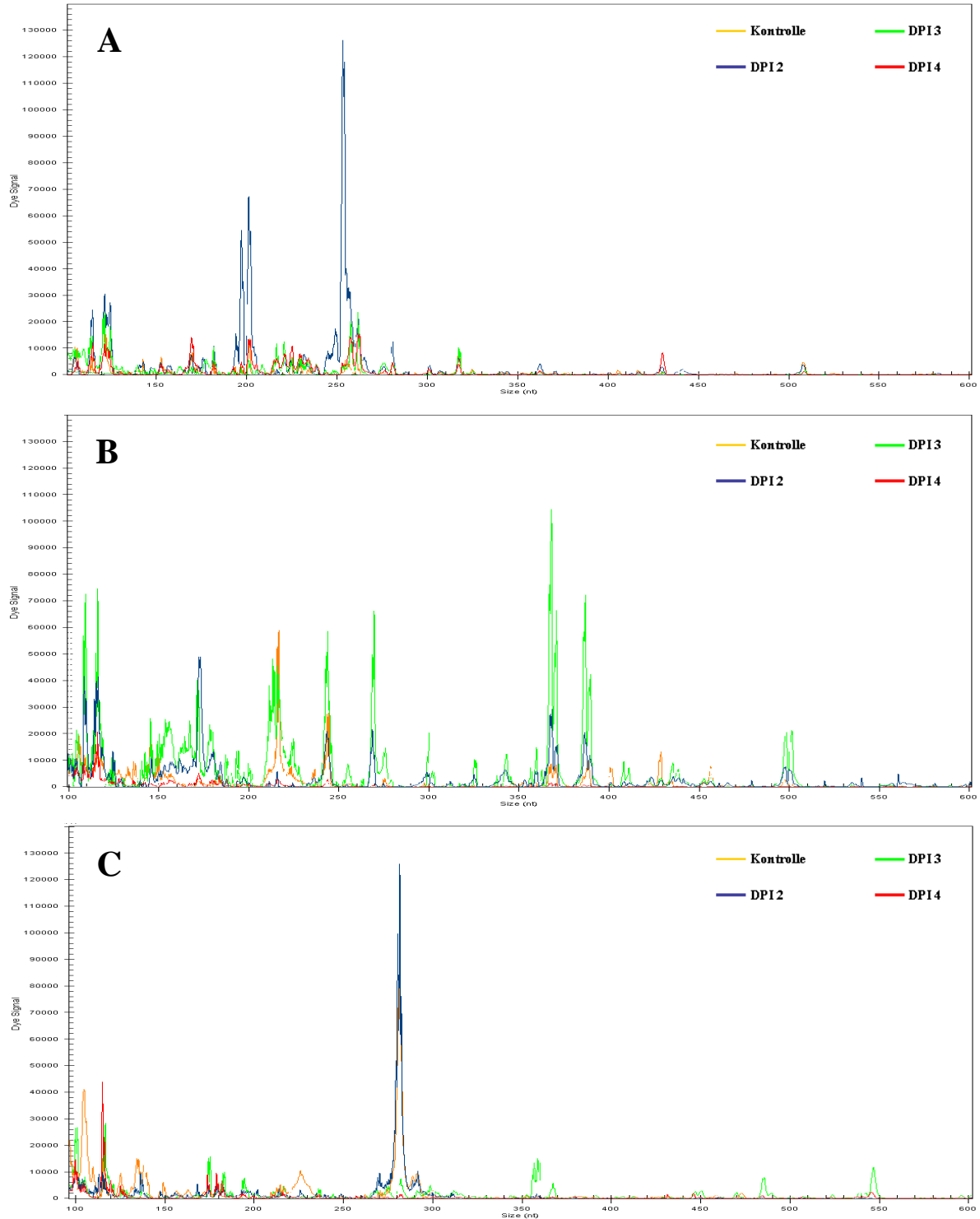


Abb. 13: Vergleichendes Elektropherogramm-Overlay von Cy5-gelabelten cDNA-Fragmenten für die AC 7 Primer-Kombination B01-OligodT (A), die AC M Primer-Kombination B04-OligodT (B) und die Albena Primer-Kombination B08-OligodT (C) an vier unterschiedlichen Infektionszeitpunkten.

3.4.2.1 Qualitätsprüfung und Standardisierung der Expressionsdaten

Um die Auswertung zur Auswahl von Kandidatenfragmenten aus dem generierten cDNA-Fragmente-Pool vorzunehmen, wurden die zuvor durch Binning ausgewählten Fragmente herangezogen. Für alle Peaks wurden die Peakhöhen als abhängige Messgröße eingesetzt und waren durch die detektierten absoluten Fluoreszenzsignalstärken repräsentiert. Diese konnten in numerischer Form als AscII-Tabelle exportiert und für die Normalisierung und das Screenen von cDNA-Fragmenten differentiell exprimierter Gene Verwendung finden. Um die Identifizierung von Kandidatenfragmenten zu gewährleisten, wurden die Rohdaten auf ihre Qualität hin geprüft (JMPGenomics 3, SAS). Dafür wurde primär eine eindimensionale Verteilungsanalyse aller Proben durchgeführt. Die Ergebnisse der Dichteschätzung ergaben, dass die Expressionsdaten aller untersuchten Proben einem ähnlichen Verteilungsmuster entsprachen, welches auf eine hohe Qualität der Daten hindeutete und eine gute Voraussetzung für die sich anschließende statistische Auswertung darstellte. Die Rohdaten wurden mit Hilfe einer Zentralisation über die Standardabweichung transformiert, um eine bestmögliche Repräsentation der Daten zu ermöglichen und die experimentell bzw. technisch bedingten systemischen Fehler zu eliminieren.

3.4.2.2 Klassifizierungen anhand von Expressionsmustern

Um Ähnlichkeiten zu definieren und somit Gruppierungen zwischen den untersuchten Proben auf der Grundlage ihrer Expressionsmuster vorzunehmen, wurden die standardisierten Expressionsdaten aller untersuchten Proben in einer hierarchisch-agglomerativen Analyse nach dem Ward'schen Verfahren klassifiziert. Hierbei handelt es sich um ein iteratives Verfahren zur Segmentierung von Objekten in homogene Gruppen, denen ähnliche Expressionsmuster zugrunde liegen. In dieser Arbeit wurden die Expressionsdaten aller infizierten und nicht infizierten Blattproben der drei Sonnenblumenarten AC 7, AC M und Albena in die Clusteranalyse miteinbezogen. Wie in Abb. 14 in dem erstellten Dendrogramm mit Heat map zu sehen ist, waren sich, bis auf Probe K7_AC 7, die sich zu einer Kontrollprobe der Wildart AC M (K2_AC M) zuordnete, zunächst die Expressionsmuster der nicht infizierten Kontrollproben und die Expressionsmuster der infizierten Blattproben innerhalb einer Art am ähnlichsten. Dies lässt darauf schließen, dass sich insbesondere die Kontrollproben dieser einzelnen Klassen in einem vergleichbaren physiologischen Zustand befanden. In den infizierten Proben ließ sich kein spezifisches Muster bezüglich der

Messzeitpunkte erkennen, es konnte lediglich in infektionsspezifische Muster gruppiert werden.

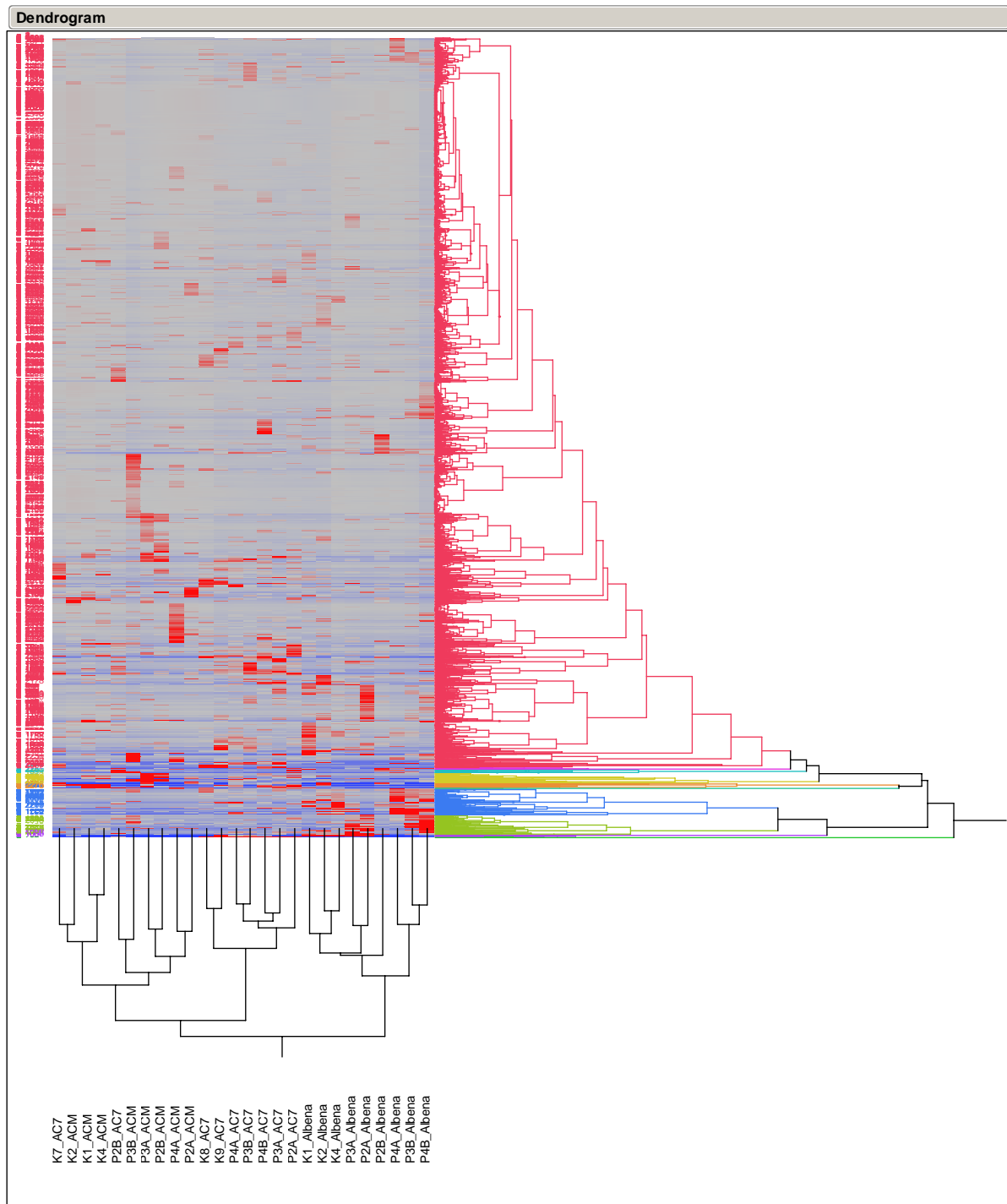


Abb. 14: Darstellung der Ergebnisse der hierarchischen Clusteranalyse nach Ward anhand eines Dendrogramms in Kombination mit einem Heat map für alle untersuchten Blattproben (unten) und für die jeweiligen cDNA-Fragmente (links) (SAS9, Jmp Genomics3).

Des Weiteren ergab sich durch wiederholende Fusionierung von ähnlichen Gruppen trotz einer Integration von infizierten und nicht infizierten Proben, eine klare genomspezifische Segmentierung in die Klasse der Wildarten und in die Klasse der annualen Art *H. annuus* cv. Albena. Diese Segmentierung wurde durch eine hohe Variabilität der Expressionsdaten zwischen dem Genom C, wozu *H. annuus* gezählt wird, und Genom A, in welches die perennierenden Wildarten AC M und AC 7 zugeordnet sind, gekennzeichnet. Weiterhin konnte mit Hilfe der Clusteranalyse eine genotypspezifische Klassifizierung erzielt werden, da sich AC M und AC 7 ebenfalls anhand ihrer Expressionsprofile segmentieren ließen. Insgesamt kann generalisiert werden, dass sich die Expressionsmuster der untersuchten Pflanzenarten deutlich voneinander unterscheiden und dass die Variabilitäten der Expressionsdaten zwischen den Arten höher waren, als die infektionsspezifischen Variabilitäten einer Art. Es erfolgte bei keiner Pflanzenart eine eindeutige Gruppierung der infizierten Proben anhand der eingeführten Messzeitpunkte nach Infektion.

Weiterhin ließ sich unmittelbar zeigen, dass sich Expressionsdaten, die mit Hilfe eines Differential Display Ansatzes mit 19 Primern generiert und anhand des Fluoreszenz-Labeling detektiert wurden, mit Einsatz eines hierarchischen Clusterverfahrens genotyp- und genomspezifisch klassifizieren ließen. Die Typologie der Expressionsdaten weist somit darauf hin, dass ohne Kenntnis der Arten und ohne Berücksichtigung spezifischer Sequenzdaten eine Gruppierung der Arten allein anhand der Fragmentdaten aus 19 Primer-Kombinationen mit der Methode des DDRT-PCR möglich war. Dies lässt eine einfache Verifizierung des Differential Display Systems zu, da die Clusteranalyse einen raschen Einblick in die Struktur der Daten gewährt.

3.4.2.3 Etablierung einer Varianzanalyse zum Screenen von Kandidatenfragmenten

Für die Identifizierung von Kandidatenfragmenten aus *Sclerotinia*-infizierten *Helianthus*-Blattproben, die in engem Zusammenhang zu den Infektionsprozessen stehen, wurde eine Varianzanalyse (One-Way ANOVA, SAS) mit einem α -Fehler von 5% als statistische Auswertung angewandt. Insbesondere bei Auswertungen von Genexpressionsdaten am Beispiel z.B. der Microarray-Methodik, stellt der Fehler 1. Art, auch α -Fehler Kumulierung, der durch multiples Testen entsteht, ein außerordentliches Problem dar. Je größer das Datenvolumen, desto wahrscheinlicher ist eine Auswahl von Falsch-Positiven Kandidaten. Um die Anzahl Falsch-Positiver bei der Auswahl von signifikant differentiell exprimierten Kandidatenfragmenten zu minimieren, wurde in dieser Arbeit eine multiple Testkorrektur durch die Ermittlung des FDR (False Discovery Rate) nach Benjamini und Hochberg (1995)

eingesetzt. Wie für die hierarchische Clusteranalyse fanden die bereits standardisierten Expressionsdaten auch zur Auswahl von Kandidatenfragmenten Verwendung. Insgesamt wurden je drei Kontrollproben und je zwei infizierte Proben pro Messzeitpunkt (DPI 2, DPI 3, DPI 4) als biologische Wiederholungen zur Untersuchung der Expressionsdaten kombiniert. Die biometrische Auswertung der Expressionsdaten wurde aufgrund von artenspezifischen Unterschieden auf der Ebene der Genotypen einzeln durchgeführt. Um die pathogen-induzierte Genexpression für distinkte Zeitpunkte der Pathogenese zu untersuchen, wurden die Expressionsdaten der Messzeitpunkte aus der Zeitreihe jeweils mit den Expressionsmustern der nicht infizierten Kontrollproben verglichen. Die Ergebnisse der Varianzanalyse wurden in Form von „Volcano Plots“ (Abb. 15) für die einzelnen Kombinationen visualisiert, bei denen die negativen \log_{10} -transformierten p-Werte aus der Varianzanalyse zu den \log_2 geschätzten Effekten gesetzt wurden. Mit der Darstellung der in Abb. 15 aufgeführten Volcano Plots sind exemplarisch Kombinationen zwischen Messzeitpunkten und Kontrollen für die *Sclerotinia*-resistente Sonnenblumenart AC 7, AC M und *Sclerotinia*-anfällige Art Albena aufgeführt. Die Ergebnisse aus 19 Primerkombinationen zeigen bei den drei untersuchten Pflanzenarten, dass die meisten generierten Fragmente in allen Proben der Zeitreihe nicht signifikant und somit nicht differentiell exprimiert, sondern konstitutiv exprimiert waren. Durch die Infektion mit dem Pathogen wurden genotypspezifische signifikante Fragmente differentiell exprimiert, und es ergab sich aus der unterschiedlichen Anzahl an signifikanten Fragmenten ein artenspezifisches Profil.

Geht man davon aus, dass die einzelnen Fragmente jeweils Teilsequenzen unterschiedlicher Gene darstellen, dann wurden subsummiert und ohne Berücksichtigung der einzelnen Kombinationen signifikant differentielle Expressionen für 23 Fragmente (1,4 %) bei der Wildart AC 7, für 9 Fragmente bei der Wildart AC M (0,6 %) und 25 Fragmente (1,4 %) bei der annuellen Sorte Albena durch die Varianzanalyse festgehalten. Im Unterschied zu der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena wurden bei den Wildarten AC 7 und AC M nach Pathogeninduktion an allen Messzeitpunkten im Vergleich zu den Kontrollen signifikante Transkripte mit ausschließlich positiv geschätztem Effekt und somit ausschließlich hochregulierte Transkripte ermittelt (Abb. 16). Mit 15 hochregulierten Fragmenten war die Anzahl der induzierten signifikanten Transkripte bei der Wildart AC 7 2 Tage nach Infektion am höchsten. Lediglich einer dieser cDNA-Fragmente war auch nach 96 Stunden wiederum signifikant hochexprimiert. Von den Fragmenten, die in diesem frühen Infektionsstadium durch das Pathogen induziert waren, hatten alle positiv geschätzte Effekte mit \log_2 -transformierten Werten zwischen 0,5 und 13,7. Die meisten dieser Fragmente erreichten

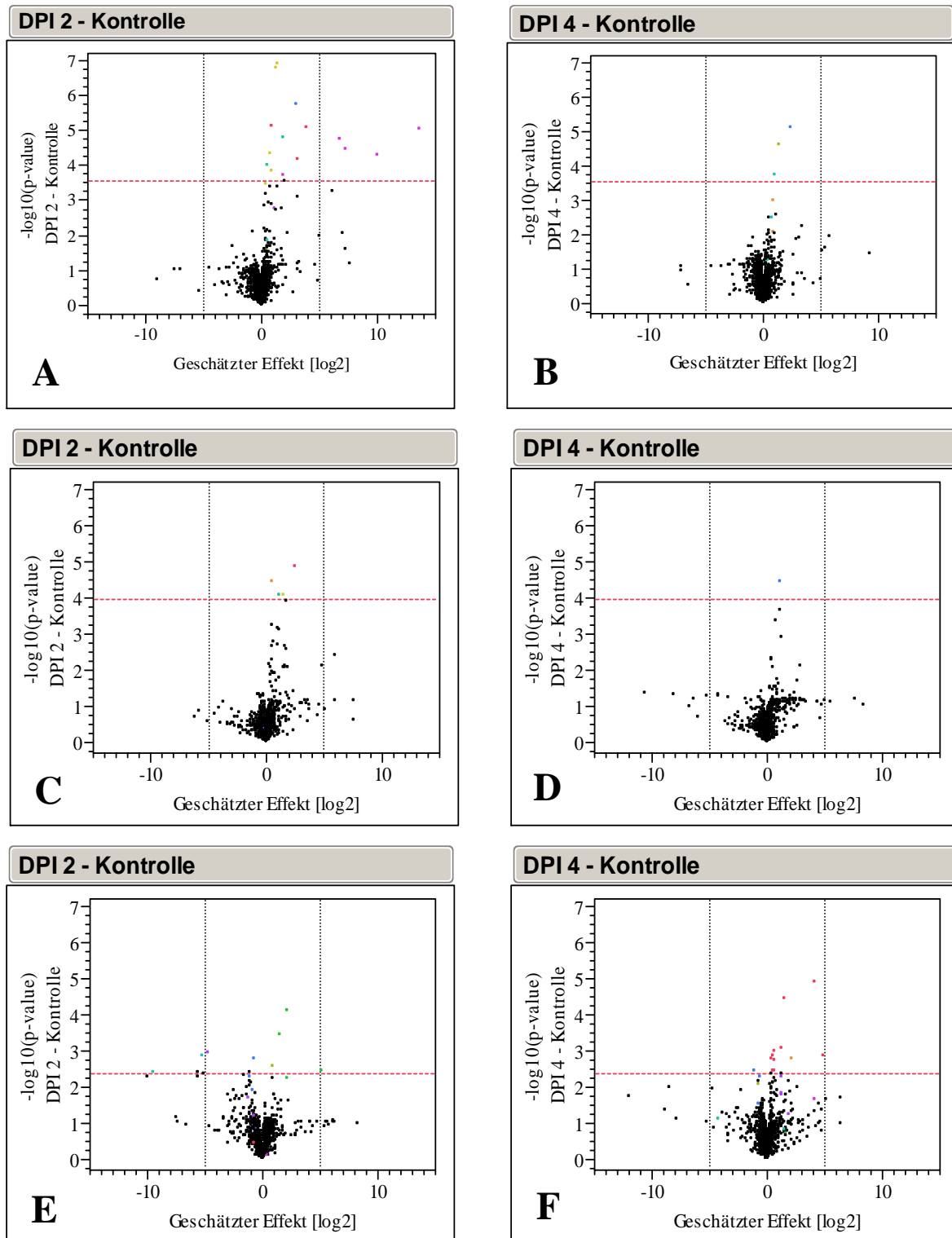


Abb. 15: Volcano Plots exemplarisch für sechs Vergleiche zwischen infizierten Proben und Kontrollproben für AC 7 (A), AC M (C) und Albena (E, F) und zwischen infizierten Proben an unterschiedlichen Messzeitpunkten für AC 7 (B) und AC M (D) mit Auftragung des geschätzten Effekts (\log_2) gegen die statistische Signifikanz ($-\log_{10}$, p-value) (SAS9, Jmp Genomics3). Punkte, die über der gestrichelten roten Linie liegen, stellen signifikante cDNA-Fragmente nach einer One-Way ANOVA mit FDR nach Benjamini und Hochberg (1995) bei $\alpha < 0.05$ dar.

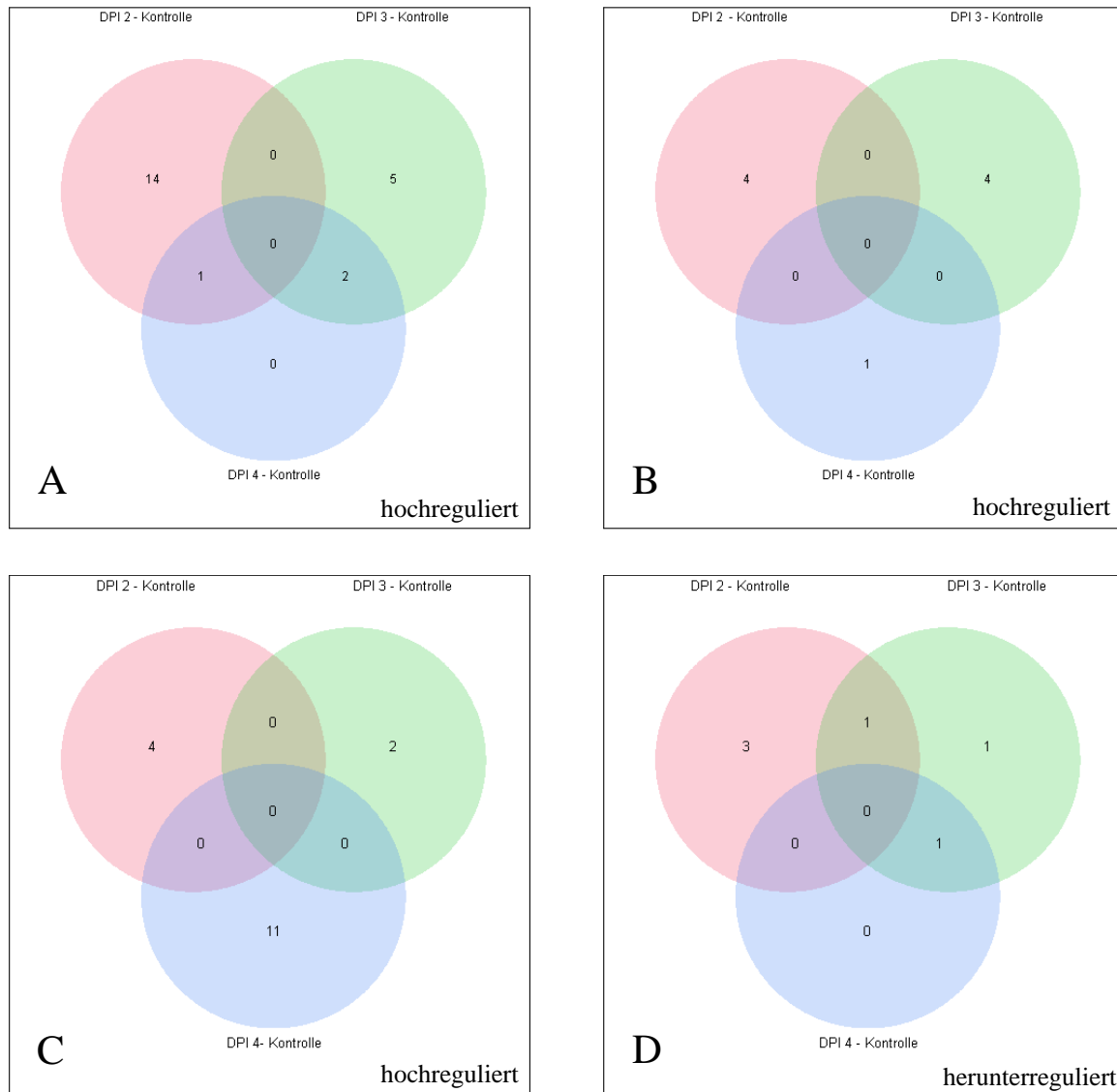


Abb. 16: Schnittmengendiagramme zur Darstellung und zum Vergleich signifikanter Transkripte an drei Messzeitpunkten (DPI 2 (rosa), DPI 3 (grün), DPI 4 (blau)) der infizierten Blattproben im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollproben für AC 7 (A), AC M (B) und Albena (C, D) (SAS9, Jmp Genomics3).

Anzahl der Fragmente stellen die Gesamtheit aller signifikant differentiell exprimierter Fragmente nach One-Way ANOVA mit FDR nach Benjamini und Hochberg (1995) bei $\alpha < 0.05$ für die jeweiligen Vergleichskombinationen dar. **DPI:** Days Post Inoculum.

jedoch geringe Varianzen mit geschätzten Effekten < 2 (Tab. 11). Bei vier Fragmenten konnte eine sehr starke Varianz der Genexpression festgestellt werden mit geschätzten Effekten von > 4 (B01_253, B13_162, B13_164, B13_193). Drei Tage nach Inokulation wurden bei AC 7 insgesamt 7 Fragmente hochreguliert, von denen zwei, B11_261 und B11_263, auch noch an DPI 4 weiterhin induziert waren.

Von den insgesamt 9 Fragmenten, die bei der Wildart AC M signifikant hochreguliert waren, konnten die Fragmente lediglich einzelnen Messzeitpunkten zugeteilt werden. Davon waren

jeweils 4 unterschiedliche Fragmente an DPI 2 und DPI 3 und ein Fragment am 4. Tag nach Inokulation signifikant. Die Expression dieser induzierten Fragmente erreichte bis zu 2,4-fach höhere Transkriptniveaus im Vergleich zu den untersuchten Kontrollen.

Frühe Zeitpunkte der Infektion durch *S. sclerotiorum* führten bei der anfälligen Sorte Albena im Gegensatz zu den Ergebnissen der Expressionsdaten der Wildarten zu hochexprimierten und reprimierten Kandidatenfragmenten im gleichen Verhältnis. Alle hochregulierten Transkripte wiesen eine DPI-spezifische Genexpression auf. Bei den reprimierten Fragmenten von DPI2 war einer der Transkripte ebenfalls am Tag 3 nach Inokulation weiterhin herunterreguliert. Dies traf für ein weiteres Fragment zu, welches an den Zeitpunkten DPI 3 und DPI 4 mit einem 1,1-fachen geringeren Effekt zur Kontrolle exprimiert war. Eine auffällig hohe Anzahl an signifikanten Transkripten wurde bei der Sorte Albena am 4. Tag nach Infektion festgestellt, wo es sich bei 11 von 12 Kandidatenfragmenten um hochregulierte Transkripte mit bis zu 4,8-fachen \log_2 -transformierten Effekt im Vergleich zur Kontrolle handelte. Diese starke Induktion an einem späteren Zeitpunkt der Pathogenese stellt einen wesentlichen Unterschied zwischen der resistenten Wildarten und der anfälligen Sorte Albena dar. Je nach Bedeutung der entsprechenden Gensequenzen für die Abwehrreaktion, wäre dieser Unterschied eventuell ein Ansatz zur Erklärung der schnelleren Verbreitung des Pilzes im Blattgewebe der anfälligen Sorte.

3.4.3 Klonierung, Sequenzierung und Sequenzhomologievergleich von Kandidatenfragmenten

Für die Klonierung und Sequenzierung wurden cDNA-Fragmente als Kandidatenfragmente ausgewählt, die als Ergebnis der Varianzanalyse einen mittel bis stark geschätzten Effekt und zugleich eine Signifikanz mit $\alpha < 0,05$ aufwiesen. Da das kapillargelelektrophoretische System nicht mit einem Fraktionssammler ausgestattet war, wurden die Proben, um die ausgewählten Kandidatenfragmente zu gewinnen, auf einem Agarosegel aufgetrennt und präparativ aus dem Gel isoliert. Aufgrund der geringeren Nachweisgrenze mittels Ethidiumbromid-Färbung im Gegensatz zur Detektion Cy5-gelabelter cDNA-Fragmente wurden auch nur diejenigen Kandidatenfragmente isoliert, die auf dem Agarosegel ein starkes Bandensignal aufwiesen. Zur Blunt-end Klonierung wurde die Reamplifikation der cDNA-Fragmente mittels Phusion-Taq und den phosphorylierten Primerpaar durchgeführt. Nach Überprüfung des PCR-Produkts wurden die Proben aufgereinigt und es erfolgten die Ligation in den pcDNA3-Vektor und die Transformation in DH5 α . Nach Klonierung und

Tab. 11: Bezeichnung und Zuordnung der differentiell exprimierten Fragmente an unterschiedlichen Messzeitpunkten aus *Sclerotinia*-infizierten Blattproben bezogen auf den log2-transformierten geschätzten Effekt im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollproben. (+/++ hochexprimiert mit $+ = < 4$, $++ = > 4$, -/-- reprimiert mit $- > -4$, $-- = < -4$).

	DPI 2 - Kontrolle			DPI 3 - Kontrolle			DPI 4 - Kontrolle		
	Primer	Fragment- größe [bp]	Expression [+/-]	Primer	Fragment- größe [bp]	Expression [+/-]	Primer	Fragment- größe [bp]	Expression [+/-]
AC 7	B01	248	+	B02	110	+	B11	261	+
	B01	250	+	B06	116	+	B11	263	+
	B01	253	++	B06	120	+	B14	114	+
	B01	256	+	B11	244	+			
	B01	265	+	B11	261	+			
	B02	242	+	B11	263	+			
	B13	162	++	B11	265	+			
	B13	164	++						
	B13	188	+						
	B13	190	+						
	B13	193	++						
	B14	114	+						
	B14	126	+						
	B14	441	+						
	B14	570	+						
AC M	B02	190	+	B06	463	+	B20	210	+
	B03	199	+	B10	237	+			
	B05	223	+	B16	100	+			
	B13	148	+	B16	114	+			
Albena	B05	108	++	B08	160	+	B01	108	+
	B06	106	+	B12	410	++	B01	202	+
	B06	119	+	B02	166	-	B02	166	-
	B09	107	+	B14	165	-	B12	222	+
	B12	406	--	B14	194	-	B17	109	++
	B14	180	--				B17	189	+
	B14	194	-				B17	191	+
	B17	101	--				B17	242	+
							B17	247	+
							B17	283	++
						B17	285	+	
						B17	322	+	

Ausplattierung war es erforderlich, die Klone auf die Größe ihres Inserts zu überprüfen. PCR-Proben, deren Amplifikationsprodukt nach Größe entsprechend mit dem zu charakterisierenden Fragment übereinstimmte, wurden aufgereinigt und sequenziert (s. Anhang). Zur spezifischen Sequenzanalyse erfolgte die Sequenzierung mit Einsatz der plasmidsequenzspezifischen Primer (CMV bzw. BGH). Die Poly-A bzw. Poly-T Sequenz erschwerte die Sequenzierung aufgrund des Phänomens des „Enzyme-Slipping“ und führte zu teilweise unvollständigen Sequenzen. Eine vollständige Sequenzierung war somit lediglich von einer Richtung mit je einem der Primer möglich, je nachdem an welchem Primer die poly-A bzw. -T-Sequenz am Ende der Sequenz auftrat. Bei der Sequenzierung der cDNA-Fragmente B01_253, B01_265, B11_263 und B13_262 konnte auf diese Weise die Sequenzabfolge ausreichend entschlüsselt werden. Für die cDNA-Fragmente B02_242, B13_193, B08_160 und B12_406 ergaben die Sequenzierungen mit den plasmidsequenzspezifischen Primern jedoch keine eindeutigen Sequenzinformationen. An dieser Stelle wurde eine Sequenzierung mit Hilfe des poly-dT-Primers durchgeführt. Der Einsatz dieses Primers hatte jedoch den Nachteil, dass nur ein Teilabschnitt des gesamten cDNA-Fragments sequenziert werden konnte. Die Sequenzen wurden abschließend mit den Einträgen aus öffentlichen Gendatenbanken verglichen (NCBI, BLAST). In Tab. 12 sind die Ergebnisse des Homologievergleichs bekannter Sequenzen für insgesamt 8 Kandidatenfragmente aufgeführt. Auf der Grundlage der Sequenzabfolge stammen zwei der Kandidatenfragmente offensichtlich aus dem mRNA-Pool des Pathogens *S. sclerotiorum*. Bei beiden Fragmenten lagen die partiellen Homologien bei 100% für die übereinstimmenden Sequenzabschnitte. Bei Fragment B01_248 wurde auf eine Sequenz einer Aspartatprotease und bei Fragment B01_253 auf ein hypothetisches Protein aus *S. sclerotiorum* geschlossen. Es konnten für diese Fragmente keine Übereinstimmungen mit pflanzlichen mRNA's ermittelt werden. Die restlichen 6 cDNA-Fragmente (B11_263, B13_162, B02_242, B13_193, B08_160, B12_406) wiesen starke Homologien zu pflanzlichen mRNA-Sequenzen auf. Zwei der charakterisierten cDNA-Fragmente stammen aus dem infizierten Blattgewebe der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena. Davon war Fragment B12_406, wie mittels ANOVA festgehalten, an DPI 2 signifikant herunterreguliert und Fragment B08_160 an DPI 3 signifikant hochreguliert. Das reprimierte cDNA-Fragment B12_406 wies mit 88% eine hohe maximale Identität zu einem Chlorophyll *a/b*-bindenden Protein auf. Bei dem Fragment B08_160 mit signifikanter Induktion handelt es sich womöglich um die Sequenz des Gens einer S-Adenosyl-Methionin-Synthetase mit einer Homologie von 86%. Dieses Protein stellt das Schlüsselenzym aus dem Methioninstoffwechsel dar. Alle übrigen zu charakterisierenden cDNA-Fragmente stammten aus dem

mRNA-Pool der *Sclerotinia*-resistenten Wildart AC 7. Für zwei der sequenzierten Kandidatenfragmente war eine Funktion mittels BLAST nicht charakterisierbar. Fragment B13_162 wies zwar eine 99% Homologie zu einem *Helianthus tuberosus* cDNA Klon auf, jedoch wurden keine Hinweise auf Funktionalität anhand der partiellen mRNA-Sequenz gefunden. Für das Fragment B02_242 konnte eine nur geringe partielle maximale Identität (79%) mit dem Vergleich zu einem *Brassica napus* cDNA Klon festgehalten werden. Bei dem Fragment B01_265 wurde eine geringe Homologie (0,20 %) zu einem Protein ähnlich dem Heat shock Protein von *Arabidopsis thaliana* identifiziert. B11_263 wies ausschließlich eine Homologie von 86% zu einer Sequenz aus *Aster tripolium* auf, die für eine Cysteinprotease kodiert. Für das Fragment B13_193 wurden mehrfach starke Übereinstimmungen mit Sequenzen, die für die 4-Coumarat-CoA-Ligase aus unterschiedlichen Pflanzenarten kodieren mit der höchsten partiellen Identität von 98% zu *Pelargonium x hortorum*. Dieses Enzym ist bekannt als ein Schlüsselenzym im Phenolpropanoidstoffwechsel.

