

Untersuchungen zur Interaktion von *Ipomoea batatas* mit synergistischen und pathogenen Mikroorganismen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation

von

Dipl. Biol. Matthias Debarry

geboren am 02.09.1972 in Wriezen



Referent: Prof. Dr. Hans-Albert Kolb

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Irene Marten

Tag der Promotion: 16. Juli 2003

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen *Ipomoea batatas* mit dem synergistischen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* sowie mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* auf der Ebene der frühen und späten pflanzlichen Pathogenantworten vergleichend betrachtet. Für die Charakterisierung des Signaltransduktionsweges der H₂O₂-Synthese wurden potentiell beteiligte intrazelluläre Komponenten der Signaltransduktion mit Hilfe von Effektoren identifiziert. Die Quantifizierung der H₂O₂-Synthese erfolgte mit der Luminol-Methode. Darüber hinaus wurde die Abwehrreaktion mittels interner und externer pH-Wertmessung quantifiziert. Die Analyse des Signalweges des „oxidative burst“ elicierter Süßkartoffelzellen erbrachte sichere Hinweise dafür, dass die Phospholipase A₂ (PLA₂) involviert ist. Daneben wurde mit dem G-Protein-Aktivator Mastoparan sowohl eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine an der extrazellulären Alkalisierung gezeigt, als auch Hinweise für eine direkte Kopplung mit der PLA₂ gefunden. Bezüglich der Phospholipase C (PLC) konnte dagegen keine zweifelsfreie Aussage getroffen werden. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Ca²⁺-abhängige Protein-Kinasen (CDPK), jedoch keine Protein-Kinase C an der Signaltransduktion der Elicitor-induzierten H₂O₂-Synthese beteiligt sind. Eine anhaltende Phosphorylierung von Zielproteinen durch CDPK über die gesamte Dauer des „oxidative burst“ erwies sich als notwendig. Es gab Hinweise darauf, dass der Ca²⁺-Sensor Calmodulin im Signalweg des „oxidative burst“ involviert ist. Untersuchungen mit Ionenkanal-Blockern deuten darauf hin, dass Cl⁻- sowie Ca²⁺-Kanäle notwendige Komponenten zur Induktion der H₂O₂-Synthese sind. Eine Elicitor-induzierte Änderung der K⁺-Homöostase schien dagegen nicht wesentlich an der Signaltransduktion des „oxidative burst“ beteiligt zu sein. Ihr konnte eher eine regulierende Funktion der frühen Abwehrreaktionen zugesprochen werden. Desweiteren wurde festgestellt, dass neben dem Einstrom externen Ca²⁺ auch die intrazellulären IP₃-aktivierten Ca²⁺-Speicher für die Elicitor-induzierte Synthese von H₂O₂ erforderlich sind. Die vergleichende Aktivitätsanalyse der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5) machte eine differenzierte Induktion des Phenylpropanoid-Weges durch verschiedene elicitierende Signale deutlich. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass auch der synergistische Endophyt *G. diazotrophicus* eine, wenn auch deutlich abgeschwächte, Abwehrreaktion in den Süßkartoffelzellen induzierte. Dies konnte durch „oxidative burst“-Messungen sowie im Alkalisierungstest untermauert werden. HPLC-Analysen dokumentierten einen Anstieg der Auxin-Synthese in Mischkulturen der Organismen *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Dabei ließ das Auxin eine mögliche Funktion als Suppressor einer pflanzlichen Abwehrreaktion erkennen.

Die Untersuchungen des cytosolischen pH-Signals elicierter Süßkartoffelzellen wurden mittels der Fluoreszenzmessung von BCECF-beladenen Pflanzenzellen durchgeführt. Ein Pathogen-induziertes pH-Signal war stets durch eine anhaltende Azidifizierung charakterisiert. Das Endophyten-induzierte Signal war dagegen zunächst durch eine leichte transiente Azidifizierung gekennzeichnet, gefolgt von einer anhaltenden Alkalisierung. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass eine Unterscheidung zwischen einem Endophyten und einem Pathogen bereits in der frühen Phase der Interaktion eingeleitet wird.

Schlüsselwörter: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Ipomoea batatas*, „oxidative burst“, Pflanzen-Bakterien-Interaktion

Abstract

Within the scope of this thesis, comparative studies of the early and late plant pathogen responses of *Ipomoea batatas* were performed in the presence of both the synergistic endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the phytopathogenic bacterium *Ralstonia solanacearum*. To characterize the signal transduction pathway of H₂O₂-synthesis, the components which are potentially involved were identified by means of effectors. Quantification of H₂O₂-synthesis was carried out using the luminol method. Furthermore, the plant pathogen response was followed by determining the internal and external pH. When analyzing the signal pathway of the oxidative burst in sweet potato cells, previously exposed to an elicitor, there was evidence that phospholipase A₂ (PLA₂) is certainly involved. By using the G-protein activator mastoparan it was shown that heterotrimeric G-proteins contribute to the extracellular alkalinization of the cell, possibly by a direct link to PLA₂. Concerning phospholipase C (PLC), however, no unequivocal evidence could be obtained. In addition, the participation of Ca²⁺-dependent protein kinases (CDPK), but not protein kinase C, in the signal transduction of elicitor induced H₂O₂ synthesis could be shown. A continuous phosphorylation of target proteins of the CDPK turned out to be necessary during the whole course of the oxidative burst. Besides, there was indication that the Ca²⁺-sensor calmodulin is part of the signal transduction pathway. By using specific blockers, Cl⁻- and Ca²⁺-channels were identified as being essential for the induction of H₂O₂-synthesis. However, an elicitor-induced change of the cell K⁺ homeostasis did not seem to influence the signal transduction pathway during the oxidative burst. More likely, K⁺ contributed to the regulation of the early plant response. Apart from the influx of external Ca²⁺, it could further be demonstrated that the intracellular IP₃-activated Ca²⁺-storages are also required for the synthesis of H₂O₂. When comparing the activity of phenylalanine-ammonium-lyase (PAL, EC 4.3.1.5), a sophisticated induction of the phenylpropanoid pathway by different eliciting signals was made clear. Moreover, the synergistic endophyte *G. diazotrophicus* was also shown to induce a pathogen response in sweet potato, although it was clearly reduced. This was confirmed by both assaying the oxidative burst and measuring alkalinization. By means of HPLC analyses an increase of the auxin synthesis in mixed cultures of *Ipomoea batatas* and *Gluconacetobacter diazotrophicus* could be demonstrated, indicating that auxins might be involved in the suppression of the plant pathogen response.

Studies of the cytosolic pH-signals in elicited sweet potato cells were carried out by measuring the fluorescence of BCECF-loaded plant cells. A pathogen induced pH-signal was always accompanied by a continuous acidification. However, the signal induced by the endophyte was initially reflected by a slightly transient acidification, followed by a persistent alkalinization. These results suggest that the differentiation between an endophyte and a pathogen is already made in an early phase of the interaction.

Keywords: *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Ipomoea batatas*, oxidative burst, plant-bacteria-interaction

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Zusammenfassung | i |
| Abstract | ii |
| Abkürzungen | vii |
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Interaktionen von Pflanzen und Mikroorganismen | 1 |
| 1.1.1 <i>Ipomoea batatas</i> | 3 |
| 1.1.2 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | 4 |
| 1.1.3 Synergistische Interaktionen | 5 |
| 1.1.4 <i>Ralstonia solanacearum</i> | 7 |
| 1.1.5 Die Pathogenantwort von Pflanzen | 7 |
| 1.1.6 Die Synthese und Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Pflanzen | 9 |
| 1.1.7 Signaltransduktion des „oxidative burst“ | 11 |
| 1.1.8 Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 2 Material und Methoden | 16 |
| 2.1 Verwendete Organismen | 16 |
| 2.2 Kultivierung der Mikroorganismen | 17 |
| 2.2.1 Dauerkulturen der Mikroorganismen | 17 |
| 2.3 Induktion und Kultivierung von festen und suspendierten Süßkartoffel-Zellkulturen | 18 |
| 2.3.1 Initialisierung einer Kalluskultur aus sterilem Pflanzenmaterial | 18 |
| 2.3.2 Kalluskultivierung auf MS-Festmedium | 18 |
| 2.3.3 Induktion von Suspensionskulturen aus Kalluszellen | 19 |
| 2.3.4 Transfer der Suspensionskulturen | 20 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 2.3.5 | Parameter zur Kultivierung der verwendeten Pflanzenzellkulturen | 21 |
| 2.4 | Kulturmedien | 21 |
| 2.4.1 | LGI-P-Medium | 21 |
| 2.4.2 | Nähragar | 22 |
| 2.4.3 | BG-Medium zur Kultivierung von <i>Ralstonia solanacearum</i> | 22 |
| 2.4.4 | Phosphat-gepufferte-Saline (PBS) | 22 |
| 2.4.5 | MS-Medium zur Kultivierung von <i>Ipomoea batatas</i> | 23 |
| 2.4.6 | Vorinkubationsmedium für Lumineszenz-Messung | 24 |
| 2.5 | Alkalisierungstest | 24 |
| 2.6 | Quantifizierung der H ₂ O ₂ -Produktion durch Chemilumineszenz | 25 |
| 2.7 | Fluoreszenzspektroskopische Messung des cytosolischen pH-Wertes | 26 |
| 2.7.1 | Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläschen zur Fixierung von Pflanzenzellen | 28 |
| 2.8 | HPLC-Messtechnik | 29 |
| 2.8.1 | Grundlagen der High-Pressure-Liquid-Chromatographie | 29 |
| 2.8.2 | Vorbereitung der Zellkulturen | 30 |
| 2.8.3 | Festphasenextraktion | 31 |
| 2.8.4 | HPLC-Analyse | 32 |
| 2.9 | Aktivitätsmessung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) | 32 |
| 2.10 | Isolation des Hefeextrakt-Elicitors aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 33 |
| 2.11 | Pharmakologische Agenzien | 34 |
| 3 | Ergebnisse | 35 |
| 3.1 | Der Elicitor Invertase | 35 |
| 3.2 | Beteiligung pflanzlicher Ionenkanäle am „oxidative burst“ | 37 |
| 3.2.1 | Beteiligung von Anionenkanälen an der Induktion des „oxidative burst“ | 37 |
| 3.2.2 | Beteiligung von K ⁺ -Kanälen an der Induktion des „oxidative burst“ | 39 |
| 3.2.3 | Beteiligung extrazellulärer Ca ²⁺ -Ionen und Ca ²⁺ -Kanälen der Plasmamembran an der Induktion des „oxidative burst“ | 40 |
| 3.2.4 | Beteiligung von intrazellulären Ca ²⁺ -Speichern am „oxidative burst“ | 42 |
| 3.3 | Beteiligung von Calmodulin am „oxidative burst“ | 43 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Beteiligung von Protein-Kinasen am „oxidative burst“ | 45 |
| 3.5 | Beteiligung von Phospholipasen am „oxidative burst“ | 48 |
| 3.5.1 | Phospholipase A ₂ | 49 |
| 3.5.2 | Phospholipase C | 50 |
| 3.6 | Extrazelluläre pH-Wertmessung - Alkalisierungstests | 52 |
| 3.6.1 | Invertase-induzierte externe Alkalisierung | 53 |
| 3.6.2 | Alkalisierungstest in Anwesenheit des Anionenkanal-Blockers DIDS | 53 |
| 3.6.3 | Mastoparan-induzierte externe Alkalisierung | 54 |
| 3.6.4 | Alkalisierungstest mit dem PLA ₂ -Inhibitor HELSS | 56 |
| 3.6.5 | Bakterien-induzierte externe Alkalisierung | 57 |
| 3.7 | HPLC-Analyse verschiedener Zellkulturen | 58 |
| 3.7.1 | Einfluss des Auxins Indol-3-Essigsäure auf die externe Alkalisierung | 60 |
| 3.8 | Das Phytopathogen <i>Ralstonia solanacearum</i> als Induktor des „oxidative burst“ | 61 |
| 3.9 | „oxidative burst“-Messungen mit dem Endophyten <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | 64 |
| 3.10 | PAL-Aktivität | 66 |
| 3.11 | Cytosolische pH-Wertmessungen in Süßkartoffelzellen | 67 |
| 3.11.1 | Kontrolle der Beladung von Süßkartoffelzellen mit dem pH- sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM | 68 |
| 3.11.2 | Änderung des cytosolischen pH-Wertes nach Elicitierung mit HE und In- vertase | 70 |
| 3.11.3 | Intrazellulärer pH-Wert bei Kontakt mit <i>Ralstonia solanacearum</i> | 72 |
| 3.11.4 | Intrazellulärer pH-Wert bei Kontakt mit <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | 74 |
| 3.11.5 | Vergleich des Intrazellulären pH-Signals | 75 |
| 4 | Diskussion | 77 |
| 4.1 | Die Rolle des Auxins IAA bei der Pflanzen-Bakterien Interaktion | 77 |
| 4.2 | Bedeutung der veränderten Ionenströme bei Elicitierung von Süßkartoffel- Suspensionszellen | 79 |
| 4.3 | Die Beteiligung von Phospholipasen am „oxidative burst“ | 81 |
| 4.4 | G-Proteine als Mittler in der Signaltransduktionskette | 83 |
| 4.5 | Beteiligung von Protein-Kinasen am „oxidative burst“ | 84 |
| 4.6 | Mikroorganismen-induzierte Abwehrreaktionen in Süßkartoffelpflanzen | 86 |
| 4.7 | Stimuli-abhängige cytosolische pH-Signale | 89 |
| 4.7.1 | Modell der Signaltransduktion früher Abwehrreaktionen von <i>Ipomoea batatas</i> | 92 |

| | |
|--|------------|
| Literaturverzeichnis | 95 |
| Anhang | 112 |
| Eidesstattliche Versicherung | 112 |

Abkürzungen

| | |
|------------------|--|
| 2-APB | 2-Aminoethoxydiphenylborat |
| Abb. | Abbildung |
| AM | <i>Acetomethyl</i> |
| APX | Ascorbat-Peroxidase |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BCECF | (2',7'-Bis[2-Carboxyethyl]-5-[und-6]-Carboxyfluoreszein) |
| BG | Nährmedium für rs |
| bp | Basenpaare |
| Ca ²⁺ | Kalzium (-Ion) |
| cADPR | zyklische Adenosindiphosphat-Ribose |
| cAMP | zyklisches Adenosinmonophosphat |
| Cl ⁻ | Chlorid (-Ion) |
| cm | Zentimeter |
| d | day, Tag |
| DAG | Diacylglycerin |
| DIDS | 4,4'-Diisothiocyanostilben-2,2'-disulfonsäure |
| dm | Dezimeter |
| DSM | Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen |
| EC | Enzyme Classification |
| EGTA | Ethylenglycerin-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure |
| engl. | englisch |
| EPS | Exopolysacchariden |
| ER | Endoplasmatisches Reticulum |
| Fa. | Firma |
| g | Gramm |
| G-Protein | GTP bindendes Protein |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GF109203X | 2-[1-(3-Dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimid, Bisindolylmaleimid |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | hour, Stunde |
| HE | Hefeextrakt-Elicitor |
| HELSS | <u>H</u> aloenol <u>L</u> actone <u>S</u> uicide <u>S</u> ubstrate |

| | |
|-------------------------------|---|
| H ₂ O ₂ | Wasserstoffperoxid |
| HO ₂ · | Hydroperoxyl-Radikal |
| HPLC | High-Performance-Liquid-Chromatographie |
| IAA | indole acetic acid, Indol-3-Essigsäure |
| IP ₃ | Inositoltriphosphat |
| K-252a | Ser/Threo Protein Kinasen |
| K ⁺ | Kalium (-Ion) |
| kd | Kilo-Dalton |
| kg | Kilogramm |
| LaCl ₃ | Lanthan-Chlorid |
| LGI-P-Medium | Selektiv-Medium für <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| M | molar |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | millimolar |
| MS | Murashige & Skoog |
| N | nitrogen, Stickstoff |
| N ₂ | molekularer Luftstickstoff |
| NA | Nähr-Agar |
| NAA | naphtalene acetic acid, 1-Naphtylessigsäure |
| NADPH | Nicotinamid-Adenin-Dinukleotidphosphat |
| NH ₃ | Ammoniak |
| nm | Nanometer |
| nM | nanomolar |
| O ₂ ⁻ | Superoxidanionen |
| OAG | Oleyl-Acetyl-Glycerin |
| OD ₅₇₈ | Optische Dichte gemessen bei 578 nm |
| PAL | Phenylalanin-Ammonium-Lyase |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PC | Personal Computer |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat |

| | |
|-----------------------|---|
| PLA ₂ | Phospholipasen A ₂ |
| PLC | Phospholipasen C |
| PLD | Phospholipasen D |
| PMA | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, Phorbolester |
| PS-Röhrchen | Polystyrol-Röhrchen |
| PtdOH | Phosphatidsäure |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RLU/s | relative light units per second |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| rRNA | ribosomale Ribonukleinsäure |
| s.o. | siehe oben |
| sec | Sekunde |
| SOD | Superoxiddismutase |
| TEA | Tetraethylammoniumchlorid |
| TFP | Trifluoperazin |
| U-73122 | 1-[6-((17b-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-1H-pyrrole-2,5-dione |
| U-73343 | 1-[6-((17b-3-Methoxyestra-1,3,5(10)-trien-17-yl)amino)hexyl]-2,5-pyrrolidinedione |
| u. a. | unter anderem |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV-Licht | Ultraviolettes Licht |
| VIM | Vorinkubationsmedium |
| w/w | weight per weight |
| z.B. | zum Beispiel |
| <i>PR</i> -Genen | <i>pathogenesis related</i> -Gene |
| µg | Mikrogramm |
| µg · ml ⁻¹ | Mikrogramm pro Milliliter |
| µl | Mikroliter |
| µM | mikromolar |
| °C | Grad Celsius |
| ø | Durchmesser |

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Interaktionen von Pflanzen und Mikroorganismen

In der natürlichen Umgebung von Pflanzen kommt es zu diversen Wechselbeziehungen mit Mikroorganismen. Dies kann sich in Form eines Befalls durch pathogene Pilze, Bakterien oder Viren manifestieren oder im Falle einer Interaktion mit synergistischen Mikroorganismen als Assoziation oder Symbiose ausprägen. Der Begriff Synergismus soll in diesem Kontext als ein Zusammenwirken zweier Organismen verstanden werden, die sich gegenseitig im Wachstum und Stoffwechsel fördern. Als Symbiosen werden Organismen-Interaktionen bezeichnet, die durch ihr enges Zusammenleben morphologischen sowie physiologischen Veränderungen unterliegen. Diese gegenseitige Anpassung ermöglicht es einen maximalen Nutzen aus diesem Zusammenleben zu ziehen. Eine sehr gut untersuchte Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen ist die Symbiose zwischen der Pflanzengruppe der Leguminosen und Rhizobien. Subspezies bzw. Biovarianten des Luftstickstoff-fixierenden Bakteriums der Gattung *Rhizobium* bilden wirtsspezifisch mit einer Reihe von Leguminosen-Arten symbiontische Strukturen in Form von Knöllchen aus [Richter 1996]. Erst nach der Ausbildung dieser Knöllchen-Struktur und der damit einsetzende Fähigkeit des Bakteriums Luftstickstoff zu fixieren (Diazotrophie), ist die Symbiose der beiden Organismen voll ausgebildet. Abweichend von den Symbiosen versteht man unter einer Assoziation eine enge Wechselbeziehung zwischen Pflanzen und Mikroorganismen, die ebenfalls im gegenseitigen Nutzen stattfindet, jedoch keine morphologischen Veränderungen der Interaktionspartner verursacht. Zu dieser Gruppe der assoziativen Mikroorganismen zählen eine ganze Reihe von diazotrophen Bakterien, unter ihnen die Gattungen *Azoarcus* spp. [Reinhold-Hurek et al. 1993], assoziiert

mit Kallagras, *Azospirillum* [Patriquin et al. 1983], assoziiert mit Zuckerrohr, Reis, Mais, Hirse, Kallagras und Weizen sowie *Gluconacetobacter diazotrophicus* [Cavalcante und Döbereiner 1988], assoziiert mit Zuckerrohr und Süßkartoffel.

Wie zuvor beschrieben, sind sehr häufig diazotrophe Mikroorganismen an synergistischen Interaktionen beteiligt. Diese sind in der Lage, molekularen Luftstickstoff (N_2) mit Hilfe des Enzyms Nitrogenase zu reduzieren und so in die gebundene Form Ammoniak (NH_3) zu überführen. Der auf diese Weise fixierte Luftstickstoff wird entweder bei Lyse der Bakterien freigesetzt und kann somit vom Interaktionspartner genutzt werden [Boddey et al. 1991], oder er wird aktiv aus dem Bakterium ausgeschleust und ist so dem pflanzlichen Interaktionspartner zugänglich [Cojho et al. 1993]. Der Prozess der Luftstickstofffixierung ist sehr energieaufwendig und unterliegt komplexen Regulationsmechanismen. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei die sehr hohe Sauerstoffempfindlichkeit des Enzyms Nitrogenase. Bereits ein geringer Sauerstoffpartialdruck zerstört das Enzym und führt zu einer Reprimierung der Neusynthese [Vande Broek et al. 1996]. Dies bedingt die Notwendigkeit, das Enzym vor der Oxidation durch Sauerstoff zu schützen. Innerhalb der Gruppe von diazotrophen Mikroorganismen entwickelten sich im Verlauf der Evolution vielfältige Strategien zur Lösung dieses Problems [Richter 1996]. So sind einige Bakterienarten in der Lage, Exopolysaccharidschichten zu bilden, die für den Sauerstoff eine Diffusionsbarriere darstellen. Andere Bakterien können wiederum ihre Respirationsrate so stark erhöhen, dass der störende Sauerstoff veratmet wird. Die besonderen Anforderungen an die unmittelbare Umgebung des diazotrophen Mikroorganismus stellen gewisse Ansprüche an die Wirtspflanze. Dazu zählt unter anderem das Vorhandensein einer leicht zugänglichen und großen Nährstoffquelle zur Versorgung der Mikroorganismus mit Energie. Um sich eine pflanzliche Energiequelle nutzbar zu machen, muß der Mikroorganismus eine sehr enge Wechselbeziehung mit der Pflanze eingehen. Dies wird durch die Anheftung an der Pflanze gewährleistet oder das Bakterium dringt zur Besiedlung in das Pflanzengewebe ein. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage nach der Unterscheidungsmöglichkeit der Pflanze zwischen einem potentiellen Pathogen und einem synergistischen Mikroorganismus. Inzwischen sind grundlegende Kenntnisse über die Ausbildung dieser differenzierten Erkennung durch die Pflanze bekannt [Bashan und Holguin 1996]. Allerdings sind die molekularen Mechanismen der Signalweiterleitung auf zellulärem Niveau, die zu der Induktion einer solchen synergistischen Interaktion führen oder aber in die Auslösung von Abwehrmaßnahmen münden, noch nicht voll verstanden. Nur mit diesen Kenntnissen wäre es jedoch möglich, durch gezielte Veränderungen von Pflanzen bzw. Mikroorganismen auf genetischer Ebene, eine Kommunikation zwischen Organismen zu vermitteln, die natürlicherweise keinen Kontakt miteinander haben. In diesem Zusammenhang treten insbesondere Kulturpflanzen in den Blickpunkt des Interesses, da

bei Wechselbeziehungen, die zum gegenseitigen Nutzen der Interaktionspartner führen, oftmals ertragsteigernde Effekte beobachtet wurden [Pereira et al. 1988]. Es wäre daher sinnvoll, solche wachstumsfördernden Einflüsse von Mikroorganismen in der Landwirtschaft zu nutzen, nicht zuletzt deshalb, um den Einsatz von chemischen Düngemitteln zu vermeiden und somit auch eine Reduzierung der Grundwasserbelastung durch ausgewaschenen Dünger zu erreichen. Auch unter ökonomischen Gesichtspunkten ist der Ansatz, eine natürliche Wachstumsförderung zu etablieren, sinnvoll, denn Düngemittel sind im Allgemeinen teuer und energetisch aufwendig herzustellen. Hinzu kommt, dass aufgrund des bereits zuvor genannten Auswaschungsprozesses die Wirkung des Düngemittels nur kurzfristig ist. Das hat zur Folge, dass der Nährstoffbedarf der Kulturpflanzen, vor allem an gebundenem Stickstoff, nur durch regelmäßiges Düngen gedeckt werden kann und somit erhebliche Kosten verursacht.

1.1.1 *Ipomoea batatas*

Die Süßkartoffel, *Ipomoea batatas* (L.) Lam., gehört zu der Pflanzenfamilie *Convolvulaceae*. Sie zählt zu den fünf wichtigsten Kulturpflanzen der Erde, wobei sich ihr Verbreitungsgebiet von den tropischen und subtropischen Klimazonen bis hin zu gemäßigteren Klimaten erstreckt [Duke 1983]. Einige grundlegende Wachstumsbedingungen sind nachfolgend aufgelistet:

- jährlicher Niederschlag: 3,1 dm bis 42,9 dm
- Temperaturtoleranz: 8,4 °C bis 28,5 °C
- pH-Wert des Bodens: 4,3 bis 8,7

Im gesamten asiatischen Raum wie China, Indonesien und Südkorea, aber auch in Teilen Afrikas und in Südamerika hat diese Kulturpflanze ihre Hauptverbreitung. In diesen Gebieten hat sich die Süßkartoffel insbesondere in den ärmeren Bevölkerungsschichten als Hauptnahrungsmittel etabliert, da sie leicht vermehrt werden kann und der Anbau keiner besonderen Agrartechnologie bedarf. Neben ihrer Bedeutung als Nahrungsmittel kann die Süßkartoffel auch anderweitig verarbeitet werden und auf diese Weise als Ausgangsmaterial für die Herstellung von Methanol und Ethanol dienen [Gama et al. 1996].

Ipomoea batatas ist einer ganzen Reihe von viralen, pilzlichen und auch bakteriellen Krankheitserregern ausgesetzt, die zur Ausbildung unterschiedlichster Krankheitssymptome führen können. Unter ihnen befindet sich auch das weltweit verbreitete Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*,

das bei Süßkartoffeln eine Welke (*engl.: bacterial wilt*) verursachen kann. Es wurden aber auch Mikroorganismen aus der Pflanzenwurzel isoliert, die keinen pathogenen Charakter haben. Zu diesen Isolaten gehört unter anderem das diazotrophe Bakterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Kapitel 1.1.2). Dieses Bakterium benötigt einen sehr hohen Zuckergehalt in seinem Habitat und findet daher ideale Lebensbedingungen in der Süßkartoffel vor [Paula et al. 1992], die in 100 g Wurzelmaterial ein durchschnittlichen Gehalt von 25,6 bis 31,0 g Kohlenhydrate aufweist.

1.1.2 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5 [Cavalcante und Döbereiner 1988] ist ein gram-negatives, stäbchenförmiges und peritrich begeißeltes Bakterium, das der alpha-Unterklasse der Proteobakterien angehört. Es wurde aus Zuckerrohr (*Saccharum* sp.) [Fuentes-Ramirez et al. 1993, Cavalcante und Döbereiner 1988], der Süßkartoffel (*Ipomoea batatas*) [Paula et al. 1992], Hirsegras (*Pennisetum purpureum*) [Döbereiner 1992] und auch aus der Kaffeepflanze (*Coffea arabica*) [Jimenez Salgado et al. 1997] isoliert. *G. diazotrophicus* wurde in die Familie der *Acetobacteraceae* eingeordnet, da es neben der Anpassung an hohe Zuckerkonzentrationen, eine Reihe weiterer physiologischer Charakteristika dieser Familie aufweist. So ist es befähigt, Ethanol zu Essigsäure zu oxidieren und diese durch nachfolgende Überoxidation in Kohlendioxid und Wasser zu überführen. Zudem zeigt das Bakterium eine sehr hohe Säuretoleranz bis zu einem pH-Wert von 2,5 [Swings 1992]. Ein optimales Wachstum erreicht *G. diazotrophicus* bei einem pH-Wert von 5,8 und 28 °C bis 30 °C sowie einer Saccharosekonzentration von 10%. Innerhalb der Familie *Acetobacteraceae* ist lediglich *G. diazotrophicus* befähigt, molekularen Stickstoff (N₂) mit Hilfe des Enzyms Nitrogenase zu reduzieren und so in eine gebundene Form zu überführen [Gillis et al. 1989]. Auch ein sehr niedriger pH-Wert (bis 2,5) reduziert nicht die Fähigkeit des Bakteriums zur Fixierung von Luftstickstoff [Stephan et al. 1991]. Nitrat repräsentiert bei vielen anderen N₂-fixierenden Bakterien die Nitrogenase und lässt auf diese Weise keine Stickstofffixierung in Anwesenheit dieser Stickstoffquelle zu. Da das Bakterium keine Nitratreduktase besitzt, stellt es auch in Anwesenheit des Nitrats die Stickstofffixierung nicht ein [Cavalcante und Döbereiner 1988]. Diese Besonderheit, N₂ auch in Anwesenheit von Nitrat zu reduzieren, ermöglicht es *G. diazotrophicus*, die Wirtspflanze ergänzend mit gebundenem Stickstoff zu versorgen [Cojho et al. 1993]. Für einen optimalen Austausch solcher Stoffwechselprodukte wie dem gebundenen Stickstoff oder einer anderen Nährstoffquelle ist ein möglichst enger Kontakt der Interaktionspartner von Vorteil. *G. diazotrophicus* löst dieses Problem, indem es den intrazellulären Raum zwischen Zellmembran und Zellwand einer Pflanzenzellen (Apoplasten) besiedelt und wird als

Nutzer eines solchen Habitats auch als Endophyt bezeichnet [Dong et al. 1995]. Die Definition des Begriffes Endophyt umfasst alle Mikroorganismen, die innerhalb ihrer Wirtspflanzen leben und deren Anwesenheit weder zur Ausbildung von symbiontischen Strukturen führt noch eine Induktion von Abwehrreaktionen hervorruft.

Der Endophyt *G. diazotrophicus* gehört zu den leistungsfähigsten nicht-symbiontischen Stickstofffixierern mit Eintragsraten von bis zu 150 kg N pro Hektar und Jahr [Urquiaga et al. 1989, Boddey et al. 1991, Urquiaga et al. 1992]. Dieser Wert liegt in etwa auf dem Niveau der effektivsten symbiontischen Stickstofffixierer, zu denen die Gattung *Rhizobium* gehört. *G. diazotrophicus* ist bisher der einzige Endophyt, bei dem die Fixierung des Luftstickstoffs über den Eigenbedarf hinaus nachgewiesen wurde und ein aktiver Transfer von Aminokomponenten zur Pflanze vorhanden ist.

Bei vielen Interaktionen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen wurde die Beobachtung gemacht, dass offensichtlich Auxine bei der Erkennung involviert sind. In Pflanzengeweben fördern Auxine in niedriger Konzentration das Streckungswachstum von Koleoptilen (Sproßscheide), den Sproßachsen und der Wurzel. Bei höheren Konzentrationen wird das Wachstum der Wurzel und des Sprosses durch die Stimulation der Ethylensynthese gehemmt [Martinez Noel et al. 2001]. Auxine wirken zudem bei einer Vielzahl anderer Differenzierungs- und Wachstumsprozesse mit. Sie fördern die Plasmaströmung der Pflanzenzellen und verursachen einen Protonenefflux aus der Zelle [Johri und Mitra 2001]. Eine ganze Reihe von Bakterien besitzen die stoffwechselphysiologische Fähigkeit zur Synthese des Auxins Indol-3-Essigsäure [Manulis et al. 1998]. Die Bedeutung und Funktion der bakteriellen Auxinsynthese ist nach wie vor nicht eindeutig geklärt, eine Wirkung des bakteriellen Auxins über die Unterstützung des Pflanzenwachstums hinaus ist jedoch wahrscheinlich. So gibt es bereits Hinweise, dass Auxin im Zusammenhang mit der Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen [Robinette und Matthysse 1990] korreliert werden kann und die Ausbildung synergistischer Bakterien-Pflanzen Interaktionen beeinflusst [Lambrecht et al. 2000]. Somit kann das Auxin als eine Signalsubstanz zur Kommunikation zwischen Bakterium und Pflanze interpretiert werden.

1.1.3 Synergistische Interaktionen

Anders als beim Befall einer Pflanze mit einem Pathogen wird die Interaktion mit synergistischen Mikroorganismen nicht von einer massiven Induktion von Abwehrreaktionen begleitet. Dies liegt zum einen darin begründet, dass zwischen der Pflanze und dem Bakterium spezifische Mechanis-

men der Erkennung, wie Rezeptoren und Signalsubstanzen, beteiligt sind. Zum anderen ist das Phänomen zu beobachten, dass die synergistischen Bakterienarten Strategien entwickelt haben, die zur Unterdrückung pflanzlicher Abwehrreaktionen führen. An diesen Mechanismen können einige Stoffwechselprodukte wie z.B. Zuckerderivate und Phytoeffektoren beteiligt sein, die von einem der beiden Interaktionspartner synthetisiert werden [Bhagwat et al. 1999]. Erste Erkenntnisse wurden dabei bereits mit der symbiontischen Bakteriengattung *Rhizobium* gewonnen, wohingegen bei den Assoziationen noch wenig darüber bekannt ist. Die Rhizobien gehören zu der Gruppe stickstofffixierender Mikroorganismen und bilden Symbiosen mit Mitgliedern der Pflanzenordnung *Fabales* [Richter 1996]. Eine der charakteristischen Signalsubstanzen zur Erkennung des Symbiosepartners von *Rhizobium* sind die Nod-Faktoren [Felle et al. 2000]. Diese von den Bakterien synthetisierten Lipochitooligosaccharide (LCO) induzieren die Knöllchenbildung im Wurzelgewebe der Pflanze und scheinen einen reprimierenden Effekt auf pflanzliche Abwehrreaktionen zu haben. Derzeit wird ferner diskutiert, ob die Pathogenantwort einer Pflanze bei der Ausbildung einer Symbiose oder Assoziation durch sogenannte Suppressor-Moleküle unterdrückt werden kann. Hinweise für diese Annahme wurden wiederum bei den symbiontischen Rhizobien gefunden, welche Lipopolysaccharide (LPS) in ihrer Membran besitzen, die als Suppressoren pflanzlicher Abwehrreaktionen identifiziert wurden [Niehaus et al. 1998]. Lipopolysaccharide sind Bestandteile der äußeren Membran aller gram-negativen Bakterien und zeichnen sich durch eine sehr große Diversität in ihrer molekularen Zusammensetzung aus. Dies macht sie für eine art- oder sogar stammspezifische Erkennung der Interaktionspartner besonders geeignet. Ferner wird auch die Beteiligung von Exopolysacchariden (EPS) an verschiedenen Stufen zur Etablierung einer symbiontischen Interaktion vermutet [Niehaus et al. 1993, Niehaus et al. 1998]. Exopolysaccharide sind Komponenten der Zelloberfläche von Bakterien und an der Zelladhäsion beteiligt.

Neben den bisher genannten Suppressor-Molekülen wird auch der Phytoeffektor Indol-3-Essigsäure (*engl.*: Indole-3-acetic acid; IAA, Auxin) mit der Inhibierung von pflanzlichen Abwehrreaktionen in Verbindung gebracht. Die Fähigkeit zur Synthese von IAA ist in vielen pathogenen sowie synergistischen Bakterienarten zu finden. So bedienen sich bestimmte Pseudomonaden-Arten dieses Mechanismus, um ihren potentiellen Wirt leichter besiedeln zu können [Robinette und Matthyse 1990]. Derzeit wird diskutiert, ob die Indol-3-Essigsäure auch bei der Ausbildung synergistischer Pflanzen-Bakterien Interaktionen maßgeblich beteiligt sein könnte. Es gibt Hinweise darauf, dass das Auxin den Prozess der Ausbildung einer Interaktion zwischen *Azospirillum* und *Arabidopsis thaliana* fördert [Lambrecht et al. 2000].

1.1.4 *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum ist ein gram-negatives, aerobes, polar begeißeltes Bakterium. Die Gattung *Ralstonia* wird in die beta-Unterklasse der *Proteobacteria* eingeordnet und wird der rRNA-Homologie Gruppe II des Taxons *Pseudomonas* zugeordnet [Wullings et al. 1998]. Neben vielen anderen Bakterien dieser Gruppe ist auch *R. solanacearum* ein potentiell Pathogen und als solches Verursacher vieler Krankheiten in Kulturpflanzen (z.B. Ringfäule und Schleimkrankheit der Kartoffel). Es ist stoffwechselphysiologisch eng an das pflanzliche Habitat angepasst, kann aber bis zu zwei Jahre bei gemäßigten Temperaturen ohne geeignete Wirtspflanze im Boden überleben. Die Art *Ralstonia solanacearum* wird in verschiedene Rassen und Biovarianten unterteilt. Dabei beruht die Zuordnung der Rassen auf ein unterschiedliches Wirtsspektrum und die Differenzierung der Biovarianten auf eine stoffwechselphysiologische Klassifizierung [French et al. 1995]. Das Bakterium *Ralstonia solanacearum* Rasse 3 Biovariante 2 stellt ein natürliches Pathogen der Süßkartoffel dar und wurde ebenfalls aus der Kartoffel- und der Tomatenpflanze isoliert [Elsas et al. 2000].

1.1.5 Die Pathogenantwort von Pflanzen

Pflanzen schützen sich vor dem Eindringen pathogener Mikroorganismen mit der Induktion einer Vielzahl von Abwehrreaktionen. Die Induktion einer solchen Pathogenantwort läßt sich in drei Phasen untergliedern, die wiederum eine ganze Reihe einzelner Signalschritte umfassen können [Eltner et al. 1996]. In der ersten Phase zur Auslösung einer pflanzlichen Abwehrreaktion bedarf es eines externen Stimulus, für den sogenannte Elicitoren verantwortlich sind. Der Ausdruck „Elicitor“ wurde ursprünglich für Moleküle und Stimuli verwendet, die eine Synthese und Akkumulation von antimikrobiellen Komponenten (Phytoalexine) in Pflanzenzellen induzieren. Der Begriff wird heute allerdings weiter gefasst und beinhaltet alle Moleküle, die im Allgemeinen pflanzliche Abwehrreaktionen auslösen können. In der Regel werden diese Moleküle von dem Pathogen freigesetzt, es sind aber auch Elicitoren bekannt, die pflanzlichen Ursprungs sind. Es werden eine Reihe unterschiedlicher biotischer und abiotischer Elicitoren voneinander unterschieden. Als biotische Elicitoren konnten Substanzen aus pilzlichen, bakteriellen und pflanzlichen Zellwänden isoliert werden, die bei der Infektion mit einem Pathogen im Apoplasten der Pflanzenzelle ihre Wirkung entfalten. Zu ihnen zählen Oligosaccharide (Glucane), Glucosamine (z.B. Chitosan), Glykoproteine und Polypeptide [Hahn 1996]. Als abiotische Elicitoren sind Schwermetallsalze oder UV-Licht zu nennen, deren Wirkung aber lediglich auf die Freisetzung biotischer Elicitoren beschränkt ist [Eltner et al. 1996].

Die zweite Phase der Induktion einer pflanzlichen Abwehrreaktion beginnt mit der Erkennung des Elicitors durch geeignete Rezeptoren in der pflanzlichen Zellmembran [Hahn 1996]. Sie umfasst eine Reihe lokal wirksamer Abwehrreaktionen und ist durch ein komplexes Netzwerk von Signalkaskaden charakterisiert, an deren Ende sich die Aktivierung von sogenannten *PR*-Genen (*pathogenesis related*) anschließt [Somssich und Hahlbrock 1998]. Die *PR*-Gene codieren häufig für sogenannte Phytoalexine [Jabs et al. 1997]. Dies sind Substanzen, die sowohl antibakteriell wirken als auch das Wachstum von Pilzen beeinträchtigen können. Unmittelbar nach der Ausbildung eines Elicitor-Rezeptor-Komplexes kommt es zur Aktivierung von pflanzlichen Ionenkanälen. Dies führt zu einer Veränderung der Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Pflanzenzelle und damit zu einer Ladungsverschiebung an der Membran [Nürnberg et al. 1994], die schließlich in einer Depolarisation mündet [Felle et al. 2000]. In zahlreichen Zellkulturen (z.B. Tomate, Petersilie) konnte ein Efflux von Kalium- und Chloridionen, sowie der Influx von Kalziumionen und eine veränderte Protonen- Homöostase in der Pflanzenzelle nachgewiesen werden [Gus-Mayer et al. 1998, Elstner et al. 1996]. Diese veränderten Ionenströme und der damit verbundenen Depolarisation ist der Auslöser für eine abwehrspezifische Signaltransduktion in der Pflanzenzelle. Eine weitere schnelle Reaktion in der zweiten Phase der Pathogenantwort ist die Synthese von „reaktiven Sauerstoffspezies“ (*reactive oxygen species*; ROS), die auch unter dem Begriff „oxidative burst“ zusammengefasst wird. Die Einzelheiten des „oxidative burst“ in elicitierten Pflanzenzellen werden im nachfolgenden Kapitel 1.1.6 näher betrachtet. Während der „oxidative burst“ nach Elicitierung der Pflanzenzelle sehr schnell induziert wird und es keinerlei Transkription von Abwehrgenen bedarf, ist die Entwicklung einer dauerhaften Stärkung der Abwehr jedoch von der Transkription vieler Gene abhängig, deren Produkte Abwehrmoleküle darstellen. Zu ihnen gehören die Phytoalexine (antibakteriell) und Komponenten, die dem eindringenden Pathogen eine Barriere bieten, wie etwa Lignine und phenolische Zellwandkomponenten. Viele dieser Genprodukte werden über den Phenylpropanoid-Weg synthetisiert, wobei ihre Vorstufen von der Phenylalanin- Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.5), dem zentralen Eingangsenzym des Phenylpropanoid- Metabolismus, gebildet werden. Die Aktivität dieses Enzyms wird auch als ein nützlicher Marker zur Betrachtung des Pathogenabwehr- spezifischen Phenylpropanoid- Metabolismus herangezogen [Hotter 1997].

In der dritten Phase der Abwehrreaktionen einer Pflanzenzelle kommt es schließlich zu einer Weiterleitung von sogenannten systemischen Signalen. Diese induzieren die Aktivierung von Abwehrmaßnahmen in weit vom ursprünglichen Invasions- und Infektionsort des Pathogens entfernten Gewebeteilen. Als Beispiel einer systemisch wirkenden Signalsubstanz sei das Systemin genannt [Felix und Boller 1995]. Diese Substanz induziert in Tomatenpflanzen die Akkumulation

von Proteaseinhibitoren [Elstner et al. 1996] und unterstützt auf diese Weise die Ausbildung einer Resistenz.

1.1.6 Die Synthese und Funktion von reaktiven Sauerstoffspezies in Pflanzen

Sowohl Pflanzen als auch tierische Zellen besitzen die Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu produzieren und diese auch wieder zu entgiften [Low und Dwyer 1994]. Zu den wesentlichen Entgiftungsmechanismen zählen:

1. Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Dismutation von Superoxidanionen (O_2^-) und dem Hydroperoxyl-Radikal ($HO_2\cdot$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Dismutasen sind metallhaltige Enzyme (Mn, Fe oder Cu/Zn), die sich im Cytosol, in Mitochondrien, Chloroplasten, Peroxisomen und Glyoxisomen befinden können [Price et al. 1994].
2. Die Ascorbat-Peroxidase (APX) spielt eine wichtige Rolle bei der Beseitigung von H_2O_2 . Das Ascorbat kann auch direkt Radikale wie $\cdot O_2^-$ und H_2O_2 einfangen und sie entgiften. Die Peroxidase wird durch die Dehydroascorbatreduktase, unter Verbrauch von Glutathion, regeneriert. Das Glutathion wird wiederum unter Verbrauch von NADPH von der Glutathionreduktase regeneriert. Auch das Glutathion kann seinerseits direkt mit $HO_2\cdot$ reagieren. Über die Ascorbat-Regeneration hinaus spielt der Ascorbat/ Glutathion Zyklus eine wichtige Rolle bei der Regeneration von α -Tocopherol, welches ein wichtiges Antioxidans zur Beseitigung von Lipidperoxiden ist [Price et al. 1994].
3. Die Katalase ist ebenfalls ein weit verbreitetes Enzym zur Umsetzung von H_2O_2 in H_2O und O_2 . Sie spielt bei der Reduzierung des H_2O_2 -Gehaltes in den Peroxysomen eine signifikante Rolle. Die meisten Katalasen sind in den Peroxysomen lokalisiert, wobei einige auch in den Glyoxysomen nachgewiesen werden konnten [Yang und Poovaiah 2002].

