

**Molekulare Grundlagen von
Verfärbungsprozessen im Holz der Robinie
(*Robinia pseudoacacia* L.):
Genexpressionsstudien an Schlüsselgenen der
Flavonoidsynthese**

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

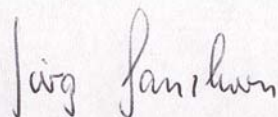
der Fakultät für Mathematik, Informatik und
Naturwissenschaften der Universität Hamburg

vorgelegt von
Henrik Lange
aus Donnern im Kreis Cuxhaven

Hamburg 2009

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Frau Professor Dr. E. MAGEL
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Prlv.-Doz. Dr. M. FLADUNG
Tag der Disputation: 29. Oktober 2009

Hamburg, den 15. Oktober 2009



Professor Dr. Jörg Ganzhorn
Leiter des Departments Biologie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Wissensstand	10
1.1.1 Biologische Grundlagen der Farbkernbildung	10
1.1.1.1 Jahresrhythmik der Kernholzbildung und cytologische Veränderungen des Xylemparenchyms in der Robinie	11
1.1.1.2 Enzymaktivitäten	11
1.1.1.3 Genexpressionsmuster	12
1.1.2 Holzverfärbungen nach Verletzung und Pathogenbefall	13
1.1.3 Regulation von PAL- und CHS-Aktivität in Pflanzen	14
1.1.4 Die Robinie als Modellbaum für Kernholzbildung und Pathogen-abwehr	16
1.2 Ziele der Arbeit	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	19
2.1.1 Geräte	19
2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.2 Untersuchungsmaterial	22
2.2.1 Stammquerschnitte aus gesunden Robinien	22
2.2.2 Verwundung und Pilzinfektion von Robinienstämmen	24
2.3 Probenaufarbeitung	26
2.3.1 DNA-Isolierung	26
2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA und DNase-Verdau	26
2.3.3 Reverse Transkription	27
2.4 Identifizierung von PAL- und CHS-Gensequenzen	29
2.4.1 Datenbankrecherche, Sequenzalignments, Primerdesign	29
2.4.2 PCR mit degenerierten Primern	30
2.4.3 Klonierungen	32
2.4.3.1 Ligation von Vektor und PCR-Produkt	32
2.4.3.2 Transformation von kompetenten <i>E.coli</i>	32
2.4.4 Selektion von rekombinanten Klonen	33
2.4.4.1 Blau-Weiß-Selektion	33
2.4.4.2 M13-PCR	34
2.4.4.3 Restriktionsanalysen	35
2.4.5 Plasmidisolierung	35
2.4.6 Sequenzierung	36
2.4.7 Bestimmung der 3'- und 5'-untranslatierten Regionen	36
2.4.8 Erweiterung der codierenden Regionen in 5'- und 3'-Richtung	39
2.4.9 Assemblierung der Teilfragmente, Sequenzbearbeitungen	40
2.5 Genexpressionsanalysen	41
2.5.1 Konstruktion genspezifischer Primer	41
2.5.2 Semiquantitative RT-PCR	42
2.5.2.1 Normalisierung der cDNA-Proben	42
2.5.2.2 Durchführung der semiquantitativen RT-PCR	44
2.5.2.3 Auswertung semiquantitative RT-PCR	46
2.5.3 Real-Time PCR	47
2.5.3.1 Versuchsdesign und Probenaufteilung	47
2.5.3.2 Durchführung der Real-Time PCR	48
2.5.3.3 Kalibrierung der Einzelexperimente	51
2.5.3.4 Ermittlung der Amplifikationseffizienzen	52
2.5.3.5 Berechnung der relativen Expression	53
3. Ergebnisse	55
3.1 Identifizierung von PAL- und CHS-Genen	55

3.1.1 Klonierungen.....	55
3.1.2 Die <i>RpPAL</i> -Genfragmente.....	58
3.1.3 Die <i>RpCHS</i> -Genfragmente.....	64
3.2 Konstruktion genspezifischer Primer.....	69
3.2.1 Genspezifische Primer für die semiquantitative RT-PCR.....	69
3.2.2 Genspezifische Primer für die Real-Time PCR.....	74
3.3 Extraktion von Gesamt-RNA.....	77
3.4 Genexpressionsanalysen.....	80
3.4.1 <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Expression im Xylem während der Vegetationsperiode.....	80
3.4.1.1 Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR.....	80
3.4.1.2 Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR.....	84
3.4.2 <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Expression in pilzinfiziertem Splintholz.....	93
3.4.2.1 Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR.....	93
3.4.2.2 Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR.....	96
4. Diskussion.....	101
4.1 Identifizierung von <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Genen der Robinie.....	101
4.1.1 Verwendung degenerierter Primer für die Genidentifizierung.....	101
4.1.2 Die <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Genfamilien und deren Expression im Xylem.....	103
4.1.2.1 Vollständigkeit der Genfamilien.....	103
4.1.2.2 Allele Varianten.....	105
4.1.2.3 Expression der nicht analysierten <i>CHS</i> -Gene.....	106
4.1.2.4 Vergleich der <i>RpPAL</i> - und <i>RpCHS</i> -Genfragmente.....	107
4.2 Zur Methodik PCR-basierter Expressionsanalysen.....	108
4.2.1 Vergleich von semiquantitativer RT-PCR und Real-Time PCR.....	108
4.2.2 Die 18S ribosomale Untereinheit als interne Referenz.....	113
4.3 <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Expression im Xylem während der Vegetationsperiode.....	114
4.3.1 <i>PAL</i> -Expression.....	114
4.3.2 <i>CHS</i> -Expression.....	117
4.3.3 Biochemie und Saisonalität der Kernholzbildung.....	119
4.4 <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Expression nach Verwundung und Pathogenbefall des Xylems.....	121
4.4.1 <i>PAL</i> und <i>CHS</i> -Induktion durch Verwundung oder Infektion?.....	122
4.4.2 <i>PAL</i> -Expression.....	124
4.4.3 <i>CHS</i> -Expression.....	127
4.5 Biologische Bedeutung von paralleler Expression mehrerer <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Gene ..	129
4.6 Konstitutive und induzierte Verfärbungen im Xylem – Gemeinsamkeiten und Unterschiede.....	131
4.6.1 Unterschiedliche Expressionsniveaus der <i>PAL</i> - und <i>CHS</i> -Gene.....	132
4.7 Ausblick.....	134
5. Zusammenfassung.....	135
6. Literaturverzeichnis.....	137
7. Abkürzungen.....	150
8. Anhang.....	152
Danksagung.....	174
Erklärung.....	176

1. Einleitung

Verfärbungsprozesse im Holz von Laub- und Nadelbäumen sind ein allgegenwärtig zu beobachtendes Phänomen. Sie können sowohl als Teil der natürlichen Entwicklung der Sprossachse auftreten, als auch durch äußere Einflüsse induziert werden. Zur ersten Kategorie ist die Ausbildung eines Farbkerns zu zählen, der im Stammholz vieler Baumarten auftritt (reguläre oder obligate Kernholzbildung). Ab einem gewissen Alter, bzw. Entwicklungszustand und in Abhängigkeit verschiedener exogener Faktoren beginnen viele Baumarten, in den ältesten Abschnitten des Stamms farbige Substanzen (Kerninhaltsstoffe) einzulagern, gefolgt von einem kontrollierten Absterben des Parenchymgewebes in der verfärbten Zone. Die Extraktstoffe haben oft eine antimikrobielle Wirkung und verleihen dem (toten) Kernholz eine höhere Resistenz gegenüber holzerstörenden Organismen (Pilze, Bakterien, Insekten). Generell führt die Farbkernbildung zu einer Aufwertung des Holzes für den Verwender, sei es aus optischen Gründen oder aufgrund der verbesserten Eigenschaften, wie zum Beispiel eine erhöhte natürliche Dauerhaftigkeit.

Zu den Verfärbungen der zweiten Kategorie sind die Verfärbungsprozesse zu zählen, die als Reaktion auf mechanische Verletzungen des Xylems in Wundnähe und/oder nach Infektionen auftreten. Sie stellen einen Teil einer komplexen Antwort des Xylems auf die Beschädigung dar und dienen dem Zweck, das verletzte Holzgewebe vom unverletzten räumlich abzugrenzen und eine Ausbreitung von holzpathogenen Organismen durch einen Aufbau von Grenzschichten zu unterbinden (Hart und Johnson 1970). Mit dem CODIT-Modell („compartmentalization of decay in trees“) wurde eine Beschreibung dieser Abwehrmechanismen des Xylems präsentiert (Shigo und Marx 1977, Shigo 1979, Shigo 1984). Von Liese und Dujesiefken (1989) wurde dieses Modell erweitert, indem die induzierten Reaktionen des Baums auf eine Stammverletzung weniger als reine Abwehrmaßnahmen gegen Holzpathogene, sondern in erster Linie als Maßnahmen des Xylems zur Sicherung des Transpirationsstroms, insbesondere durch Verschluss der Gefäße, interpretiert wurden. Eine Eindämmung der holzerstörenden Mikroorganismen – u.a. durch den Aufbau von verfärbten Grenzschichten – ist zwar ein wichtiger Bestandteil dieser Schutzmaßnahmen, sie wird jedoch hinsichtlich der Priorität als zweitrangig, bzw. als zeitlich nachgeordnet bewertet (Liese und Dujesiefken 1989, Dujesiefken et al. 1989). Diese abgewandelte Bewertung der Kompartimentierungsprozesse fand ihren Ausdruck durch die von den Autoren vorgeschlagene Änderung der Abkürzung CODIT, bei der „D“ nicht mehr für „decay“ (Fäulnis) steht, sondern mit den Begriffen „damage“ (Beschädigung), „dysfunction“ (Funktionsstörung) und/oder „desiccation“ (Austrocknung) eine allgemeinere Bedeutung erhalten sollte. Mit der Einführung des CODIT-Prinzips, welches die Schutzreaktionen des

Baums als allumfassende Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der Funktionen als Festigungs- Leit- und Speichergewebe betrachtet und die Reaktionen des Kambiums und des Bastes einbezieht, sowie eine Einteilung der Reaktionen in vier Phasen vornimmt, erfuhr das CODIT-Modell nochmals eine Erweiterung (Dujesiefken und Liese 2006, Dujesiefken und Liese 2008).