Tab. 12: Liste der Sequenzhomologien von cDNA-Kandidatenfragmenten aus *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe von *Helianthus* spp. ermittelt durch Vergleich von Datenbanken mit einem BLAST-Programm (NCBI). Isolation des cDNA-Fragments erfolgte aus AC 7 (†) und Albena (‡)

Fragment	Potentielle Funktion	Organismus	Identität (E-value)
B01_248 [†]	Aspartatprotease	<i>S. sclerotiorum</i>	6e-04
B01_253 [†]	Hypothetisches Protein	<i>S. sclerotiorum</i>	6e-54
B01_265 [†]	Heat shock cognate	<i>Arabidopsis thaliana</i>	0,20
B08_160 [‡]	S-Adenosyl-Methionin-Synthetase	<i>Cucumis sativus</i>	2e-39
B11_263 [†]	Cysteinprotease	<i>Aster tripolium</i>	2e-19
B12_406 [‡]	Chlorophyll <i>a/b</i> -bindendes Protein	<i>Brassica juncea</i>	3e-21
B13_162 [†]	unbekannt	<i>Helianthus tuberosus</i>	1e-103
B13_193 [†]	4-Coumarat-CoA-Ligase	<i>Pelargonium x hortorum</i>	5e-65
B02_242 [†]	unbekannt	<i>Brassica napus</i>	2,3

3.4.4 Überprüfung und Verifizierung der differentiellen Expression mittels semi-quantitativer Real Time-PCR

Anhand der ermittelten Sequenzdaten und der statistischen Auswertung der DDRT-PCR Daten wurden für vier signifikant differentiell exprimierte Kandidatenfragmente spezifische Primerpaare hergestellt (Tab. 7, S. 23). Diese spezifischen Primer wurden mit Real-Time-PCR zur Verifizierung der Differentialität eingesetzt. In Abb. 17 sind die Expressionsdaten der spezifischen Transkripte an zwei unterschiedlichen Zeitpunkten (DPI 2 und 3) und für die drei untersuchten *Helianthus*-Arten zusammengefasst. Die signifikante Differentialität, die anhand der Differential Display Methode und der Varianzanalyse festgehalten wurde, konnte für alle vier spezifischen mit qPCR verifiziert werden. Dazu gehörte die Hochregulation von S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (SAMS) an DPI 2 und die Suppression des Transkripts

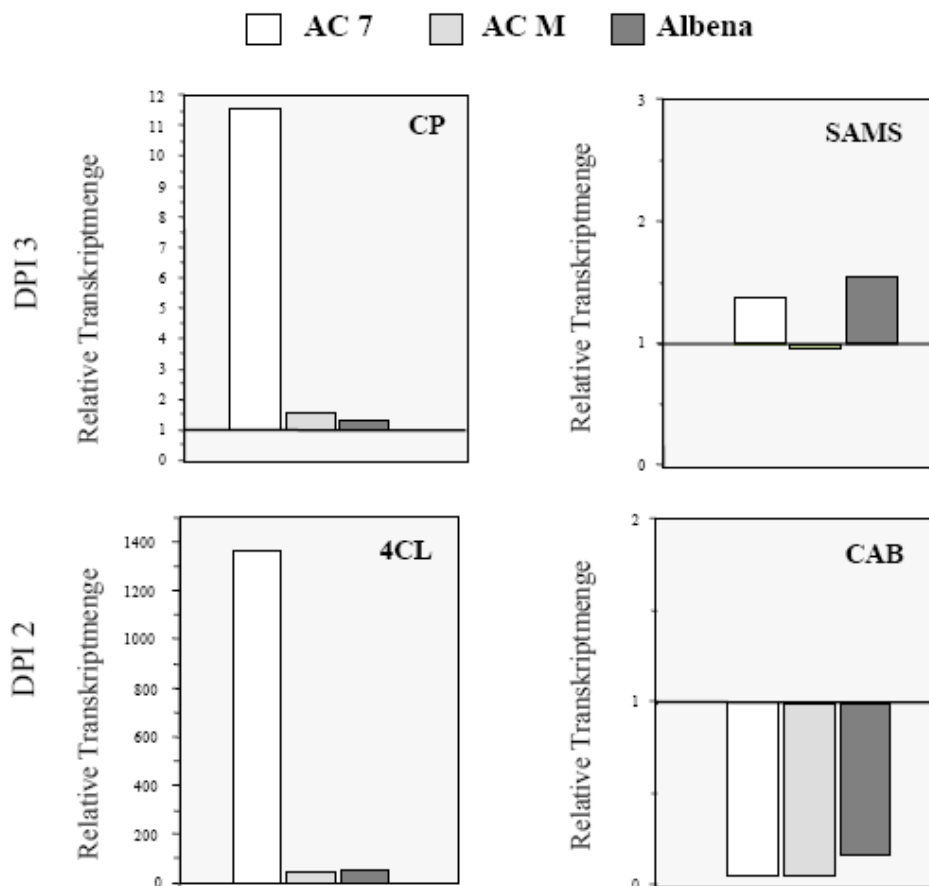


Abb. 17: Expressionsraten der differentiell regulierter Transkripte aus inokulierten Blattgewebe von AC 7, AC M und Albena im Vergleich zu nicht-inokulierten Kontrollblättern nach quantitative Real-Time PCR ermittelt anhand der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

CAB: Chlorophyll *a/b*-bindendes Protein, **4CL:** 4-Coumarat-CoA-Ligase, **CP:** Cysteinprotease, **SAMS:** S-Adenosyl-Methionin-Synthetase.

homolog zu einem Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteins (CAB) an DPI 2 in der Kultursorte Albena. Die signifikante Hochregulation der Transkripte homolog zu einer Cysteinprotease (CP) und einer 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) in der Wildart AC 7 wurden ebenfalls in den qPCR-Analysen bestätigt. Interessanterweise konnte zudem eine Hybridisierung aller spezifischen Primer und eine Amplifikation von spezifischen PCR-Produkten für SAMS, CAB, CP und 4CL in AC 7, AC M und Albena durchgeführt werden. Dies deutet auf die Konservierung dieser vier Sequenzbereiche in der Gattung *Helianthus* hin.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurden am Beispiel der *Helianthus-Sclerotinia*-Interaktion Untersuchungen zur Resistenzausprägung von zwei *Helianthus*-Wildaccessionen vorgenommen. Die Charakterisierung der phänotypischen Reaktionen der resistenten Pflanzen auf die Infektion mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* erfolgte im Vergleich zu den Reaktionen einer anfälligen *Helianthus*-Art. Dabei wurden zur Ermittlung der Anfälligkeit die Läsionslängen und -zuwachsrate sowie phytochemische Daten herangezogen. Gleichzeitig wurde eine Untersuchung des *Sclerotinia*-infizierten Blattgewebes auf der transkriptomischen Ebene durchgeführt. Hierbei sollte die Isolation und Charakterisierung von differentiell exprimierten Genen, die über eine potentielle Relevanz bei den Resistenzmechanismen von Sonnenblumenwildarten verfügen könnten, im Vordergrund stehen. Das Screenen von differentiell exprimierten Genen aus dem sekundären *Helianthus*-Genpool wurde durch den Einsatz der DDRT-PCR Technik gefolgt von einer kapillargelelektrophoretischen Auftrennung der generierten cDNA-Fragmente realisiert. Für die Auswahl von Kandidatenfragmenten wurde erstmalig eine statistische Auswertung der Genexpressionsdaten mithilfe von biometrischen Datenreduktionsalgorithmen durchgeführt. Die differentielle Expression wurde anhand von semiquantitativer Real-Time PCR zur relativen Quantifizierung verifiziert. Im Folgenden wurden die ermittelten Ergebnisse und die daraus abzuleitenden Erkenntnisse verknüpft und diskutiert.

4.1 Molekulare Klassifizierung der untersuchten Sonnenblumenwildarten in der Systematik *Helianthus*

In dieser Arbeit wurden zwei *Helianthus*-Wildartaccessionen, AC 7 und AC M, hinsichtlich ihrer Resistenz gegen den phytopathogenen Pilz *S. sclerotiorum* untersucht. Diese beiden Accessionen AC 7 und AC M wiesen Unterschiede in ihrem morphologischen Erscheinungsbild untereinander und innerhalb der Accession bei der *In vitro*-Propagation, als auch bei Anzucht im Gewächshaus auf. Morphologische Variabilitäten innerhalb und zwischen Populationen von *Helianthus*-Arten und insbesondere innerhalb der Art *H. maximiliani* wurden bereits mehrfach beschrieben (Heiser *et al.*, 1969; Miljanovic *et al.*, 2000; Saftic-Pankovic *et al.*, 2005). Um die beiden Accessionen auf ihre Artenherkunft zu überprüfen, wurde eine Artenbestimmung vorgenommen. Bis heute existieren jedoch keine einheitlichen Bestimmungsschlüssel für die Gattung *Helianthus*, da die Bestimmung von Arten anhand morphologischer Charakteristika oftmals komplex erscheint und zu falschen Schlüssen führen

kann. Eine systematische Gruppierung von diversen *Helianthus*-Arten wurde zwar bereits mehrfach durchgeführt (Robinson, 1979; Anashchenko, 1979), hingegen ist eine abschließende Klassifikation aller Arten noch nicht erfolgt. Dies liegt mitunter daran, dass eine klare Differenzierung durch die häufig natürlich auftretenden Hybridisierungen zwischen Arten erschwert wird. Beispielsweise wurden Arten wie *H. deserticola* und *H. paradoxus* erst sehr viel später als tatsächliche interspezifische Hybride identifiziert (Welch & Rieseberg, 2002; Gross *et al.*, 2003). Ansätze zur Identifizierung und Klassifizierung von Arten unabhängig ihrer morphologischen Erscheinung erfolgten bereits biochemisch und anhand von molekularen Charakteristika (Schilling & Mabry, 1981; Spring & Schilling, 1990; Giordani *et al.*, 2003; Tang & Knapp, 2003; Vischi *et al.*, 2006; Timme *et al.*, 2007). Da die Bestimmung anhand von morphologischen Charakteristika aufgrund von fehlenden oder unvollständigen Bestimmungsschlüsseln nicht möglich war, wurde in dieser Arbeit eine Artenbestimmung auf molekularer Ebene durchgeführt. Zu den molekularbiologischen Methoden, die generell zur Bestimmung von Pflanzenarten eingesetzt werden, zählen eigens die Sequenzierung kurzer orthologer DNA-Sequenzen wie z.B. die der „Internal Transcribed Spacer“ Regionen des nuklearen ribosomalen Cistrons (18S-5,8S-26S) und Loci der Plastiden wie z.B. *rbcL* und *trnL-F* (Kress *et al.*, 2005). Diese sogenannten „Barcodes“ haben den Vorteil, dass sie eine kurze Sequenzlänge und eine artenspezifische Varianz aufweisen, sowie unter Verwendung von universellen Primerkombinationen amplifiziert werden können. Für die Artenbestimmung wurden auf die bereits durchgeführten Bestimmungen von *Helianthus*-Arten mittels ITS-Region durch Schilling *et al.* (1998) zurückgegriffen. Die Ergebnisse des Homologievergleichs der ITS-Sequenzen von diversen *Helianthus*-Arten aus der öffentlichen Datenbank ergaben, dass es sich bei der Accession AC 7 um die Art *H. maximiliani* handelt. Der Vergleich der ITS-Sequenz von AC M mit den in der öffentlichen Genbank aufgelisteten *Helianthus*-Arten ergab, dass eine starke Homologie zu den beiden Arten *H. microcephalus* und *H. decapetalus* bestand. Eine phylogenetische Analyse mittels Alinierung und Clusteranalyse auf der Grundlage der ITS-Sequenzdaten von AC 7, AC M und den aus den öffentlichen Datenbanken ausgewählten *Helianthus*-Arten führte zu einer ähnlichen Klassifizierung wie bereits durch Arbeiten von Schilling *et al.* (1998) beschrieben wurde. Die Erstellung des ultrametrischen Stammbaumes aus den ITS-Sequenzdaten ergab die Gruppierung von AC M in einer Klade mit *H. microcephalus*, *H. decapetalus* und *H. glaucophyllus*. Auf der Basis einer hierarchischen Clusteranalyse der Diversität an Phenolinhaltstoffen konnte Cerboncini (2003) bereits zeigen, dass eine starke Ähnlichkeit von AC M zu der Wildart *H. microcephalus* bestand.

Bei der Bestimmung von AC M konnte zwischen den Arten *H. microcephalus*, *H. decapetalus* und *H. glaucophyllus* nicht eindeutig differenziert werden. Es lässt sich auch nicht ausschließen, dass es sich bei dieser Accession möglicherweise um ein interspezifisches Hybrid handelt, was die erschwerte Zuordnung innerhalb der Gattung *Helianthus* begründen würde. So ist z.B. in einer Literaturstelle von Heiser *et al.* (1969) angegeben, dass eine Hybridisierung der beiden Arten *H. decapetalus* und *H. microcephalus* natürlicherweise vermehrt auftreten kann. Die perennierenden Sonnenblumenwildarten, die als potentielle Arten aus der phylogenetischen Analyse für AC 7 und AC M zu erwägen sind, wie z.B. *H. maximiliani* und die Arten *H. decapetalus*, *H. microcephalus* und *H. glaucophyllus*, werden alle zur *Helianthus*-Sektion *Divaricati* zugeordnet (Heiser *et al.*, 1969; Seiler & Rieseberg, 1997). Es kann demzufolge davon ausgegangen werden, dass die zu bestimmenden Accessionen ebenfalls in die Sektion *Divaricati* einzuordnen sind.

4.2 Unterschiede in der phänotypischen Ausprägung von Blattsymptomen zwischen *Sclerotinia*-resistenten und –anfälligen Arten der Gattung *Helianthus*

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Sonnenblumenwildarten, AC 7 und AC M, auf ihre phänotypische Reaktion nach Blattinfektion mit dem peritrophen Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen untersucht. Zur genotypischen Bewertung wurde die Blattreaktion der Wildarten mit der einer *Sclerotinia*-anfälligen Kultursorte ergänzend verglichen. Die phänotypische Bonitierung der Blattreaktion auf eine Infektion mit *S. sclerotiorum* war erforderlich, um das Resistenzniveau der Wildarten unter Gewächshausbedingungen vorbereitend für die transkriptomischen Untersuchungen zu klassifizieren. Die Aufrechterhaltung konstanter Bedingungen, die einen homogenen Infektionsdruck gewährleistet, war für die sich anschließende transkriptomische Untersuchung zur Selektion von konfidenten pathogen-induzierten Kandidatenfragmenten ebenfalls entscheidend. Die Inokulation wurde mit dem Myzel-Blatttest durchgeführt, welcher zur Bewertung der Resistenzen von Sonnenblumengenotypen gegen den Erreger *Phomopsis* von Bertrand & Tourvieille (1987) bereits etabliert wurde. Diese Inokulationsmethode ermöglicht die Untersuchung von *Sclerotinia*-Blattinfektionen, die in Form einer aktiven Penetration des Pathogens ins Wirtsgewebe ohne artifizielle Verwundung entsteht und als Simulation des natürlichen Infektionsprozesses betrachtet werden kann. Unter natürlichen Bedingungen und bei Anfälligkeit der Wirtspflanze führt die Infektion über die Petiole zum Einwachsen des Myzels in den Stängel und führt unter optimalen klimatischen Bedingungen zum Totalausfall der Pflanze (Masirevic & Gulya, 1992).

Der Infektionserfolg lag 48 Stunden nach Inokulation bei 80, 69 und 73 % für Albena, AC 7 und AC M. Nach 62 h wiesen fast alle inokulierten Blätter (99 %) ungeachtet der Pflanzenart makroskopisch sichtbare Symptome auf. Die eigenen Inokulationsergebnisse haben damit bestätigt, dass, wie auch bereits von Castano *et al.* (1992) gezeigt wurde, mit dieser Methode hohe Infektionsraten mit reproduzierbaren Ergebnissen mit *Sclerotinia*-infizierten *Helianthus*-Arten erreicht werden. Da die eigenen Untersuchungen im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt wurden, konnten optimale Temperatur- und Feuchtebedingungen erzielt werden. Auf das Eintüten der Inokulationsstellen wurde absichtlich verzichtet, da eine ausreichende Feuchtigkeit in der Gewächshauskammer gewährleistet und damit die Versuchshandhabung und Probenentnahme erleichtert wurde.

Während der Inokulationsversuche konnte festgestellt werden, dass eine Infektion durch das Pathogen erfolgreich verlief und somit die Disposition einer Erkrankung des Gewebes, sowohl bei der anfälligen Sorte, als auch bei den resistenten Wildarten gegeben war. Für die qualitative Bewertung des Resistenzniveaus in der Gattung *Helianthus* war somit nicht die Anzahl der infizierten *Helianthus*-Pflanzen maßgeblich, sondern das Ausmaß der Infektion des Blattes. Zu einem ähnlichen Schluss kamen Bazzalo und Mitarbeiter (1991), denen die prozentuale Angabe infizierter Pflanzen nicht als Selektionskriterium für die Resistenz ausreichte. Die Ermittlung des Krankheitsverlaufs zeigte eindeutig, dass sich die zeitliche Ausprägung der Läsionen der Wildarten sich deutlich von denen der anfälligen Sorte Albena unterscheiden ließ. Bei dieser Art von Resistenzreaktion der beiden Wildarten auf die Inokulation mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* handelt es sich offensichtlich um eine Wirtsresistenz in Kombination mit einer Basiskompatibilität (Prell & Day, 2001).

Bei der Mehrheit der inokulierten Blätter der Sorte Albena traten bereits innerhalb der ersten 24 h makroskopisch sichtbare Symptome auf. Damit verbunden war die Beobachtung, dass sich die Läsionen bei der anfälligen Sonnenblumensorte insbesondere innerhalb der ersten 48 h weitaus schneller ausbreiteten. An allen Messzeitpunkten wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionslängen der infizierten Blätter der Sorte Albena und denen der Wildarten festgestellt. Zudem konnte beobachtet werden, dass insbesondere in den ersten zwei Tagen nach Inokulation die Zuwachsrate der Läsionen in den Blättern der annuellen Sorte Albena doppelt so hoch war wie für die perennierenden Wildarten AC 7 und AC M. Die Erfassung der durchschnittlichen Läsionsextension über die Ermittlung der Läsionszuwachsrate in den ersten 48 h war für einen Infektionsverlauf charakteristisch. Mit dem evaluierten

Zuwachsparemeter konnte somit ein konfidenter und differenzierender Resistenzparemeter gefunden werden.

In den hier vorliegenden Gewächshausversuchen traten die Symptome an artifiziiell infizierten Blättern insgesamt früher und mit höherem Infektionserfolg auf, als in vergleichbaren *Sclerotinia*-infizierten Sonnenblumen, die im Freiland angezogen worden waren (Degener *et al.*, 1998; Cerboncini, 2003; Micic *et al.*, 2005). Dies lässt darauf schließen, dass optimale Bedingungen für die Inokulation geschaffen werden konnten und zusätzlich eine ausreichende Aggressivität des *Sclerotinia*-Isolats vorlag. Bei der annuellen Sorte Albena traten dennoch Schwankungen innerhalb der Messreihen auf. Diese Schwankungen lagen jedoch weit unter denen der bereits zuvor genannten Freilandversuche (Degener *et al.*, 1998).

Die reduzierten Läsionslängen der Wildarten sind ein eindeutiger Hinweis für eine Inhibierung des Hyphenwachstums während der Ausbreitung des Pathogens im Gewebe. In eigenen mikroskopischen Aufnahmen von *Sclerotinia*-infizierten Blättern der anfälligen Sorte Albena konnte beobachtet werden, dass ein Hyphenwachstum an den Randbereichen zum nekrotischen Blattgewebe erfolgt. Diese Beobachtung stimmt mit ähnlichen Untersuchungen von Sedun & Brown (1987) überein, bei denen das Hyphenwachstum $\pm 0,2$ cm entlang der Läsionsfront in Richtung Petiole erfolgte. Unterschiede im Wachstumsverhalten des Pilzes in Abhängigkeit von der untersuchten *Helianthus*-Art konnten mikroskopisch nicht beobachtet werden. Dennoch ist nach Sedun & Brown davon auszugehen, dass die ermittelten Läsionslängen mit der Hyphenwachstumsfront eng in Zusammenhang stehen und somit mit reduzierter Läsionslänge auch ein reduziertes Hyphenwachstum einhergeht. Die Resistenzmechanismen die zu einer Reduktion der Läsionen nach Infektion bei resistenten Sonnenblumenwildarten führen, sind bis heute noch nicht eingehend untersucht. Die Resistenz gegen *S. sclerotiorum* ist innerhalb der Gattung *Helianthus* komplexer Natur. Bisherige Untersuchungen sprechen für eine horizontale Resistenz mit additivem Charakter (Castano *et al.*, 1993; Castano *et al.*, 2001).

Die Infektion der Blätter mit *S. sclerotiorum* ergab für alle untersuchten Arten zuerst nadelstichgroße nekrotische Stellen. Im Laufe der ersten 62 h entstanden wässrige Flecken, die sich später zu nekrotischen Flecken, den sog. Läsionen, entwickelten. Diese Art der Symptomausprägung ist neben den allgemeinen später auftretenden Welkeerscheinungen eine charakteristische symptomatische Erscheinung, die durch die Infektion von pflanzlichem

Gewebe durch peritrophe Pathogen bei vielen Wirtspflanzen hervorgerufen werden (Lumsden & Dow, 1973; Purdy, 1979; Tores & Moreno, 1987; Jamaux *et al.*, 1995). Die Penetration und die Ernährung von senescentem oder verwundetem Wirtsgewebe stellt eine opportunistische Ernährungsweise dar, wohingegen das Abtöten von Wirtszellen und die aktive Ausbreitung des Pilzes im Wirtsgewebe andere physiologische Mechanismen und einen stärkeren pathogenen Charakter voraussetzen (Hegedus & Rimmer, 2005). *S. sclerotiorum* zeigte sich somit in der Lage in das pflanzliche Gewebe beider untersuchten Wildarten zwar einzudringen und eine Infektion einzuleiten. Dennoch war es dem Pathogen nicht möglich, den Infektionsprozess wie bei der anfälligen Sorte Albena gleichermaßen aufrechtzuerhalten, da die Ausbreitung des Pathogens im Blattgewebe der Wildarten signifikant eingeschränkt war.

Um in das pflanzliche Gewebe einzudringen und die Verfügbarkeit der Nahrungsquelle aufrechtzuerhalten, ist *S. sclerotiorum* in der Lage die pflanzliche Zellwand vor allem mit der Synthese von pektinolytischen Enzymen partiell zu degradieren (Riou *et al.*, 1991; Fraissinet-Tachet *et al.*, 1995; Martel *et al.*, 1998). Bei *S. sclerotiorum* werden hauptsächlich Endo-Polygalacturonasen (Endo-PGs), Exo-Polygalacturonasen (Exo-PGs) und Pektinmethyl-esterasen (PME) extrazellulär sezerniert, die mit sukzessiven lytischen Mechanismen das Pektin der pflanzlichen Zellwand deesterifizieren (PMEs) und hydrolysieren (PGs) (Li *et al.*, 2004; Reignault *et al.*, 2008). 48 h nach Inokulation wurde in dieser Arbeit eine potentielle Aspartatprotease aus *S. sclerotiorum* an der frontalen Zone zur Läsion in den untersuchten Arten nachgewiesen. Dieser Zeitpunkt der Proteaseaktivität stimmt mit Arbeiten von Movahedi & Heale (1990) überein, die 48 h nach Inokulation aus *Botrytis*-infiziertem Karottengewebe die höchsten Konzentrationen an Aspartatproteasen nachwiesen. Aspartatproteasen gehören zu der Gruppe der hydrolytischen Enzyme, die während früher Infektionsprozesse in der Pathogenese diverser phytopathogener Pilze involviert sind (Choi *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1997; Carlile *et al.*, 2000; Hegedus & Rimmer, 2005). Die grundlegende Funktion von Proteasen während der Pathogenese ist noch nicht eindeutig geklärt, jedoch wird zum einen eine Detoxifizierung von Phytoalexinen, die vom Wirt zur Abwehr eingesetzt werden, vermutet (Staples & Mayer, 1995). Zum anderen geht man davon aus, dass sie zur Degradierung von Zellwand- und Plasmamembranproteinen aktiviert werden und zum Zelltod der pflanzlichen Zellen beitragen (Tseng & Mount, 1974; Carlile *et al.*, 2000; Olivieri *et al.*, 2002). Eine Charakterisierung einer Aspartatprotease (*aspS*) aus *S. sclerotiorum* erfolgte durch Possereau *et al.* (2001), die eine starke Korrelation zwischen der

Stärke des Proteinsignals und dem Beginn der Symptomausprägung feststellten. Interessanterweise wurde für *aspS* bisher keine bevorzugte Funktionalität in saurem pH-Milieu ermittelt. Es wäre somit möglich, dass die Aspartatproteasen, unabhängig von einer Oxalsäureproduktion, aktiv sind, was ihr Auftreten in der frühen Phase der Pathogenese, wenn andere zellwandabbauenden Enzyme, wie z.B. die PG's und PME's noch weitestgehend inaktiv sind, erklären würde. Xia *et al.* (2004) beschreiben eine apoplastische Aspartatprotease (CDR1) aus *Pseudomonas syringae*, die bei Interaktion durch die Wirtspflanze *Arabidopsis thaliana* erkannt wird und bei der Resistenzausprägung eine Rolle spielt. Dies lässt auch den Schluss zu, dass Aspartatproteasen möglicherweise als Induktor einer Pathogenabwehr in der *Sclerotinia-Helianthus*-Interaktion fungieren könnten. Der Nachweis der Aspartatprotease könnte in den eigenen Untersuchungen als Hinweis auf eine ungestörte, frühe pathogenese-relevante Phase dienen. Möglicherweise sind zu diesem frühen Zeitpunkt die pathogen-inhibierenden Faktoren entweder a) nicht induziert, b) nicht am Wirkort oder c) noch nicht exprimiert. Eine generelle Basiskompatibilität der hier untersuchten *Helianthus*-Arten gegenüber *S. sclerotiorum* konnte somit indirekt auch über die Präsenz der pathogenese-relevanten Aspartatprotease verifiziert werden.

Die mikroskopischen Untersuchungen dieser Arbeit konnten zeigen, dass ein dichotomes Hyphenwachstum des Pathogens bevorzugt um die Spaltöffnungen aller untersuchten *Helianthus*-Arten erfolgte. Ähnliche Beobachtungen wurden von Guimaraes & Stotz (2004) gemacht, die dieses gerichtete Wachstum des Pathogens an Bohnenblättern zeigen konnten. In ihren Studien wiesen sie zudem nach, dass durch die Infektion mit *S. sclerotiorum* das Schließen der Stomata in der Nacht inhibiert wurde. Dieser aktive Eingriff in die Physiologie der Pflanze steht offensichtlich mit der Pathogensekretion von Oxalsäure in Zusammenhang, da Oxalat-Mutanten nicht in der Lage waren, die Öffnungsweite der Stomata zu regulieren. Die Oxalsäure dürfte demzufolge eine inhibierende Wirkung auf den sonst ABA-abhängigen und osmotisch regulierten Schließ- und Öffnungsmechanismus der Stomata haben. Von Seiten des peritrophen Pathogens verursacht die Beeinflussung der Spaltöffnungsweite eine aktive Schwächung des pflanzlichen Organismus, die mitunter auch die Welkeerscheinungen in *Sclerotinia*-erkrankten Pflanzen erklären könnte. Möglicherweise könnte diese Wirkung von Oxalsäure auf die Schließzellen mit diesem gerichteten Wachstumsverhalten der Hyphen in Zusammenhang stehen.

4.3 Bedeutung des Pathogen-induzierten Phenolstoffwechsels in resistenten Wildarten

In den Wildarten war, neben einer Reduktion der Läsionsextension, eine deutliche dunkelgefärbte Abgrenzung an der Läsionsfront ab dem 3. Tag nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* erkennbar. Ausprägungen dieser Art stehen meist in Zusammenhang mit der Akkumulation und Oxidation von phenolischen Verbindungen und führen zur Bildung von Quinonen bzw. ihren polymeren Oxidationsprodukten und freien Radikalen (Appel, 1992). Diese oxidierten Phenole besitzen ein erhöhtes antimikrobielles Potential und wirken nicht selten direkt toxisch auf Pathogene. Über die Ermittlung der Gesamtphenolgehalte konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass beide Wildarten, sowohl AC 7 als auch AC M, im Vergleich zu Albena prä- und postinfektionell höhere Gesamtphenolgehalte aufwiesen. Eine hohe Relevanz phenolischer Inhaltsstoffe für die Resistenz in Wildarten lässt sich aufgrund der starken Unterschiede in den Phenolgehalten und den Ausprägungen der Läsionen zwischen den Wildarten und der Sorte Albena vermuten. Für *Helianthus annuus* ist die Pathogen-Induktion des Phenolstoffwechsels in Blättern, Stängel und Körben von *Sclerotinia*-toleranten und partiell-resistenten Sorten nachgewiesen worden (Bazzalo *et al.*, 1985; Hemery-Tardin *et al.*, 1998; Prats *et al.*, 2003; Rodriguez *et al.*, 2004). Im Umkehrschluss zeigen *Sclerotinia*-anfällige *Helianthus*-Sorten einen signifikant niedrigeren Phenolgehalt. Höchstwahrscheinlich stehen auch die erhöhten Gesamtphenolgehalte in den untersuchten Wildarten mit einer Inhibierung des Pilzwachstums in Zusammenhang.

In den eigenen Untersuchungen lagen die Gesamtphenolgehalte der Wildarten postinfektionell zwischen 61 und 153 mg GAE/100 mg TG (s. Abb. 7, S. 51). Diese Konzentrationen sind trotz einer Versuchsdurchführung im Gewächshaus weitaus höher als bisher dokumentierte Phenolgehalte der Sorten von *H. annuus*. Dennoch waren die Gehalte etwas niedriger als die in Feldversuchen ermittelten Gesamtphenolgehalte von Wildarten (Cerboncini, 2003). Dies trifft im Allgemeinen für viele Pflanzenarten bei dem Vergleich von Gesamtphenolgehalten aus Freiland- bzw. Gewächshausuntersuchungen zu (Hall *et al.*, 1982; Romani *et al.*, 2002). Pflanzen, die unter Gewächshausglas kultiviert werden, sind dem UV-Spektrum infolge des Einsatzes von UV-undurchlässigem Glas weniger ausgesetzt. Da eine UV-Bestrahlung, insbesondere UV-A und UV-B, die Synthese von phenolischen Inhaltsstoffen wie z.B. Flavonoide induziert (Harborne & Williams, 2000; Mazza *et al.*, 2000; Izaguirre *et al.*, 2007), sind die reduzierten Gesamtphenolgehalte in Blättern der untersuchten *Helianthus*-Arten auf eine niedrigere UV-Einwirkung zurückzuführen.

Es waren darüber hinaus Unterschiede der ermittelten Gesamtphenolgehalte zwischen den Wildarten AC 7 und AC M zu erkennen. Trotz durchschnittlich steigender Phenolgehalte in der Wildart AC 7 nach Inokulation waren die induzierten Phenolgehalte an allen untersuchten Messzeitpunkten niedriger als in den Blättern von AC M. Interessanterweise enthielten selbst die Kontrollblätter in AC M sehr hohe Gesamtphenolgehalte. Sekundärmetabolite, die konstitutiv in pflanzlichem Zellgewebe auftreten, sind in ökologische und physiologische Prozesse involviert und besitzen oftmals die Funktion einer konstitutiven kohlenstoffbasierten chemischen Abwehr gegen Pathogene oder Schädlinge (Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Albrecht *et al.*, 1999). Eine Kompartimentierung von Phenolen, die während der normalen Entwicklung der Pflanze synthetisiert werden, erfolgt dabei vornehmlich in den Vakuolen (Wink, 1997). Solche Kompartimentierungen können auch durch abiotische und biotische Stressoren induziert werden (Beckman & Halmos, 1962). Die Penetration und Mazeration des Pflanzengewebes durch das Pathogen *S. sclerotiorum* führt unmittelbar zur Dekompartimentierung der Zelle und zum Freiwerden zellulärer Inhaltsstoffe. Sekundäre Inhaltsstoffe mit antifungalem Effekt werden hiermit sogleich frühzeitig gegen einen sich verbreitenden Pathogen aktiv, ohne dass eine Induktion des Phenylpropanoidstoffwechsels erfolgen muss. Eine Induktion von phenolischen Substanzen, wie sie signifikant bei der Wildart AC 7 6 Tage nach Inokulation erfolgte, stellt demgegenüber einen Teil einer aktiven Pflanzenabwehr dar und beinhaltet die induzierte Aktivität von spezifischen Enzymen, wie z.B. die der Phenylalaninlyase (PAL) (Maher *et al.*, 1994). Die de novo-Synthese und Akkumulation spezifischer sekundärer Inhaltsstoffe mit fungitoxischem Charakter sind oftmals für die Resistenz gegen Pathogene primär notwendig.

Die HPLC-Analysen zur Untersuchung der phenolischen Inhaltsstoffe in den Blättern der zu untersuchenden *Helianthus*-Arten ergaben, dass lediglich in den Wildarten hohe Anteile an Kaffeoyle Säurederivaten nachzuweisen waren. Bei einigen dieser chromatographisch erfassten Kaffeoyle Säurederivate wurden innerhalb der 6 Versuchstage nach Inokulation sogar steigende Konzentrationen in beiden Wildarten ermittelt. Demgegenüber wurden bei den chromatographischen Analysen der Blattrohextrakte der *Sclerotinia*-anfälligen Kultursorte Albena keine Kaffeoyle- bzw. Coumarylsäurederivate weder prä- noch postinfektionell nachgewiesen. Die Kaffeoyle- und Coumarylsäurederivate gehören zu der Gruppe der Hydroxyzimtsäuren und werden über das Grundgerüst der Phenolpropanoide charakterisiert. Typische Vertreter dieser Klasse sind Kaffeesäure, Coumarsäure, Ferulasäure und Chinasäure, die jeweils in diversen Pflanzenarten organspezifisch vertreten sind (Vermerris & Nicholson,

2006). Aufgrund ihrer antioxidativen und antimikrobiellen Wirkung, sind die Hydroxyzimtsäuren und ihre Chinasäureester in unzählige Prozesse zur Abwehr gegen abiotische und biotische Stressfaktoren in der pflanzlichen Zelle involviert (Baranowski & Nagel, 1982; Takahama, 1998). Einige dieser Ester werden für die Lignifizierungsprozesse benötigt und tragen somit zur Verstärkung der Zellwand bei (Faulds & Williamson, 1999). In dikotylen Pflanzen werden bevorzugt Ferula- und Coumarsäuren an den Pektinen der Zellwand verestert. Die Zunahme an Hydroxyzimtsäurederivaten in den Blättern der Wildarten nach der Inokulation mit *S. sclerotiorum* könnte einen vermehrten Einbau dieser Verbindungen in die Zellwand implizieren und somit zu einer Verstärkung der pflanzlichen Zellwände beitragen. Eine erhöhte Lignifizierung könnte für die Verbreitung von *S. sclerotiorum* im pflanzlichen Gewebe von entscheidender Bedeutung sein, da Studien gezeigt haben, dass das Pathogen mit seinem Enzymarsenal nicht in der Lage ist, stark lignifiziertes Pflanzengewebe zu degradieren.

Hohe Gehalte an Hydroxyzimtsäuren und deren Ester in den Kontrollblättern der Sonnenblumenwildarten sind offensichtlich die Folge einer langfristigen Adaption an ihre Umwelt, in der sie ständig mit diversen abiotischen und biotischen Stressfaktoren konfrontiert werden. Der erhebliche Unterschied zwischen den Gehalten an Hydroxyzimtsäurederivaten der Wildarten und der Sorte Albena auch nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* lassen, aufgrund möglicher antifungaler Wirkung dieser Verbindungen, auf eine spezifische Wirkung auf das Pathogen schließen. Ähnliche Zusammenhänge wurden für erhöhte Hydroxyzimtsäuregehalte in Gurke festgestellt, da eine antifungale Wirkung gegen biotrophe, aber auch pertotrophe Pathogene beobachtet werden konnte (Daayf *et al.*, 2000). Ein erhöhter Gehalt an Kaffeoylsäurederivaten in den Blättern der Wildarten nach Infektion ist möglicherweise mit einer erhöhten Biosynthese und der damit verbundenen Induktion von spezifischen Enzymen, die in den Syntheseprozessen involviert sind, zu erklären. Die involvierten Gene der *Sclerotinia*-resistenten Genotypen, wie z.B. die der Sonnenblumenwildarten AC 7 sowie AC M, haben möglicherweise einen regulierenden Effekt auf die Synthese von insbesondere Kaffeoylsäurederivaten. Die Induktion zur Biosynthese der Hydroxyzimtsäuren und deren Ester wird dabei höchstwahrscheinlich durch die Einwirkung des Pathogens und die dadurch physiologisch ausgelösten Stressfaktoren in Gang gesetzt. Mechanismen, die der Biosynthese dieser Verbindungen unterliegen, sind bis heute jedoch noch größtenteils ungeklärt. Es wird jedoch vermutet, dass die Biosynthese partiell in den Chloroplasten erfolgt (Alibert *et al.*, 1977).

Die Klassifizierung der Chinasäuren in Mono- und Di-Ester wurde mittels LC-MS ermöglicht. Der erhöhte Gehalt an Kaffeoylesterderivaten, wie bereits aus den HPLC-Daten zu schließen war, wurde bestätigt. Zudem wurden Veränderungen bezüglich der jeweiligen Anteile an Mono- und Di-Ester in den Blattproben postinfektionell ermittelt. In den Kontrollblättern waren vermehrt Mono-Ester, wohingegen die *Sclerotinia*-infizierten Blätter höhere Anteile an Mono-Estern sowie Di-Estern der Kaffeoylester Chinasäureester enthielten. Einige Vertreter der Chlorogensäurederivate, wie z.B. die Isochlorogensäuren, sind in der Gattung *Helianthus* bereits für Kultursorten von *H. annuus*, sowie für Sonnenblumenwildarten beschrieben worden (Bazzalo *et al.*, 1985; Andary *et al.*, 1996; Tourvieille de Labrouhe *et al.*, 1997; Aramendía *et al.*, 2000; Pedrosa *et al.*, 2000). Die eigenen Ergebnisse untermauern eine *Sclerotinia*-induzierte Akkumulation von Di-Kaffeoylester Chinasäureestern in dem Blattgewebe von Sonnenblumenwildarten, wie bereits durch die Arbeiten von Cerboncini (2003) und Andary *et al.* (1996) postuliert und diskutiert wurde. Der Nachweis von induzierten Gehalten an Kaffeoylester Chinasäureestern konnte in dieser Arbeit noch ergänzend erfolgen. In nicht infizierten Blättern der Wildart AC 7 wurden mit abnehmenden Gehalt folgende Mono- und Di-Chlorogensäuren detektiert: Kaffeoylester Chinasäuren > Coumaroylester Chinasäuren > Feruloylester Chinasäuren > Di-Kaffeoylester Chinasäuren > Kaffeoylester Feruloylester Chinasäuren > Kaffeoylester Coumaroylester Chinasäuren.

Die 3-, 4- und 5-Kaffeoylester Chinasäuren, sind für ihr Auftreten in diversen Pflanzenarten bekannt (Sondheimer, 1964; Clifford, 1999). Insbesondere die 5-Kaffeoylester Chinasäure ist ubiquitär in der Pflanzenwelt vertreten. Die Chlorogensäuren setzen sich aus Veresterungen zwischen einer Zimtsäure, z.B. Kaffee- oder Ferulasäure, und der Chinasäure zusammen (Clifford, 1999). Ihre Akkumulation und Lagerung findet in der Vakuole und im Apoplasten statt (Mösli-Waldhauser & Baumann, 1996). Die hohen Gehalte an Kaffeoylester Chinasäuren in nicht infizierten Blättern könnten möglicherweise mit der Reduktion der Läsionslängen in den Wildarten in Zusammenhang stehen. Eine direkte inhibierende Wirkung der Chlorogensäure (5-Kaffeoylester Chinasäure) wurde zwar von Urdangarin *et al.* (1999) widerlegt, jedoch kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, dass in den Wildarten eine Inhibierung durch weitere in den Zellen enthaltenen Isomere der Mono-Ester erfolgen könnte. Die größte Wahrscheinlichkeit der direkten Inhibierung des Myzelwachstums von *S. sclerotiorum* wäre durch die Entstehung von Chlorogensäurequinonen an der Läsionsfront bedingt. Bei dem Zellaufbruch, der durch die Degradierung der pflanzlichen Zellwand bewirkt wird, werden kompartimentierte Chlorogensäuren frei. Dies konnte bereits für andere Wirt-Pathogen-

Interaktionen, wie z.B. für *Erwinia*-infizierte Kartoffelknollen, gezeigt werden (Rober, 1989). Die damit eingeleiteten Oxidationsprozesse werden durch die Aktivität von speziellen Enzymen, wie z.B. Polyphenoloxidasen und Peroxidasen in Gang gesetzt (Mayer & Harel, 1979). Mit der Aktivität von Polyphenoloxidasen und den Chlorogensäuren als Substrat kann demzufolge eine Oxidierung zu den entsprechenden Chlorogensäurequinonen erfolgen (Pierpont, 1966; Murata *et al.*, 2002; Munoz *et al.*, 2007). Diese Verbindungen besitzen oftmals eine weitaus toxischere Wirkung als die Chlorogensäuren selbst und können zudem kovalente Interaktionen mit Proteinen eingehen (Prigent *et al.*, 2008).