In pflanzlichen Zellen werden ROS, unter normalen physiologischen Bedingungen, während der Assimilation von molekularem Sauerstoff gebildet. Unter Stressbedingungen werden die Entgiftungsreaktionen zeitweise außer Kraft gesetzt, und es wird eine massive Produktion von ROS beobachtet. Dieser Prozess wird als „oxidative burst“ bezeichnet [Elstner et al. 1996] und hat auffallende Ähnlichkeit mit Abwehrreaktionen des tierischen Immunsystems, wo der „oxidative burst“ in Phagozyten beobachtet werden kann. Die sehr schnelle und intensive Bildung von ROS ist ein gemeinsames Merkmal vieler Stressantworten, unter anderem bei mechanischem

Stress [Gus-Mayer et al. 1998, Yahraus et al. 1995], hypoosmotischem Stress [Cazalé et al. 1998] und Pathogenbefall [Rajasekhar et al. 1999b, Rajasekhar et al. 1999a]. Die erhöhte ROS-Konzentration führt zu Zellschädigungen und letztendlich zum Zelltod [Tenhaken et al. 1995], der in erster Linie durch die Zerstörung des Reaktionszentrums im Photosystem II und von Membranlipiden bedingt ist.

Die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies ist, zusammen mit dem Anstieg der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration [Chandra und Low 1997], eine der ersten Reaktionen, die in Pflanzengewebe während einer Interaktion zwischen einem Pathogen und einer Pflanze beobachtet wurden. ca. 30 min nach Beginn des Pathogenbefalls auf, ein zweiter Anstieg kann nach 1.5 bis 6 Stunden nach der Elicitierung beobachtet werden. In einigen Fällen wurde auch bei kompatiblen Interaktionen eine Induktion von ROS gezeigt, allerdings wurde hier nur der erste Peak nachgewiesen, der als eine unspezifische Reaktion angesehen wird. H_2O_2 stellt den größten Anteil stabiler ROS während eines „oxidative burst“ dar, jedoch ist es aufgrund der chemischen Interaktion von H_2O_2 mit O_2^- schwierig festzustellen, welche der beiden Verbindungen zuerst synthetisiert wird [Wojtaszek 1997]. Die Isolierung von pflanzlichen Strukturen, die der tierischen NADPH-Oxidase homolog sind [Barceló 1998], führte zu der Annahme, dass dieses Enzym, ähnlich wie bei den Tieren, die Bildung von ROS während des „oxidative burst“ katalysiert [Amicucci et al. 1999, Tenhaken und Rübel 1998, Mithöfer et al. 1997]. Zudem zeigte sich, dass die NADPH-Oxidase Ca^{2+} -bindende Motive besitzt. Daher ist zu vermuten, dass dieses Enzym durch die Veränderung der cytosolischen Ca^{2+} -Homöostase bei Kontakt mit einem Elicitor aktiviert werden kann. Das Auftreten von ROS ist nicht auf den Apoplasten beschränkt, da H_2O_2 membranpermeabel ist und als solches leicht auch über Lipidmembranen diffundieren kann. Dem zu Folge wird dem H_2O_2 eine Reihe von Funktionen im Zuge einer pflanzlichen Abwehrreaktion zugesprochen:

1. Ein direkter toxischer Effekt auf invasive Mikroorganismen [Wu et al. 1997] ;
2. Förderung des „oxidative cross linking“ der Zellwand durch verstärkte Quervernetzung Hydroxylprolin- und Prolin-reicher Glycoproteine, was einen verbesserten Schutz vor Enzymdegradation zur Folge hat [Tenhaken et al. 1995];
3. Anstieg der Lignin-Polymerbildung in der Zellwand und damit einer Ausbildung einer physikalischen Barriere gegen das Eindringen von Mikroorganismen [Cahill und McComb 1992];
4. Induktion der Phytoalexin-Synthese [Jabs et al. 1997];
5. Funktion als Signalsubstanz auf lokaler bzw. systemischer Ebene [Park et al. 1998].

Der Signalweg, von dem ersten Kontakt der Pflanzenzelle mit einem elicitierenden Stimulus bis zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und der damit verbundenen H_2O_2 -Synthese, ist durch eine Vielzahl an Komponenten bestimmt und reguliert. Eine Übersicht über die wichtigsten Signaltransduktionsschritte wird im nachfolgenden Kapitel 1.1.7 gegeben.

1.1.7 Signaltransduktion des „oxidative burst“

Der „oxidative burst“ einer Pflanzenzelle, dessen Funktion in Kapitel 1.1.6 beschrieben wurde, steht am Ende einer komplexen intrazellulären Signaltransduktionskette. Die Wege über die das Abwehr-stimulierende Signal intrazellulär weiterverarbeitet wird können in verschiedenen Zellsystemen deutlich variieren. Beispielsweise gibt es unterschiedliche Rezeptoren, die zur Signalperzeption genutzt werden können [Hahn 1996]. Andere Variationen konnten in den beteiligten Signalkomponenten des Signalweges aufgedeckt werden. Zu diesen Komponenten gehören verschiedene Protein-Kinasen [Cardinale et al. 2000, Taylor et al. 2001, Budda und Randall 1990] und Phospholipasen [Chandra et al. 1996, Legendre et al. 1993, Taylor und Low 1997]. Zudem sind unterschiedlich aktivierte Ionen-Kanal-Typen [Zimmermann et al. 1997b, Zimmermann et al. 1999] als Teile einer solchen Signaltransduktion identifiziert worden. Andere Signalkomponenten, zu denen vor allem die sogenannten sekundären Botenstoffe gehören, treten hingegen in fast allen Signalwegen auf [Felle 2001, Volotovski et al. 1998b]. In diesem Zusammenhang sind verschiedene Umsetzungsprodukte von Phospholipasen [Chandra et al. 1996, Legendre et al. 1993], aber auch das cAMP [Assmann 1995] und vor allem die Ca^{2+} -Ionen zu nennen.

In der Abbildung 1.1 ist ein schematischer Verlauf der Signalweiterleitung in einer elicitierten Pflanzenzelle vereinfacht dargestellt. Der Kontakt einer Pflanzenzelle mit einem elicitierenden Stimulus veranlasst eine drastische Veränderung der Ladungsverteilung an der pflanzlichen Zellmembran. Dies wird durch die Ausbildung eines Elicitor-Rezeptor-Komplexes induziert. Die Änderungen der Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zellmembran werden bereits wenige Sekunden bis Minuten nach Elicitierung detektiert. Dabei ist insbesondere der Efflux von Kalium- und Chloridionen, sowie der Influx von Kalziumionen zu beobachten [Elstner et al. 1996]. Als eine indirekte Folge der Ionenflüsse über die Zellmembran kommt es zu einer verzögerten Alkalisierung des externen Mediums [Pachten und Barz 1999]. Die Ursache dafür ist zum einen die puffernde Wirkung ausströmender Anionen organischer Säuren und zum anderen die Bindung von H^+ bei der einsetzenden H_2O_2 -Synthese, die durch das membranständige Enzym NADPH-Oxidase katalysiert wird [Elstner et al. 1996, Gus-Mayer et al. 1998]. Diese externen pH-Wertänderungen liefern einen guten Nachweis für den Beginn der frühen Abwehrreaktionen.

Bei der Elicitierung einer Pflanzenzelle ändert sich aber nicht nur der extrazelluläre pH-Wert, sondern auch der pH-Wert des Cytosols. Dabei scheint es von der Art des externen Stimulus abzuhängen, ob es zu einer vorübergehenden Azidose oder einer Basidose kommt. Der auf diese Weise gesteuerte cytosolische pH-Wert stellt damit eine weitere Möglichkeit der Zelle dar, auf externe Stimuli differenziert zu reagieren [Felle et al. 2000]. Eine ähnliche Funktion wird auch dem cytosolischen Ca^{2+} zugesprochen und bedarf daher einer gesonderten Betrachtung.

Kalziumionen haben in der Zelle eine wesentliche Aufgabe als sekundäre Botenstoffe und können in dieser Funktion die Aktivitätszustände von Enzymen oder anderen Proteinen in den Zellen direkt beeinflussen [Trewavas und Malhó 1998, Volotovski et al. 1998b, Xing und Jordan 2000, Yang und Poovaiah 2002, Romeis et al. 2000]. In diesem Zusammenhang ist sowohl das cytosolische, als auch das extrazelluläre Ca^{2+} von Bedeutung. So unterbleibt bspw. bei Messungen von elicitierten Pflanzenzellen in kalziumfreien Kulturmedien die Induktion der antibakteriell wirkenden Phytoalexinen, oder auch die Auslösung des „oxidative burst“. Das extrazelluläre Ca^{2+} kann als ein überdurchschnittlich großer Speicher angesehen werden, der bei Bedarf durch Öffnen von Ca^{2+} -Kanälen in der Plasmamembran genutzt werden kann. Zu den wichtigsten intrazellulären Ca^{2+} -Speichern gehören die Vakuole (1-10 mM), das Endoplasmatische Reticulum (1 mM) und die Mitochondrien (1 mM) [Trewavas und Malhó 1998]. Obwohl ihre Speicherkapazität im Vergleich zum externen Milieu gering ist, scheinen sie für die Signalinduktion und auch Weiterleitung eine zentrale Funktion zu übernehmen [Lecourieux et al. 2002]. Über die Modulation des intrazellulären Ca^{2+} -Signals bietet sich der Pflanze die Möglichkeit, differenzierte Signalwege zu induzieren. So wurden temporäre und lokale Veränderungen der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration abhängig vom auslösenden Stimulus detektiert. Hinzu kommt die Variation der Amplitude des Ca^{2+} -Signals, die ebenfalls eine differenzierte Antwort auf einen spezifischen Stimulus bietet [Trewavas und Malhó 1998]. Es gibt inzwischen hinreichende Belege dafür, dass auch Calmodulin [Harding et al. 1997a, Harding und Roberts 1998] bzw. Proteine mit einer Calmodulin-ähnlichen Kalziumbindungsstelle [Stone und Walker 1995] in die Ca^{2+} -abhängige Signalweiterleitung involviert sein können. Calmodulin ist ein hoch konservierter und gut charakterisierter Ca^{2+} -Sensor. Es besitzt nur ein geringes Molekulargewicht von 17 kd und weist vier Ca^{2+} -bindende Motive auf. In Pflanzen wurden bereits mehrere Isoformen identifiziert, deren Expression von der Art des extern auftretenden Stimulus abhängig ist [Reddy 2001]. Das Calmodulin steuert die Aktivität von Calmodulin-abhängigen Protein-Kinasen, denen unter anderem eine Beteiligung am „oxidative burst“ in Pflanzenzellen zugesprochen wird [Harding und Roberts 1998].

Eine weitere, bereits aus dem tierischen System bekannte signalvermittelnde Molekülgruppe sind die heterotrimeren G-Proteine. Ihre Beteiligung auch an pflanzlichen Signaltransduktionswegen ist gesichert [Hebe et al. 1998, Rajasekhar et al. 1999b, Vera-Estrella et al. 1994, Mahady et al. 1998]. G-Proteine sind GTP-bindende Rezeptormoleküle [Millner und Causier 1996], die bei Aktivierung das zunächst gebundene GDP durch GTP ersetzen. Daraufhin dissoziiert das Heterotrimer in eine GTP-beladene α -Untereinheit und einem Dimer, bestehend aus der β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bewegt sich in der Membran bis zu seinem Zielprotein und aktiviert dieses. Mögliche Zielproteine stellen unter anderem die Phospholipasen dar [Munnik et al. 1998]. So wurde eine Interaktion der G-Proteine mit den Phospholipasen C, A₂ und D in elicitierten Pflanzenzellen nachgewiesen [Chapman 1998]. Die Phospholipase C (PLC) katalysiert die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat (PIP₂) zu Inositoltriphosphat (IP₃) und Diacylglycerin (DAG). Das IP₃ ist ein besonders wichtiger sekundärer Botenstoff in der Zelle. Es induziert die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Ca²⁺-Speichern [Volotovski et al. 1998a]. Auf diese Weise nimmt es Einfluss auf die Ca²⁺-Homöostase der Zelle und somit auch auf den Verlauf vieler Ca²⁺-abhängiger Prozesse [Lecourieux et al. 2002], wie u.a. die Kontrolle und Steuerung calcium-aktivierter Protein-Kinasen [Budda und Randall 1990]. Aber auch das Diacylglycerin (DAG) ist in die pflanzliche Signaltransduktion involviert. Es ist in der Lage, membranständige Protein-Kinasen zu aktivieren [Munnik et al. 1998], die ihrerseits die Signalkaskade der Abwehrgen-Aktivierung steuern und so die Expression von *PR*-Genen induzieren.

Dieses kurz skizzierte Signaltransduktionsschema einer elicitierten Pflanzenzelle variiert jedoch von Pflanzenart zu Pflanzenart und von der Art der Elicitierung. Dies macht eine allgemeingültige Aussage über den Verlauf einer solchen Signalkaskade kaum möglich und muß für jede Pflanzenart separat verifiziert werden.

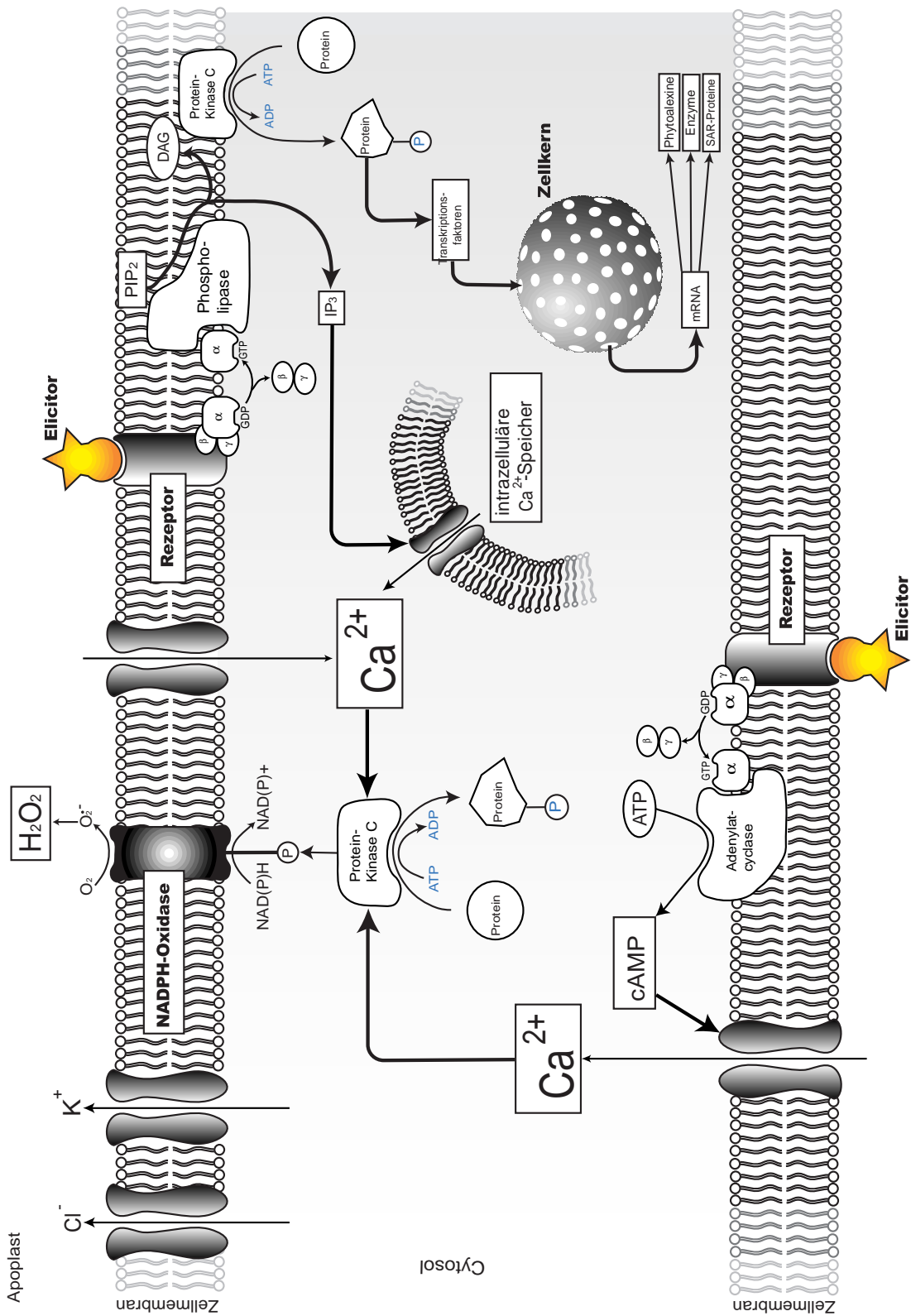


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der wichtigsten Signaltransduktionskomponenten in einer Pflanzenzelle nach Elicitierung. Erläuterung siehe Text.

1.1.8 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die grundlegenden Mechanismen der Wechselbeziehung zwischen der agrarökonomisch bedeutsamen Süßkartoffelpflanze *Ipomoea batatas* und pathogenen sowie synergistischen Mikroorganismen näher zu analysieren. Das Wissen um die Interaktionen mit Mikroorganismen und den sich daraus ergebenden Folgen ist aufgrund der wirtschaftlichen Bedeutung dieser Kulturpflanze von großem Interesse. Zu diesem Zweck sollte eine der wichtigsten „frühen“ Abwehrreaktionen von Pflanzenzellen bei Kontakt mit einem pathogenen Signal, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, bei der Betrachtung der Interaktion herangezogen werden. An dieser auch als „oxidative burst“ bezeichneten Abwehrreaktion, können abhängig vom elicitierenden Reiz, aber auch abhängig von der Pflanzenart, unterschiedliche Signalkomponenten involviert sein. Der Signalweg des „oxidative burst“ der Süßkartoffel wurde auf der Ebene der beteiligten Signalkomponenten noch nicht untersucht. Daher sollten zunächst durch Einsatz von Inhibitoren und Aktivatoren diese Komponenten identifiziert werden und Übereinstimmungen und Abweichungen dieses Signalweges im Vergleich zu anderen Zellsystemen dargelegt werden. Neben dem natürlichen Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* der Süßkartoffel stand mit der Invertase ein neuer Elicitor zur Verfügung, die ähnlich wie das Pathogen Abwehrreaktionen in Süßkartoffelzellen induzieren kann und zudem den Vorteil besitzt, dass der elicitierende Bestandteil genau quantifizierbar ist. Die dabei maßgeblich induzierten Abwehrreaktionen sollten mit Hilfe der Chemilumineszenz-Messung sowie der extra- und intrazellulären pH-Wertmessung charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, ob die Süßkartoffelpflanze auch bei Kontakt mit einem synergistischen Mikroorganismus Abwehrreaktionen einleitet. Zu diesem Zweck sollte *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ein endophytischer Assoziationspartner der Süßkartoffel, eingesetzt werden. Zudem sollte eine vergleichende Betrachtung der Süßkartoffel-Reaktionen auf das Pathogen und den Endophyten durchgeführt werden und gegebenenfalls Differenzen in der Induktion „früher“ pflanzlicher Abwehrreaktionen identifiziert sowie Einblicke in die sich anschließenden „späten“ Abwehrreaktionen erlangt werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Verwendete Organismen

Bei den Mikroorganismen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, handelt es sich um die *Gluconacetobacter diazotrophicus* Stämme Pal5^T und BR11289, sowie dem phytopathogenen Mikroorganismus *Ralstonia solanacearum* biovar 2.

Tabelle 2.1: Verwendete Organismen

| <i>Spezies</i> | <i>Herkunft / Eigenschaften</i> |
|---|---|
| <i>Ipomoea batatas</i> IITA TIS 9465 | Endophytenfreie Pflanze; Zur Verfügung gestellt vom ENEA Casaccia, Rom, Italien |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5 ^T | Isolat aus Zuckerrohr [Gillis et al. 1989], Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen (DSM 5601), Braunschweig |
| <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> BR11289 | Isolat aus Süßkartoffel [Paula et al. 1992]; Zur Verfügung gestellt vom Embrapa/CNPS, Rio de Janeiro, Brasilien |
| <i>Ralstonia solanacearum</i> Rasse 3 biovar 2 | Phytopathogen der Süßkartoffel, Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen (DSM 9544), Braunschweig |

2.2 Kultivierung der Mikroorganismen

Die Bakterien Stämme *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5^T und BR11289 wurden für die Stammhaltung auf LGI-P-Festmedium (Tabelle 2.3) kultiviert. Diese Kulturen wurden bei 30 °C unter einer Inkubationshaube inkubiert. In einem Abstand von 14 Tagen wurden einzelne Kolonien der Bakterienkultur durch Ausstreichen auf frische LGI-P-Festmedienplatten überimpft. Für die Überprüfung des Reinkulturcharakters wurde bei jedem Transfer eine Kolonie des Mikroorganismus in einem Tropfen PBS auf einem Objektträger suspendiert und mikroskopisch auf Kontaminationen geprüft. Flüssigkulturen von *G. diazotrophicus* wurden in MS-Flüssigmedium, sowie in LGI-P-Flüssigmedium ebenfalls bei 30 °C unter der Inkubationshaube auf einem Rundschtüttler mit 160 Upm kultiviert. Das Pytopathogen *Ralstonia solanacearum* wurde nur kurzfristig auf BG-Festmedium, sowie in BG-Flüssigmedium (Tabelle 2.5) unter einer Inkubationshaube bei 30 °C kultiviert, da es bereits nach zwei- bis dreimaligem Überimpfen auf frisches Kulturmedium seine Pathogenität verloren hatte. Dabei wurden die Flüssigkulturen auf einem Rundschtüttler bei 160 Upm inkubiert. Zum Erhalt der Pathogenität des Bakteriums wurde regelmäßig von einer Übernachtkultur eine Dauerkultur hergestellt (Kapitel 2.2.1).

2.2.1 Dauerkulturen der Mikroorganismen

Die Herstellung von Dauerkulturen der Mikroorganismen wurde als vorbeugende Maßnahme gegen unerwünschte Spontanmutationen durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Bakterien in einer Übernachtkultur angezogen und anschließend bei 6000 Upm für 10 Minuten und 4 °C zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in kalter Saline in einer OD₅₇₈ von 2,0 resuspendiert. Ein Aliquot von 800 µl der Bakteriensuspension wurde jeweils mit 200 µl einer 50%igen Glycerinlösung in einem Kryogefäß vereinigt. Dieses Gemisch wurde direkt danach bei –85 °C eingefroren.

2.3 Induktion und Kultivierung von festen und suspendierten Süßkartoffel-Zellkulturen

2.3.1 Initialisierung einer Kalluskultur aus sterilem Pflanzenmaterial

Für die Initialisierung einer Kalluskultur wurden vier Wochen alte endophytenfreie Süßkartoffelpflanzen (*Tab. 2.1*) unter sterilen Bedingungen auf festem MS-Medium (*siehe Tab. 2.7 auf S. 23*) in einem Pflanzen-Zellkultur-Container (*Fa. Duchefa Biochemie BV; Niederlande*) kultiviert. Die sterilen Container wurden für einen besseren Schutz vor Kontamination mit Parafilm® verschlossen. Die Inkubation erfolgte in der Klimakammer unter den in Tabelle 2.2 angegebenen Parametern. Nach vierwöchiger Kultivierung wurden die Sproßmeristeme der Pflanzen mit Hilfe sterilem Präparationsbesteckes isoliert und auf MS-Medium (*siehe Tab. 2.7 auf S. 23*) in sterile Petrischalen überführt. Diese Meristemexplantate wurden wiederum wie in Tabelle 2.2 angegeben inkubiert. Nach 7 bis 12 Tagen kam es an den Schnittstellen der Explantate zu undifferenziertem Zellwachstum. Dieses Zellmaterial wurde mit einem sterilen Präparationsbesteck von dem Meristemexplantaten abgelöst, auf frisches MS-Festmedium überführt und unter den gleichen Bedingungen wie die Meristemexplantate inkubiert (*Tab. 2.2*). Das Wachstum und die Sterilität dieser Zellaggregate wurde über einen Zeitraum von 3 Wochen kontrolliert und nur steriles undifferenziertes Material wurde erneut auf frisches MS-Medium transferiert. Nach dreimaligem Transferieren dieser Zellaggregate (Kapitel 2.3.1) war eine stabile Kalluskultur etabliert.

2.3.2 Kalluskultivierung auf MS-Festmedium

Bei der weiteren Kultivierung der Kalluszellen mußten mehrere Kriterien berücksichtigt werden. Dazu zählten die Sterilität der Kulturen, die Konsistenz und Farbe der Kallusaggregate, sowie das Wachstum der Kalli im Verlauf der Inkubation. Vor jeder Passage der Zellen auf frisches MS-Festmedium (*siehe Tab. 2.7 auf S. 23*) wurde die Sterilität der Kalluskulturen kontrolliert. Die Kontrolle sah zum einen die visuelle Prüfung (makroskopische Betrachtung der Petrischalen) der Zellen vor und zum anderen wurde ein Ausstrich von Stichproben auf Nährmediumplatten (*siehe Tab. 2.4 auf S. 22*) durchgeführt. Diese Sterilitätskontrollen wurden vor jeder Passage der Zellen durchgeführt. Desweiteren wurden nur Zellen transferiert, die eine kräftige Grünfärbung aufwiesen. Kalluskulturen, die eine bräunliche oder hellbeige Farbe zeigten, wurden verworfen, da in diesen der Anteil intakter Zellen deutlich verringert war. Aus den Kalluskulturen, die alle zuvor genannten Kriterien erfüllt hatten, wurden diejenigen Kulturen selektiert, die sich durch besonders

lockere Zellaggregate auszeichneten. Da nur diese sich zur Induktion einer Suspensionskultur eigneten (Kapitel 2.3.3). Nach dreimaliger Durchführung dieses Selektionsvorganges entsprachen alle kultivierten Kalluskulturen den Selektionskriterien. An dieser Stelle sei jedoch erwähnt, dass die Kalluskulturen trotz dauerhafter Kultivierung in der Klimakammer (Tabelle 2.2) einem annualen Rhythmus unterworfen waren. Dieser zeigte sich durch ein deutlich langsames Wachstum und einer verminderten Vitalität im Winter-Zeitraum (Oktober bis Februar). Die Kalluskulturen wurden nach der Selektion alle 21 Tage auf frisches MS-Festmedium transferiert. Der Zelltransfer wurde mit einem sterilen Löffel durchgeführt. Die Zellen wurden vom alten MS-Festmedium abgehoben und in einer sterilen Petrischale gesammelt. Um größere Aggregate zu zerkleinern wurden die Zellaggregate vorsichtig mit dem Löffel zerdrückt und anschließend als dünne Schicht auf mehrere MS-Festmedium Platten ausgestrichen und wie in Tabelle 2.2 beschrieben, inkubiert.

2.3.3 Induktion von Suspensionskulturen aus Kalluszellen

Die Initialisierung von Süßkartoffel-Suspensionskulturen wurde mit den zuvor etablierten Kalluskulturen (Kapitel 2.3.2) durchgeführt. 10 bis 15 Tage nach der zweiten Passage der Kalluszellen (Kapitel 2.3.2) auf frisches MS-Festmedium (*siehe Tab. 2.7 auf S. 23*) wurden 4 g des Zellmaterials mit einem sterilen Löffel von dem MS-Festmedium abgehoben und in ein ebenfalls steriles feinmaschiges Küchensieb (\varnothing 7 cm) aus Metall überführt. Das Sieb wurde auf einem geeigneten sterilen Becherglas plziert und das darin befindliche Kallusmaterial vorsichtig mit dem sterilen Löffel durch die Siebmaschen gedrückt. Dabei war es von Vorteil, wenn die Zellaggregate sich leicht voneinander trennen ließen (Kapitel 2.3.2). Die zerkleinerten Zellaggregate wurden in dem Becherglas aufgefangen. Wenn an dem Sieb Reste des zerkleinerten Zellmaterials zurückgeblieben waren, wurde diese mit 10 ml MS-Flüssigmedium ebenfalls in das Becherglas überführt.

Die in dem Becherglas gesammelten Zellaggregate wurden anschließend mit weiteren 40 ml MS-Flüssigmedium suspendiert. Die Suspension wurde durch vorsichtiges Schütteln durchmischt und schließlich vollständig in einen sterilen 100 ml Erlenmeyerkolben transferiert. Die Erlenmeyerkolben wurden mit sterilen Silikonstopfen verschlossen und dieser wurde zusätzlich mit steriler Alufolie zum Schutz vor Kontaminationen bedeckt. Die Inkubation der Suspensionskulturen wurde wie in Kapitel 2.2 angegeben durchgeführt.

2.3.4 Transfer der Suspensionskulturen

Es wurde beobachtet, dass es bei neu initialisierten Suspensionskulturen zu einer starken Braunfärbung des Kulturmediums kam, die eine Akkumulation von phenolischen Komponenten vermuten ließ. Wahrscheinlich wurden diese von intakten Zellaggregaten als Reaktion auf Zellfragmente freigesetzt, die bei der Zerkleinerung mit dem Sieb (Kapitel 2.3.3) auftraten. Die Zerstörung einzelner Zellaggregate konnte methodisch jedoch nicht ganz vermieden werden. Die sekundären Stoffwechselprodukte führten bei längerer Inkubation zur Induktion einer hypersensitiven Reaktion, die schließlich in einem induzierten Zelltod endete. Aus diesem Grund wurden die neu induzierten Suspensionskulturen in den ersten drei Tagen nach Initialisierung täglich in frisches Medium passagiert. Danach wurden die Zellen einmal pro Woche in frisches MS-Flüssigmedium (*siehe Tab. 2.7 auf S. 23*) transferiert.

Für den Medienwechsel wurden die Zellen für 5 Minuten in dem Erlenmeyerkolben zur Sedimentation stehen gelassen. Zunächst wurde eine Probe des Überstandes steril entnommen und mikroskopisch auf Kontaminationen geprüft. Nach Bestätigung der Sterilität der Zellkultur wurde der Medienüberstand in ein steriles Becherglas dekantiert und sofort durch 50 ml frisches MS-Flüssigmedium ersetzt. 10 bis 14 Tage nach der Initialisierung der Suspensionskultur war die Zellmasse so stark angewachsen, dass die Kultur in zwei bis drei neue Kulturen aufgeteilt werden konnte. Die Teilung solcher Kulturen wurde ab diesem Zeitpunkt einmal wöchentlich durchgeführt. Nach zweimonatiger Kultivierungsdauer der Suspensionskulturen waren die Zellaggregate so groß geworden, dass sie nicht mehr für Messungen benutzt werden konnten und daher verworfen wurden.

2.3.5 Parameter zur Kultivierung der verwendeten Pflanzenzellkulturen

Tabelle 2.2: Kultivierungsparameter in der Klimakammer

| Art der Zellkultur | Temperatur [°C] | Luftfeuchtigkeit [%] | Lichtintensität [Lux] | Tag/Nacht-Rhythmus [h] | Schüttler [Upm] |
|--------------------------|-----------------|----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------|
| endophyten-freie Pflanze | 25 | 55 | 30000 | 12/12 | – |
| Pflanzen-explantate | 27 | 65 | 30000 | 12/12 | – |
| Kallus-kulturen | 27 | 65 | 30000 | 12/12 | – |
| Suspensions-Kulturen | 25 | 55 | 30000 | 12/12 | 180 |

2.4 Kulturmedien

2.4.1 LGI-P-Medium

Tabelle 2.3: LGI-P-Medium (flüssig) zu Kultivierung von *Gluconacetobacter diazotrophicus*

| <i>Mikro-/Makroelemente</i> | | | |
|---|--------|------|----------|
| Rohrzucker | 30,00 | g/l | |
| MgSO ₄ · 7 H ₂ O | 200,00 | mg/l | 0,81 mM |
| NaCl | 100,00 | mg/l | 1,71 mM |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 20,00 | mg/l | 0,14 mM |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 2,00 | mg/l | 82,68 µM |
| FeCl ₃ · 6 H ₂ O | 10,00 | mg/l | 36,99 µM |
| <i>Puffer</i> | | | |
| K ₂ HPO ₄ | 200,00 | mg/l | 1,15 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 600,00 | mg/l | 4,41 mM |
| <i>Zusätzliche Komponenten für LGI-P-Festmedium</i> | | | |
| Hefeextrakt | 20,00 | mg/l | |
| Agar | 16,00 | g/l | |
| pH 6,0 | | | |

Der Puffer, der Rohrzucker und die Mikro/Makroelemente wurden getrennt voneinander autoklaviert und erst nach Abkühlung vereinigt. Dies verhinderte die Bildung von schwerlöslichen Phosphatsalzen.

2.4.2 Nähragar

Tabelle 2.4: NA-Nähragarplatten zur Sterilitätsprüfung der Kalluszellkulturen

| <i>Medium-Komponenten</i> | |
|---------------------------|-----------|
| Pepton | 5,00 g/l |
| Fleischextrakt | 3,00 g/l |
| Agar | 15,00 g/l |
| pH 7,0 | |

2.4.3 BG-Medium zur Kultivierung von *Ralstonia solanacearum*

Tabelle 2.5: BG-Medium zur Kultivierung von *Ralstonia solanacearum*

| <i>Medium-Komponenten</i> | |
|--|-----------|
| Pepton | 10,00 g/l |
| Caseinhydrolysat | 1,00 g/l |
| Hefeextrakt | 10,00 g/l |
| Glucose | 5,00 g/l |
| <i>Zusätzliche Komponenten für MS-Festmedium</i> | |
| Agar | 16,00 g/l |
| pH 7,0 | |

2.4.4 Phosphat-gepufferte-Saline (PBS)

Tabelle 2.6: Phosphat-gepufferte-Saline (PBS)

| <i>Medium-Komponenten</i> | | | |
|----------------------------------|----------|--|-----------|
| KH ₂ PO ₄ | 0,43 g/l | | 3,16 mM |
| Na ₂ HPO ₄ | 1,68 g/l | | 11,83 mM |
| NaCl | 7,2 g/l | | 123,20 mM |
| pH 6,8 | | | |

2.4.5 MS-Medium zur Kultivierung von *Ipomoea batatas*

Tabelle 2.7: MS-Medium zur Kultivierung von *Ipomoea batatas*, modifiziert nach Murashige und Skoog [Murashige und Skoog 1962]

| <i>Mikroelemente</i> | | | |
|---|---------|------|----------|
| CoCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,025 | mg/l | 0,11 μM |
| Cu SO ₄ · 5 H ₂ O | 0,025 | | 0,10 μM |
| FeNaEDTA | 36,70 | | 0,10 mM |
| H ₃ BO ₃ | 6,20 | | 0,10 mM |
| KJ | 0,83 | | 5,00 μM |
| MnSO ₄ · H ₂ O | 16,90 | | 0,10 mM |
| Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O | 0,25 | | 1,03 μM |
| ZnSO ₄ · 7 H ₂ O | 8,60 | | 29,91 μM |
| <i>Makroelemente</i> | | | |
| CaCl ₂ | 332,02 | mg/l | 2,99 mM |
| KH ₂ PO ₄ | 170,00 | | 1,25 mM |
| KNO ₃ | 1900,00 | | 18,79 mM |
| MgSO ₄ | 180,54 | | 1,50 mM |
| NH ₄ NO ₃ | 1650,00 | | 20,61 mM |
| <i>Vitamine</i> | | | |
| Glycin | 2,00 | mg/l | 26,64 μM |
| myo-Inositol | 100,00 | | 0,56 mM |
| Nikotinsäure | 0,50 | | 4,06 μM |
| Pyridoxin HCl | 0,50 | | 2,43 μM |
| Thiamin HCl | 0,10 | | 0,30 μM |
| <i>weitere Komponenten</i> | | | |
| Saccharose | 20,00 | g/l | 58,43 mM |
| DL-Äpfelsäure | 0,10 | | 7,45 mM |
| Caseinhydrolysat | 1,00 | | |
| <i>Phytoeffektoren</i> | | | |
| α-Naphtyl-Essigsäure (NAA) | 1,00 | mg/l | 4,3 μM |
| Benzylaminopurin (BAP) | 1,00 | | 5 μM |
| <i>Zusätzliche Komponenten für MS-Festmedium</i> | | | |
| Saccharose | 30,00 | g/l | 87,64 mM |
| Agar | 16 | | |
| pH 5,8 eingestellt mit 1 M KOH | | | |

2.4.6 Vorinkubationsmedium für Lumineszenz-Messung

Das Vorinkubationsmedium (VIM) wird für die Alkalisierungsmessung, die Chemilumineszenzmessungen und die Fluoreszenzmessungen eingesetzt. Es ist eine 25:1 Verdünnung des flüssigen MS-Mediums (*siehe Kap. 2.7 auf S. 23*).

2.5 Alkalisierungstest

Bei dem Alkalisierungstest wird die pH-Wertänderung des Pflanzensuspensionsmediums in Anwesenheit verschiedener Elicitoren und Effektoren gemessen. Die externe pH-Wertänderung ist eine Folge zellulärer Mechanismen, die nach einer Elicitierung der Pflanzenzelle in Gang gesetzt werden (*siehe Kap. 1.1.7 auf S. 11*). Die Messung wurde mit dem pH-Meter (*inoLab pH Level 2, Fa. WTW*) und angeschlossener pH-Mikroelektrode (*BlueLine 16 Mikro, Fa. Schott*) durchgeführt. Die pH-Mikroelektrode wurde aufgrund ihrer Bauform eingesetzt, da bei größeren Elektroden-durchmessern stärkere Scherkräfte auftraten, die zu unerwünschten Messwertschwankungen führten. Die vom pH-Meter erfassten Messdaten wurden in kontinuierlichen Intervallen über eine Schnittstelle von einem PC erfasst und mit Hilfe einer Datenverarbeitungs-Software (*Software: Multi/ACHAT II Version 1.05, WTW*) ausgewertet.

Durch Vorversuche wurde das optimale Alter der Zellsuspensionskulturen, die Zelldichte, sowie die Schüttlergeschwindigkeit für den Alkalisierungstest ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass Kulturen, die mindestens ein Alter von 2 Wochen erreicht hatten und 2 bis 3 Tage zuvor passagiert worden waren, die höchsten pH-Wertänderungen durch Elicitierung aufwiesen. Im Folgenden wurden ausschließlich Kulturen eingesetzt, die diese Kriterien erfüllten. Die optimale Zelldichte lag bei $125 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in einem Endvolumen von 8 ml Vorinkubationsmedium (VIM Kapitel 2.4.6).

Für die Durchführung der Messungen wurden geeignete Zellsuspensionskulturen (s.o.) der Süßkartoffel durch Abnutschen auf einen Weißband-Filter ($\varnothing 50 \text{ mm}$, *Fa. Schleicher & Schüll*) von ihrem Kulturmedium Kapitel 2.7 auf Seite 23 getrennt. Diese Zellen wurden anschließend mit 100 ml Aqua dest. gespült, um noch vorhandene Reste des Kulturmediums zu entfernen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht vollständig trockenfielen, um möglichst wenige Zellen zu schädigen. Im Anschluß daran wurde je 1 g Frischgewicht der Zellen in sterile 50 ml Bechergläschen eingewogen, in denen bereits zuvor 8 ml VIM (Kapitel 2.4.6) vorgelegt wurden. Die Anzahl der eingesetzten Bechergläschen variierte abhängig von dem Versuchsansatz. Direkt nach der Einwaage des Zellmaterials wurden die Bechergläschen mit Alufolie abgedeckt und auf

einem Rundschtüttler (*KS 250 basic, Fa. IKA Labortechnik*) bei ~180 Upm für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Inkubationszeit diente der Adaptierung der Zellen an die veränderten Inkubationsbedingungen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die zu messende Probe in ein 10 ml Becherglas umgefüllt, um eine hinreichende Eintauchtiefe für die pH-Mikroelektrode zu gewährleisten. Nach dem Einsetzen der Elektrode wurde der Rundschtüttler wieder eingeschaltet und die Datenverarbeitungs-Software gestartet. Sie bot die Möglichkeit, kontinuierlich in frei wählbaren Intervallzeiten die vom pH-Meter gesendeten Daten zu erfassen und erleichterte somit die Messung einer zeitlich abhängigen pH-Wertänderung. Die Applikation der Effektoren mit einer Pipette wurde erst nach dem Erreichen eines stabilen Messwertes (nach ca. 1 Minute) durchgeführt. Alle Effektoren, ausgenommen die Elicitoren und des G-Protein Aktivators Mastoparan, wurden 5 Minuten vor Messbeginn in den Versuchsansatz pipettiert. Die Elicitoren wurden erst unmittelbar vor Beginn der Messung hinzugegeben. Die Messdauer der Experimente lag zwischen 20 und 60 Minuten.

2.6 Quantifizierung der H₂O₂-Produktion durch Chemilumineszenz

Die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies wurde in Kap. 1.1.6 auf S. 9 bereits ausführlich beschrieben. Diese Abwehrreaktion von Pflanzenzellen auf einen elicitierenden Stimulus kann mit Hilfe der Luminol/Kaliumhexacyanoferrat-Methode quantifiziert werden. Bei dieser Reaktion nimmt H₂O₂ als das Oxidationsmittel zwei Elektronen der Hydrazidgruppe des Luminols auf. Diese wird dabei zu Stickstoff oxidiert. Die Eisen-Ionen des Kaliumhexacyanoferrats katalysieren die Umsetzung durch Bildung intermediärer Komplexe mit dem Peroxid und einer radikalischen Elektronenübertragung. Dabei wird die frei werdende Energie der Elektronen nicht als Wärme sondern ausschließlich als Licht der Wellenlängen zwischen 440 bis 470 nm abgestrahlt. Diese Lichtreaktion wird als Chemilumineszenz bezeichnet. Die Registrierung dieser Photonenemission wurde mit dem Luminometer (Modell Sirius, *Fa. Berthold Detection Systems, Pforzheim*) durchgeführt, wobei die Chemilumineszenzintensität als „relative light units per second“ (RLU/s) ausgegeben wurde.

Für die Messung wurden PS-Röhrchen (5 ml Vol.; *Fa. Greiner*) mit 350 µl Kalium-Phosphat-Puffer (60 mM, pH 7.9) befüllt. Pro Messung wurden 100 µl Zellsuspensionsüberstand in ein PS-Röhrchen pipettiert und anschließend in den Probenhalter des Messgerätes platziert. Direkt nach dem Schließen der Messkammer wurde die Injektion von 100 µl einer 1,21 mM Luminol-Lösung sowie einer 14 mM K₃[Fe(CN)₆]-Lösung mit Hilfe von zwei separaten Mikropumpen

automatisch ausgelöst. Die Injektionen wurden in der sogenannten delay-time (Dauer = 2 sec) des Messzyklus durchgeführt. Die sich daran anschließende Messperiode hatte eine Dauer von 10 sec. Die Messdaten stellen Mittelwerte aller Einzelmessungen dar, die vom Luminometer während der 10-sekündigen Messperiode in 0,2 sec Intervallen zum PC gesendet wurden. Der weitgehend automatisierte Injektions- und Messvorgang erlaubte eine präzise Einschätzung des zeitlichen Verlaufs der Photonenemission bei der Detektierung des gebildeten H_2O_2 und gewährleistete auch bei sehr geringen Chemilumineszenzintensitäten eine hohe Reproduzierbarkeit.