Darüber hinaus ist auch die Bildung eines (farbigen) Falschkerns – auch als fakultative oder irreguläre Kernholzbildung bezeichnet – der zweiten Kategorie von Verfärbungsprozessen zuzurechnen, wie sie zum Beispiel bei der Rotbuche (*Fagus sylvatica*) nach Stammverletzungen häufiger auftritt.

Die qualitative und quantitative Zusammensetzung der farbgebenden Substanzen in Verfärbungszonen von Hölzern ist sehr vielfältig und hängt neben der betrachteten Baumart auch vom Verfärbungstyp (Kernholz oder Reaktionszone in der Nähe einer Verletzung, im folgenden vereinfacht als Pathogenholz bezeichnet) und von weiteren Faktoren ab (Kemp und Burden 1986, Hillis 1987 und Ref. darin). Eine strukturelle Gemeinsamkeit der farbigen Kerninhaltsstoffe ist das Vorkommen von phenolischen Verbindungen. Zu der wichtigsten und strukturell vielfältigsten Substanzklasse dieser phenolischen Verbindungen gehören die Flavonoide und ihre Derivate. Sie kommen in allen Pflanzen vor und erfüllen die unterschiedlichsten physiologischen Funktionen, vor allem als Pigmente und als Abwehrsubstanzen (Ververidis et al. 2007). Dem Kernholz der Robinie (*Robinia pseudoacacia* L., *Fabaceae*), der Modellbaumart für die vorliegende Arbeit, verleihen sie sowohl die Farbe als auch die natürliche Dauerhaftigkeit (Freudenberg und Hartmann 1953). Auch die Resistenz von Pathogenholz gegenüber Holz zerstörenden Organismen ist bei der Robinie auf den Flavonoidgehalt zurückzuführen. Bei der Robinie sind Dihydrorobinetin und Robinetin die Flavonoide mit dem höchsten Mengenanteil (Freudenberg und Hartmann 1953, Roux und Paulus 1962, IUPAC-Namen: Robinetin: 3,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)chromen-4-one; Dihydrorobinetin: 3,7-dihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl)-2,3-dihydrochromen-4-one). Zudem scheinen die für die *Fabaceae* charakteristischen Pterocarpane, ebenfalls Flavonoidderivate, für die Fäulnisresistenz verantwortlich zu sein (Hijwegen 1973).

Die Synthese der Flavonoide ist einer von vielen Stoffwechselwegen, die sich von Intermediaten des Phenylpropanstoffwechsels (PPS) ableiten (Abb. 1). Dieser ist die Basis für die Synthese zahlreicher Klassen von phenolischen Verbindungen in Pflanzen. Das Eingangs- und damit Schlüssel-Enzym des PPS ist die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL, EC 4.3.1.24), welche die Desaminierung der Aminosäure L-Phenylalanin zu Trans-Zimtsäure katalysiert. Letztere wird durch zwei weitere enzymatische Reaktionen zu Cumaroyl-CoA umgesetzt, dem Ausgangssubstrat für die Flavonoidsynthese. Das

Schlüsselenzym des Flavonoid-Syntheseweges ist die Chalkon-Synthase (CHS, EC 2.3.1.74), die die Kondensation von einem Cumaroyl-CoA aus dem PPS mit drei Malonyl-CoA zu Naringenin-Chalkon und unter Freisetzung von drei CO₂ und vier Coenzym A katalysiert. Das resultierende Naringenin-Chalkon ist das Grundgerüst aller Flavonoide.

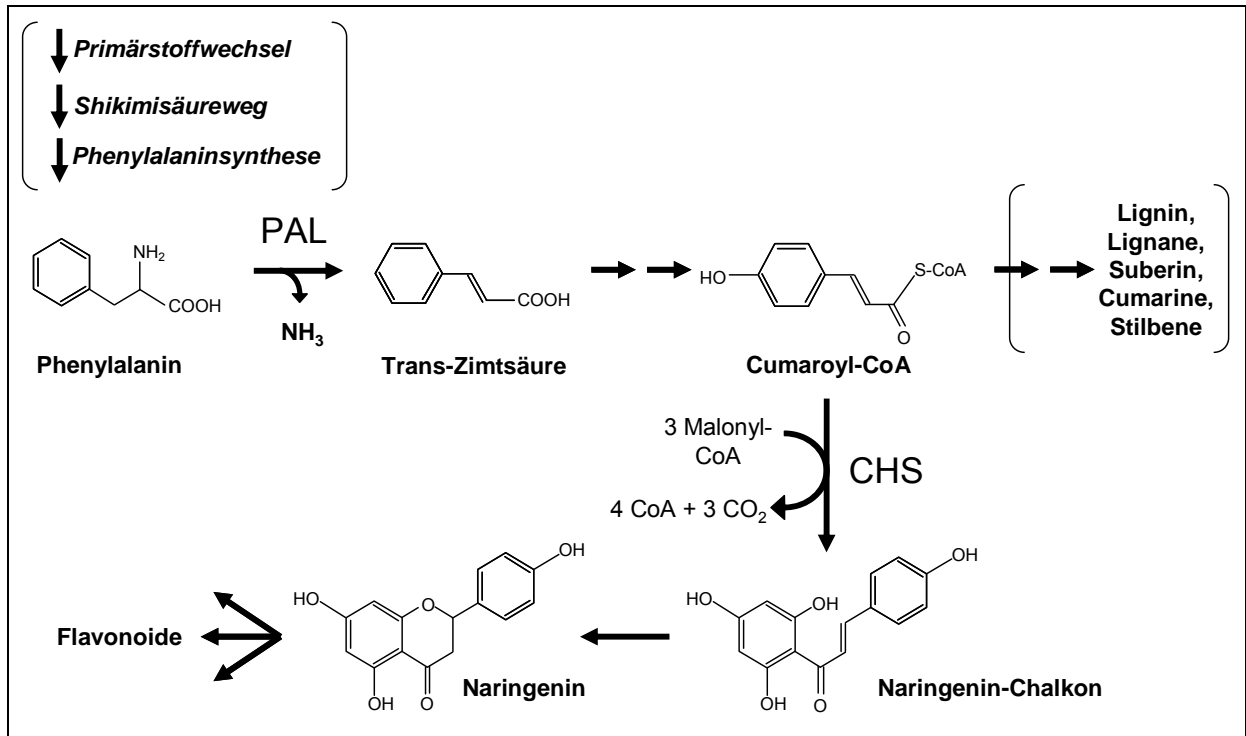


Abbildung 1 – Schematische und stark vereinfachte Übersicht des Phenylpropanstoffwechsels und der Flavonoidsynthese, ausgehend von Phenylalanin. Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) ist das einleitende Enzym des Phenylpropanstoffwechsels, die Chalcon-Synthase (CHS) leitet den Flavonoidstoffwechselweg ein.

Flavonoide spielen sowohl bei Wachstum und Entwicklung der Pflanzen als auch bei der Interaktion zwischen Pflanze und Umwelt häufig eine essentielle Rolle. Aus diesem Grund wurden PAL und CHS als Eingangsenzyme des PPS, bzw. der Flavonoidsynthese in der Vergangenheit intensiv erforscht. Vorwiegend nicht verholzende Pflanzen dienen als Studienobjekte für die Entschlüsselung der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen von PAL und CHS. Dabei war die Regulation dieser Enzyme auf Protein- und Genexpressionsebene zum einen während der normalen Pflanzenentwicklung, zum anderen als Reaktion auf biotische und abiotische Stressfaktoren von besonderem Interesse (z.B. Kuhn et al. 1984, Edwards et al. 1985, Grab et al. 1985, Lawton et al. 1987, Estabrook et al. 1991). Aufgrund der Beteiligung von PAL an der Ligninsynthese (vgl. Abb. 1) wurde das Enzym, bzw. die zugrunde liegende Genexpression auch im Zusammenhang mit der

Lignifizierung von Zellwänden untersucht (Fukuda 1996 und Ref. darin, Lin und Northcote 1990, Hertzberg et al. 2005).