Zudem wird bei der Oxidation zu Chlorogensäurequinonen H_2O_2 frei. Die Formation reaktiver Sauerstoffspezies, wie z.B. H_2O_2 , sind im Allgemeinen erste messbare Reaktionen einer pflanzlichen Pathogenabwehr, die während der im Zuge der Aktivitätserhöhung von membran-assoziierten NAD(P)H Oxidasen und im Apoplasten lokalisierten Peroxidasen gebildet werden (Somssich & Hahlbrock, 1998). Möglicherweise entsteht als erste Reaktion auf *S. sclerotiorum* in den *Helianthus*-Arten an der Infektionsfront ebenfalls ein H_2O_2 -Boost, der durch die erhöhte Aktivität von NAD(P)H Oxidasen, Peroxidasen und Polyphenoloxidasen entsteht. Ein Mechanismus zur Unterdrückung von H_2O_2 ist jedoch für *S. sclerotiorum* bereits postuliert worden. Untersuchungen von Cessna *et al.* (2000) haben gezeigt, dass die Sekretion von Oxalsäure, die durch *S. sclerotiorum* induziert wird, die Ausschüttung von ROS, den sog. „oxidative burst“, unterdrückt. In den ersten Stunden der Infektion ist jedoch die Konzentration an Oxalsäure möglicherweise für eine ROS-Abwehr noch nicht ausreichend, so dass in der Anfangsphase der Penetration erhöhte H_2O_2 -Gehalte die Pathogenentwicklung negativ beeinflussen könnten. In diesem Kontext konnten Walz und Mitarbeiter nachweisen, dass *S. sclerotiorum* zwar hohe Konzentrationen an H_2O_2 toleriert, jedoch das Myzelwachstum *in vitro* stark durch H_2O_2 gehemmt wird (Walz *et al.*, 2008). Die Oxidation der Chlorogensäuren könnte somit zur Generierung eines H_2O_2 -Boosts an der Penetrationsfront beitragen, wodurch *S. sclerotiorum* möglicherweise im Wachstum gehemmt wäre. Im Gegensatz zu der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena, bei der keine Chlorogensäuren nachgewiesen werden konnten, sind die Wildarten zudem in der Lage, das an der Penetrationsfront entstandene H_2O_2 in den noch intakten Zellen abzapuffern. Es wird vermutet, dass die Hauptfunktion der Kaffeoylchinasäuren in ihrer antioxidativen Wirkung liegt und insbesondere dem Schutz vor starker Lichteinwirkung dient (Takahama & Oniki, 1997). Mono-Kaffeoylchinasäuren und Di-Kaffeoylchinasäuren sind höchstwahrscheinlich

aus diesem Grunde als Schutzmechanismus vor UV-Strahlung mit den Chloroplasten assoziiert (Mondolot *et al.*, 2006).

Die Beobachtung einer reduzierten durchschnittlichen Läsionszuwachsrate innerhalb der ersten 48 h nach Inokulation ist für die Wildarten möglicherweise mit den erhöhten konstitutiv disponiblen Gehalten an Chlorogensäuren in Verbindung zu bringen, da a) Chlorogensäurenquinone eine potentiell hohe toxische Wirkung gegen Pathogene besitzen, b) die Synthese dieser zu einer erhöhten H₂O₂-Formation beitragen könnte c) eine erhöhte Lignifizierung eine Penetrationsbarriere darstellt und d) die Chlorogensäuren per se ein hohes Potential an antioxidativer Wirkung zum Schutz der Zellen aufweisen.

In den Wildarten konnten postinfektionell an DPI 6 mit abnehmender Konzentration Di-Kaffeoylchinasäuren > Mono-Kaffeoylchinasäuren > Coumaroylchinasäuren > Feruloylchinasäure > Kaffeoyl-Coumaroyl-Chinasäure > Kaffeoyl-Feruloyl-Chinasäure nachgewiesen werden. Es wurden erhöhte Gehalte an 3-Kaffeoylchinasäure und diversen Isomeren der Di-Kaffeoylchinasäure identifiziert. Für die Biosynthese von Chlorogensäure sind bisher drei unterschiedliche Synthesewege postuliert worden (Niggeweg *et al.*, 2004). Zwei Acyltransferasen, HQT (HydroxycinnamoylCoA:Quinat-Transferase) und HCT (HydroxycinnamoylCoA:Shikimat/Quinat Hydroxycinnamoyl-Transferase), besitzen bei zwei dieser Synthesewege die Schlüsselfunktionen (Abb. 18) (Stöckigt & Zenk, 1974). Die jeweilige Aktivität dieser beiden Enzyme hängt von der Pflanzenart und dem entsprechenden Pflanzenorgan ab (Hoffmann *et al.*, 2003; Lepelley *et al.*, 2007). Die Bedeutung der Funktionalität der HQT für den Phenolstoffwechsel wurde in Arbeiten von Niggeweg *et al.* (2004) mit der Tomate veranschaulicht. In ihren Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Überexprimierung von HQT zu erhöhten Gehalten an Chlorogensäure von mehr als 85 % führte. Demgegenüber wurde durch das Silencing des HQT-Gens eine Reduktion von Chlorogensäure in den Blättern von bis zu 98 % herbeigeführt. Die erhöhten Konzentrationen an Chlorogensäuren hatten zudem einen Effekt auf die Toleranz bzw. die Resistenz der Pflanzen gegenüber oxidativen Stress und gegen den bakteriellen Erreger *Pseudomonas syringae*. Es kann somit angenommen werden, dass in den Blättern der *Sclerotinia*-resistenten Wildarten auch die nach Infektion akkumulierten Kaffeoylchinasäuren eine bedeutende Rolle als Radikalfänger übernehmen und ihre Synthese durch einen oxidativen Stress induziert wird. Ähnliche Beobachtungen wurden durch Baker und Mitarbeiter (2002) mit Suspensionskulturen von Tomate und Tabak ermittelt. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass ein extrazellulär lokalisierter Pool an diversen phenolischen Inhaltsstoffen, die als Antioxidantien

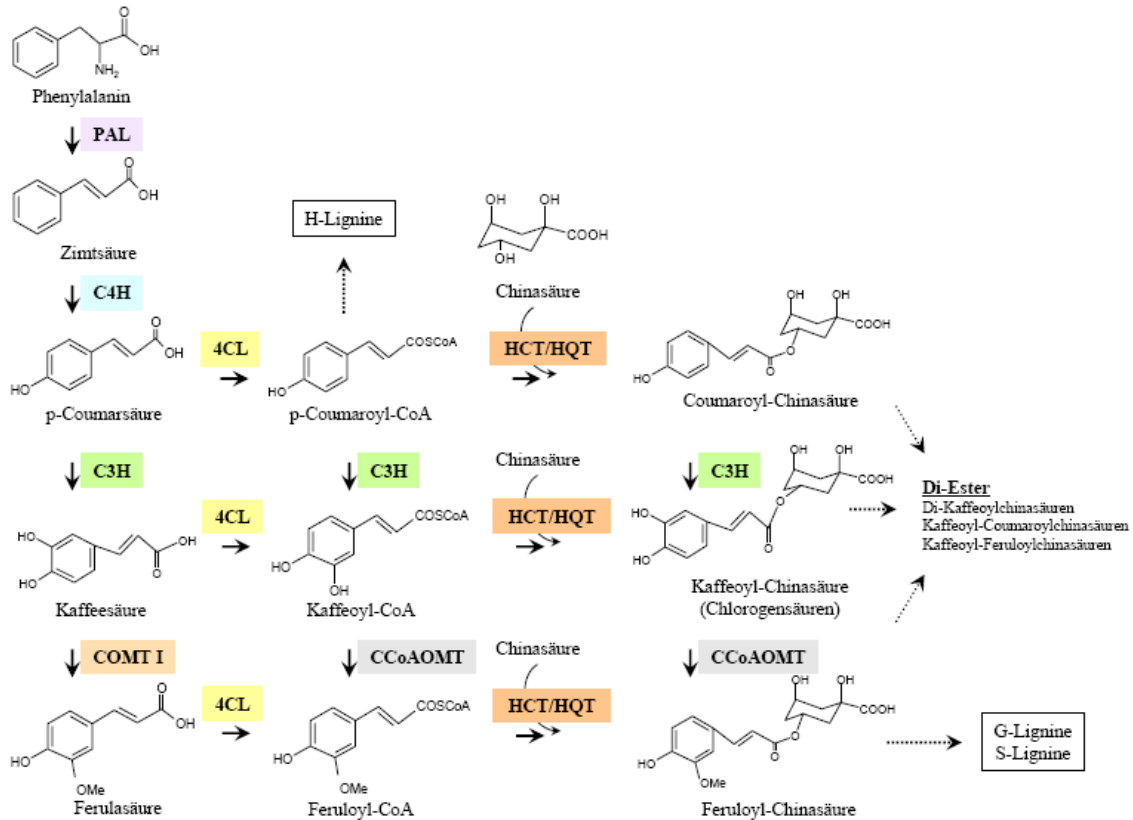


Abb. 18: Biosyntheseweg von Mono- und Di-Estern der Chinasäuren in Dikotyledonen.

4CL: 4-Coumarat-CoA-Ligase, C3H: p-Coumarat-3-Hydroxylase, C4H: Cinnamat-4-Hydroxylase, CCoAOMT: Kaffeyl-CoA-Methyltransferase, COMT I: Kaffeesäure-Methyltransferase, HCT: Hydroxycinnamoyltransferase, HQT: Hydroxyquinattransferase, PAL: Phenylalaninlyase.

wirken, die Ausschüttung von H_2O_2 nach Inokulation mit phytopathogenen Bakterien abpufferten. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass das antioxidative Potential durch eine Behandlung mit H_2O_2 mit der Zeit zunehmend anstieg. Trotz des Nachweises einiger Vorstufen und einiger Kaffeylchinasäuren selbst, konnten bisher für die gesamte Gattung *Helianthus* keine eindeutigen Erkenntnisse für den einen oder anderen Chlorogensäure-Syntheseweg erfolgen.

Es ist an dieser Stelle hervorzuheben, dass in den eigenen Studien erstmalig der Nachweis einer potentiellen 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) für die Gattung *Helianthus* erfolgt ist. In den transkriptomischen Studien dieser Arbeit wurde in der Wildart AC 7 48 h nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* ein signifikant hochexprimiertes Transkript mit starker Homologie zu einer 4-Coumarat-CoA-Ligase aus *Pelargonium x hortorum* isoliert und charakterisiert. Bei der Verifizierung der Differentialität mit Real Time (RT)-PCR konnte zudem gezeigt werden, dass die charakterisierte Sequenz für die untersuchten *Helianthus*-

Arten konserviert vorlag. Die differentielle Hochexpressierung auch für AC M und der annuellen Sorte Albena 48 h konnte nach Inokulation gezeigt werden. Mit dem Nachweis der Induzierbarkeit von 4CL und dem erhöhten Gehalt an Kaffeoylchinasäuren kann postuliert werden, dass HCT bzw. HQT in den Syntheseweg der Kaffeoylchinasäuren in *Helianthus* involviert sind, da 4CL im dritten möglichen Syntheseweg nicht beteiligt ist (Villegas & Kojima, 1986). In der eigenen Arbeit wurde das Transkript der 4-Coumarat-CoA-Ligase mit Homologie zu einem Isomer als Schlüsseltranskript für den *Sclerotinia*-induzierten Stoffwechselweg der Hydroxyzimtsäuren in der Gattung *Helianthus* identifiziert.

4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) ist, neben der PAL, ein Schlüsselenzym des Phenolpropanoidstoffwechsels und katalysiert die Formation aller CoA-Ester der Hydroxyzimtsäuren (s. Abb. 18), indem sie insbesondere die p-Coumarsäure als spezifisches Substrat aktiviert (Douglas, 1996). Die Induzierbarkeit durch die Einwirkung externer Stimuli, wie z.B. Pathogenbefall, Verwundung und UV-Bestrahlung, wurde bereits für einige Pflanzensysteme demonstriert (Kuhn *et al.*, 1984; Fritzemeier *et al.*, 1987; Vincent & Nicholson, 1987; Soltani *et al.*, 2006). Die erhöhte Verfügbarkeit nach Induktion führt zu einem stark erhöhten Coumaroyl-CoA-Pool. Coumaroyl-CoA selbst dient nicht nur zur Synthese von diversen Hydroxyzimtsäureestern, sondern ist auch als Vorstufe für Lignine, Lignane, Suberine, Coumarine und Flavonoide bekannt (Hahlbrock & Scheel, 1989; Dixon & Paiva, 1995). Die herausragende Bedeutung einer Gruppe von Coumarinen aus *Helianthus annuus* zur Pathogenabwehr und Resistenzausprägung gegen *S. sclerotiorum* wird seit einigen Jahren verstärkt postuliert (Tal & Robeson, 1986; Urdangarin *et al.*, 1999; Prats *et al.*, 2006; Prats *et al.*, 2007). Für die Wildarten AC 7 sowie AC M kann ein Einfluss von Coumarinen auf die Interaktion mit *S. sclerotiorum* zwar nicht völlig ausgeschlossen werden. In den eigenen phytochemischen Analysen wurden jedoch mit keiner der eingesetzten chromatographischen Methoden Coumarine nachgewiesen. Möglicherweise könnte dies durch die Pflanzenanzucht im Gewächshaus bedingt sein, da die Synthese der Coumarine stark UV-abhängig ist. Demgegenüber konnte jedoch auch in Freilandversuchen kein Nachweis von Coumarinen in den *Helianthus*-Wildarten erbracht werden (Carboncini, 2003).

Aus den eigenen Ergebnissen ist primär zu entnehmen, dass die Infektion mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* höchstwahrscheinlich zu einem erhöhten Bedarf an Hydroxyzimtsäuren und deren Estern in den Blättern der Wildarten geführt hat und die signifikante Genexpression von 4CL mit diesem Bedarf korreliert. Lignifizierungsprozesse wurden in dieser Arbeit nicht

untersucht und können somit auch nicht ausgeschlossen werden. Die potentielle Bedeutung einer Lignifizierung in der *Sclerotinia*-Abwehr der Wildarten konnte jedoch bereits für Stängelbereiche durch die Arbeiten von Cerboncini (2003) gezeigt werden.

Die Untersuchung mittels LC-MS des *Sclerotinia*-infizierten Blattgewebes 6 Tage nach Inokulation zeigte, neben den erhöhten Gehalten an Mono-Kaffeoylchinasäuren auch hohe Gehalte an Di-Kaffeoylchinasäuren. Die 3,5-Di-Kaffeoylchinasäure, die als einziges Di-Kaffeoylchinasäure nach einem MS-Schlüssel nach Clifford *et al.* (2003, 2005) charakterisiert werden konnte, fehlte in den Kontrollproben. Ein weiteres Isomer der Di-Kaffeoylchinasäuren trat nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* an DPI 6 mit besonders erhöhtem Gehalt in den Blättern der Wildarten auf. Offensichtlich kann von einer Pathogen-induzierten Synthese dieser Esterverbindungen ausgegangen werden. Eine Induktion dieser Substanzen durch externe Stimuli, wie z.B. UV-Bestrahlung wurden in der Artischocke erst kürzlich nachgewiesen (Moglia *et al.*, 2008). Es konnte jedoch in derselben Studie ebenso gezeigt werden, dass die Induktion durch hormonale Behandlung mit Methyljasmonat oder Salicylsäure keinen Effekt hatte. Bis heute ist der Biosyntheseweg der Di-Kaffeoylchinasäuren noch weitestgehend ungeklärt. Es wird allerdings vermutet, dass die Synthese der Di-Kaffeoylchinasäuren mit der Synthese von Chlorogensäure in Zusammenhang steht und die Kaffeoylchinasäuren als Vorstufen gelten. Aus den Wurzeln der Süßkartoffel wurde die Aktivität eines Enzyms, welches die Synthese von 3,5-Dikaffeoylchinasäure aus 3-Kaffeoylchinasäure katalysiert, nachgewiesen (Kojima & Kondo, 1985). Die starke Akkumulation einer Di-Kaffeoylchinasäure in den Wildarten zeigt offensichtlich, dass es sich wohl auch hier um eine gerichtete pathogen-induzierte Katalyse handeln dürfte. Die Induktion der Biosynthese von Di-Kaffeoylchinasäuren und weiteren Derivaten ist möglicherweise ähnlich wie bei den Kaffeoylchinasäuren in dem infizierten Gewebe als Antwort auf einen oxidativen Stress zu sehen. Auch die Depside der Chlorogensäuren besitzen ein hohes Potential zum Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies. Das Potential wird sogar zum Teil noch höher eingestuft als das der Mono-Ester. Neben der Funktion als Radikalfänger sind die Chlorogensäuren auch in der Lage der Lipidperoxidation entgegenzuwirken (Rice-Evans *et al.*, 1997). Der Nachweis von Mono- und Di-Kaffeoylchinasäuren ermöglicht die Einstufung des antioxidativen Potentials auf die Infektion mit *S. sclerotiorum* und wäre möglicherweise als Selektionskriterium zur Unterscheidung zwischen *Sclerotinia*-anfälligen und -resistenten Genotypen einsetzbar.

4.4 Durchführung und Bewertung der Differential-Display Methodik zum Screenen differentiell exprimierter Gene in *Helianthus*

Die transkriptomischen Untersuchungen der Interaktion zwischen den *Helianthus*-Arten und dem Pathogen *S. sclerotiorum* wurden primär zur Isolation und Charakterisierung von *Sclerotinia*-induzierten Transkripten eingesetzt. Die Analysen wurden mit Einsatz der Differential-Display (DD) RT-PCR-Technik durchgeführt. Diese Fingerprint-Methode wurde von Liang & Pardee (1992) entwickelt und erlaubt den simultanen Vergleich von mehr als zwei experimentellen Proben mit geringen Mengen an poly(A)⁺-RNA (0,1-0,5 µg). Zudem wird die Detektion einer supprimierten und einer hochexprimierten Genexpression ermöglicht. Methodisch basiert das Differential Display, nach Synthese von cDNA aus den diversen mRNA-Spezies mit Einsatz eines Oligo-dT-Primers, auf einer Fragmentierung des cDNA-Pools mittels PCR-Amplifikation. Mittlerweile findet die DDRT-Methodik auch für transkriptomische Studien im Bereich der Pflanzenwissenschaften hinsichtlich physiologischer, metabolischer und phytopathologischer Fragestellungen Verwendung (Benito *et al.*, 1996; Yamazaki & Saito, 2002).

Da nur marginale Sequenzinformationen für die in dieser Arbeit untersuchten Genotypen vorliegen, war es erforderlich, eine adäquate Methodik zur Selektion und Charakterisierung von Kandidatenfragmenten zu verwenden. Aufgrund der unspezifischen Hybridisierung des Arbitrary-Primers an die Template-cDNA ist die Information von Zielsequenzen bei der DDRT-PCR keine Voraussetzung. Im Gegensatz zu anderen transkriptomischen Techniken wie beispielsweise Microarray oder Real-Time PCR sind in der hier verwendeten Technik die Isolation und Identifizierung unbekannter Gensequenzen möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurden die aus der DDRT-PCR amplifizierten Cy5-markierten cDNA-Fragmente multikapillargelelektrophoretisch aufgetrennt. Dabei stellte der Einsatz eines fluoreszenz-markierten „Anchor“-Primer eine anwenderfreundliche Alternative zu den radioaktiv markierten Fragmenten dar (Ito *et al.*, 1994; Luehrsen *et al.*, 1997) und ermöglicht eine präzise Laser-induzierte Fluoreszenz (LIF)-Detektion der markierten cDNA-Fragmente. Die kapillargelelektrophoretische Auftrennung hatte den weiteren Vorteil, dass im Zuge der Automatisierung in kürzester Zeit große Mengen an elektrophoretischen Daten mit hoher Auflösung produziert werden konnten. Diese Technik wurde zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten bereits mehrfach genutzt (Swerdlow & Gesteland, 1990; Milofsky & Yeung, 1993; Williams *et al.*, 1996; Borson *et al.*, 1998; Schouten *et al.*, 2002). Dennoch sind bisher wenige Durchführungen zur Auftrennung von cDNA-Fragmenten aus DDRT-PCR

Ansätzen mittels Kapillargelelektrophorese beschrieben (Zhao & George, 2001; Guttman *et al.*, 2003; Kriegs *et al.*, 2006). Die Auftrennung der generierten cDNA-Fragmente aus der DDRT-PCR erfolgt vorwiegend mit Polyacrylamid-Gelen und wird inzwischen mit dem Einsatz von DNA-Sequenziermaschinen erweitert (Ito *et al.*, 1994; Stein & Liang, 2002). Die Verwendung von Polyacrylamidgelen zur Auswahl von Kandidatenfragmenten erfordert jedoch einen erheblichen Zeit- und Arbeitsaufwand, da die Banden einzeln visuell betrachtet und ausgewertet werden müssen. Erste Beiträge zur Quantifizierung von Genexpressionsdaten aus DDRT-PCR-Analysen beinhalten die Auswertung von densitometrischen Daten zur Ermittlung von relativen Verhältnissen zwischen Intensitäten vergleichbarer Banden (Venkatesh *et al.*, 2005) oder der Einsatz von computer-basierten statistischen Auswertungen der Genexpressionsmuster (Aittokallio *et al.*, 2000; Aittokallio *et al.*, 2003). Da die Ergebnisse der Expressionsdaten bei der kapillargelelektrophoretischen Auftrennung in Form von numerischen Daten vorliegen, können sie zur relativen Quantifizierung verwendet werden. Die hohe Auflösung und Sensitivität der kapillargelelektrophoretischen Auftrennung und Fluoreszenzdetektion wurde in dieser Arbeit genutzt, um eine computergestützte statistische Auswertung anhand von Datenreduktionsalgorithmen einzuführen. Die hier verwendeten Datenreduktionsalgorithmen dienen zur Simplifizierung der Selektion von Kandidatenfragmenten für die anschließende Charakterisierung.

Seit der Einführung der Methode sind kontinuierlich Protokolle zur methodischen Optimierung der DDRT-PCR Technik beschrieben worden (Bauer *et al.*, 1993; Liang *et al.*, 1993; Matz *et al.*, 1997; Graf *et al.*, 1997; Miele *et al.*, 1998; Colmenares *et al.*, 2000). Ein großes Problem stellt die hohe Rate an Falsch-Positiven dar, die durch den Anteil der cDNA-Fragmente repräsentiert werden, bei denen keine Verifizierung der Differentialität mit Hilfe von ergänzenden Methoden z.B. Northern Blot erfolgen kann (Li *et al.*, 1994; Lievens *et al.*, 2001). Bei der DDRT-PCR wird dieser Anteil an Falsch-Positiven relativ hoch eingeschätzt. Der Anteil an Falsch-Positiven kann bedingt sein durch RNA- und DNA-Kontamination, degradierte RNA, Mischung aus konstitutiv und differentiell exprimierter mRNA's gleicher Größe und imperfekte Hybridisierung des Primers. In den eigenen durchgeführten der DDRT-PCR wurden verlängerte „Arbitrary“-Primer mit einer modifizierten Sequenz zur Erzielung einer Annealing Temperatur > 40 °C in einem ergänzenden PCR-Schritt eingesetzt. Nach Zhao *et al.* (1994) erhöht diese Modifikation die Reproduzierbarkeit und Sensitivität und führt zur Reduktion Falsch-Positiver. Eine hohe Reproduzierbarkeit konnte in den vorliegenden Untersuchungen zum einen visuell anhand der Expressionsmuster der Elektropherogramme

und zum anderen mit der Durchführung einer hierarchischen Clusteranalyse der Expressionsdaten bestätigt werden. Zusätzlich war es abschließend notwendig, die Differentialität der signifikant exprimierten Kandidatenfragmente infolge der in- und extrinsischen Fehlerfaktoren zu verifizieren. Die Verifizierung wurde in der eigenen Arbeit nach Sequenzierung und Design der spezifischen Primer mittels quantitativer Real Time-PCR durchgeführt. Für alle untersuchten differentiellen Kandidatentranskripte konnte die Differentialität nachgewiesen werden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Auswahl von Kandidatenfragmenten mittels DDRT-PCR kombiniert mit der Auswertung anhand von biometrischen Datenreduktionsalgorithmen eine geeignete Methode darstellt.

Die statistische Auswertung der Expressionsdaten dieser Arbeit basierte nach der Qualitätsprüfung und Standardisierung der Daten auf einem hierarchisch-agglomerativen Clusterverfahren nach Ward zur Klassifizierung der Expressionsmuster. Zur Auswahl von Kandidatenfragmenten wurde eine Varianzanalyse unter Berücksichtigung des False Discovery Rate (FDR) durch Anwendung einer multiplen Testkorrektur nach Benjamini & Hochberg (1995) durchgeführt. In der Analyse von Microarray-Daten werden Klassifizierungsverfahren bereits in Genexpressionsstudien genutzt, um Zusammenhänge zwischen individuellen Genen und deren Expressionsmustern zu untersuchen oder individuelle Proben anhand von Expressionsmustern einzelner Gene zu vergleichen (Nadon & Shoemaker, 2002; Domany, 2003). In dieser Arbeit sollten mit Einsatz der hierarchischen Clusteranalyse aus methodischer Sichtweise die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Expressionsdaten von infizierten und nicht infizierten Blattproben der einzelnen *Helianthus*-Arten untersucht und verglichen werden. Die ermittelten Ergebnisse aus standardisierten Daten zeigten, dass sowohl genom-, genotyp- als auch infektionsspezifische Gruppierungen anhand der Expressionsdaten klassifiziert werden konnten. Daraus kann geschlossen werden, dass die DDRT-PCR kombiniert mit multikapillargelelektrophoretischer Auftrennung hinreichend sensitiv ist, um anhand der ermittelten Expressionsdaten themenspezifische Muster in *Helianthus* zu erfassen.

Insgesamt rekrutierten sich aus der Gruppe der signifikant differentiell exprimierter Transkripte zwei cDNA-Fragmente aus dem cDNA-Pool des Pathogens *S. sclerotiorum*. Nach Übereinstimmung der Sequenzdaten mit den öffentlichen Gendatenbanken konnten diese beiden Transkripte eindeutig dem Pathogen zugeordnet werden. Bei einem der beiden Transkripte handelt es sich um ein hypothetisches Protein. Die Sequenzabfolge des zweiten

Transkripts ergab eine Übereinstimmung mit einer Aspartatprotease (s. S. 85). Eine Identifizierung war möglich, da die Sequenzen des gesamten *Sclerotinia*-Genoms durch das USDA/NSF Microbial Genome Sequencing Programms seit 2005 öffentlich zugänglich sind.

Die DDRT-PCR Methodik lässt bei der Untersuchung einer Interaktion zwischen zwei lebenden Organismen keine selektive Trennung der beiden mRNA-Pools zu, da die Generierung von Kandidatenfragmenten über eine zufällige Amplifikation mit Einsatz von Arbitrary-Primer mit randomisierter Sequenz erfolgt. Des Weiteren besitzen pflanzliche, sowie pilzliche mRNA's einen universellen poly-A-Schwanz, so dass auch mit Einsatz des Anchor-Primers keine Selektion zwischen Organismen erfolgen kann. Auch wenn die Mehrheit der charakterisierten Transkripte aus dem mRNA-Pool der Pflanze stammten, konnte erwartungsgemäß nachgewiesen werden, dass es gleichermaßen möglich war, Transkripte aus dem mRNA-Pool des Pathogens zu isolieren. Da bei allen untersuchten Proben die isolierten mRNA's aus dem Blattbereich entnommen wurden, welches unmittelbar an die bereits vorhandene Läsion angrenzte, war davon auszugehen, dass es sich bei den pathogenbürtigen mRNA's um pathogeneserelevante Transkripte handelte.

4.5 Bedeutung von *Sclerotinia*-induzierten und differentiell exprimierten Transkripten in resistenten *Helianthus*-Wildarten

Eine molekulare Untersuchung von *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe erfolgte an drei unterschiedlichen Zeitpunkten während des frühen Infektionszeitraumes mit einer anfälligen Sorte Albena und zwei *Sclerotinia*-resistenten Wildarten (AC 7, AC M). Da sich anhand der Inokulationsversuche im Vorfeld beobachten ließ, dass erste sichtbare Symptome im Versuchsmittel zwischen 48 h und 64 h auftraten, wurde der früheste Untersuchungszeitpunkt an Tag 2 festgelegt und zwei weitere Zeitpunkte, 3 und 4 Tage nach Inokulation (DPI), ausgewählt. Das Auftreten erster Symptome wird in der Literatur in transkriptomischen Untersuchungen von Wirt-Pathogen-Interaktionen häufig als optimaler Beprobungszeitpunkt erachtet (Truesdell & Dickman, 1997; Benito *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2007; Darvishzadeh *et al.*, 2008).

Die Ergebnisse der Differential Display Analyse ergab für die drei untersuchten *Helianthus*-Arten ein artenspezifisches Expressionsprofil, das sich durch die Anzahl der signifikant exprimierten Transkripte an den unterschiedlichen Zeitpunkten auszeichnete (Tab. 13). Die *Sclerotinia*-resistente Wildart AC 7 wies zum frühen Infektionszeitpunkt (DPI 2) die höchste

Anzahl an signifikant hochregulierten Transkripten auf. Im Vergleich dazu, wurde bei der Infektion von AC M durch *S. sclerotiorum* eine relativ moderate Anzahl an induzierten Transkripten an allen untersuchten Zeitpunkten festgehalten. Die anfällige Sorte Albena wies demgegenüber zu dem späteren Zeitpunkt der Pathogenese (DPI 4) eine stark induzierte Hochregulation auf. Unterschiede zwischen pathogenanfälligen und –resistenten Pflanzenarten in der Zeitabfolge der Reaktionen auf Pathogene und deren maßgebliche Bedeutung für die Ausprägung der Resistenz sind allgemein bereits mehrfach beschrieben worden (Dixon *et al.*, 1994; Ebel & Mithöfer, 1998; Tao *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2006). Auch für die Interaktionen zwischen Wirtspflanzen und *S. sclerotiorum* wurden solche Beobachtungen in jüngster Zeit beschrieben. So konnten Zhao *et al.* (2007) in Microarray-Analysen in Raps nachweisen, dass in einem *Sclerotinia*-anfälligen Genotyp zwar ähnliche Gene durch das Pathogen induziert werden, allerdings werden diese weitaus später exprimiert, als bei dem partiell-resistenten Genotyp. Die frühzeitige Erkennung des Pathogens spielt eine maßgebliche Rolle für eine effiziente Pathogenabwehr. Insbesondere bei pertotrophen Pathogenen ist eine frühe Pathogenabwehr von besonderer Bedeutung, da eine Zerstörung des Pflanzengewebes und eine Verbreitung des Pathogens im Gewebe früh und beschleunigt erfolgt (Asselbergh *et al.*, 2007).

Tab. 13: Anzahl der signifikant differentiell exprimierten Transkripte in den resistenten Wildarten (AC 7, AC M) und der anfälligen Sorte Albena für drei aufeinanderfolgenden Tage nach Inokulation mit dem pertotrophen Pathogen *S. sclerotiorum*.

	DPI 2		DPI 3		DPI 4	
	Differentiell exprimierter Transkripte insgesamt	hoch-reguliert (+) bzw. supprimiert (-)	Differentiell exprimierter Transkripte insgesamt	hoch-reguliert (+) bzw. supprimiert (-)	Differentiell exprimierter Transkripte insgesamt	hoch-reguliert (+) bzw. supprimiert (-)
AC 7	15	15 (+) 0 (-)	7	7 (+) 0 (-)	3	3 (+) 0 (-)
AC M	4	4 (+) 0 (-)	4	4 (+) 0 (-)	1	1 (+) 0 (-)
Albena	8	4 (+) 4 (-)	5	2 (+) 3 (-)	12	11 (+) 1 (-)

In der Wildart AC 7 scheint die Resistenzausprägung mit einer frühen Erkennung des Pathogens und einer frühzeitigen Pathogenabwehr in engem Zusammenhang zu stehen. Frühzeitige Reaktionen auf die Infektion des Pathogens im Gewebe, wie für die Wildart AC 7 in dieser Arbeit nachgewiesen, erfordern eine frühzeitige Erkennung des Pathogens. Zur pathogenspezifischen Erkennung und Induktion einer pflanzlichen Abwehrkaskade wurden umfassend sog. Elicitoren beschrieben, die als diverse biochemische Signale mit hoher Sensitivität von der Pflanze sowohl an der Zelloberfläche als auch innerhalb der Zellen fungieren. Anhand von spezifischen Rezeptoren perzipieren sie nach dem Elicitor-Rezeptor-Modell, was zu einer Resistenz der Pflanze führen kann (Keen *et al.*, 1972; Scheel & Parker, 1990; Ebel & Scheel, 1997; Ebel & Mithöfer, 1998). Zu den Elicitoren, die in der jüngsten Literatur als „Pathogen-associated molecular pattern“ (PAMP) benannt werden, gehören Makromoleküle aus der pilzlichen Zellwand und pathogensekretierte Moleküle wie z.B. (Glyco-) Proteine, Peptide, Fettsäuren und vorherrschend Oligosaccharide (Vidhyasekaran, 1997). Potentielle Elicitoren aus *S. sclerotiorum* sind jedoch bisher wenige beschrieben (Bertinetti & Ugalde, 1996). Da die Sekretion von Endopolygalacturonasen für *S. sclerotiorum* ebenfalls eine maßgebliche Bedeutung für die Virulenz hat und entscheidend zum aktiven Abtöten der Wirtszellen beiträgt, wäre ein Einfluss dieser Enzyme auf die Verfügbarkeit der enzymatischen Produkte als potentielle Elicitoren denkbar. Für ein weiteres nekrotrophes Pathogen *Botrytis cinerea*, welches zu *S. sclerotiorum* Ähnlichkeiten in der Ernährungsweise und Ablauf der Pathogenese aufweist, sind bereits elicitor-induzierte Resistenzmechanismen in Pflanzen beschrieben. So wurde z.B. die Bedeutung von PG's in der Resistenz von *Arabidopsis thaliana* gegen *B. cinerea* hervorgehoben (Ferrari *et al.*, 2007). Die Aktivität dieser lytischen Enzyme führte zur Freisetzung von Oligogalacturoniden, die als exogene Elicitoren die Pathogenabwehr aktivieren. Es konnte zudem in Untersuchungen von Favaron *et al.* (1988) mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* und Sojabohnenpflanzen gezeigt werden, dass Polygalacturonasen möglicherweise selbst als Elicitoren auftreten. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass durch die konstitutive und/oder induzierte Aktivität von Chitinasen aus der Wirtspflanze das Auflösen der pilzlichen Zellwand zur Freisetzung von Zuckermolekülen als exogene Elicitoren führt (Benhamou, 1996). Eine induzierte Resistenz gegen *S. sclerotiorum*, verursacht durch die Behandlung von *Daucus carota* L. mit dem exogenen Elicitor Chitosan, wurde in Untersuchungen von Molloy *et al.* (2004) nachgewiesen. Zudem wurde die von dem Pathogen sekretierte Oxalsäure, einem weiteren Pathogenitätsfaktor aus *S. sclerotiorum*, als potentielles Signalmolekül beschrieben (Favaron *et al.*, 1988; Toal & Jones, 1999).

Da die Wildart AC M eine ähnliche Symptomausprägung wie die Wildart AC 7 zeigte, jedoch auf der transkriptomischen Ebene in den untersuchten Zeitpunkten lediglich eine moderate Anzahl an signifikant hochexprimierten Transkripten aufwies, lässt sich hier ein anderer Resistenztyp postulieren. Im Gegensatz zu einer pathogen-induzierten Expression kann die konstitutive Expression hydrolytischer Enzyme in sehr frühen Stadien der Infektion als weitere Möglichkeit zur Freisetzung von Elicitoren führen und ebenfalls eine frühzeitige Pathogenabwehr induzieren. Für die Wildart AC M konnte in vorangehenden Studien gezeigt werden, dass eine hohe Aktivität von Chitinasen von zwei unterschiedlichen Chitinaseisoformen und eine hohe Glucanaseaktivität in Stängeln präinfektionell nachweisbar war (Ellers, 2002). Dies stellt eine Besonderheit dar, da in vielen bisher beschriebenen Wirt-Pathogen-Interaktionen die Aktivität von Chitinasen durch das Pathogen induziert wird (Legrand *et al.*, 1987; Nishizawa & Hibi, 1991). Die geringe Anzahl an signifikant differentiellen und pathogenrelevanten Transkripten der *Sclerotinia*-resistenten Wildart AC M kombiniert mit der hohen Aktivität von PR-Proteinen im gesunden Pflanzengewebe könnte darauf hindeuten, dass im Gegensatz zur Wildart AC 7 spezifische Gene relevant für eine *Sclerotinia*-Abwehr konstitutiv exprimiert werden und eine Pathogeninduktion eine erste effiziente Abwehrreaktionen von geringerer Bedeutung ist. Die Unterscheidung zwischen konstitutiv exprimierten und induzierten Resistenzmechanismen, wie sie höchstwahrscheinlich in AC M bzw. AC 7 vorliegen, wird in Pflanzen seit längerer Zeit postuliert (Yang *et al.*, 1997). Fließende Übergänge zwischen konstitutiven und induzierten Resistenzmechanismen können jedoch nicht ausgeschlossen werden.

In der Differential Display Analyse dieser Arbeit wurden 4 signifikant differentiell exprimierte pflanzliche cDNA-Transkripte aus Blättern der untersuchten *Helianthus*-Arten isoliert und charakterisiert. Im Folgenden werden diese differentiell exprimierten Transkripte, die jeweils in diversen Stoffwechselwegen der pflanzlichen Zelle integriert sind, im Hinblick auf ihre Bedeutung in dem *Sclerotinia*-infizierten Blattgewebe der resistenten Wildarten diskutiert (Abb. 19). Bei den Transkripten handelt es sich um eine Cysteinprotease (**I**), eine 4-Coumarat-CoA-Ligase (**II**) (s. S. 94 ff.), ein Chlorophyll *a/b*-bindendes Protein (**III**) und eine S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (**IV**).