Die Vorbereitung der Zellsuspensionen entsprach weitgehend dem bei den Alkalisierungstests bereits dargestellten Schema (*siehe Kap. 2.5 auf S. 24*). Erst nach Beendigung der dreistündigen Inkubationszeit in dem Vorinkubationsmedium (VIM Kapitel 2.4.6) änderte sich die weitere Vorgehensweise geringfügig. Die Probenansätze verblieben in den 50 ml Bechergläschen, in die je nach Versuchsziel die gewünschte Effektor-Konzentration appliziert wurde. Die meisten untersuchten Effektoren wurden wie bei den Alkalisierungstests 5 Minuten vor Messbeginn in den Versuchsansatz pipettiert. Die Elicitoren wurden hingegen erst unmittelbar davor hinzugefügt. Das Schütteln (*Infors HT, Fa. B. Braun*) der Proben wurde nur zum Zeitraum der Probenahmen unterbrochen und sofort nach Entnahme der gewünschten Probenmenge wieder aktiviert.

2.7 Fluoreszenzspektroskopische Messung des cytosolischen pH-Wertes

Zur Messung des cytosolischen pH-Wertes in Suspensionszellen von *Ipomoea batatas* wurde der Fluoreszenzfarbstoff BCECF (2',7'-Bis(2-Carboxyethyl)-5-(und-6)-Carboxyfluoreszein) eingesetzt. Der pK_s -Wert von BCECF liegt bei 7,0 und ist damit für den cytoplasmatischen pH-Bereich von tierischen sowie pflanzlichen Zellen geeignet ($\sim 6,8$ bis $7,4$). Das Fluoreszenz-Anregungsprofil dieses Farbstoffes ist pH-abhängig und erlaubt die Anwendung der sogenannten Ratio-Messtechnik. Bei dieser Methode wird das Verhältnis zwischen zwei Anregungswellenlängen (490 und 440 nm) ermittelt und dient als Maß der Fluoreszenz in Abhängigkeit von dem pH-Wert. Dabei ist zu beachten, dass eine Anregungswellenlänge am isosbestischen Punkt des Farbstoffspektrums liegt. An diesem Punkt zeigt der Farbstoff keine pH-Sensitivität. Der isosbestische Punkt von BCECF liegt bei ~ 439 nm. Die zweite Anregungswellenlänge wird in einem Bereich mit einer hohen pH-Sensitivität gewählt. Dies ist bei BCECF etwa bei 490 nm der Fall. Wird der Fluoreszenzfarbstoff abwechselnd bei beiden Wellenlängen angeregt erlaubt die Bildung des Intensitätsverhältnisses bei den Wellenlängen von 490 und 439 nm eine direkte

Korrelation mit der Veränderung des pH-Wertes der gemessenen Probe. Die Fluoreszenzemission der Probe wurde kontinuierlich bei 535 nm detektiert.

Die Zellen der Süßkartoffelsuspension wurden mit einem Derivat des Farbstoffes BCECF beladen. Dabei handelt es sich um BCECF-AM, einem *Acetomethyl* (AM) Ester. Dieses Derivat ist aufgrund seiner chemischen Eigenschaften membrangängig und fluoresziert nicht. Das BCECF-AM wird erst durch die Hydrolyse durch intrazellulärer Esterasen in die fluoreszierende Form überführt. Dabei kann die intrazelluläre Esterase-Aktivität gleichzeitig als Indikator der Zellviabilität herangezogen werden. Nach der intrazellulären Abspaltung des *Acetomethyl*-Restes ist das fluoreszierende BCECF nicht mehr membrangängig. Bevor die Zellen mit dem BCECF beladen werden konnten, mußte die Löslichkeit des Fluoreszenzfarbstoffes verbessert werden. Zu diesem Zweck wurden 10 μl BCECF-AM mit 5 μl Pluronic[®] F-127 (20% [w/v]-Stocklösung) im Verhältnis 2:1 gemischt. Pluronic[®] F-127 ist ein nichtionisches, tensidisches Polyol, welches die Löslichkeit wasserunlöslicher Fluoreszenzfarbstoffe in Kulturmedien verbessern soll. Nach der Inkubation von Süßkartoffelzellen in diesem Gemisch war eine deutlich stabilere Beladung der Zelle zu beobachten. Für die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde ca. 0,1 g Zellmaterial einer Kalluszellkultur (Kapitel 2.3.2) in ein Eppendorfreaktionsgefäß überführt. In diesem waren bereits 985 μl VIM (Kapitel 2.4.6) sowie 15 μl des BCECF-AM/Pluronic[®] F-127 Gemisches vorgelegt. Noch bestehende größere Zellaggregate wurden durch vorsichtiges Durchmischen des Mediums im Reaktionsgefäß mit einer Pipettenspitze aufgelöst. Dieser Ansatz wurde anschließend bei Raumtemperatur für 2 h auf einem Wippen-Inkubator in ständiger Bewegung gehalten. Nach der Inkubation wurden 200 μl der BCECF-beladenen Zellsuspension in eine Superfusionsmesskammer (Abbildung 2.1) überführt, auf deren Boden zuvor ein Polylysin-beschichtetes Objektgläschen (\varnothing 10 mm, Kapitel 2.7.1) fixiert worden war. Die Pflanzenzellen hefteten sich innerhalb von 5 Minuten auf der Polylysin-Beschichtung an, so dass eine ständige Medienperfusion ohne ein Verrutschen der Zellen während des gesamten Versuchszeitraums möglich war. Nun wurde der Rest der Messkammer vollständig mit VIM (Kapitel 2.4.6) gefüllt. Dabei war es wichtig, dass beim Füllen keine Luftblasen in den Zu- und Abläufen der Messkammer entstanden, da diese den Medienfluss behinderten. Die Messkammer wurde unter dem Inversmikroskop („Axiovert 10“, Fa. Zeiss) plziert und auf dem Kreuztisch des Mikroskops fixiert. Für eine kontinuierliche Superfusion der Zellen mit Medium bzw. mit Effektor-Lösungen wurden an dem Zu- und Ablauf der Messkammer Teflonschläuche (\varnothing 0,5mm) angeschlossen, die über eine Peristaltikpumpe (*Peristaltic Pump P-3*, Fa. Pharmacia Fine Chemicals) mit dem Mediumvorratsbehälter sowie dem Abfallbehälter verbunden waren. Zum Entfernen überschüssigen Farbstoffs wurde die Messkammer für mindestens 5 Minuten mit VIM (Kapitel 2.4.6) superfundiert.

Mit Hilfe des Inversmikroskops wurden geeignete Zellen für die Messung des cytosolischen pH-Wertes ausgesucht. Die für die Auswahl bedeutenden Kriterien waren:

- zweidimensionale Lage der Zellen, keine größeren überlagerten Zellaggregate
- intakte Zellstruktur
- Zellen mit möglichst kleinen Vakuolen, also in einem frühen Differenzierungsstadium
- möglichst zwei oder mehr Zellen im Bildausschnitt der Fokussierungsebene

Die Fluoreszenzintensitäten werden von einer Digitalkamera (C 4742-95, Fa. Hamamatsu GmbH) detektiert und mit Hilfe des Computerprogrammes „Aquacosmos“ Version 1.10 (Fa. Hamamatsu) in Ratio-Werte und Ratio-Bilder beider Anregungswellenlängen (490/439 nm) umgerechnet. Das Programm ermöglicht zudem die Fluoreszenzintensitäten ausgewählter Bildausschnitte separat grafisch darzustellen. So ist es möglich, einzelne Zellen und auch Kompartimente einer Zelle gesondert in ihrer Fluoreszenzintensität zu beurteilen.

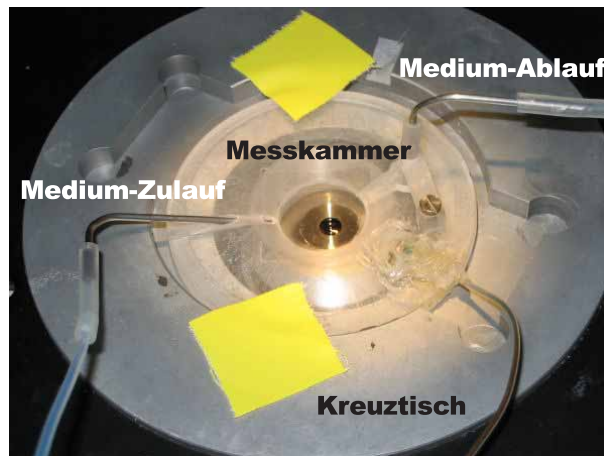


Abbildung 2.1: Messkammer mit Zu- und Ablauf, fixiert auf dem Kreuztisch des Inversmikroskops „Axiovert 10“

2.7.1 Poly-L-Lysin-Beschichtung von Deckgläschen zur Fixierung von Pflanzenzellen

Die für eine Poly-L-Lysin-Beschichtung verwendeten Deckgläschen (\varnothing 10mm) wurden zur Reinigung für mindestens eine Woche in Schwefelsäure eingelegt. Bei Bedarf wurden die benötigte

Anzahl von Deckgläschen ausgiebig mit Aqua dest. und anschließend mit Ethanol (98%) gespült. Die gereinigten Deckgläschen wurden mit einer Pinzette aufgenommen, mit Druckluft gründlich getrocknet und anschließend in eine mit Filterpapier ausgelegte Glas-Petrischale platziert. Auf die vorbereiteten Deckgläschen wurden 20 μl einer 10:1 verdünnten Poly-L-Lysin Lösung (*Fa. Sigma-Aldrich*) mit einer Pipette aufgetragen. Im Anschluß daran wurde die Glaspetrischale mit den Deckgläschen für mindestens zwei Stunden mit halb geöffnetem Deckel in einen Trockenschrank gestellt. Nach dem vollständigem Eintrocknen der Poly-L-Lysin Lösung wurde die Glaspetrischale geschlossen und bei Raumtemperatur gelagert. Die beschichteten Deckgläschen konnten bis zu zwei Wochen nach der Beschichtung für die Fixierung der Süßkartoffelzellen (*siehe Kap. 2.7 auf S. 26*) eingesetzt werden.

2.8 IAA-Nachweis in Suspensionskulturen von *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* mittels HPLC-Analyse

2.8.1 Grundlagen der High-Pressure-Liquid-Chromatographie

Das grundlegende Trennprinzip der „High-Performance-Liquid-Chromatographie“ (HPLC) ist, wie bei allen anderen Chromatographieverfahren, die Trennung eines Substanzgemisches (Analyt) mit Hilfe einer mobilen (Laufmittel) und einer stationären Phase (spezifische Oberfläche des Packungsmaterials [Sorbens] einer chromatographischen Säule). Dabei treten einzelne Bestandteile mit der stationären Phase in eine Wechselwirkung, so dass diese einzelnen Komponenten (Eluat) eine charakteristische Zeit (Retentionszeit) oder ein charakteristisches Volumen (Retentionsvolumen) benötigen, bis sie die Trennsäule wieder verlassen. Bei einer isokratischen Trennung wird während des gesamten Trennvorganges eine gleichbleibende Lösungsmittelzusammensetzung verwendet. Wird hingegen die Lösungsmittelzusammensetzung im Verlauf des Trennvorganges geändert, so wird dies als Gradiententrennung bezeichnet. Für eine möglichst hohe Trennleistung wird die Säule mit sehr kleinen Sorbens-Teilchen (5 μm) befüllt. Die dabei entstehende Packungsdichte der Säule ist so hoch, dass die Schwerkraft nicht mehr ausreicht, um den Eluenten durch die Säule fließen zu lassen. Daher wird in der HPLC-Technik der Eluent unter starkem Druck (20 bis 200 bar) gesetzt und auf diese Weise durch die Säule gepresst. Der apparative Aufwand einer solchen chromatographischen Trennung ist sehr groß und umfasst den Injektor, die Trennsäule, ein Pumpensystem (pulsationsfrei) und schließlich noch ein Detektionssystem. Das Füllmaterial der Trennsäule ist ausschlaggebend für die Bindungseigenschaften des Analyt. Üblicherweise

sind die stationären Phasen in den meisten Chromatographieverfahren durch die an der Oberfläche befindlichen Hydroxygruppen (OH-Gruppen) polar und hydrophil. Diese hydrophilen Eigenschaften können jedoch den Chromatographieverlauf stören. Abhilfe dafür schafft die so genannte Umkehrphasen-Chromatographie (Reversed-Phase-Chromatographie). Bei ihr werden diese OH-Gruppen mit langen Kohlenwasserstoffketten verethert. Dies führt dazu, dass die Oberfläche des Säulenfüllmaterials zu einer unpolaren stationären Phase wird. Es kommt zu einer hydrophoben Wechselwirkung zwischen dem in einem polaren wässrigen Lösungsmittel gelösten Analyten und der hydrophoben stationären Phase. Die mobile Phase eluiert die Komponenten des Analyten indem es mit den adsorbierten Molekülen um die Bindungsstelle konkurriert [Lottspeich und Zorbas 1998].

2.8.2 Vorbereitung der Zellkulturen

Für die IAA-Gehalts-Analyse von Reinkulturen sowie Mischkulturen von *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* wurden in sechs mit jeweils 100 ml modifiziertem MS-Medium (siehe Tab. 2.7 auf S. 23) befüllten 250 ml Erlenmeyerkolben die Reinkulturen von *G. diazotrophicus* angezogen. Die Inokulationsdichte betrug $OD_{578} = 0,05$. Als Reinkultur der Süßkartoffelzellen wurde eine bereits voll etablierte Suspensionskultur (Kap. 2.3.4 auf S. 20) eingesetzt. Aus dieser Reinkultur wurden jeweils 20 g Zellmaterial in sechs Erlenmeyerkolben (250 ml) überführt und in 100 ml frischem MS-Flüssigmedium suspendiert. Für die Mischkultur wurden nochmals sechs Erlenmeyerkolben (250 ml) mit jeweils 20 g Zellmaterial beschickt und mit je 100 ml MS-Flüssigmedium suspendiert. Diese Kolben wurden zusätzlich noch mit einer Vorkultur von *G. diazotrophicus* mit einer $OD_{578} = 0,05$ angeimpft. Für jeden Probenahmezeitpunkt standen von jeder Rein- und Mischkultur jeweils 200 ml Medium zur Analyse des IAA-Gehaltes zur Verfügung. Alle 18 Erlenmeyerkolben wurden in der Klimakammer auf einem Rundschüttler unter den in Tabelle 2.2 auf Seite 21 angegebenen Parametern inkubiert. Zur Vorbereitung der Kultur-Überstände wurden bei jeder Probenahme jeweils zwei mal 100 ml der Pflanzenzell- sowie der Mischkulturen aseptisch über ein feinmaschiges Sieb gegeben, um größere Zellaggregate zu entfernen. Die so vorgereinigten Suspensionsüberstände sowie die Bakterien-Reinkultur wurden anschließend bei 10000 Upm für 10 Minuten abzentrifugiert (*Centrifuge Modell J2-21, Fa. Beckmann Instruments*). Die Überstände dieses Zentrifugations-schrittes wurden in sterile 500 ml Erlenmeyerkolben dekantiert und als Ausgangsmaterial für die Festphasenextraktion genutzt.

2.8.3 Festphasenextraktion

Die Festphasenextraktion (SPE) ist eine leistungsfähige Technik zur schnellen und selektiven Probenaufbereitung, insbesondere für HPLC-Analysen. Gegenüber herkömmlichen Probenaufbereitungstechniken bietet die Festphasenextraktion einige Vorteile. Mit dieser Methode ist eine hohe Wiederfindungsrate des Analytes gewährleistet. Desweiteren wird der Analyt optimal konzentriert und liegt nach Eluierung von der Extraktionssäule in hoher Reinheit vor. Ein weiterer praktischer Vorteil ist zudem die deutliche Reduktion des Lösungsmittelverbrauches gegenüber herkömmlichen Extraktionsverfahren.

Das Prinzip der Festphasenextraktion beruht darauf, dass eine flüssige Probe das Sorbensmaterial durchfließt, währenddessen die Probenbestandteile, abhängig von der Beschaffenheit des Sorbens, von diesem zurückgehalten werden. Die sich anschließende selektive Elution wird mit einem geeigneten Lösungsmittel durchgeführt. Typischerweise umfasst eine Festphasenextraktion fünf Schritte:

- Vorbereitung sowie Vorbehandlung der Probe
- Vorkonditionierung des Sorbens in der Extraktionssäule:
10 ml Methanol wurden mit Hilfe eines angelegten Vakuums durch die Säule gesaugt.
- Auftragen der Probe:
200 ml der vorgereinigten Filtrate der Kulturen (Kapitel 2.8.2) wurden durch mehrere Extraktionssäulen eluiert. Dabei wurden nicht absorbierende Matrixbestandteile in Glasgefäßen gesammelt und nach Beendigung dieses Extraktionsschrittes verworfen.
- Reinigungsschritt:
Noch nicht eluierte Matrixbestandteile wurden mit Wasser in mehreren Waschschrinen entfernt.
- Elution und Gewinnung des aufgereinigten Analyten:
Für die Elution wurde das Eluentengemisch verwendet, welches auch bei der darauf folgenden HPLC-Analyse eingesetzt wurde. Für das Auxin IAA ist ein Gemisch aus Methanol/Eisessig (1%) in H₂O im Verhältnis 40:60 gebräuchlich. Das Eluat wurde in 10 ml Meßkölbchen aufgefangen und konnte direkt zur Analyse mittels HPLC weiter verwendet werden.

2.8.4 HPLC-Analyse

Die HPLC-Analysen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Kalippke (Institut für Biophysik, Universität Hannover) [Kalippke 2000] am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hannover mit freundlicher Unterstützung von Herrn Prof. Berger und Mitarbeitern durchgeführt.

10 μl der Analytenlösung wurden in die Injektionseinheit eingespritzt und mit dem Eluenten (Methanol/Eisessig [1%] in H_2O [40:60]) bei einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ sowie einem isokratischen Säulendruck von 220 bar auf die Säule (reverse phase [RP 18] der *Fa. Machery und Nagel* [Nucleosil 120-5 C_{18} , 5 μm Partikelgröße]) aufgetragen. Die Detektierung der Substanz erfolgte im UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 278 nm und wurde mit Hilfe eines Integrators als integrierte Peakfläche ausgegeben. Die Identifizierung des IAA-Peaks wurde mit einem IAA-Standard ($1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) durchgeführt, dessen Peak im equilibrierten System nach einer Retentionszeit von 7,90 Minuten ermittelt wurde. Die Konzentration wurde unter Zuhilfenahme der integrierten Peakflächen und einer IAA-Eichreihe errechnet.

2.9 Aktivitätsmessung der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL)

Das Prinzip der enzymatischen PAL-Aktivitätsbestimmung beruhte auf dem photometrischen Nachweis von Zimtsäure. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) setzt das Substrat Phenylalanin zu Zimtsäure um. Die Isolierung und Aktivitätsbestimmung der PAL aus der Süßkartoffel wurde mit einem modifizierten Protokoll nach Cahill und McComb [Cahill und McComb 1992] durchgeführt.

Das verwendete Zellmaterial stammte aus einer 2 Wochen alten Zellsuspensionskultur (siehe Kap. 2.3.4 auf S. 20), die 2 Tage zuvor passagiert worden war. Diese Suspensionskultur wurde auf einen Weißband-Filter (\varnothing 50 mm, *Fa. Schleicher & Schüll*) abgenutscht und mit 100 ml sterilem Aqua dest. gespült. Anschließend wurden jeweils 5 g des Zellmaterials in vier 100 ml Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 50 ml MS-Flüssigmedium (siehe Tab. 2.7 auf S. 23) beschickt. In drei der vier Erlenmeyerkolben wurden verschiedene Effektoren hinzugegeben. Der erste Ansatz wurde mit dem Bakterium *Gluconacetobacter diazotrophicus* (Tab. 2.1) in einer Animpfdichte von $\text{OD}_{578} = 0,025$ inokuliert, der zweite mit dem Bakterium *Ralstonia solanacearum* (Tab. 2.1) mit der gleichen Animpfdichte. Der dritte Ansatz wurde mit dem Elicitor Invertase in einer Konzentration von $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ versetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde der vierte Ansatz, ohne einen Effektor, verwendet. Die Inkubation der Versuchsansätze wurde in der Klimakammer unter den

standardmäßigen Bedingungen für Suspensionskulturen durchgeführt (siehe Tab. 2.2 auf S. 21). Die Probenahmen wurden direkt nach Zugabe der Effektoren (0 Stunden) und anschließend nach 2, 5, 7, 10, 12,5, 25 und 27,5 Stunden durchgeführt. Dafür wurden 100 mg Zellmaterial jedes Versuchsansatzes entnommen und mit flüssigem Stickstoff, 100 mg Quarzsand sowie 20 mg Polyvinylpyrolidon (PVP 40, 20% w/w) bis zur Homogenität gemörsert. Die so behandelten Proben wurden mit einem gekühlten Spatel in Eppendorfreaktionsgefäße überführt, in denen bereits 1 ml gekühlter Probenpuffer vorgelegt wurde. Der Probenpuffer enthielt 0,1 M Na-Borat (pH 8,8) sowie 20 mM Mercaptoethanol. Der Isolationsansatz wurde auf einem Mischer (*Mono-Mixer, Fa. Sarstedt*) durchmischt und anschließend für 5 Minuten bei 13.000 Upm in einer, in einem Kühlraum (ca. 4 °C) gekühlten, Tischzentrifuge (*Biofuge - pico, Fa. Heraeus*) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und in ein neues gekühltes Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Diese Überstände wurden bis zur gesammelten Enzym-Aktivitätsbestimmung bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Aktivitätsbestimmung der PAL wurden 200 µl des isolierten Überstandes mit 1300 µl 0,1 M Na-Borat Puffer versetzt. Dieser Na-Borat Puffer enthielt anstelle des Mercaptoethanols (s.o.) 30 mM D- bzw. L-Phenylalanin. Der Reaktionsansatz wurde für 60 Minuten bei 30 °C in einem Thermostat (*Eppendorf-Thermostat Typ 5432, Fa. Eppendorf-Gerätebau netheler+Hinz GmbH*) inkubiert und danach sofort auf Eis gestellt. Zur Ermittlung des Aktivitätszustandes der PAL wurde nun die Extinktion der Proben bei 290 nm gemessen, wobei die Extinktion der Ansätze mit L-Phenylalanin gegen die gleiche Probe mit D-Phenylalanin ermittelt wurde. Der Gehalt an Zimtsäure in dem jeweiligen Probenansatz wurde mit Hilfe einer Eichkurve der *trans*-Zimtsäure errechnet. Die Berechnung der PAL-Aktivität wurde über die Ermittlung der Zimtsäure-Menge, die pro Stunde und g Frischgewicht des Pflanzenzellmaterials produziert wurde, durchgeführt.

2.10 Isolation des Hefeextrakt-Elicitors aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolation eines Hefeextrakt-Elicitors (HE) wurde aus handelsüblicher Bäckerhefe durchgeführt. Dazu wurde 1 kg Hefe in 1,5 l Citratpuffer (0,1 M; pH 7,5) suspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 200 Upm auf einem Magnetrührer mit einem Rührfisch gerührt. Die so gewonnene Suspension wurde 46 Minuten bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert und anschließend 30 Minuten bei 7000 Upm zentrifugiert (*Centrifuge Modell J2-21, Fa. Beckmann Instruments*). Der Überstand wurde dekantiert und nachfolgend über einen Faltenfilter gegeben.

Das Filtrat wurde erneut zentrifugiert (10 Minuten; 7000 Upm) und der Überstand wieder dekantiert. Das resultierende Pellet (*Pellet 1*) wurde zunächst bei 4 °C gelagert und der Überstand mit Ethanol im Verhältnis 1:1 gemischt. Für diesen Fällungsschritt wurde das Gemisch für 24 h bei 4 °C gerührt (s.o.) und anschließend für 10 Minuten zentrifugiert (7000 Upm). Der daraus resultierende Überstand konnte verworfen werden und das gewonnene Pellet (*Pellet 2*) wurde mit dem *Pellet 1* in 100 ml Aqua dest. gelöst und vereinigt. Diese Lösung wurde erneut 60 Minuten unter den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. In einem letzten Schritt wurde der so gewonnene Überstand lyophilisiert. Dieses Lyophilisat wurde bei -20 °C gelagert und bei Bedarf in Aqua dest. gelöst.

2.11 Pharmakologische Agenzien

Tabelle 2.8: Verwendete pharmakologische Agenzien

| <i>Agenz</i> | <i>Funktion/Wirkort</i> | <i>Firma</i> |
|---------------------|---|---------------|
| 2-APB | intrazelluläre Ca ²⁺ -Speicher | Calbiochem® |
| Calphostin C | PKC-Inhibitor | Calbiochem® |
| Chlorpromazin-HCl | PLA ₂ -Inhibitor | Calbiochem® |
| DIDS | Anionenkanal-Blocker | Calbiochem® |
| EGTA | Ca ²⁺ -Chelator | Sigma-Aldrich |
| GF109203X | PKC-Inhibitor | Calbiochem® |
| HELSS | PLA ₂ -Inhibitor | Calbiochem® |
| Invertase Grade VII | Elicitor (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>) | Sigma-Aldrich |
| K-252a | Ser/Threo-Protein-Kinasen-Inhibitor | Calbiochem® |
| LaCl ₃ | Ca ²⁺ -Kanal-Blocker | Sigma-Aldrich |
| Mastoparan | G-Protein Aktivator | Calbiochem® |
| Neomycin Sulfat | PLC-Inhibitor | Sigma-Aldrich |
| OAG | DAG-Analogon | Calbiochem® |
| PMA | PKC-Aktivator | Calbiochem® |
| Quinin | K ⁺ -Kanal-Blocker | Calbiochem® |
| TEA | K ⁺ -Kanal-Blocker | Sigma-Aldrich |
| TFP | Calmodulin-Antagonist | Calbiochem® |
| U-73122 / U-73343 | PLC-Inhibitor | Calbiochem® |

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Invertase als neuer Elicitor zur Induktion des „oxidative burst“ in einer Süßkartoffelsuspensionskultur

Die H_2O_2 -Synthese bei Elicitierung von Pflanzenzellen ist Teil der frühen Abwehrreaktionen von Pflanzenzellen. Für die Etablierung eines geeigneten Induktionssystems zum Studium des daran beteiligten Signalweges, wurde ein geeigneter Elicitor für die Induktion in Süßkartoffel-Suspensionskulturen benötigt. Die als Indikator für die H_2O_2 -Synthese dienende Chemilumineszenz wurde für die Quantifizierung dieser Abwehrreaktion herangezogen. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde ein Hefezellextrakt aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (Kapitel 2.10) isoliert und als Hefeextrakt-Elicitor (HE) zur Induktion des „oxidative burst“ für erste Vorversuche verwendet. Ein konstruktiver Erfahrungsaustausch fand mit Dr. K. Niehaus (Universität Bielefeld, Biologie VI) bei der Isolierung des Hefeextrakt-Elicitors sowie bei der Aufarbeitung des Hefeextrakt-Elicitors statt. Einige grundlegende Vorversuche wurden in der Dissertation von [Kalippke 2000] bereits dargestellt. Die Nachteile des Elicitors lagen jedoch in seiner unbekanntem Zusammensetzung, des unbekanntem elicitierenden Bestandteils und der daraus folgenden nicht definierbaren Konzentration bei der Induktion eines „oxidative burst“. Es sollte daher geprüft werden, ob ein anderer Elicitor ähnlich gute induzierende Eigenschaften besaß, dabei aber auch noch quantifizierbare Reaktionen aufwies. Bei diesem Elicitor handelte es sich um eine aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten Invertase (Tabelle 2.8).

In Abbildung 3.1 ist die maximal induzierte Chemilumineszenz in einer Süßkartoffelsuspensionskultur in Abhängigkeit der eingesetzten Invertase-Konzentration dargestellt. Der Maximalwert der

Chemilumineszenz stieg in dem Ansatz mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase um ca. 40% im direkten Vergleich zu der Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle) an. Die mit $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ elicitierte Süßkartoffel-suspensionskultur zeigte mit ca. 80% der maximal induzierbaren Chemilumineszenzintensität eine deutliche Erhöhung im Vergleich zu dem zuvor beschriebenen Ansatz mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Schon bei einer Erhöhung der Elicitor-Konzentration auf $50 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ging die Chemilumineszenzintensität in eine Sättigung über. Die Applikation von $100 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ erhöhte die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz der Süßkartoffelzellen nur noch leicht. Die stärkste Abwehrreaktion konnte durch die Applikation von 100 und $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase induziert werden, wobei keine eindeutige Unterscheidung zwischen den beiden Konzentrationen möglich war. Eine weitere Konzentrations-erhöhung des Elicitors auf 400, 600 und $800 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ hatte keinen weiteren Anstieg der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz zur Folge, sondern bewirkte vielmehr einen deutlichen Abfall des Chemilumineszenzsignals auf etwa das Niveau des Ansatzes mit $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase.

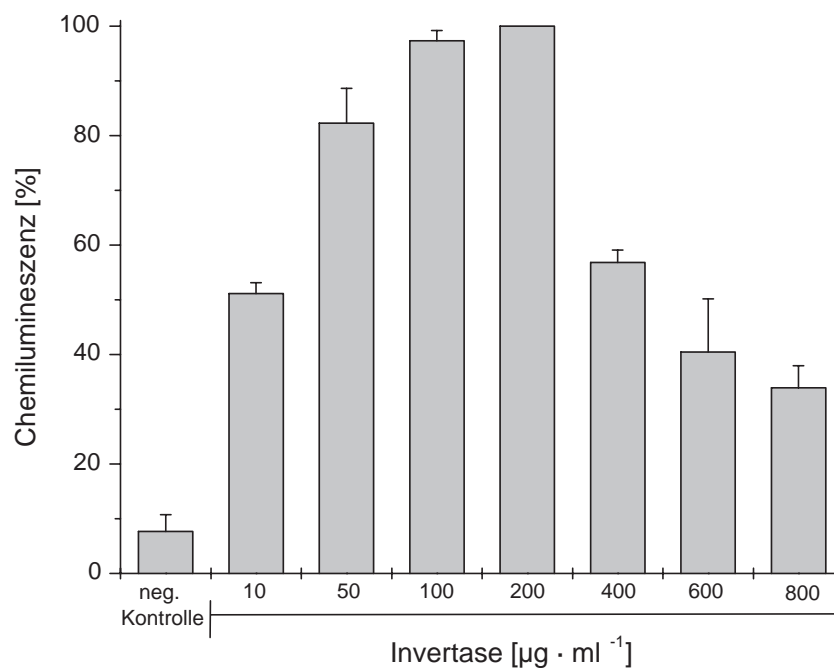


Abbildung 3.1: Abhängigkeit der maximalen Invertase-induzierten H_2O_2 -Synthese von der eingesetzten Elicitorkonzentration 10, 50, 100, 200, 400, 600 und $800 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur. Die Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle) wurde in Abwesenheit des Elicitors gemessen. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde im weiteren Verlauf der Arbeit in allen Experimenten, in denen eine Elicitierung notwendig war, $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase zur Induktion eines „oxidative burst“ eingesetzt. Der Grund dafür war die Notwendigkeit eine möglichst hohe Chemilumineszenzintensität als Positiv-Kontrolle zu induzieren, um zum einen möglichst weit von der unteren Nachweisgrenze des Luminometer-Detektors entfernt zu arbeiten, und um zum anderen eventuelle Einflüsse eingesetzter Effektoren sicher beurteilen zu können.

3.2 Beteiligung pflanzlicher Ionenkanäle am „oxidative burst“

Die Pflanzenzelle reagiert auf einen externen elicitierenden Stimulus mit einer Änderung der Ionenkonzentration innerhalb und außerhalb der pflanzlichen Plasmamembran. Diese veränderten Ionenkonzentrationen stehen am Anfang einer Signaltransduktion, die schließlich in die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Kapitel 1.1.6) mündet. In anderen Pflanzenzellsystemen konnte bereits gezeigt werden, dass nach Ausbildung eines Elicitor-Rezeptor-Komplexes sowohl Anionen- als auch Kationenkanäle geöffnet werden [Zimmermann et al. 1997b, Zimmermann et al. 1999, Küpper et al. 2001]. Einige Sekunden bis Minuten nach der Ausbildung dieses Komplexes kam es in den elicitierten Zellen zu einem erhöhten Austrom von Cl^- - und K^+ -Ionen. Gleichzeitig wurde ein Einstromen von Ca^{2+} -Ionen beobachtet (Kapitel 1.1.7). In Folge dieser Ionenströme treten sekundär Änderungen des extrazellulären pH-Wertes auf, die neben der Messung der H_2O_2 -Synthese, als ein deskriptiver Parameter der frühen Abwehrreaktion verwendet wird. Die mit der Ionenbewegung einhergehende Depolarisation der Membran kann die Öffnung membranständiger spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle induzieren und auf diese Weise den Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle noch verstärken. Um eine Beteiligung der angesprochenen Ionen und pflanzlichen Ionenkanäle bei der Induktion des „oxidative burst“ in Süßkartoffelsuspensionskulturen nachzuweisen wurden verschiedene Ionenkanal-spezifische Hemmstoffe und der Ca^{2+} -Chelator EGTA eingesetzt. Die dabei erzielten Befunde werden nachfolgend beschrieben.

3.2.1 Beteiligung von Anionenkanälen an der Induktion des „oxidative burst“

Die Beteiligung der Anionenkanäle an der Signaltransduktion zur H_2O_2 -Synthese wurde mit dem weitläufig verwendeten Anionenkanal-Blocker DIDS bei Konzentrationen von 1, 10 und $100 \mu\text{M}$ (Tabelle 2.8 auf Seite 34) geprüft. In Abbildung 3.2 ist die maximale H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz [%] einer Süßkartoffelsuspensionskultur in Abhängigkeit der eingesetzten

DIDS-Konzentration dargestellt. Bei der Inkubation der Süßkartoffelzellen (Kap. 2.6 auf S. 25) mit $1 \mu\text{M}$ DIDS wurde nach Elicitierung mit Invertase eine geringe Reduktion der Chemilumineszenz um ca. 10% registriert. Wurde die Effektor-Konzentration auf $10 \mu\text{M}$ DIDS erhöht, kam es zu einer halbmaximalen Inhibierung der H_2O_2 -Bildung. Eine fast vollständige Unterdrückung wurde durch die Applikation von $100 \mu\text{M}$ DIDS erreicht. In diesem Ansatz lag die H_2O_2 -Synthese dauerhaft auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle. Diese Versuchsreihe zeigte, dass DIDS konzentrationsabhängig die H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz und den damit korrelierenden „oxidative burst“ unterdrückt. Die Wirkung des Anionenkanal-Blockers DIDS auf die externe Alkalisierung des Kulturmediums einer elicitierten Süßkartoffelsuspension wurde ebenfalls näher betrachtet und wird Kapitel 3.14 auf Seite 54 näher beschrieben.

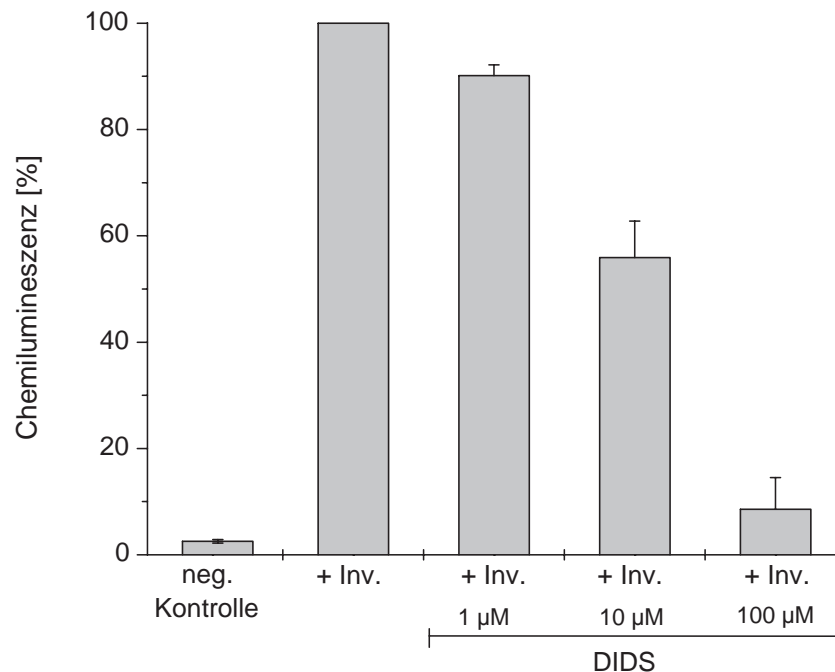


Abbildung 3.2: Effekt des Anionenkanal-Blockers DIDS (1, 10, $100 \mu\text{M}$) auf die maximale Invertase-induzierte (+Inv., $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur. Die Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle) wurde in Abwesenheit von Invertase und Anionenkanal-Blocker gemessen. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.2.2 Beteiligung von K^+ -Kanälen an der Induktion des „oxidative burst“

K^+ -Ionen spielen in einer ganzen Reihe zellulärer Mechanismen eine essentielle Rolle. Zum Beispiel ist Kalium neben Chlorid an der Zellvolumenänderung beteiligt. Die Beteiligung der pflanzlichen K^+ -Kanäle am „oxidative burst“ ist nicht so eindeutig wie die der Anionenkanäle [Felle et al. 2000]. Es zeigte sich, dass eine veränderte K^+ -Ionen-Homöostase der Zelle zwar an der Signalkaskade des „oxidative burst“ beteiligt zu sein scheint, jedoch kein notwendiges Element zur Induktion der Kaskade darstellt. So wird den auströmenden K^+ -Ionen lediglich eine Funktion zur Repolarisation der zuvor depolarisierten pflanzlichen Zellmembran zugesprochen.

Um den Grad einer Beteiligung der K^+ -Ionen in Gegenwart eines Elicitors in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur abzuschätzen, wurden die beiden Kaliumkanal-Blocker TEA^+ und Quinin zur Inhibition der Elicitor-induzierten H_2O_2 -Synthese eingesetzt. Dabei wurde der Effekt von TEA^+ bei Konzentrationen von 10 mM, 40 mM und 80 mM sowie von Quinin bei Konzentrationen von 1 mM und 2 mM getestet.

In Abbildung 3.3 ist die Intensität der Chemilumineszenz in Abhängigkeit von den Effektor-Konzentrationen aufgetragen. Hierbei ist zu beobachten, dass beide Blocker die H_2O_2 -Bildung nicht vollständig unterdrücken. Bei Einsatz von 10 mM TEA^+ wurde die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz auf 80% der Positiv-Kontrolle vermindert. Der Versuchsansatz mit einer TEA^+ -Konzentrationen von 40 mM reduzierte das Intensitätsniveau auf etwa 50% der ungehemmten Reaktion. Eine Verdopplung der Konzentration auf 80 mM TEA^+ führte zu keiner Verstärkung der inhibierenden Wirkung auf die H_2O_2 -Synthese. Die Applikation von 1 mM des Kanal-Blockers Quinin reduzierte die maximale Elicitor-induzierte H_2O_2 -Synthese um etwa 25%. Auch in diesem Fall hatte eine Konzentrationserhöhung des Kanal-Blockers auf 2 mM keinen verstärkenden Einfluss auf die Unterdrückung des „oxidative burst“.

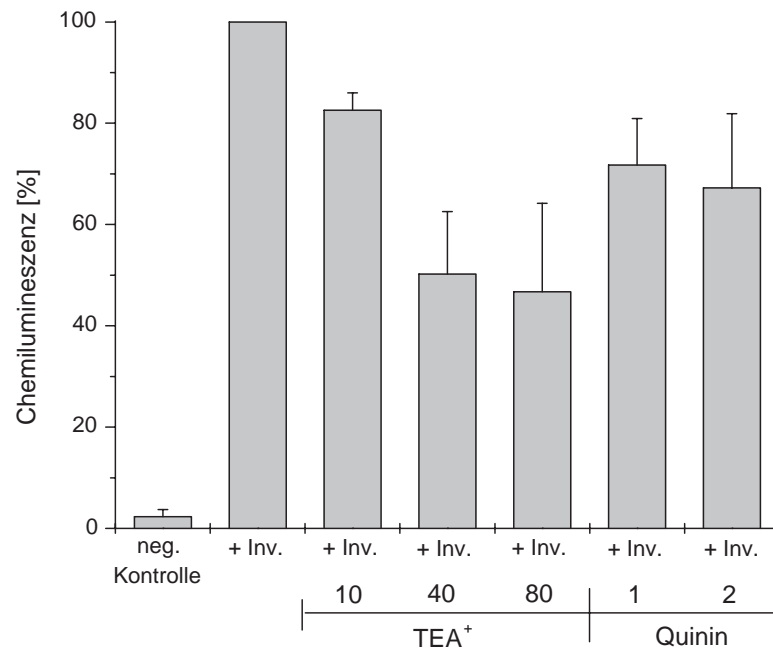


Abbildung 3.3: Effekt der K⁺-Kanal-Blocker TEA⁺ (10, 40, 80 mM) und Quinin (1, 2 mM) auf die maximale Invertase-induzierte H₂O₂-Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur. Negativ-Kontrolle: kein Einsatz von Invertase und Hemmstoffen. +Inv. = in Anwesenheit von Invertase (200 µg · ml⁻¹). ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.2.3 Beteiligung extrazellulärer Ca²⁺-Ionen und Ca²⁺-Kanälen der Plasmamembran an der Induktion des „oxidative burst“

Ca²⁺-Ionen übernehmen als sekundäre Botenstoffe sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen eine zentrale Rolle bei vielen Signaltransduktionswegen. Neben den intrazellulären Speicherorten wie Vakuole, Mitochondrien oder Endoplasmatischem Reticulum ist der extrazelluläre Raum der Zellen einer der größten Speicherorte für das Ca²⁺. Um sich diese Quelle nutzbar machen zu können, benötigt die Zelle Ca²⁺-selektive Ionenkanäle, die einen schnellen und gerichteten Transport der Ionen ermöglichen. Pflanzenzellen besitzen eine ganze Reihe verschiedener Ca²⁺-Ionenkanäle, die zum Teil durch Liganden gesteuert werden oder aber spannungsabhängig sind [Zimmermann et al. 1999].

Zur Beurteilung einer möglichen Beteiligung des extrazellulären Ca^{2+} an der Ausbildung eines Elicitor-induzierten „oxidative burst“ wurde die Ca^{2+} -Aufnahme mit zwei Effektoren beeinflusst. Eine Möglichkeit, das Ca^{2+} am Einstrom in die Zelle zu hindern, war die Komplexbildung der Ionen und die damit verbundene Immobilisierung. Zu diesem Zweck wurde der Ca^{2+} -Chelator EGTA (siehe Tab. 2.8 auf S. 34) verwendet. Eine zweite Möglichkeit bestand in der Blockierung der Ca^{2+} -Kanäle der pflanzlichen Zellmembran. Zu diesem Zweck wurde der Ca^{2+} -Kanalblocker LaCl_3 eingesetzt (siehe Tab. 2.8 auf S. 34).

Die Abbildung 3.4 zeigt die maximale Chemilumineszenz in elicitierten und nicht elicitierten Ansätzen bei Applikation der Effektoren EGTA und LaCl_3 in verschiedenen Konzentrationen. Der Ca^{2+} -Chelator EGTA (5 mM) unterdrückte die Invertase-induzierte Bildung von H_2O_2 vollständig. Die gemessene Chemilumineszenz lag auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle: Ansatz ohne jegliche Effektoren). Der Ca^{2+} -Kanal-Blocker LaCl_3 zeigte eine ähnliche Kompetenz zur Reduktion des „oxidative burst“ wie EGTA. Allerdings erreichte die Chemilumineszenz bei Verwendung von 10 mM LaCl_3 noch Intensitäten bis zu 20% der Positiv-Kontrolle.