In nahezu allen untersuchten Pflanzen liegen für PAL und CHS jeweils mehrere Gene im Genom vor, d.h. sie sind in Genfamilien organisiert. Endogene und exogene Faktoren kontrollieren die Expression der Mitglieder dieser Genfamilien (Claudot et al. 1999). Die *PAL*-Genfamilie ist mit zumeist 3 bis 4 Mitgliedern relativ klein (Gowri et al. 1991 und Ref. darin, Goujon et al. 2003, Logemann et al. 1995), es gibt jedoch auch Ausnahmen mit größeren *PAL*-Genfamilien (Joos und Hahlbrock 1992, Butland et al. 1998). Die *CHS*-Genfamilie umfasst meist 6 bis 8 Gene (Durbin et al. 2000 und Ref. darin). Es wird angenommen, dass sich – wie bei anderen Genfamilien auch – die einzelnen Mitglieder der *PAL*- und *CHS*-Genfamilien während der Evolution durch wiederholte Duplikationen aus einem Ursprungsgen entwickelt und dann auf bestimmte Funktionen im Stoffwechselgeschehen spezialisiert haben (Ito et al. 1997, Durbin et al. 2000). Dies führte zu einem gewebe-, entwicklungs- und reizspezifischen, differentiellen Expressionverhalten der *PAL*- und *CHS*-Gene. Darüber hinaus wird der Organisation von Genen in Genfamilien und der daraus resultierenden genetischen Redundanz eine grundlegende Bedeutung für die Entwicklung und Funktion vielzelliger Organismen zugeschrieben (z.B. Tautz 1992). Während die differentielle Expression von *PAL*- oder *CHS*-Genen in nicht verholzten Pflanzen gut untersucht ist, liegen über differentielle Expressionsmuster der *PAL*- und *CHS*-Gene während genetisch oder biotisch / abiotisch induzierten Verfärbungsprozessen im Holz von Nadel- oder Laubbäumen bisher keine Kenntnisse vor.

1.1 Wissensstand

1.1.1 Biologische Grundlagen der Farbkernbildung

Das Phänomen der obligaten Farbkernbildung im Stammholz vieler Baumarten kann als ein sekundärer Differenzierungsprozess des Xylems angesehen werden, bei dem das Splintholz seine Funktion als Leit- und Speichergewebe aufgibt und durch die Umwandlung zu Kernholz nur noch seine Festigungsfunktion beibehält. Trotz artspezifischer Unterschiede gibt es Gemeinsamkeiten hinsichtlich der biologischen Vorgänge bei der Kernholzbildung. Verantwortlich für die Bildung der Kerninhaltsstoffe ist das noch lebende Parenchymgewebe in der Splint-Kern-Übergangszone, welches *in situ* die Stärke- und Lipid-Reserven zu phenolischen Verbindungen (den Kernholzsubstanzen) umsetzt und in das umliegende Gewebe abgibt. Zudem treten Oxidations- und Polymerisierungsreaktionen der phenolischen Verbindungen auf, welche zur dunklen Verfärbung des Kernholzes beitragen (Dellus et al. 1997, Dehon et al. 2002). Begleitet wird die Synthese der Kerninhaltsstoffe durch eine

saisonal begrenzte, erhöhte physiologische Aktivität des Parenchymgewebes, die durch cytologische Veränderungen (Bosshard 1966), verstärkte Respirationsraten, gesteigerte Protein- und Vitamingehalte sowie durch Ethylenfreisetzung gekennzeichnet ist (Höll und Lenzian 1973, Ziegler 1968, Hillis 1987). Auch die Verthyllung von Gefäßen, sofern nicht schon im Splintholz erfolgt, ist ein häufig beobachtetes Merkmal der Kernholzbildung bei Laubbäumen (Frey-Wyssling und Bosshard 1959). Abgeschlossen wird die Kernholzbildung durch das kontrollierte Absterben des Parenchyms (Programmierter Zelltod, Magel et al. 2001, Spicer und Holbrook 2007).

1.1.1.1 Jahresrhythmik der Kernholzbildung und cytologische Veränderungen des Xylemparenchyms in der Robinie

Die Periode der Kernholzbildung im Jahresverlauf, d.h. das Fortschreiten der Splint-Kerngrenze im Stammquerschnitt, wurde bei der Robinie auf die Zeit zwischen Hochsommer und Spätwinter eingegrenzt (Nobuchi et al. 1984). Der schnellste Zuwachs der Kernholzzone wurde dabei in der Zeit zwischen Hochsommer und Frühherbst beobachtet, was einem zeitlichen Versatz von etwa drei Monaten nach Einsetzen der Kambialaktivität entspricht. In dieser Zeit der schnellsten Zunahme der Kernholzzone kommt es zu einer starken Ausdehnung der Splint-Kern-Übergangszone (TZ, von engl. ‚transition zone‘). In der TZ werden die farbgebenden Substanzen (Kerninhaltsstoffe) von vitalen, d.h. Zellkerne und Stärkegranula enthaltenden, Strahlparenchymzellen gebildet, was einer vorübergehenden, saisonal begrenzten Überlagerung von vitaler und verfärbter Zone gleichkommt. Zeitgleich mit der Akkumulation der Kerninhaltsstoffe (Flavonoide) die Stärkespeicher in der Verfärbungszone und dem innersten, unverfärbten Splintholz abgebaut. Metabolitmessungen (Glucose, Fructose, Stärke) im Robinienstammholz bestätigten den von Nobuchi und Mitarbeitern (1984) festgestellten, frühherbstlichen Stärkeabbau im inneren Splint und äußeren Kernholz (Magel et al. 1994). Im Herbst beginnen die Strahlparenchymzellen in der TZ abzusterben, wodurch die Umwandlung zu Kernholz abgeschlossen wird.

1.1.1.2 Enzymaktivitäten

In Übereinstimmung mit den cytologischen Veränderungen der an der Kernholzbildung beteiligten parenchymatischen Gewebe wurden gesteigerte Aktivitäten der Schlüsselenzyme des Phenylpropanstoffwechsels und der Flavonoidsynthese, PAL und CHS, in der Splint-

Kern-Übergangszone (TZ) nachgewiesen (Magel et al. 1991, Magel und Hübner 1997, Beritognolo et al. 2002). PAL-Enzymaktivität ist sowohl in der TZ über das gesamte Jahr als auch im Frühjahr im differenzierenden Xylem des Zuwachsrings nachweisbar. Letztere weist auf die Beteiligung von PAL an der Synthese von Ligninmonomeren für den Aufbau der Zellwände hin. Die höchsten Enzymaktivitäten von PAL und CHS in der TZ wurden im November gemessen, ähnlich hohe Aktivitäten der PAL im September im inneren Splint nahe der TZ. Die Aktivität der CHS hingegen ist fast ausschließlich auf die TZ beschränkt. Diese Beobachtungen lassen auf eine saisonale und gewebespezifische Regulierung der beiden Enzyme im Xylem schließen. Ähnliches gilt für Enzyme des Zuckerstoffwechsels, die durch die Mobilisierung der Speicherstärke durch Hydrolyse zu Hexose-Monomeren sowohl Kohlenstoffgerüste, als auch Stoffwechselenergie für die Extraktstoffsynthesen bereitstellen (Hauch und Magel 1998, Magel et al. 2001). Gesteigerte Aktivitäten von einer Reihe weiterer Enzyme wurden in der TZ verschiedener Nadel- und Laubbäume gemessen (Hillis 1987 und Ref. darin). In ihrer Gesamtheit sind diese Enzymaktivitäten Ausdruck für eine erhöhte Stoffwechselaktivität in der Splint-Kern-Übergangszone.

1.1.1.3 Genexpressionsmuster

Die Enzymsysteme, die die Kernholzsubstanzen synthetisieren, unterliegen einer stringenten saisonalen und gewebespezifischen Regulation. Prinzipiell ist diese Regulation auf allen Ebenen der Expression möglich, angefangen bei der Transkription bis hin zur direkten Aktivierung oder Inhibierung eines Enzyms. Im Falle von PAL und CHS wurden in mehreren Studien saisonale Änderungen der Transkriptmengen in der TZ nachgewiesen. So wurde in der TZ der Robinie mittels cDNA Microarrays eine Hochregulierung von je einem *PAL*- und einem *CHS*-Gen im Sommer, bezogen auf eine Referenz im Spätherbst, festgestellt (Yang et al. 2004). Bei der Kernholzbildung in der Schwarznuss (*Juglans nigra*) wurde eine Korrelation zwischen Flavonoid-Akkumulation und der Expression von Genen für Enzyme der Flavonoidbiosynthese, darunter die CHS, gefunden (Beritognolo et al. 2002). Für die Expression von *PAL* und anderen Genen des PPS wurde diese Korrelation nicht gefunden (Beritognolo et al. 2002). Dennoch weist die TZ über das Jahr hinweg und insbesondere im Herbst höhere *PAL*-Transkriptmengen auf als das umliegende innere Splintholz.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse zu den cytologischen und molekularen Vorgängen bei der obligaten (Farb-) Kernholzbildung weisen zusammen betrachtet auf einen fein abgestimmten, räumlich und zeitlich kontrollierten Prozess hin, dem ein komplexes Regulationsnetzwerk auf inter- und intrazellulärer Ebene zugrunde zu liegen scheint.