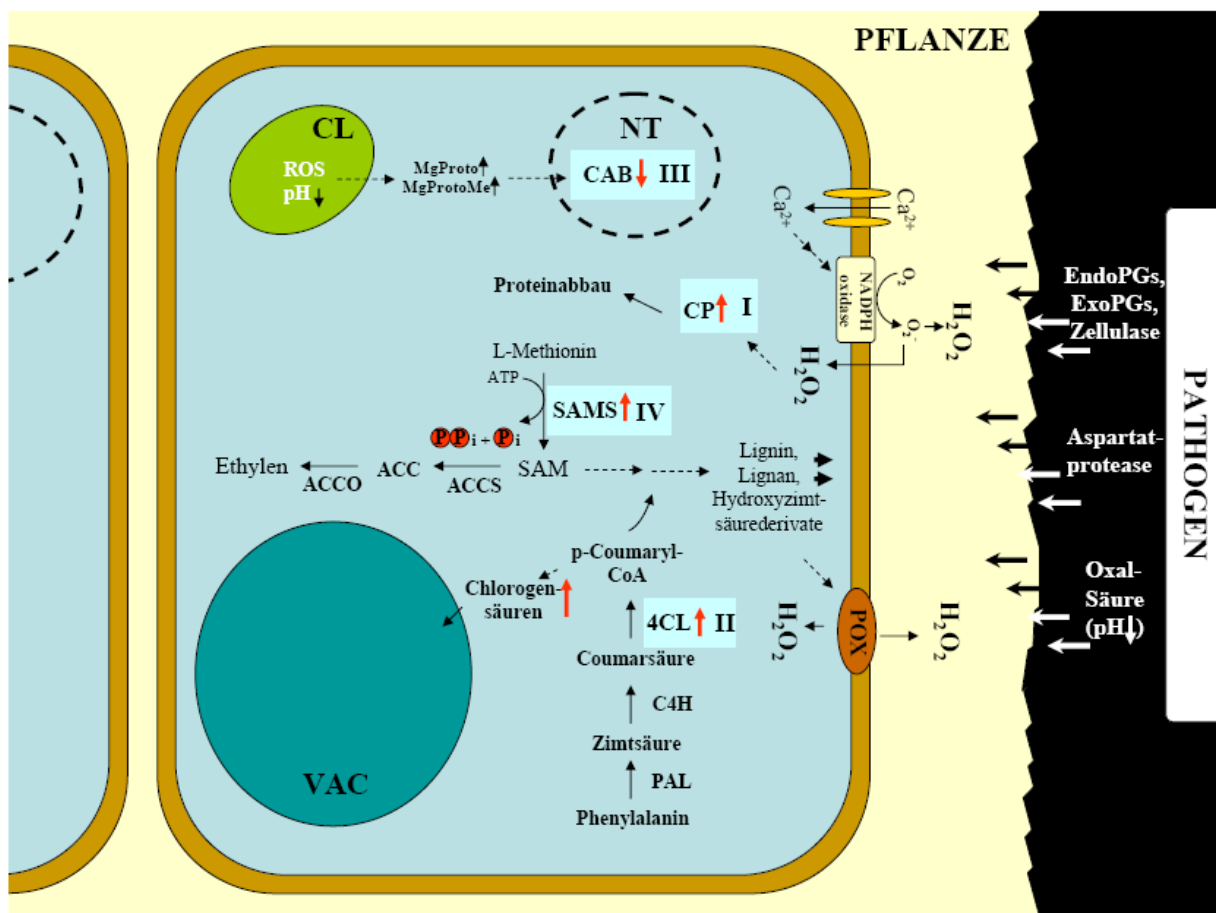


Abb. 19: Modell des Einflusses einer *Sclerotinia*-Infektion auf zelluläre Stoffwechselprozesse in resistenten Wildarten unter besonderer Berücksichtigung der differentiell exprimierten Transkripte.

ACC: 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure, **ACCO:** 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure Oxidase, **ACCS:** 1-Aminocyclopropan-1-Carboxylsäure Synthetase, **CAB:** Chlorophyll *a/b*-bindendes Protein, **C4H:** Zimtsäure-4-Hydroxylase, **CP:** Cysteinprotease, **4CL:** 4-Coumarat-CoA-Ligase, **CL:** Chloroplasten, **NT:** Nucleus, **PAL:** Phenylalaninlyase, **POX:** Peroxidase, **ROS:** Reaktive Sauerstoffspezies, **SAM:** S-Adenosyl-Methionin, **SAMS:** S-Adenosyl-Methionin-Synthetase, **VAC:** Vakuole.

Cysteinprotease (CP)

Unter den Proteasen sind die Cysteinproteasen eine bedeutende Gruppe von Enzymen, die hauptsächlich in die proteolytischen Prozesse der pflanzlichen Zelle involviert sind (Beers *et al.*, 2004). Im Gegensatz zu ihrer Funktion als Schlüsselproteine zur Regulation der Apoptose in tierischen Zellen, weisen pflanzliche Cysteinproteasen auch einen multifunktionellen Charakter auf (Grudkowska & Zagdanska, 2004). Eine entscheidende Rolle besitzen sie in physiologischen und katabolischen Prozessen der Pflanze, insbesondere während der Mobilisierung von Lagerproteinen des Endosperms in den Samen diverser Pflanzenarten (Shutov & Vaintraub, 1987; Müntz *et al.*, 2001, Sheokand *et al.*, 2005).

Ihre konstitutive Funktion beinhaltet den Abbau degradiertes und falsch gefalteter Proteine. Für die Peptidspaltung besitzen alle Cysteinproteasen einen histidinaktivierten Cysteinrest, welche am aktiven Zentrum als Nukleophil in den ersten Schritten der Proteolyse fungiert. Sie besitzen ubiquitär eine Prodomäne, die für die Aktivierung entfernt werden muss, unterliegen starker posttranskriptionaler Regulation und sind in ihrer Aktivität stark pH-Wert-abhängig (Bryan, 2002). Zum Teil erfolgt die Kontrolle der Proteasen über die endogene Aktivität von Protease-Inhibitoren (Otto & Schirmeister, 1997; Habib & Fazili, 2007). Bisher charakterisierte pflanzliche Cysteinproteasen weisen meist ein pH-Optimum im sauren Bereich auf (Expósito *et al.*, 1991; Grudkowska & Zagdanska, 2004; Rooney *et al.*, 2005), welches insbesondere ihre vermehrte Aktivität in der pflanzlichen Vakuole erklärt. Weitere Cysteinproteasen wurden zudem in der Zellwand, in Chloroplasten und im Cytosol lokalisiert (Lindahl *et al.*, 1995; Korthout *et al.*, 2000). Cysteinproteasen kommen in allen Pflanzenorganen vor, weisen jedoch höchstwahrscheinlich eine organspezifische Funktion auf. Am weitesten untersucht sind Funktionen der Cysteinproteasen, die zur Papainfamilie gezählt werden (van der Hoorn *et al.*, 2004). Allein das Genom von *Arabidopsis* kodiert insgesamt 32 Cysteinproteasen des Papain-Typs (C1-Familie), die multifunktionelle Aufgaben haben und zum Teil Seneszenz- oder Stress-induziert auftreten. Neben den Cysteinproteasen des Papain-Typs, werden weitere Cysteinproteasen jeweils zu den Calpainen, Legumainen oder Caspasen gezählt (Grudkowska & Zagdanska, 2004).

Das Transkript mit Homologie zu einer Cysteinprotease in der Wildart AC 7 war 72 Stunden nach Inokulation im Blattgewebe signifikant hochexprimiert. Zu diesem Zeitpunkt war *S. sclerotiorum* bereits im pflanzlichen Blattgewebe mittels zellwandabbauender Enzyme aktiv in das Wirtsgewebe eingedrungen und hatte sich in ihm verbreitet. Die Hochregulation der Cysteinprotease steht höchstwahrscheinlich in einem engen Zusammenhang mit den physiologischen Veränderungen des Gewebes durch den Pathogenbefall. Bisher existieren in

der Gattung *Helianthus* keine Beschreibungen über die Induktion von Cysteinproteasen durch die Interaktion mit *S. sclerotiorum*. Die Bedeutung der Cysteinprotease in der Gattung *Helianthus* begrenzt sich derzeit lediglich auf physiologische Funktionen in Keimlingen oder Blättern unter Einfluss von externen Stimuli mit z.B. Schwermetallen (Pena *et al.*, 2006a, Pena *et al.*, 2006b). Ob die Induktion des Transkripts in Zusammenhang mit einem Resistenzverhalten der Wildart AC 7 steht, konnte an dieser Stelle nicht eindeutig geklärt werden. Eine mögliche Funktion wäre in der mit einem oxidativen Stress assoziierten Degradation von oxidierten Proteinen zu vermuten. Zudem könnte die Funktionalität des Enzyms prinzipiell mit der zellulären Remobilisierung des Aminosäurestoffwechsels nach Infektion in Zusammenhang stehen oder sogar in der direkten Pathogenabwehr als potentiell PR-Protein eine Rolle spielen.

Im Hinblick auf Wirt-Pathogen-Interaktionen wurde eine pathogen-induzierte Expression von Cysteinproteasen bereits für diverse Pflanzenarten beschrieben (Avovra *et al.*, 1999; Hatsugai *et al.*, 2004). Grundsätzlich spielen Proteasen eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen, bei der Signalweiterleitung zur Pathogenabwehr, aber auch in der Basisabwehr (van der Hoorn & Jones, 2004; Takayuki & van der Hoorn, 2008). Bezüglich der spezifischen Rolle in Abwehrmechanismen der Pflanzen gegen Pathogene ist die Aktivität von Cysteinproteasen weitestgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass, ähnlich zu den Caspasen in tierischen Zellen, diese proteolytischen Enzyme eine bedeutende Rolle in der Apoptose besitzen. Entsprechende Homologien dieser sog. Caspase-ähnlichen Proteasen zu den Caspasen in tierischen Zellen sind in der Literatur jedoch umstritten (Woltering *et al.*, 2002; Woltering, 2004; Piszczek & Gutman, 2007).

Ein Zusammenhang zwischen einer Hochregulation des Transkripts der Cysteinprotease und der Infektion durch ein Pathogen wird oftmals mit der Induzierbarkeit von Cysteinproteasen durch oxidativen Stress erklärt (Solomon *et al.*, 1999). Im Zuge der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Zelle kann eine Schädigung von intrazellulären Proteinen eintreten. Je nach Konzentration der ROS liegen Proteine in einer oxidativ modifizierten Form, die durch eine Defunktionalisierung über die Bildung von Carbonylgruppen im Proteinmolekül gekennzeichnet ist (Reinheckel *et al.*, 1998). Moderat oxidierte Proteine werden aufgrund ihrer reduzierten Funktionalität in der Zelle abgebaut, welches über die regulierte Proteolyse mittels Proteasen realisiert wird. Da in der pflanzlichen Zelle insbesondere die photosynthetischen Prozesse durch oxidativen Stress betroffen sind, findet vermehrt eine Oxidation von plastidär lokalisierten Proteinen statt. Beispielsweise wird

die Ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase-Oxygenase (Rubisco) bei geringen oxidativen Veränderungen der Zelle durch Cysteinproteasen katabolisiert (Basset, 2002). Zudem unterliegen auch die zentralen D1-Proteine der Thylakoidmembranen dieser Degradierung bei oxidativem Stress (Lindahl *et al.*, 2000).

Neben der Aktivierung von Abwehrmechanismen durch reaktive Sauerstoffspezies wäre eine Induktion von Cysteinproteasen durchaus auch durch die Aktivität von zellwandabbauenden Endopolygalacturonasen denkbar. Eine Induzierbarkeit einer Cysteinprotease durch Polygalacturonasen in mit *Botrytis elliptica*-infizierten Lilien ist bereits nachgewiesen worden (van Baarlen *et al.*, 2007). Studien von Terras *et al.* (1995) belegen, dass in *Raphanus*-Blättern ein cysteinreiches Protein (Rs-AFP1) zur Abwehr von *Alternaria brassicola* synthetisiert wird und als PR-Protein fungiert. Eine weitere mögliche Funktion von Cysteinproteasen wäre in Zusammenhang mit der Induktion durch Verwundung gegeben. Im Zuge einer Verwundung des Gewebes reagiert die Pflanze mit einer wund-induzierten Genexpression, die zur Wundheilung, aber auch zur generellen Abwehr von Pathogenen beiträgt. Bei Interaktion zwischen Mais und fraßschädigenden Lepidopteren-Larven wurde z.B. die Aktivierung einer Papain-ähnlichen Protease (Mir1-CP) beschrieben, die zudem eine hohe Toxizität gegen diverse Raupenarten aufwies (Mohan *et al.*, 2008).

Chlorophyll *a/b*-bindendes Protein (CAB)

Zwei Tage nach Inokulation mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* konnte bei allen drei untersuchten *Helianthus*-Genotypen eine Supprimierung des Chlorophyll *a/b*-bindenden (*cab*) Proteins nachgewiesen werden. Die Funktion der *cab*-Proteine deutet grundsätzlich auf einen Einfluss der Infektion des Pathogens *S. sclerotiorum* auf den photosynthetischen Apparat des gesunden Blattgewebes hin. Die *cab*-Proteine, auch bekannt als Lichtsammelprotein-komplexe (*LHC*-Proteine) des Photosystems (PS) I und PSII, befinden sich in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten. Diese besitzen über eine nicht-kovalente Bindung mit Chlorophyll *a* und *b*, sowie in Assoziation mit diversen Karotinoiden, die Funktion zur effektiven Absorption von Licht und der damit verbundenen Weiterleitung der aufgenommenen Energie an die photosynthetischen Reaktionszentren (Green & Durnford, 1996). Obschon eine Expression Photosynthese-relevanter Gene in den Chloroplasten aufgrund der Autonomie des Plastoms erfolgen könnte, wird ein Großteil dieser photosynthetisch bedeutsamen Gene, wie auch alle *cab*-Gene, nuklear kodiert. Dies erfordert eine regulative Koordination und einen post-translationalen Import der Proteine aus dem

Cytosol in den Chloroplasten (Robinson *et al.*, 2000). Dabei ist eine koordinierte Kontrolle nuklearer und plastidärer Gene für die photosynthetische Maschinerie und der damit verbundenen photoautotrophen Lebensweise der pflanzlichen Zelle obligatorisch. Die Regulation der Genexpression aller Photosynthese-relevanten Gene erfolgt primär durch den Nukleus (Goldschmidt-Clermont, 1998). Eine sogenannte retrograde Signalübertragung zu den im Nukleus exprimierten photosynthetisch-relevanten Genen kann jedoch ebenso durch die Chloroplasten erfolgen. Diese wird insbesondere durch physiologische Veränderungen in den Chloroplasten bei der Einwirkung exogener Stimuli induziert (Nott *et al.*, 2006). Neben der primären Funktion dieser retrograden Regulationsmechanismen bei der Adaptation an umweltbedingte Veränderungen insbesondere der Lichtverhältnisse, findet eine Regulation der nuklear kodierten Genexpression im Zuge einer Blockierung der Plastidenentwicklung statt. Weiterhin wird bei einer Reduktion der Funktionalität des Chloroplasten, einer Inhibierung des Karotenoidstoffwechsels und bei der Einwirkung von toxischen Substanzen, die chloroplastische Genexpression inhibiert (Oelmüller *et al.*, 1986a; Oelmüller *et al.*, 1986b; Taylor, 1989). Auch die *cab*-Gene sind dieser retrograden Regulation unterworfen, so dass sich vermuten lässt, dass die Suppression des *cab*-Gens unmittelbar mit der Schädigung von Chloroplasten im Zusammenhang steht (Batschauer *et al.*, 1986).

Die Suppression des *cab*-Gens stimmt mit elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Tariq und Jeffries (1985) überein, die Veränderungen der Chloroplasten in *Sclerotinia*-infizierten Bohnenblättern nachgewiesen hatten. Die genannten Autoren postulieren weiterhin, dass es sich bei den entstandenen Proteinablagerungen um eine Degradierung des Rubisco-Proteins handelte, die aufgrund eines pH-Abfalls bedingt durch die Sekretion von Oxalsäure durch *S. sclerotiorum* verursacht werden. Zudem konnten sie strukturveränderte Chloroplasten in diesen Randbereichen, wo kein Hyphenwachstum zu beobachten war, nachweisen. Untersuchungen bei denen eine Behandlung mit Oxalsäure erfolgte, ergaben ähnliche physiologische Erscheinungen. Eine Schädigung von Chloroplasten verursacht durch einen abrupten Abfall des pH-Wertes ist möglicherweise auch die Ursache für Schädigungen der Chloroplasten in den eigenen Untersuchungen.

In der Literatur wird angegeben, dass insbesondere die Akkumulation biosynthetischer Vorstufen des Chlorophylls, wie z.B. Mg-ProtoporphyrinIX (Mg-ProtoIX) und Mg-ProtoporphyrinIX-Methylester (Mg-ProtoIX-Me), auf die nuklearen Gene des Photosyntheseapparats regulierend einwirken (Kropat *et al.*, 1997; Kropat *et al.*, 2000; Strand *et al.*, 2003). Strand und Mitarbeiter (2003) konnten zeigen, dass im Zuge einer

Akkumulierung von Mg-ProtoIX die Genexpression von photosynthetisch-relevanten Genen in *Arabidopsis* supprimiert ist. Der Abbau von Chlorophyll und die Suppression der Biosynthese von *cab*-Proteinen können somit als gekoppelte Prozesse angesehen werden (Falbel & Staehelin, 1992).

Kontrollmechanismen der nuklearen photosynthetisch-relevanten Gene werden zudem durch Veränderungen des Redoxzustandes von Komponenten des Elektronentransports und durch Einfluss von ROS aktiviert (Pfannschmidt *et al.*, 1999; Brown *et al.*, 2001; Pfannschmidt, 2003; Fey *et al.*, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass die Regulation über den Redoxzustand des Plastiquinonpools als genereller Mechanismus bei starken Veränderungen der Lichtzustände und durch den Einfluss von Umweltstimuli einsetzt (Beck, 2001). Eine ähnliche Auswirkung haben ROS, wie z.B. H₂O₂, bei Überschreitung von gewissen Konzentrationen in der pflanzlichen Zelle. Die Generierung von H₂O₂ erfolgt üblicherweise in Thylakoiden aus dem primären Produkt der Sauerstoffreduktion O₂⁻ mit Hilfe der Superoxiddismutase (SOD). In intakten Chloroplasten findet aufgrund der Aktivierung von Ascorbatperoxidase (APX) normalerweise eine Reduktion von H₂O₂ statt. Die Generierung von Radikalen kann aus einer sehr starken Lichteinwirkung resultieren, die zu einem Überschuss an Elektronen aus dem Elektronentransportsystem führt (Niyogi, 1999). H₂O₂ gilt in der retrograden Signalübertragung aber auch als direkter Regulator Photosynthese-relevanter Gene.

Da H₂O₂ durch Aquaporine diffundieren kann, reicht eine exogene Einwirkung von H₂O₂ aus, um die Regulation von photosynthetisch-relevanten Genen in den Chloroplasten und im Nukleus, selbst wenn der H₂O₂-Ausstoß apoplastisch entstanden ist, auszulösen. Von Kimura und Mitarbeitern (2001) konnte nachgewiesen werden, dass eine Behandlung von *Arabidopsis*-Keimlingen mit Hydrogenperoxid unter Lichteinwirkung in einer Aktivierung stress-induzierter bzw. nuklear enkodierter Gene resultierte (*ELIP2* und *APX2*). Die Regulation von photosynthetisch-relevanten Genen im Nukleus mit H₂O₂ als Signalüberträger, hervorgerufen durch starke Lichtbestrahlung, stellt einen Verknüpfungspunkt mit der Induktion von Genen durch einen Pathogenbefall dar, da in beiden Fällen die Präsenz von H₂O₂ einen Effekt auf nuklear kodierte Gene auslöst (Kimura *et al.*, 2001). Im Zuge einer retrograden Signalübertragung werden unter starker Lichteinwirkung mit H₂O₂-Abhängigkeit selbst Pathogenabwehrmechanismen und eine antioxidative Abwehr aktiviert (Mullineaux *et al.*, 2000; Noctor & Foyer, 1998). Weitere Einzelheiten einer direkten Signalübertragung via H₂O₂ an den Nukleus sind jedoch zurzeit noch weitgehend ungeklärt. Dennoch könnte die Suppression der Genexpression des *cab*-Gens einen verifizierenden Hinweis auf einen

denkbaren zellulären oxidativen Stress geben, der in Folge in der Aktivierung von Pathogenabwehrmechanismen involviert ist (Mittler, 2002).

S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (SAMS)

Das Transkript mit Homologie zu einer S-Adenosylmethionin-Synthetase (SAMS) aus *Cucumis sativus* wurde an DPI3 als signifikant hochreguliertes Transkript in der anfälligen Sorte Albena nachgewiesen und isoliert. Es konnte bei der Verifizierung der differentiellen Expression mit RT-PCR zudem gezeigt werden, dass in der resistenten Wildart AC 7 dieses Transkript ebenfalls an DPI3 hochreguliert war.

S-Adenosyl-Methionin-Synthase (SAMS) katalysiert die Synthese von S-Adenosyl-Methionin (SAM, syn. AdoMet) durch eine nukleophile Substitution zwischen Methionin und ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat und Phosphat im Cytosol. SAMS als konstitutives Protein setzt im gesunden Gewebe etwa 80 % des pflanzlichen Methionins in SAM um (Giovanelli *et al.*, 1985). In diversen Pflanzenarten variiert die Anzahl an charakterisierten SAMS-Isomeren, dennoch existiert eine artenübergreifende konservierte Sequenzhomologie von SAMS-Proteinen innerhalb des gesamten Pflanzenreichs. In *Catharanthus roseus* konnte gezeigt werden, dass drei isolierte Isomere (SAMS1, SAMS2 und SAMS3) in Abhängigkeit von variierenden Umweltbedingungen differenziell reguliert wurden und möglicherweise einer multiplen Spezifität unterliegen (Schröder *et al.*, 1997). SAM, welches das Endprodukt des Methionin-Stoffwechsels darstellt, kann in vielfältiger Weise in diverse Stoffwechselforgänge der pflanzlichen Zelle eingebunden werden. Als Hauptmethyl-Donor besitzt SAM die Funktion zur Methylierung von u.a. Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Produkten des Phenylpropanoid-Stoffwechsels (Chiang *et al.*, 1996; Moffatt & Weretilnyk, 2001). Des Weiteren wird SAM für die Biosynthese von Aminosäuren und Polyaminen eingesetzt und ist zudem eine Vorstufe des Phytohormons Ethylen (Tabor & Tabor, 1984; Yang & Hoffman, 1984). Eine Rückführung in den Methylzyklus ist via S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase (SAHH) ebenfalls möglich.

In Ergänzung zu den eigenen Ergebnissen des *Sclerotinia*-induzierten Phenolstoffwechsels in den Wildarten resultiert die verstärkte Bereitstellung an S-Adenosyl-Methionin aller Voraussicht nach in gesteigerten Methylierungen von phenolischen Verbindungen. Es konnte in den eigenen Untersuchungen gezeigt werden, dass die Verfügbarkeit an Hydroxyzimtsäuren in den Zellen der Wildarten nach Infektion mit *S. sclerotiorum* erhöht ist. Folglich kann in Erwägung gezogen werden, dass die erhöhte Bereitstellung an SAM, die aus

dem gesteigerten Bedarf an Methyleinheiten resultiert, zu einer vermehrten Methylierung von Hydroxyzimtsäuren und weiteren phenolischer Verbindungen durch die Aktivität von Methyltransferasen erfolgt. Bedeutende Methylierungen im Phenylpropanoidstoffwechsel werden in vielen Pflanzenarten durch die Caffeoyl-CoA-*O*-Methyltransferase (CCoAOMT) und die Kaffeesäure/Hydroxyferulasäure-*O*-Methyltransferase (COMT) realisiert (Atanassova *et al.*, 1995; Ye, 1997). Dabei basiert die Katalyse von Kaffeesäure bzw. Kaffeoyle-CoA zu Ferulasäure bzw. Feruloyl-CoA auf der Methylierung der meta-Hydroxylgruppe an dem aromatischen Ring dieser Verbindungen. SAM wird in diesen enzymatischen Reaktionen als Cofaktor eingesetzt. Wie bereits in Abb. 18 (s. S. 93) dargestellt ist, erfolgt die Synthese von Feruloylchinasäuren aus Kaffeoylechinasäure ebenfalls über die katalytische Aktivität von CCoAOMT. Die Feruloylchinasäuren konnten in den eigenen Untersuchungen in den Kontrollblättern, sowie in den infizierten Gewebeproben der Wildarten nachgewiesen werden. Demzufolge steht eine erhöhte Aktivität an Methylierungsprozessen im Phenylpropanoidstoffwechsels der Wildarten nach Inokulation mit *S. sclerotiorum* möglicherweise mit einer ansteigenden Synthese der Monolignole den Vorstufen des Lignins, in Zusammenhang. Die Biosynthese von Ligninpolymeren in Folge einer Verwundung oder Infektion durch ein Pathogen konnte bereits mehrfach verifiziert werden (Grand *et al.*, 1987; von Röpenack *et al.*, 1998) Die Relevanz zellwandverstärkender Prozesse als effiziente Pathogenabwehr gegen peritrophe Pathogene konnte ebenfalls demonstriert werden (Schenk *et al.*, 2000; Kishimoto *et al.*, 2006). Eine verstärkte Lignifizierung der Zellwände an der lokalen Läsionsfront als Reaktion auf die Infektion mit *S. sclerotiorum* könnte auch in den Wildarten als Wachstumsbarriere die Ausbreitung des Pathogens einschränken und somit zu einer Reduktion der Läsionsextension führen. Weitere Erkenntnisse zur Bedeutung einer Lignifizierung gegen *S. sclerotiorum* müssten jedoch in zukünftigen Untersuchungen in den Sonnenblumenwildarten noch dargelegt werden.

Neben der Bereitstellung von SAM als Kofaktor für Methylierungsprozesse von phenolischen Verbindungen, ist SAM als Vorstufe auch in der Biosynthese von Ethylen involviert. Möglicherweise besteht auch hier ein Zusammenhang zu einer Induktion des Enzyms SAMS nach Infektion mit *S. sclerotiorum*, da in der Interaktion mit peritrophen Pathogenen Ethylen bzw. Ethylen-abhängige Signalkaskaden möglicherweise involviert sind (Ecker *et al.*, 1987; Diaz *et al.*, 2002; Broekaert *et al.*, 2006). Es müssten allerdings noch weitergehende differenzierende Untersuchungen durchgeführt werden, um die Bedeutung der S-Adenosyl-Methionin-Synthetase in der *Helianthus-Sclerotinia*-Interaktion herauszuarbeiten.

4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL)

Diskussion siehe S. 94 ff.

Alle vier differentiell exprimierten Transkripte (CAB, 4CL, CP, SAMS), die in dieser Arbeit erstmalig aus den Wildarten der Sonnenblume isoliert und charakterisiert wurden, besitzen bedeutende Stoffwechselfunktionen in der pflanzlichen Zelle. Hinsichtlich ihrer Bedeutung in der *Sclerotinia*-Abwehr steht die differentielle Genexpression aller vier Transkripte höchstwahrscheinlich in Verbindung mit einem pathogen-induzierten oxidativen Stress. Die Charakterisierung einer 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) konnte in Verbindung mit den phytochemischen Ergebnissen die Bedeutung des Phenolpropanoidstoffwechsels für die *Sclerotinia*-Resistenz der untersuchten *Helianthus*-Wildarten AC 7 und AC M bestätigen und vertiefen. Da bisher weder ein Nachweis noch eine *Sclerotinia*-Induktion der vier charakterisierten Transkripte in diversen *Helianthus*-Wildarten beschrieben worden ist, sind weiterführende Untersuchungen erstrebenswert, um die Bedeutung und Funktionalität dieser Proteine in der *Sclerotinia*-Abwehr von *Helianthus*-Wildarten in zukünftigen Untersuchungen zu bekräftigen und zu beschreiben.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen zwei Wildarten der Gattung *Helianthus* (AC 7 und AC M) und dem pertotrophen Pilz *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary phänotypisch, phytochemisch und transkriptomisch in infiziertem Blattgewebe untersucht. Im Vergleich zu der Interaktion zwischen der *Sclerotinia*-anfälligen annuellen *Helianthus*-Kultursorte Albena und dem Pilzerreger *S. sclerotiorum*, konnten für die Wildarten AC 7 und AC M in Gewächshausuntersuchungen gezeigt werden, dass die Läsionen und die Ausbreitung des Erregers im Blattgewebe der Wildarten signifikant reduziert waren. Es wurde beobachtet, dass die Reduktion der Läsionslängen insbesondere in den ersten 48 h nach Inokulation für die Resistenzausprägung der Wildarten entscheidend ist. Somit konnten die ermittelten durchschnittlichen Zuwachsraten der ersten 48 h als Parameter zur Prognose des weiteren Verlaufs der Infektion mit *S. sclerotiorum* herangezogen werden.

Um einen Einblick in den Phenolstoffwechsel zu erhalten, wurden die Blätter der Wildarten im Vergleich zu der annuellen Kultursorte Albena chromatographisch untersucht. Die phytochemischen Analysen von *Sclerotinia*-infiziertem Blattgewebe der Wildarten AC 7 und AC M wiesen, im Gegensatz zu Albena, hohe Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen auf. Ein bedeutender Unterschied zwischen den untersuchten Wildarten bestand in den Gesamtphenolgehalten der Kontrollblätter, da in der Wildart AC M präinfektionell sehr hohe Gehalte an phenolischen Inhaltsstoffen ermittelt wurden. In den Blättern der Wildarten waren insgesamt phenolische Substanzen aus der Gruppe der Hydroxymitsäuren und deren Derivaten stark vertreten. Die Kontrollblätter der Wildarten enthielten vermehrt Mono-Ester, wohingegen postinfektionell in den Blättern der Wildarten erhöhte Mengen an Mono- und Di-Kaffeoylchinasäuren nachgewiesen wurden. Insbesondere die Di-Kaffeoylchinasäuren wurden durch die Infektion mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* induziert.

Eine Identifizierung von differentiell exprimierten Transkripte erfolgte, um diejenigen Transkripte zu charakterisieren, die durch die Infektion mit dem Pathogen *S. sclerotiorum* induziert wurden. In dieser Arbeit wurde die Methodik der Differential Display RT-PCR gekoppelt an die kapillargelelektrophoretische Auftrennung generierter cDNA-Fragmente eingesetzt. Eine hierarchisch-agglomerative Analyse der Expressionsprofile ergab genom-, genotyp- und infektionsspezifische Klassifizierungen, die u.a. eine hohe Reproduzierbarkeit der DDRT-PCR Methodik im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchte *Sclerotinia-Helianthus*-Interaktion verifizierten.

Für die Auswahl von Kandidatenfragmenten wurde erstmalig eine statistische Auswertung der Genexpressionsdaten mithilfe von biometrischen Datenreduktionsalgorithmen durchgeführt. Die Selektion signifikant differentiell exprimierter Transkripte erfolgte mit Etablierung und Optimierung einer statistischen Auswertung der Expressionsdaten. Diese bestand aus der Durchführung einer datenbankgenerierten Auswertung der kapillargelektrophoretisch aufgetrennten cDNA-Fragmente, aus denen eine Auswahl an signifikant differentiell exprimierten Transkripten erfolgte. Die signifikant differentiell exprimierten Transkripte der Wildarten wiesen an allen untersuchten Zeitpunkten eine Hochregulation nach *Sclerotinia*-Infektion auf, wohingegen bei der Kultursorte Albena auch supprimierte Transkripte postinfektionell ermittelt wurden.

Die Bedeutung des Phenolstoffwechsels für die Interaktion zwischen den Wildarten und dem Pathogen konnte auch in den transkriptomischen Untersuchungen durch den Nachweis der differentiellen Genexpression einer 4-Coumarat-CoA-Ligase (4CL) bestätigt werden. Als weitere hochexprimierte Transkripte wurden eine Cysteinprotease (CP) aus dem Proteinstoffwechsel und das Schlüsselenzym S-Adenosyl-Methionin-Synthetase (SAMS) aus dem Methioninstoffwechsel nachgewiesen. Eine postinfektionelle Suppression wurde für ein Chlorophyll-*a/b*-bindendes Protein (CAB) aus dem Lichtsammelkomplex des Photosynthesestoffwechsels belegt. Durch den Einsatz der Differential Display-Methodik und der kapillargelektrophoretischen Auftrennung der generierten cDNA-Fragmente konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Isolation dieser vier Transkripte (CAB, 4-CL, CP, SAMS) in Wildarten der Gattung *Helianthus* erfolgen. Die differentielle Expression der vier Transkripte wurde anhand von semiquantitativer Real-Time PCR verifiziert.

In der Gesamtheit der transkriptomischen Untersuchungen wurde zudem gezeigt, dass eine frühzeitige pathogen-induzierte Genexpression in den Blättern der Wildarten für eine erfolgreiche Pathogenabwehr entscheidend ist. Im Gegensatz dazu war eine induzierte Genexpression in der *Sclerotinia*-anfälligen Sorte Albena zu einem weitaus späteren Zeitpunkt zu beobachten. Weiterhin konnten, trotz ähnlichen phänotypischen Läsionsausprägungen, genotypische Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Wildartaccessionen hinsichtlich der Anzahl differentiell exprimierter Transkripte nachgewiesen werden, da in der Wildart AC 7 eine erhöhte Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Transkripten an dem frühen Zeitpunkt DPI 2 ermittelt wurde. In den infizierten Blättern der Wildart AC M wurden hingegen an allen untersuchten Zeitpunkten eine geringe Anzahl an signifikant differentiell exprimierten Transkripten nachgewiesen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Achbani**, E.H., Tourvieille, D. & Vear (1994): Methods of determining the reaction of sunflower genotypes to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Agronomie* 14, 195-203.
- Achbani**, E.H., Tourvieille de Labrouhe, D. & Vear, F. (1996): Resistance of sunflower (*Helianthus annuus* L.) to terminal bud attack by *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *European Journal of Plant Pathology* 102, 421-429.
- Agrios**, G.N. (2005): Special plant diseases: Plant diseases caused by fungi. In: *Plant Pathology*, Fifth edition, p. 546 ff.
- Aittokallio**, T., Ojala, P., Nevalainen, T.J. & Nevalainen, O. (2000): Analysis of similarity of electrophoretic patterns in mRNA differential display. *Electrophoresis* 21, 2947-2956.
- Aittokallio**, Pahikkala, T., Ojala, P., Nevalainen, T.J. & Nevalainen, O. (2003): Electrophoretic signal comparison applied to mRNA differential display analysis. *BioTechniques* 34, 116-122.
- Albrecht**, H., Yoder, J.I. & Phillips, D.A. (1999): Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Triphysaria versicolor*. *Plant Physiol.* 119, 585-591.
- Alibert**, G., Ranjeva, R. & Boudet, A.M. (1977): Organisation subcellulaire des voies de synthèse des composés phénoliques. *Physiologie Végétale* 15, 279-301.
- Alignan**, M., Hewezi, T., Petitprez, M., Dechamp-Guillame, G. & Gentzbittel, L. (2006): A cDNA microarray approach to decipher sunflower (*Helianthus annuus*) responses to the necrotrophic fungus *Phoma macdonaldii*. *New Phytologist* 170, 523-536.
- Altschul**, S. F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Anashchenko**, A.V. (1979): Phylogenetic relations in the genus *Helianthus* L. *Bull. Appl. Bot. Genet. Plant Breed.* 64, 146-156.
- Andary**, C., Mondolot-Cosson, L. & Dai, G.H. (1996): In situ detection of polyphenols in plant microorganism interactions. In: Nicole, M & Gianinazzi-Pearson, V. (eds.): *Histology, ultrastructure and molecular cytology of plant-microorganism interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Appel**, H.M. (1992): Phenolics in ecological interactions – the importance of oxidation. *J. Chem. Ecol.* 19, 1521-1552.
- Aramendía**, M.A., García, I.M., Lafont, F., Lizaso, J., Marinas, J.M. & Urbano, F.J. (2000): Rapid determination of chlorogenic acid and related compounds in sunflower seeds by high-performance liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 14, 1019-1022.

- Asselbergh, B., Curvers, K., Franca, S.C., Audenaert, K., Vuylsteke, M., Van Breusegem, F. & Höfte, M. (2007):** Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiology* 144, 1863-1877.
- Atanassova, R., Favet, N., Martz, F., Chabbert, B., Tollier, M.-T., Monties, B., Fritig, B. & Legrand, M. (1995):** Altered lignin composition in transgenic tobacco expressing O-methyltransferase sequence in sense and antisense orientation. *Plant Journal* 8, 465-477.
- Avovra, A.O., Stewart, H.E., De Jong, W., Heilbronn, J., Lyon, G.D. & Birch, P.R.J. (1999):** A cysteine protease gene is expressed early in resistant potato interactions with *Phytophthora infestans*. *MPMI* 12, 1114-1119.
- Babitha, M.P., Prakash, H.S. & Shetty, H.S. (2004):** Purification and properties of lipoxygenase induced in downy mildew resistant pearl millet seedlings due to infection with *Sclerospora graminicola*. *Plant Science* 166, 31-39.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dinesh-Kumar, S.P. (1997):** Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276, 726-733.
- Baker, C.J., O'Neill, N.R., Deahl, K. & Lydon, J. (2002):** Continuous production of extracellular antioxidants in suspension cells attenuates the oxidative burst detected in plant microbe interactions. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 641-644.
- Baran, H. & Schwedt, G. (1993):** HPLC-Analytik von ethanolischen Eichenholzextrakten mit UV-, Fluoreszenz- und amperometrischer Detektion. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 196, 370-374.
- Baranowski, J.D. & Nagel, C.W. (1982):** Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* by hydroxycinnamic acids and their alkyl esters. *J. Food Sci.* 47, 1587-1589.
- Basset, G., Raymond, P., Malek, L. & Brouquisse, R. (2002):** Changes in the expression and the enzymatic properties of the 20S proteasome in sugar-starved maize roots. Evidence for an *in vivo* oxidation of the proteasome. *Plant Physiology* 128, 1149-1162.
- Batschauer, A., Möisinger, E., Kreuz, K., Dörr, I. & Apel, K. (1986):** The implication of a plastid-derived factor in the transcriptional control of nuclear genes encoding the light-harvesting chlorophyll a/b protein. *Eur. J. Biochem.* 154, 625-634.
- Bauer, D., Müller, H., Reich, J., Riedel, H., Ahrenkiel, V., Warthoe, P. & Strauss, M. (1993):** Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research* 21, 4272-4280.
- Bazzalo, M.E., Heber, E.M., Del Pero Martinez, M.A. & Caso, O.H. (1985):** Phenolic compounds in stems of sunflower plants inoculated with *Sclerotinia sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. *Phytopathol. Z.* 112, 322-332.