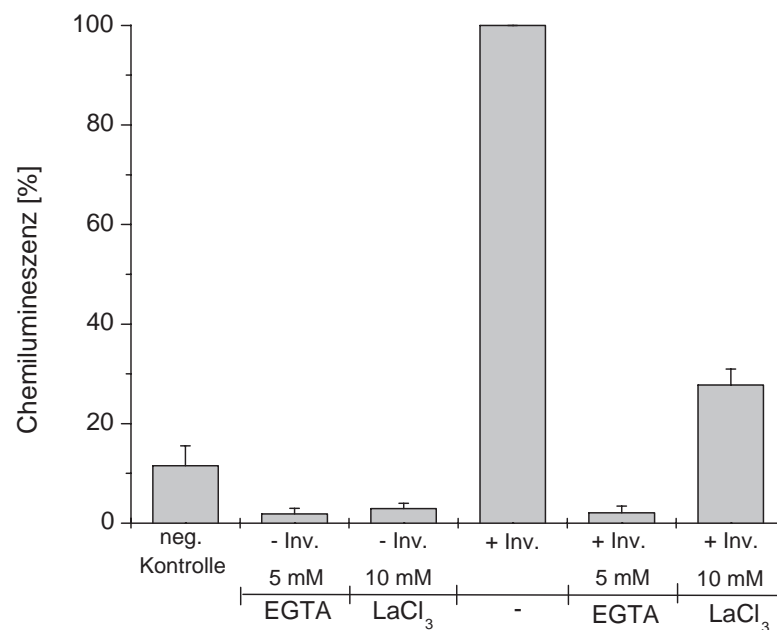


Abbildung 3.4: Maximal erreichte Invertase-induzierte H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des Ca^{2+} -Chelators EGTA (5 mM) und dem Ca^{2+} -Kanal-Blocker LaCl_3 (10 mM). Negativ-Kontrolle: kein Einsatz von Invertase und Hemmstoffen. +Inv. = in Anwesenheit von Invertase ($200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$). \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.2.4 Beteiligung von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern am „oxidative burst“

Zellen reagieren innerhalb kurzer Zeit auf verschiedene Reize mit einer geänderten Ca^{2+} -Homöostase. Neben dem Einstrom des extrazellulären Ca^{2+} (Kapitel 3.2.3) kann auch das Öffnen der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher einen Beitrag zur Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration leisten. Der Verlauf dieser Konzentrationsänderung kann abhängig von der Art des Reizes verschiedene Signaturen aufweisen. So werden transiente Konzentrationsänderungen, oszillierende, aber auch sog. peakförmige Signale unterschieden [Trewavas und Malhó 1998].

Allgemein scheint die Beteiligung interner sowie des externen Ca^{2+} -Speichers bei der Induktion eines „oxidative burst“ von Pflanzenart zu Pflanzenart, aber auch abhängig vom Typ des stimulierenden Reizes zu variieren. Es stellte sich daher die Frage, ob auch der Elicitor-induzierte „oxidative burst“ der Süßkartoffelzellen von einer Änderung der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase abhängig ist. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurde die Wirkung von 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) auf die Ausbildung eines Invertase-induzierten „oxidative burst“ dokumentiert. Der Modulator 2-APB ist als Hemmer des IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Ausstroms aus internen Ca^{2+} -Speichern bekannt, wobei er die IP_3 -Bindung an den Rezeptor selbst nicht beeinflusst.

In Abbildung 3.5 ist der zeitliche Verlauf des Invertase-induzierten „oxidative burst“ nach Applikation verschiedener Konzentrationen des Modulators 2-APB dargestellt. Nach der Zugabe von 10 μM 2-APB stieg die Chemilumineszenzintensität innerhalb von 50 Minuten auf ca. 70% der maximal induzierbaren H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz (Invertase-Ansatz = Positiv-Kontrolle) an. Im Vergleich zu dieser Positiv-Kontrolle war die Kinetik des „oxidative burst“ bei 2-APB-Gabe zudem bereits deutlich verzögert. Es fiel jedoch auf, dass die Kinetik nach der verlängerten *lag*-Phase noch einen ähnlich starken exponentiellen Anstieg zeigte wie die Positiv-Kontrolle, dann aber nach 30 Minuten deutlich abflachte. Die Verlängerung der *lag*-Phase verstärkte sich bei der Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 20 μM 2-APB nochmals deutlich. Die Kinetik dieses Ansatzes hatte einen eindeutig linearen Charakter und erreichte nach 50 Minuten ein vorläufiges Maximum bei ca. 50% der Positiv-Kontrolle. Dies legte den Verdacht nahe, dass bei hinreichend langer Inkubation der inhibierende Effekt von 20 μM 2-APB nicht ausreichen würde, um den „oxidative burst“ dauerhaft zu reduzieren. Aus diesem Grund wurde die 2-APB-Konzentration auf 30 μM und schließlich noch auf 50 μM 2-APB erhöht. Die Applikation von 30 μM reduzierte die Invertase-induzierte Chemilumineszenz bis zu 30 Minuten nach der Applikation des Elicitors nachhaltig auf das Niveau der Negativ-Kontrolle. Erst nach der 30. Minute stieg das Signal noch auf 20% der Positiv-Kontrolle an. Die vollständige

Unterdrückung eines H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenzsignals wurde in den Versuchsansätzen mit $50 \mu M$ 2-APB erreicht und konnte über die gesamte Messdauer von 50 Minuten aufrecht erhalten werden.

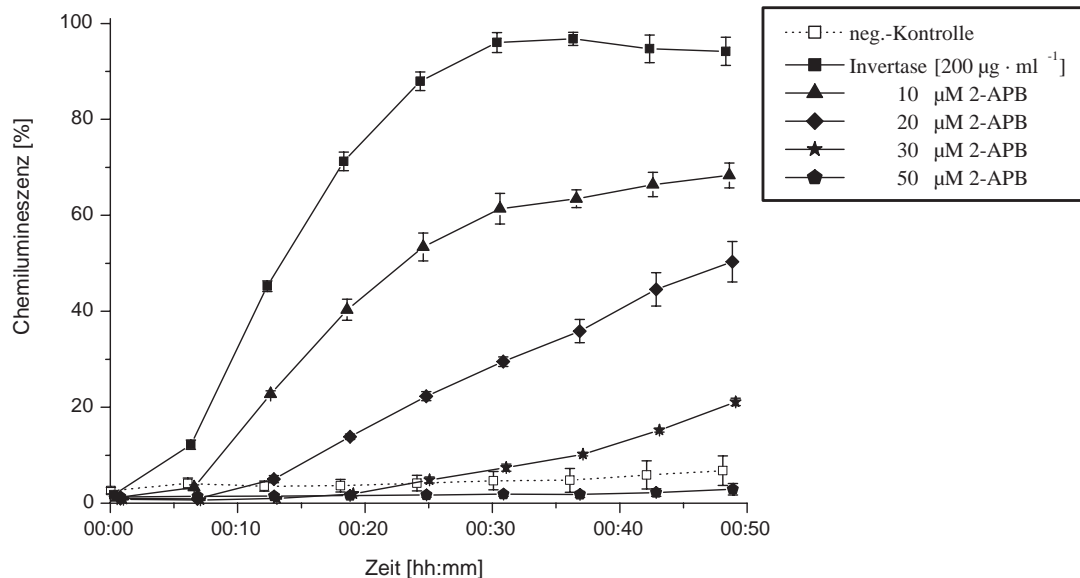


Abbildung 3.5: Zeitlicher Verlauf der Invertase-induzierten H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des Modulators 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) in den Konzentrationen 10, 20, 30 und $50 \mu M$. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.3 Beteiligung von Calmodulin am „oxidative burst“

Calmodulin ist ein gut charakterisierter Ca^{2+} -Sensor und kann in aktivierter Form andere Proteine einer Zelle in ihrer Aktivität steuern. Es ist ein 17-kd-Protein und zeichnet sich insbesondere durch vier Ca^{2+} -bindenden Motive aus. Um zu prüfen, ob eine Beteiligung von Calmodulin an der Signaltransduktion des Elicitor-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffelzellen vorliegt, wurde der Effektor Trifluoperazin Dimaleat (TFP) eingesetzt (siehe Tab. 2.8 auf S. 34). TFP ist ein Calmodulin-Antagonist und wurde bereits in anderen Studien, die sich mit dem Thema einer möglichen Beteiligung Ca^{2+} -bindender Proteine an pflanzlichen Abwehrreaktionen beschäftigten, wirksam eingesetzt [Romeis et al. 2000].

Die Abbildung 3.6 zeigt den zeitlichen Verlauf des Invertase-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffel-Suspensionskulturen nach Applikation einer entsprechenden Konzentration TFP (1, 5 und 10 μM). Die Inkubation mit 1 μM TFP führte bereits zu einer deutlichen Verzögerung der Invertase-induzierten H_2O_2 -Synthese in dem Versuchsansatz (siehe Abbildung 3.6). Es wurde festgestellt, dass der mit 1 μM TFP inkubierte Ansatz eine 12-minütige *lag*-Phase aufwies und damit doppelt solange keinen Anstieg der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz erlaubte wie die Positiv-Kontrolle (Invertase).

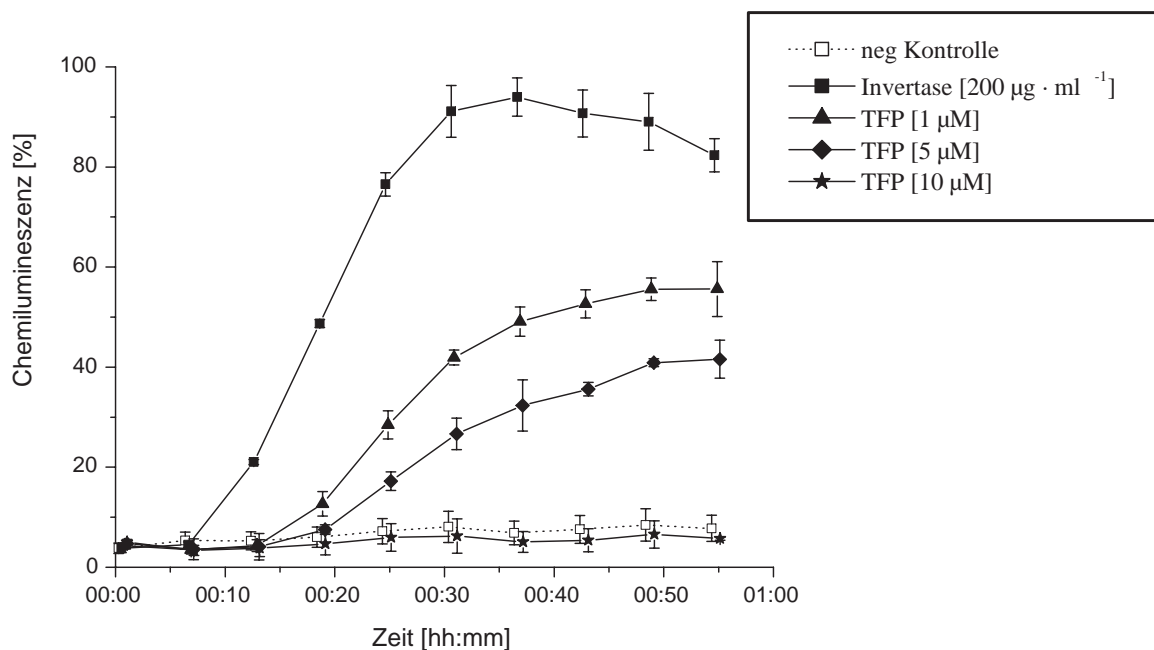


Abbildung 3.6: Zeitlicher Verlauf der Invertase-induzierten H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des Calmodulin-Antagonisten TFP in den Konzentrationen 1, 5 und 10 μM . \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Des weiteren war zu beobachten, dass der TFP-inkubierte Versuchsansatz (1 μM) für eine Verdopplung der Chemilumineszenz-Intensität etwa 10 Minuten benötigte, wohingegen die Positiv-Kontrolle (Invertase) lediglich 5 Minuten zur Verdopplung der Intensität benötigte. Hinzu kam, dass die maximal induzierbare Chemilumineszenz des Ansatzes mit 1 μM TFP lediglich bei 50% der Positiv-Kontrolle lag und dieses auch erst nach 50 Minuten erreicht wurde. Die Positiv-Kontrolle zeigte dagegen bereits nach 30-minütiger Inkubation ein Maximum. Bei einer Erhöhung der TFP-Konzentration auf 5 μM wurde der „oxidative burst“ noch deutlicher unterdrückt

und erreichte, ähnlich wie bei dem Ansatz mit $1\ \mu\text{M}$ TFP, erst nach 50 Minuten ein Maximum. Ein weiterer Effekt der Konzentrationserhöhung des Antagonisten war eine noch länger anhaltende *lag*-Phase, die bereits in dem zuvor beschriebenen Ansatz mit $1\ \mu\text{M}$ TFP beobachtet wurde. Auch dieser Ansatz ($5\ \mu\text{M}$ TFP) erreichte sein Maximum erst nach 50 Minuten und lag bei 40% der Positiv-Kontrolle. Die Applikation von $10\ \mu\text{M}$ TFP reduzierte die Invertase-induzierte H_2O_2 -Synthese schließlich dauerhaft und hielt die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz konstant auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle.

3.4 Beteiligung von Protein-Kinasen am „oxidative burst“

Zielproteine von Ca^{2+} und auch Calmodulin sind häufig Protein-Kinasen, die an den meisten wichtigen regulatorischen Mechanismen bei der Signalweiterleitung in einer Zelle beteiligt sind. Angesichts des Ca^{2+} -sensitiven „oxidative burst“ der Süßkartoffelzellen wurde in diesem Zusammenhang eine Beteiligung von Protein-Kinasen näher beleuchtet. Ihre strukturelle Diversität macht sie zu spezifischen Modulatoren ihrer Zielproteine. Die Aktivität dieser Proteine ist immer auch in Zusammenhang mit den Phosphatasen zu sehen, die als Antagonisten zu den Protein-Kinasen die Aktivitätsregulation erst möglich machen. Zur Beurteilung einer Beteiligung von Protein-Kinasen am Signalweg des „oxidative burst“ wurden Modulatoren unterschiedlicher Kinase-Klassen in ihrer Wirkung getestet. Dabei wurden u.a. Effektoren der Protein Kinase C (PKC) in ihrer Wirkung getestet. Neben den beiden PKC-Inhibitoren Calphostin C und GF109203X (ein Bisindolylmaleimid) wurden auch die PKC-Aktivatoren Oleyl-Acetyl-Glycerin (OAG) und der Phorbolster Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) eingesetzt.

Calphostin C ist ein spezifischer Protein Kinase C Inhibitor, welcher an der proteinregulatorischen Domäne mit dem Diacylglycerin (DAG) und Phorbolestern konkurriert. Bei Einsatz des Inhibitors wurde in einem Konzentrationsbereich zwischen 10 und 200 nM keine Änderung in der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz nachgewiesen (Abb. 3.7 auf S. 46). Zur Bestätigung dieses Resultates wurde ein weiterer PKC-Inhibitor, das Bisindolylmaleimid (GF109203X), getestet, der dem Staurosporin sehr ähnlich ist und PKC bereits im nanomolaren Bereich hemmt. Bei höheren Konzentrationen, etwa ab $10\ \mu\text{M}$, wirkt es jedoch zytotoxisch [Brandt 2002]. Auch dieser Effektor zeigte keine inhibierende Wirkung auf die Elicitor-induzierte H_2O_2 -Bildung.

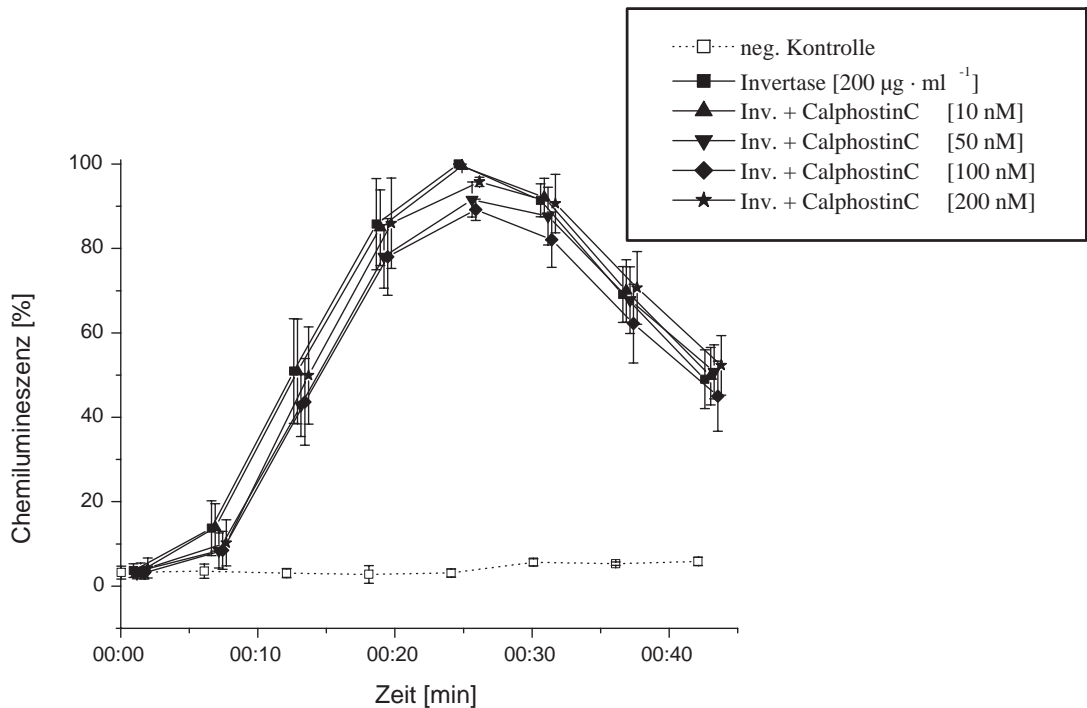


Abbildung 3.7: Zeitlicher Verlauf der Invertase-induzierten H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des PKC-Inhibitors Calphostin C in den Konzentrationen 10, 50, 75, 100 und 200 nM. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Um weiteren Aufschluss über die Beteiligung der PKC am „oxidative burst“ zu erhalten, wurden die Effektoren OAG, ein Diacylglycerin-Analogon, und PMA, ein Phorbolster, auf eine Aktivierung des „oxidative burst“ getestet. Beide Effektoren können durch Bindung an PKC das Enzym aktivieren.

In der Abbildung 3.8 wurden die Ergebnisse der Messungen mit beiden PKC-Aktivatoren zusammengefasst. Weder die Gegenwart von OAG noch von PMA führte zu einer messbaren H_2O_2 -Synthese in den Süßkartoffel-Suspensionskulturen. Die Effektoren wiesen in anderen Zellsystemen bereits im niedrigen mikromolaren Bereich (OAG) oder sogar schon im nanomolaren Bereich (PMA) ihre maximale PKC-aktivierende Wirkung auf. Bei der Verwendung in den Süßkartoffel-Suspensionskulturen konnte in diesen Konzentrationsbereichen keine aktivierende Wirkung auf den „oxidative burst“ erzielt werden. Auch eine starke Erhöhung der Effektor-Konzentrationen hatte keine Aktivierung der H_2O_2 -Synthese zur Folge.

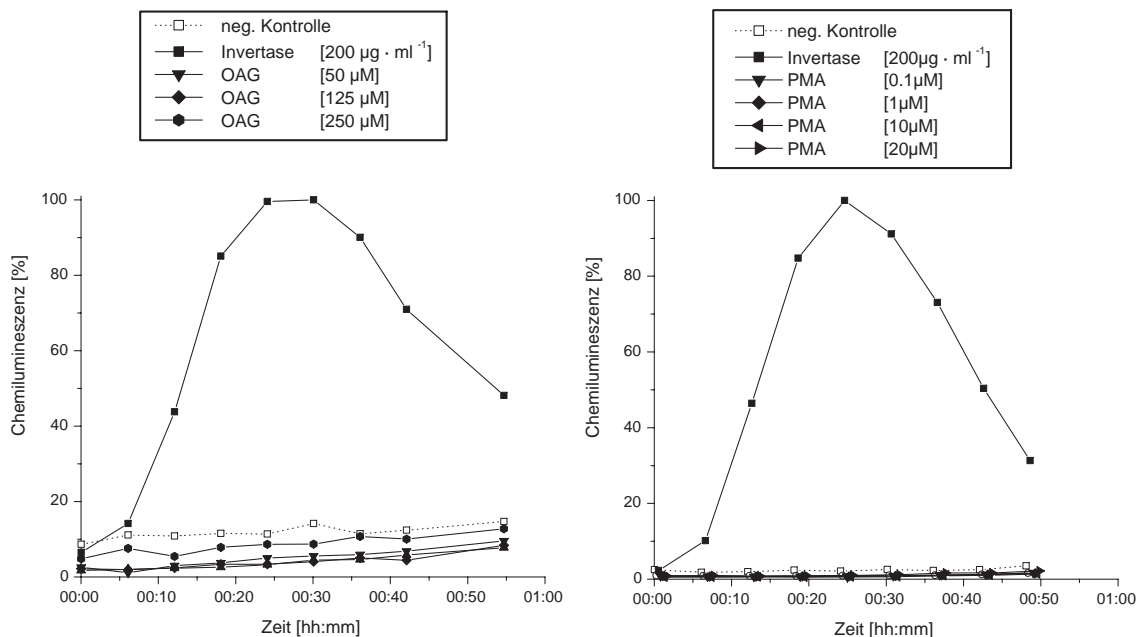


Abbildung 3.8: Zeitlicher Verlauf der H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Applikation der PKC-Aktivatoren OAG (Oleyl-Acetyl-Glycerin) in den Konzentrationen 50, 125 und 250 μM und PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat) in den Konzentrationen 0,1, 1, 10 und 20 μM .

Zur Beurteilung einer Beteiligung anderer Protein-Kinasen am Signalweg des „oxidative burst“ wurde der Effektor K-252a, ein Inhibitor von Serin/Threonin-Kinasen in seiner Wirkung getestet. K-252a wirkt bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich stark inhibierend. Zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen zählt u.a. auch die große und wichtige Klasse der CDPK's. Die CDPK's sind Ca^{2+} -abhängigen, aber Calmodulin-unabhängigen Protein Kinasen, die an ihrem C-Terminus eine „Calmodulin-ähnliche“ Domäne besitzen. Diese Domäne weist konservierte Ca^{2+} -bindende Motive auf, die auch für Calmodulin typisch sind.

Der Modulator K-252a wurde in den Konzentrationen 0,1, 0,5 und 1 μM im Hinblick auf seine inhibierende Wirkung bei der H_2O_2 -Synthese getestet. In Abbildung 3.9 ist die Kinetik der Invertase-induzierten H_2O_2 -Bildung abhängig von der eingesetzten Effektorkonzentration dargestellt. Dabei wurde bei der Verwendung einer Modulator-Konzentration von 0,1 μM eine halbmaximale Inhibierung der H_2O_2 -Synthese nachgewiesen. Bei den beiden, in diesen Experimenten eingesetzten, höheren Konzentrationen wurde die H_2O_2 -Bildung bereits vollständig unterdrückt.

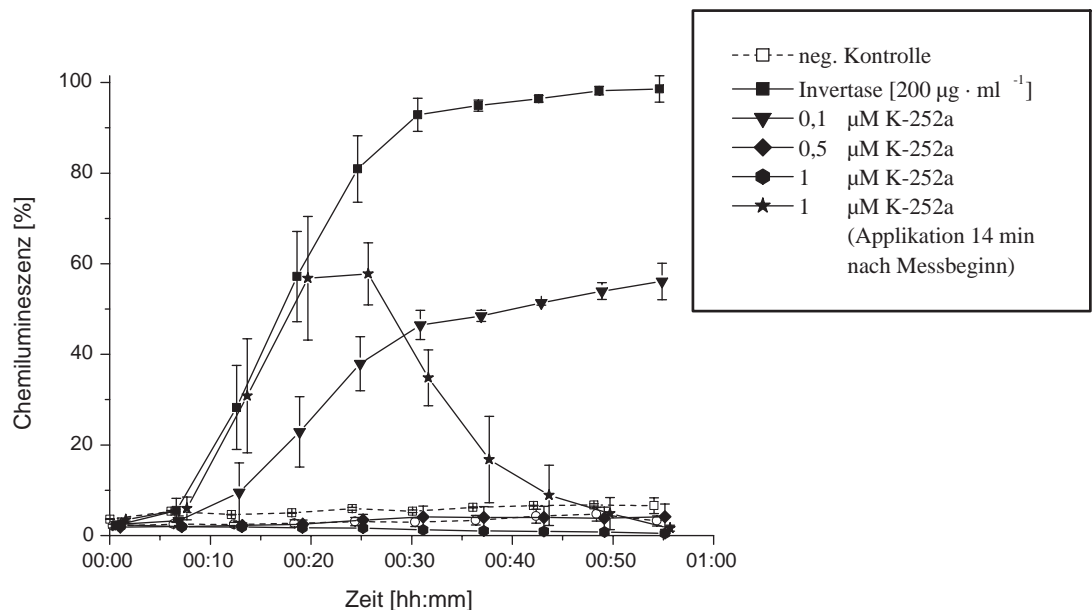


Abbildung 3.9: Zeitlicher Verlauf der Invertase-induzierten H_2O_2 -Bildung in einer Süßkartoffel- Suspensionskultur nach Zugabe des Ser/Threo-Protein-Kinase Inhibitors K-252a in den Konzentrationen 0,1, 0,5 und 1 μM . \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Von besonderer Bedeutung ist die Beobachtung, dass auch ein voll induzierter „oxidative burst“ durch die Applikation von 1 μM K-252a vollständig inhibiert werden konnte. Die Kinetik dieses Versuchansatzes zeigte allerdings keine sofortige Reduktion der H_2O_2 -Synthese. Nachdem der Modulator 15 Minuten nach Messbeginn der Probe appliziert wurde stieg zunächst die H_2O_2 -Konzentration noch auf etwa 50% des Maximums der Positiv-Kontrolle (Invertase) an. Erst dann stellte sich die inhibierende Wirkung des K-252a ein und etwa 30 Minuten nach Applikation des Effektors befand sich die Chemilumineszenzintensität auf dem Niveau der Negativ-Kontrolle.

3.5 Beteiligung von Phospholipasen am „oxidative burst“

Externe Signale können von der Zelle unter anderem durch die Produktion von intrazellulären sekundären Botenstoffen über Rezeptor-aktivierte Enzyme weitergeleitet bzw. verarbeitet werden. Deren Botenstoffe sind häufig Hydrolyseprodukte von Membrankomponenten der Zelle. Seit den frühen 80'er Jahren traten insbesondere die Phospholipide als Vorstufen solcher Botenstoffe in den

Blickpunkt des Interesses. Mittlerweile sind vier verschiedene Effektor-Enzyme in der pflanzlichen Signalgebung durch Phospholipide bekannt. Sie werden in den Klassen der Phospholipase C (PLC), der Phospholipase A₂ (PLA₂), der Phospholipase D (PLD) und der Phosphoinosit 3-Kinase (PI3K) voneinander differenziert. Besondere Bedeutung als sekundäre Botenstoffe haben die Verbindungen Inositol-1,4,5-triphosphat [Ins(1,4,5)P₃] und Diacylglycerin (DAG) als Produkte der katalytischen Wirkung der PLC. Von der PLA₂ werden Lysophospholipide und freie Fettsäuren gebildet, von der PLD die Phosphatidsäure (PtdOH) und schließlich das Phosphatidylinositol-triphosphat [PtdIns(3,4,5)P₃] als Produkt der Phosphoinosit-3-Kinase. Ins(1,4,5)P₃ induziert den Ausstrom von Ca²⁺ aus internen Ca²⁺-Speichern, wie der Vakuole, dem ER oder auch den Mitochondrien. Als Antwort auf einen externen Stimulus führt dies schließlich zur Modellierung eines Ca²⁺-Signals in einer Zelle. Die Phospholipasen werden alle über G-Protein bindende Rezeptoren aktiviert, wobei es grundsätzlich möglich ist, dass über einen Rezeptor mehrere Phospholipasen aktiviert werden können. Für die hier vorliegenden Untersuchungen ist es zudem von Bedeutung, dass sowohl die PLC als auch die PLA₂ in der Lage sind die NADPH-Oxidase zu aktivieren und so die Bildung von H₂O₂ zu induzieren.

3.5.1 Phospholipase A₂

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der PLA₂ an der Signalweiterleitung eines elicitierenden Stimulus in Süßkartoffel-Suspensionszellen das pharmakologische Agens Chlorpromazin-HCl verwendet (*siehe Tab. 2.8 auf S. 34*). In der Abbildung 3.10 sind die maximalen Chemilumineszenzintensitäten [%] bei vier verschiedenen Konzentrationen von Chlorpromazin-HCl im Vergleich zu einer Positiv-Kontrolle (Invertase) und einer Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle) dargestellt. Aus der Abbildung geht hervor, dass bei Applikation von 10 μM des Effektors keine Reduktion der H₂O₂-abhängigen Chemilumineszenz gemessen werden konnte. Sie lag bei allen durchgeführten Experimenten auf einem Niveau mit der Positiv-Kontrolle. Bei Erhöhung der Effektor-Konzentration auf 50 μM konnte in dem Versuchsansatz dann bereits eine Verminderung der detektierten Chemilumineszenz induziert werden. Die H₂O₂-Synthese wurde bei dieser Konzentration um etwa 80% in Bezug zu der Positiv-Kontrolle reduziert. Eine Steigerung der Effektorkonzentration auf 100 bzw. 200 μM zog eine vollständige und reproduzierbare Reduktion der H₂O₂-abhängigen Chemilumineszenz in den Versuchsansätzen nach sich.

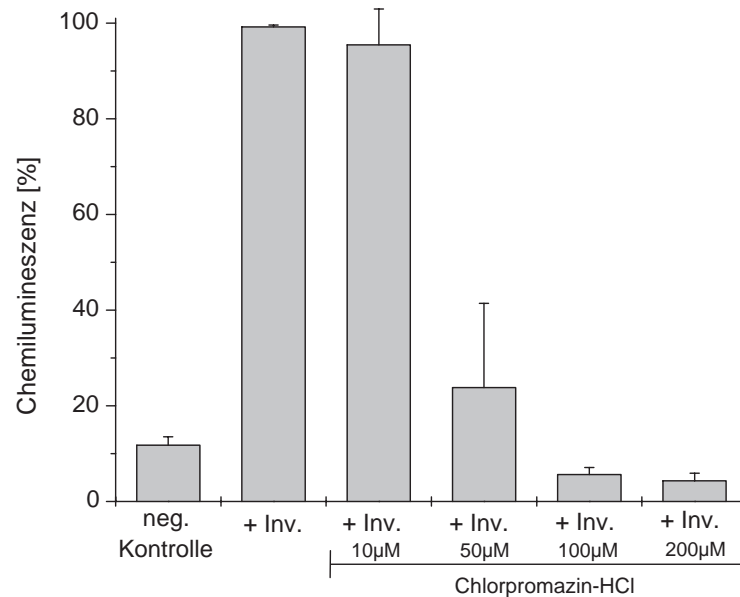


Abbildung 3.10: Darstellung der maximalen Invertase-induzierten Chemilumineszenz in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des PLA₂-Inhibitors Chlorpromazin-HCl in den Konzentrationen 10, 50, 100 und 200 µM. ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.5.2 Phospholipase C

Um genaueren Aufschluss über die Beteiligung der PLC am Elicitor-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffel-Suspensionskulturen zu erlangen wurde der Effektor U-73122 (Tabelle 2.2) auf seine inhibierende Wirkung getestet. Dieser Effektor ist ein hoch spezifischer Inhibitor der PLC. Die Spezifität des Effektors wird mit Hilfe einer Analogsubstanz sichergestellt, die nur eine sehr geringe inhibierende Wirkung auf die PLC besitzt. Aus der Abbildung 3.11 wird ersichtlich, dass der PLC-Inhibitor U-73122 eine Reduktion der H₂O₂-abhängigen Chemilumineszenz induzierte. Bei Applikation von 5 µM des Effektors wurde eine halbmaximale Inhibierung des „oxidative burst“ detektiert. Die Inkubation der Zellen mit 2 µM U-73122 führte ebenfalls zu einer Reduktion des Chemilumineszenzsignals um etwa 20%. Eine weitere Konzentrationsverringering des Effektors in dem Versuchsansatz auf 0,5 µM ließ keine reproduzierbare Reduktion des Signals mehr erkennen. Die Kontrollsubstanz U-73343 zeigte bei Applikation von 5 µM ebenfalls eine unterdrückende Wirkung auf das Chemilumineszenzsignal. Das Effektor-Analogon reduzierte die H₂O₂-abhängige Chemilumineszenz unter 40% der Positiv-Kontrolle (Invertase) und erreichte

damit die stärkste Inhibierungsrate aller gemessenen Ansätze. Dies deutete darauf hin, dass es sich bei den H_2O_2 -unterdrückenden Effekten nicht um spezifische Einflüsse auf die PLC handelte.

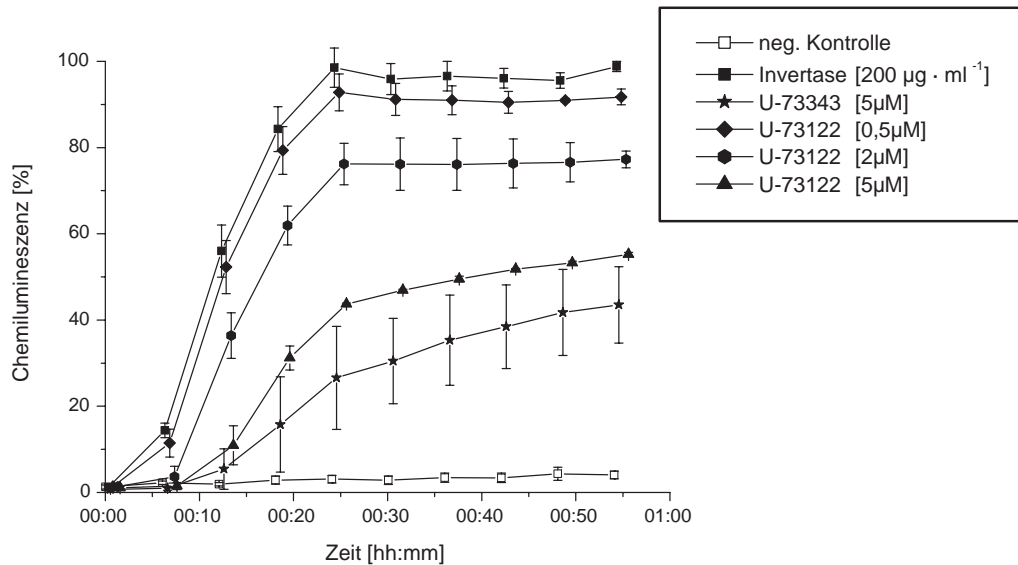


Abbildung 3.11: Zeitlicher Verlauf der Invertase-induzierten Chemilumineszenz in Süßkartoffel-Suspensionskulturen nach Zugabe des PLC-Inhibitors U-73122 in den Konzentrationen 0,5, 2 und 5 μM sowie der nicht PLC-inhibierenden Analogsubstanz U-73343 in der Konzentration von 5 μM . neg.-Kontrolle = nicht elicitierte Zellkultur; Invertase = elicitierte Positiv-Kontrolle, ohne weiteren Effektor. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Da es bei der Applikation von U-73122 offenbar zu unspezifischen Reaktionen kam sollte mit dem Effektor Neomycin-Sulfat, einem weiteren selektiven PLC-Inhibitor, die Frage nach der Beteiligung der PLC am „oxidative burst“ der Süßkartoffelzellen geklärt werden. In Abbildung 3.12 ist die maximale Chemilumineszenz [%] in Abhängigkeit dieses PLC-Inhibitors gezeigt. Nach Applikation von 100 μM bzw. 200 μM Neomycin-Sulfat war keine deutliche Reduktion feststellbar. Bei Verwendung von 400 μM des Effektors konnten die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz lediglich um ca. 20% reduziert werden. Der PLC-Inhibitor konnte den Invertase-induzierten „oxidative burst“ bei Applikation von 600 bis 800 μM Neomycin-Sulfat um maximal 24% reduzieren. Die H_2O_2 -Synthese zeigte, wenn auch nur eine geringe, Sensitivität gegenüber dem Neomycin-Sulfat und deutete damit auf eine mögliche Beteiligung der PLC am „oxidative burst“ hin.

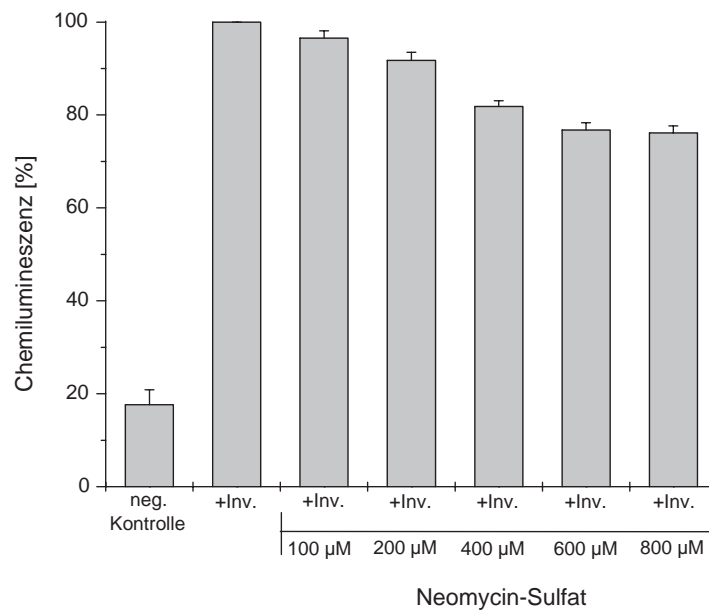


Abbildung 3.12: Maximale Invertase-induzierte Chemilumineszenz [%] in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Zugabe des PLC-Inhibitors Neomycin-Sulfat in den Konzentrationen 100, 200, 400, 600 und 800 μM . \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.6 Extrazelluläre pH-Wertmessung - Alkalisierungstests

Die Alkalisierung des externen Milieus ist im engeren Sinne keine direkte Reaktion der Pflanzenzelle auf einen externen Stimulus. Diese pH-Wertänderung ist vielmehr eine Folge veränderter Ionenströme und somit ein Ergebnis der Membrandepolarisation. Durch aktivierte Anionenkanäle verlassen neben Cl^- -Ionen auch Anionen organischer Säuren die Zelle. Diese binden Protonen und alkalisieren so das externe Medium [Felle et al. 2000]. Eine weitere Ursache für die extrazelluläre Alkalisierung ist die H^+ -Bindung bei der Synthese von H_2O_2 durch die membranständige NADPH-Oxidase. In den folgenden Versuchen sollte dieser Aspekt der pflanzlichen Abwehrmechanismen auch in Hinblick auf die Verwendung verschiedener elicitierender Substanzen und inhibierender Effektoren näher betrachtet werden.

3.6.1 Invertase-induzierte externe Alkalisierung

In Abbildung 3.13 ist der Verlauf einer Elicitor-induzierten Alkalisierung des Kultur-Mediums einer Süßkartoffelsuspensionskultur dargestellt. Die Höhe der pH-Wertänderung war zum einen von der Konzentration des eingesetzten Elicitors und zum anderen vom Alter und der Wachstumsphase der Zellkultur abhängig (siehe Kap. 2.5 auf S. 24). Die Kinetik der pH-Wertänderung zeigte nach einer kurzen lag-Phase einen exponentiellen Verlauf und ging anschließend in eine Sättigungsphase über. Eine nachfolgende Azidifizierung wurde bei keiner Messung einer Alkalisierungsreaktion (Kapitel 2.5) festgestellt.

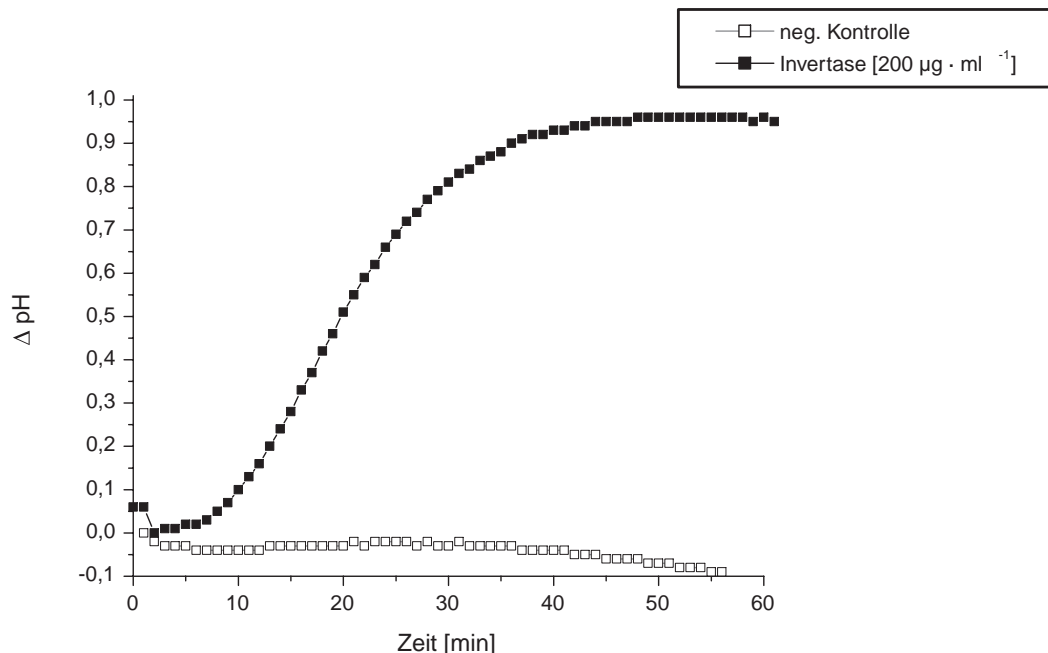


Abbildung 3.13: Repräsentative Darstellung des zeitlichen Verlaufs einer Elicitor-induzierten (Invertase [$200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]) pH-Wertänderung im Kulturmedium einer Süßkartoffelsuspensionskultur.

3.6.2 Alkalisierungstest in Anwesenheit des Anionenkanal-Blockers DIDS

Wie bereits in Kapitel 3.2 dargestellt wurde, sind aktivierte Anionenkanäle in der pflanzlichen Zellmembran für die Invertase-induzierte H_2O_2 -Synthese wichtig. Zur Untermauerung dieser Resultate wurde der Effektor DIDS zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung von Anionenkanälen an der Elicitor-induzierten extrazellulären Alkalisierung verwendet. In Abbildung 3.14 ist der Verlauf einer Alkalisierungsreaktion in Anwesenheit des Effektors DIDS bei gleichzeitiger

Elicitierung mit $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase dargestellt. Bei dieser Messung wurde neben einer Verzögerung der extrazellulären Alkalisierung auch ein wesentlich geringerer ΔpH in dem Versuchsansatz mit $100 \mu\text{M}$ DIDS beobachtet. Die maximale ΔpH -Wertänderung von 0,35 pH-Einheiten wurde nach 25 Minuten erreicht, wohingegen der nicht reprimierte Invertase-Ansatz eine ΔpH -Wertänderung um 0,65 pH-Einheiten aufwies.