1.1.2 Holzverfärbungen nach Verletzung und Pathogenbefall

Bäume sind nicht in der Lage, eine ‚Heilung‘ von verletztem/zerstörtem Holzgewebe im Sinne eines Ersetzens oder Reparierens des zerstörten Gewebes durchzuführen (Shigo 1979). Die allgegenwärtige Präsenz von holzpathogenen Organismen, wie Pilzen, Bakterien und Insekten, die nach mechanischer Verletzung des Xylems unweigerlich eine Infektion desselben nach sich zieht, erfordert jedoch effektive Abwehrmechanismen, um langfristig die Funktion des Holzkörpers als Festigungs-, Leit- und Speichergewebe zu gewährleisten. Bäume haben eine Abwehrstrategie entwickelt, die in einer Abschottung der Verwundungsstelle nach innen zum Schutz der intakten Splintbereiche und einer Überwallung der Wunde durch die hinzukommenden Jahresringe besteht (Abschottung nach außen). Das CODIT-Modell nach Shigo (1984), das von Dujesiefken und Liese (2006, 2008) erweitert wurde, beschreibt diese Abschottungsstrategie umfassend. Nach diesem Modell leistet das Holz aufgrund seiner Anatomie den eindringenden Organismen je nach Ausbreitungsrichtung einen unterschiedlich starken Widerstand, was sich im CODIT-Modell in der Definition von vier modellhaften „Wänden“ widerspiegelt, die nach Pathogenbefall um die Befallsstelle herum gebildet werden. Je nachdem, ob die Holzpathogene in axialer, radialer oder tangentialer Richtung ins Holz vordringen, unterbinden die Wände dieses Vordringen mit unterschiedlicher Effektivität. Durch die Präsenz der Pathogene werden verschiedene Abwehrreaktionen induziert. Suberinisierung von axialem und radialem Parenchymgewebe, Erhöhung der Holzfeuchte zur Schaffung anaerober Bedingungen, Akkumulation von freien Radikalen, Bildung von traumatischen Harzkanälen sowie Verthyllung von Gefäßen in Wundnähe sind häufig beobachtete Reaktionen (Biggs 1987, Boddy und Rayner 1983, Pearce et al. 1997, Schmitt und Liese 1993, Schmitt und Liese 1994, Krokene et al. 2003, Nagy et al. 2006). Die Ausbildung von Verfärbungszonen im wundnahen Splintholz – auch als Reaktionszone bezeichnet (Pearce 2000) – durch Akkumulation zumeist farbiger, und häufig antimikrobiell wirkender Substanzen (Phytoalexine) gehört ebenfalls zu den Abschottungsreaktionen. Verfärbte Reaktionszonen werden in allen Richtungen um die Verwundungsstelle mit unterschiedlicher räumlicher Ausdehnung gebildet. Durch sie wird neben der mechanischen Barriere, die das Holz aufgrund seiner Festigkeit für holzpathogene Organismen darstellt, zusätzlich eine chemische Barriere aufgebaut. Die dadurch erhöhte Fäulnisresistenz des verfärbten Splintholzes wurde von Hart und Johnson (1970) bei drei Baumarten, darunter die Robinie, nachgewiesen. Neben der Funktion als chemische Barriere wird auch eine Funktion als Versiegelung gegenüber Wasserverlust und Sauerstoffeintritt diskutiert, durch die die Wachstumsbedingungen der holzpathogenen Organismen verschlechtert werden (Pearce 1996 und Ref. darin). Wird die verfärbte Reaktionszone von

den Fäulniserregern durchbrochen, können sich weitere Reaktionszonen bilden; die Interaktion zwischen Pathogen und Splintholz hat also einen dynamischen Charakter (Pearce 2000 und Ref. darin).

Artspezifische Unterschiede in der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung der Verfärbungen – einen Überblick über die strukturelle Vielfalt der Phytoalexine geben Kemp und Burden (1986) – bedingen jedoch auch artspezifische Unterschiede in der Resistenz der Reaktionszone gegenüber Fäulnis. Darüber hinaus treten auch individuen-spezifische Unterschiede in der Abschottungseffizienz auf, was auf einen Zusammenhang zwischen der genetischen „Ausstattung“ eines Baumes und seiner Widerstandskraft gegenüber Verwundungen und Infektionen des Xylems schließen lässt (Shigo et al. 1977).

Auch der Zeitpunkt einer Verwundung hat einen Einfluss auf die Effizienz der Wundabschottung: Wunden zur Zeit der Wachstumsperiode werden effizienter kompartimentiert als solche während der Winterruhe (Dujesiefken et al. 2005).

Für die Ausbildung von induzierten Holzverfärbungen nach Verwundung ist eine komplexe Abfolge von molekularen Vorgängen der Reizwahrnehmung und -weiterleitung, sowie Auslösung einer adäquaten Reizantwort durch die Aktivierung spezifischer Genexpression im betroffenen Gewebe notwendig. Dazu gehört die Aktivierung des PPS und – sofern Flavonoide akkumuliert werden – auch die der Flavonoidsynthese. Es kann angenommen werden, dass in der sich bildenden Reaktionszone erhöhten Transkriptmengen von einem oder mehreren *PAL*- und *CHS*-Genen nachzuweisen sind. Expressionsanalysen dieser beiden Schlüsselgene während der Wundreaktionen des Holzes wurden jedoch bislang nicht durchgeführt. Insbesondere über eine eventuelle differentielle Expression einzelner Mitglieder der *PAL*- und *CHS*-Genfamilien ist in diesem Zusammenhang noch nichts bekannt.

1.1.3 Regulation von *PAL*- und *CHS*-Aktivität in Pflanzen

Als Schlüsselenzyme für die Synthese phenolischer Sekundärmetabolite in Pflanzen haben *PAL* und *CHS* hinsichtlich ihrer Regulation im Zusammenhang mit Pflanzenwachstum und -entwicklung, sowie im Rahmen von Stressreaktionen in den vergangenen Jahrzehnten ein großes Interesse auf sich gezogen. Es wurde häufig gezeigt, dass beide Enzyme transkriptionell, also durch die Zu- oder Abnahme von Transkriptmengen reguliert werden. Dieser Mechanismus wurde sowohl bei entwicklungs- und gewebespezifischer als auch bei reizinduzierter Expression der beiden Gene gefunden (z.B. Edwards et al. 1985, Grab et al. 1985, Lawton und Lamb 1987, Wingate et al. 1988, Liang et al. 1989, Joos und Hahlbrock 1992, Ito et al. 1997, Kumar und Ellis 2001). Die Einwirkung von Umweltreizen (UV-Licht, Verwundung, Infektion, Wurzelknöllchen-symbionten, etc.) führen zur (meist transienten)

Akkumulation von *PAL*- und *CHS*-Transkripten in den betroffenen Pflanzenorganen. Damit verbunden ist die Produktion der entsprechenden (Stress-) Metabolite.

Neben der transkriptionellen Regulation von *PAL* wurden weitere Regulationsmechanismen gefunden: Durch (posttranslationale) Phosphorylierung wird das Enzym deaktiviert und durch Dephosphorylierung aktiviert (Bolwell 1992). Sowohl das phosphorylierende Enzym *PAL*-Kinase, als auch die über Artgrenzen hinweg hoch konservierte Phosphorylierungsstelle des *PAL*-Proteins ist bekannt. Beides weist auf einen universellen Regulationsmechanismus in höheren Pflanzen hin (Allwood et al. 1999). Dass dieser Mechanismus vermutlich auch im Stamm der Robinie vorkommt, wird durch parallele Messungen von *PAL*-Proteingehalten und -Enzymaktivitäten im Splintholz gestützt: Trotz ähnlich hoher Gehalte an *PAL*-Protein in allen Splintbereichen wurden lediglich im differenzierenden Xylem und in der TZ hohe *PAL*-Aktivitäten, in den mittleren Splintholzbereichen dagegen niedrige oder keine *PAL*-Aktivität gemessen (Magel und Hübner 1997).

Für die Chalkonsynthese wurden bislang keine posttranslationalen Regulationsmechanismen gefunden, es wurde jedoch in der Sojabohne (*Glycine max*) ein Homologie-abhängiger Genabschaltungsmechanismus (homology dependent gene silencing, HDGS) entdeckt, der auf posttranskriptioneller Ebene wirksam ist und auf der Synthese kleiner interferierender RNA-Moleküle (small interfering RNA = siRNA) beruht. Als genetische Grundlage für diesen HDGS-Mechanismus wurde das Vorkommen von invertierten Wiederholungen (inverted repeats) von *CHS*-Genclustern, bestehend aus drei *CHS*-Genen, identifiziert, die im Genom in räumlicher Nähe zueinander angeordnet sind (Todd und Vodkin 1996, Senda et al. 2004, Tuteja et al. 2004). Darüber hinaus gibt es einen Hinweis auf translationale Kontrolle der *CHS*-Expression durch ein sogenanntes intensivier-Gen, dessen Funktionsweise jedoch noch nicht aufgeklärt wurde (Franken et al. 1991). Diese Untersuchungen machen deutlich, dass die Regulation der *CHS*-Expression komplexer ist, als es nach der Mehrzahl der Studien den Anschein hat, und dass auch in dieser Richtung weiterer Forschungsbedarf notwendig ist.

Neben den zahlreichen Untersuchungen zur Regulation der Genfunktion von *PAL* und *CHS* waren die entsprechenden Enzyme ebenfalls Gegenstand umfangreicher struktureller und biochemischer Untersuchungen. Das funktionelle *PAL*-Enzym ist ein Homo-Tetramer und das funktionelle *CHS*-Enzym ein Homo-Dimer, d.h. sie sind aus vier *PAL*-, bzw. zwei *CHS*-Proteinuntereinheiten mit jeweils gleichem Molekulargewicht aufgebaut (Campbell und Ellis 1992 und Ref. darin, Kreuzaler et al. 1979). Über die intrazelluläre Lokalisierung ist bekannt, dass beide Enzyme im Cytosol lokalisiert sind. Bei der *PAL* wurde auch eine Bindung an das Endoplasmatische Retikulum, sowie eine Lokalisierung in den Plastiden und auch im Golgi-Apparat nachgewiesen. Eine umfangreiche Zusammenfassung der Eigenschaften dieser beiden Enzyme ist in der Enzym-Datenbank BRENDA zu finden (www.brenda-enzymes.info).