- Bazzalo, M.E., Dimarco, P., Martinez, F. & Daleo, G.R. (1991):** Indicators of resistance of sunflower plant to basal stalk rot (*Sclerotinia sclerotiorum*): Symptomatological, biochemical, anatomical, and morphological characters of the host. *Euphytica* 57, 195-205.
- Beck, C.F. (2001):** Signaling pathways in chloroplast-to-nucleus communication. *Protist* 152, 175-182.
- Beckman, C.H. & Halmos, S. (1962):** Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root-invading fungi. *Phytopathology* 52, 893-897.
- Beers, E.P., Jones, A.M. & Dickerman, A.W. (2004):** The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis*. *Phytochemistry* 65, 43-58.
- Bengoechea, L., Hernández, T., Quesada, C., Bartolomé, B., Estrella, I. & Gómez-Cordovés, C. (1995):** Structure of hydroxycinnamic acid derivatives established by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *Chromatographia* 41, 94-98.
- Benhamou, N. (1996):** Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends in plant science* 1, 233-240.
- Benito, E.P., Prins, Th. & van der Kan, J.A.L (1996):** Application of differential display RT-PCR to the analysis of gene expression in a plant-fungus interaction. *Plant Mol. Biol.* 32, 947-957.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995):** Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Statist. Soc. Ser. B57*, 289-300.
- Bertinetti, C. & Ugalde, R. A. (1996):** Studies on the response of carrot cell to a *Sclerotinia sclerotiorum* elicitor: Induction of the expression of an extracellular glycoprotein mRNA. *Molecular Plant – Microbe Interactions* 9, 658–663.
- Bertrand, F. & Tourvieille, D. (1987):** *Phomopsis* sur tournesol: tests de sélection. *Inf. Tech. CETIOM* 98, 12-18.
- Billon-Grand, G., Poussereau, N. & Fèvre, M. (2002):** The extracellular proteases secreted *in vitro* and *in planta* by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology* 150, 507-511.
- Binsfeld, P.C., Wingender, R. & Schnabl, H. (2000):** Characterization and molecular analysis of transgenic plants obtained by microprotoplast fusion of sunflowers. *Theor. Appl. Genet.* 101, 1250-1258.
- Binsfeld, P.C. & Schnabl, H. (2002):** Molecular and cytogenetic constitution of *Helianthus annuus* – *Helianthus maximiliani* somatic hybrids. *Plant Cell Reports* 21, 58-62.
- Boland, G.J. & Hall, R. (1994):** Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16, 93-108.

- Bolwell**, G.P., Bindschedler, L.V., Blee, K.A., Butt, V.S., Davies, D.R., Gardner, S.L., Gerrish, C. & Minibayeva, F. (2002): The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: A three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53, 1367-1376.
- Borson**, N.D., Strausbauch, M.A., Wettstein, P.J., Oda, R.P., Johnston, S.L. & Landers, J.P. (1998): Direct quantification of RNA transcripts by competitive single-tube RT-PCR and capillary electrophoresis. *BioTechniques* 25, 130-137.
- Broekaert**, W.F., Delauré, S.L., De Bolle, M.F.C. & Cammue, B.P.A. (2006): The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, 393-416.
- Brown**, E.C., Somanchi, A. & Mayfield, S.P. (2001): Interorganellar crosstalk: New perspectives on signalling from the chloroplast to the nucleus. *Genome Biology* 2, reviews 1021.1-1021.4.
- Bryan**, P.N. (2002): Prodomains and protein folding catalysis. *Chem Rev.* 102, 4805-4815.
- Carlile**, A.J., Bindschedler, L.V., Bailey, A.M., Bowyer, P., Clarkson, J.M. & Cooper, R.M. (2000): Characterization of SNP1, a cell wall-degrading trypsin, produced during infection by *Stagonospora nodorum*. *MPMI* 13, 538-550.
- Castano**, F., Hémerly-Tardin, M.C., Tourvieille de Labrouhe, D. & Vear, F. (1992): The inheritance and biochemistry of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* leaf infections in sunflower. *Euphytica* 58, 209-219.
- Castano**, F., Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (1993): Resistance of sunflower inbred lines to various forms of attack by *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* 68, 85-98.
- Castano**, F., Vear, F. & Tourvieille de Labrouhe, D. (2001): The genetics of resistance in sunflower capitula to *Sclerotinia sclerotiorum* and relations with some morphological characters. *Euphytica* 122, 373-380.
- Chiang**, P.K., Gordon, R.K., Tal, J., Zeng, G.C., Doctor, B.P., Pardhasaradhi, K. & McCann, P.P. (1996): S-adenosylmethionine and methylation. *FASEB J.* 10, 471-480.
- Choi**, G.H., Pawlyk, D.M., Rae, B., Shapira, R. & Nuss, D.L. (1993): Molecular analysis and overexpression of the gene encoding endothiapsin, an aspartic protease from *Cryphonectria parasitica*. *Gene* 125, 135-141.
- Cerboncini**, C., Binsfeld, P.C., Beine, G., Dresen, B., Peisker, H., Zerwas, A. & Schnabl, H. (2002): Sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in the natural *Helianthus* gene pool. *Helia* 25, 167-176.
- Cerboncini**, C. (2003): Charakterisierung von *Helianthus*-Wildarten im Freiland: Biometrische, histologische und biochemische Untersuchungen. Ph.D. Dissertation, Rheinische Friedrich – Wilhelms – Universität.

- Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B. & Low, P.S. (2000):** Oxalic acid, a pathogenicity factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, suppresses the oxidative burst of the host plant. *The Plant Cell* 12, 2191-2199.
- Clark, S.J., Templeton, M.D. & Sullivan, P.A. (1997):** A secreted aspartic proteinase from *Glomerella cingulata*: purification of the enzyme and molecular cloning of the cDNA. *Microbiology* 143, 1395-1403.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T. & Neill, S.J. (2000):** NO way back: Nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal* 24, 667-677.
- Clifford, M.N. (1999):** Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 362-372.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S. & Kuhnert, N. (2003):** Hierarchical scheme for LC-MS identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S. & Kuhnert, N. (2005):** Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3821-3832.
- Colmenares, M., Giménez, C., Oropeza, M. & De García, E. (2000):** Nonradioactive identification of differential display RT-PCR products. *Plant Molecular Biology Reporter* 18, 65a-65f.
- Cotton, P., Kasza, Z., Bruel, C., Rasclé, C. & Fèvre, M. (2003):** Ambient pH controls the expression of endopolygalacturonase genes in the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* 227, 163-169.
- Daayf, F., Ongena, M., Boulanger, R., El Hadrami, I. & Bélanger, R.R. (2000):** Induction of phenolic compounds in two cultivars of cucumber by treatment of healthy and powdery mildew-infected plants with extracts of *Reynoutria sachalinensis*. *Journal of Chemical Ecology* 26, 1579-1593.
- Darvishzadeh, R., Hewezi, T., Gentzbittel, L. & Sarrafi, A. (2008):** Differential expression of defence-related genes between compatible and partially compatible sunflower-*Phoma macdonaldii* interactions. *Crop Protection* 27, 740-746.
- Degener, J., Melchinger, A.E., Gumber, R.K. & Hahn, V. (1998):** Breeding for *Sclerotinia* resistance in sunflower: A modified screening test and assessment of genetic variation in current germplasm. *Plant Breeding* 117, 367-372.
- Delledonne, M., Polverari, A. & Murgia, I. (2003):** The functions of nitric oxide-mediated signaling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidants and Redox signaling* 5, 33-41.
- de Wit, P.J.G.M. (2007):** How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 2726-2732.

- Donaldson**, P.A., Anderson, T., Lane, B.G., Davidson, A.L. & Simmonds, D.H. (2001): Soybean plants expressing an active oligomeric oxalate oxidase from the wheat *gf-2.8* (germin) gene are resistant to the oxalate-secreting pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59, 297-307.
- Diaz**, J., ten Have, A. & van Kan, A.L. (2002): The role of ethylene and wound signaling in resistance of tomato to *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology* 129, 1341-1351.
- Dixon**, R.A. & Lamb, C.J. (1990): Molecular communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41, 339-367.
- Dixon**, R.A., Harrison, M.J. & Lamb, C.J. (1994): Early events in the activation of plant defense responses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 479-501.
- Dixon**, R.A. & Paiva, N.L. (1995): Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7, 1085-1097.
- Dixon**, R.A., Lamb, C.J., Masoud, S., Sewalt, V.J.H. & Paiva, N.L. (1996): Metabolic engineering: Prospects for crop improvement through the genetic manipulation of phenylpropanoid biosynthesis and defense responses – a review. *Gene* 179, 61-71.
- Dixon**, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S.S. & Wang, L. (2002): The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* 3, 371-390.
- Domany**, E. (2003): Cluster analysis of gene expression data. *Journal of Statistical Physics* 110, 1117-1139.
- Dong**, X. (1998): SA, JA, ethylene, and disease resistance in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 1, 316-323.
- Douglas**, C.J. (1996): Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. *Trends in Plant Science* 1, 171-178.
- Ebel**, J. & Scheel, D. (1997): Signals in host-parasite interactions. In: Carroll, G.C. and Tudzynski, P. (eds.), *The Mycota V, part A. Plant relationships*. Springer Berlin Heidelberg, p. 85-105.
- Ebel**, J. & Mithöfer, A. (1998): Early events in the elicitation of plant defence. *Planta* 206, 335-348.
- Eckenrode**, V.K., Arnold, J. & Meagher, R.B. (1985): Comparison of the nucleotide sequence of soybean 18S rRNA with the sequences of other small-subunit rRNAs. *J. Mol. Evol.* 21, 259-269.
- Ecker**, J.R. & Davis, R.W. (1987): Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 5202-5206.
- Ellers**, S. (2002): Veränderungen im Proteinmuster in der Gattung *Helianthus* nach Infektion mit *Sclerotinia sclerotiorum*. Diplomarbeit der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, p. 46-58.

- Expósito, J.M., Gordillo, C.M., Marino, J.I.M. & Iglesias, J.L.M. (1991):** Purification and characterization of a cysteine protease in *Vitis vinifera* L. grapes (Macabeo variety). *Die Nahrung* 35, 139-142.
- Falbel, T.G. & Staehelin, L.A. (1992):** Species-related differences in the electrophoretic behaviour of CP 29 and CP 26: An immunological analysis. *Photosynth. Res.* 34, 249-262.
- Faulds, C.B. & Williamson, G. (1999):** The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79, 393-395.
- Favaron, F., Alghisi, P., Marciano, P. & Magro, P. (1988):** Polygalacturonase isoenzymes and oxalic acid produced by *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean hypocotyls as elicitors of glyceollin. *Physiol. Mol. Pathol.* 33, 385-395.
- Favaron, F., Sella, L. & D'Ovidio, R. (2004):** Relationship among endo-polygalacturonase, oxalate, pH, and plant polygalacturonase-inhibiting protein (PGIP) in the interaction between *Sclerotinia sclerotiorum* and soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17, 1402-1409.
- Ferrari, S. Galletti, R., Denoux, C., De Lorenzo, G., Ausubel, F.M. & Dewdney, J. (2007):** Resistance to *Botrytis cinerea* induced in *Arabidopsis* by elicitors is independent of salicylic acid, ethylene, or jasmonate signaling but requires PHYTOALEXIN DEFICIENT3. *Plant Physiology* 144, 367-379.
- Fey, V., Wagner, R., Bräutigam, K. & Pfannschmidt, T. (2005):** Photosynthetic redox control of nuclear gene expression. *Journal of Experimental Botany* 56, 1491-1498.
- Fraissinet-Tachet, L., Reymond-Cotton, P. & Fèvre, M. (1995):** Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Current Genetics* 29, 96-99.
- Fritzemeier, K.-H., Cretin, C., Kombrink, E., Rohwer, F., Taylor, J., Scheel, D. & Hahlbrock, K. (1987):** Transient induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNA's in potato leaves infected with virulent or avirulent races of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology* 85, 34-41.
- Giordani, T., Natali, L. & Cavallini, A. (2003):** Analysis of a dehydrin encoding gene and its phylogenetic utility in *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* 107, 316-325.
- Giovanelli, J., Mudd, S.H. & Datko, A.H. (1985):** Quantitative analysis of pathways of methionine metabolism and their regulation in *Lemna*. *Plant Physiology* 78, 555-560.
- Glazebrook, J. (2005):** Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205-227.
- Godoy, G., Steadman, J.R., Dickman, M.B. & Dam, R. (1990):** Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol.Mol. Plant Pathol.* 37, 179-191.

- Goldschmidt-Clermont, M.** (1998): Coordination of nuclear and chloroplast gene expression in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 177, 115-180.
- Govrin, E.M. & Levine, A.** (2000): The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* 10, 751-757.
- Graf, D., Fisher, A.G. & Merckenschlager, M.** (1997): Rational primer design greatly improves differential display-PCR (DD-PCR). *Nucleic Acids Research* 25, 2239-2240.
- Grand, C., Sarni, F. & Lamb, C.J.** (1987): Rapid induction by fungal elicitor of the synthesis of cinnamyl-alcohol dehydrogenase, a specific enzyme of lignin synthesis. *Eur. J. Biochem.* 169, 73-77.
- Green, B.R. & Durnford, D.G.** (1996): The Chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 685-714.
- Gross, B.L., Schwarbach, A.E. & Rieseberg, L.H.** (2003): Origin(s) of the diploid hybrid species *Helianthus deserticola* (Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 90, 1708-1719.
- Grudkowska, M. & Zagdanska, B.** (2004): Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica* 51, 609-624.
- Guimaraes, R.L. & Stotz, H.U.** (2004): Oxalate production by *Sclerotinia sclerotiorum* deregulates guard cells during infection. *Plant Physiology* 136, 3703-3711.
- Guttmann, A., Shi, L., Khandurina, J. & Wang, X.** (2003): Differential gene expression analysis by micro-preparative capillary gel electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1014, 29-35.
- Habib, H. & Fazili, K.M.** (2007): Plant protease inhibitors: A defense strategy in plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2, 68-85.
- Hahlbrock, K. & Scheel, D.** (1989): Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Bio.* 40, 347-369.
- Hall, A.B., Blum, U. & Fites, R.C.** (1982): Stress modification of allelopathy of *Helianthus annuus* L. debris on seed germination. *Amer. J. Bot.* 69, 776-783.
- Hammerschmidt, R.** (1999): Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55, 77-84.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D.G.** (1996): Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell* 8, 1773-1791.
- Hanahan, D.** (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A.** (2000): Advances in flavonoid research. *Photochemistry* 55, 481-504.

- Hatsugai, N.,** Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M & Hara-Nishimura, I. (2004): A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305, 855-858.
- Hegedus, D.D. & Rimmer, S.R.** (2005): *Sclerotinia sclerotiorum*: When “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiology Letters* 251, 177-184.
- Heiser, C.B. Jr, Smith, D.M., Clevenger, S.B., & Martin, W.C.** (1969): The North American Sunflowers (*Helianthus*). *Memories of The Torrey Botanical Club (Memoir)*. Vol. 22. No. 2, New Heaven, Connecticut, USA.
- Hemery-Tardin, M.C.,** Tourvieille de Labrouhe, D., Jay, M., Ledoigt, G. & Vear, F. (1998): Effect of infection by *Sclerotinia* spp. on the phenolic metabolism of sunflower capitula and leaves. *Helia* 21, 19-32.
- Henn, H.J.,** Steiner, U., Wingender, R., & Schnabl, H. (1997): Wildtype sunflower clones: Source of resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary stem infection. *Angew. Bot.* 71, 5-9.
- Hoffmann, L.,** Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. & Legrand, M. (2003): Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *The journal of biological chemistry* 278, 95–103.
- Hu, X.,** Bidney, D.L., Yalpani, N., Duvick, J.P., Crasta, O., Folkerts, O. & Lu, G. (2003): Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology* 133, 170-181.
- Hutcheson, S.W.** (1998): Current concepts of active defense in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36, 59-90.
- Ito, T.,** Kito, K., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, H. & Sakaki, Y. (1994): Fluorescent differential display: Arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Letters* 351, 231-236.
- Izaguirre, M.M.,** Mazza, C.A., Svatos, A., Baldwin, I.T. & Ballaré, C.L. (2007): Solar ultraviolet-B radiation and insect herbivory trigger partially overlapping phenolic responses in *Nicotinia attenuata* and *Nicotinia longiflora*. *Annals of Botany* 99, 103-109.
- Jamaux, I.,** Gelie, B. & Lamarque, C. (1995): Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathology* 44, 22-30.
- Jan, C.C.** (1997): Cytology and interspecific hybridization. In: *Schneiter, A.A. (Ed.): Sunflower Technology and Production. Agronomy, Vol. 35, Madison, Wisconsin, ASA-CSSA-SSA of America, USA, p. 497 ff.*
- Keen, N.T.,** Partridge, J.E. & Zaki, A. (1972): Pathogen-produced elicitor of a chemical defense mechanism in soybean monogenetically resistant to *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Phytopathology* 62, 768.

- Kesarwani, M., Azam, M., Natarjan, K., Mehta, A. & Datta, A. (2000):** Oxalate decarboxylase from *Collybia velutipes*. The Journal of Biological Chemistry 275, 7230-7238.
- Kimura, M., Yoshizumi, T., Manabe, K., Yamamoto, Y.Y. & Matsui, M. (2001):** *Arabidopsis* transcriptional regulation by light stress via hydrogen peroxide-dependent and – independent pathways. Genes to cells 6, 607-617.
- Kishimoto, K., Matsui, K., Ozawa, R. & Takabayashi, J. (2006):** Components of C6-aldehyde-induced resistance in *Arabidopsis thaliana* against a necrotrophic fungal pathogen, *Botrytis cinerea*. Plant Science 170, 715-723.
- Kolkman, J.M. & Kelly, J.D. (2000):** An indirect test using oxalate to determine physiological resistance to white mold in common bean. Crop science 40, 281-285.
- Korthout, H.A.A.J., Berecki, G., Bruin, W., van Duijn, B. & Wang, M. (2000):** The presence and subcellular localization of caspase 3-like proteinases in plant cells. FEBS Letters 475, 139-144.
- Kress, W.J., Wurdack, K.J., Zimmer, E.A., Weigt, L.A., & Janzen, D.H. (2005):** Use of DNA barcodes to identify flowering plants. PNAS 102, 8369-8374.
- Kriegs. B., Theisen, R. & Schnabl, H. (2006):** Inositol 1,4,5-trisphosphate and Ran expression during simulated and real microgravity. Protoplasma 229, 163-174.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. & Beck, C.F. (1997):** Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 14168-14172.
- Kropat, J., Oster, U., Rudiger, W. & Beck, C.F. (2000):** Chloroplast signaling in the light induction of nuclear HSP70 genes requires the accumulation of chlorophyll precursors and their accessibility to cytoplasm/nucleus. Plant J. 24, 523-531.
- Kojima, M. & Kondo, T. (1985):** An enzyme in sweet potato root which catalyzes the conversion of chlorogenic acid, 3-caffeoylquinic acid, to isochlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid. Agric. Biol. Chem. 49, 2467-2469.
- Kuhn, D.N., Chappell, J., Boudet, A. & Hahlbrock, K. (1984):** Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate:CoA ligase mRNA's in cultured plant cells by UV light of fungal elicitor. PNAS 81, 1102-1106.
- Kunkel, B.N. & Brooks, D.M. (2002):** Cross talk between signalling pathways in pathogen defense. Current Opinion in Plant Biology 5, 325-331.
- Langridge, P., Patltridge, N., & Fincher, G. (2006):** Functional genomics of abiotic stress tolerance in cereals. Briefings in Functional Genomics and Proteomics 4, 343-354.
- Lamb, C. & Dixon, R.A. (1997):** The oxidative burst in plant disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 48, 251-275.

- Legrand, M., Kauffman, S., Geoffroy, P. & Frittig, B. (1987):** Biological function of pathogenesis-related proteins: Four tobacco pathogenesis-related proteins are chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 6750-6754.
- Lepelley, M., Cheminade, G., Tremillon, N., Simkin, A., Caillet, V. & McCarthy, J. (2007):** Chlorogenic acid synthesis in coffee: An analysis of CGA content and real-time RT-PCR expression of HCT, HQT, C3H1, and CCoAOMT1 genes during grain development in *C. canephora*. *Plant Science* 172, 978-996.
- Lexer, C., Lai, Z., & Rieseberg, L.H. (2003):** Candidate gene polymorphisms associated with salt tolerance in wild sunflower hybrids: Implications for the origin of *Helianthus paradoxus*, a diploid hybrid species. *New Phytologist* 161, 225-233.
- Liang, P. & Pardee, A.B. (1992):** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257, 967-971.
- Liang, P., Averboukh, L. & Pardee, B. (1993):** Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. *Nucleic Acids Research* 21, 3269-3275.
- Li, F., Barnathan, E.S. & Kariko, K. (1994):** Rapid method for screening and cloning cDNA's generated in differential mRNA display: application of Northern blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Research* 22, 1764-1765.
- Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A.G., Séguin-Swartz, G. & Hegedus, D.D. (2004):** Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with *Brassica napus*: cloning and characterization of endo- and exo-polygalacturonases expressed during saprophytic and parasitic modes. *Fungal Genetics and Biology* 41, 754-765.
- Li, C., Bai, Y., Jacobsen, E., Visser, R., Lindhout, P. & Bonnema, G. (2006):** Tomato defense to the powdery mildew fungus: Differences in expression of genes in susceptible, monogenic- and polygenic resistance responses are mainly in timing. *Plant Mol Biol* 62, 127-140.
- Lievens, S., Goormachtig, S. & Holsters, M. (2001):** A critical evaluation of differential display as a tool to identify genes involved in legume nodulation: Looking back and looking forward. *Nucleic Acids Research* 29, 3459-3468.
- Lindahl, M., Yang, D.H. & Andersson, B. (1995):** Regulatory proteolysis of the major light-harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II by a light-induced membrane-associated enzymatic system. *Eur. J. Biochem.* 231, 503-509.
- Lindahl, M., Spetea, C., Hundal, T., Oppenheim, A.B., Adam, Z. & Andersson, B. (2000):** The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. *Plant Cell* 12, 419-431.
- Liu, R., Zhao, J., Xiao, Y. & Meng, J. (2005):** Identification of prior candidate genes for *Sclerotinia* local resistance in *Brassica napus* using *Arabidopsis* cDNA microarray and *Brassica-Arabidopsis* comparative mapping. *Science in China Ser. C Life Sciences* 48, 460-470.

- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001):** Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lu, H. & Higgins, V.J. (1999):** The effect of hydrogen peroxide on the viability of tomato cells and of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 54, 131-143.
- Luehrsen, K.R., Marr, L.L., van der Knaap, E. & Cumberledge, S. (1997):** Analysis of differential display RT-PCR products using fluorescent primers and GENESCANTM Software. *BioTechniques* 22, 168-174.
- Lumsden, R.D. & Dow, R.L. (1973):** Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* infection of bean. *Phytopathology* 63, 708-715.
- Lumsden, R.D. (1979):** Histology and physiology of pathogenesis in plant diseases caused by *Sclerotinia* species. *Phytopathology* 69, 891-895.
- Maher, E.A., Bate, N.J., Ni, W., Elkind, Y., Dixon, R. & Lamb, C.J. (1994):** Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7802-7806.
- Martel, M.-B., Létoublon, R. & Fèvre, M. (1998):** Purification and characterization of two endopolygalacturonases secreted during the early stages of the saprophytic growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. *FEMS Microbiology Letters* 158, 133-138.
- Masirevic, S. & Gulya, T.J. (1992):** *Sclerotinia* and *Phomopsis* – two devastating sunflower pathogens. *Field Crops Research* 30, 271-300.
- Matz, M., Usman, N., Shagin, D., Bogdanova, E. & Lukyanov, S. (1997):** Ordered differential display: A simple method for systematic comparison of gene expression profiles. *Nucleic Acids Research* 12, 2541-2542.
- Mayer, A.M. & Harel, E. (1979):** Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* 18, 193-215.
- Mayer, A.M., Staples, R.C. & Gil-ad, N.L. (2001):** Mechanisms of survival of necrotrophic fungal plant pathogens in hosts expressing the hypersensitive response. *Phytochemistry* 58, 33-41.
- Mazeyrat, F., Mouzeyar, S., Nicolas, P., Tourvieille de Labrouhe, D. & Ledoigt, G. (1998):** Cloning, sequence and characterization of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) pathogen-induced gene showing sequence homology with auxin-induced genes from plants. *Plant Mol. Biol.* 38, 899-903.
- Mazeyrat, F., Mouzeyar, S., Courbou, I., Badaoui, S., Roedel-Drevet, P., Tourvieille de Labrouhe, D. & Ledoigt, G. (1999):** Accumulation of defense related transcripts in sunflower hypocotyls (*Helianthus annuus* L.) infected with *Plasmopara halstedii*. *European Journal of Plant Pathology* 105, 333-340.
- Mazza, C.A., Bocalandro, H.E., Giordano, C.V., Battista, D., Scopel, A.L. & Ballaré, C.L. (2000):** Functional significance and induction by solar radiation of ultraviolet-absorbing sunscreens in field-grown soybean crops. *Plant Physiology* 122, 117-126.

- McDowell, J.M. & Dangl, J.L. (2000):** Signal transduction in the plant response. *TIBS* 25, 79-82.
- Mestries, E., Gentzbittel, L., Tourvieille de Labrouhe, D., Nicolas, P. & Vear, F. (1998):** Analyses of quantitative trait loci associated with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) using molecular markers. *Mol. Breed.* 4, 215-226.
- Micic, Z., Hahn, V., Bauer, E., Melchinger, A.E., Knapp, S.J., Tang, S. & Schön, C.C. (2005):** Identification and validation of QTL for *Sclerotinia* midstalk rot resistance in sunflower by selective genotyping. *Theor. Appl. Genet.* 111, 233-242.
- Miele, G., MacRae, L., McBride, D., Manson, J. & Clinton, M. (1998):** Elimination of false positives generated through PCR re-amplification of differential display cDNA. *BioTechniques* 25, 138-144.
- Miljanovic, T., Boza, P., Atlagic, J., & Skoric, D. (2000):** Morphological variability of *H. giganteus* L. and *H. maximiliani* Sch. Populations. *Helia* 23, 45-52.
- Milofsky, R.E. & Yeung, E.S. (1993):** Native fluorescence detection of nucleic acids and DNA restriction fragments in capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 65, 153-157.
- Mittler, R. (2002):** Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7, 405-410.
- Moffatt, B.A. & Weretilnyk, E.A. (2001):** Sustaining S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases activity in plant cells. *Physiol. Plantarum* 113, 435-442.
- Moglia, A., Lanteri, S, Comino, C., Acquadro, A., De Vos, R & Beekwilder, J. (2008):** Stress-induced biosynthesis of dicaffeoylquinic acids in globe artichoke. *J. Agric. Food Chem.* Open access
- Mohan, S., Ma, P.W.K., Williams, W.P. & Luthe, D.S. (2008):** A naturally occurring plant cysteine protease possesses remarkable toxicity against insect pests and synergizes *Bacillus thuringiensis* toxin. *Plos One* 3, e1786.
- Movahedi, S. & Heale, J.B. (1990):** Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36, 289-302.
- Molloy, C., Cheah, L.-H. & Koolaard, J.P. (2004):** Induced resistance against *Sclerotinia sclerotiorum* in carrots treated with enzymatically hydrolysed chitosan. *Postharvest Biology and Technology* 33, 61-65.
- Mondolot, L., La Fisca, P., Buatois, B., Talansier, E., De Kochko, A. & Campa, C. (2006):** Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. *Ann. Bot. (Lond.)* 98, 33-40.
- Mösli-Waldhauser, S.S. & Baumann, T.W. (1996):** Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry* 42, 985-996.

- Munoz, J., Garcia-Molina, F., Varon, R., Rodriguez-Lopez, J.N., García-Ruiz, P.A., García-Cánovas, F. & Tudela, J. (2007):** Kinetic characterization of the oxidation of chlorogenic acid by polyphenol oxidase and peroxidase. Characteristics of the o-quinone. *J. Agric. Food Chem.* 55, 920-928.
- Mullineaux, P., Ball, L., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. & Karpinska, S. (2000):** Are diverse signalling pathways integrated in the regulation of *Arabidopsis* antioxidant defence gene expression in response to excess excitation energy? *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 355, 1531-1540.
- Müntz, K., Belozersky, M.A., Dunaevsky, Y.E., Schlereth, A. & Tiedemann, J. (2001):** Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany* 52, 1741-1752.
- Murata, M., Sugiura, M., Sonokawa, Y., Shimamura, T. & Homma, S. (2002):** Properties of chlorogenic acid quinone: Relationship between browning and the formation of hydrogen peroxide from a quinone solution. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 2525-2530.
- Nadon, R. & Shoemaker, J. (2002):** Statistical issues with microarrays: Processing and analysis. *Trends in Genetics* 18, 265-271.
- Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Ishida, J., Nakashima, M., Kamiyo, A., Enju, A., Sakurai, T., Satoh, M., Kobayashi, M., Tosa, Y., Park, P. & Shinozaki, K. (2003):** The cDNA microarray analysis using an *Arabidopsis pad3* mutant reveals the expression profiles and classification of genes induced by *Alternaria brassicicola* attack. *Plant and Cell Physiology* 44, 377-387.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992):** Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 369-389.
- Niggeweg, R., Michael, A.J. & Martin, C. (2004):** Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22, 746-754.
- Nishizawa, Y. & Hibi, T. (1991):** Rice chitinase gene: cDNA cloning and stress-induced expression. *Plant Science* 76, 211-218.
- Niyogi, K.K. (1999):** Photoprotection revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50, 333-359.
- Noctor, G. & Foyer, C.H. (1998):** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *A. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 249-279.
- Nott, A., Jung, H.-S., Koussevitzky, S. & Chory, J. (2006):** Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 739-759.
- Noyes, R.D. & Hancock, J.G. (1981):** Role of oxalic acid in the *Sclerotinia* wilt of sunflower. *Physiol. Plant Pathol.* 18, 123-132.
- Oelmüller, R., Levitan, I., Bergfeld, R., Rajasekhar, V.K. & Mohr, H. (1986a):** Expression of nuclear genes as affected by treatments acting on the plastids. *Planta* 168, 482-492.

- Oelmüller**, R. & Mohr, H. (1986b): Photooxidative destruction of chloroplast and its consequences for expression of nuclear genes. *Planta* 167, 106-113.
- Olivieri**, F., Zanetti, M.E., Oliva, C.R., Covarrubias, A.A. & Casalongué, C.A. (2002): Characterization of an extracellular serine protease of *Fusarium eumartii* and its action on pathogenesis related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 108, 63-72.
- Otto**, H.-H. & Schirmeister, T. (1997): Cysteine proteases and their inhibitors. *Chem. Rev.* 97, 133-172.
- Pedrosa**, M.M., Muzquiz, M., Garcia-Vallejo, C., Burbona, C., Cuadrado, C., Ayet, G. & Robredo, L.M. (2000): Determination of caffeic and chlorogenic acids and their derivatives in different sunflower seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 459-464.
- Pena**, L.B., Pasquini, L.A., Tomaro, M.L. & Gallego, S.M. (2006a): Proteolytic system in sunflower (*Helianthus annuus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Science* 171, 531-537.
- Pena**, L.B., Tomaro, M.L. & Gallego, S.M. (2006b): Effect of different metals on protease activity in sunflower cotyledons. *Electronic Journal of Biotechnology* 9, 258-262.
- Pfannschmidt**, T., Nilsson, A. & Allen, F. (1999): Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* 397, 625-628.
- Pfannschmidt**, T. (2003): Chloroplast redox signals: How photosynthesis controls its own genes. *Trends in Plant Science* 8, 33-41.
- Pierpoint**, W.S. (1966): The enzymatic oxidation of chlorogenic acid and some reactions of the quinone produced. *Biochem. J.* 98, 567-580.
- Piszczek**, E. & Gutman, W. (2007): Caspase-like proteases and their role in programmed cell death in plants. *Acta Physiol Plant* 29, 391-398.
- Poussereau**, N., Gente, S., Rasclé, C., Billon-Grand, G. & Fèvre, M. (2001): aspS encoding an unusual aspartyl protease from *Sclerotinia sclerotiorum* is expressed during phytopathogenesis. *FEMS Microbiology Letters* 194, 27-32.
- Prats**, E., Bazzalo, M.E., León, A. & Jorrín, J.V. (2003): Accumulation of soluble compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia*. *Euphytica* 132, 321-329.
- Prats**, E., Bazzalo, M.E., León, A. & Jorrín, J.V. (2006): Fungitoxic effect of scopolin and related coumarins on *Sclerotinia sclerotiorum*. A way to overcome sunflower head rot. *Euphytica* 147, 451-460.
- Prats**, E., Galindo, J.C., Bazzalo, M.E., León, A., Macías, F.A., Rubiales, D. & Jorrín, J.V. (2007): Antifungal activity of a new phenolic compound from capitulum of a head rot-resistant sunflower genotype. *J. Chem. Ecol.* 33, 2245-2253.
- Prell**, H.P. & Day, P. (2001): Plant fungal pathogen interaction: A classical and molecular view. Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York.

- Prigent**, S.V.E., Voragen, A.G.J., Li, F., Visser, A.J.W.G., van Koningsveld, G.A. & Gruppen, H. (2008): Covalent interactions between amino acid side chains and oxidation products of caffeoylquinic acid (chlorogenic acid). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88, 1748-1754.
- Proite**, K., Leal-Bertioli, S.C.M., Bertioli, D.J., Moretzsohn, M.C., da Silva, F.R., Martins, N.F., & Guimaraes, P.M. (2007): ESTs from a wild *Arachis* species for gene discovery and marker development. *BMC Plant Biology* 7, 1-10.
- Purdy**, L.H. (1979): *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathology* 69, 875-880.
- Reignault**, Ph., Valette-Collet, O. & Boccara, M. (2008): The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology* 120, 1-11.
- Reimonte**, G. & Castano, F. (2008): Susceptibility of sunflower (*Helianthus annuus*) hybrids to mid stem rot and broken stem caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. *Cien. Inv. Agr.* 35, 21-28.
- Reinheckel**, T. Noack, H., Lorenz, S., Wiswedel, I. & Augustin, W. (1998): Comparison of protein oxidation and aldehyde formation during oxidative stress in isolated mitochondria. *Free Rad. Res.* 29, 297-305.
- Rice-Evans**, C.A., Miller, N.J. & Paganga, G. (1997): Antioxidants effect of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2, 152-159.
- Riou**, C., Freyssinet, G. & Fèvre, M. (1991): Production of cell wall-degrading enzymes by the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1478-1484.
- Robinson**, H. (1979): Studies in the *Heliantheae* (Asteraceae). XVIII. A new genus *Helianthopsis*. *Phytologia* 44, 257-259.
- Robinson**, C., Woolhead, C. & Edwards, W. (2000): Transport of proteins into and across the thylakoid membrane. *J. Exp. Bot.* 51, 369-374.
- Rober**, K.C. (1989): Investigation on the synthesis of polyphenols and phytoalexins in rot infected potato-tubers. *Biochem. Physiol. Pflanzen* 184, 277-284.
- Rodriguez**, M.A., Venedikian, N., Bazzalo, M.E. & Godeas, A. (2004): Histopathology of *Sclerotinia sclerotiorum* attack on flower parts of *Helianthus annuus* heads in tolerant and susceptible varieties. *Mycopathologia* 157, 291-302.
- Roland**, O. & Jones, D.G. (2001): Unraveling regulatory networks in plant defense using microarrays. *Genome Biology* 2, 1001.1-1001.3.
- Romani**, A., Pinelli, P., Galardi, C., Sani, Cimato, A. & Heimler, D. (2002): Polyphenols in greenhouse and open-air-grown lettuce. *Food Chemistry* 79, 337-342.

- Rönicke, S., Hahn, V., Horn, R., Gröne, I., Brahm, L., Schnabl, H. & Friedt, W. (2004):** Interspecific hybrids of sunflower as a source of *Sclerotinia* resistance. *Plant Breeding* 123, 152-157.
- Rooney, H.C.E., van't Klooster, J.W., van der Hoorn, R.A.L., Joosten, M.H.A.J., Jones, J.D.G. & de Wit, P.J.G.M. (2005):** *Cladosporium Avr2* inhibits tomato *Rcr3* protease required for *Cf-2*-dependent disease resistance. *Science* 308, 1783-1786.
- Rozen, S. & Skaletsky, H.J. (2000):** Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds.) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365-386.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A, Steiner, H.Y. & Hunt, M.D. (1996):** Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8, 1809-1819.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Saftic-Pankovic, D., Atlagic, J., Miljanovic, T. & Radovanovic, N. (2005):** Morphological and molecular variability of *Helianthus giganteus* L. and *Helianthus maximiliani* Sch. species. *Genetica* 37, 121-130.
- Sambatti, J.B.M., & Rice, K.J. (2006):** Local adaptation, patterns of selection, and gene flow in the Californian serpentine sunflower (*Helianthus exilis*). *Evolution* 60, 696-710.
- Sedun, F.S. & Brown, J.F. (1987):** Comparison of three methods to assess resistance in sunflower to basal stem rot caused by *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *Plant Disease* 73, 52-55.
- Scheel, D. & Parker, J.E. (1990):** Elicitor recognition and signal transduction in plant defense gene activation. *Z. Naturforschung* 45c, 569-575.
- Schenk, P.M, Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S. & Manners, J.M. (2000):** Coordinated plant defence responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11655-11660.
- Schilling, E.E., & Heiser, C.B. (1981):** Infrageneric classification of *Helianthus* (Asteraceae). *Taxon* 30, 393-403.
- Schilling, E.E., & Mabry, T.J. (1981):** Flavonoids of *Helianthus* series *Corona-Solis*. *Biochemical Systematics and Ecology* 9, 161-163.
- Schilling, E.E., Linder, C.R., Noyes, R.D., & Rieseberg, L.H. (1998).** Phylogenetic relationships in *Helianthus* (Asteraceae) based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer region sequence data. *Systematic Botany* 23, 177-187.
- Schilling, E.E. (2001):** Phylogeny of *Helianthus* and related genera. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* 8, 22-25.