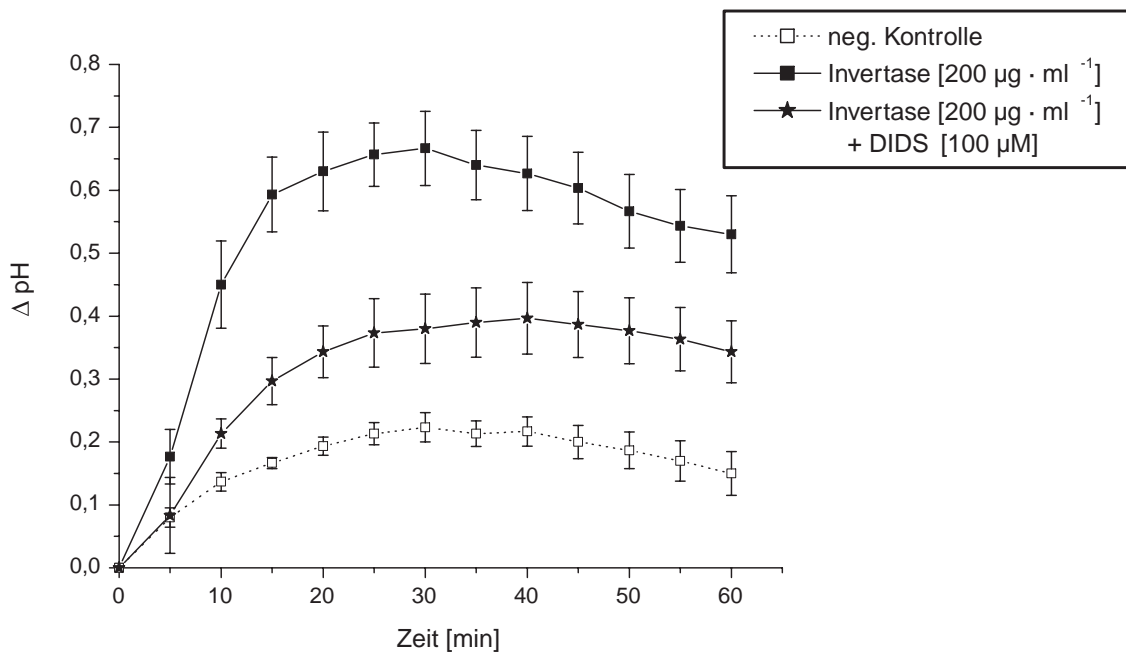


Abbildung 3.14: pH-Wertänderung des Kulturmediums in einer mit DIDS inkubierten Süßkartoffel-Suspensionskultur bei Elicitierung mit Invertase, einer Positiv-Kontrolle (Invertase) sowie einer Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle). \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

3.6.3 Mastoparan-induzierte externe Alkalisierung

Die Hinweise einer Beteiligung von Phospholipase A₂ und Phospholipase C am „oxidative burst“ der Süßkartoffelzellen führten zu der Frage wie diese Signalkomponenten aktiviert werden. Untersuchungen an anderen Zellsystemen zeigten eine Aktivierung der Lipasen durch G-Proteine. Versuche mit dem G-Protein-Aktivator Mastoparan eine H₂O₂-Synthese in Süßkartoffelzellen zu induzieren waren nicht erfolgreich. Der Effektor Mastoparan, ein Oligopeptid aus 14 Aminosäuren, besitzt die Fähigkeit heterotrimere G-Proteine (*siehe Kap. 1.1.7 auf S. 11*) zu aktivieren. Die räumliche Konformation dieses Peptids imitiert die Domäne Liganden-aktivierter Rezeptormoleküle, welche die Sequenz der G-Proteine registrieren können. Um diese Resultate zu stützen

wurde die Messung der extrazellulären Alkalisierung in Anwesenheit des Aktivators als zweiter Indikator einer Abwehrreaktion herangezogen.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Messergebnisse des Alkalisierungstestes mit dem Effektor Mastoparan (Abb. 3.15) und einer Invertase-induzierten extrazellulären Alkalisierung wurde ein unterschiedlicher Verlauf der pH-Wertänderung des Invertase-Ansatzes und der Ansätze mit Mastoparan festgestellt. Die Invertase-induzierte externe Alkalisierung des Kulturmediums setzte mit einer deutlichen Verzögerungsphase von etwa 5 Minuten ein (vergleiche auch Abb. 3.13), wohingegen die Kinetik der Mastoparan-induzierten Ansätze diese *lag*-Phase nicht zeigten.

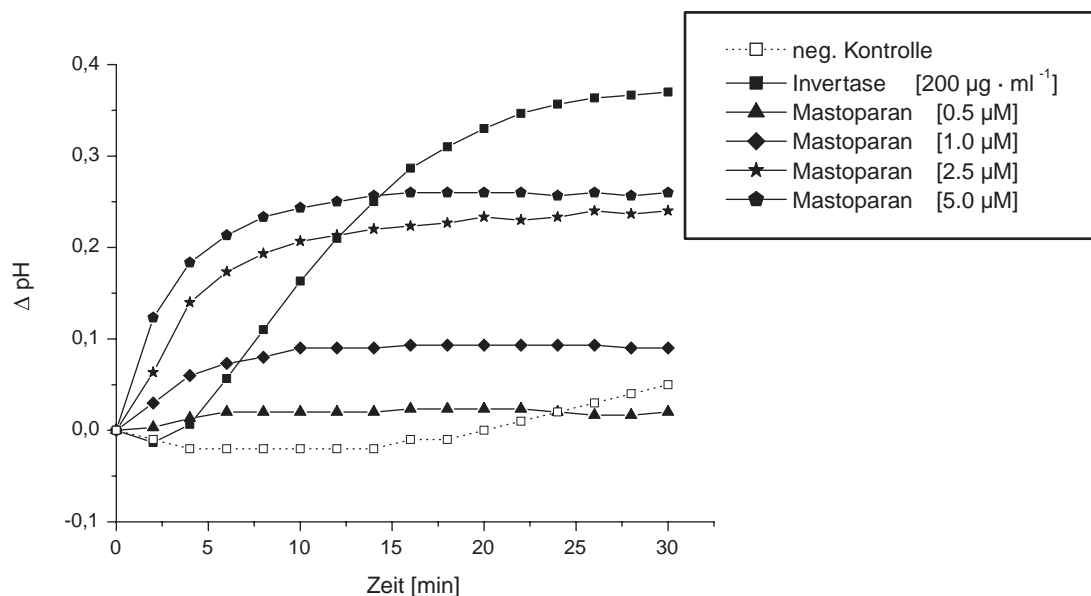


Abbildung 3.15: Darstellung der pH-Wertänderung des Kulturmediums in einer Süßkartoffelsuspensionskultur nach Applikation des G-Protein-Aktivators Mastoparan in den Konzentrationen 0,5, 1, 2,5 und 5 µM. ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Die in Abbildung 3.15 dargestellten Alkalisierungsmessungen zeigten eine konzentrationsabhängige Änderung des extrazellulären pH-Wertes. Bei einer Mastoparan-Konzentration von 0,5 µM war keine pH-Wertänderung im Kulturmedium der Süßkartoffelzellen nachweisbar. Eine erhöhte Effektor-Konzentration von 1 µM im Versuchsansatz, löste einen Anstieg des pH-Wertes im Kulturmedium aus. Der Anstieg betrug jedoch im Schnitt lediglich 0,08 pH-Einheiten und erreichte somit gerade 20% des durchschnittlichen Maximalwertes des Invertase-Ansatzes. Bei Applikation von 2,5 µM Mastoparan wurde eine Alkalisierung von 0,2 pH-Einheiten erreicht, was ca. 60% des Invertase-Ansatzes entsprach. Bei einer weiteren Erhöhung der Konzentration

auf 5 μM war nur noch eine geringfügige Zunahme der Alkalisierung zu beobachten. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Beteiligung heterotrimerer G-Proteine in dem Elicitor-induzierten Signalweg des „oxidative burst“ in Süßkartoffeln. Die nicht nachweisbare Induktion von H_2O_2 bei Applikation von Mastoparan war vermutlich auf eine Reduzierung der Signalstärke durch den G-Protein-Aktivator zurückzuführen.

3.6.4 Alkalisierungstest mit dem PLA_2 -Inhibitor HELSS

In den nachfolgenden Experimenten sollte eine direkte Kopplung bzw. Aktivierung der Phospholipase A_2 durch G-Proteine nachgewiesen werden. Dafür wurde neben dem G-Protein-Aktivator Mastoparan der Phospholipase-Inhibitor HELSS verwendet. Die Effektorsubstanz HELSS (*siehe Tab. 2.8 auf S. 34*) ist ebenfalls ein potenter PLA_2 -Inhibitor, der sich jedoch in Vorversuchen als ungeeignet für H_2O_2 -Messungen in Süßkartoffel-Suspensionskulturen erwies, da sein Einsatz zu einer Reduktion des Chemilumineszenz-Signals führte. Der PLA_2 -Inhibitor Chlorpromazin-HCl (Kapitel 3.10) zeigte dagegen keinen inhibierenden Einfluss auf die Elicitor-induzierte Alkalisierung.

Die Abbildung 3.16 zeigt, dass bei der Applikation von 10 μM HELSS keine Alkalisierung des Kulturmediums induziert wurde. Mit dem PLA_2 -Inhibitor HELSS in einer Konzentration von 10 μM und gleichzeitiger Inkubation der Zellen mit 5 μM Mastoparan (*siehe auch Kapitel 3.6.3*) wurde eine extrazelluläre Alkalisierung induziert. Dabei kam es innerhalb von 7 Minuten zu einer pH-Wertänderung um 0,19 pH-Einheiten. Diese leichte Alkalisierung blieb im Messzeitraum von einer Stunde etwa konstant. Eine Konzentrationsverringerung des PLA_2 -Inhibitors auf 2 μM bei gleichzeitiger Applikation von 5 μM Mastoparan, ließ den pH-Wert des Kulturmediums innerhalb von 7 Minuten um 0,3 pH-Einheiten ansteigen. Dieses Alkalisierungsniveau sank jedoch im Laufe der Messdauer (60 Minuten) wieder um etwa 0,1 pH-Einheiten ab. Die ungehemmte extrazelluläre Mastoparan-induzierte Alkalisierung erreichte eine pH-Wertänderung um 0,45 pH-Einheiten. Es wurde ein Maximum dieser Alkalisierungsreaktion 10 Minuten nach dem Inkubationsbeginn ermittelt. Im nachfolgenden Messzeitraum verringerte sich der Δ pH-Wert um 0,1 pH-Einheiten.

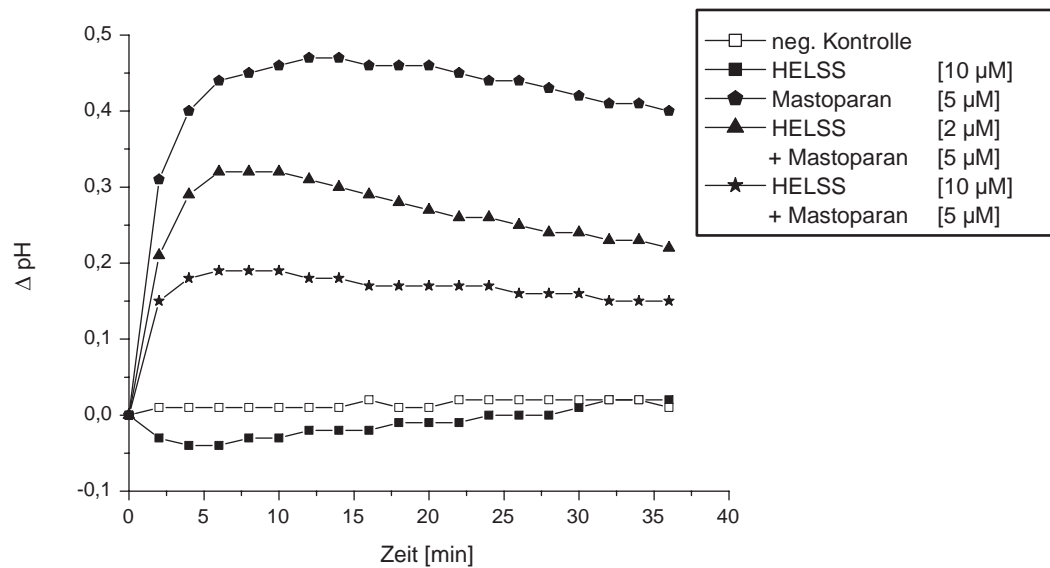


Abbildung 3.16: Repräsentative Darstellung einer Mastoparan-induzierten pH-Wertänderung des Kulturmediums einer Süßkartoffel-Suspensionskultur nach Applikation des PLA₂-Inhibitors HELSS in den Konzentrationen 2 und 10 μM.

3.6.5 Bakterien-induzierte externe Alkalisierung

Mikroorganismen stellen in der natürlichen Umgebung der Pflanze einen potentiellen Stimulus für Abwehrreaktionen dar. Wurde bisher der Einfluss eines „künstlichen“ Stressors wie der Invertase untersucht, so ist weiterführend ein Vergleich mit bakteriell induzierten Effekten notwendig. Durch die Betrachtung bakterieller Einflüsse auf die Abwehrreaktionen der Pflanzenzellen sollten Differenzierungen zwischen dem bakteriellen Interaktionspartner *Gluconacetobacter diazotrophicus* und dem natürlichen Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* herausgearbeitet werden.

Die Inkubation von Süßkartoffel-Suspensionskulturen mit dem Phytopathogen *R. solanacearum* (Tab. 2.1) wurde mit einer Animpfdichte von $OD_{578} = 0,025$ durchgeführt. Diese Animpfdichte erwies sich für die Induktion eines „oxidative burst“ als optimal (Kapitel 3.8). Die Zugabe der Bakterien führte zu einer deutlichen Alkalisierung des Kulturmediums, wobei die Kinetik der pH-Wertänderung analog zu der Invertase induzierten Alkalisierung verlief. In Abbildung 3.17 ist zu erkennen, dass sowohl bei der Invertase-induzierten als auch der Pathogen-induzierten Alkalisierung anfänglich eine ca. 5-minütige lag-Phase vorlag, an die sich ein exponentieller Anstieg des pH-Wertes anschloss. Nach etwa 30 Minuten ging die pH-Wertänderung in eine Sättigung über, die sich bis zum Ende der Messdauer von 60 Minuten auf diesem Niveau stabilisierte.

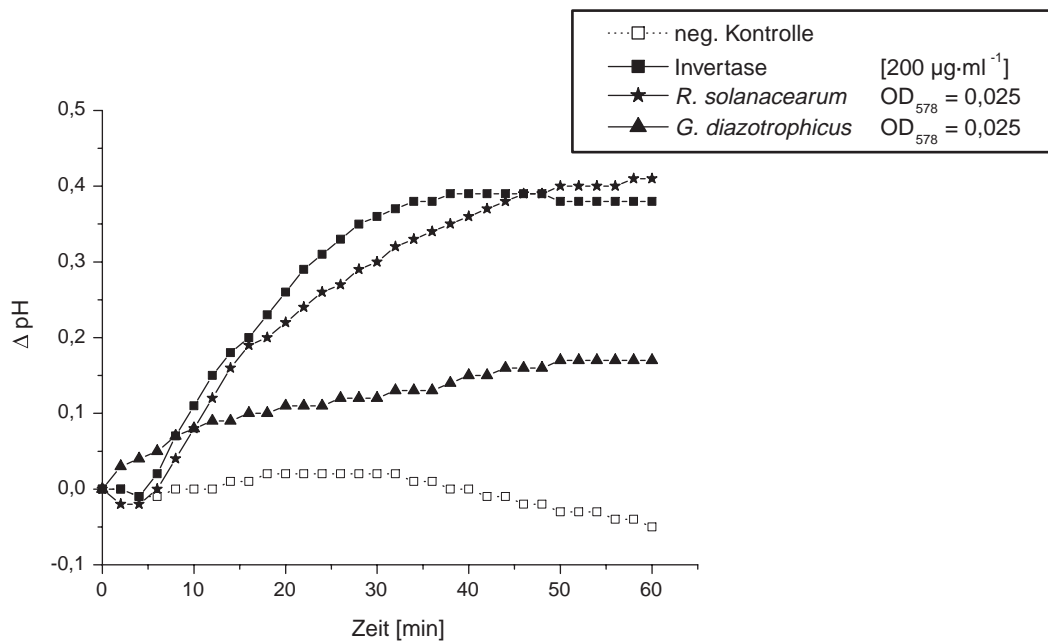


Abbildung 3.17: Repräsentative pH-Wertänderung des Kulturmediums in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur bei Inkubation mit Invertase [$200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$], mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* und dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* mit jeweils einer OD_{578} von 0,025.

Ein anderes Ergebnis zeigte die Endophyten-induzierte Alkalisierungsreaktion in den Süßkartoffel-Suspensionskulturen. Es kam zu einer deutlich geringeren Alkalisierung des Kulturmediums bei gleicher inokulierter Bakteriendichte ($\text{OD}_{578} = 0,025$). Die Pathogen-induzierte Alkalisierung erreichte mit einer ΔpH -Wertänderung von 0,4 das Niveau der Invertase-induzierten Alkalisierung, wohingegen in dem Endophyten-Ansatz lediglich eine ΔpH -Wertänderung von 0,15 induziert wurde.

3.7 HPLC-Analyse verschiedener Zellkulturen

Bei der Signalgebung bzw. Signalunterdrückung während der Ausbildung einer Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktion hat sich der Phytoeffektor Indol-3-Essigsäure (IAA) als ein möglicher Modulator dieser Signalkaskaden herauskristalliert. Interessanterweise produzieren nicht nur Pflanzen diesen Phytoeffektor, sondern auch eine Reihe von Mikroorganismen. Unter ihnen befindet sich der Endophyt *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Er ist in der Lage Konzentrationen zwischen $0,14$ und $3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ IAA zu synthetisieren und das Auxin aus der Zelle auszuschleusen [Fuentes-Ramirez et al. 1993]. Ähnliche stoffwechselphysiologische Eigenschaften konnten

bei anderen synergistischen Mikroorganismen wie beispielsweise *Azospirillum* [Crozier et al. 1988] aber auch bei Phytopathogenen wie *Pseudomonas syringae* [Robinette und Matthyse 1990] nachgewiesen werden. In einer Zusammenarbeit mit Herrn Dr. K. Kalippke wurden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Berger und Mitarbeitern (Institut für Lebensmittelchemie, Universität Hannover) Zellkulturmedien in Hinblick auf ihren IAA-Gehalt analysiert¹. Die HPLC-Analysen von Reinkulturen sowie einer Mischkultur der Interaktionspartner *Ipomoea batatas* und dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* sollten Aufschluss darüber geben, ob durch die Interaktion eine vermehrte Synthese des Auxins stattfindet. Dafür wurden Rein- sowie Mischkulturen beider Organismen in einem Kultivierungsalter von 2, 6 und 21 Tagen auf ihren IAA-Gehalt hin untersucht.

Die Kulturen wurden wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben vorbereitet, aufgereinigt (*siehe Kap. 2.8.3 auf S. 31*) und die IAA-Konzentration im Kulturmedium mittels HPLC-Analyse bestimmt (*siehe Kap. 2.8.4 auf S. 32*). Wie in Abbildung 3.18 dargestellt, nahm der IAA Gehalt in der Reinkultur von *Gluconacetobacter diazotrophicus* über die gesamte Kulturdauer hinweg ab. So wurde in den 2 Tage alten Kulturen des Endophyten eine Konzentration von $0,179 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ nachgewiesen. In den 6 Tage alten Reinkulturen sank die Konzentration der IAA jedoch auf $0,063 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ab, und nach 21-tägiger Kultivierungsdauer war schließlich kein IAA mehr nachweisbar.

Im Vergleich zur Endophytenkultur von *Gluconacetobacter diazotrophicus* wurde bei der Reinkultur der Süßkartoffelsuspension eine gegenläufige Änderung im IAA Gehalt beobachtet. So konnte nach zwei Kultivierungstagen keine IAA mit Hilfe der HPLC-Technik nachgewiesen werden. Nach 6 Tagen lag hingegen eine IAA-Konzentration von $0,637 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ vor, die nach 21-tägiger Kultivierung auf einen Wert von $0,705 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ leicht anstieg. In der Mischkultur beider Organismen lag die IAA-Konzentration zu jedem Kultivierungszeitpunkt (2, 6, 21 Tage) deutlich höher als in den Reinkulturen der Süßkartoffel und des Endophyten. Am zweiten Tag betrug die IAA-Konzentration $0,806 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, was etwa der 4,5fachen Konzentration der Summe beider Reinkulturen zu diesem Zeitpunkt entsprach. Am 6. Tag der Mischkultivierung stieg die IAA-Konzentration nochmals deutlich auf $3,093 \mu\text{g}/\text{ml}$ an. Auch hier lag das Verhältnis zwischen der Summe der Reinkulturen und den Mischkulturen bei dem Faktor 4,5. Am 21. Kultivierungstag sank die absolute IAA-Konzentration in der Mischkultur wieder auf $1,737 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ab und erreichte damit nur noch die Hälfte der Konzentration, die am 6. Tag detektiert wurde. Gegenüber den Reinkulturen war die IAA-Konzentration zu diesem Zeitpunkt um den Faktor 2,5 erhöht.

¹Die Ergebnisse dieser Zusammenarbeit wurden bereits im Jahr 2000 von Herrn Dr. Kalippke im Rahmen seiner Dissertation [Kalippke 2000] veröffentlicht.

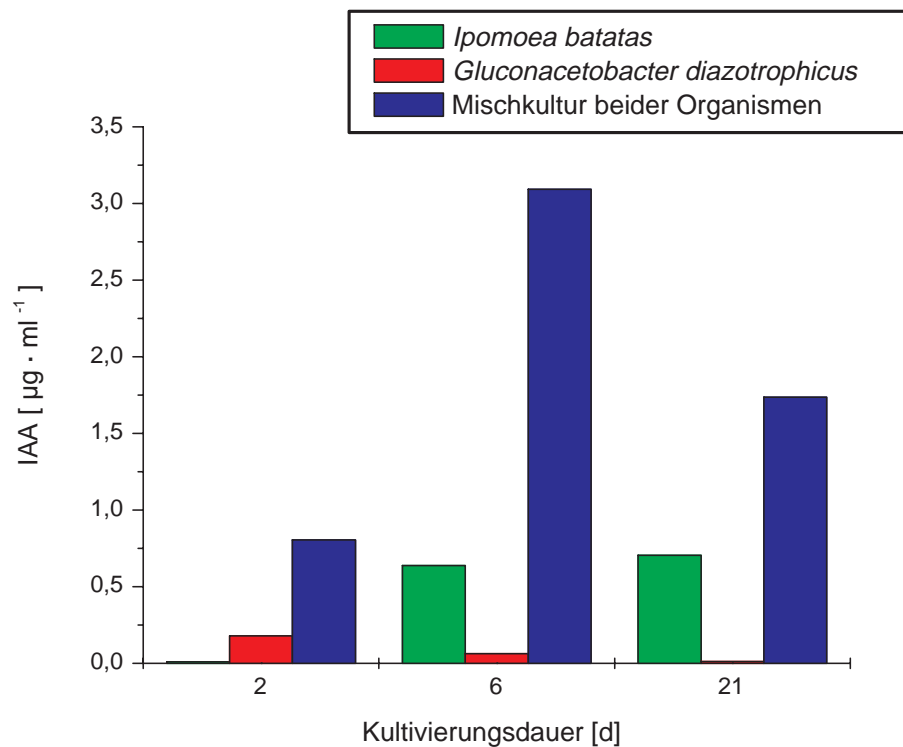


Abbildung 3.18: IAA-Konzentrationen in den Reinkulturen von *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* sowie in einer Mischkultur beider Organismen nach 2, 6 und 21 Tagen Kulturdauer.

3.7.1 Einfluss des Auxins Indol-3-Essigsäure auf die externe Alkalisierung

Ein interessanter Aspekt in der Betrachtung der extrazellulären Alkalisierung ist ein möglicher Effekt des Auxins IAA. Wie schon in (Kapitel 3.7) dargestellt, ist die Indol-3-Essigsäure bei der Interaktion von Mikroorganismen und Süßkartoffelzellen involviert. Neben dem wachstumsfördernden Einfluss, der bspw. bei der Interaktion von *Arabidopsis* und *Azospirillum* nachgewiesen werden konnte [Schulze-Stanke 2003], wird auch eine unterdrückende Wirkung auf Abwehrreaktionen der Pflanzenzelle diskutiert [Robinette und Matthyse 1990].

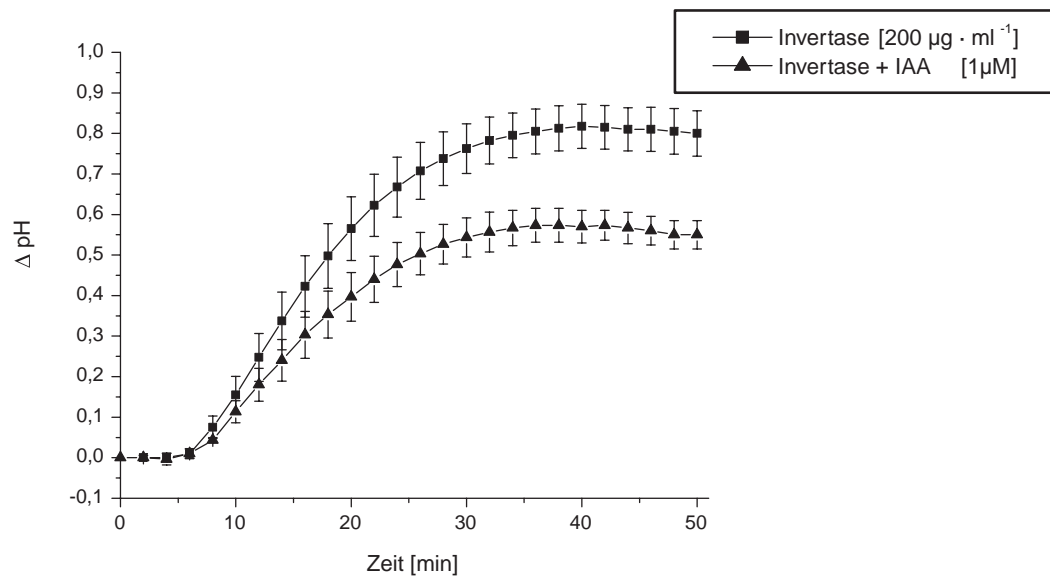


Abbildung 3.19: pH-Wertänderung des Kulturmediums in einer mit IAA inkubierten Süßkartoffel-Suspensionskultur bei Elicitierung mit Invertase. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Bei der Betrachtung der externen Alkalisierung der Invertase-elicitierten Süßkartoffelzellen wurde in Anwesenheit von 1 μM IAA eine Verringerung dieser Reaktion beobachtet. Die Zellen wurden für diese Messungen ca. 5 Minuten vor Applikation des Elicitors mit IAA vorinkubiert. Die Kinetik der externen Alkalisierung ist in beiden Ansätzen sehr ähnlich und zeigt den typischen Verlauf einer Invertase-induzierten Alkalisierung (Kapitel 3.6.1). Im IAA-Ansatz wurde jedoch eine geringere Δ pH-Wertänderung induziert, die im Durchschnitt nur ca. 0,5 pH-Einheiten erreichte. Im Gegensatz dazu stieg der pH-Wert des Versuchsansatzes in Abwesenheit des Phytoeffektors IAA durchschnittlich um 0,8 pH-Einheiten.

3.8 Das Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* als Induktor des „oxidative burst“

Das Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* ist ein natürliches Pathogen der Süßkartoffelpflanze (siehe Kap. 1.1.4 auf S. 7) und besitzt Eigenschaften die das Bakterium zu einem idealen Modellsystem für die Untersuchung der pflanzlichen Pathogenantwort machen. Das Phytopathogen ist weltweit verbreitet, es ist sehr gut an das Leben im Boden adaptiert und kann dort für eine gewisse Zeit ohne Wirtspflanze überdauern. Zudem hat das Phytopathogen ein sehr weites Wirtsspektrum von über 200 Pflanzenspezies [Elsas et al. 2000]. Eine weitere Besonderheit dieses Bakteriums ist

die hohe Mutationsrate zu einem avirulenten Typus bei längerer Kultivierungsdauer [French et al. 1995]. Dieser Eigenschaft wurde mit einer konsequenten Stammhaltung entgegengewirkt (siehe Kap. 2.2 auf S. 17).

Bei der Betrachtung der ermittelten Messdaten eines Pathogen-induzierten „oxidative burst“ ist ein Zusammenhang zwischen der optischen Dichte des Phytopathogens und der H₂O₂-abhängigen Chemilumineszenz zu beobachten. Aus Abbildung 3.20 wird ersichtlich, dass bereits eine sehr geringe Zellzahl des Bakteriums einen voll ausgebildeten „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur induzierte. Eine optische Dichte von 0,001 des Bakteriums war ausreichend, um einen Anstieg der H₂O₂-Bildung reproduzierbar nachvollziehen zu können. Die halbmaximale Induktionsrate des „oxidative burst“ wurde bei der Inkubation der Süßkartoffelzellen mit einer OD₅₇₈ von 0,01 ermittelt. Wurde die optische Dichte des Versuchsansatzes auf 0,025 eingestellt, erreichte die H₂O₂-abhängige Chemilumineszenz etwa 80% der Invertase-induzierten Positiv-Kontrolle. Eine weitere Erhöhung der OD₅₇₈ im Probenansatz auf 0,05 hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Chemilumineszenz der Probe. Der Wert stagnierte auf dem Niveau des zuvor beschriebenen Versuchsansatzes (OD₅₇₈ = 0,025).

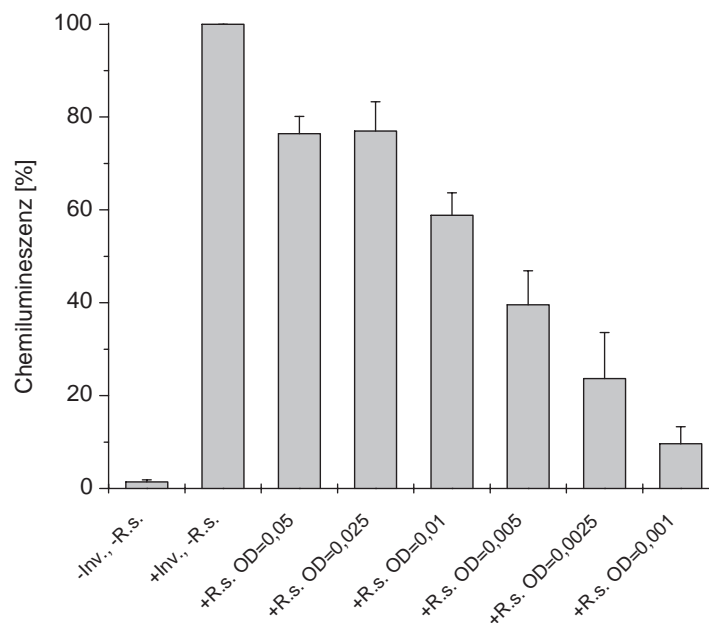


Abbildung 3.20: Darstellung der maximal induzierten Chemilumineszenz in Abhängigkeit der Zelldichte des Phytopathogens *Ralstonia solanacearum*. ± Standardfehler des Mittelwertes von 2 (+R.s. OD = 0,05) bzw. 4 Experimenten.

Im Zusammenhang mit diesen Messungen wurde das Phänomen der überdurchschnittlich schnellen Mutationsrate des Pathogens zu einem avirulenten Typ beobachtet. Dabei wurde deutlich, dass bereits ein drei- bis viermaliges Überimpfen der Bakterienkultur in frisches Kulturmedium zum teilweisen bzw. vollständigen Verlust der Pathogenität führte. Diese Beobachtung hatte zur Folge, dass in sämtlichen nachfolgenden Experimenten lediglich Kulturen eingesetzt wurden, die maximal zweimal subkultiviert worden waren (siehe auch Kapitel 2.2). Dies war notwendig, um sicherzustellen, dass es sich bei einer reduzierten Abwehrreaktion der Pflanzenzellen nicht um einen Pathogenitätsverlust des Bakteriums handelte.

Desweiteren wurde überprüft inwieweit die identifizierten Signalkomponenten PLA_2 und Ca^{2+} -abhängige Protein-Kinasen (CDPK) eines Invertase-induzierten „oxidative burst“ auch bei Elicitierung der Süßkartoffelzellen mit dem Pathogen *Ralstonia solanacearum* involviert waren. Für diese Untersuchungen wurden analog zu den Invertase-induzierten „oxidative burst“-Messungen die Effektoren K-252a (CDPK-Inhibitor) und Chlorpromazin-HCL (PLA_2 -Inhibitor) verwendet. In den in Abbildung 3.21 dargestellten Messungen wurden die in den Invertase-Versuchen ermittelten maximal wirksamen Konzentrationen des jeweiligen Effektors eingesetzt. Beide Inhibitoren unterdrückten in den eingesetzten Konzentrationen die Pathogen-induzierte H_2O_2 -Synthese vollständig. Dieses Resultat zeigte, dass sowohl die PLA_2 , als auch die CDPK essentielle Komponenten des Pathogen-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffelzellen waren.

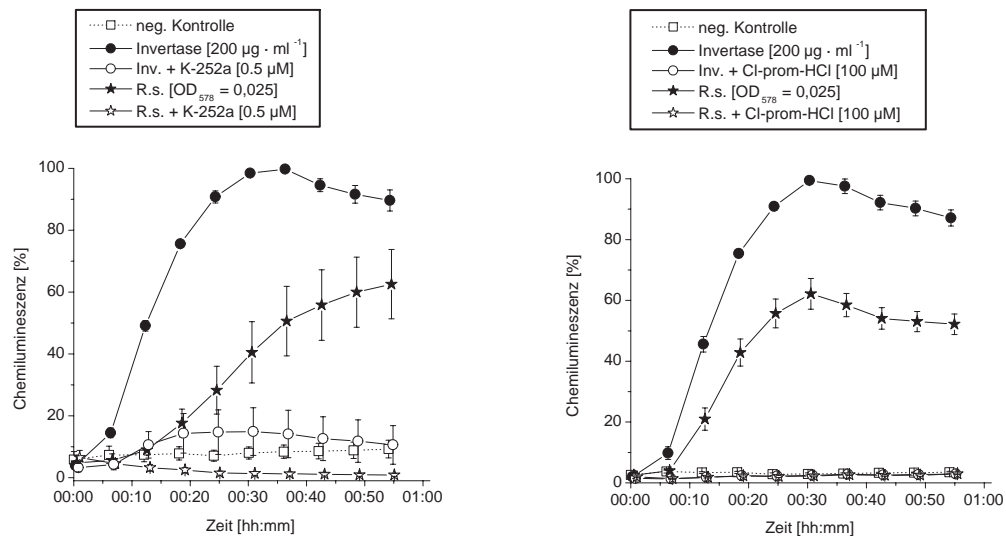


Abbildung 3.21: Zeitabhängige Darstellung der Pathogen-induzierten Chemilumineszenz in Anwesenheit des CDPK-Inhibitors K-252a und des PLA_2 -Inhibitors Chlorpromazin-HCl. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 4 Experimenten.

3.9 „oxidative burst“-Messungen mit dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus*

In den folgenden Experimenten wurde die Fähigkeit des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* geprüft, eine pflanzliche Abwehrreaktion in Süßkartoffel-Suspensionszellen in Form eines „oxidative burst“ zu induzieren. Dazu wurde eine vergleichende Untersuchung mit dem Elicitor Invertase sowie dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* durchgeführt.

Die Resultate der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz-Messungen mit der Invertase und dem Phytopathogen zeigten erwartungsgemäß eine maximale Induktion des „oxidative burst“. Die H_2O_2 -Synthese erreichte in beiden Ansätzen etwa das gleiche Niveau und bestätigte die Ergebnisse vorhergehender Experimente (Kapitel 3.8 und Kapitel 3.1). Bei der Inkubation der Pflanzenzellen mit dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* wurde ebenfalls ein Anstieg der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz nachgewiesen. Es war jedoch festzustellen, dass die Intensität der induzierten Abwehrreaktion bei gleicher optischer Dichte im Versuchsansatz ($OD_{578} = 0,025$) lediglich 30 bis 40% des Phytopathogen-induzierten „oxidative burst“ erreichte. Die Kinetik des *Ralstonia*-induzierten „oxidative burst“ hatte in etwa den gleichen Verlauf wie die Invertase-induzierte Positiv-Kontrolle (Abb. 3.22).

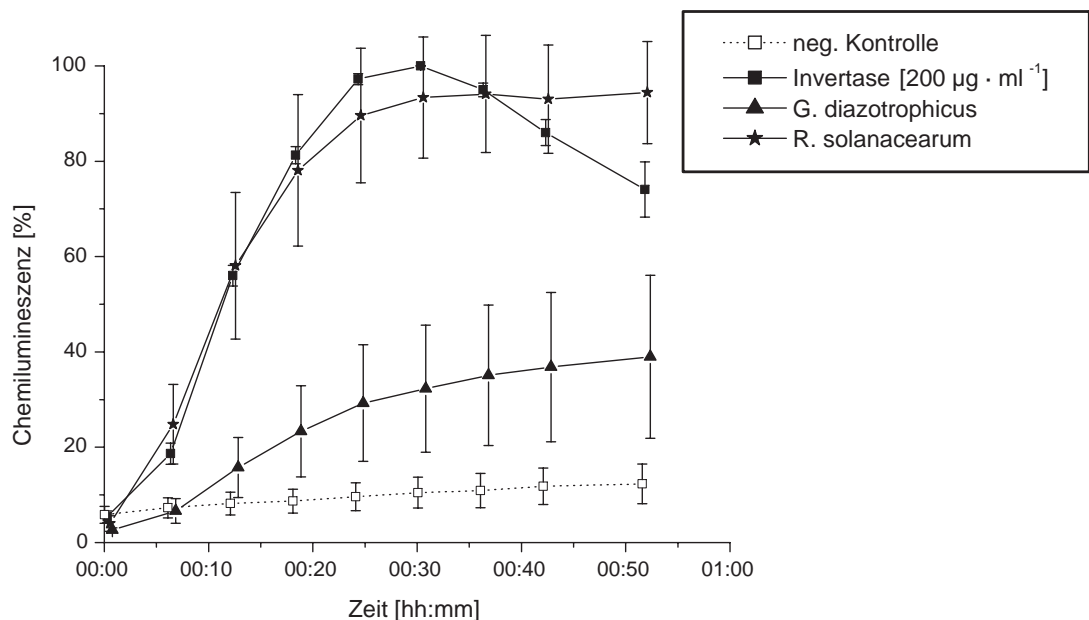


Abbildung 3.22: Zeitabhängige Darstellung des „oxidative burst“ in Abhängigkeit vom verwendeten Mikroorganismus. \pm Standardfehler des Mittelwertes von 4 Experimenten.

Dabei war zu beobachten, dass kurz nach Applikation der Invertase bzw. des Pathogens die H_2O_2 -Synthese im Vergleich zur Negativ-Kontrolle anstieg. Beide Versuchsansätze erreichten nach 30 Minuten ein Maximum der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz. Im Vergleich dazu stieg die Endophyten-induzierte H_2O_2 -Bildung erst nach 10 Minuten über das Niveau der Negativ-Kontrolle an. Dieser Anstieg wies zudem eine wesentlich geringere Steigung auf und erreichte erst nach etwa 50 Minuten ein Maximum.

Ein weiterer wichtiger Aspekt bei der Betrachtung der durch Endophyten ausgelösten Abwehrreaktionen in einer Süßkartoffelsuspensionskultur, war eine mögliche Wirtsspezifität des Endophyten. Die zuvor beobachtete „leichte“ Pathogenantwort der Süßkartoffelzellen (Kapitel 3.9) bei Kontakt mit dem Endophyten-Stamm Pal5^T führte zu der Fragestellung, ob es bei der Induktion des „oxidative burst“ stammspezifische Unterschiede gibt. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Endophyten-Stamm Pal5^T, einem Isolat aus dem Zuckerrohr, mit dem Stamm BR11289, einem Isolat aus der Süßkartoffel, miteinander verglichen (siehe Kap. 2.1 auf S. 16). In Abbildung 3.23 ist zu erkennen, dass die detektierte H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz eine vergleichbare Intensität zu den vorhergehenden Experimenten mit dem Endophyten-Stamm Pal5^T aufwies (Kapitel 3.9).

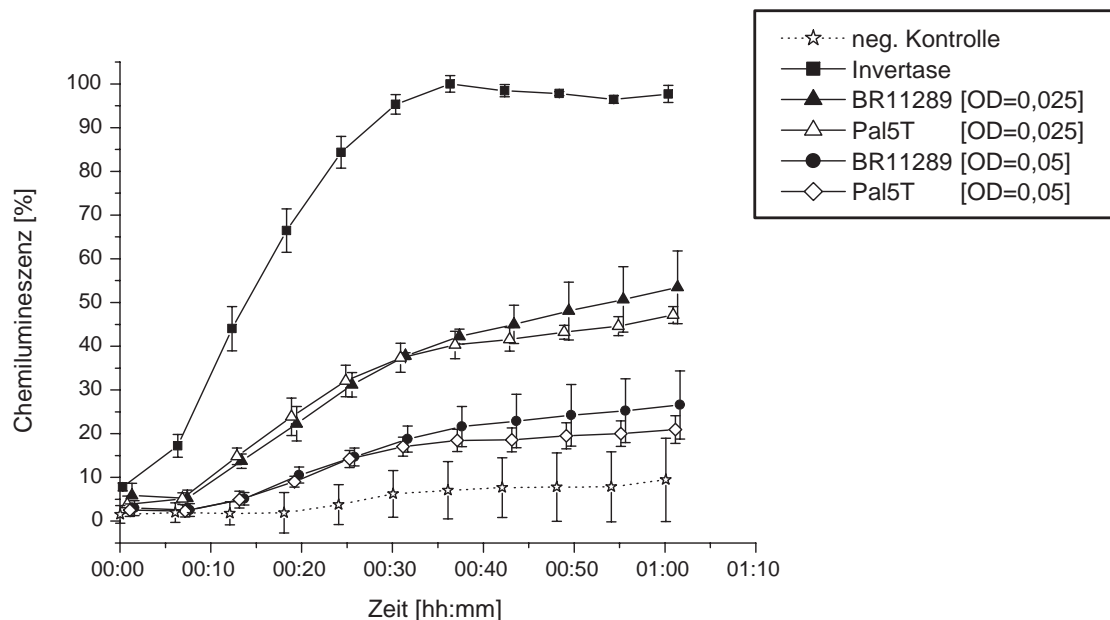


Abbildung 3.23: Zeitabhängige Darstellung des „oxidative burst“, induziert durch verschiedene Stämme des Endophyten (*G. diazotrophicus* Pal5^T und *G. diazotrophicus* BR11289). ± Standardfehler des Mittelwertes von 3 Experimenten.

Zudem war bei einer identischen Animpfdichte von $OD_{578} = 0,025$ kein Stamm-spezifischer Unterschied bei der Induktion eines „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur festzustellen. Die Erhöhung der Endophyten-Zelldichte im Inkubationsansatz auf $OD_{578} = 0,05$ führte zu einer Reduktion der H_2O_2 -Synthese. In diesen Ansätzen wurde von beiden Endophyten-Stämmen lediglich eine 20%ige Erhöhung der H_2O_2 -abhängigen Chemilumineszenz induziert.

3.10 PAL-Aktivität

Um auch die späten Abwehrreaktionen einer elicitierten Süßkartoffel-Suspensionskultur zu erfassen und Differenzen zwischen den induzierenden Mikroorganismen zu prüfen wurde die Aktivität der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) gemessen. Die PAL katalysiert die Umsetzung von L-Phenylalanin zur *trans*-Zimtsäure, der Eingangsreaktion im weitverzweigten Phenylpropanoid-Weg (Kapitel 1.1.5). Dieser Stoffwechselweg führt u.a. zur Biosynthese von polyphenolhaltigen Komponenten, wie Flavonoide, Phenylpropanoide oder Lignin, in Pflanzen. Die Aktivität des Enzyms kann als Reaktion auf eine Reihe von Stimuli drastisch ansteigen [Tanaka et al. 1989]. Neben den induzierenden Stimuli wie Licht, Phytoeffektoren oder Verletzungen des Gewebes kann auch der Kontakt bzw. die Infektion mit einem Mikroorganismus zu einer solchen Reaktion führen. Die Aktivierung der PAL findet innerhalb von Stunden statt und hat zumeist ein erstes Maximum zwischen 5 bis 7 Stunden nach Elicitierung.