Bei vielen Studien zur *PAL*- und *CHS*-Expression wurde nicht berücksichtigt, dass beide Enzyme von Genfamilien codiert werden. Über die differentielle Expression von Mitgliedern dieser Genfamilien in verholzenden Sprossachsen ist bislang wenig bekannt. In lediglich einer Studie wurde durch Expressionsanalysen von zwei *PAL*-Genen (*PtPAL1* und 2) im differenzierenden Xylem und anderen Organen der Pappel (*Populus tremuloides* Michx.) eine gewebespezifische Expression dieser beiden *PALs* nachgewiesen (Kao et al. 2002): Während *PtPAL1* in Geweben mit verstärkter Akkumulation von kondensierten Tanninen, aber ohne Lignifizierungsaktivität stark exprimiert war, fand eine *PtPAL2*-Transkription vor allem in Zellen mit starker Lignifizierungsaktivität statt, so dass von einer funktionellen Differenzierung bei diesen beiden *PAL*-Isoformen gesprochen werden kann.

Über differentielle Expression von *PAL*- und *CHS*-Genen im Zusammenhang mit Verfärbungsprozessen im Holz ist jedoch noch nichts bekannt.

1.1.4 Die Robinie als Modellbaum für Kernholzbildung und Pathogenabwehr

Die Robinie ist aufgrund verschiedener Eigenschaften als Modellbaumart für die Untersuchung der Kernholzbildung, aber auch für die Analyse der Pathogenabwehr des Xylems besonders geeignet. Sie gehört zu der Familie *Fabaceae* (Schmetterlingsblütler / Hülsenfrüchtler / Leguminosen) und hat damit viele phylogenetisch nah verwandte, als Nutzpflanzen und auch als Modellpflanzen in der molekularbiologischen Forschung verwendete Spezies, so dass eine Vielzahl von Genen molekular gut charakterisiert sind. Dies erleichtert die Identifizierung von unbekanntem Genen aus der Robinie. Sie ist raschwüchsig und bildet vergleichsweise früh einen Farbkern (ab ca. 6 bis 8 cm Stammdurchmesser; eigene Beobachtung) mit scharfer Splint-Kerngrenze. Dies erleichtert die Probengewinnung. Sie ist eine weltweit verbreitete, forstlich genutzte und ökonomisch relevante Baumart mit hoher Standortamplitude (Schütt 2006, DeGomez und Wagner 2001), und ihr Kernholz zeichnet sich durch gute mechanische und technologische Eigenschaften, sowie durch eine hohe natürliche Dauerhaftigkeit aus (Richter und Waitkus 2001). Letztlich gehört sie zu den guten Kompartimentierern, d.h. sie verfügt über effektive Abschottungs- und Abwehrmechanismen im Falle von Verletzungen des Xylems (Magel E, pers. Mitt.).

Diese Eigenschaften haben dazu geführt, dass die Robinie für die vorliegende Arbeit, aber auch für zahlreiche cytologische, molekulargenetische und holzchemische Studien im Zusammenhang mit Holz- und Kernholzbildung, sowie mit Wirt-Pathogen-Interaktion als Modellbaum herangezogen wurde (Roux und Paulus 1961, Hart 1968, Hart und Johnson

1970, Höll und Lenzian 1973, Nobuchi et al. 1984, Smith et al. 1989, Magel et al. 1991, Magel et al. 1994, Schmidt und Liese 1993, Schmidt und Liese 1994, Magel und Hübner 1997, Hauch und Magel 1998, Magel et al. 2001, Schwarze et al. 2003, Yang et al. 2003, Yang et al. 2004).

1.2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Analyse der mit Verfärbungsprozessen verbundene Expression von Genfamilienmitgliedern der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (*PAL*) und der Chalkonsynthase (*CHS*) im Holz der Robinie (*Robinia pseudoacacia* L.). Bei zwei Typen von Verfärbungsprozessen wurde die Expression von *PAL*- und *CHS*-Genen untersucht, der konstitutiven Kernholzbildung und der induzierten Bildung einer Reaktionszone infolge von Verwundung und Infektion des Xylems mit dem pilzlichen Holzpathogen *Phellinus robiniae*. Darüber hinaus wurde die Expression dieser Gene im unverfärbten Splintholz der Robinie während der Vegetationsperiode analysiert, um saisonale und gewebespezifische Expressionsmuster aufzudecken. Auf diese Weise sollte geklärt werden, ob innerhalb der beiden Genfamilien einzelne Mitglieder differentiell exprimiert werden, ob funktionelle Redundanzen oder Spezialisierungen auftreten, bzw. wie hoch der Beitrag der Genfamilienmitglieder an der Gesamtexpression in den untersuchten Geweben ist. Für diese Untersuchungen wurden Sequenzen von *PAL*- und *CHS*-Genen identifiziert, auf ihrer Grundlage genspezifische Primer konstruiert und mit diesen die relative Expression mittels semiquantitativer RT-PCR und Real-Time PCR analysiert. Mit den Ergebnissen dieser Arbeit wird ein tieferer Einblick in die Expression zweier Schlüsselgene für konstitutive und induzierte Verfärbungsprozesse im Holz der Robinie erhalten. Die gewonnenen Ergebnisse könnten dazu beitragen, in der Zukunft gewünschte Verfärbungsprozesse im Holz gezielt zu fördern oder unerwünschte zu unterbinden.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	OHAUS Explorer
Autoklaven	Systec 3870 ELV 35435 Wettenberg
Gelelektrophoreseapparatur	i-MUPID Mini Gel, COSMO BIO Co., Ltd.
Geldokumentation (Gel-Doc)	Gel documentation system mit Universal-Haube II, BIO-RAD Laboratories GmbH D-80901 München
Gefriertrocknungsanlage	Christ Gefriertrocknungsanlage Typ 102042 Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH D-37520 Osterode am Harz
Heizblock	Metallblock-Thermostat VLM LS 2, VLM GmbH, D-33818 Leopoldshöhe
Mikrowellengerät	Panasonic
pH-Meter	HI 9321 Microprocessor pH METER, Hanna Instruments Deutschland GmbH, D-77694 Kehl
Real-Time PCR Cycler	Mx3005P [®] QPCR System, Stratagene Agilent Technologies D-76337 Waldbronn
Reinstwasseranlage	Barnstead D11931 Thermo Fisher Scientific
Rotationsschüttler mit Inkubationshaube	SM 30 control, Inkubationshaube TH 30, Bühler Technologies GmbH, D-409880 Ratingen
Schüttler	Vibrax basic, IKA [®] -Werke, D-79219 Staufen
Schwingmühle	HSM 100 (Herzog Maschinenfabrik, Osnabrück)
Sterilbank	Dargatz, Ceag Schirp Reinraumtechnik D-59379 Selm-Bork
Thermocycler	T-Gradient Thermoblock, Biometra Biomedizinische Analytik GmbH, D-37079 Göttingen
Tiefkühlagerschrank	HFU 486, Heraeus D-63450 Hanau
Trockenschrank	Typ ULM 400, Memmert GmbH + Co. KG, D-91126 Schwabach
UV/Vis-Spektrophotometer	Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Cambridge, England
Zentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus, Kendro Laboratories, D-63505 Langenselbold

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle selbst hergestellten wässrigen Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, unter Verwendung von Reinstwasser angesetzt, welches von einer Reinstwasseranlage des Typs „Clear“ der Firma SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH (Barsbüttel) aufbereitet wurde.

DEPC-Wasser 1 ml Diethylpyrocarbonat in 1l Reinstwasser emulgieren, anschließend für 30 min bei 121°C autoklavieren

DNA- und RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Native Agarose-Gele (DNA) Je nach Agarose-Konzentration Zugabe von 0,8 – 2,5 % (w/v) Agarose zu 0,5x TAE-Puffer

Denaturierende Agarose-Gele (RNA) 10 % (v/v) 10x MOPS-Elektrophoresepuffer
88 % (v/v) DEPC-Wasser
1,2 % (w/v) Agarose
Nach Aufkochen in der Mikrowelle und Abkühlung auf ca. 50°C, Zugabe von 2 % (v/v) Formaldehyd (37 %)

DNA-Größenmarker 100 bp DNA Ladder (1 µg/µl), Invitrogen
1 Kb DNA Ladder (1 µg/µl), Invitrogen

DNA-Ladepuffer 30 % (v/v) Glycerin in Reinstwasser
0,25 % (w/v) Bromphenolblau

Ethidiumbromid-Färbebad 1,5 µg/ml [0,015 % (w/v)] Ethidiumbromid in deion. Wasser

MOPS-Elektrophorese-Puffer (10x) 200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA

RNA-Ladepuffer 2x RNA Loading Dye Solution, Fermentas
TAE-Puffer 50x Stocklösung:
2 M Tris-Acetat
50 mM EDTA
auf pH 7,0 mit NaOH, (Sterilfiltration 0,2 µm Porenweite)

Kits

5'/3' RACE PCR 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, Roche Diagnostics

DNA-Extraktion DNeasy[®] Plant Mini Kit, Qiagen

DNase-Verdau Deoxyribonuclease I (DNase I), Fermentas

Klonierung von PCR-Produkten TOPO TA Cloning[®] Kit, Invitrogen

PCR Taq PCR Core Kit, Qiagen

Real-Time PCR Brilliant[®] II SYBR[®] Green QPCR Master Mix, Stratagene (an Agilent Technologies Company)

PCR-Produktaufreinigung High Pure PCR Product Purification Kit, Roche Diagnostics

Reverse Transkription SuperScript III[®] First strand synthesis system, Invitrogen