- Schnabl**, H., Binsfeld, P.C., Cerboncini, C., Dresen, B. & Peisker, H. (2002): Biotechnological methods applied to produce *Sclerotinia sclerotiorum* resistant sunflower. *Helia* 25, 191-200.
- Schouten**, J.P., McElgunn, C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. & Pals, G. (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research* 30, 12 e57.
- Schröder**, G., Eichel, J., Breinig, S. & Schröder, J. (1997): Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetases from *Catharanthus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Mol. Biol.* 33, 211-222.
- Schuster**, W.H. (1993): Die Züchtung der Sonnenblume (*Helianthus annuus* L.). Fortschritte der Pflanzenzüchtung, Heft 14. Paul Parey Verlag, Berlin – Hamburg.
- Seiler**, G.J., (1992): Utilization of wild sunflower species for the improvement of cultivated sunflower. *Field Crop Research* 30, 195-230.
- Seiler**, G.J. & Rieseberg, L.H. (1997): Systematics, origin, and germplasm resources of the wild and domesticated sunflower. In: Schneiter, A.A. (ed.): *Sunflower Technology and Production*. Agronomy, Nr. 35, Madison, Wisconsin, USA, 21-65.
- Sheokand**, S., Dahiya, P., Vincent, J.L. & Brewin, N.J. (2005): Modified expression of cysteine protease affects seed germination, vegetative growth and nodule development in transgenic lines of *Medicago truncatula*. *Plant Science* 169, 966-975.
- Shutov**, A.D. & Vaintraub, J.A. (1987): Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry* 26, 1557-1566.
- Singh**, K.B., Ocampo, B., & Robertson, L.D. (1998): Diversity of abiotic and biotic stress resistance in the wild annual *Cicer* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* 45, 9-17.
- Singleton**, V.L. & Rossi, J.A. (1965): Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* 16, 144-58.
- Skoric**, D. (1987): FAO subnetwork report 1984-1986. In: Genetic evaluation and use of *Helianthus* wild species and their use in breeding programs. FAO, Rome, Italy.
- Skoric**, D. (1993): Wild species use in sunflower breeding – results and future directions. *Plant Genetic Resource Letters* 93, 17-23.
- Solomon**, M., Belenghi, B., Delledonne, M., Menachem, E. & Levine, A. (1999): The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *The Plant Cell* 11, 431-443.
- Soltani**, B., Ehlting, J., Hamberger, B. & Douglas, C. (2006): Multiple cis-regulatory elements regulate distinct and complex patterns of developmental and wound-induced expression of *Arabidopsis thaliana* 4CL gene family members. *Planta* 23, 1239-1240.

- Somssich, I.E. & Hahlbrock, K. (1998):** Pathogen defence in plants – a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 3, 86-90.
- Sondheimer, E. (1964):** Chlorogenic acid and related depsides. *Bot. Rev.* 30, 667-712.
- Sossey-Alaoui, K., Serieys, H., Tersac, M., Lambert, P., Schilling, E., Griveau, Y., Kaan, F., & Bervillé, A. (1998):** Evidence for several genomes in *Helianthus*. *Theor. Appl. Genet.* 97, 422-430.
- Spring, O., & Schilling, E.E. (1990):** The sesquiterpene lactone chemistry of *Helianthus* Sect. *Ciliares* (Asteraceae: Heliantheae). *Biochemical Systematics and Ecology* 18, 139-143.
- Staples, R. & Mayer, A. (1995):** Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbio. Lett.* 134, 1-7.
- Stein, J. & Liang, P. (2002):** Differential display technology: A general guide. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1235-1240.
- Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J.R. & Chory, J. (2003):** Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. *Nature* 421, 79-83.
- Stöckigt, J. & Zenk, M.H. (1974):** Enzymatic synthesis of chlorogenic acid from caffeoyl coenzyme A and quinic acid. *FEBS Letters* 42, 131-134.
- Sukno, S., Ruso, J., Jan, C.C., Melero-Vara, J.M. & Fernández-Martínez, J.M. (1999):** Interspecific hybridization between sunflower and wild perennial *Helianthus* species via embryo rescue. *Euphytica* 106, 69-78.
- Swordlow, H. & Gesteland, R. (1990):** Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research* 18, 1415-1419.
- Tabor, C.W. & Tabor, H. (1984):** Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749-790.
- Takahama, U. & Oniki, T. (1997):** A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiologia Plantarum* 101, 845-852.
- Takahama, U., (1998):** Ascorbic acid-dependent regulation of redox levels of chlorogenic acid and its isomers in the apoplast of leaves of *Nicotinia tabacum* L. *Plant Cell Physiology* 39, 681-689.
- Takayuki, S. & van der Hoorn, R.A.L. (2008):** Papain-like cysteine proteases: key players at molecular battlefields employed by both plants and their invaders. *Mol. Plant Pathol.* 9, 119-125.
- Tal, B. & Robeson, D.J. (1986):** The induction, by fungal inoculation, of ayapin and scopoletin biosynthesis in *Helianthus annuus*. *Phytochemistry* 25, 77-79.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007):** MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24, 1596-1599.

- Tang, S. & Knapp, S.J.** (2003): Microsatellites uncover extraordinary diversity in Native American land races and wild populations of cultivated sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 106, 990-1003.
- Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G. & Katagiri, F.** (2003): Quantitative nature of *Arabidopsis* responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15, 317-330.
- Tariq, V.N. & Jeffries, P.** (1985): Changes occurring in chloroplasts of *Phaseolus* following infection by *Sclerotinia*: A cytochemical study. *J. Cell Sci.* 75, 195-205.
- Taylor, W.C.** (1989): Regulatory interactions between nuclear and plastid genomes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 211-233.
- Tenhaken, R., Levine, A., Brisson, L.F., Dixon, R.A. & Lamb, C.** (1995): Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4158-4163.
- Terras, F.R.G., Eggermont, K., Kovaleva, V., Raikhel, N.V., Osborn, R.W., Kester, A., Rees, S.B., Torrekens, S. Van Leuven, F., Vanderleyden, Cammue, B.P.A. & Broekaert, W.F.** (1995): Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: Their role in host defense. *The Plant Cell* 7, 573-588.
- Thomas, C., Meyer, D., Wolff, M., Himber, C., Alioua, M. & Steinmetz, A.** (2003): Molecular characterization and spatial expression of the sunflower ABP1 gene. *Plant Mol. Biol.* 52, 1025-1036.
- Thompson, C., Dunwell, J.M., Johnstone, C.E., Lay, V., Ray, J., Schmitt, M., Watson, H. & Nisbet, G.** (1995): Degradation of oxalic acid by transgenic oilseed rape plants expressing oxalate oxidase. *Euphytica* 85, 169-172.
- Timme, R.E., Beryl, Simpson, B.B. & Linder, C.R.** (2007): High-resolution phylogeny for *Helianthus* (Asteraceae) using the 18S-26S ribosomal DNA external transcribed spacer. *American Journal of Botany* 94, 1837-1852.
- Toal, E.S. & Jones, P.W.** (1999): Induction of systemic resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* by oxalic acid in oilseed rape. *Plant Pathol.* 48, 759-767.
- Tores, J.A. & Moreno, R.** (1987): Lesion development factors following inoculation of *Sclerotinia sclerotiorum* mycelium to eggplant, tomato and french bean. *Phytoparasitica* 15, 325-333.
- Tourvieille de Labrouhe, D., Mondolot-Cosson, L., Walser, P., Andary, C. & Serieys, H.** (1997): Relation entre teneurs en dérivés caffeoylquiniques des feuilles et la résistance de *Helianthus* spp. a *Sclerotinia sclerotiorum*. *Helia* 20, 39-50.
- Truesdell, G.M. & Dickman, M.B.** (1997): Isolation of pathogen/stress-inducible cDNA's from alfalfa by mRNA differential display. *Plant Mol. Biol.* 33, 737-743.

- Tseng, T.C. & Mount, M.S. (1974):** Toxicity of endopolygalacturonate transeliminase, phosphatidase and protease to potato and cucumber tissue. *Phytopathology* 64, 229-236.
- Urdangarin, C., Regente, M.C., Jorin, J. & De La Canal, L. (1999):** Sunflower coumarin phytoalexins inhibit the growth of the virulent pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Phytopathology* 147, 441-443.
- USDA/NSF Microbial Genome Sequencing Program:**
http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/sclerotinia_sclerotiorum.2/Home.html
- van Baarlen, P., Woltering, E.J., Staats, M. & van Kan, J.A.L. (2007):** Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Mol. Plant Pathol.* 8, 41-54.
- van der Biezen, E.A., Juwana, H., Parker, J.E. & Jones, J.D.G. (2000):** cDNA-AFLP display for the isolation of *Peronospora parasitica* genes expressed during infection in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 13, 895-898.
- van der Hoorn, R.A.L. & Jones, J.D.G. (2004):** The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 400-407.
- van der Hoorn, R.A.L., Leeuwenburgh, M.A., Bogyo, M., Joosten, M.H.A.J. & Peck, S.C. (2004):** Activity profiling of papain-like cysteine proteases in plants. *Plant Physiology* 135, 1170-1178.
- Vear, F. & Tourvieille, D. (1988):** Heredity of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower. II. Study of capitulum resistance to natural and artificial ascospores infections. *Agronomie* 8, 503-508.
- Venkatesh, B., Hettwer, U., Koopmann, B. & Karlovsky, P. (2005):** Conversion of cDNA differential display results (DDRT-PCR) into quantitative transcription profiles. *BMC Genomics* 6, 51.
- Vermerris, W. & Nicholson, R. (2006):** The role of phenols in plant defense. In: *Phenolic Compound Chemistry*, p. 211 ff., Springer Netherlands.
- Vidhyasekaran, P. (1997):** Pathogen recognizes host, host recognizes pathogen. In: Vidhyasekaran, P. (ed.): *Fungal pathogenesis in plants and crops. Molecular biology and host defense mechanisms: Part I, Molecular events during early recognition process.* Marcel Dekker Inc., New York, USA, p. 11-22.
- Villegas, R.J.A. & Kojima, M. (1986):** Purification and characterisation of hydroxycinnamoyl D-glucose quinase hydroxycinnamoyl transferase in the root of sweet potato, *Ipoemoea batatas* LAM. *J. Biol. Chem.* 261, 8729-8733.
- Vincent, J.R. & Nicholson, R.L. (1987):** Evidence for isoenzymes of 4-hydroxycinnamic acid:CoA ligase in maize mesocotyls and their response to infection by *Helminthosporium maydis* race 0. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30, 121-129.

- Vischi, M., Arzenton, F., De Paoli, E., Paselli, S., Tomat, E. & Olivieri, A.M. (2006):** Identification of wild species of sunflower by a specific plastid DNA sequence. *Helia* 29, 11-18.
- von Röpenack, E., Parr, A. & Schulze-Lefert, P. (1998):** Structural analyses and dynamics of soluble and cell wall-bound phenolics in a broad spectrum resistance to the powdery mildew fungus in barley. *The Journal of Biological Chemistry* 273, 9013-9022.
- von Tiedemann, A., Hedke, K. & Mögling, R. (2001):** Abbauverhalten von Sklerotien der Weißstängeligkeit bei Einsatz von Contans. *Raps* 1/2001, 1-3.
- Vranová, E., Inzé, D. & Van Breusegem, F. (2002):** Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* 53, 1227-1236.
- Waksman, G., Keon, J.P. & Turner, G. (1991):** Purification and characterization of two endopolygalacturonases from *Sclerotinia sclerotiorum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1073, 43-48.
- Walz, A., Zingen-Sell, I., Theisen, S. & Kortekamp (2008):** Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Plant Pathol.* 120, 317-330.
- Welch, M.E & L.H. Rieseberg (2002):** Patterns of genetic variation suggest a single, ancient origin for the diploid hybrid species *Helianthus paradoxus*. *Evolution* 56, 2126–2137.
- White, T.J., Bruns, T. Lee, S. & Taylor, J. (1990):** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Shinsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 315-322, Academic Press, San Diego.
- Williams, S.J., Schwer, C., Krishnarao, A.S.M., Heid, C., Karger, B.L. & Williams, P.M. (1996):** Quantitative competitive polymerase chain reaction: Analysis of amplified products of the HIV-1 gag gene by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical Biochemistry* 236, 146-152.
- Wink, M. (1997):** Compartmentation of secondary metabolites and xenobiotics in plant vacuoles. *Advances in Botanical Research* 25, 141-169.
- Wojtaszek, P. (1997):** Oxidative burst: An early plant response to pathogen infection. *Biochem. J.* 322, 681-692.
- Woltering, E.J., van der Bent, A. & Hoerberichts, F.A. (2002):** Do plant caspases exist? *Plant Physiology* 130, 1764-1769.
- Woltering, E.J. (2004):** Death proteases come alive. *Trends in Plant Science* 9, 469-472.
- Xia, Y., Suzuki, H., Borevitz, J., Blount, J., Guo, Z., Patel, K., Dixon, R.A. & Lamb, C. (2004):** An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *The EMBO Journal* 23, 980-988.

- Yamazaki, M & Saito, K.** (2002): Differential display analysis of gene expression in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 59, 1246-1255.
- Yang, S.F. & Hoffman, N.E.** (1984): Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 35, 155-189.
- Yang, Y., Shah, J. & Klessig, D.F.** (1997): Signal perception and transduction in plant defense responses. *Genes and Development* 11, 1621-1639.
- Yang, B., Srivastava, S., Deyholos, M.K. & Kav, N.N.V.** (2007): Transcriptional profiling of canola (*Brassica napus* L.) responses to the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science* 173, 156-171.
- Ye, Z.-H.** (1997): Association of caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase expression with lignifying tissues in several dicot plants. *Plant Physiology* 115, 1341-1350.
- Zhao, S., Ooi, S.L. & Pardee, A.B.** (1994): New primer strategy improves precision of differential display. *Biotechniques* 18, 842-850.
- Zhao, X. & George, K.S.** (2001): Differential display analysis by capillary electrophoresis. In: Mitchelson, K.R. and Cheng, J. (eds.): *Methods in Molecular Biology 163: Capillary Electrophoresis of Nucleic Acids Vol. 2.* Humana Press, Totowa, NJ, pp.259-267.
- Zhao, J., Wang, J., An, L., Doerge, R.W., Chen, Z.J., Grau, C.R., Meng, J. & Osborn, T.C.** (2007): Analysis of gene expression profiles in response to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. *Planta* 227, 13-24.
- Ziman, L., Jedryczka, M. & Srobarova, A.** (1998): Relationship between morphological and biochemical characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates and their aggressivity. *Z. Pflanzenkrankheiten Pflanzenschutz* 105, 283-288.

7. ANHANG

I. cDNA-Sequenzen

B01_248

TTAGCTCACTCATTAGGGTTTCGCTCCAAGCGTTTCCGCATAAAGGGTGATGATGCGATCGTGG
 GAAATTTGTAAGAATGACAAAAAGGGATACGGATGACTTGGACAAAAATATTGGGAATGAATG
 GATCTGATCAACCACACGTTTGAATTTCTGCGAGCGGAATTCTGCAAGCTATGATATTCAATG
 ACTTATCAAAAATTGAACGCATACAAACGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

XM_001595043 *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 aspartate protease (SS1G_03181)
 partial mRNA.

Score = 52.8 bits (28), Expect = 6e-04
 Identities = 28/28 (100%), Gaps = 0/28 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```
Query 16      GGGTTTCGCTCCAAGCGTTTCCGCATAA 43
          |||
Sbjct 1182   GGGTTTCGCTCCAAGCGTTTCCGCATAA 1209
```

B01_253

TTAGCTCACTCATTANGGTTTCGCTCCATGCCGTCAATTTTTCTTGGCTTATAAGTCTTTGTGC
 CCTAGTGCCTGGGTTGAGAGATGGGATGATCAACGTGATAATGGAACATTCCCAGCTCGTTTGG
 ATCAATAGGAAATTTGAGGATTATAGAANGTTAGCATGGTGGGGTAGAGCACAAGACGTTTACA
 ATGGATGTGTATCATACAAAGTCATNATGAGAATTGATGAGCGACGTCTCGGCTTAAAAAAAAA
 AAAAA

XM_001588892 *Sclerotinia sclerotiorum* 1980 hypothetical protein
 (SS1G_10490) partial mRNA.

Score = 219 bits (118), Expect = 6e-54
 Identities = 118/118 (100%), Gaps = 0/118 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```
Query 19      TTTCGCTCCATGCCGTCAATTTTTCTTGGCTTATAAGTCTTTGTGCCCTAGTGCCTGGGT 78
          |||
Sbjct 138   TTTCGCTCCATGCCGTCAATTTTTCTTGGCTTATAAGTCTTTGTGCCCTAGTGCCTGGGT 197

Query 79      TGAGAGATGGGATGATCAACGTGATAATGGAACATTCCCAGCTCGTTTGGATCAATAG 136
          |||
Sbjct 198   TGAGAGATGGGATGATCAACGTGATAATGGAACATTCCCAGCTCGTTTGGATCAATAG 255
```

B01_265

B13_162

ACTGGAGGCTGGCTTGTTCAGACGACTGTGGGGAAACCGGATTCAACGGGCCTGGTTGTGATTCA
ACAACTACCAGAATGGAAAGGGCATGAATGGACACTTGGAAAAGTACCCCTCCAGAATCTTAA
TTTCTTGATATGTAATGTTGTAAATTAATGGTGAGAGCATGAGAATGATTATAGTGTTGTAATA
 TTGACACATTCTTGAATCCTATATAAAAAAAAAA

EL464229 CHTS2789.b2_J01.ab1 CHT(LMS) Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosus* cDNA clone CHTS2789, mRNA sequence.

Score = 383 bits (424), Expect = 1e-103
 Identities = 215/217 (99%), Gaps = 0/217 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1 ACTGGAGGCTGGCTTGTTCAGACGACTGTGGGGAAACCGGATTCAACGGGCCTGGTTGTGA 60
      |||
Sbjct 395 ACTGGAGGCTGGCTTGTCAAACGACTGTGGGGAAACCGGATTCAACGGGCCTGGTTGTGA 454

Query 61 TTCAACAACACTACCAGAATGGAAAGGGCATGAATGGACACTTGGAAAAGTACCCCTCCAG 120
      |||
Sbjct 455 TTCAACAACACTACCAGAATGGAAAGGGCATGAATGGACACTTGGAAAAGTACCCCTCCAG 514

Query 121 AATCTTAATTTCTTGATATGTAATGTTGTAAATTAATGGTGAGAGCATGAGAATGATTAT 180
      |||
Sbjct 515 AATCTTAATTTCTTGATATGTAATGTTGTAAATTAATGGTGAGAGCATGAGAATGATTAT 574

Query 181 AGTGTTGTAATATTGACACATTCTTGAATCCTATATA 217
      |||
Sbjct 575 AGTGTTGTAATATTGACACATTCTTGAATCCTATATA 611
    
```

B02_242

CGGGCCTCTTCGCTATACCTA**AATGAGTGAGCTAACCANGGATCACCTAATGAGTGAGCTAACCA**
 NGGATCACCTAATGAGTGAGCTACGGGCCTCTTCGCTACGGGCCTCTTCCCTCGGGCCTCTTCG
 CTATACCTAATGAGTGAGCTAAAGGGCAGAGCACCTAATGAGTGAGCTCGGGCCTCTTCGCTAT
ACCTAATGAGTGAGCTCGGGCCTCTTCGCTATACCTAATGAGTGAGCTAA

CD836688 BN45.049I22F020103 BN45 *Brassica napus* cDNA clone BN45049I22,
 mRNA sequence.

Score = 39.2 bits (42), Expect = 2.3
 Identities = 35/44 (79%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 165 AATGAGTGAGCTCGGGCCTCTTCGCTATACCTAATGAGTGAGCT 208
      ||
Sbjct 18 AAAGAGTGAGCTCGGGGTTCTTCGCTATGTCTCAAGAGAGACCT 61
    
```

Score = 39.2 bits (42), Expect = 2.3
 Identities = 35/44 (79%), Gaps = 0/44 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 197 AATGAGTGAGCTCGGGCCTCTTCGCTATACCTAATGAGTGAGCT 240
      ||
Sbjct 18 AAAGAGTGAGCTCGGGGTTCTTCGCTATGTCTCAAGAGAGACCT 61
    
```

B13_193

TATCGATTCCAATTCAGCGGGGGCCACCTGATATCCTTTGTATTTAATTAAGACTTCAAGCGG
TCAACTATGAAGAAGTGTTCGTCCCTCGTCCCAGTAAGCTATGTCTCCAGAATGTAGCCATCCAT
CCTTGTCAATCAAGATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTAAATCCC

AY224135 *Pelargonium x hortorum* 4 coumarate CoA ligase mRNA, partial cds.

Score = 252 bits (136), Expect = 5e-65
Identities = 140/142 (98%), Gaps = 0/142 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1 TATCGATTCCAATTCAGCGGGGGCCACCTGATATCCTTTGTATTTAATTAAGACTTCAA 60
      |||
Sbjct 142 TATCGATTCCAATTCAGCGGGGGCCACCTGATATCCTTTGTATTTAATTAAGACTTCAA 83

Query 61 GCGGTCAACTATGAAGAAGTGTTCGTCCCTCGTCCCAGTAAGCTATGTCTCCAGAATGTAG 120
      |||
Sbjct 82 GCGGTCAACTATGAAGAAGTGTTCGACTTCGTCCCAGTAAGCTATGTCTCCAGAATGTAG 23

Query 121 CCATCCATCCTTGTCAATCAAG 142
      |||
Sbjct 22 CCATCCATCCTTGTCAATCAAG 1

```

B08_160

ACACGGTGATGCAGGTTTGACCGGCAGGANGATAATCATCGACACCTACGGTGGATGGGGAGCT
CACGGTGGTGGTGCTTTCTCTGGGAAAGATCCAACCTAAGGTGGACAGGAGTGGTGCTTACATTG
TTAGGCAAGCAGCCAAGAGCATTGTGGCATCAG

DQ911149 *Cucumis sativus* S-adenosylmethionine synthase-like (SAMS) mRNA,
complete sequence.

Score = 167 bits (90), Expect = 2e-39
Identities = 132/152 (86%), Gaps = 6/152 (3%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 5 GGTGATGCAGGT-TTGACCGGCA-GGANGATAATCATCGACACCTACGGTGGATGGGGAG 62
      |||
Sbjct 403 GGTGATGCAGGTCTT-ACCGG-ACGCAAGATCATCATCGACACCTACGGTGGTTGGGGAG 460

Query 63 CTCACGGTGGTGGTGCTTTCTCTGGGAAAG-ATCCAACCTAAGGTGGACAGGAGTGGTGCT 121
      |||
Sbjct 461 CTCACGGTGGTGGTGCTTTCTCCGG-AAAGGATCCCACCAAGGTCGACAGGAGTGGTGCC 519