Die Änderung der PAL-Aktivität nach Elicitierung einer Süßkartoffel-Suspensionskultur mit drei verschiedenen induzierenden Effektoren kann in Abbildung 3.24 im Vergleich zu einer nicht elicitierten Negativ-Kontrolle (neg. Kontrolle) nachvollzogen werden. Neben einer Invertase-Elicitierung der Süßkartoffelzellen wurde eine Inkubation der Pflanzenzellen mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* sowie dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* durchgeführt. Bei der Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der PAL-Aktivität in den genannten Versuchsansätzen war zu beobachten, dass unmittelbar nach Beginn der Versuche bzw. nach zweistündiger Inkubation, in allen Versuchsansätzen nur eine geringe PAL-Aktivität nachgewiesen werden konnte. Nach 5 Stunden stieg die Aktivität des Enzyms in allen Ansätzen deutlich an. Dabei war zu beobachten, dass in dem mit *R. solanacearum* inkubierten Ansatz eine dreifach höhere Aktivität gemessen wurde als in der Negativ-Kontrolle. Zum gleichen Zeitpunkt war die PAL-Aktivität im Versuchsansatz mit dem Elicitor Invertase auf das zweifache des Kontroll-Niveaus angestiegen. Der mit *G. diazotrophicus* inkubierte Ansatz lag zu diesem Zeitpunkt ebenfalls auf diesem Niveau. Im Verlauf der nächsten zwei Probenahmen, nach 7 bzw. 10 Stunden, blieb die PAL-

Aktivität in den Versuchsansätzen mit Invertase, *G. diazotrophicus* sowie in der Negativ-Kontrolle konstant. Die *R. solanacearum* induzierte PAL-Aktivität fiel dagegen in diesem Zeitraum wieder leicht ab, lag jedoch immer oberhalb der Aktivität der drei anderen Versuchsansätze. Nach 12,5 Stunden Inkubationszeit änderte sich dieses Verhältnis deutlich. Während sich die Aktivität des Phytopathogen-induzierten Ansatzes um fast die Hälfte auf das Niveau der beiden anderen elicierten Ansätze reduzierte, nahmen diese nur geringfügig ab. Nach 25 bzw. 27,5 Stunden Inkubation der Süßkartoffel-Suspensionskulturen hatte die PAL-Aktivität des Phytopathogen-induzierten Ansatzes ebenso wie der Invertase-induzierte Ansatz auf das Niveau der Negativ-Kontrolle abgenommen. Im Gegensatz dazu blieb die PAL-Aktivität des Endophyten-induzierten Ansatzes auf dem Niveau der vorhergehenden Probenahmezeitpunkte.

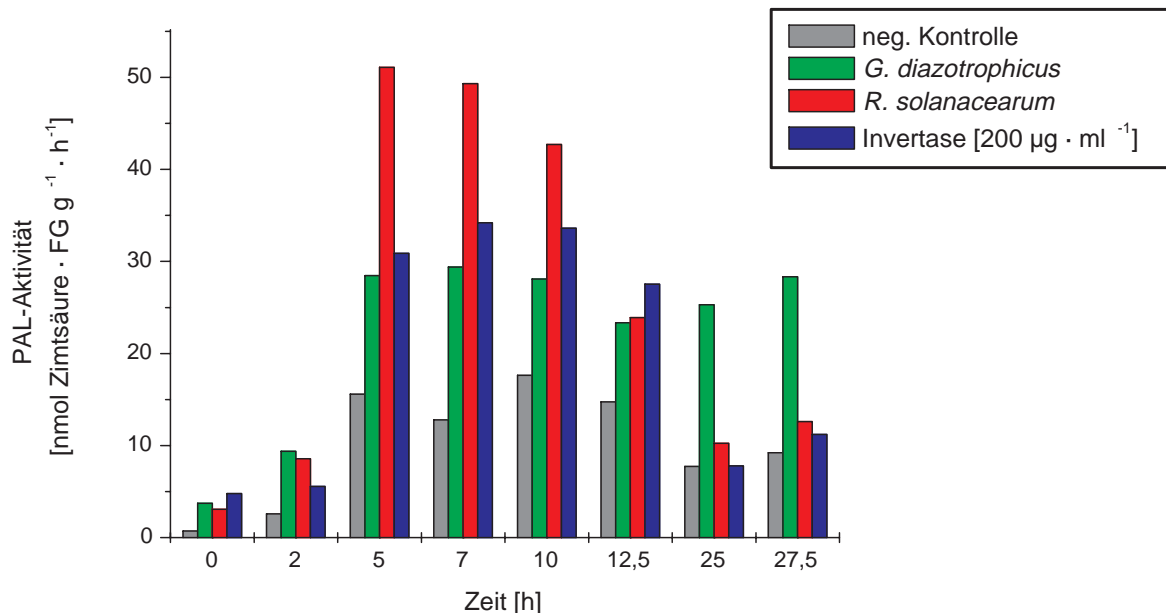


Abbildung 3.24: Verlauf der PAL-Aktivität in Zellsuspensionskulturen von *Ipomoea batatas*, nach Elicitation mit Invertase, *G. diazotrophicus* und *R. solanacearum*. Darstellung gemittelter Werte von jeweils 2 unabhängigen Experimenten.

3.11 Cytosolische pH-Wertmessungen in Süßkartoffelzellen

Neben der Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration in einer elicierten Zelle, scheint auch eine veränderte H^{+} -Homöostase wahrscheinlich. Es konnte bereits eine Änderung des ex-

trazellulären pH-Wertes nach Elicitierung von Süßkartoffelzellen nachgewiesen werden (Kapitel 3.6.1). Dies legte die Vermutung nahe, dass es analog dazu auch zu einer intrazellulären Änderung der H^+ -Konzentration kommen könnte. Zur Erfassung des cytosolischen pH-Wertes wurde der pH-sensitive Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM eingesetzt, der sich aufgrund seiner Membranpermeabilität für eine Beladung der Süßkartoffelzellen zu eignen schien. Nach der intrazellulären Abspaltung des Acetomethyl-Restes (AM) verliert das BCECF diese Eigenschaft und kann zur Fluoreszenz angeregt werden.

3.11.1 Kontrolle der Beladung von Süßkartoffelzellen mit dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM

Die Beladung der Pflanzenzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM unter Zuhilfenahme des Detergenz Pluronic[®] F-127 wurde in Kapitel 2.7 auf Seite 26 ausführlich beschrieben. Die nachfolgend beschriebenen Messungen sollten Aufschluss über den Beladungszustand der Pflanzenzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff geben. Daneben dienten sie auch dazu, die Fähigkeit der Zelle für eine aktive pH-Regulation zu analysieren [Deitmer und Schild 2000]. Diese Kontrolle war notwendig, da die Methode der Diffusionsbeladung für die Süßkartoffelzellen modifiziert wurde. Mit Hilfe des Ratio-Messverfahrens, bei dem das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten zweier Anregungswellenlängen (439 und 490 nm) gebildet wird, konnte eine Änderung des cytosolischen pH-Wertes detektiert werden.

Eine Möglichkeit zum Test einer erfolgreichen Beladung der Zellen mit BCECF-AM/Pluronic[®] F-127 war die Ammonium-Vorpuls-Methode. In Abbildung 3.25 kann der Verlauf eines Ammonium-Vorpulses, induziert durch die Perfusion mit einer 20 mM NH_4Cl -Lösung, in BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen Kapitel 2.7 auf Seite 26 nachvollzogen werden. Das zugegebene NH_4^+ , dissoziiert in der wässrigen Lösung in das gasförmige NH_3 und H^+ . Das NH_3 ist in der Lage frei in die Zelle zu diffundieren und löst dort durch die Pufferung von intrazellulären H^+ eine schnelle Alkalisierung des Cytosols (Alkalose) aus. Die nachfolgende Umkehr in eine langsame Ansäuerung (Azidose) erfolgt durch die Diffusion von NH_4^+ durch Ionenkanäle oder durch Carrier-unterstützten Transport in die Zelle, wo das Ammonium H^+ freisetzt. Wird die Zelle im folgenden mit NH_4^+ -freiem Kulturmedium superfundiert, kommt es intrazellulär zu einer deutlichen Azidose, da NH_3 dem Konzentrationsgradienten folgend aus der Zelle heraus diffundiert. Diese Azidose kann nur durch aktive Regulation der Zelle wieder abgefangen werden z.B. durch Aktivierung von NH_4^+/H^+ -Austauschern.

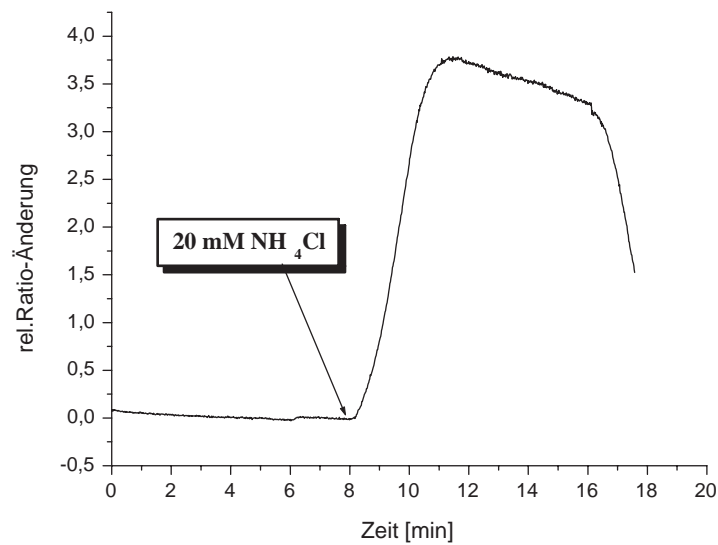


Abbildung 3.25: Repräsentative Darstellung der relativen (rel.) Ratio-Änderung im Cytosol von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen, induziert mit der Ammonium-Vorpuls-Methode.

Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der mit BCECF-AM/Pluronic® F-127 beladenen Zellen, sowie der Empfindlichkeit des cytosolischen pH-Wertes dieser Zellen auf externe Stimuli, war die Inkubation der Zellen mit Salzsäure (HCl). Bei Perfusion BCECF-beladener Süßkartoffelzellen mit 20 mM HCl wurde eine cytosolische Azidifizierung der Zellen induziert (Abb. 3.26), die ebenfalls durch aktive Transportmechanismen der Zelle wieder partiell aufgehoben wurde.

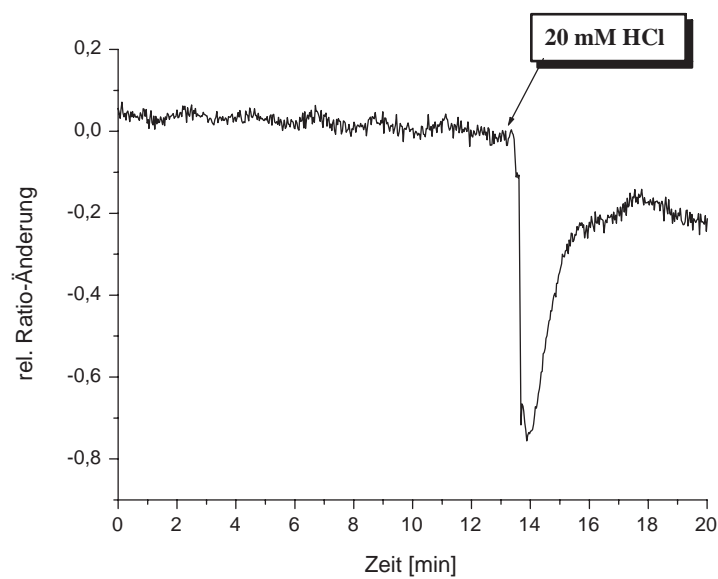


Abbildung 3.26: Repräsentative Darstellung der relativen (rel.) Ratio-Änderung im Cytosol von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen, induziert mit 20 mM HCl.

Mit diesen beiden Methoden zum Test einer optimalen Beladung der Süßkartoffelzellen mit BCECF-AM konnte abschließend festgestellt werden, dass es mit der gewählten Beladungsmethode möglich war in den Süßkartoffelzellen den cytosolischen pH-Wert zu messen.

3.11.2 Änderung des cytosolischen pH-Wertes nach Elicitierung mit HE und Invertase

Pflanzenzellen reagieren auf eine Vielzahl externer Stimuli mit einer schnellen und charakteristischen Induktion von Ionenflüssen über die pflanzliche Zellmembran. Diese Änderungen spiegeln sich häufig in der H^+ -Homöostase innerhalb und außerhalb der Zelle wider. Die veränderten Ionenströme und die sich daraus ergebenden Folgen für die Induktion einer schnellen Reaktion der Pflanzelle sind zuvor bereits beschrieben worden (*siehe Kap. 3.2 auf S. 37*). An dieser Stelle soll der zentralen Fragestellung nach den Unterschieden des intrazellulären pH-Signals bei Kontakt mit verschiedenen Elicitoren nachgegangen werden. Aufgrund der Tatsache, dass bereits eine Änderung des extrazellulären pH-Wertes einer Suspensionskultur von *Ipomoea batatas* nach Elicitierung festgestellt wurde (*siehe Kap. 3.6 auf S. 52*), ist auch eine intrazelluläre Änderung der H^+ -Homöostase bei Kontakt mit elicitierenden Faktoren naheliegend. Dabei stellte sich die Frage, ob auf der Ebene des cytosolischen pH-Wertes eine Differenzierung in symbiontische und Abwehr-induzierende Signaltransduktionskaskaden erfolgt.

Abbildung 3.27 zeigt die relativen Ratio-Änderungen von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen bei Kontakt mit dem Hefeextrakt-Elicitor (Kapitel 2.10) und der Reinsubstanz Invertase (Kapitel 2.8). Zudem wurden Kontrollmessungen (Kontrolle) mit nicht elicitierten Pflanzenzellen durchgeführt und vergleichend dargestellt. Nach einer etwa 10-minütigen Superfusionsphase mit dem Vorinkubationsmedium (VIM, Kap. 2.4.6 auf S. 24), die zur Kontrolle einer stabilen Beladung der Süßkartoffelzellen diente, wurden die Zellen mit dem in VIM gelösten Elicitor [$200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$] superfundiert. Sowohl die mit dem Hefeextrakt-Elicitor (HE) als auch mit Invertase inkubierten Pflanzenzellen zeigten 1 bis 2 Minuten nach Beginn der Elicitor-Superfusion eine Abnahme der pH-abhängigen Fluoreszenzintensität um 0,3 relative Ratio-Einheiten. Die beobachtete Intensitätsverringering der Fluoreszenz war gleichbedeutend mit einer Azidifizierung des Pflanzenzellcytosols zu interpretieren. Die relative Ratio-Änderung stabilisierte sich nach etwa 4 Minuten auf diesem Niveau.

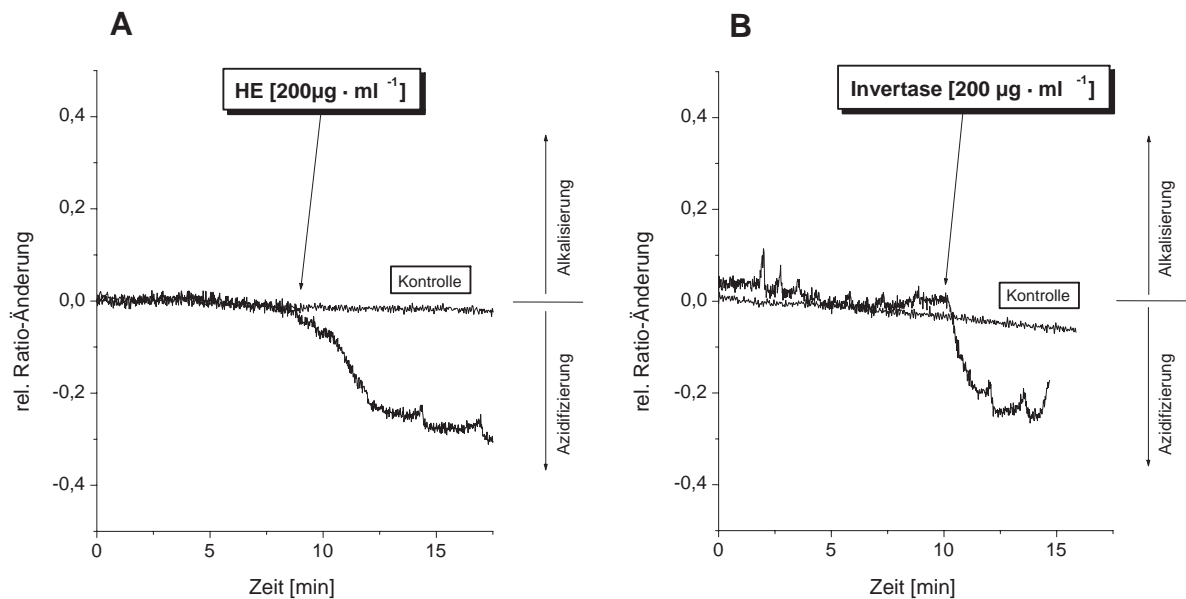


Abbildung 3.27: Repräsentative Darstellung der relativen (rel.) Ratio-Änderung im Cytosol von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen bei Superfusion mit (A) dem Hefeextrakt-Elicitor [200 µg · ml⁻¹] und (B) mit der Invertase [200 µg · ml⁻¹]. Der Zeitpunkt des vollständigen Austausches des Messkammervolumens (500 µl) mit der Elicitor-Lösung ist mit einem Pfeil markiert. In der Kontrollmessung wurde kein Effektor zugegeben. Der Nullwert der relativen Ratio-Änderung ist mit einer waagerechten Linie gekennzeichnet.

Wie auch in Abbildung 3.27 zu sehen ist wurde bei einigen Messungen eine oszillierende Intensitätsänderung des Fluoreszenzsignals zu beobachten. Dies war auf die ungleichmäßige Pumpgeschwindigkeit der eingesetzten Schlauchpumpe (*Peristaltic Pump P-3, Fa. Pharmacia Fine Chemicals*) zurückzuführen, die dazu führte, dass es zu Schwankungen des Flüssigkeitsstandes in der Messkammer (siehe *Abb. 2.1 auf S. 28*) kam, was sich im Fluoreszenzsignal widerspiegelte.

3.11.3 Intrazellulärer pH-Wert bei Kontakt mit *Ralstonia solanacearum*

In den nachfolgenden Experimenten wurde der cytosolische pH-Wert bei Inkubation von Süßkartoffelzellen mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* näher untersucht. In Kap. 3.11.2 auf S. 70 wurde bereits gezeigt, dass Elicitoren wie der Hefeextrakt und die Invertase das intrazelluläre pH-Signal charakteristisch ändern. Die Interaktionsexperimente mit *R. solanacearum* sollten genaueren Aufschluss darüber geben wie sich das pH-Signal bei Kontakt mit einem pathogenen Mikroorganismus verhält. In Abbildung 3.28 ist der Verlauf einer intrazellulären pH-Wertänderung in Anwesenheit des Phytopathogens dargestellt. Die Süßkartoffelzellen wurden zunächst mit VIM (Kapitel 2.4.6) superfundiert bis sich eine konstante Fluoreszenzintensität (keine relative-Ratio-Änderung) der BCECF-beladenen Zellen eingestellt hatte. Etwa 10 Minuten nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals wurden die Pflanzenzellen in die Messkammer mit einer Suspension des Phytopathogens *Ralstonia solanacearum* ($OD_{578} = 0,025$ in VIM) superfundiert. 2 Minuten nach dem vollständigen Medienaustausch in der Messkammer reduzierte sich der pH-abhängige Ratio-Wert innerhalb von 2 Minuten um $-1,00$ (relative Ratio-Änderung). In den darauf folgenden 10 Minuten sank das Fluoreszenzsignal noch um etwa $-0,4$ ab und erreichte damit insgesamt eine relative-Ratio-Änderung um $-1,4$.

In Abbildung 3.28 sind zudem Falschfarbenaufnahmen zu vier verschiedenen Zeitpunkten der zuvor beschriebenen Fluoreszenzmessung dargestellt. Die erste Abbildung (1. Minute) zeigt die in Falschfarben dargestellte pH-abhängige Fluoreszenz der vermessenen Süßkartoffelzellen 1 Minute nach Erreichen eines konstanten Fluoreszenzsignals. Die zweite Abbildung (10. Minute) wurde direkt nach dem vollständigen Austausch des Vorinkubationsmediums mit der Bakterien-Suspension (s.o.) in der Messkammer festgehalten. Es war bis zu diesem Zeitpunkt keine wesentliche Änderung in der Falschfarbendarstellung zu erkennen. In der dritten Abbildung (14. Minute) war eine deutliche Farbverschiebung von grün nach blau in dem Cytosol der Zellen zu beobachten. Die farbliche Änderung entsprach einer Reduktion der BCECF-abhängigen Fluoreszenzintensität und stellte damit visuell die Azidifizierung des Cytosols der Pflanzenzellen dar. In der vierten Falschfarbendarstellung (25. Minute) wurde die sich fortsetzende Azidifizierung des Cytosols der Pflanzenzellen und der damit verbundenen negativen Ratio-Änderung nochmals verdeutlicht.

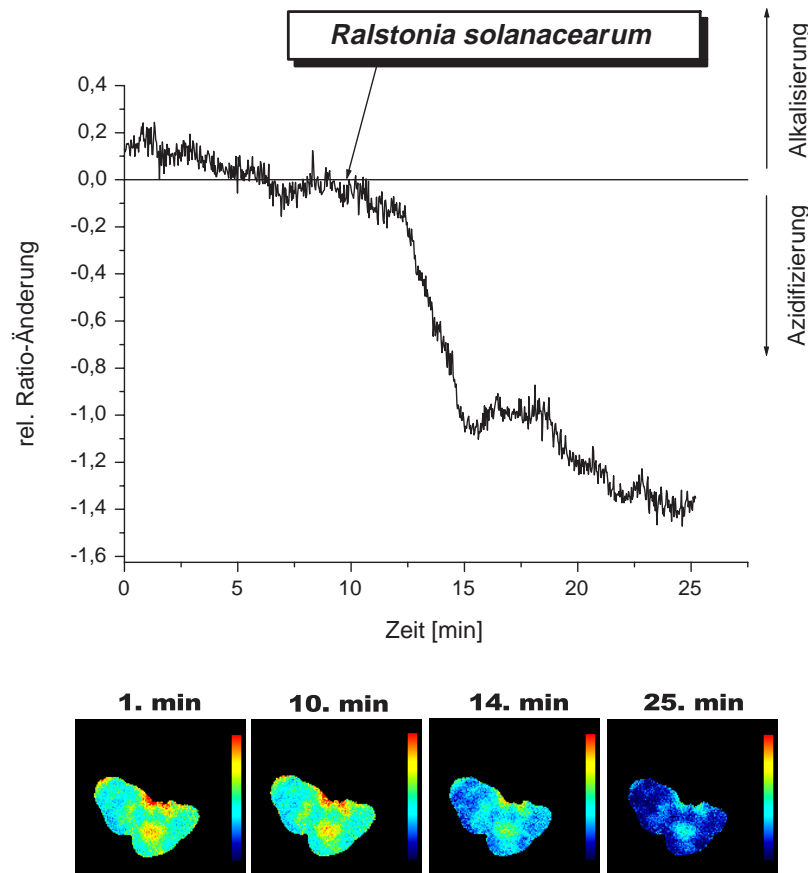


Abbildung 3.28: Verlauf der relativen Ratio-Änderung während der Superfusion von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* ($OD_{578} = 0,025$) und einer Ratio-abhängigen Falschfarben-Darstellung der Pflanzenzellen zu vier verschiedenen Mess-Zeitpunkten (1., 10., 14. und 25. Minuten). Repräsentative Darstellung von 4 unabhängigen Experimenten.

Neben der zuvor beschriebenen sehr schnellen Fluoreszenzänderung BCECF-beladener Süßkartoffelzellen bei Perfusion mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* wurde in einigen Fällen auch eine wesentlich langsamere Intensitätsverminderung beobachtet. In Abbildung 3.29 wurde diese Beobachtung grafisch dargestellt. Nach dem Beginn der Perfusion mit dem Phytopathogen ($OD_{578} = 0,025$ in VIM) sank die pH-abhängige Fluoreszenz (relative Ratio-Änderung) in den Zellen innerhalb von 20 Minuten um 0,3 bis 0,4 relative Ratio-Einheiten ab. In einigen Fällen wurden auch Verringerungen um 0,8 relative Ratio-Einheiten gemessen (siehe auch Abb. 3.31).

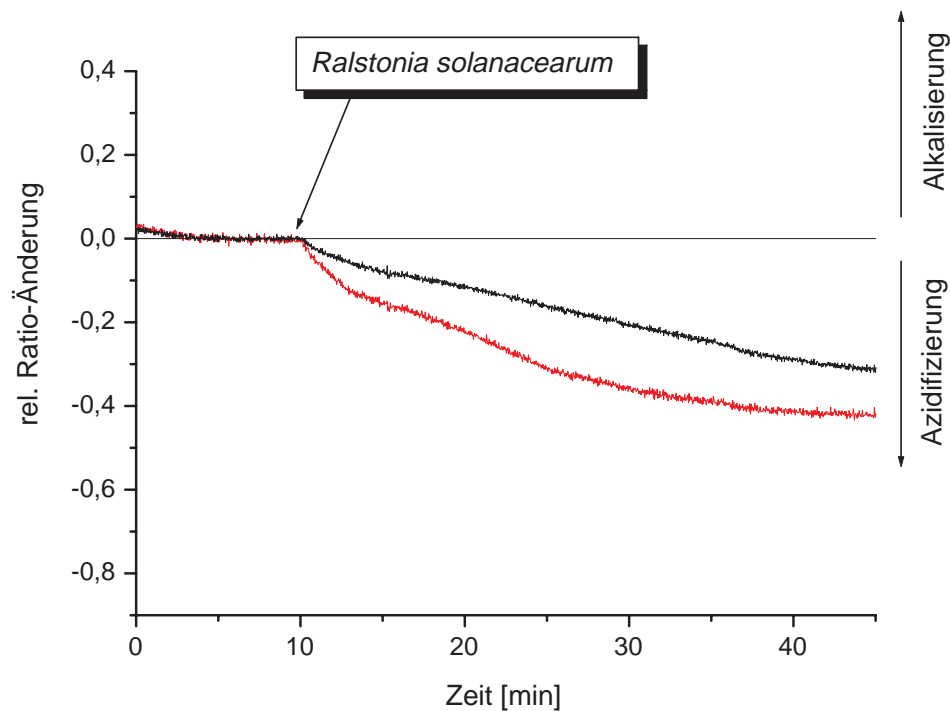


Abbildung 3.29: Verlauf der relativen Ratio-Änderung während der Perfusion von BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* ($OD_{578} = 0,025$). Die rote und schwarze Linie kennzeichnen die Fluoreszenzintensität von zwei Zellen im Versuchsansatz. Der Nullwert der relativen Ratio-Änderung ist mit einer waagerechten Linie gekennzeichnet. Repräsentative Darstellung von 4 unabhängigen Experimenten.

3.11.4 Intrazellulärer pH-Wert bei Kontakt mit *Gluconacetobacter diazotrophicus*

In den nachfolgenden Experimenten sollte geklärt werden, welchen Einfluss der Endophyt *Gluconacetobacter diazotrophicus* auf den cytosolischen pH-Wert hat. Bei diesen Untersuchungen wurde festgestellt, dass die BCECF-abhängige Fluoreszenzintensität in den Süßkartoffelzellen kurze Zeit nach Applikation der Bakterien-Suspension ebenfalls leicht absinkt. In der Abbildung 3.30 sind zwei Messspuren von zwei vereinzelt Süßkartoffelzellen dargestellt. Innerhalb von etwa 4 Minuten reduzierte sich die Intensität um 0,07 bzw. 0,13 relative Ratio-Einheiten. Im Anschluss an dieses Minimum stiegen die Fluoreszenzintensitäten wieder an. Innerhalb von 14 bis 30 Minuten wurde die Fluoreszenzintensität, die bei Messbeginn registriert wurde, erneut erreicht und stieg in der nachfolgenden Zeit weiter stetig an. Dies war gleichbedeutend mit einer

Alkalisierung des Cytosols der Pflanzenzellen.

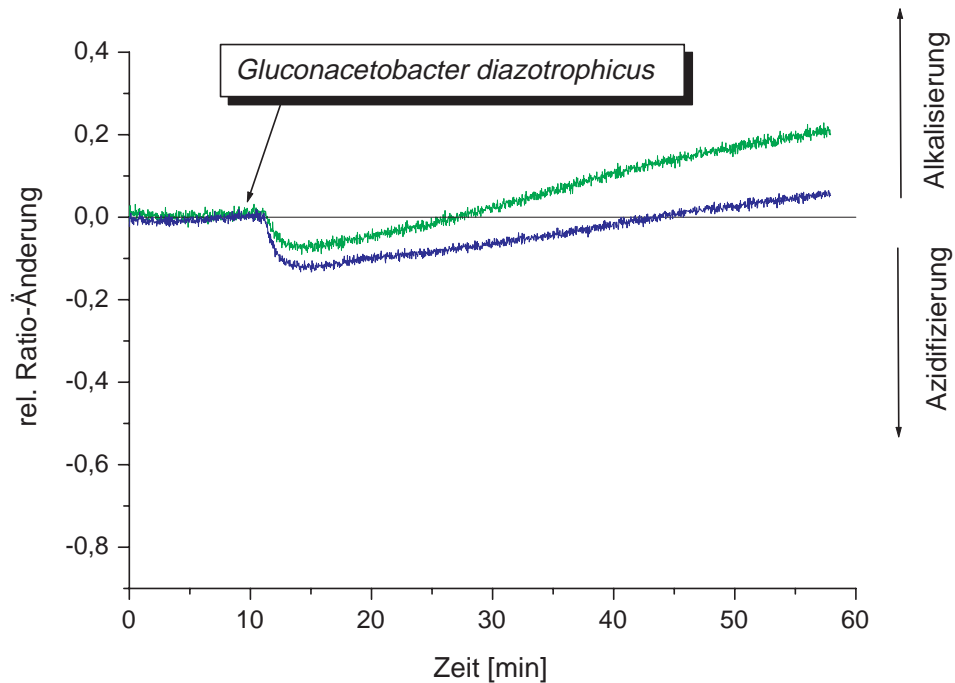


Abbildung 3.30: Messung der relativen Ratio-Änderung in BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen bei Perfusion mit Bakteriensuspensionen von *Gluconacetobacter diazotrophicus* mit einer $OD_{578} = 0,025$. Die blaue und grüne Linie kennzeichnen die Fluoreszenzintensität von zwei Zellen im Versuchsansatz. Der Nullwert der relativen Ratio-Änderung ist mit einer waagerechten Linie gekennzeichnet. Repräsentative Darstellung von 4 unabhängigen Experimenten.

3.11.5 Vergleich des Intrazellulären pH-Signals

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Messungen des cytosolischen pH-Wertes in Abhängigkeit des jeweils elicitierenden Reizes nicht vergleichend mit anderen Reizen dargestellt. Nachfolgend wurde eine vergleichende Untersuchung des intrazellulären pH-Signals bei Elicitierung mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*, dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* sowie mit dem Elicitor Invertase an einer Süßkartoffel-Zellkultur durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass sich die pH-abhängige Fluoreszenz-Änderungen in den Süßkartoffelzellen Elicitor-spezifisch voneinander unterschieden.

Im Versuchsansatz mit den Endophyten-elicitierten (*Gluconacetobacter diazotrophicus*) Süßkartoffelzellen wurde direkt nach der Applikation eine Reduktion der relativen Fluoreszenzintensität (relative Ratio-Änderung) detektiert. Dies war gleichbedeutend mit einer Azidifizierung des Cytosols der Pflanzenzelle. Wie in Abbildung 3.31 gezeigt wird, erreichte die pH-abhängige BCECF-Fluoreszenz etwa 7 Minuten nach Zugabe des Endophyten ein Minimum und stieg nachfolgend innerhalb von etwa 8 Minuten wieder auf den Ausgangswert. Im weiteren Verlauf der Messung stieg die Fluoreszenzintensität kontinuierlich, was wiederum gleichbedeutend mit einer cytosolischen Alkalisierung war. Im Vergleich dazu kam es bei Kontakt der Pflanzenzellen mit dem Elicitor Invertase zu einer dauerhaften Intensitätsverringering, was gleichbedeutend mit einer anhaltenden Azidifizierung des Cytosols zu sehen war. Der Verlauf der Invertase-induzierten Fluoreszenzänderung zeigte eine langsame und stetige relative Ratio-Änderung, die sich erst nach etwa 28 Minuten auf dem erreichten Niveau stabilisierte. Eine ähnliche Tendenz des Fluoreszenzsignals zeigte der Versuchsansatz mit dem Phytopathogen-elicitierten Süßkartoffelzellen. Im Unterschied zum Invertase-elicitierten Ansatz verringerte sich die Intensität der Fluoreszenz zum einen wesentlich schneller und zum anderen wurde eine fast vierfach höhere relative Ratio-Änderung beobachtet.

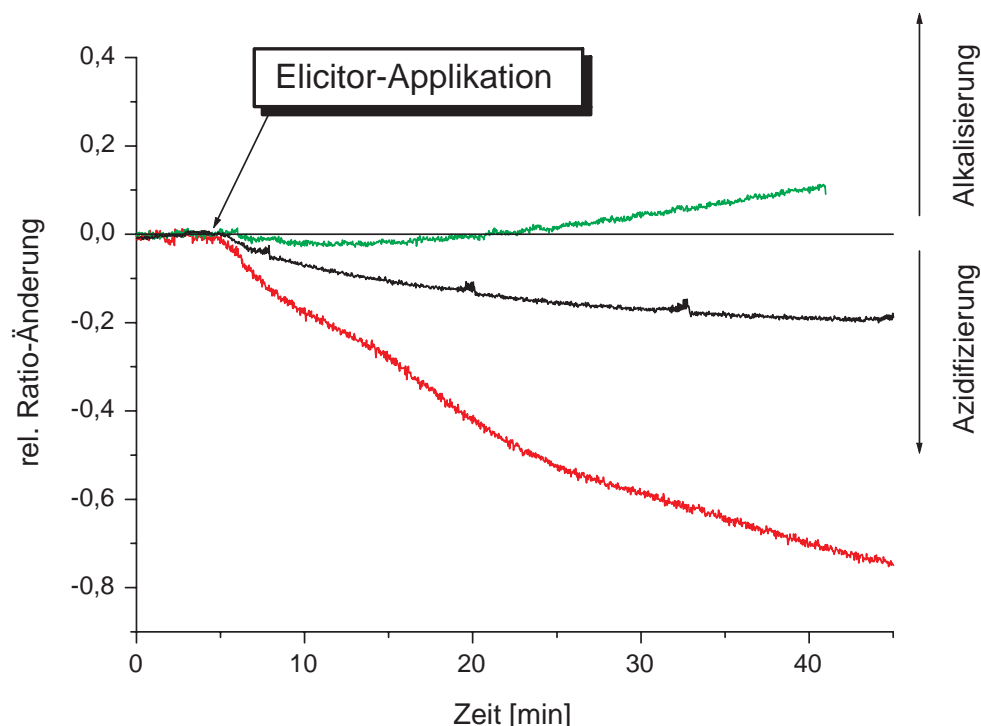


Abbildung 3.31: Differenzierte Änderung der relativen Fluoreszenz (relative Ratio-Änderung) in BCECF-beladenen Süßkartoffelzellen bei Superfusion mit Bakteriensuspensionen von *Ralstonia solanacearum* (rote Linie) und *Gluconacetobacter diazotrophicus* (grüne Linie) mit einer $OD_{578} = 0,025$, sowie mit $200 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Invertase (schwarze Linie).

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Die Rolle des Auxins IAA bei der Interaktion zwischen *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Die Indol-3-Essigsäure (IAA) zeichnet sich durch ihre vielfältigen physiologischen Effekte in einer Pflanze aus. Das Wissen über die mit der IAA verbundenen Signaltransduktionswege ist aber noch sehr unvollständig [Lambrecht et al. 2000]. Dies gilt vor allem bei der Ausbildung einer Pflanzen-Bakterien Interaktion. Inzwischen konnte gezeigt werden, dass sehr viele pathogene sowie synergistische Bakterien IAA synthetisieren [Glickmann et al. 1998, Fuentes-Ramirez et al. 1993, Crozier et al. 1988]. Eine Verbindung zwischen dieser bakteriellen IAA-Synthese und einem wachstumsfördernden Effekt auf die Pflanzen ist zwar sehr wahrscheinlich [Schulze-Stanke 2003], konnte allerdings noch nicht eindeutig bewiesen werden. Die Ergebnisse der in Kapitel 3.7 dargestellten Versuche machen deutlich, dass sowohl der Endophyt *Gluconacetobacter diazotrophicus* als auch die Süßkartoffelpflanze (*Ipomoea batatas*) unter geeigneten Wachstumsbedingungen Indol-3-Essigsäure synthetisieren. In den zwei Tage alten Kulturen des Endophyten wurde eine Konzentration von $0,179 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ nachgewiesen. In diesem Zeitraum befindet sich das Bakterium wachstumsphysiologisch gesehen im Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase. Dies entspricht in etwa dem Zeitraum, in dem nach Fuentes-Ramirez et al. [1993] die höchsten IAA-Syntheseraten bei *Gluconacetobacter diazotrophicus* erwartet werden können. Auch die Höhe der Auxin-Konzentration lag in dem Bereich, der für diesen Mikroorganismus in anderen Studien nachgewiesen wurde [Fuentes-Ramirez et al. 1993]. Die Abnahme der IAA-Konzentration in den 6 bzw. 21 Tage alten Reinkulturen des Bakteriums korreliert

ebenfalls mit den Wachstumsphasen des Mikroorganismus. Nach 6-tägiger Kultivierung kommt der Sekundärstoffwechsel von *Gluconacetobacter diazotrophicus* zum Erliegen und nach 21 Tagen befindet sich das Bakterium schon längere Zeit in der Phase des Absterbens. Es konnte jedoch durch mikroskopische Kontrollen festgestellt werden, dass in dieser Phase noch zahlreiche Zellen des Mikroorganismus Vitalität zeigten. Die Süßkartoffel-Suspensionskulturen wiesen dagegen einen gegenläufigen Trend in der Anreicherung des Auxins im Kulturmedium auf. Dies korreliert mit dem Wachstumsverhalten der suspendierten Süßkartoffelzellen in dem Kulturmedium. Das Wachstum der Pflanzenzellen in dem MS-Flüssigmedium zeigt zwar die gleichen Wachstumsphasen, bestehend aus einer Verzögerungsphase (*lag*-Phase), einer exponentiellen Wachstumsphase (*log*-Phase) und einer stationären Phase (*stat*-Phase). Allerdings sind diese im Vergleich zum bakteriellen Wachstum wesentlich länger [Kalippke 2000]. Die Pflanzenzellen befinden sich zwei Tage nach einem Medientransfer noch in der *lag*-Phase. Nach 6-tägiger Kultivierung erreichen sie die logarithmische Wachstumsphase, in der die Pflanzenzellen wie die Bakterienreinkultur, mit der IAA-Synthese beginnen. Nach 21 Tagen geht das Wachstum der Pflanzenzellen in die stationäre Wachstumsphase über. Die IAA-Syntheserate befindet sich zu diesem Zeitpunkt weiterhin auf einem gleichbleibendem Niveau. Die Ursache für die, im Vergleich zur Bakterienreinkultur, deutlich höhere Auxin-Konzentration ($0,67 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ IAA) ist in Zusammenhang mit der größeren Biomasse der Pflanzenzellen zu sehen. Demgegenüber ist der überproportionale Anstieg der IAA-Konzentration in den Mischkulturen damit nicht erklärbar. Insbesondere nach der 6-tägigen Co-Inkubation der beiden Organismen ist die Steigerung der IAA-Konzentration auf über $3 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ nur durch eine Stimulation der bakteriellen oder aber pflanzlichen Auxinsynthese zu interpretieren. Welcher der beiden Interaktionspartner das nachgewiesene Auxin synthetisiert, kann nicht eindeutig nachvollzogen werden, da beide Organismen unabhängig voneinander in der Lage sind, IAA in diesen Konzentrationen zu synthetisieren. Eine mögliche Erklärung für den Konzentrationsrückgang in der Mischkultur nach 21 Tagen könnte der Rückgang der IAA-Konzentration in der bakteriellen Reinkultur sein. Dies würde nahelegen, dass der Anteil bakteriell synthetisierter IAA in den Mischkulturen gegenüber dem pflanzlich synthetisierten IAA überwiegt. Eine ähnliche Verteilung der IAA-Synthese wurde auch schon bei Rhizobien-Leguminosen Symbiosen beobachtet [Hunter 1989]. In den sich bildenden Knöllchen wurde der Hauptanteil des akkumulierten Auxins von den Bakteroiden synthetisiert. Als eine Folge der verstärkten Auxinsynthese bei Pflanzen-Bakterien-Interaktionen wird aber nicht nur die Beeinflussung des Pflanzenwachstums diskutiert. Daneben wird das Auxin auch mit einer wachstumshemmenden Wirkung auf pathogene Pilze [Martinez Noel et al. 2001] sowie mit der Unterdrückung von pflanzlichen Abwehrreaktionen bei Kontakt mit einem Bakterium in Verbindung gebracht. So wurde gezeigt, daß *Agrobacterium tumefaciens*, abhängig von der Fähigkeit IAA zu synthetisieren, eine hyper-

sensitive Reaktion der Pflanzenzellen bei Eindringen in diese, unterdrücken kann [Robinette und Matthyse 1990]. Solch ein abschwächender Effekt konnte bei Untersuchungen des extrazellulären pH-Wertes einer Invertase-elicitierten Süßkartoffel-Suspensionskultur gezeigt werden. Die Alkalisierungsreaktion der elicitierten Pflanzenzellen wird als eine Folge der Induktion von zellulären Abwehrreaktionen angesehen. In Kapitel 3.7.1 wurde gezeigt, dass in Anwesenheit von 1 μM IAA die extrazelluläre Alkalisierung des Kulturmediums bei Elicitierung verringert wird. Diese Reduktion um ca. 30% kann mit einer Aktivierung der Plasmamembran-gebundenen H^+ -ATPase erklärt werden. Die Stimulation dieser Protonen-Pumpe führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und einer extrazellulären Azidifizierung [Johri und Mitra 2001]. Auf diese Weise wirkt die IAA der Invertase-induzierten Alkalisierung entgegen. Diese Beobachtung steht jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen, die an jungen Gurken-Pflanzen durchgeführt wurden [Spiro et al. 2002]. Dort wurde bei einer Inkubation der Pflanzen mit IAA und gleichzeitiger Elicitierung eine Erhöhung des extrazellulären pH-Wertes gemessen. Eine extrazelluläre Azidifizierung und die damit verbundene Hyperpolarisation erscheint jedoch für die postulierte Unterdrückung von Abwehrreaktionen durch das Auxin sinnvoller und wurden in Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur Beteiligung von Anionenkanälen am „oxidative burst“ elicitiertes Süßkartoffelzellen untermauert.

4.2 Bedeutung der veränderten Ionenströme bei Elicitierung von Süßkartoffel-Suspensionszellen

Als Folge eines Elicitor-Kontaktes wird die Ionen-Homöostase einer Pflanzenzelle beeinflusst. An diesen Änderungen sind Ionenkanäle der pflanzlichen Zellmembran beteiligt. In Kapitel 3.2 wurde die Beteiligung der Cl^- -, K^+ - und Ca^{2+} -Ionen bzw. die für diese Ionen selektiven Kanäle an dem „oxidative burst“ einer Süßkartoffel-Suspensionskultur untersucht. Die erzielten Ergebnisse stehen im Einklang mit Untersuchungen von Autoren an anderen Pflanzenkulturen [Zimmermann et al. 1997b, Zimmermann et al. 1999, Küpper et al. 2001]. So wurde gezeigt, dass es bei Elicitor-Kontakt zur Öffnung von Anionen-Kanälen der pflanzlichen Zellmembran kommen kann. Der daraus resultierende Efflux von Anionen aus der Zelle führte zu einer Depolarisation der Zellmembran [Felle et al. 2000]. Es konnte mit dem selektiven Anionenkanal-Blocker DIDS nachgewiesen werden, dass der Efflux von Anionen aus der Zelle eine wichtige Signalkomponente für die Induktion des „oxidative burst“ in den Süßkartoffelzellen darstellt. Bei einer Konzentration von 100 μM des eingesetzten Blockers wurde die Elicitor-induzierte H_2O_2 -Synthese vollständig reprimiert. Der gleiche Inhibitor bewirkte in Tabak-Suspensionskulturen bei einer verwendeten

Konzentration von 100 μM lediglich eine 50%ige Reduktion des „oxidative burst“. In diesen Kulturen wurde die H_2O_2 -Synthese allerdings nicht durch eine Elicitor-Substanz induziert, sondern durch hypoosmotischen Stress verursacht [Cazalé et al. 1998]. Dies könnte ein Hinweis auf eine Reiz-spezifische Aktivierung verschiedener Anionenkanäle sein. Die Aktivierung von Anionenkanälen und der damit korrelierenden Alkalisierung des extrazellulären Milieus wurde in Alkalisierungsexperimenten ebenfalls mit dem Anionenkanal-Blocker DIDS näher betrachtet. Dabei wurde festgestellt, dass in Anwesenheit von 100 μM des Effektors die Invertase-induzierte Alkalisierungsreaktion vermindert wird. Die Ergebnisse in Kapitel 3.14 untermauern das Resultat der Chemilumineszenz-Messungen, die den Efflux von Anionen bei Elicitierung von Süßkartoffel-Suspensionszellen als eine obligate Voraussetzung der pflanzlichen Abwehrreaktion in Form eines „oxidative burst“ belegen.