RNA-Extraktion RNeasy[®] Plant Mini Kit, Qiagen

Klonierung von Genfragmenten mit dem TOPO® TA Cloning Kit

S.O.C. Medium	2 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
X-Gal-Lösung	40 mg X-Gal / 1 ml Dimethylformamid
Kanamycin-Stammlösung	10 mg/ml Kanamycin Sterilfiltration (0,22 µm Porenweite)
Ampicillin-Stammlösung	10 mg/ml Ampicillin, Sterilfiltration (0,22 µm Porenweite)
LB-Medium (flüssig)	1,0 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt 1,0 % (w/v) NaCl Einstellung pH 7,0 Autoklavieren für 20 min bei 121°C Nach Abkühlung auf Raumtemperatur Zugabe von 0,05 mg/ml Kanamycin
LB-Medium (fest, für Platten)	LB-Medium flüssig, ohne Kanamycin Einstellung pH 7,0 Autoklavieren, Abkühlung auf ca. 50°C, Zugabe von 0,05 mg/ml Ampicillin, Gießen der Platten (ca. 20 ml pro Platte), Aushärtung bei Raumtemperatur, Trocknung der Nährbodenoberfläche für ca. 2 h bei Raum- temperatur unter einer sterilen Werkbank
<u>Plasmidisolierung</u>	
Lösung I (Resuspendierungspuffer)	25 mM Tris 10 mM EDTA
Lösung II (Zelllysepuffer)	0,2 N NaOH 1 % (w/v) SDS
Lösung III (Neutralisierungspuffer)	3 M Kaliumacetat 11,5 % (v/v) Eisessig

2.2 Untersuchungsmaterial

Das Untersuchungsmaterial wurde aus Stammholz von Robinien (*Robinia pseudoacacia* L.) gewonnen, welches abhängig vom Versuch von verschiedenen Standorten bezogen wurde.

2.2.1 Stammquerschnitte aus gesunden Robinien

Für die Expressionsanalysen von *PAL*- und *CHS*-Genen in gesundem, unverletztem Robinienholz mit regulärer Kernholzbildung wurden im Laufe einer Vegetationsperiode Stammabschnitte aus jeweils drei Bäumen pro Probenzeitpunkt gewonnen. Bis auf eine Parallele, welche an einem Waldstandort bei Eberswalde im Oktober 2005 bezogen wurde, wurden alle Bäume mit freundlicher Genehmigung der Revierförsterei Bergedorf an Waldstandorten in Hamburg-Bergedorf und in Reinbek in der Vegetationsperiode des Jahres 2006 bezogen. Bäume mit einem Alter zwischen 8 und 20 Jahren (Stammdurchmesser 10 - 20 cm) wurden gefällt, von diesen in etwa 30 - 50 cm Stammhöhe mehrere Stammscheiben mit einer Dicke von etwa 3 – 4 cm abgesägt und vor Ort mit Trockeneis tiefgefroren. Die Lagerung erfolgte vor Austrocknung geschützt bei -80°C.

Die Probennahmezeitpunkte waren:

- (1) Frühjahr (Anfang Mai, beginnender Neuaustrieb), Bäume 1, 2, 3
- (2) Hochsommer (Anfang Juli), Bäume 4, 5, 6
- (3) Spätsommer (Ende August), Bäume 7, 8, 9
- (4) Herbst (Ende Oktober, beginnender Laubfall), Bäume 10, 11, 12
- (5) Spätherbst (Ende November, Laubfall abgeschlossen), Bäume 13, 14, 15.

Zur Vereinfachung werden die Proben aus diesem Experiment im Folgenden unter der Bezeichnung ‚Robinienstammquerschnitte‘ zusammengefasst.

Die Stammscheiben wurden bei 100 Pa (1 mbar) sieben Tage lang gefriergetrocknet (Christ Gefriertrocknungsanlage Typ 102042). Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die getrockneten Stammscheiben luftdicht verschlossen bei -80°C gelagert. Zur Präparation einzelner Holzgewebeabschnitte wurden die Stammscheiben in einem Exsikkator aufgetaut. Mit einem Stechbeitel erfolgte die anschließende Präparation der Gewebeabschnitte aus dem Xylem. Der unverfärbte Splintholzbereich wurde unterteilt in äußeren Splint (outer sapwood, OS), mittleren Splint (MS) und inneren Splint (IS). An der Grenze zwischen innerem Splintholz und der Kernholzzone wurde die Splint-Kern-Übergangszone (transition zone, TZ) präpariert (vgl. Abb. 2). Bei den Frühjahrsproben wurde zusätzlich das jüngste,

sich zum Zeitpunkt der Probennahme im Differenzierungsstadium befindliche Holzgewebe (differentiating xylem, DX) präpariert. Bei den Sommerproben wurde zusätzlich das DX-Gewebe sowie das Frühholz des neuen Jahrrings (early wood, EW) präpariert (Tab. 1). Die Präparation der DX-Proben wurde durch den Umstand ermöglicht, dass sich durch die Schrumpfung der Stammscheiben bei der Gefriertrocknung der Bast und die Borke von den Stammscheiben ablöste und das neu gebildete Gewebe des Zuwachsrings freigelegt wurde. Von jedem Holzgewebeabschnitt wurden mit dem Stechbeitel feine Späne abgetragen, die im Anschluss mit einer Schwingmühle für jeweils 1 min mit 1400 U/min zu einem feinen Pulver zermahlen wurden (HSM 100, Herzog Maschinenfabrik, Osnabrück). Gelagert wurden die pulverisierten Holzproben bei -80°C.

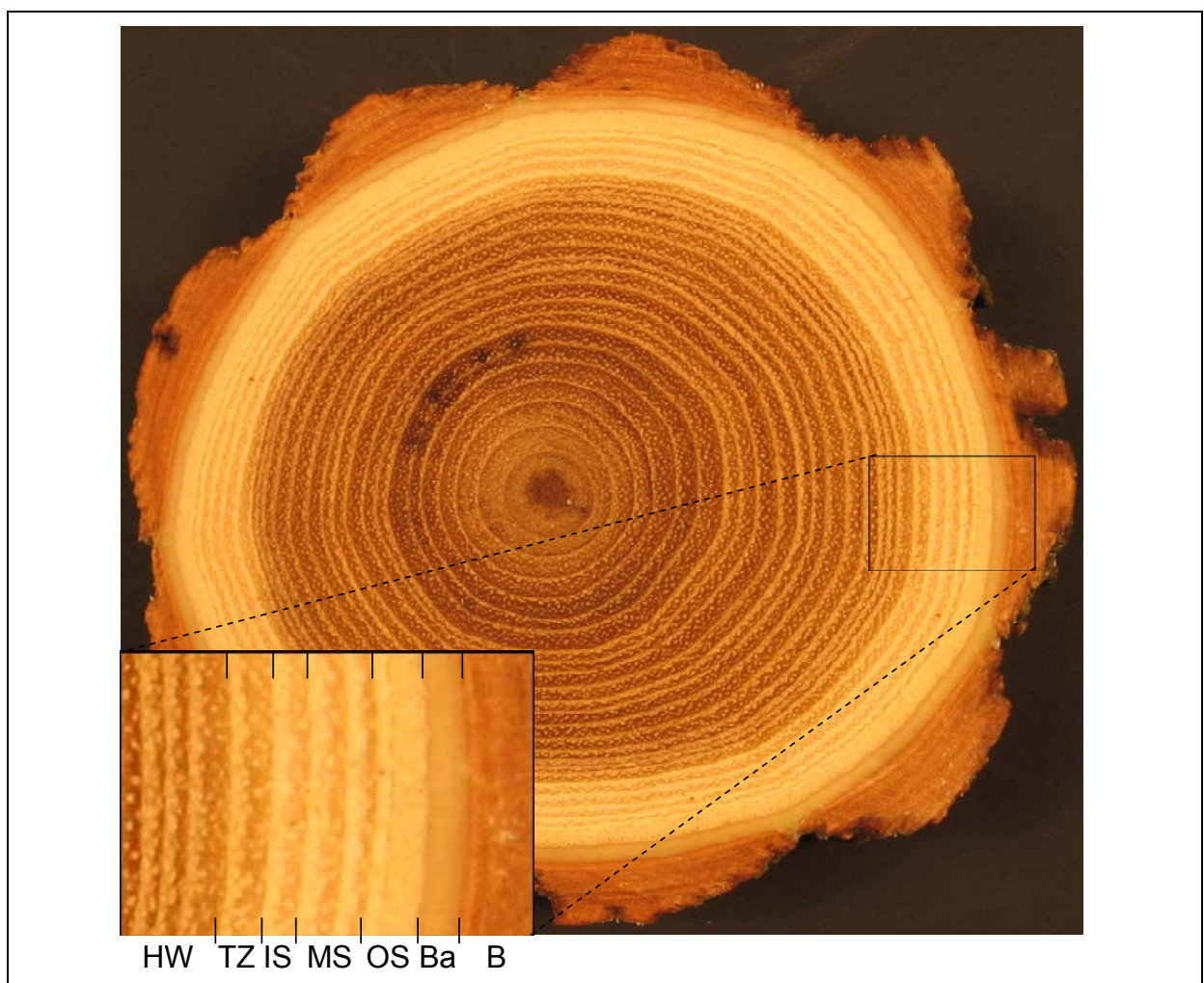


Abbildung 2 – Ansicht eines Robinienstammquerschnitts mit dunkler Kernholzzone und schmalen, hellem Splint (Fällzeitpunkt August). Der eingerahmte Ausschnitt ist unten links vergrößert dargestellt und zeigt beispielhaft die für die Probengewinnung vorgenommene Unterteilung in verschiedene Gewebezonenebene, die sich im Xylem in der Regel an den Jahrringgrenzen orientierte. Abkürzungen: HW – Kernholz (engl. heartwood), TZ – Splint-Kern-Übergangszone (engl. transition zone), IS – inneres, MS – mittleres und OS – äußeres (engl. outer) Splintholz, Ba – Bast, B – Borke.