Query 122 TACATTGTTAGGCAAGCAGCCAAGAGCATTGT 153
      |||
Sbjct 520 TACATTGTGAGACAGGCTGCTAAGAGCATTGT 551

```


II. LC-MS-Daten

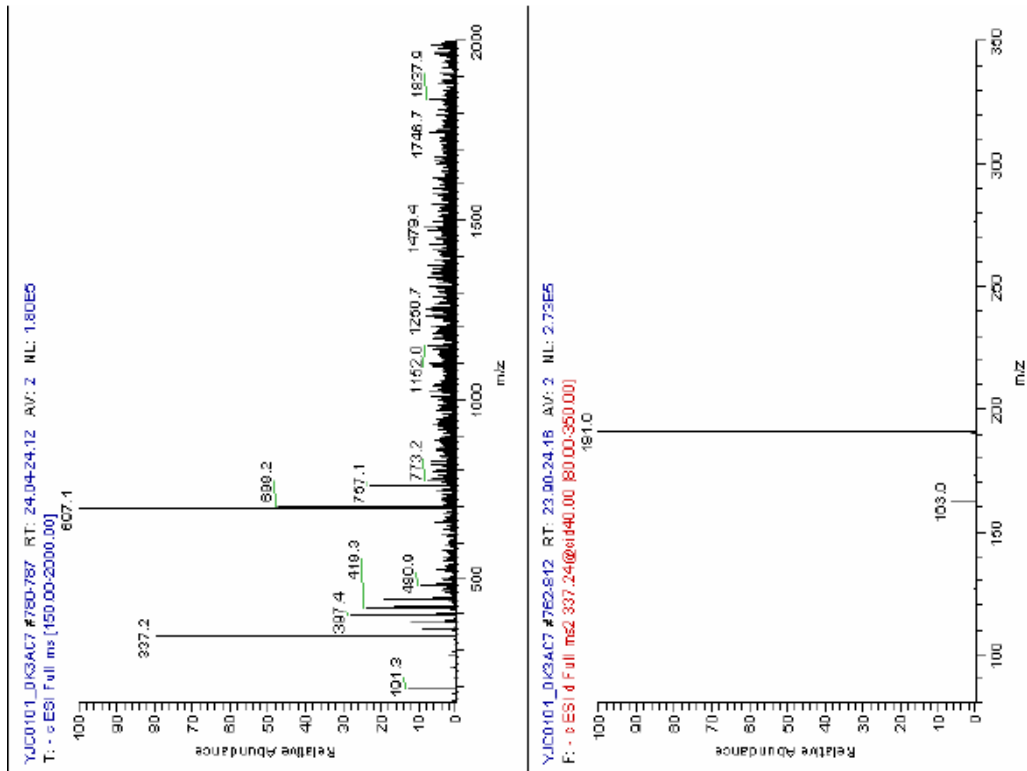


Abb. 7.1: MS-Daten des Peaks mit Rt 24,1 min mit m/z 337 aus einer Kontrollprobe von AC7.

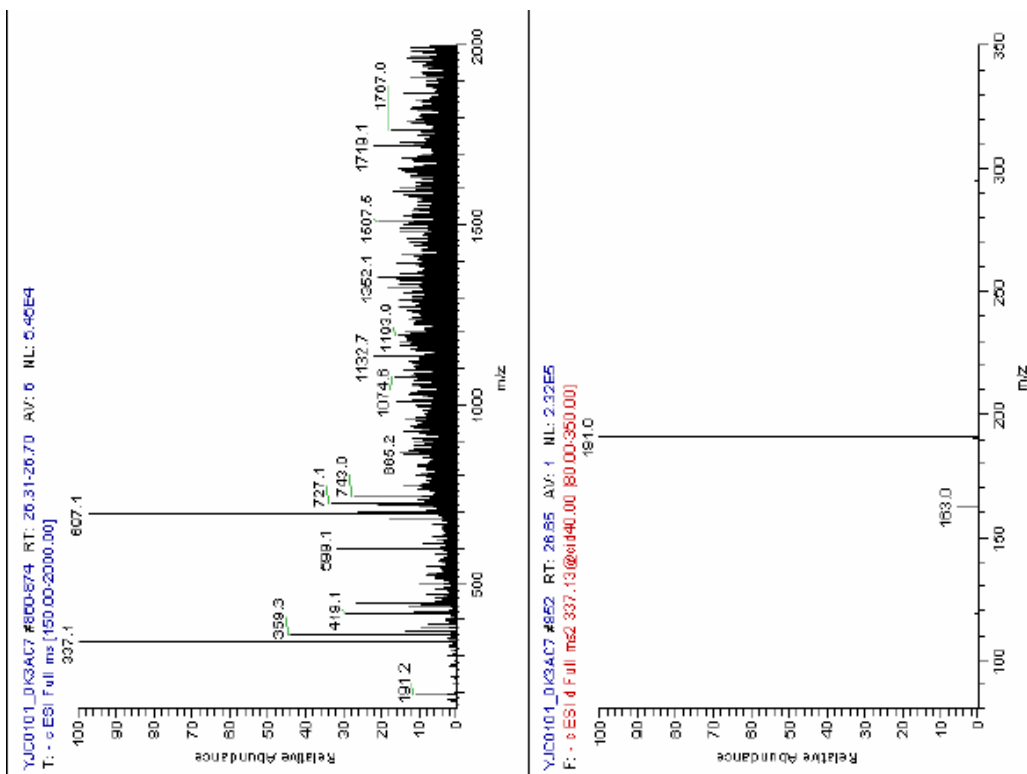


Abb. 7.2: MS-Daten des Peaks mit Rt 26,5 min mit m/z 337 aus einer Kontrollprobe von AC7.

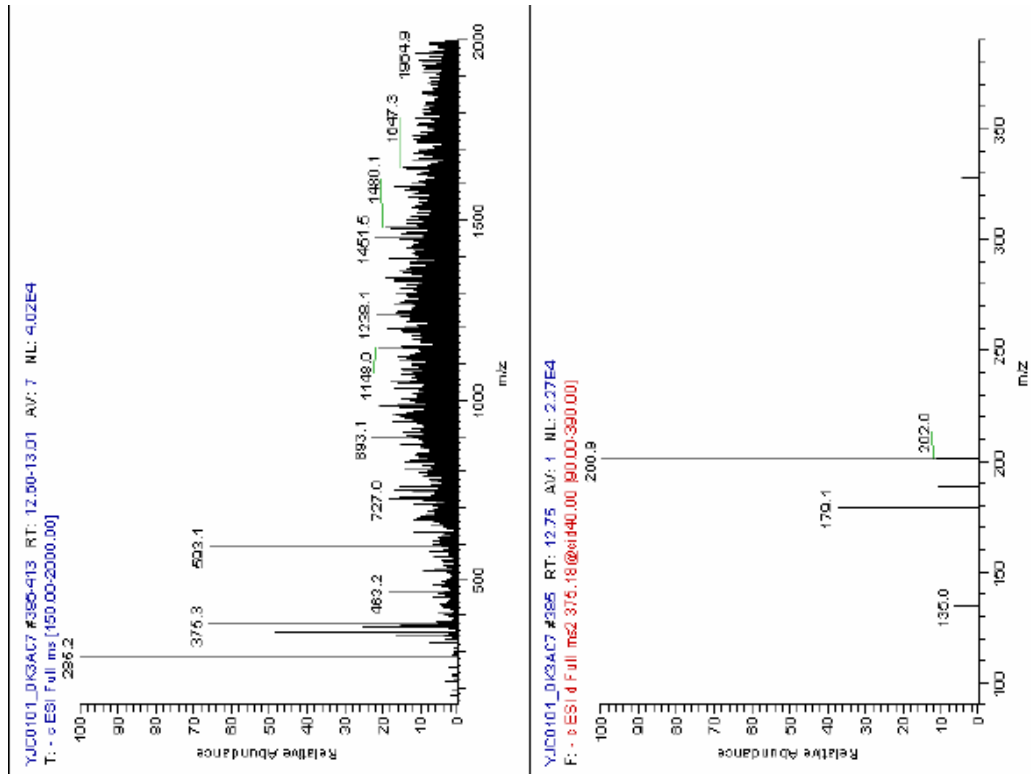


Abb. 7.3: MS-Daten des Peaks mit Rt 12,8 min mit m/z 353 aus einer Kontrollprobe von AC7.

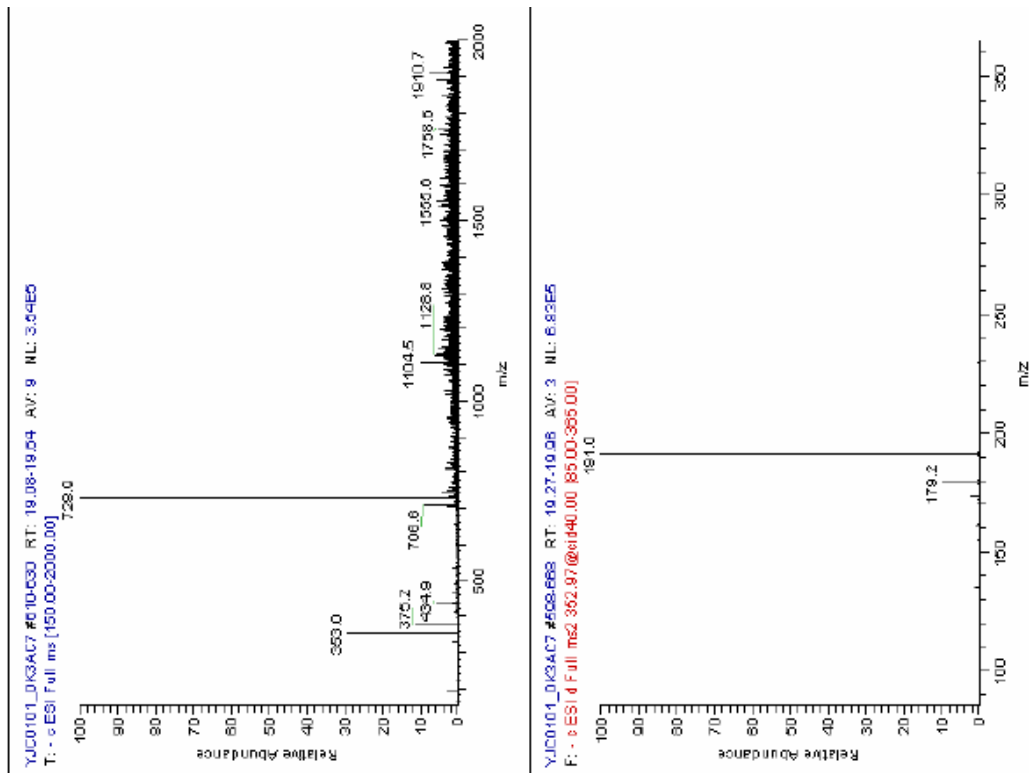


Abb. 7.4: MS-Daten des Peaks mit Rt 19,4 min mit m/z 353 aus einer Kontrollprobe von AC7.

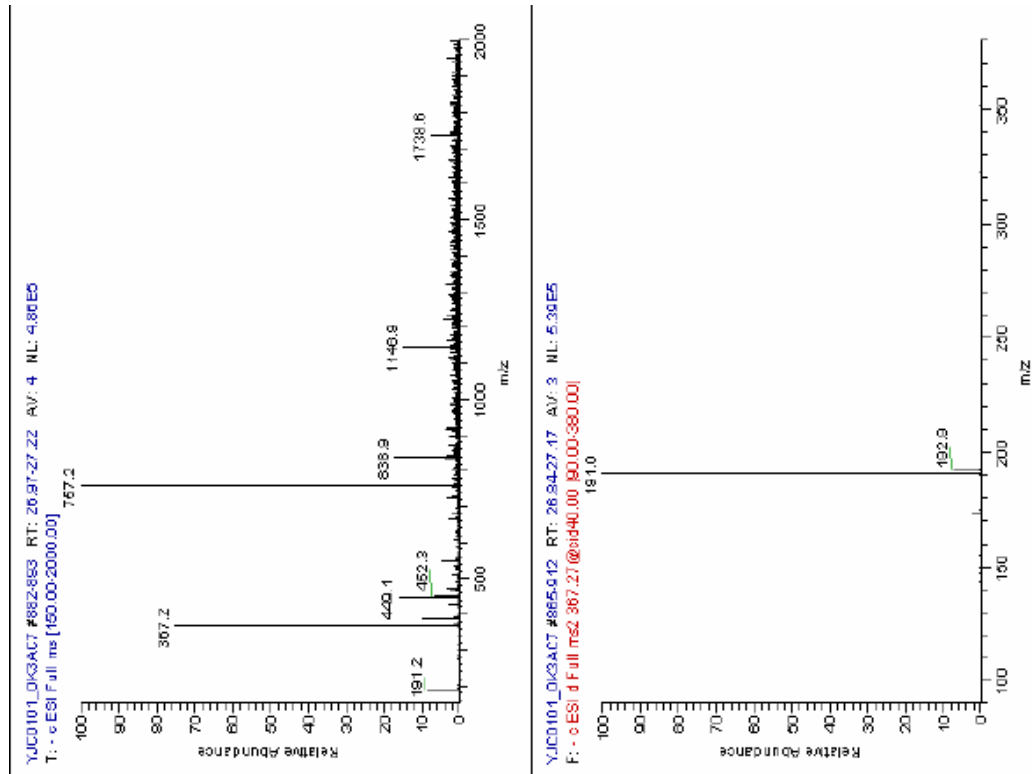


Abb. 7.5: MS-Daten des Peaks mit Rt 27,1 min mit m/z 367 aus einer Kontrollprobe von AC7.

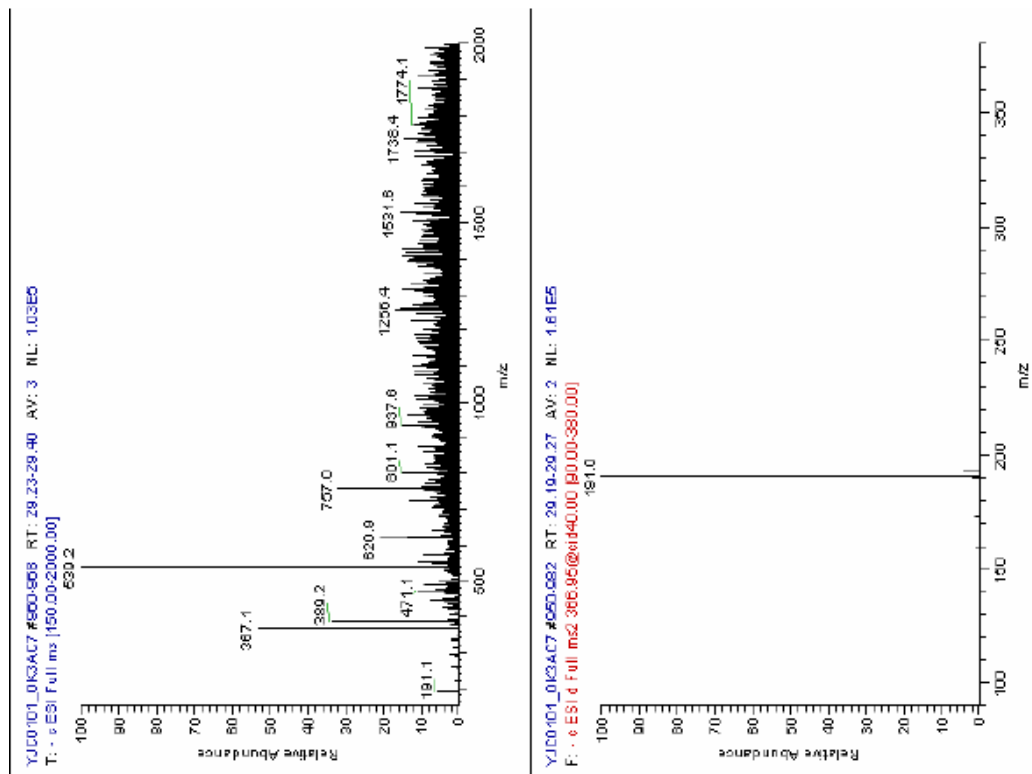


Abb. 7.6: MS-Daten des Peaks mit Rt 29,3 min mit m/z 367 aus einer Kontrollprobe von AC7.

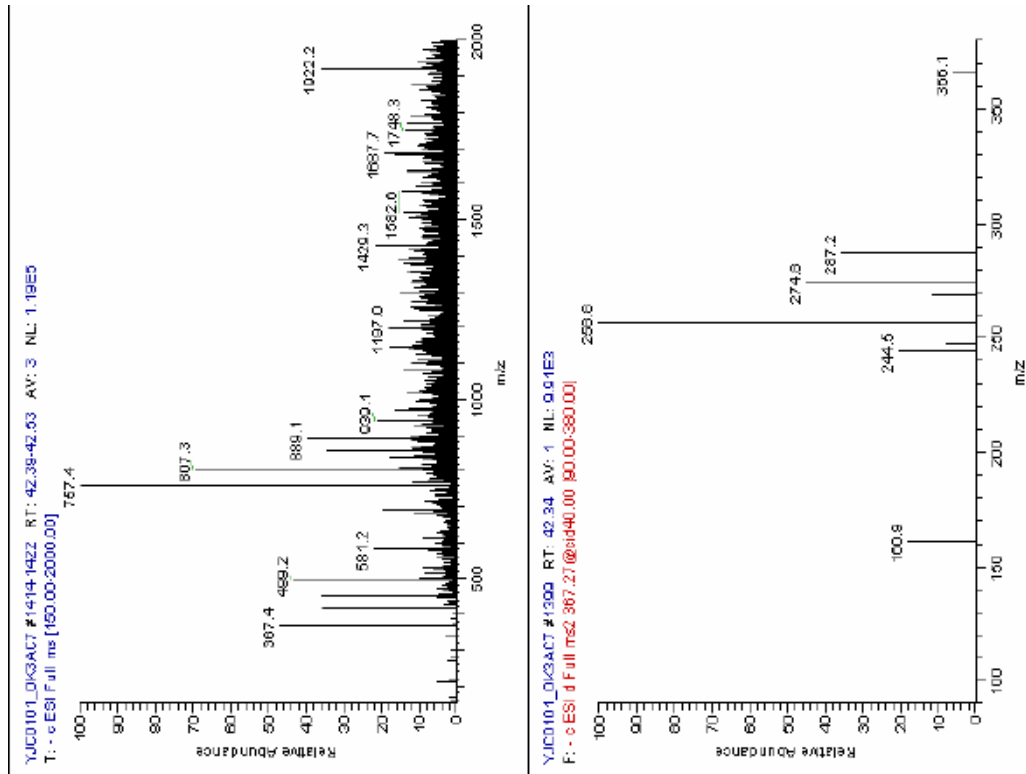


Abb. 7.7: MS-Daten des Peaks mit Rt 42,5 min mit m/z 367 aus einer Kontrollprobe von AC7.

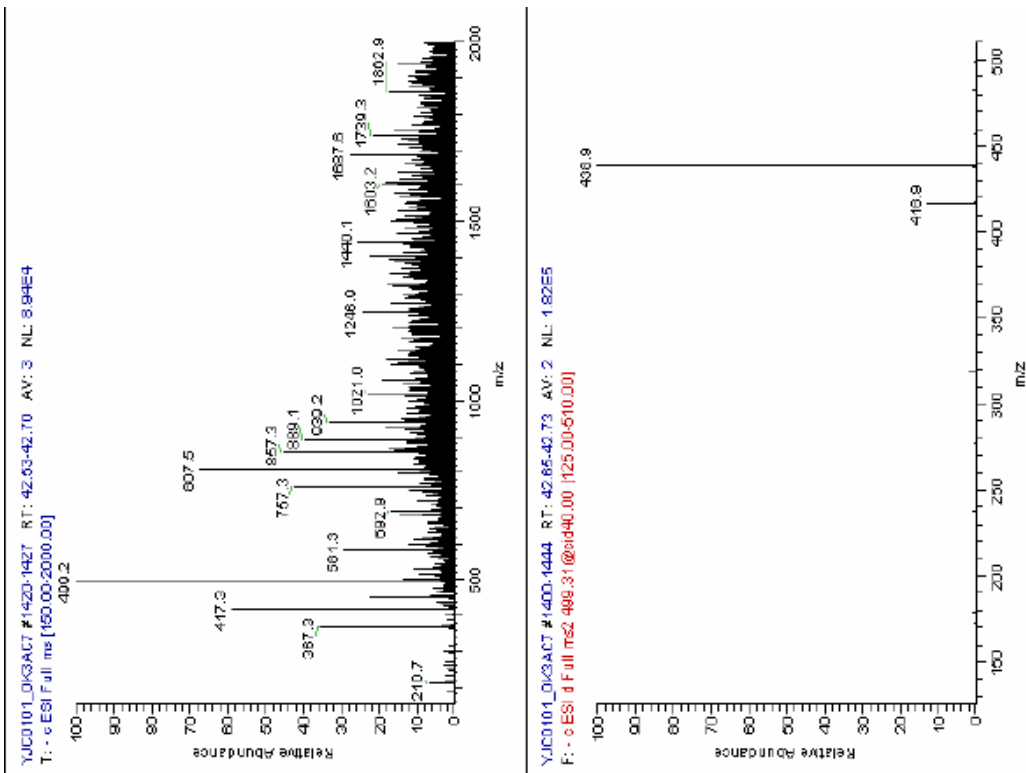


Abb. 7.8: MS-Daten des Peaks mit Rt 43,0 min mit m/z 499 aus einer Kontrollprobe von AC7.

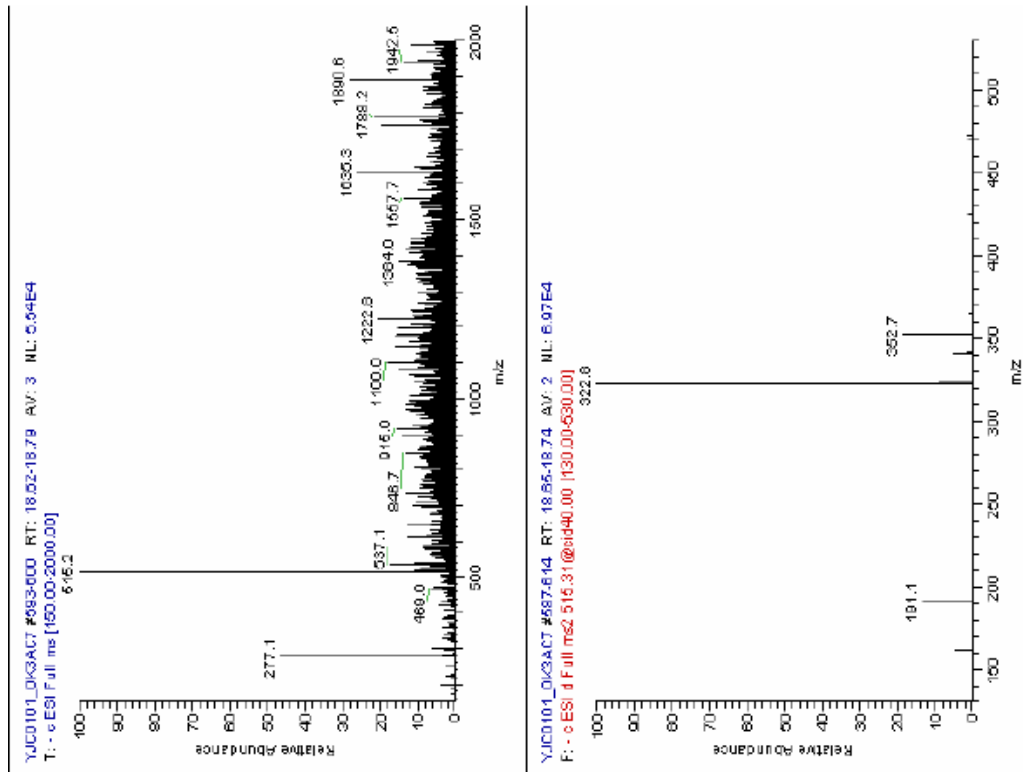


Abb. 7.9: MS-Daten des Peaks mit Rt 18,6 min mit m/z 515 aus einer Kontrollprobe von AC7.

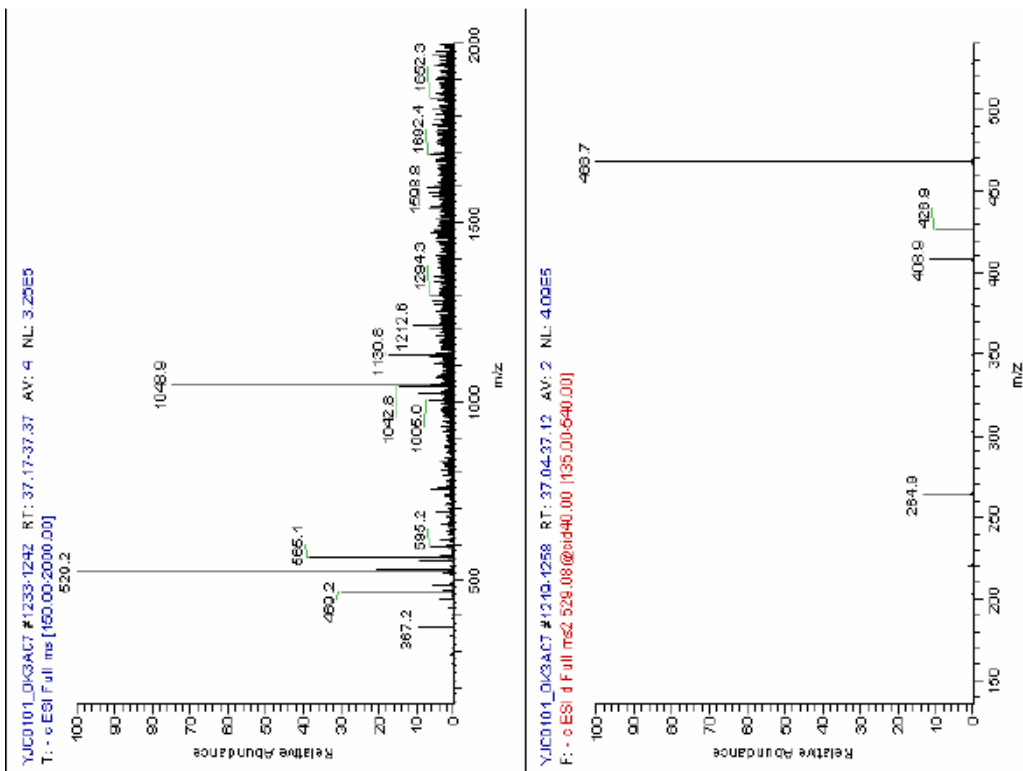


Abb. 7.10: MS-Daten des Peaks mit Rt 37,6 min mit m/z 529 aus einer Kontrollprobe von AC7.

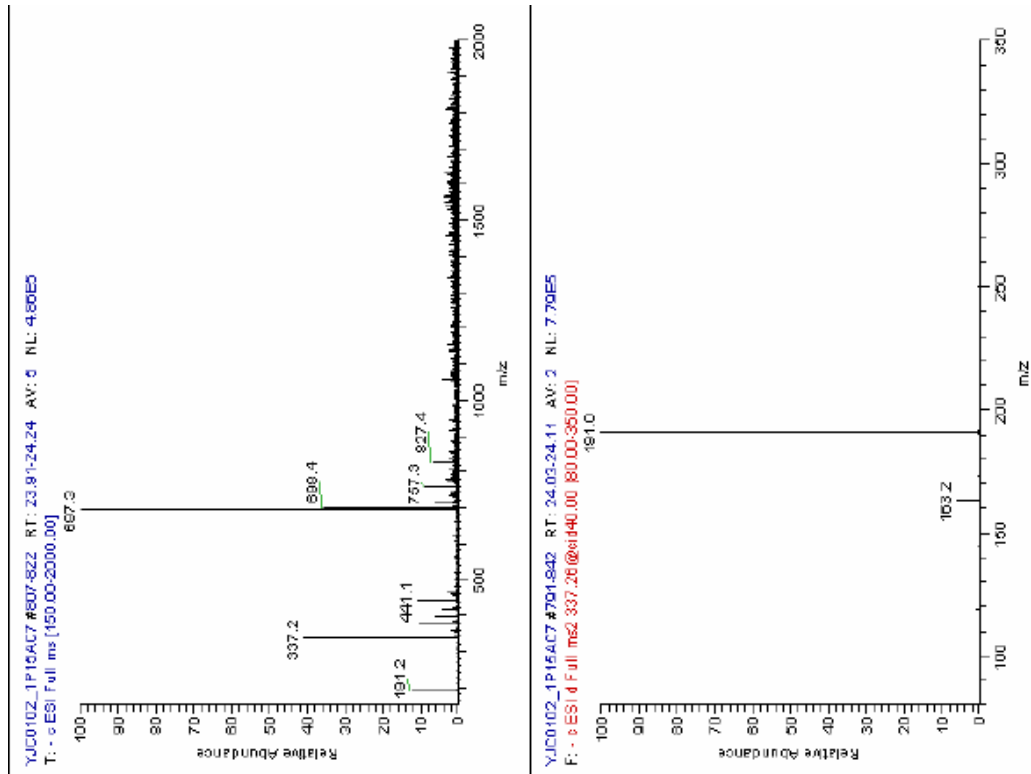


Abb. 7.11: MS-Daten des Peaks mit Rt 24,1 min mit m/z 337 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

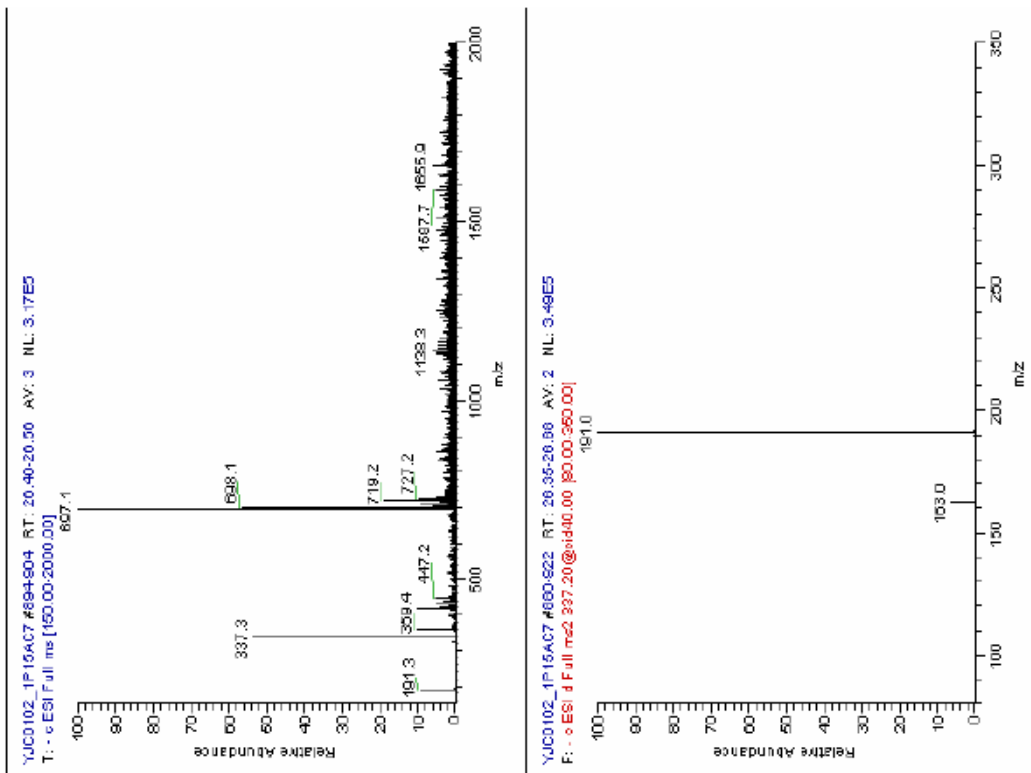


Abb. 7.12: MS-Daten des Peaks mit Rt 26,5 min mit m/z 337 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

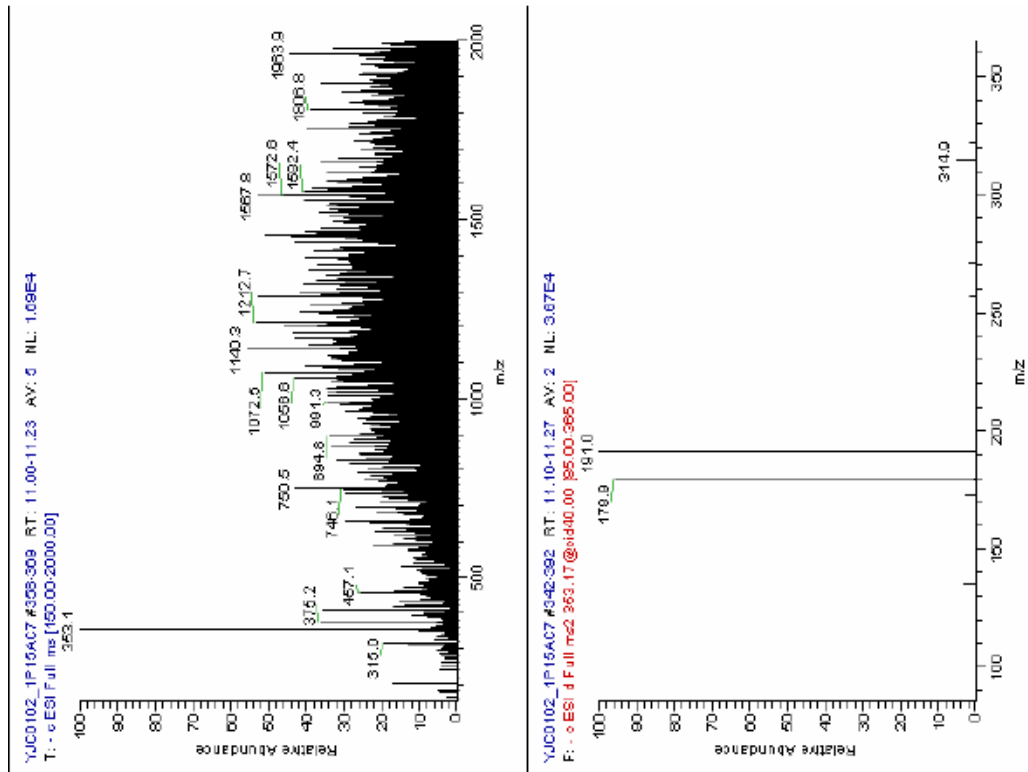


Abb. 7.13: MS-Daten des Peaks mit Rt 11,1 min mit m/z 353 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

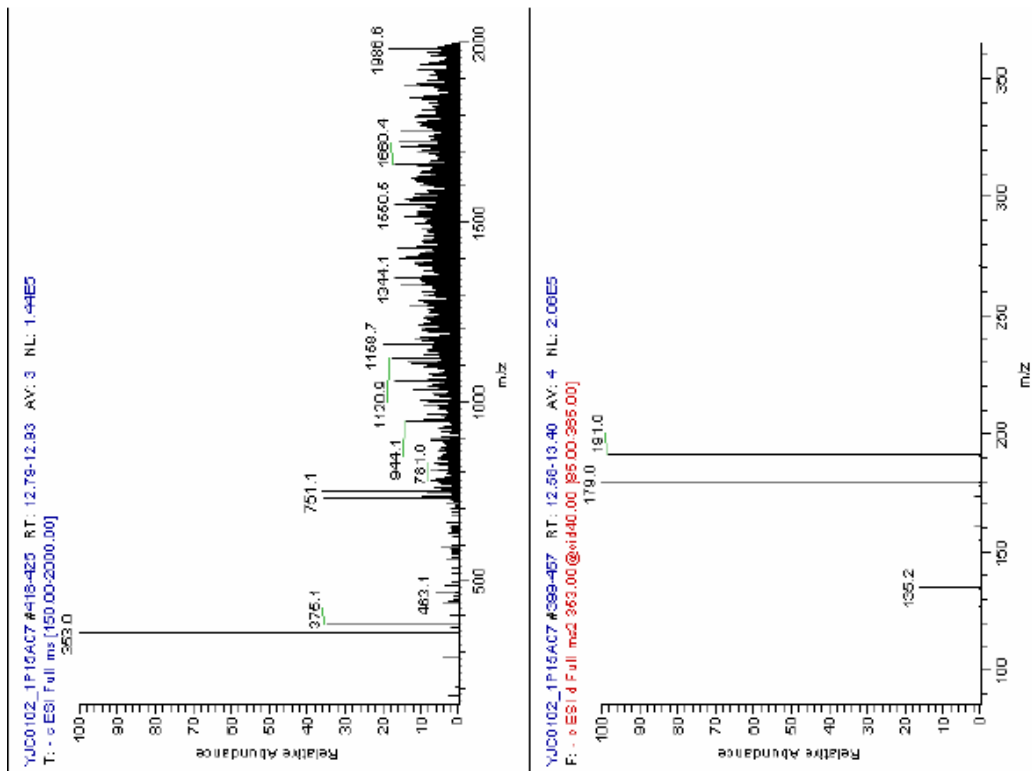


Abb. 7.14: MS-Daten des Peaks mit Rt 12,8 min mit m/z 353 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

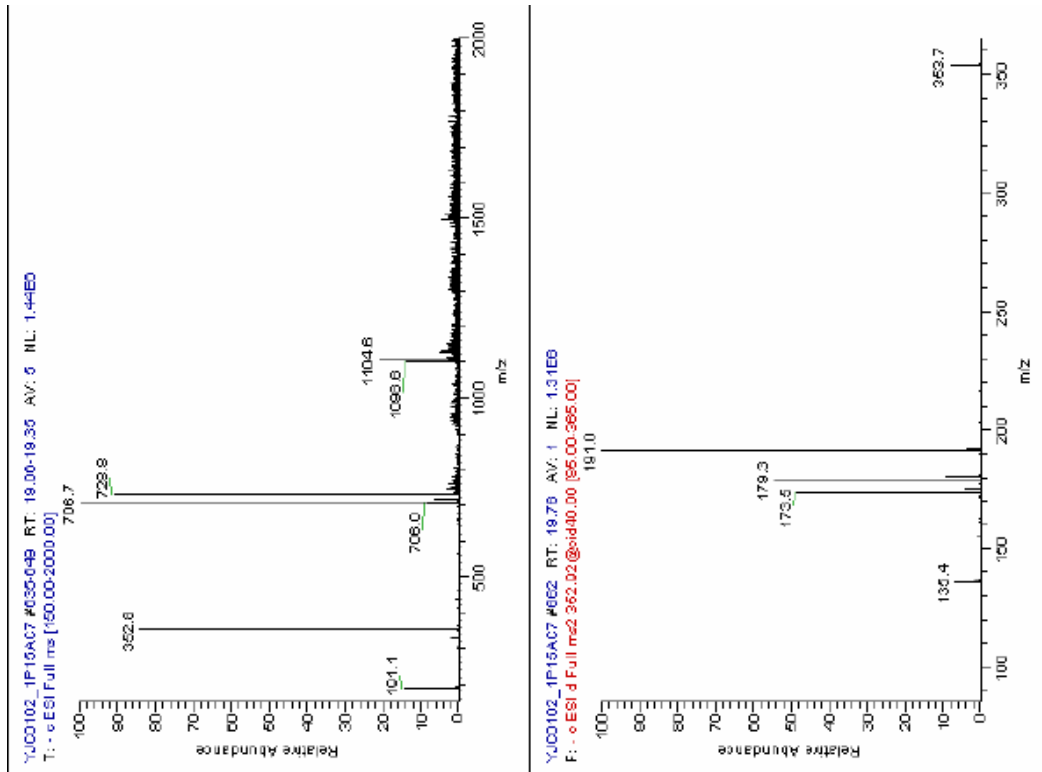


Abb. 7.15: MS-Daten des Peaks mit Rt 19,2 min mit m/z 353 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

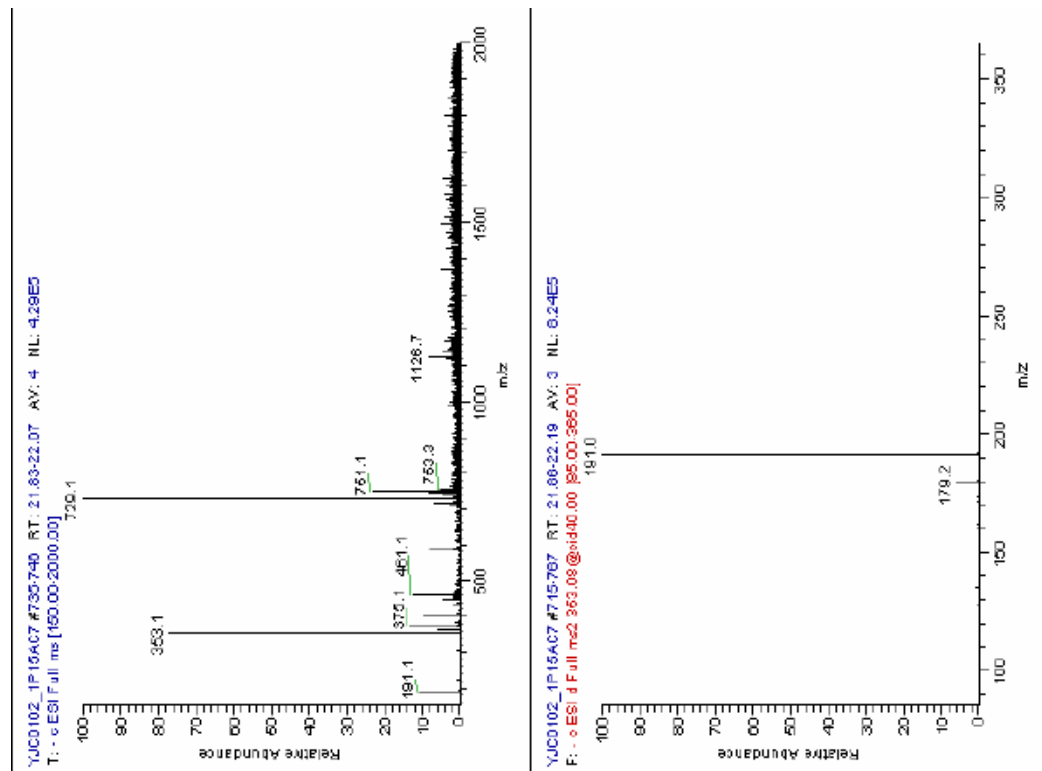


Abb. 7.16: MS-Daten des Peaks mit Rt 22,0 min mit m/z 353 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

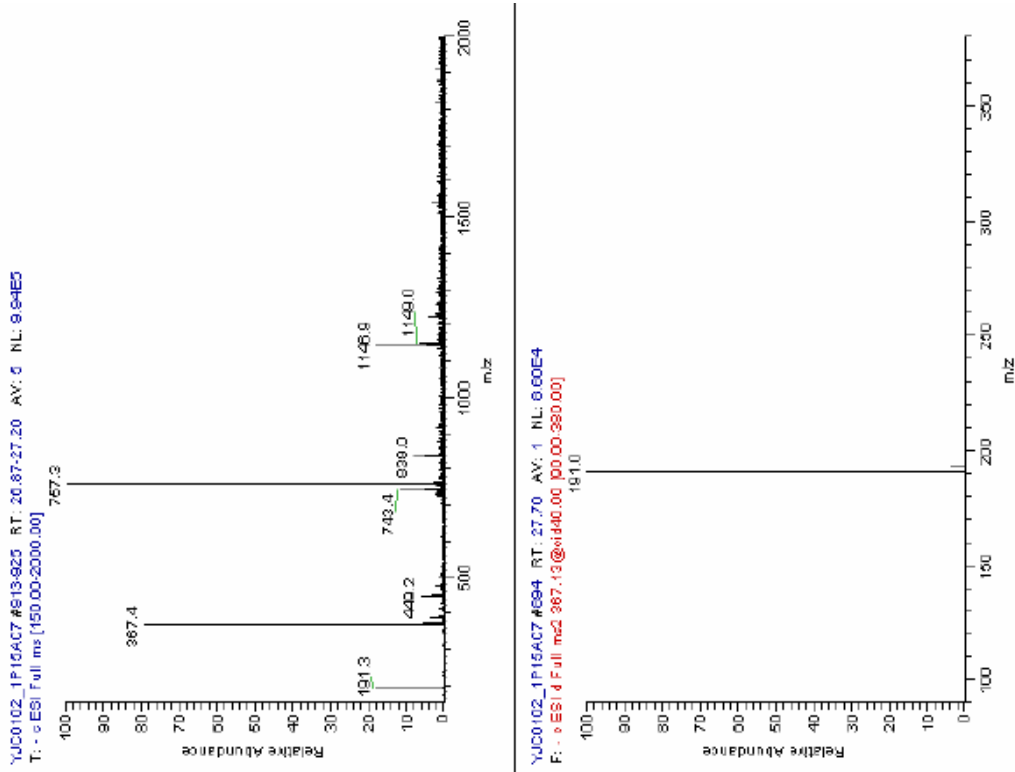


Abb. 7.17: MS-Daten des Peaks mit Rt 27,1 min mit m/z 367 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

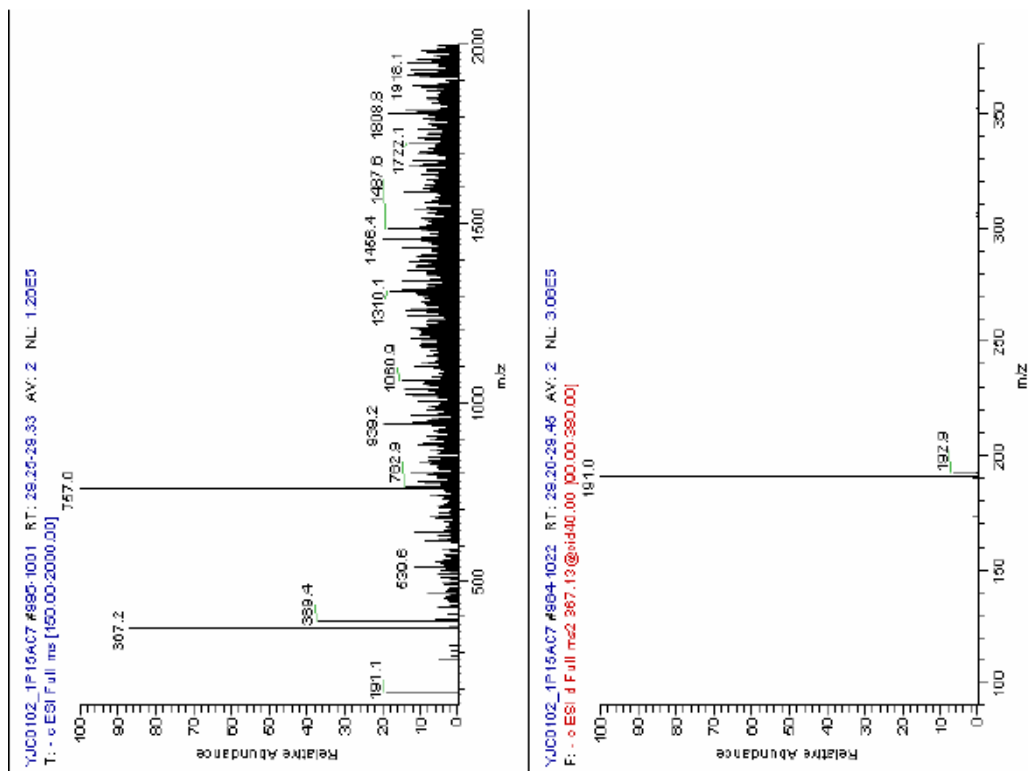


Abb. 7.18: MS-Daten des Peaks mit Rt 29,3 min mit m/z 367 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

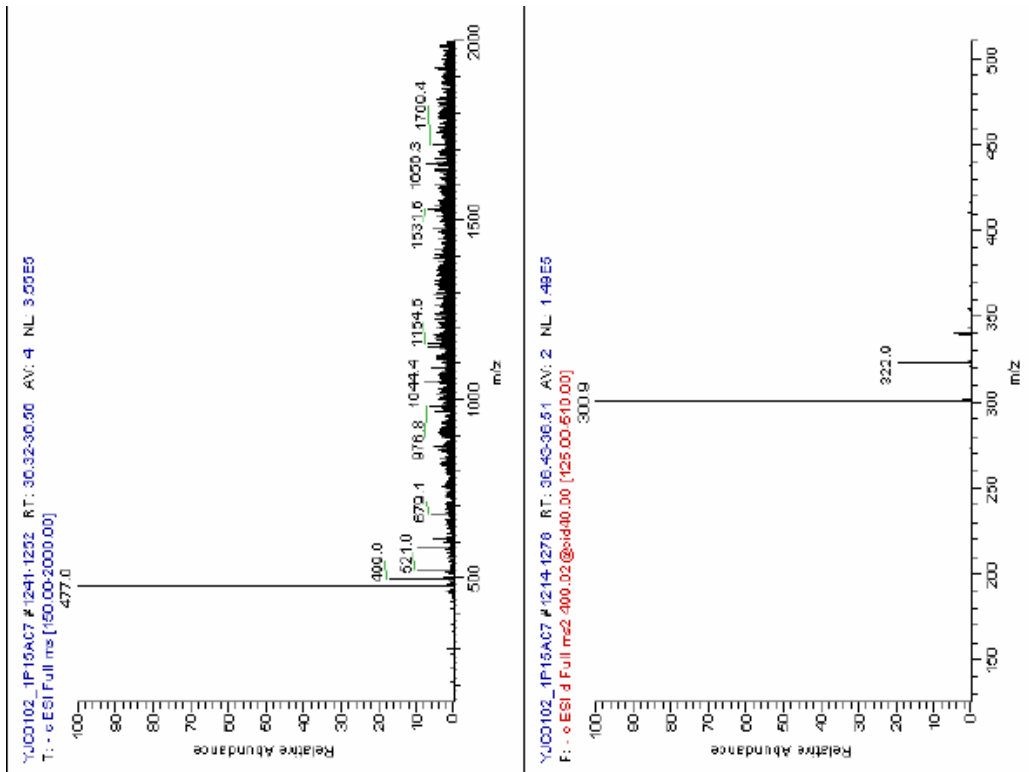


Abb. 7.19: MS-Daten des Peaks mit Rt 36,5 min mit m/z 499 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

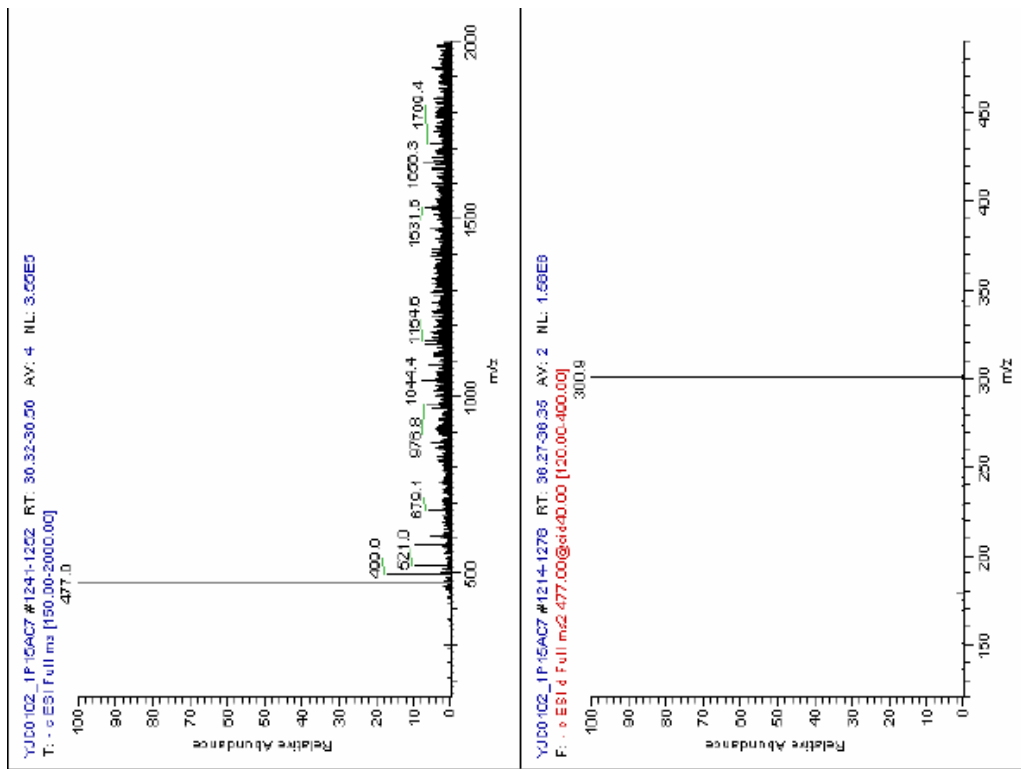


Abb. 7.20: MS-Daten des Peaks mit Rt 36,5 min mit m/z 477 (Basispeak) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

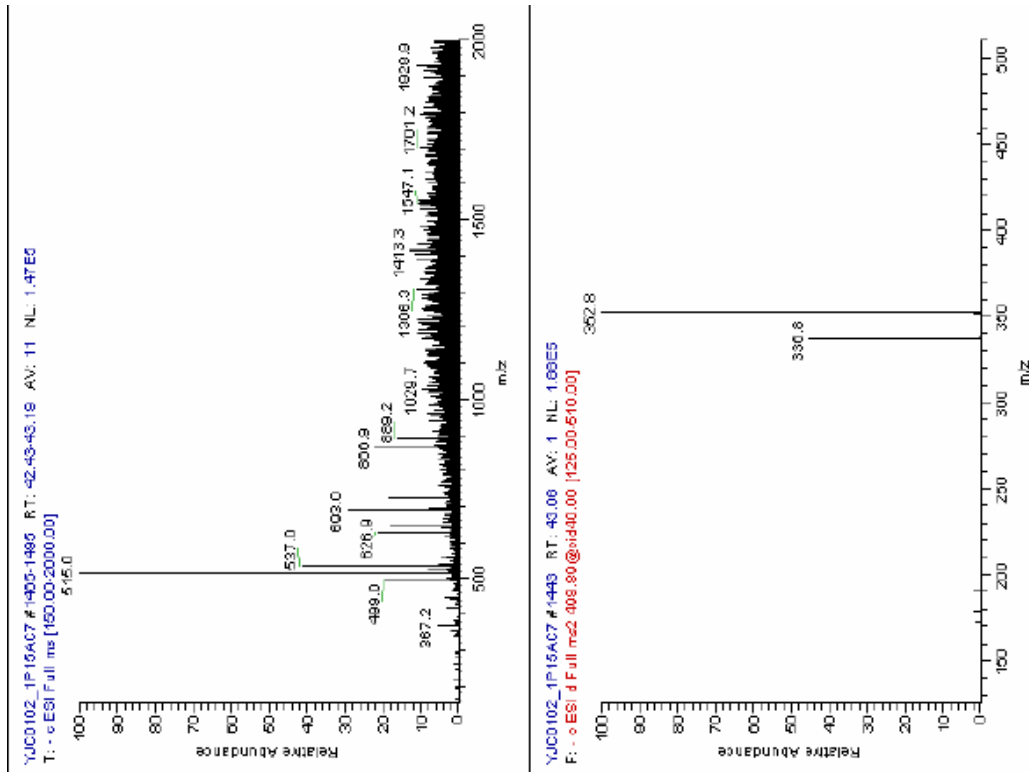


Abb. 7.21: MS-Daten des Peaks mit Rt 43,0 min mit m/z 499 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

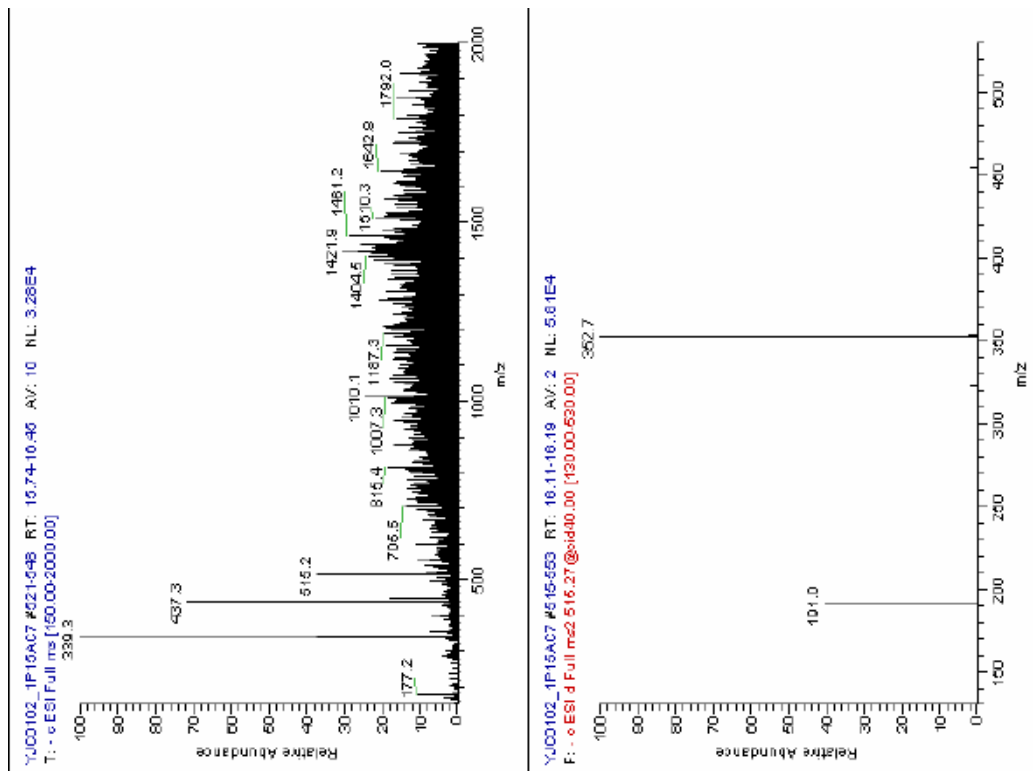


Abb. 7.22: MS-Daten des Peaks mit Rt 16,1 min mit m/z 515 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

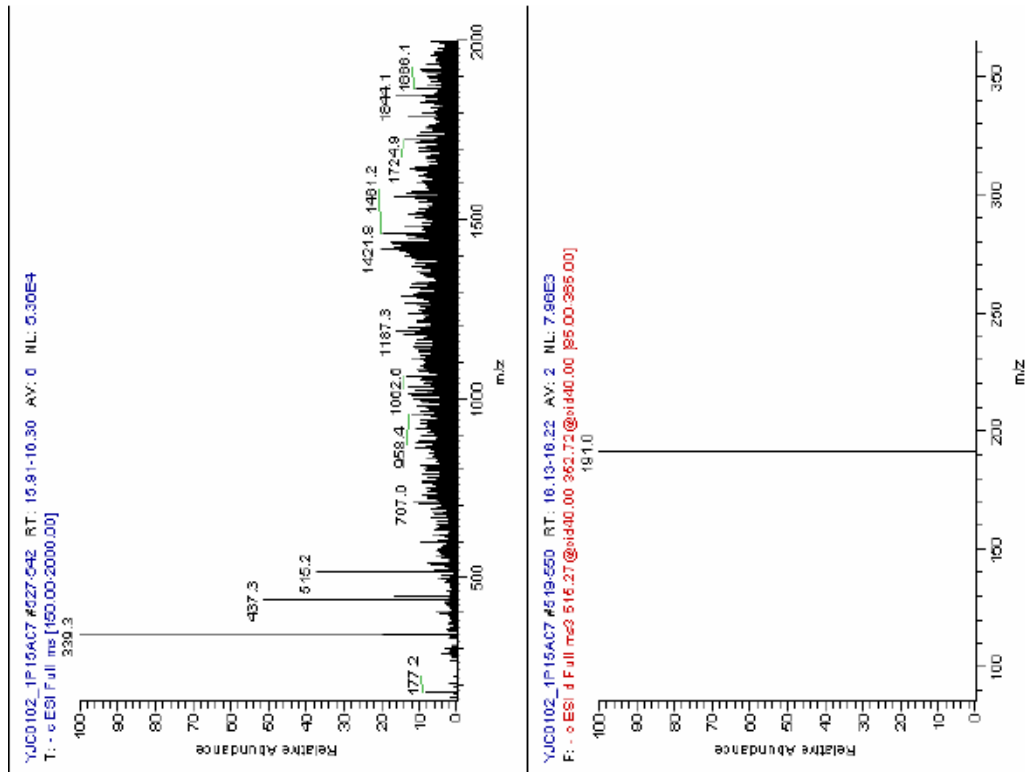


Abb. 7.23: MS-Daten des Peaks mit Rt 16,1 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

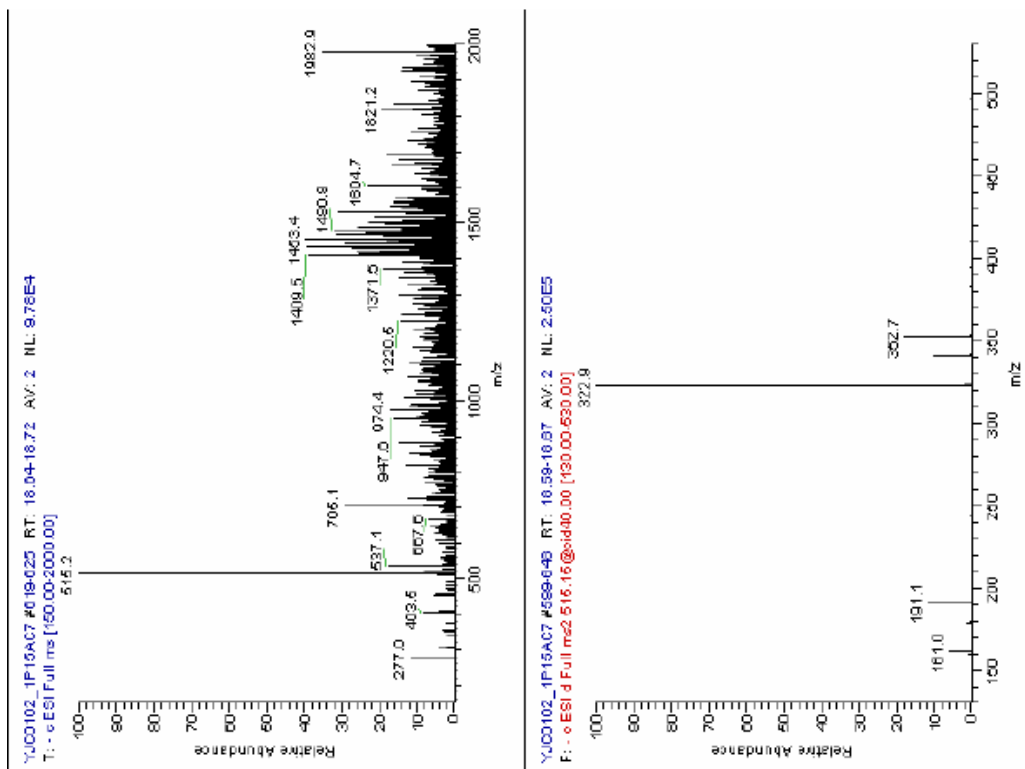


Abb. 7.24: MS-Daten des Peaks mit Rt 18,6 min mit m/z 515 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

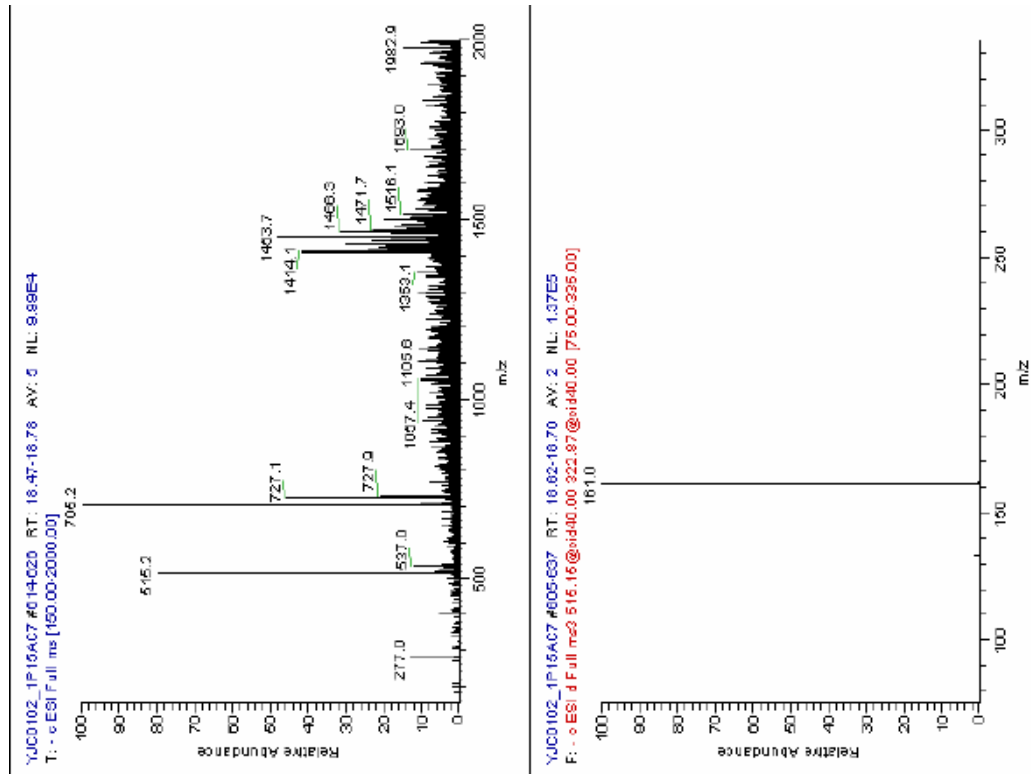


Abb. 7.25: MS-Daten des Peaks mit Rt 18,6 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