Neben dem Anionen-Efflux wurde bei vielen Pflanzen auch ein vermehrter Ausstrom von Kationen, insbesondere von Kalium-Ionen (K^+), beobachtet [Gus-Mayer et al. 1998, Elstner et al. 1996]. Die Beteiligung dieser Kationen an der Signaltransduktion des „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur ist im Gegensatz zu den Anionen nicht zwingend erforderlich. Dies wurde durch Versuche mit den Kaliumionenkanal-Blockern Tetraethylammonium-Chlorid (TEA^+) und Quinin belegt. Die Ergebnisse in Kapitel 3.2.2 der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass in Anwesenheit beider Kationenkanal-Blocker die Elicitor-induzierte H_2O_2 -Synthese nicht vollständig inhibiert wird. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in Untersuchungen an elicitierten Wurzelhaaren von *Medicago sativa* eine regulierende Funktion der K^+ -Ionen festgestellt wurde [Felle et al. 2000]. Die Autoren konnten zeigen, dass der K^+ -Ionen-Efflux dem Anionen-Efflux folgt. Dabei wurde eine zunehmende Repolarisation der durch den Anionen-Efflux depolarisierten Zellmembran beobachtet. Daraus kann gefolgert werden, dass die Anionen-Kanäle eine dominierende Position bei der Induktion und Kontrolle des „oxidative burst“ in Süßkartoffelzellen einnehmen, während die K^+ -Ionen eine dauerhafte Depolarisation der pflanzlichen Zellmembran verhindern und damit die Regulation der zellulären Ionen-Homöostase gewährleisten.

Neben den Cl^- - und K^+ -Ionen sind vor allem Ca^{2+} -Ionen an der Induktion des „oxidative burst“ in einer Pflanzenzelle zu berücksichtigen. Insbesondere der Einstrom des extrazellulären Ca^{2+} ist Teil der am „oxidative burst“ beteiligten Signaltransduktionskaskade. Die Experimente in Kapitel 3.2.3 zeigen die Abhängigkeit des Invertase-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffel-Suspensionskulturen von dem Einstrom des extrazellulären Ca^{2+} . So konnte sowohl durch die Komplexbildung des externen Ca^{2+} mit EGTA als auch durch Unterbinden des Ca^{2+} -Einstroms mit dem Ca^{2+} -Kanal-Blocker LaCl_3 , die H_2O_2 -Synthese vollständig zum Erliegen gebracht werden.

Dies steht im Einklang mit Untersuchungen die u.a. an Petersilien-Protoplasten durchgeführt wurden [Zimmermann et al. 1997a]. Dort konnte eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung eines Ca^{2+} -Kanals (LEAC) gezeigt werden, der durch Bindung eines Oligopeptid-Elicitors aktivierbar war und ebenfalls selektiv mit LaCl_3 blockiert werden konnte. Bezüglich der Beteiligung des extrazellulären Ca^{2+} gibt es jedoch auch Untersuchungen, die keinerlei Zusammenhang zwischen dem Einstrom von externem Ca^{2+} und einem Elicitor-induzierten „oxidative burst“ finden können [Cessna und Low 2000]. Ein möglicher Erklärungsansatz für diese Diskrepanz bietet Bolwell et al. [1999] an. Die Autoren postulieren, dass die Induktion eines „oxidative burst“ in einer Pflanzenzelle nicht zwingend auf identischen Signaltransduktionswegen stattfindet. Vielmehr soll die Art des stimulierenden Reizes unterschiedliche Signalkomponenten aktivieren können.

Bei der Betrachtung der Ca^{2+} -Abhängigkeit des „oxidative burst“ einer Pflanzenzelle muss zwischen dem extrazellulären und cytosolischen Ca^{2+} differenziert werden. Es ist bekannt, dass die Änderung der cytosolischen Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) sowohl in tierischen als auch in pflanzlichen Zellen eine wichtige Rolle bei der Induktion eines „oxidative burst“ spielen kann [Felle et al. 2000, Lecourieux et al. 2002]. Dabei ist, neben dem Einstrom von externem Ca^{2+} , das Öffnen von intrazellulären Ca^{2+} -Speichern eine zentrale Voraussetzung. Im Kapitel 3.2.4 wurde eine Beteiligung dieser intrazellulären Ca^{2+} -Speicher an der Elicitor-induzierten H_2O_2 -Synthese in Süßkartoffel-Suspensionskulturen nachgewiesen. Es wurde festgestellt, dass die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Ca^{2+} -Speichern direkt mit einer Induktion der H_2O_2 -Synthese zusammenhängt. Es sind verschiedene Möglichkeiten der Induktion des Ca^{2+} -Efflux aus internen Ca^{2+} -Speichern bekannt. Neben einem IP_3 -abhängigen Prozess ist auch eine cADPR-induzierbare Öffnung (cADPR = zyklische ADP-Ribose) dieser internen Speicher möglich. Die Induktion des IP_3 -induzierten Ca^{2+} -Ausstroms ließ sich mit dem Modulator 2-APB selektiv hemmen. Daraus ist zu folgern, dass ein Phosphoinosit-Signal und die damit verbundene Erhöhung des $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ notwendig ist, um in einer elicitierten Süßkartoffel-Suspensionskultur die Synthese von H_2O_2 zu induzieren. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit gezeigten IP_3 -abhängigen Entladung der intrazellulären Ca^{2+} -Speicher konnte bspw. bei Tabakpflanzen, kein inhibierender Effekt des Modulators 2-APB nachgewiesen werden [Cessna und Low 2000].

4.3 Die Beteiligung von Phospholipasen am „oxidative burst“

Das zuvor angesprochene Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) ist neben dem Diacylglycerin (DAG) ein Produkt der Spaltung von PIP_2 durch die Phospholipase C (PLC). Die Versuche mit dem

IP₃-Rezeptor-Blocker 2-APB (Kapitel 3.2.4) legten die Vermutung nahe, dass die PLC an der Signaltransduktion des „oxidative burst“ in elicitierten Süßkartoffelzellen beteiligt ist. Diese Arbeitshypothese konnte jedoch experimentell nicht eindeutig bestätigt werden. Zwar wurden mit zwei unterschiedlichen PLC-Inhibitoren eine Abschwächung des Invertase-induzierten „oxidative burst“ in Süßkartoffelsuspensionskulturen festgestellt werden, jedoch konnte jedoch nicht sichergestellt werden, ob diese Effekte spezifisch sind.

Die Ergebnisse mit dem PLC-Inhibitor Neomycin-Sulfat, die in Kapitel 3.5.2 dargestellt sind, lassen nur einen schwachen Einfluss der Phospholipase C Aktivität auf den „oxidative burst“ erkennen. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit Zellkulturen der Sojabohne [Legendre et al. 1993] konnte bei den Süßkartoffel-Suspensionskulturen erst bei sehr hohen Effektor-Konzentrationen (600 und 800 μM Neomycin-Sulfat) eine Reduktion der H₂O₂-abhängigen Chemilumineszenz um maximal 30% beobachtet werden. In der Sojabohnen-Suspensionskultur wurde bereits bei Applikation von 50 μM Neomycin-Sulfat eine 60%ige Reduktion der H₂O₂-Synthese nachgewiesen. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf 200 μM Neomycin-Sulfat führte zu einer vollständigen Inhibierung des „oxidative burst“ [Legendre et al. 1993]. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die bei der Süßkartoffel eingesetzten hohen Effektor-Konzentrationen unspezifische Effekte induzierten. Für die Bestätigung der Resultate mit Neomycin-Sulfat wurde der selektive PLC-Inhibitor U-73122, sowie die dazugehörige analoge Kontrollsubstanz U-73343 (kein inhibierender Effekt auf PLC) auf ihre inhibierende Wirkung getestet. Die Ergebnisse in Kapitel 3.5.2 machen deutlich, dass dieser PLC-Inhibitor keinen eindeutigen Nachweis für eine Beteiligung der PLC am „oxidative burst“ einer Süßkartoffel-Suspensionskultur erbringen konnte. Insbesondere die starke Inhibierung durch die analoge Kontrollsubstanz U-73343 lässt eine zuverlässige Beurteilung der gemessenen Effekte nicht zu. Die Ursache für die starke Unterdrückung der H₂O₂-Synthese durch U-73343 bleibt unklar. Trotz der nicht zweifelsfrei nachgewiesenen Beteiligung der PLC an der Induktion eines „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur erscheint es wahrscheinlich, dass die PLC daran beteiligt ist. Dies begründet sich zum einen auf eine, wenn auch geringe, Reduktion der H₂O₂-Synthese durch den Effektor Neomycin-Sulfat und zum anderen auf eine Abschwächung durch den IP₃-Rezeptor-Blocker 2-APB.

Neben der Beteiligung von PLC an der Elicitor-induzierten H_2O_2 -Bildung wurde in einigen Fällen auch ein Mitwirken der Phospholipase A_2 in Signaltransduktionswegen von pflanzlichen Abwehrreaktionen nachgewiesen [Chandra et al. 1996, Senda et al. 1998, Holk et al. 2002]. Die PLA_2 spaltet Phospholipide an der sn 2-Position in freie Fettsäuren und Lysophospholipide. Den so entstehenden Fettsäuren (u.a. Linolensäure) wird eine induzierende Wirkung im Verlauf der Signaltransduktion eines „oxidative burst“ zugesprochen [Chandra et al. 1996]. Bei der Verwendung des selektiven PLA_2 -Inhibitors Chlorpromazin-HCl wurde die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz bereits bei der Applikation von $50 \mu M$ des Effektors vollständig inhibiert (Kapitel 3.5.1). Diese Ergebnisse korrespondieren sehr gut mit Untersuchungen an der Sojabohne [Chandra et al. 1996], bei der ebenfalls bei Konzentrationen von 50 bis $200 \mu M$ Chlorpromazin-HCl eine Reduktion des „oxidative burst“ festgestellt wurde. Als Resultat der Experimente mit dem PLA_2 -Inhibitor Chlorpromazin-HCl wurde eine Beteiligung der PLA_2 an der Signaltransduktion des „oxidative burst“ einer elicitierten Süßkartoffel-Suspensionskultur nachgewiesen. Ob dagegen noch weitere Signalkomponenten für eine Aktivierung der NADPH-Oxidase erforderlich sind konnte nicht eindeutig geklärt werden. Es gibt jedoch Untersuchungen von Morre und Brightman [1991] die eine direkte Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Hydrolyse-Produkte der PLA_2 gezeigt haben. Die Tatsache, dass verschiedene Signalwege zur Aktivierung der NADPH-Oxidase führen können, lässt keine allgemeingültigen Aussagen für die Induktion des „oxidative burst“ in elicitierten Pflanzenzellen zu. Eine einfache Übertragung von Ergebnissen einzelner experimenteller Systeme kann daher zu einer Fehlinterpretation bei der Einschätzung der Rolle von Phospholipasen führen. Daher sollte jedes Zellsystem getrennt voneinander betrachtet werden. Neben dem aktivierenden Einfluss der PLA_2 auf die NADPH-Oxidase kann die PLA_2 auch an einer transienten Azidifizierung des cytosolischen pH-Wertes beteiligt sein [Viehweger et al. 2002]. Die Lysophospholipide mobilisieren Protonen aus dem H^+ -Pool aus der Zell-Vakuole und aktivieren damit eine transiente pH-Wertänderung im Cytosol der Zelle, der wiederum Einfluss auf die Aktivierung von Abwehrgenen haben kann.

4.4 G-Proteine als Mittler in der Signaltransduktionskette des „oxidative burst“ in Süßkartoffel-Suspensionskulturen

Die zuvor beschriebene Beteiligung der Phospholipase A_2 in der Signaltransduktion des „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur warf die Frage nach dem Aktivierungsmechanismus der PLA_2 im Zuge der Elicitierung auf. Zur Klärung dieser Fragestellung sollten Versuche mit dem G-Protein-Aktivator Mastoparan die Beteiligung von G-Proteinen an einer Signalkaskade

der pflanzlichen Abwehrreaktion belegen. Untersuchungen anderer Autoren konnten in Zellkulturen von Fichte und Kartoffel einen solchen Zusammenhang herstellen [Hebe et al. 1998, Senda et al. 1998]. Bei Verwendung von Mastoparan in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur konnte jedoch kein direkter Nachweis der Induktion eines „oxidative burst“ über die Chemilumineszenz-Methode erbracht werden. Der Effektor erwies sich nur bei Applikation in einem Alkalisierungstest als geeigneter Induktor einer pflanzlichen Abwehrreaktion (Kapitel 3.6.3). Es wird vermutet, dass Mastoparan die Freisetzung Lumineszenz-unterdrückender Substanzen induziert und so eine H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz-Messung verhindert. Das gleiche methodische Problem wurde auch von Hebe et al. [1999] in Fichten-Zellkulturen beobachtet. Die vergleichende Darstellung der Kinetik der extrazellulären Alkalisierung in Süßkartoffel-Suspensionszellen in Abbildung 3.15 auf Seite 55 macht deutlich, dass eine Dosis-abhängige Korrelation zur Alkalisierung des Kulturmediums besteht. Die Ergebnisse weisen aber auch einen wesentlichen Unterschied zur Invertase-induzierten Alkalisierung auf. Die Mastoparan-induzierte pH-Wertänderung verläuft wesentlich schneller und ohne ersichtliche *lag*-Phase, wohingegen der Invertase-Ansatz erst nach mehreren Minuten eine Änderung des extrazellulären pH-Wertes erkennen lässt. Es ist anzunehmen, dass der Zeitraum zwischen der Ausbildung eines Elicitor-Rezeptor-Komplexes und nachfolgender G-Protein-Aktivierung für diese *lag*-Phase verantwortlich ist. Diese Verzögerungsphase der Abwehrreaktion wird von Mastoparan wahrscheinlich durch die direkte Aktivierung der G-Proteine umgangen. Alkalisierungstests mit dem selektiven Phospholipase A_2 Inhibitor *Haloenol Lactone Suicide Substrate* (HELSS) (Kapitel 3.6.4) erbrachten eine Dosis-abhängige Verminderung der Mastoparan-induzierten extrazellulären Alkalisierung. Dieses Resultat ist ein Indiz dafür, dass die PLA_2 -Aktivität, ähnlich wie es bereits in Kartoffelknollen nachgewiesen wurde, von G-Proteinen reguliert wird [Senda et al. 1998].

4.5 Beteiligung von Protein-Kinasen am „oxidative burst“

Neben dem in Kapitel 4.3 beschriebenen sekundären Botenstoff IP_3 wird von der Phospholipase C noch ein zweites Umsetzungsprodukt gebildet. Dabei handelt es sich um Diacylglycerin (DAG). Dieser sekundäre Botenstoff gilt als Aktivator der Protein-Kinase C (PKC). Die PKC phosphoryliert Zellproteine und ändert somit ihren Aktivitätszustand. Für die PKC ist im humanen System eine aktivierende Wirkung auf die NADPH-Oxidase gezeigt worden [Martins Chaves et al. 2002] wohingegen im pflanzlichen Zellsystem dieser Zusammenhang nicht hergestellt werden konnte. Um Aufschluß über die Beteiligung der PKC am „oxidative burst“ in elicitierten Süßkartoffelzellen zu erlangen, wurde mit Hilfe der Effektoren OAG, einem Diacylglycerin-

Analogon, und PMA, einem Phorbolster, die PKC aktiviert. Beide Effektoren können bei Bindung an die PKC, diese aktivieren und so eine PKC-abhängige Signalkaskade initialisieren. Die in Kapitel 3.4 dargestellten Experimente konnten eine aktivierende Wirkung auf die Synthese von reaktiven Sauerstoffspezies, wie sie im humanen Zellsystem gefunden wurden, in suspendierten Süßkartoffelzellen nicht bestätigen. Weder der Einsatz des Diacylglycerin-Analogons OAG, noch der Phorbolster PMA können eine Aktivierung der pflanzlichen NADPH-Oxidase und damit die Synthese von H_2O_2 induzieren. Um sicherzustellen, dass auch eine Inhibierung der PKC keinen Einfluss auf die Synthese von H_2O_2 in elicitierten Süßkartoffelzellen hat, wurden die Inhibitoren Calphostin C und GF109203X (ein Bisindolylmaleimid) getestet. Auch in diesem Fall waren die Ergebnisse eindeutig. Es konnte keine inhibierende Wirkung dieser Effektoren festgestellt werden. Da sowohl das Ca^{2+} als auch das Calmodulin als wichtige Komponenten bei der Induktion eines „oxidative burst“ elicitierten Süßkartoffelzellen identifiziert wurden und häufig Kinasen als Zielproteine haben, sind Ca^{2+} -abhängige Protein-Kinasen (CDPK, *Ca²⁺-Dependent Protein Kinase*) als Komponenten des Signaltransduktionsweges wahrscheinlich. Diese Kinasen besitzen eine „Calmodulin-ähnliche Domäne“, die stark konservierte Ca^{2+} -bindende Motive aufweist [Stone und Walker 1995] und können mit dem Protein-Kinase Inhibitor K-252a selektiv gehemmt werden. Die in Kapitel 3.4 beschriebenen Ergebnisse zeigen eine eindeutige Verknüpfung zwischen der CDPK und der H_2O_2 -Synthese. Der Inhibitor wirkt bereits in geringen Dosen stark reprimierend und konnte den Invertase-induzierten „oxidative burst“ der Süßkartoffel-Suspensionszellen auch nach einem Anstieg der H_2O_2 -Bildung vollständig unterdrücken. Dieses Ergebnis stützt die Vermutung, dass es einer dauerhaften Phosphorylierung einzelner Proteine in der Signaltransduktionskette bedarf, um eine anhaltende H_2O_2 -Synthese zu gewährleisten. Es wird auch eine direkte Regulation der NADPH-Oxidase durch die CDPK diskutiert. So zeigten Untersuchungen an Protoplasten von *Arabidopsis* eine selektive Aktivierung der NADPH-Oxidase durch die CDPK [Xing et al. 2001]. In Tabakpflanzen wurde hingegen eine NAD-Kinase für den Elicitor-induzierten Anstieg von reaktiven Sauerstoffspezies identifiziert [Harding und Roberts 1998]. In diesem Zusammenhang tritt das Calmodulin als eine weitere potentielle Signaltransduktionskomponente in den Blickpunkt. Es konnte gezeigt werden, dass die NAD-Kinase von Calmodulin maßgeblich in ihrer Aktivität beeinflusst wird [Harding et al. 1997b]. Calmodulin ist aus dem tierischen Zellsystem als Ca^{2+} -Sensor bekannt und beeinflusst zahlreiche zelluläre Proteine in ihrem Aktivitätszustand. Auch die CDPK besitzt zumindest eine „Calmodulin-ähnliche Domäne“, die ebenfalls durch Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen die Kinase-Aktivität reguliert [Stone und Walker 1995]. Dies lässt vermuten, dass auch Calmodulin zur Steuerung des „oxidative burst“ in Pflanzenzellen notwendig sein könnte. Die in Kapitel 3.3 dargestellten Experimente mit dem Calmodulin-Antagonisten Trifluoperazin Dimaleat (TFP) bestätigen diese Hypothese,

da TFP den Invertase-induzierten „oxidative burst“ in den Süßkartoffel-Suspensionskulturen Dosis-abhängig reduzierte. Die Experimente mit TFP können allerdings nicht zweifelsfrei klären, ob freies Calmodulin im Cytosol der Zelle oder lediglich die „Calmodulin-ähnliche Domäne“ der CDPK durch die inhibitorische Wirkung des Effektors beeinflusst wird. Die Ergebnisse unterstreichen jedoch zusätzlich die bedeutende Rolle von Ca^{2+} -Ionen bei der Steuerung von Abwehrmechanismen in einer Pflanzenzelle.

4.6 Mikroorganismen-induzierte Abwehrreaktionen in Süßkartoffelpflanzen

Neben den zahlreich isolierten und aufgereinigten Elicitoren, die in der Lage sind pflanzliche Abwehrreaktionen zu induzieren [Hahn 1996], können Inokulationsversuche mit lebenden Mikroorganismen ebenfalls einen Einblick in die Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktion geben. Insbesondere eine vergleichende Untersuchung der Einflüsse verschiedener Bakterien auf die Ausprägung von pflanzlichen Abwehrreaktionen kann zu Rückschlüssen auf Erkennungs- oder Suppressionsmechanismen führen. Die in Kapitel 3.8 dargestellten Chemilumineszenz-Messungen belegen die abwehrinduzierende Wirkung des Phytopathogens *Ralstonia solanacearum* auf Süßkartoffel-Suspensionszellen. Mit zunehmender Mikroorganismen-Dichte steigt auch die Synthese von H_2O_2 in der Pflanzenzellkultur, wobei der maximal induzierbare „oxidative burst“ bei einer Inokulationsdichte zwischen $\text{OD}_{578} = 0,025$ und $0,5$ des Phytopathogens festgestellt wurde. In diesen Fällen erreichte die H_2O_2 -abhängige Chemilumineszenz ca. 80% der Invertase-induzierten Positiv-Kontrolle. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass *Ralstonia solanacearum* als ein natürliches Pathogen der Süßkartoffel ein großes Potential zur Induktion der pflanzlichen Abwehrreaktion aufweist. Nach diesen Inokulationsversuchen sollten Phytopathogen-induzierte „oxidative burst“-Messungen in Anwesenheit des CDPK-Inhibitors K-252a und des PLA_2 -Inhibitors Chlorpromazin-HCl zeigen, dass diese Signalkomponenten ebenfalls an der Induktion der H_2O_2 -Synthese beteiligt sind (Kapitel 3.8). Die Tatsache, dass beide Effektoren den Phytopathogen-induzierten „oxidative burst“ vollständig unterdrücken können, legt die Vergleichbarkeit mit der Invertase-induzierten H_2O_2 -Synthese nahe.

Im Gegensatz dazu wurde bei den Inokulationsversuchen mit dem synergistischen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* keine Induktion von Abwehrreaktionen angenommen. Diese Erwartung wurde jedoch durch die in Kapitel 3.9 und Kapitel 3.6.5 dargestellten Ergebnisse nicht vollständig bestätigt. Sowohl die Alkalisierungstests als auch die „oxidative burst“-Messungen

machten zwar einen Unterschied in der Induktion dieser Abwehrreaktionen abhängig vom Mikroorganismus sichtbar, jedoch wurde auch von *G. diazotrophicus* in beiden Untersuchungen eine „leichte“ Abwehrreaktion der Süßkartoffelzellen induziert. In anderen Untersuchungen wurde der Kontakt dieses Endophyten mit der Wirtspflanze allgemein als symptomlos beschrieben [Dong et al. 1994, Döbereiner et al. 1995, Baldani et al. 1997]. Im Zuckerrohr, einer der Wirtspflanzen des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ist bei Inokulation mit einer sehr hohen Zellzahl (10^8 Zellen \cdot ml $^{-1}$) eine lokale Abwehrreaktion beobachtet worden [James et al. 2001]. Sie wurde von den Autoren jedoch hauptsächlich auf die Verletzung des Pflanzengewebes bei der Injektion des Bakteriums zurückgeführt. Bei einigen symbiotischen Interaktionen wurde während der Ausbildung einer Symbiose ebenfalls eine vorübergehende hypersensitive Reaktion des pflanzlichen Interaktionspartners beobachtet [Santos et al. 2001]. Diese Abwehrreaktion beschränkt sich jedoch auf die Ausbildung eines „oxidative burst“, der im weiteren Verlauf der Symbiose-Ausbildung keine weiteren Abwehrreaktionen nach sich zieht, wie es bei inkompatiblen Pflanzen-Mikroorganismen-Interaktionen normalerweise der Fall ist. Die symbiotischen Bakterien inhibieren vermutlich den weiteren Signalweg zur Induktion nachfolgender Abwehrmaßnahmen mittels spezifischer Suppressormoleküle [Niehaus et al. 1998].

Da der für die Experimente eingesetzte Endophytenstamm Pa15^T ein Isolat aus dem Zuckerrohr ist, wurde eine vergleichende Untersuchung mit einem aus der Süßkartoffel isoliertem Stamm (BR11289) durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Experimente (Kapitel 3.9) machen deutlich, dass keine wirtsspezifische Unterscheidung der beiden Endophytenstämme vorliegt. Dabei fiel jedoch die geringere Syntheserate von H₂O₂ in den Versuchsansätzen mit höherer Animpfdichte auf. Dies steht im deutlichen Kontrast zu den Experimenten mit dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* (Kapitel 3.8), in denen die Erhöhung der Animpfdichte keine Verringerung des „oxidative burst“ zur Folge hatte. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei einer hinreichend hohen Endophyten-Zellzahl genügend Suppressorsubstanzen zur Verfügung stehen, die eine Abwehrreaktion in Form eines „oxidative burst“ wirksam abmildern können. Dabei sind Exopolysaccharide als Suppressoren denkbar. Diese wurden in Rhizobien-Leguminosen-Symbiosen bereits als mögliche Suppressormoleküle erkannt [Niehaus et al. 1993, Niehaus et al. 1998]. Aber auch die Indol-3-Essigsäure, deren reprimierende Wirkung auf die Elicitor-induzierte Alkalisierungreaktion in Kapitel 4.1 bereits beschrieben wurde, könnte beteiligt sein.

Die Fähigkeit des Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* in Süßkartoffel-Suspensionszellen, eine abgemilderte Abwehr in Form einer extrazellulären Alkalisierung und eines schwachen „oxidative burst“ zu induzieren, führte zu der Fragestellung, ob auch nachfolgende Abwehrmechanismen der Pflanzenzelle durch das Bakterium eingeleitet werden. Zu diesem Zweck wurde

die PAL-Aktivität der Pflanzenzellen in Anwesenheit der beiden Mikroorganismen sowie des Elicitors Invertase gemessen. Die PAL ist das zentrale Eingangsenzym des Phenylpropanoid-Syntheseweges von Pflanzenzellen an dessen Ende die Bildung von phenolischen Komponenten wie den bakterizid wirkenden Phytoalexinen steht. Die Phenylpropanoid-Synthese wird als Antwort auf Stressoren der Pflanzenzelle wie Elicitoren [Li et al. 2001, Campbell und Ellis 1992], Verwundung [Logemann et al. 1995] und Pathogenbefall [Cahill und McComb 1992] aktiviert. Die Messungen der PAL-Aktivität in Mischkulturen von *Ipomoea batatas* und *Gluconacetobacter diazotrophicus* erbrachte ein ähnliches Bild wie zuvor die Alkalisierung- bzw. die „oxidative burst“-Messungen. Die in Kapitel 3.24 dargestellten Untersuchungen machen zwar einen Unterschied zwischen dem Phytopathogen *Ralstonia solanacearum* und dem Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus* deutlich, zeigen aber auch, dass der Endophyt ebenfalls eine Aktivierung der PAL in Süßkartoffelzellen induziert. Dieses Ergebnis überrascht zunächst, da die Induktion einer zweiten bzw. dritten Abwehrphase (siehe Kap. 1.1.5 auf S. 7) durch die Pflanzenzelle bei der Interaktion mit dem synergistischen Endophyten nicht einleuchtend erscheint. Jedoch konnte von Recourt et al. [1992] gezeigt werden, dass auch bei Ausbildung einer synergistischen Interaktion zwischen Pflanze und Mikroorganismus in Form einer Symbiose, eine erhöhte PAL-Aktivität induziert wird. Während aber die Pathogen-induzierte PAL-Aktivität nach fünf Stunden ein Maximum zeigt und anschließend kontinuierlich auf das Niveau der nicht elicitierten Negativ-Kontrolle abfällt, weist die Endophyten-induzierte PAL-Aktivität eine andere Kinetik auf. In diesem Versuchsansatz bleibt die Aktivität des Enzyms nach Erreichen eines Maximums (5 Stunden) in den folgenden 22 Stunden etwa auf dem gleichen Niveau. Hinzu kommt, dass das Maximum nur bei etwa 50% der PAL-Aktivität des Pathogen-Ansatzes liegt und damit ein ähnlich deutliche Differenzierung des mikrobiellen Signals offenbart, wie bereits im Zusammenhang mit den Ergebnissen der „oxidative burst“-Messungen und des Alkalisierungstests diskutiert wurde. Ein Erklärungsansatz für die beschriebenen Unterschiede im zeitlichen Verlauf der PAL-Aktivität kann die Vitalität der Süßkartoffelzellen sein. So wurde festgestellt, dass sich die mit *R. solanacearum* inokulierten Zellsuspensionen bereits nach zehn Stunden deutlich sichtbar verfärbten und nach 25 Stunden nur noch eine blasse Grün-Färbung zeigten. Diese farbliche Änderung wird auch beim Absterben der Pflanzenzellen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in den mit *G. diazotrophicus* inokulierten Süßkartoffel-Zellsuspensionen keine farbliche Änderung beobachtet. Es kann also vermutet werden, dass der rapide Abfall der PAL-Aktivität auf das verstärkte Absterben der Pflanzenzellen bei Kontakt mit *Ralstonia solanacearum* zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Interaktion zwischen dem synergistischen Endophyten und den Süßkartoffelzellen wider Erwarten mit einer Abwehrreaktion der Pflanze einhergeht. Diese „leichte“ Pathogenabwehr kann als eine Kontrollfunktion der Pflanzenzelle verstanden werden, die auf diese Weise eine zu starke Besiedlung durch den Endophyten verhindert. Diese Vermutung wird durch Inokulationsversuche an Zuckerrohr mit dem Endophyten unterstützt [James et al. 2001]. Die Autoren berichten von einer lokalen Abwehrreaktion der Wirtspflanze nach dem Eindringen des Endophyten in das Pflanzengewebe. Die Zuckerrohrpflanze bildet ein Polymermaterial, das den invasiven Mikroorganismus umschließt und dadurch die Mobilität und Ausbreitung der Bakterien im Pflanzengewebe deutlich reduziert.

4.7 Stimuli-abhängige cytosolische pH-Signale

Neben der unterschiedlichen Modulation des cytosolischen Ca^{2+} -Signals bei Kontakt der Pflanzenzelle mit unterschiedlichen externen Stimuli, wie Elicitoren, mechanischem Stress oder Pathogenbefall, wird zunehmend auch dem cytosolischen pH-Wert eine Funktion bei der Unterscheidung dieser Stimuli innerhalb der Zelle zugesprochen [Felle et al. 2000, Lecourieux et al. 2002]. In Kapitel 4.2 wurde bereits auf die Funktion des intrazellulären Ca^{2+} -Signals eingegangen. Im Folgenden soll die Funktion des cytosolischen pH-Wertes näher betrachtet werden. Der cytosolische pH-Wert einer Zelle liegt im leicht alkalischen Bereich zwischen pH 7,2 bis 7,5 [Felle 2001]. Ähnlich wie die Ca^{2+} -Konzentration ist auch die zelluläre H^+ -Homöostase zeitlich veränderbar und macht die Protonen so zu einem zellulären Botenstoff [Felle 2001]. Es gibt die Möglichkeit den cytosolischen pH-Wert invasiv mit Mikroelektroden [Felle et al. 1996, Felle et al. 2000] oder aber nicht-invasiv mit pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen zu messen. Für eine nicht-invasive Messung des cytosolischen pH-Wertes kann die Methode der Diffusions-Beladung mit einem Fluoreszenzfarbstoff verwendet werden. Diese Methode ist in den 80'ger Jahren bei tierischen Zellen etabliert worden [Deitmer und Schild 2000] und wird zunehmend auch in Pflanzensystemen eingesetzt [Gehring et al. 1990, Giglioli-Guivarc'h et al. 1996, Dixon et al. 1989, Hafke et al. 2001]. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu tierischen Zellen ist die sehr hohe Diffusionsbarriere, die eine Pflanzenzelle dem Eindringen eines Fluoreszenzfarbstoffes entgegenstellt. Dies erschwert es dem Farbstoff in ausreichender Konzentration in der Zelle zu akkumulieren. Zur Beseitigung dieses methodischen Problems kann der Farbstoff entweder in die Zelle injiziert werden [Scott und Allen 1999] oder - wie in der vorliegenden Arbeit - mit Hilfe eines Diffusions-erleichternden Detergenz (Pluronic[®] F-127) in das Cytosol der Pflanzenzelle gelangen. Ohne den Zusatz dieses Detergenz konnten die Süßkartoffelzellen nicht zuverlässig und ausreichend mit

dem pH-sensitiven Fluoreszenzfarbstoff BCECF-AM beladen werden. In diesem Fall wurde eine geringe und nicht reproduzierbare Fluoreszenzintensität detektiert und häufig auch eine rapide Verringerung der BCECF-abhängigen Fluoreszenzintensität mit zunehmender Beleuchtungsdauer der Zelle bei den Anregungswellenlängen 439 und 490 nm beobachtet. Da bei einer zu geringen Fluoreszenzintensität das Ratio-Verfahren (Kapitel 2.7) zu großen Fehlern führt, war eine Messung des pH-Wertes an solchen Zellen nicht möglich. Aus diesem Grund wurden für die cytosolischen pH-Wertmessungen die Süßkartoffelzellen mit einem Gemisch aus dem Detergens Pluronic[®] F-127 und BCECF-AM beladen (Kapitel 2.7).

Der Vergleich der pH-abhängigen Fluoreszenz nach Superfusion mit zwei unterschiedlichen Elicitoren zeigt ein übereinstimmendes Bild für den Verlauf des cytosolischen pH-Signals. Die in Kapitel 3.11.2 dargestellten Ergebnisse dieser Messungen machen deutlich, dass sowohl der heterogene Hefeextrakt-Elicitor (Kapitel 2.10) als auch die als Elicitor fungierende Reinsubstanz Invertase eine vergleichbare Azidifizierung des Cytosols der Pflanzenzelle induzieren. Ein solcher Effekt von Elicitoren auf den cytosolischen pH-Wert einer Pflanzenzelle wurde auch von anderen Autoren beobachtet. So konnte in Tabak [Mathieu et al. 1996], Mohn [Roos et al. 1998] sowie in der Luzerne [Felle et al. 2000] eine Elicitor-induzierte Azidifizierung nachgewiesen werden. Die Autoren He et al. [1998] berichten in diesem Zusammenhang von einer pH-abhängigen Induktion von Abwehrgenen in Reis-Suspensionskulturen. Die Ursache dieser pH-Wertänderung im Cytosol der Pflanzenzelle ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt aber Hinweise darauf, dass der H⁺-Pool in der Vakuole der Zelle an der Modulation des pH-Signals beteiligt ist. Wie bereits im Zusammenhang mit einer möglichen Beteiligung der PLA₂ an Abwehrreaktionen der Süßkartoffelzellen erwähnt wurde, konnte von Viehweger et al. [2002] gezeigt werden, dass Hydrolyseprodukte der Phospholipase A₂ (Lysophospholipide) Protonen-Pumpen in der Vakuolenmembran aktivieren können. Diese, für die Mohnpflanze nachgewiesene Verbindung zwischen der PLA₂-Aktivität und dem intrazellulären pH-Wert, passt sich sehr gut in das in dieser Arbeit postulierte Signaltransduktionsmodell einer elicitierten Süßkartoffelzelle ein ((Kapitel 4.7.1)). Bei Inokulation der Süßkartoffelzellen mit einem pathogenen Mikroorganismus ist eine ähnliche Änderung des cytosolischen pH-Wertes zu vermuten gewesen. Diese Vermutung bestätigte sich bei Stimulation mit dem natürlichen Phytopathogen *Ralstonia solanacearum*. Die Ergebnisse in Kapitel 3.11.3 zeigen eine ähnliche pH-Wertänderung des Cytosols wie er von dem Hefeextrakt-Elicitor und der Invertase induziert wird. Vergleichend ist jedoch festzustellen, dass eine wesentlich stärkere Azidifizierung des Cytosols in Anwesenheit des Pathogens gemessen wurde, als es bei den Elicitoren der Fall war. Dies ist insofern von Interesse, da weder bei den Alkalisierungs- noch bei den Chemilumineszenzmessungen eine solche Diskrepanz der elicitierten Abwehrreaktionen

nachgewiesen werden konnte (Kap. 3.6.5 auf S. 57 und Kap. 3.9 auf S. 64). Dies lässt vermuten, dass die cytosolische Azidifizierung kein notwendiges Ereignis zur Induktion der extrazellulären Alkalisierung sowie des „oxidative burst“ in Süßkartoffel-Suspensionszellen darstellt. Im Hinblick auf eine pH-abhängige Aktivierung von Abwehrgenen kann jedoch ableitend von den Untersuchungen an Reis-Kulturen [He et al. 1998] die deutlich höhere PAL-Aktivität in Pathogen-elicitierten Süßkartoffelzellen in Zusammenhang mit dem cytosolischen pH-Wert gebracht werden (Kapitel 3.10). Die Autoren He et al. [1998] wiesen durch Ansäuerung des Cytosols von Reis-Zellen mit organischen Säuren nach, dass erst ab einem bestimmten kritischen pH-Wert die Induktion von Abwehrgenen, u.a. auch der PAL, stattfindet. Dies könnte erklären, weshalb trotz Azidifizierung des Cytosols die Invertase-induzierte PAL-Aktivität (Kapitel 3.10) nicht auf dem Niveau des Pathogen-elicitierten Ansatzes liegt. Im Gegensatz zu den bisher vorgestellten intrazellulären pH-Wertänderungen stehen die Messungen der pH-Änderungen in einer Süßkartoffelzelle bei Elicitierung mit dem synergistischen Endophyten *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Die in Kapitel 3.11.5 auf Seite 75 dargestellten Ergebnisse der pH-abhängigen Fluoreszenz-Messungen lassen auf eine Variabilität des elicitierenden Signals auf der Ebene des cytosolischen pH-Wertes schließen. Anders als bei dem Elicitor Invertase und dem Phytopathogen *R. solanacearum* wird von dem Endophyten keine Azidifizierung, sondern eine leichte Alkalisierung des Cytosols induziert. Ein ähnlicher Effekt durch einen nicht-pathogenen externen Stimulus wurde von Felle et al. [2000] an Wurzelhaaren der Luzerne mit Hilfe von ionenselektiven Mikroelektroden nachgewiesen. Die Autoren konnten ein unterschiedliches cytosolisches pH-Signal abhängig von einem symbiontischen (Nod-Faktor) oder einem elicitierenden Stimulus (Oligochitin-Elicitor) messen. Auch Cárdenas et al. [2000] konnte eine von Nod-Faktoren abhängige cytosolische Alkalisierung in Wurzelhaaren von der Luzerne belegen. Bei allen diesen Untersuchungen handelt es sich jedoch um symbiontische Interaktionspartner. Im Hinblick auf eine rein assoziative Interaktion zwischen Pflanzen und Mikroorganismen konnte in der vorliegenden Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass auch bei diesem Interaktionstyp, ähnlich wie bei der Ausbildung einer Symbiose, eine Differenzierung im cytosolischen pH-Signal der Pflanzenzelle abhängig vom elicitierenden Reiz stattfindet.

4.7.1 Modell der Signaltransduktion früher Abwehrreaktionen von *Ipomoea batatas*

Betrachtet man zusammenfassend den Signalweg des „oxidative burst“ in einer Süßkartoffel-Suspensionskultur ist festzustellen, dass einzelne Komponenten in Übereinstimmung mit anderen Zellsystemen, als ein obligater Teil der Signaltransduktionskette eines „oxidative burst“ identifiziert werden konnten. Zu diesen Komponenten zählen die plasmamembranständigen Ionenkanäle, heterotrimere G-Proteine und unterschiedliche Protein-Kinasen und Phospholipasen. Im Zusammenhang mit den Ionenkanälen ist zudem das Ca^{2+} als ein wesentlicher sekundärer Botenstoff zu nennen. Seine Rolle im Signalweg der Elicitor-induzierten H_2O_2 -Synthese ist unbestritten, jedoch scheint es abhängig vom Zellsystem zu sein ob der Influx extrazellulärem Ca^{2+} [Zimmermann et al. 1997a] oder der Efflux aus intrazellulären Speichern für die Induktion des „oxidative burst“ essentiell ist [Cessna und Low 2000]. Die in der vorliegenden Arbeit zu diesem Thema durchgeführten Untersuchungen für die Süßkartoffelpflanze legten die Vermutung nahe, dass beide Ereignisse notwendig sind. Ein wesentlich differenziertes Bild findet man bei der Betrachtung einer Beteiligung von Phospholipasen und Protein-Kinasen. So wurde in anderen Zellsystemen häufig die Funktion bestimmter Phospholipasen als Signalkomponenten hervorgehoben, wie im Fall von Sojabohnen-Zellkulturen, in denen zum einen eine Beteiligung der Phospholipase C nachgewiesen wurde [Legendre et al. 1993], zum anderen aber auch ein H_2O_2 -induzierende Wirkung der Phospholipase A detektiert wurde [Chandra et al. 1996]. In den Süßkartoffel-Suspensionskulturen gibt es ebenfalls Hinweise darauf, dass beide Phospholipasen Teil des Signalweges eines Elicitor-induzierten „oxidative burst“ sein könnten. Ebenso vielfältig stellt sich die Situation für die Beteiligung von Protein-Kinasen im Signalweg des „oxidative burst“ dar. Eine Beteiligung der Protein-Kinase C, die im humanen Zellsystem als Signalkomponente des „oxidative burst“ identifiziert wurde [Martins Chaves et al. 2002]¹, konnte in dem Signalweg des Elicitor-induzierten „oxidative burst“ der Süßkartoffelpflanze nicht nachgewiesen werden. Neben den PKC sind ebenfalls Ca^{2+} -abhängige Protein-Kinasen (CDPK) [Xing et al. 2001]² und NAD-Kinasen [Harding et al. 1997b]³ mit dem Signalweg des „oxidative burst“ von Pflanzenzellen in Verbindung gebracht worden. Im Fall der Süßkartoffelzellen wurde nach den vorliegenden Untersuchungen eine CDPK als sehr wahrscheinliche Signalkomponente identifiziert und ordnet sich somit in eine ganze Reihe von Pflanzenkulturen ein, bei denen ähnliche Resultate erzielt wurden [Xing et al. 2001, Romeis et al. 2000]. Der in dieser Arbeit dargestellte Vergleich der aktivierenden Eigenschaften eines pa-

¹altersbedingte PKC-Aktivierung

²NADPH-Oxidase Aktivierung durch CDPK Expression

³mit Cellulase, Harpin, inkompatiblen Bakterien, osmotischen- und mechanischen Stress eliciert

thogenen und eines synergistischen Mikroorganismus auf die Synthese von H_2O_2 zeigte, dass der Signalweg auf zellulärer Ebene differenziert induziert wird. Das intrazelluläre pH-Signal, induziert durch den Kontakt der Pflanzenzelle mit den Mikroorganismen, machte diese Differenzierung besonders deutlich. In diesem Zusammenhang würden Untersuchungen des cytosolischen Ca^{2+} -Signals weiteren Aufschluss über die Differenzierung der verschiedenen elicitierenden Signale auf der Ebene der zellulären Ionen-Homöostase geben. Dazu wären Aequorin-transformierte Süßkartoffelzellen ein potentiell sehr geeignetes Mess-System. Neben der Differenzierung des elicitierenden Signals war aber auch festzustellen, dass der synergistische Endophyt *Gluconacetobacter diazotrophicus*, ähnlich wie die symbiontischen Rhizobien, durchaus auch eine schwache Abwehrreaktion induzieren kann [Santos et al. 2001]. Diese wird dann aber offensichtlich unterdrückt oder aber durch Induktion anderer Signalwege umgangen. Für weiterführende Untersuchungen wäre es daher von Interesse bakterielle Komponenten zu isolieren und auf ihre Fähigkeit zu untersuchen als Suppressoren wirksam die pflanzlichen Abwehrreaktionen zu reduzieren bzw. andere Signalwege zu induzieren. Dabei ist neben Stoffwechselprodukten auch an Bestandteile der bakteriellen Zellwand zu denken. So scheint es sinnvoll unter anderem die Lipopolysaccharide (LPS) solcher Bakterien zu isolieren und auf ihre Suppressor-Eigenschaften zu testen, da diese auch in der Ausbildung der bakteriellen Pathogenität ein entscheidender Faktor sind [Leemann et al. 1995, Newman et al. 1997, Meyer et al. 2001]. Die zuvor beschriebenen Zusammenhänge sind in Abbildung 4.1 nochmal modellhaft zusammengefasst.