Tabelle 1 – Übersicht der aus Robinienstammquerschnitten präparierten Gewebeabschnitte. Zu jedem Probennahmezeitpunkt wurden jeweils 3 Bäume gefällt. Legende: x – präpariert, n.p. – nicht präpariert. DX – differenzierendes Xylem, EW – Frühholz (engl. ‚earlywood‘). Übrige Abkürzungen siehe Abb. 2

Jahreszeit	DX	EW	OS	MS	IS	TZ
Frühjahr	x	n.p.	x	x	x	x
Sommer	x	x	x	x	x	x
Spätsommer	n.p.	n.p.	x	x	x	x
Herbst	n.p.	n.p.	x	x	x	x
Spätherbst	n.p.	n.p.	x	x	x	x

2.2.2 Verwundung und Pilzinfektion von Robinienstämmen

Das Probenmaterial aus der verfärbten Reaktionszone im Xylem der Robinie stammte aus einem Verwundungs- und Infektionsexperiment, welches im August 1996 in Tübingen durchgeführt wurde (Busch 1999). Im Folgenden wird eine kurze Beschreibung der Versuchsdurchführung vorgenommen, weitere Details finden sich bei Busch (1999). An einem Robinienstandort in Tübingen wurde das Xylem von Robinienstämmen mit einem Zuwachsbohrer bis in die Kernholzzone verwundet. In die Bohrlöcher wurden Bohrkerns eingesetzt, die mit Mycel des holzerstörenden Basidiomyceten *Phellinus robiniae* überwachsen waren (Inokula). Anschließend wurden die Wunden mit künstlicher Rinde verschlossen. Die Probennahmen erfolgten am Tag der Inokulation (Nullprobe, nicht infiziertes Splintholz) und 3, 7, 30, 90 und 360 Tage nach der Inokulation. Zu jedem Probennahmezeitpunkt wurden jeweils vier Bäume gefällt und die infizierten Stammabschnitte herausgesägt. Zur Gewinnung von nicht infizierten Kontrollen (Jahreszeitenkontrollen) wurden zudem aus gesunden äußeren Splintabschnitten der gefällten Bäume Holzproben entnommen. Die Stammabschnitte wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die Aufarbeitung beinhaltete die Gefriertrocknung der Stammscheiben, Präparation der lateral zu den Bohrlöchern gelegenen Reaktionszone mit einem Stecheisen und Zermahlung des Probenmaterials zu einem feinen Holzpulver. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben in Schlenkrohren unter Vakuum bei -20°C gelagert.

Das Probenmaterial für die Genexpressionsanalysen entstammte der lateral zur Verwundungs- und Inokulationsstelle gelegenen Reaktionszone im äußeren Splintholzbereich (Zone A in Abb. 3). Diese Zone entspricht nach dem CODIT-Modell Wand 3. In Tabelle 2 (S. 25) sind die präparierten Proben aufgelistet.

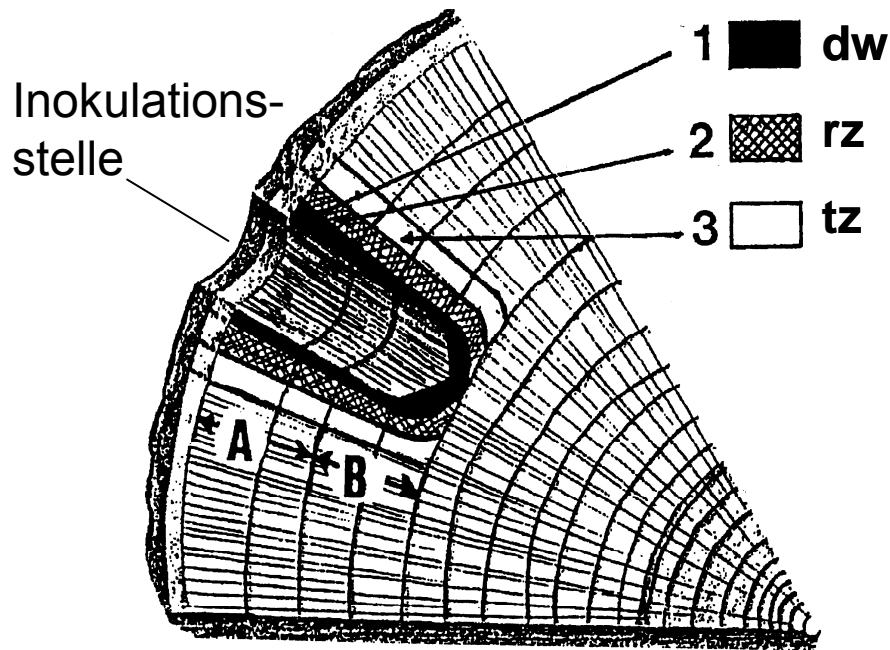


Abbildung 3 – Schematische Darstellung der Zonierung des Splintgewebes der Robinie nach Verwundung und Inokulation (aus Busch 1999). Abkürzungen: dw – decayed wood (Fäulniszone), rz – Reaktionszone, tz – transition zone (Übergangszone). In radialer Richtung wurde in Zone A (äußeres, jüngeres Splintholz) und Zone B (inneres, älteres Splintholz) unterteilt. Das für die Arbeit verwendete Probenmaterial stammte aus der rz aus Zone A.

Tabelle 2 – Übersicht der präparierten Proben aus der Reaktionszone nach Verwundung und Pathogenbefall ('Pathogenholz', P1, P2, P3, P4) und aus nicht infizierten Jahreszeitenkontrollen (K1, K2). Abkürzungen: x – präpariert, n.p. – nicht präpariert.

Parallele	Tage nach Inokulation (d _{ai})					
	0	3	7	30	90	360
P1	x	x	x	x	x	x
P2	n.p.	x	x	x	x	x
P3	n.p.	x	x	x	x	x
P4	x	x	x	x	x	x
K1	x	x	x	x	x	x
K2	x	x	x	x	x	x

2.3 Probenaufarbeitung

2.3.1 DNA-Isolierung

Genomische DNA der Robinie wurde aus ca. 20 mg Holzpulver aus dem äußeren Splintholz (OS-Zone, Oktober 2005) mit Hilfe des DNeasy DNA Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerprotokoll extrahiert. Das Extraktionsprotokoll beinhaltete folgende Verfahrensschritte: (1) Zellyse durch eine Pufferlösung, (2) Ausfällung von Proteinen und Polysacchariden durch eine Pufferlösung, (3) Entfernung unlöslicher Bestandteile durch Filtration und Zentrifugation, (4) Immobilisierung der DNA an eine Silikat-Matrix, (5) diverse Waschschrirte mit einer Pufferlösung, (6) Eluierung der DNA von der Matrix durch eine Pufferlösung. Die genomische DNA lag am Ende der Extraktion in 50 µl AE-Pufferlösung (Qiagen) vor.

2.3.2 Isolierung von Gesamt-RNA und DNase-Verdau

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des RNeasy Plant Mini Kits (Qiagen, Hilden) aus ca. 30 mg Holzpulver nach Herstellerprotokoll. Die RNA-Extraktion beinhaltete folgende Verfahrensschritte: (1) Zellaufschluss und Lösung der Zellinhalte durch einen Guanidin-Thiocyanat-haltigen Lysepuffer, (2) Filtration zur Entfernung der festen Bestandteile, (3) Immobilisierung der RNA an einer Silikat-Matrix, (4) Waschschrirte mit verschiedenen Pufferlösungen zur Entfernung von Proteinen und anderen Zellbestandteilen und (5) Elution der RNA von der Matrix mit RNase-freiem Wasser (Qiagen). Die Elution der Gesamt-RNA erfolgte – abweichend vom Hersteller-Protokoll – in zwei Elutionsschritten mit jeweils 20 µl RNase-freiem Wasser; die Eluate wurden separat aufgefangen.

Zur Kontrolle des Extraktionserfolgs wurde die Gesamt-RNA durch denaturierende Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurde von jeder Probe jeweils 1 µl der Gesamt-RNA-Lösung mit 1 µl 2x Ladepuffer (Fermentas) versetzt, anschließend für 5 min bei 65°C denaturiert (Auflösung von Sekundärstrukturen) und direkt im Anschluss für mindestens 1 min auf Eis gelagert. Es folgte die gelelektrophoretische Auftrennung der Proben im Formaldehyd-haltigen Agarosegel (1,2 % Agarose in MOPS-Puffer). In der anschließenden Ethidiumbromidfärbung wurden die Gele 2 min im Ethidiumbromidfärbebad geschwenkt und danach 40 min in deionisiertem Wasser entfärbt, gefolgt von einer photographischen Dokumentation der unter UV-Licht fluoreszierenden RNA-Banden (Gel documentation system, Biorad).

Genomische DNA in den Gesamt-RNA-Proben wurde durch enzymatischen Verdau mit DNase I eliminiert (Fermentas, St. Leon-Rot).