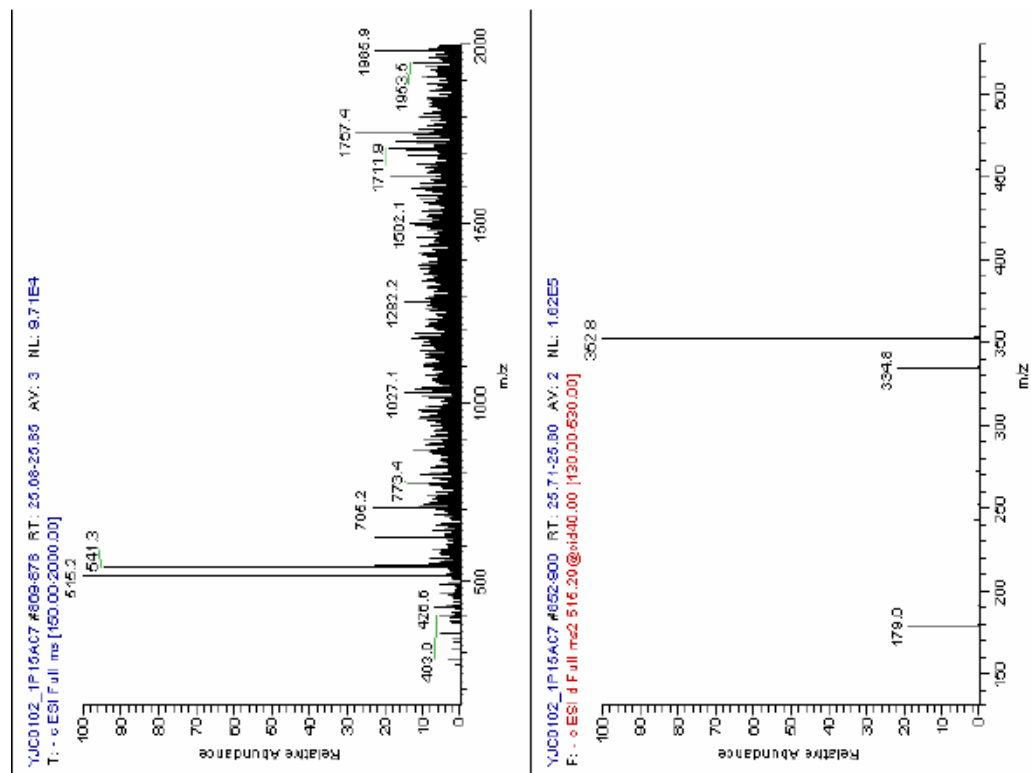


Abb. 7.26: MS-Daten des Peaks mit Rt 22,8 min mit m/z 515 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

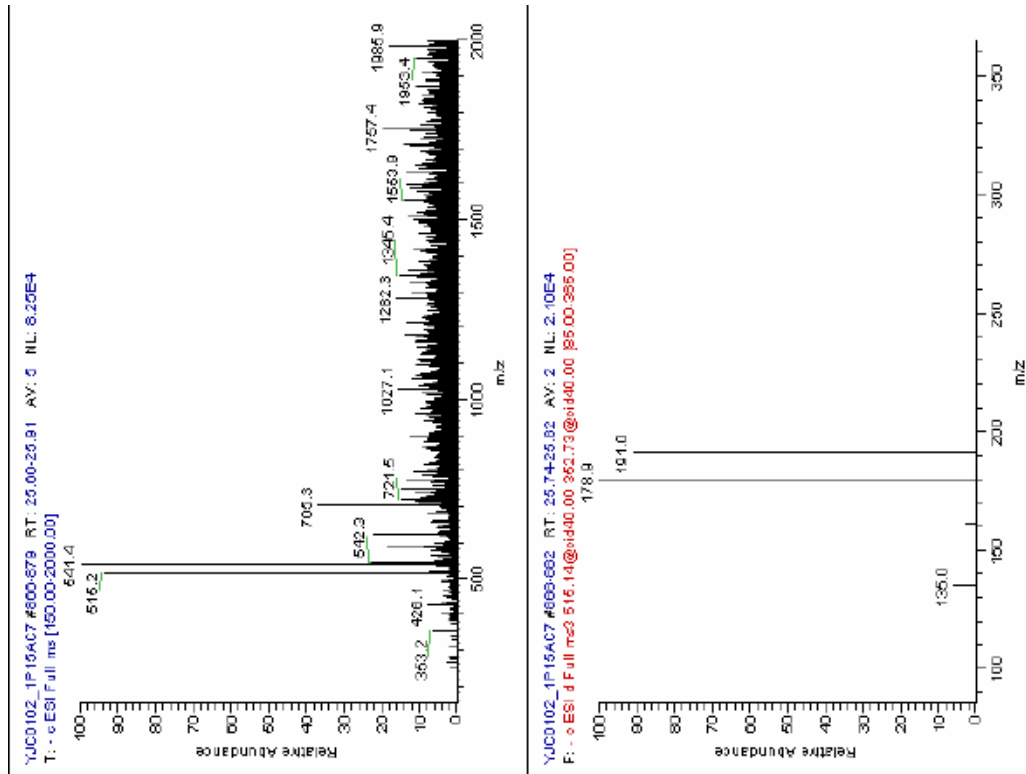


Abb. 7.27: MS-Daten des Peaks mit Rt 25,8 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

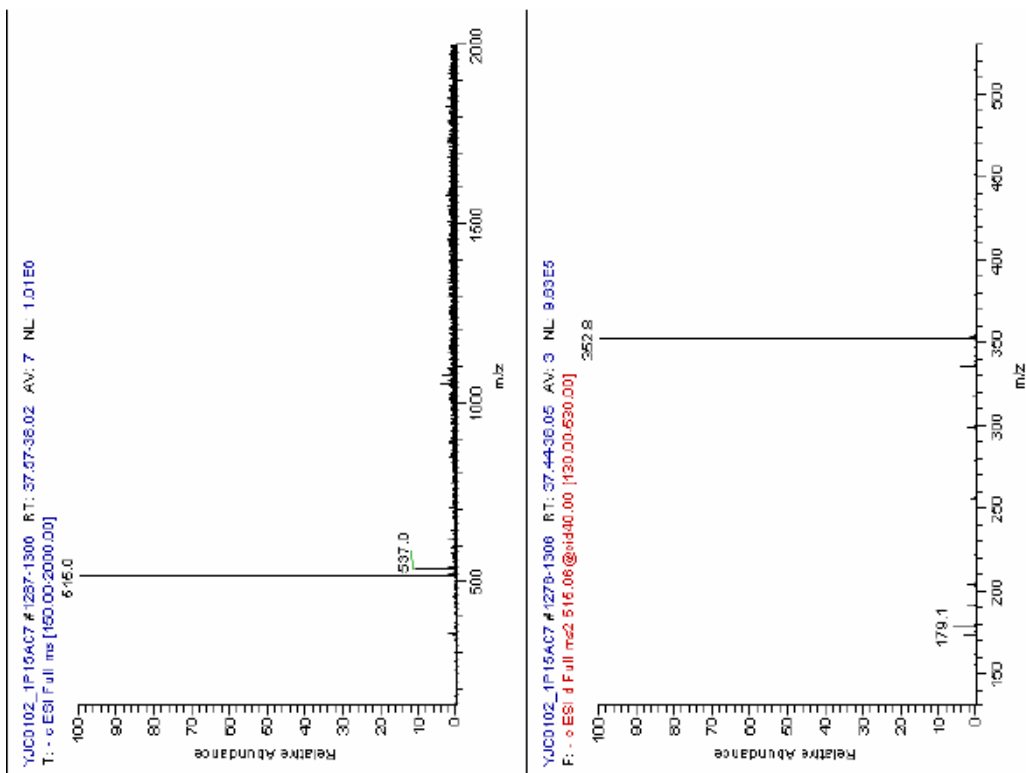


Abb. 7.28: MS-Daten des Peaks mit Rt 37,6 min mit m/z 515 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

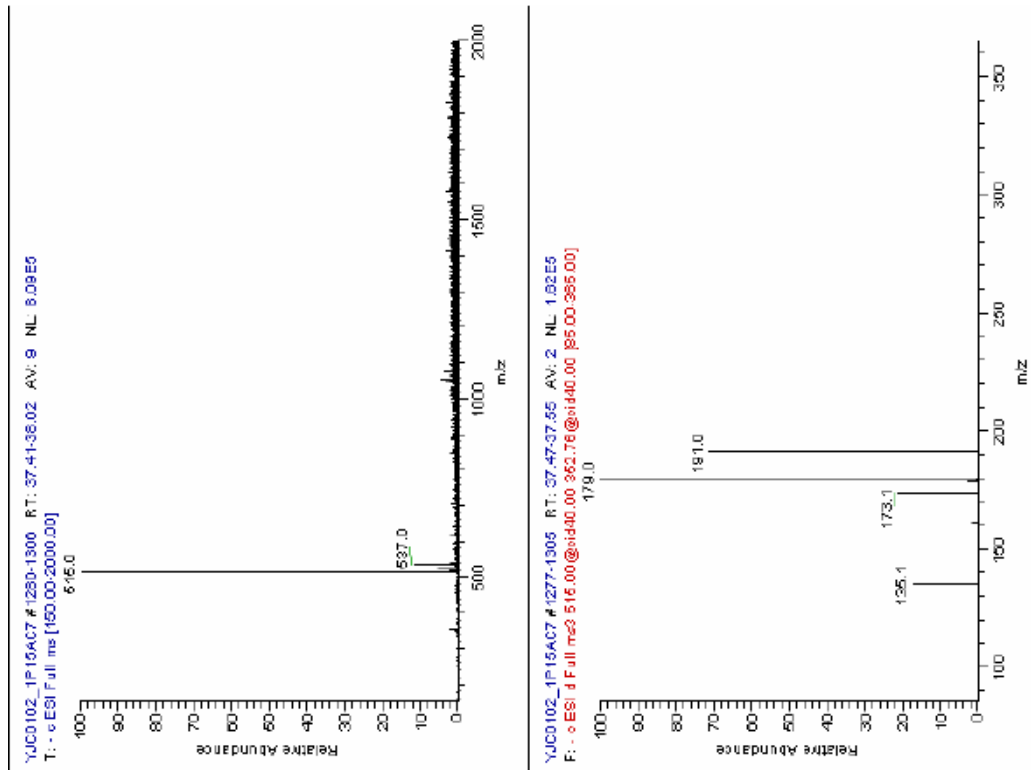


Abb. 7.29: MS-Daten des Peaks mit Rt 37,6 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

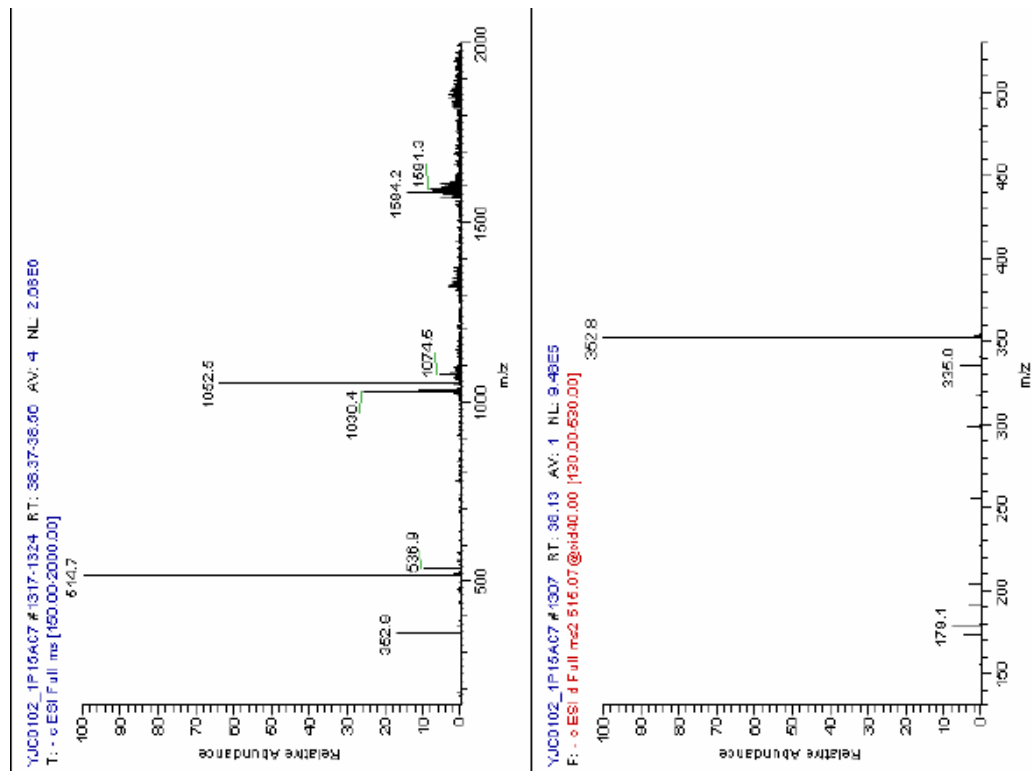


Abb. 7.30: MS-Daten des Peaks mit Rt 38,5 min mit m/z 515 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

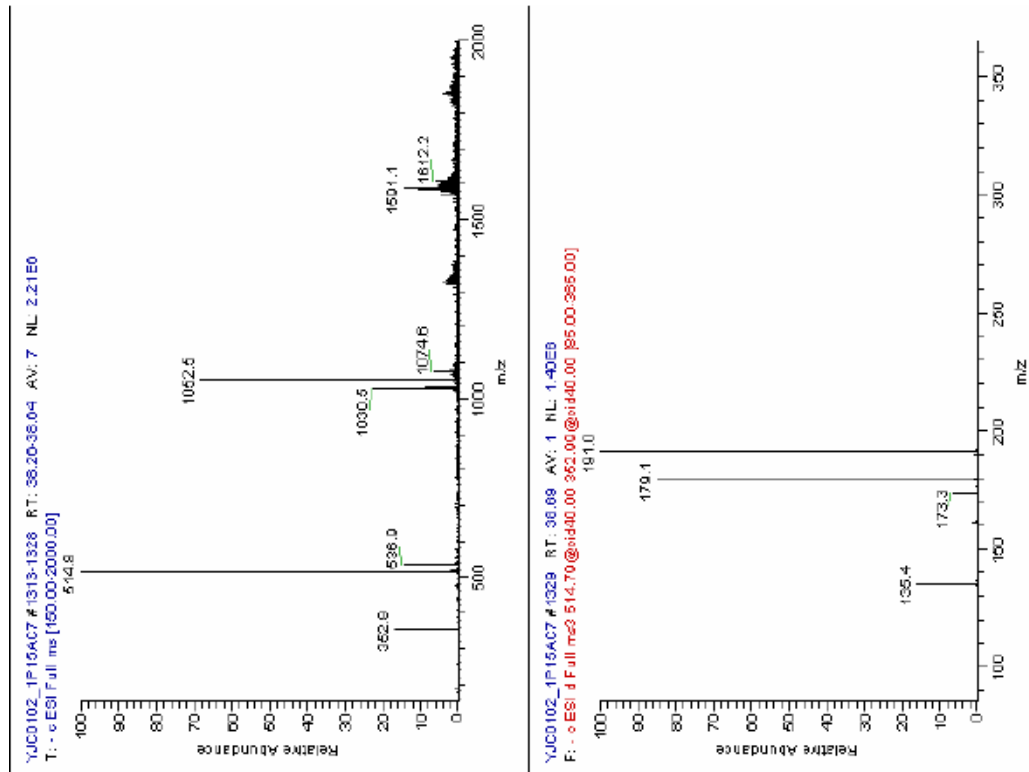


Abb. 7.31: MS-Daten des Peaks mit Rt 38,5 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

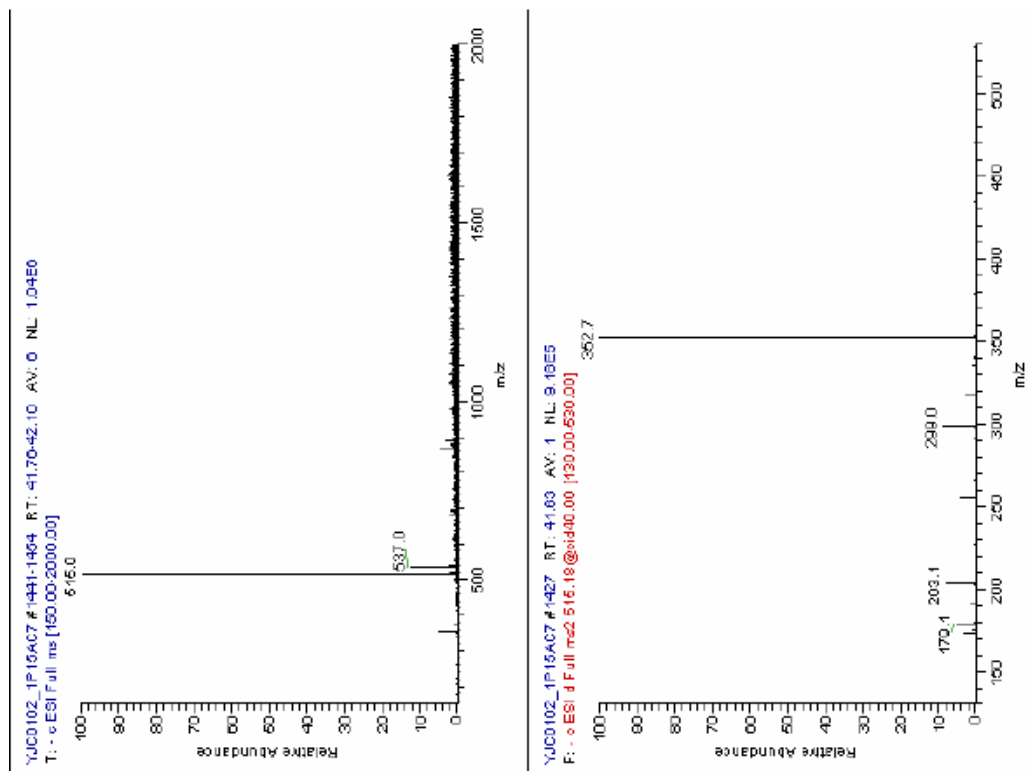


Abb. 7.32: MS-Daten des Peaks mit Rt 41,9 min mit m/z 515 (Basispeak) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

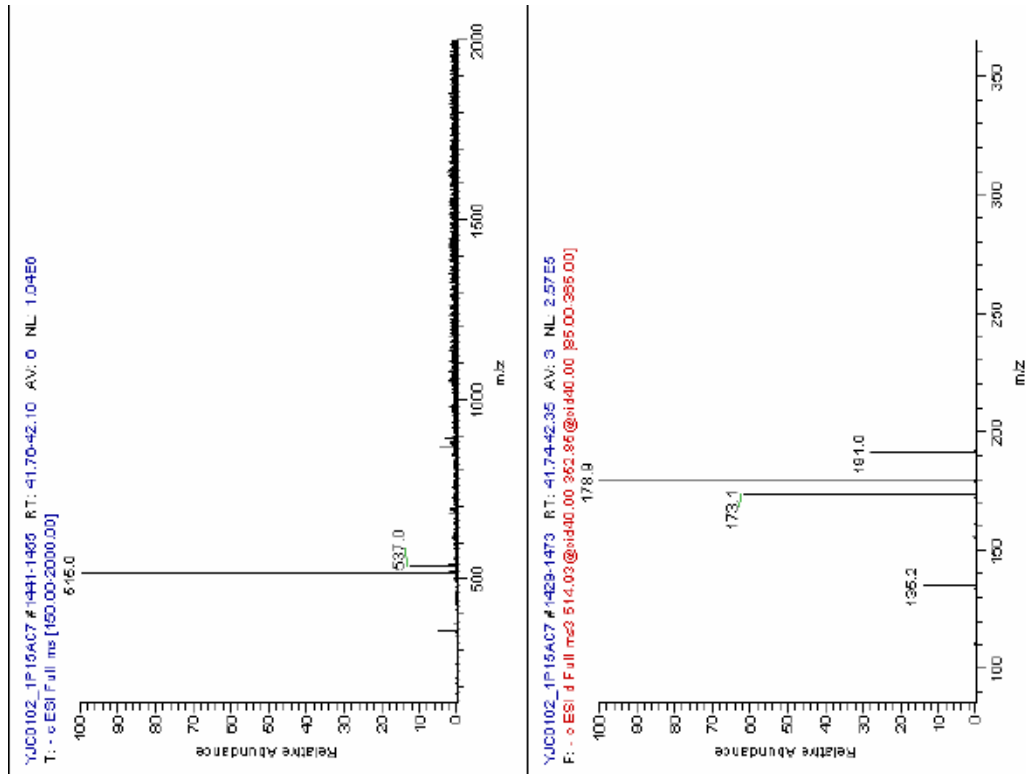


Abb. 7.33: MS-Daten des Peaks mit Rt 41,9 min mit m/z 515 (MS³) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

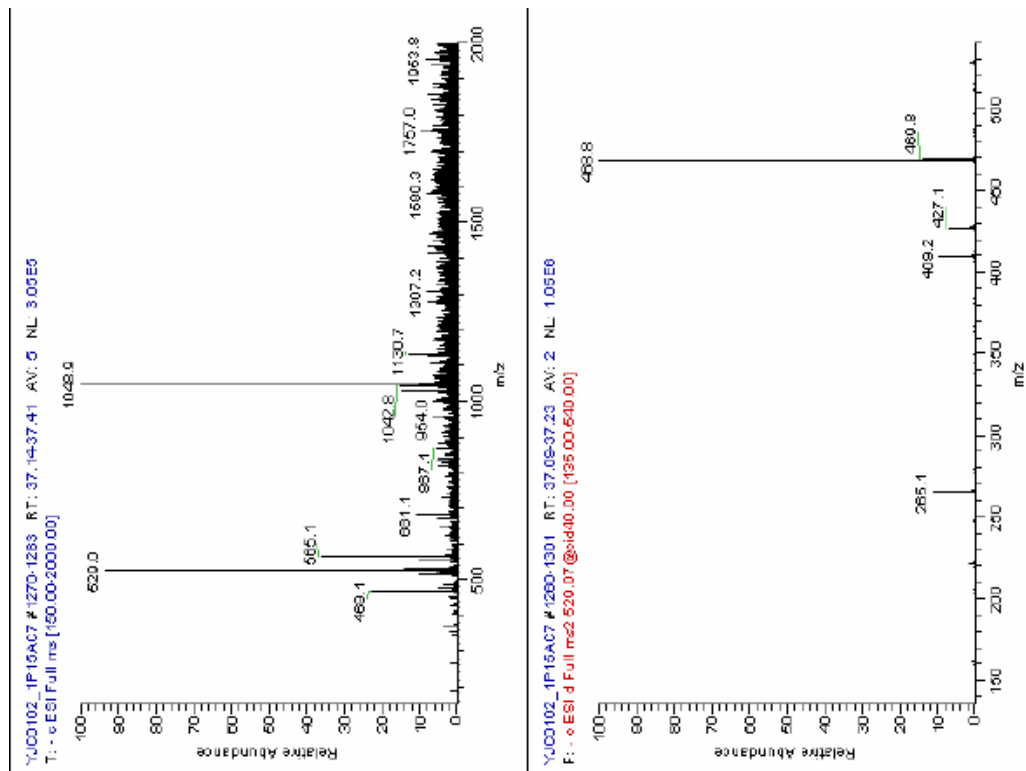


Abb. 7.34: MS-Daten des Peaks mit Rt 37,3 min mit m/z 529 aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

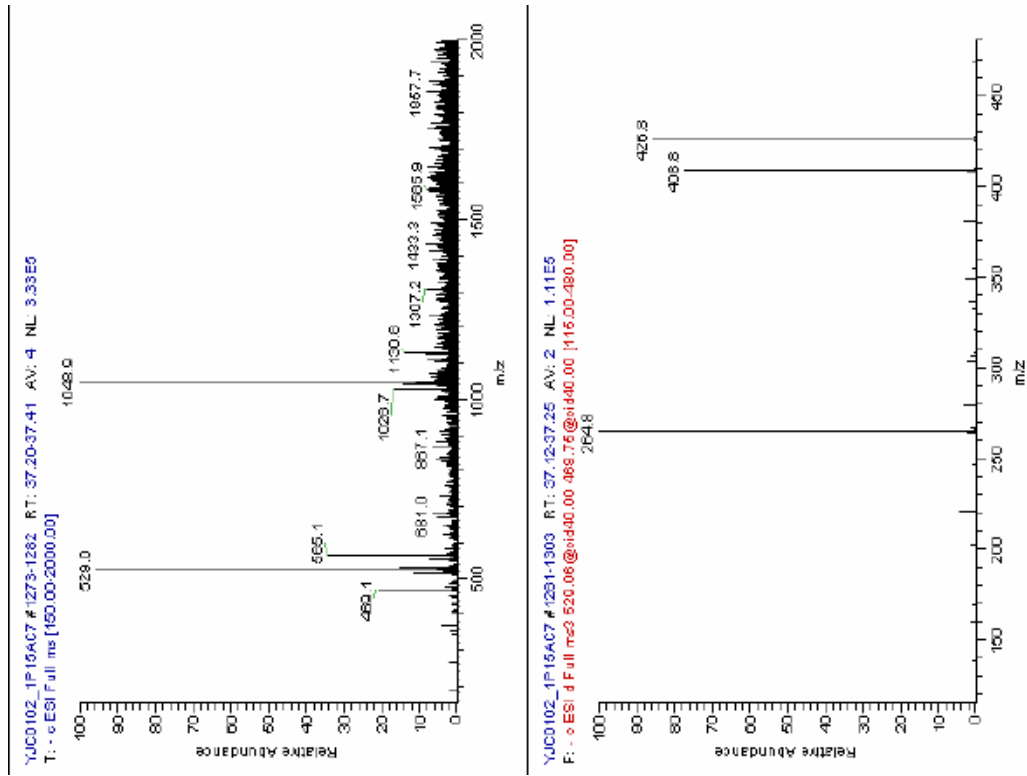


Abb. 7.35: MS-Daten des Peaks mit Rt 37,3 min mit m/z 529 (MS^3) aus einer infizierten Blattprobe von AC7.

Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Dr. H. Schnabl, die es mir ermöglicht hat, dass ich mit diesem interessanten Thema promovieren konnte. Zudem bedanke ich mich für das Interesse am Fortgang und für die Unterstützung und Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Frau HD Dr. U. Steiner danke ich besonders herzlich für die Übernahme des Korreferats, für die Hilfestellung bei den mikroskopischen Aufnahmen und für das rege Interesse an meiner Arbeit.

Dr. Claudio Cerboncini möchte ich ganz herzlich für das Interesse an der Arbeit, für die stetige Diskussionsbereitschaft, für die Offenheit und Bereitstellung des Arbeitsplatzes in der Arbeitsgruppe „Pflanzliche Rezeptoren“ bedanken. Ganz besonders bedanke ich mich für das engagierte Korrekturlesen meiner schriftlichen Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank verdient Jens Henning Krause für die außerordentliche und tatkräftige Hilfsbereitschaft und für seine freundschaftliche Unterstützung und Offenheit.

Ein ganz lieber Dank geht an Dr. Kati Servan für die hervorragenden theoretischen und praktischen Hilfestellungen bei jeglichen molekularbiologischen Fragestellungen.

Ich bedanke mich auch herzlich bei meinem langjährigen Zimmergenossen Dr. Budi Muktiono und bei Meike Jakobs und Dr. Bettina Kriegs für ihre stetige Hilfsbereitschaft.

Dr. Menelaos Papagiannopoulos möchte ich herzlich für die Durchführung und Bereitstellung der massenspektrometrischen Analysen danken.

Meinem Freund, Markus Lübken, danke ich sehr, da er mir die Kraft gegeben hat, den Glauben nicht zu verlieren und mich stets ganz besonders liebevoll unterstützt hat.

Bei meinen Eltern, Rosa und Heinrich Müllenborn, und bei meinem lieben Bruder, Dirk Müllenborn, möchte ich mich für die uneingeschränkte Unterstützung bedanken und dafür, dass sie an mich glauben.

Ich bedanke mich bei der Stiftung caesar für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und für die finanzielle Unterstützung.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Stiftung caesar und des Instituts für Molekulare Physiologie und Biotechnologie der Pflanze (IMBIO), die mich in vielfältiger Weise unterstützt haben.