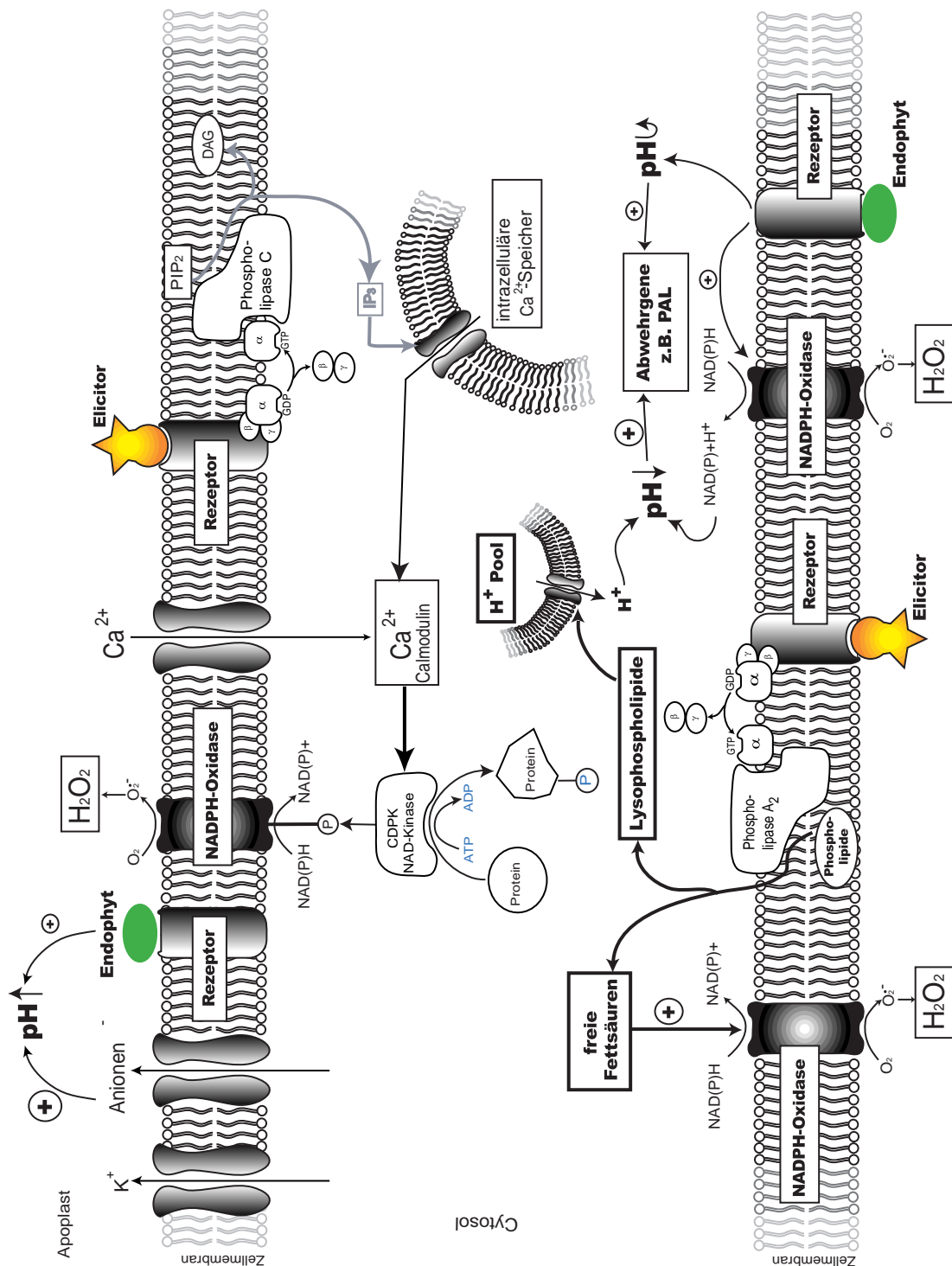


Abbildung 4.1: Modell der Signaltransduktion Elicitor- sowie Endophyten-induzierter Abwehrreaktionen einer Süßkartoffel-Suspensionskultur. Erklärung siehe Text.

Literaturverzeichnis

- [Amicucci et al. 1999] AMICUCCI, E. ; GASCHLER, K. ; WARD, J.M.: NADPH oxidase genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) and curly-leaf pondweed (*Potamogeton crispus*). In: *Plant Biol.* 1 (1999), S. 524–528
- [Assmann 1995] ASSMANN, S. M.: Cyclic AMP as a second messenger in higher plants. In: *Plant Physiol.* 108 (1995), S. 885–889
- [Baldani et al. 1997] BALDANI, J.I. ; CARUSO, L. ; BALDANI, V.L.D. ; GOI, S.R. ; DÖBEREINER, J.: Recent advances in BNF with non-legume plants. In: *Soil Biology and Biochemistry* 29 (1997), S. 911–922
- [Barceló 1998] BARCELÓ, A.R.: The generation of H₂O₂ in the xylem of *Zinnia elegans* is mediated by an NADPH-oxidase-like enzyme. In: *Planta* 207 (1998), S. 207–216
- [Bashan und Holguin 1996] BASHAN, Y. ; HOLGUIN, G.: Azospirillum - plant relationship: environmental and physiological advances (1990 - 1996). 43 (1996), S. 103–121
- [Bastian et al. 1998] BASTIAN, F. ; COHEN, A. ; PICCOLI, P. ; LUNA, V. ; BARALDI, R. ; BOTTINI, R.: Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 and A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture. In: *Plant Growth Regulation* 24 (1998), S. 7–11
- [Bhagwat et al. 1999] BHAGWAT, A.A. ; MITHÖFER, A. ; PFEFFER, P.E. ; KRAUS, C. ; SPICKERS, N. ; HOTCHKISS, A. ; EBEL, J. ; KEISTER, D.L.: Further studies of the role of cyclic α -glucans in symbiosis. An *ndvC* mutant of *Bradyrhizobium japonicum* synthesizes cyclodecakis-(1→3)- α -glucosyl. In: *Plant Physiology* 119 (1999), S. 1057–1064
- [Boddey et al. 1991] BODDEY, R.M. ; URQUIAGA, S. ; REIS, V. ; DÖBEREINER, J.: Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. In: POLSINELLI, M. (Hrsg.) ; MATER-

- RASSIAND, R. (Hrsg.) ; VINCENZINI, M. (Hrsg.): *Nitrogen Fixation*, kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991, S. 105–111
- [Bolwell et al. 1998] BOLWELL, G.P. ; DAVIES, D.R. ; GERRISH, C. ; AUH, C.-K. ; MURPHY, T.M.: Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and french bean cells reveals two distinct mechanisms. In: *Plant. Physiol.* 116 (1998), S. 1379–1385
- [Brandt 2002] BRANDT, D.: *Über die Rolle von PKC bei der Regulation des Zytoskeletts*, Universität Hannover, Diss., 2002
- [Budda und Randall 1990] BUDDA, R.J.A. ; RANDALL, D.D.: Protein kinases in higher plants. In: *Inositol metabolism in plants*. Wiley-Liss, Inc., 1990, S. 351–367
- [Cahill und McComb 1992] CAHILL, D.M. ; MCCOMB, J.A.: A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalypts calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. In: *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40 (1992), S. 315–332
- [Campbell und Ellis 1992] CAMPBELL, M.M. ; ELLIS, B.E.: Fungal elicitor-mediated responses in pine cell cultures: I. Induction of phenylpropanoid metabolism. In: *Planta* 186 (1992), S. 409–417
- [Cárdenas et al. 2000] CÁRDENAS, L. ; HOLDAWAY-CLARKE, T. L. ; SÁNCHEZ, F. ; QUINTO, C. ; FEIJÓ, J. A. ; KUNKEL, J. G. ; HEPLER, P. K.: Ion changes in Legume Root Hairs Responding to Nod Factors. In: *Plant Physiology* 123 (2000), S. 443–451
- [Cardinale et al. 2000] CARDINALE, F. ; JONAK, C. ; LIGTERINK, W. ; NIEHAUS, K. ; BOLLER, T. ; HIRT, H.: Differential activation of four specific MAPK pathways by distinct elicitors. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 47, S. 36734–36740
- [Cavalcante und Döbereiner 1988] CAVALCANTE, V.A. ; DÖBEREINER, J.: A new acidtolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. In: *Plant and Soil* 108 (1988), S. 23–31
- [Cazalé et al. 1998] CAZALÉ, A.-C. ; ROUET-MAYER, M.-A. ; BARBIER-BRYGOO, H. ; MATHIEU, Y. ; LAURIÉRE, C.: Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions. 16 (1998), S. 659–669
- [Cessna und Low 2000] CESSNA, S.G. ; LOW, P.S.: Activation of the oxidative burst in aequorin-transformed *Nicotina tabacum* cells is mediated by protein kinase- and anion channel-dependent of Ca²⁺ from internal stores. In: *Planta* 214 (2000), S. 126–134

- [Chandra und Low 1997] CHANDRA, S. ; LOW, P. S.: Measurement of Ca^{2+} Fluxes during elicitation of the oxidative burst in aequorin-transformed tobacco cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 272 (1997), Nr. 45, S. 28274–28280
- [Chandra et al. 1996] CHANDRA, S. ; P.F.HEINSTEIN ; LOW, P.S.: Activation of phospholipase A by plant defense elicitors. 110 (1996), S. 979–986
- [Chapman 1998] CHAPMAN, K.D.: Phospholipase activity during plant growth and development and in response ton environmental stress. In: *Trends in Plant Science* 3 (1998), Nr. 11, S. 419–426
- [Cojho et al. 1993] COJHO, E.H. ; REIS, V.M. ; SCHENBERG, A.C. ; DÖBEREINER, J.: Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amyolytic yeast in nitrogen-free batch culture. In: *FEMS Microbiol. Lett.* 106 (1993), S. 341–346
- [Crozier et al. 1988] CROZIER, A. ; ARRUDA, P. ; JASMIN, J.M. ; MONTEIRO, A.M. ; SANDBERG, G.: Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 54 (1988), Nr. 11, S. 2833 –2837
- [Deitmer und Schild 2000] Kap. H^+ -Messungen: Protokolle, Ergebnisse und Interpretationen In: DEITMER, J. W. ; SCHILD, D.: *Ca^{2+} und pH - Ionenmessungen in Zellen und Geweben.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg · Berlin, 2000, S. 140–151
- [Dixon et al. 1989] DIXON, G. K. ; BROWNLEE, C. ; MERRETT, M. J.: Measurement of internal pH in the coccolithophore *Emiliania huxleyi* using 2', 7'-bis-(2-carboxyethyl)-5(and-6)carboxyfluorescein acetoxymethylester and digital imaging microscopy. In: *Planta* 178 (1989), S. 443–449
- [Döbereiner 1992] DÖBEREINER, J.: History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. In: *Symbiosis* 13 (1992), S. 1–13
- [Döbereiner et al. 1995] DÖBEREINER, J. ; BALDANI, V.L.D. ; REIS, V.M.: Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: FENDRIK, I. (Hrsg.) ; GALLO, M. del (Hrsg.) ; VANDERLEYDEN, J. (Hrsg.) ; ZAMAROCZY, M. de (Hrsg.): *Azospirillum VI and related microorganisms.* Springer-Verlag, Berlin · Heidelberg, 1995, S. 3–14
- [Dong et al. 1994] DONG, Z. ; CANNY, M.J. ; MCCULLY, M.E. ; ROBOREDO, M.R. ; CABADILLA, C.F. ; ORTEGA, E. ; RODES, R.: A nitorgen-fixing endphyte of sugarcane stems. In: *Plant. Physiol.* 105 (1994), S. 1139–1147

- [Dong et al. 1995] DONG, Z. ; HEYDRICH, M. ; BERNARD, K. ; MCCULLY, M.E.: Further evidences that the N₂-fixing endophytic bacterium from the intercellular space of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus*. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995), S. 1843–1846
- [Duke 1983] DUKE, J.A. *Handbook of Energy Crops*. 1983
- [Elsas et al. 2000] ELSAS, J.D. v. ; KASTELEIN, P. ; BEKKUM, P. v. ; WOLF, J.M. van d. ; VRIES, P.M. d. ; OVERBEEK, L.S. v.: Survival of *Ralstonia solanacearum* biovar 2, the causative agent of potato brown rot, in field and microsom soils in temperate climates. In: *Phytopathology* 90 (2000), Nr. 12, S. 1358–1366
- [Elstner et al. 1996] Kap. Induktion von Abwehrmechanismen (Resistenzfaktoren) In: ELSTNER, E.F. ; OSSWALD, W. ; SCHNEIDER, I.: *Phytopathologie*. Akademischer Verlag Heidelberg · Berlin · Oxford, 1996, S. 244–276
- [Felix und Boller 1995] FELIX, G. ; BOLLER, T.: Systemin induces rapid ion fluxes and ethylene biosynthesis in *Lycopersicon peruvianum* cells. In: *The Plant Journal* 7 (1995), Nr. 3, S. 381–389
- [Felle 2001] FELLE, H.H.: pH: signal and messenger in plant cells. In: *Plant biol.* 3 (2001), S. 577–591
- [Felle et al. 1996] FELLE, H.H. ; KONDOROSI, E. ; KONDOROSI, A. ; SCHULTZE, M.: Rapid alkalization in alfalfa root hairs in response to rhizobial lipochitoooligosaccharide signals. In: *The Plant Journal* 10 (1996), Nr. 2, S. 295–301
- [Felle et al. 2000] FELLE, H.H. ; KONDOROSI, E. ; KONDOROSI, A. ; SCHULTZE, M.: How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. In: *Plant Physiology* 124 (2000), S. 1373–1380
- [French et al. 1995] FRENCH, E.B. ; GUTARRA, L. ; ALEY, P. ; ELIPHINSTONE, J.: Culture media for *Ralstonia solanacearum* isolation, identification and maintenance. In: *Fitopatologia* 30 (1995), Nr. 3, S. 126–130
- [Fuentes-Ramirez et al. 1993] FUENTES-RAMIREZ, L.E. ; JIMENEZ-SALGADO, T. ; ABARCA-OCAMPO, I.R. ; CABALLERO-MELLADO, J.: *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. In: *Plant and Soil* 154 (1993), S. 145–150

- [Gama et al. 1996] GAMA, M. I. C. S. ; LEITE JR., R. P. ; CORDEIRO, A. R. ; CANTLIFFE, D. J.: Transgenic sweet potato plants obtained by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. In: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 46 (1996), S. 237–244
- [Gehring et al. 1990] GEHRING, C.A. ; IRVING, H.R. ; PARISH, R.W.: Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 87 (1990), S. 9645–9649
- [Giglioli-Guivarc'h et al. 1996] GIGLIOLI-GUIVARC'H, N. ; PIERRE, J.-N. ; VIDAL, J. ; BROWN, S.: Flow cytometric analysis of cytosolic pH of mesophyll cell protoplasts from the crabgrass *Digitaria sanguinalis*. In: *Cytometrie* 23 (1996), S. 241–249
- [Gillis et al. 1989] GILLIS, M. ; KERSTERS, K. ; HOSTE, B. ; JANSSENS, D. ; R.M., Kroppenstedt ; STEPHAN, M.P. ; TEIXEIRA, K.R.S. ; DÖBEREINER, J. ; DELEY, J.: *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov. a nitrogen-fixing bacteria associated with sugar cane. In: *Int. J. System. Bacteriol.* 39 (1989), S. 361–364
- [Glickmann et al. 1998] GLICKMANN, E. ; GARDAN, L. ; JACQUET, S. ; HUSSAIN, S. ; ELASRI, M. ; PETIT, A. ; DESSAUX, Y.: Auxin production is a common feature of most pathovars of *Pseudomonas syringae*. In: *Mol.Plant-Microbe Interact.* 11 (1998), Nr. 2, S. 156–162
- [Gus-Mayer et al. 1998] GUS-MAYER, S. ; NATON, B. ; HAHLBROCK, K. ; SCHMELZER, E.: Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95 (1998), S. 8398–8403
- [Hafke et al. 2001] HAFKE, J. B. ; NEFF, R. ; HÜTT, M. T. ; LÜTTGE, U. ; THIEL, G.: Day-to-night variations of cytoplasmic pH in a crassulacean acid metabolism plant. In: *Protoplasma* 216 (2001), S. 164–170
- [Hahn 1996] HAHN, M. G.: Microbial elicitors and their receptors in plants. In: *Annu. Rev. Phytopatol.* 34 (1996), S. 387–412
- [Harding et al. 1997a] HARDING, S.A. ; OH, S.-H. ; ROBERTS, D.M.: Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. In: *The EMBO Journal* 16 (1997), Nr. 6, S. 1137–1144
- [Harding et al. 1997b] HARDING, S.A. ; OH, S.-H. ; ROBERTS, D.M.: Transgenic tobacco expressing a foreign calmodulin gene shows an enhanced production of active oxygen species. In: *The EMBO Journal* 16 (1997), Nr. 6, S. 1137–1144

- [Harding und Roberts 1998] HARDING, S.A. ; ROBERTS, D.M.: Incompatible pathogen infection results in enhanced reactive oxygen and cell death responses in transgenic tobacco expressing a hyperactive mutant calmodulin. In: *Planta* 206 (1998), S. 252–258
- [He et al. 1998] HE, D.-Y. ; YAZAKI, Y. ; NISHIZAWA, Y. ; TAKAI, R. ; YAMADA, K. ; SAKANNO, K. ; SHIBUYA, N. ; MINAMI, E.: Gene Activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, *N-Acetylchitoheptaose*. In: *Mol.Plant-Microbe Interact.* 11 (1998), Nr. 12, S. 1167 –1174
- [Hebe et al. 1998] HEBE, G. ; HAGER, A. ; SALZER, P.: Initial signalling processes induced by elicitors of ectomycorrhiza-forming fungi in spruce cells can also be triggered by G-protein-activating mastoparan and protein phosphatase-inhibiting cantharidin. In: *Planta* 207 (1998), S. 418–425
- [Holk et al. 2002] HOLK, A. ; RIETZ, S. ; ZAHN, M. ; QUADER, H. ; SCHERER, G. F. E.: Molecular Identification of Cytosolic, Patatin-Related Phospholipases A from Arabidopsis with Potential Functions in Plant Signal Transduction. In: *Plant Physiol.* 130 (2002), S. 90–101
- [Hotter 1997] HOTTER, G.S.: Elicitor-induced oxidative burst and phenylpropanoid metabolism in *Pinus radiata* cell suspension cultures. 24 (1997), S. 797 –804
- [Hunter 1989] HUNTER, W.J.: Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. In: *Plant Physiol.* 76 (1989), S. 36
- [Jabs et al. 1997] JABS, T. ; TSCHÖPE, M. ; COLLING, C. ; HAHLBROCK, K. ; SCHEEL, D.: Elicitor-stimulated ion fluxes and O_2^- from the oxidative burst are essential components in triggering defense gene activation and phytoalexin synthesis in parsley. In: *Plant Biology* 94 (1997), S. 4800–4805
- [James et al. 2001] JAMES, E.K. ; OLIVARES, F.L. ; OLIVEIRA, A.L.M. d. ; REIS, F.B. d. ; SILVA, L.G. d. ; REIS, V.M.: Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. In: *Journal of Experimental Botany* 52 (2001), Nr. 357, S. 747–760
- [Jimenez Salgado et al. 1997] JIMENEZ SALGADO, T. ; FUENTES-RAMIREZ, L. E. ; TAPIA HERNANDEZ, A. ; MASCARUA ESPARZA, M. A. ; MARTINEZ ROMERO, E. ; CABALLERO MELLADO, J.: *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997), S. 3676–3683

- [Johri und Mitra 2001] JOHRI, M.M. ; MITRA, D.: Action of plant hormones. In: *Current Science* 80 (2001), Nr. 2, S. 199–205
- [Kalippke 2000] KALIPPKE, K.: *Interaktionen endophytischer Bakterien mit ihren Wirtspflanzen auf zellulärer Ebene und deren Einfluß auf die Phytopathogenantwort*, Universität Hannover, Institut für Biophysik, Diss., März 2000
- [Küpper et al. 2001] KÜPPER, F.C. ; KLOAREG, B. ; GUERN, J. ; POTIN, P.: Oligoguluronates elicit an oxidative burst in the brown algal kelp *Laminaria digitala*. 125 (2001), S. 278–291
- [Lambrecht et al. 2000] LAMBRECHT, M. ; OKON, Y. ; BROEK, A. V. ; VANDERLEYDEN, J.: Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. In: *Trends in Microbiology* 8 (2000), Nr. 7, S. 298–300
- [Lecourieux et al. 2002] LECOURIEUX, D. ; MAZARS, C. ; PAULY, N. ; RANJEVA, R. ; PUGIN, A.: Analysis and effects of cytosolic free calcium increases in response to elicitors in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. In: *The Plant Cell* 14 (2002), S. 2627–2641
- [Leemann et al. 1995] LEEMANN, M. ; PELT, J.A. V. ; OUDEN, F.M. D. ; HEINSBROEK, M. ; BAKKER, P.A.H.M. ; SCHIPPERS, B.: Induction of systemic resistance against fusarium wilt of radish by lipopolysaccharides of *Pseudomonas fluorescens*. In: *Phytopathology* 85 (1995), Nr. 9, S. 1021–1027
- [Legendre et al. 1993] LEGENDRE, L. ; YUEH, Y.G. ; CRAIN, R. ; HADDOCK, N. ; HEINSTEIN, P.F. ; LOW, P.S.: Phospholipase C activation during elicitation of the oxidative burst in cultured plant cells. In: *The Journal of Biological Chemistry* 268 (1993), Nr. 33, S. 24559–24563
- [Li et al. 2001] LI, H.-P. ; FISCHER, R. ; LIAO, Y.-C.: Molecular evidence for induction of *phenylalanine ammonia-lyase* during *Puccinia graminis* infection and elicitation in wheat. 23 (2001), S. 286–291
- [Logemann et al. 1995] LOGEMANN, E. ; PARNISKE, M. ; HAHLBROCK, K.: Modes of expression and common structural features of the complete *phenylalanine ammonia-lyase* gene family in parsley. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92 (1995), S. 5905–5909
- [Lottspeich und Zorbass 1998] LOTTSPREICH, F. ; ZORBAS, H. ; LOTTSPREICH, F. (Hrsg.) ; ZORBAS, H. (Hrsg.): *Bioanalytik*. Spektrum, Akademischer Verlag, 1998

- [Low und Dwyer 1994] LOW, P. S. ; DWYER, S. C.: Comparison of the oxidative burst signaling pathways of plants and human neutrophils. In: AL., M. J. D. (Hrsg.): *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions* Bd. 3, Kluwer Academic Publishers, 1994, S. 361–369
- [Mahady et al. 1998] MAHADY, G.B. ; LIU, C. ; BEECHER, C.W.W.: Involvement of protein kinase and G Proteins in the signal transduction of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. In: *Phytochemistry* 48 (1998), Nr. 1, S. 93–102
- [Manulis et al. 1998] MANULIS, S. ; HAVIV-CHESNER, A. ; BRANDL, M.T. ; LINDOW, S.E. ; BARASH, I.: Differential involvement of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in pathogenicity and epiphytic fitness of *Erwinia herbicola* pv. *gypsophylae*. In: *Mol.Plant-Microbe Interact.* 11 (1998), Nr. 7, S. 634–642
- [Martinez Noel et al. 2001] MARTINEZ NOEL, G.M.A. ; MADRID, E.A. ; BOTTINI, R. ; LAMATINA, L.: Indole acetic acid attenuates disease severity in potato-*Phytophthora infestans* interaction and inhibits the pathogen growth in vitro. In: *Plant. Physiol. Biochem.* 39 (2001), S. 815–823
- [Martins Chaves et al. 2002] MARTINS CHAVES, M. ; PRATES RODRIGUES, A.L. ; REIS, A. Pereira d. ; GERZSTEIN, N.C. ; NOGUEIRA-MACHADO, J.A.: Correlation between NADPH oxidase and protein kinase C in the ROS production by human granulocytes related to age. In: *Gerontology* 48 (2002), S. 354–359
- [Mathieu et al. 1996] MATHIEU, Y. ; LAPOUS, D. ; THOMINE, S. ; LAURIÉRE, C. ; GUERN, J.: Cytoplasmic acidification as an early phosphorylation-dependent response of tobacco cells to elicitors. In: *Planta* 199 (1996), S. 416–424
- [Meyer et al. 2001] MEYER ; A.PÜHLER ; K.NIEHAUS: The lipopolysaccharides of the phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* induce an oxidative burst reaction in cell cultures of *Nicotiana tabacum*. In: *Planta* 213 (2001), S. 214–222
- [Millner und Causier 1996] MILLNER, P. A. ; CAUSIER, B. E.: G-protein coupled receptors in plant cells. In: *Journal of Experimental Botany* 47 (1996), Nr. 301, S. 983–992
- [Mithöfer et al. 1997] MITHÖFER, A. ; DAXBERGER, A. ; FROMHOLD-TREU, D. ; EBEL, J.: Involvement of an NAD(P)H Oxidase in the Elicitor-Inducible Oxidative Burst of Soybean. In: *Phytochemistry* 45 (1997), Nr. 6, S. 1101–1107

- [Munnik et al. 1998] MUNNIK, T. ; IRVINE, R.F. ; A., Musgrave: Phospholipid signalling in plants. In: *Biochemica et Biophysica Acta* 1389 (1998), S. 222–272
- [Murashige und Skoog 1962] MURASHIGE, T. ; SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. In: *Plant Physiol.* 15 (1962), S. 473–497
- [Newman et al. 1997] NEWMAN, M.-A. ; DANIELS, M.J. ; DOW, J.M.: The activity of lipid A and core components of bacterial lipopolysaccharides in the prevention of the hypersensitive response in pepper. In: *Mol.Plant-Microbe Interact.* 10 (1997), Nr. 7, S. 926–928
- [Niehaus et al. 1998] NIEHAUS, K. ; ALBUS, U. ; BAIER, R. ; SCHIENE, K. ; SCHRÖDER, S. ; PÜHLER, A.: Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defence System by *Rhizobium meliloti* Oligosaccharides. In: ELMERICH, C. (Hrsg.) ; KONDOROSKI, A. (Hrsg.) ; NEWTON, W. E. (Hrsg.): *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*, Kluwer Academic Publishers, 1998, S. 225–226
- [Niehaus et al. 1993] NIEHAUS, K. ; KAPP, D. ; PÜHLER, A.: Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. In: *Planta* 190 (1993), S. 415–425
- [Nürnberger et al. 1994] NÜRNBERGER, T. ; NENNSTIEL, D. ; JABS, T. ; SACKS, W.R. ; HAHLBROCK, K. ; SCHEEL, D.: High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. In: *Cell* 78 (1994), S. 449–460
- [Pachten und Barz 1999] PACHTEN, A. ; BARZ, W.: Elicitor-stimulated oxidative burst and extracellular pH changes in protoplast suspensions prepared from cultured chickpea (*Cicer arietinum* L.) cells. 155 (1999), S. 795–797
- [Park et al. 1998] PARK, H.-J. ; DOKE, N. ; MIURA, Y. ; KAWAKITA, K. ; NORITAKE, T. ; KOMATSUBARA, H.: Induction of a sub-systemic oxidative burst by elicitor-stimulated local oxidative burst in potato plant tissues: a possible systemic signaling in systemic acquired resistance. In: *Plant science* 138 (1998), S. 197–208
- [Patriquin et al. 1983] PATRIQUIN, D.G. ; DÖBEREINER, J. ; JAIN, D.K.: Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. In: *Can. J. Microbiol.* 29 (1983), S. 900–915
- [Paula et al. 1992] PAULA, M.A. ; S., Urquiaga ; SIQUEIRA, J.O. ; DÖBEREINER, J.: Synergistic effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and diazotrophic bacteria on nutrition and growth of sweet potato *Ipomoea batatas*. In: *Biol. Fertil. Soils* 13 (1992), S. 1–4

- [Pereira et al. 1988] PEREIRA, J.A.R. ; CAVALCANTE, V.A. ; BALDANI, J.I. ; DÖBEREINER, J. ; KERSTERS, K.: Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. In: *Plant Soil* 110 (1988), S. 269–274
- [Price et al. 1994] PRICE, A. H. ; TAYLOR, A. ; RIPLEY, S. J. ; GRIFFITHS, A. ; TREWAVAS, A. J. ; KNIGHT, M. R.: Oxidative signals in Tobacco Increase Cytosolic Calcium. In: *The Plant Cell* 6 (1994), S. 1301–1310
- [Rajasekhar et al. 1999a] RAJASEKHAR, V. K. ; LAMB, C. ; DIXON, R. A.: Early events in the signal pathway for the oxidative burst in Soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. In: *Plant Physiology* 120 (1999), S. 1137–1146
- [Rajasekhar et al. 1999b] RAJASEKHAR, V.K. ; LAMB, C. ; DIXON, R.A.: Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*. In: *Plant Physiology* 120 (1999), S. 1137–1146
- [Recourt et al. 1992] RECOURT, K. ; TUNEN, A.J. van ; MUR, L.A. ; BRUSSEL, A.A. van ; LUGTENBERG, B.J. ; KIJNE, J.W.: Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. In: *Plant Mol. Biol.* 19 (1992), Nr. 3, S. 411–420
- [Reddy 2001] REDDY, A.S.N.: Calcium: Silver bullet in signaling. In: *Plant Sci.* 160 (2001), S. 381–404
- [Reinhold-Hurek et al. 1993] REINHOLD-HUREK, B. ; HUREK, T. ; GILLIS, M. ; HOSTE, B. ; VANCANNEYT, M. ; KERSTERS, K. ; LEY, J. de: *Azoarcus* gen. nov., nitrogen-fixing Proteobacteria associated with roots of kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth), and description of two species, *Azoarcus indigenus* sp. nov. and *Azoarcus communis* sp. nov. In: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43 (1993), S. 574–584
- [Richter 1996] RICHTER, G.: *Biochemie der Pflanzen*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1996
- [Robinette und Matthyse 1990] ROBINETTE, D. ; MATTHYSSE, A.G.: Inhibition by *Agrobacterium tumefaciens* and *Pseudomonas savastanoi* of development of the hypersensitive response elicited by *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. In: *Journal of Bacteriology* 172 (1990), Nr. 10, S. 5742–5749
- [Romeis et al. 2000] ROMEIS, T. ; P. PIEDRAS ; JONES, J.D.G.: Resistance gene-dependent activation of a calcium-dependent protein kinase in the plant defense response. In: *The Plant Cell* 12 (2000), S. 803–815

- [Roos et al. 1998] ROOS, W. ; EVERS, S. ; HIEKE, M. ; M.TSCHÖPE ; SCHUMANN, B.: Shifts of intracellular pH distribution as a part of the signal mechanism leading to the elicitation of benzophenanthridine alkaloids. In: *Plant Physiology* 118 (1998), S. 349–364
- [Santos et al. 2001] SANTOS, R. ; HEROUART, D. ; SIGAUD, S. ; TOUATI, D. ; PUPPO, A.: Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. In: *Mol.Plant-Microbe Interact.* 14 (2001), Nr. 1, S. 86–89
- [Schulze-Stanke 2003] SCHULZE-STANKE, S.: *Molekulare Grundlagen der Pflanzen-Mikroorganismus-Interaktion am Beispiel der Assoziation mit Azospirillum brasilense*, Universität Hannover, Diss., 2003
- [Scott und Allen 1999] SCOTT, A.C. ; ALLEN, N.S.: Changes in cytosolic pH within Arabidopsis root columella cells play a key role in the early signaling pathway for root gravitropism. In: *Plant Physiology* 121 (1999), S. 1291–1298
- [Senda et al. 1998] SENDA, K. ; DOKE, N. ; KAWAKITA, K.: Effect of Mastoparan on Phospholipase A–2 Activity in Potato Tubers Treated with Fungal Elicitor. In: *Plant Cell Physiol.* 39 (1998), Nr. 10, S. 1080–1086
- [Somssich und Hahlbrock 1998] SOMSSICH, I.E. ; HAHLBROCK, K.: Pathogen defence in plants - a paradigm of biological complexity. In: *Trends in Plant Science* 3 (1998), Nr. 3, S. 86–90
- [Spiro et al. 2002] SPIRO, m.D. ; BOWERS, J.F. ; COSGROVE, D.J.: A comparison of oligogalacturonide- and auxin-induced extracellular alkalization and growth response in roots of intact cucumber seedlings. In: *Plant.Physiol.* 130 (2002), S. 895–903
- [Stephan et al. 1991] STEPHAN, M. P. ; OLIVEIRA, M. ; TEIXEIRA, K.R.S. ; MARTINEZ-DRETS, G. ; DÖBEREINER, J.: Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter diazotrophicus*. In: *FEMS Microbiol. Lett* 77 (1991), S. 70–72
- [Stone und Walker 1995] STONE, J.M. ; WALKER, J.C.: Plant protein kinase families and signal transduction. 108 (1995), S. 451–457
- [Swings 1992] Kap. The genera *Acetobacter* and *Gluconobacter* In: SWINGS, J.: *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications.* Bd. 3. 2nd Ed. Springer-Verlag, New York, 1992, S. 2268–2286
- [Tanaka et al. 1989] TANAKA, Y. ; MATSUOKA, M. ; YAMANO, N. ; OHASHI, Y. ; KANOMURAKAMI, Y. ; OZEKI, Y.: Structure and characterisation of a cDNA clone for phenylalanine ammonia-lyase from cut-injured roots of sweet potato. 90 (1989), S. 1403–1407

- [Taylor und Low 1997] TAYLOR, A.T. S. ; LOW, P.S.: Phospholipase D involvement in the plant oxidative burst. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237 (1997), S. 10–15
- [Taylor et al. 2001] TAYLOR, A.T.S. ; KIM, J. ; LOW, P.S.: Involvement of mitogen-activated protein kinase activation in the signal-transduction pathways of the soya bean oxidative burst. 355 (2001), S. 795–803
- [Tenhaken et al. 1995] TENHAKEN, R. ; LEVINE, A. ; BRISSON, L. F. ; DIXON, R. A. ; LAMB, C.: Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (1995), S. 4158–4163
- [Tenhaken und Rübél 1998] TENHAKEN, R. ; RÜBEL, C.: Cloning of putative subunits of the soybean plasma membrane NADPH oxidase involved in the oxidative burst by antibody expression screening. In: *Protoplasma* 205 (1998), S. 21–28
- [Trewavas und Malhó 1998] TREWAVAS, A.J. ; MALHÓ, R.: Ca²⁺ signalling in plant cells: the big network! In: *Current Opinion in Plant Biology* 1 (1998), S. 428–433
- [Urquiaga et al. 1989] URQUIAGA, S. ; BOTTEON, P.B.L. ; BODDEY, R.M.: Selection of sugar cane cultivars for associated biological nitrogen fixation using ¹⁵N-labelled soil. In: *Plant and Soil* 110 (1989), S. 311–319
- [Urquiaga et al. 1992] URQUIAGA, S. ; CRUZ, K.H.S. ; BODDEY, R.M.: Contribution of nitrogen fixation to sugar cane: Nitrogen-15 and nitrogen-balance estimates. In: *Soil Science Society of America Journal* 56 (1992), S. 105–114
- [Vande Broek et al. 1996] VANDE BROEK, A. ; KEIJERS, V. ; VANDERLEYDEN, J.: Effect of oxygen on the free-living nitrogen fixation activity and expression of the *Azospirillum brasilense NifH* gene in various plant-associated diazotrophs. In: *Symbiosis* 21 (1996), S. 25–40
- [Vera-Estrella et al. 1994] VERA-ESTRELLA, R. ; HIGGINS, V.J. ; BLUMWALD, E.: Plant defense response to fungal pathogens; II. G-protein-mediated changes in host plasma membrane redox reactions. In: *Plant Physiology* 106 (1994), S. 97–102
- [Viehweger et al. 2002] VIEHWEGER, K. ; DORDSCHBAL, B. ; ROOS, W.: Elicitor-Activated Phospholipase A-2 Generates Lysophosphatidylcholines That Mobilize the Vacuolar H⁺ Pool for pH Signaling via the Activation of Na⁺-Dependent Proton Fluxes. In: *The Plant Cell* 14 (2002), July, S. 1509–1525

- [Volotovski et al. 1998a] VOLOTOVSKI, I. D. ; SOKOLOVSKY, S. G. ; MOLCHAN, O. V. ; KNIGHT, M. R.: Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in Tobacco protoplasts. In: *Plant. Physiol.* 117 (1998), S. 1023–1030
- [Volotovski et al. 1998b] VOLOTOVSKI, I.D. ; SOKOLOVSKY, S.G. ; MOLCHAN, O.V. ; KNIGHT, M.R.: Second messengers mediate increases in cytosolic calcium in tobacco protoplasts. 117 (1998), S. 1023–1030
- [Wojtaszek 1997] WOJTASZEK, P.: Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. In: *Biochem. J.* 322 (1997), S. 681–692
- [Wu et al. 1997] WU, G. ; SHORTT, B.J. ; LAWRENCE, E.B. ; LEÓN, J. ; FITZSIMMONS, K.C. ; LEVINE, E.B. ; RASKIN, I. ; SHAH, D.M.: Activation of host defense mechanisms by elevated production of H₂O₂ in transgenic plants. 115 (1997), S. 427–435
- [Wullings et al. 1998] WULLINGS, B.A. ; VAN BEUNINGEN, A.R. ; JANSE, J.D. ; AKKERMANS, A.D.L.: Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. In: *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998), Nr. 11, S. 4546–4554
- [Xing und Jordan 2000] XING, T. ; JORDAN, M.: Genetic engineering of plant signal transduction - review. In: *Plant Molecular Biology Reporter* 18 (2000), S. 309–318
- [Xing et al. 2001] XING, T. ; WANG, X.J. ; MALIK, K. ; MIKI, B.L.: Ectopic expression of an Arabidopsis calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplast. In: *Mol. Plant Microbe Interact.* 14 (2001), Nr. 10, S. 1261–1264
- [Yahraus et al. 1995] YAHRAUS, T. ; CHANDRA, S. ; LEGRENDE, L. ; LOW, P. S.: Evidence for a Mechanically Induced Oxidative Burst. In: *Plant Physiol.* 109 (1995), S. 1259–1266
- [Yang und Poovaiah 2002] YANG, T. ; POOVAIAH, B.W.: Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 99 (2002), Nr. 6, S. 4097–4102
- [Zimmermann et al. 1999] ZIMMERMANN, S. ; EHRHARDT, T. ; PLESCH, G. ; MÜLLER-RÖBER, B.: Ion channel in plant signaling. 55 (1999), S. 183–203
- [Zimmermann et al. 1997a] ZIMMERMANN, S. ; NÜRNBERGER, T. ; FRACHISSE, J.-M. ; WIRTZ, W. ; GUERN, J. ; HEDRICH, R. ; SCHEEL, D.: Receptor-mediated activation of a plant

Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997), S. 2751–2755

[Zimmermann et al. 1997b] ZIMMERMANN, S. ; NÜRNBERGER, T. ; FRACHISSE, J-M. ; WY-
NANT, I. ; GUREVITZ, M. ; HEIN, F. ; SCHEEL, D.: Receptor-mediated activation of a
plant Ca²⁺-permeable ion channel involved in pathogen defense. In: *Plant Biology* 94
(1997), S. 2751–2755

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Verwendete Organismen | 16 |
| 2.2 | Kultivierungsparameter in der Klimakammer | 21 |
| 2.3 | LGI-P-Medium (flüssig) zu Kultivierung von <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> . | 21 |
| 2.4 | NA-Nähragarplatten zur Sterilitätsprüfung der Kalluszellkulturen | 22 |
| 2.5 | BG-Medium zur Kultivierung von <i>Ralstonia solanacearum</i> | 22 |
| 2.6 | Phosphat-gepufferte-Saline (PBS) | 22 |
| 2.7 | MS-Medium zur Kultivierung von <i>Ipomoea batatas</i> , modifiziert nach Murashige und Skoog [Murashige und Skoog 1962] | 23 |
| 2.8 | Verwendete pharmakologische Agenzien | 34 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|--|----|
| 1.1 | Signaltransduktions-Schema | 14 |
| 2.1 | Messkammer für Fluoreszenzmessungen | 28 |
| 3.1 | Abhängigkeit des „oxidative burst“ von der Elicitorkonzentration | 36 |
| 3.2 | Anionenkanal-Blocker DIDS | 38 |
| 3.3 | Kaliumionenkanal-Blocker TEA ⁺ und Quinine | 40 |
| 3.4 | Chemilumineszenz in Abhängigkeit von EGTA und LaCl ₃ | 41 |
| 3.5 | Chemilumineszenz in Abhängigkeit von 2-APB | 43 |
| 3.6 | Chemilumineszenz in Abhängigkeit von TFP | 44 |
| 3.7 | PKC-Inhibitor CalphostinC | 46 |
| 3.8 | PKC-Aktivator OAG | 47 |
| 3.9 | Ser/Threo-Kinase Inhibitor K-252a | 48 |
| 3.10 | PLA ₂ -Inhibitor | 50 |
| 3.11 | unspezifische Wirkung des PLC-Inhibitors U-73122 | 51 |
| 3.12 | PLC-Inhibitor Neomycin-Sulfat | 52 |
| 3.13 | Alkalisierungsmessung mit Invertase. | 53 |

| | | |
|------|---|----|
| 3.14 | Einfluss von DIDS auf die Invertase-induzierte externe Alkalisierung | 54 |
| 3.15 | G-Protein-Aktivator Mastoparan | 55 |
| 3.16 | PLA ₂ -Inhibitor HELSS | 57 |
| 3.17 | Bakterien induzierte externe Alkalisierung | 58 |
| 3.18 | HPLC-Analysen der IAA-Konzentration in Zellkulturen von <i>Ipomoea batatas</i> und <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> | 60 |
| 3.19 | Einfluss von IAA auf die Invertase-induzierte externe Alkalisierung | 61 |
| 3.20 | Phytopathogen-induzierter „oxidative burst“ | 62 |
| 3.21 | Phytopathogen-induzierter „oxidative burst“ bei Inhibition der PLA ₂ und CDPK | 63 |
| 3.22 | Vergleich - <i>Ralstonia solanacearum</i> bzw. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> in- duzierter „oxidative burst“ | 64 |
| 3.23 | Vergleich stammspezifische Induktion des „oxidative burst“ durch <i>G. diazotrophicus</i> | 65 |
| 3.24 | PAL-Aktivität in Süßkartoffelzellen nach Elicitierung | 67 |
| 3.25 | Ammonium-Vorpuls-Methode | 69 |
| 3.26 | HCl-induzierte Azidose von Süßkartoffelzellen | 69 |
| 3.27 | Hefeextrakt-Elicitor- bzw. Invertase-induzierte Azidifizierung des Cytosols von Süßkartoffelzellen | 71 |
| 3.28 | <i>Ralstonia solanacearum</i> -induzierte Azidose von Süßkartoffelzellen mit Falschfarben- Darstellung | 73 |
| 3.29 | <i>Ralstonia solanacearum</i> -induzierte Azidose von Süßkartoffelzellen | 74 |
| 3.30 | Cytosolische pH-Wertänderung bei Kontakt mit <i>G. diazotrophicus</i> | 75 |
| 3.31 | Vergleichende Darstellung der cytosolischen pH-Wertänderungen bei Kontakt mit <i>R. solanacearum</i> , <i>G. diazotrophicus</i> sowie Invertase. | 76 |
| 4.1 | Postulierter Signaltransduktionsweg des „oxidative burst“ | 94 |

Anhang

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Hannover, Mai 2003