<u>DNase I-Verdauansatz 1x 12,5 µl</u>
2,0 µl DEPC H ₂ O
3,0 µl 10x Puffer (Fermentas)
0,5 µl RNaseOut (Invitrogen)
3,0 µl DNase I (Fermentas)
<u>4,0 µl Gesamt-RNA</u>
<u>12,5 µl</u>

Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C inkubiert, anschließend wurde die Aktivität der DNase I durch Zugabe von je 1 µl EDTA (25 mM, pH 8,0) und zehnmütige Inkubation bei 65°C gestoppt. Die DNase-Verdauansätze wurden für die Reverse Transkription eingesetzt.

2.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) der RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde mit Hilfe des SuperScript® III first strand synthesis kit (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt.

Zusammensetzung und Protokoll für einen 40 µl-Ansatz (Mastermix 1 und Mastermix 2):

<u>Mastermix 1</u>
12,0 µl DEPC H ₂ O
10,0 µl RNA (= DNase-Verdauansatz)*
2,0 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid)
<u>2,0 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer (0,5 µg/µl)</u>
<u>26,0 µl</u>

* Abhängig von der Probe entsprach dies einer RNA-Menge von etwa 45 ng bis 1,5 µg. Der Kapazitätsbereich für die einzusetzende RNA-Menge liegt laut Herstellerangaben zwischen 1 ng und 5 µg.

Mastermix 1 wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, dann für eine Minute auf Eis inkubiert.

Mastermix 2

8,0 µl 5x First Strand Buffer

2,0 µl 0,1M DTT

2,0 µl RNaseOut (40 U/µl)

2,0 µl SuperScript III RT (200 U/µl)14,0 µl

Nach Abkühlung von Mastermix 1 wurde Mastermix 2 zugegeben, gemischt und für 1 h bei 50°C inkubiert (Reverse Transkription), gefolgt von einer Hitzedeaktivierung der Reversen Transkriptase für 15 min bei 70°C.

Zur Kontrolle des DNase I-Verdau und der Reversen Transkription wurden PCRs mit genspezifischen Primern für *Rp18S* durchgeführt (Grundlage: partielle Sequenz der 18S rRNA der Robinie, *GenBank* Zugangsnummer (engl. Accession number) AB005552. Forward-Primer 5'-CTTCGGGATCGGAGTAATGA-3', Reverse-Primer 5'-GGTAAGTTTCCCCGTGTTGA-3', vgl. Tab. 15 auf S. 73). Für jede Einzelprobe wurden jeweils drei PCR-Reaktionen angesetzt, in denen Aliquots der Gesamt-RNA, der DNase I-verdauten Gesamt-RNA, bzw. der cDNA als templates eingesetzt wurden.

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Ansätze analysiert. Dazu wurden Aliquots der PCR-Ansätze (2-4 µl, abhängig von Taschengröße des verwendeten Gels) mit DNA-Ladepuffer versetzt und per Gelelektrophorese separiert (1,5 % Agarose in 0,5x TAE-Puffer). Die Laufzeit wurde der Größe des Gels angepasst und betrug zwischen 15 und 25 min. Anschließend wurden die Gele 2 min im schwenkenden Ethidiumbromidbad gefärbt und anschließend 20 min in deionisiertem Wasser entfärbt. Unter UV-Licht wurden die fluoreszierenden DNA-Banden fotografisch dokumentiert (Gel documentation system, Biorad).

Die Herstellung einer cDNA-Probe aus einer gegebenen, DNase-behandelten Gesamt-RNA-Probe galt als gelungen, wenn kein PCR-Produkt im PCR-Reaktionsansatz mit DNase-behandelter Gesamt-RNA als template erhalten wurde, wohl aber bei denen mit cDNA und Gesamt-RNA als template. cDNA-Proben, für die dies nachgewiesen werden konnte, wurden für die Genexpressionsanalysen verwendet. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei -20°C.

2.4 Identifizierung von PAL- und CHS-Gensequenzen

2.4.1 Datenbankrecherche, Sequenzalignments, Primerdesign

Vor Beginn der Untersuchungen waren von *R. pseudoacacia* L. bis auf je ein Sequenzfragment von *PAL* und *CHS* keine weiteren Sequenzen bekannt (zwei ESTs, von engl. ‚expressed sequence tags‘, *GenBank* Accessions BI642887 und BI642100, Yang et al. 2004). Also wurden zunächst von den beiden Genfamilien einzelne *PAL*- und *CHS*-Gene der Robinie identifiziert. Dazu wurden *PAL*- und *CHS*-Gensequenzen von Angehörigen der Familie der *Fabaceae* (Leguminosen) aus *GenBank* beschafft, verfügbar auf der Internetseite des National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) und mit Hilfe des Programms Clustal X multiple Sequenzalignments erstellt (siehe Tab. A1 und A2 im Anhang, S. 151-152). Anhand der multiplen Sequenzalignments wurden konservierte Regionen der *PAL*- und *CHS*-Gene identifiziert und als Grundlage für die Konstruktion von degenerierten Primern herangezogen. Die hierfür verwendeten *PAL*- und *CHS*-Gene aus verschiedenen Arten der *Fabaceae* sind im Anhang in Tabelle A2 (S. 152) aufgelistet. In Tabelle 3 sind Sequenzen und weitere Eigenschaften der degenerierten Primer aufgeführt. Sie wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) hergestellt.

Die Schmelztemperatur T_m der degenerierten, aber auch aller übrigen Primer wurde durch eine empirische Näherungsformel berechnet, die als Parameter den GC-Gehalt (GC-%) und die Länge des Primers (L_{Primer}) verwendet [Formel (1)].

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 69,3 + 0,41 \times (\text{GC-\%}) - \frac{650}{L_{\text{Primer}}} \quad (1)$$

(Quelle: Berechnungsformel von MWG operon, <http://www.eurofinsdna.com>)

Da degenerierte Primer ein Gemisch aus mehreren Primer-Individuen darstellen und die Individuen unterschiedliche GC-Gehalte und damit auch unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen können, wurden die Schmelztemperaturen eines degenerierten Primers aus dem arithmetischen Mittelwert der Schmelztemperaturen der einzelnen Primer-Individuen berechnet.

In den PCR-Reaktionen (siehe nachfolgendes Kap. 2.4.2) wurden die degenerierten Forward- und Reverse-Primer für *PAL* in den vier möglichen Kombinationen eingesetzt, aus denen vier verschiedene PCR-Produktlängen resultierten, während die degenerierten Primer für *CHS* paarweise eingesetzt wurden (Tab. 3).

Tabelle 3 – Degenerierte Primer für die Identifizierung von *PAL*- und *CHS*-Genfragmenten. Abkürzungen: f/r – Forward- / Reverse-Primer, T_m – Schmelztemperatur¹, D – Degenerierung². Schlüssel für die degenerierten Nukleotide: Y = C/T, W = A/T, R = A/G, S = C/G, D = A/G/T.

Spezi- fität	Name	Sequenz (5' – 3')	f/r	T_m [°C]	D	Länge PCR-Produkt [bp]
<i>PAL</i>	F2	CYAAGTCWATTGAGAGRGAG	f	55	8	mit R3 488
	F3	CCCTYTKATTGATGKTCAAG	f	55	8	mit R3 445
	R3	CAARTTCTCYTCYAAATGYC	r	53	8	mit F3 332
	R2	CCARAGARTTSACATCYTG	r	53	16	mit F2 372
<i>CHS</i>	FA	TAYATGATGTAYCAACAAGG	f	51	4	443
	RA	GGRTGWGCAATCCWRAAG	r	54	16	
	F5	GGCACCTTCDTTGGATGCAAG	f	61	3	423
	R3	GGGTCWGAWCCAACAATSAC	r	57	8	
	F1	GGATGCDAGGCAAGACATGG	f	60	3	641
	R1	CRGGGTGTGCAATCCAAAAG	r	58	2	

[¹ Die Schmelztemperatur wurde nach Näherungsformel (1) berechnet, siehe oben.

[² Die Degenerierung gibt die Anzahl der Primer-Individuen an, aus der ein degenerierter Primer zusammengesetzt ist.]

2.4.2 PCR mit degenerierten Primern

Mit den degenerierten Primern für *CHS* und *PAL* wurden PCRs durchgeführt. Die Komponenten der PCR-Reaktionsansätze waren bei diesen und allen übrigen PCRs – sofern nicht anders angegeben – Bestandteile des Taq PCR Core Kits (Qiagen, Hilden). Als templates wurde cDNA eingesetzt, die aus der RNA aus verschiedenen Gewebetypen hergestellt wurde:

- (1) Holzgewebe aus dem äußeren Splintholz, Jahreszeit: Herbst,
- (2) Holzgewebe aus der Splint-Kern-Übergangszone, Jahreszeit Herbst
- (3) Holzgewebe aus Pathogenholz 30 Tage nach Verwundung und Infektion mit
Phellinus robiniae

Darüber hinaus wurde genomische DNA der Robinie als PCR-template verwendet, um auch nicht Xylem-exprimierte *PAL*- und *CHS*-Gene zu erfassen.

Mastermix PCR 1x 12,5 μ l

7,825 μ l	Reinstwasser
2,500 μ l	Q-Solution
1,250 μ l	10x Reaktionspuffer
0,250 μ l	dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid)
0,150 μ l	degen. forward Primer (100 μ M, Biomers)
0,150 μ l	degen. reverse Primer (100 μ M, Biomers)
0,075 μ l	Taq-Polymerase (5 U/ μ l)
0,300 μ l	template

12,5 μ lPCR-Programm

94°C	4 min	} 30-35 Zyklen
94°C	30 s	
T _a	30 s	
72°C	60 s	
72°C	7 min	

Die Annealing-Temperaturen (T_a) variierten je nach eingesetztem Primerpaar (Tab. 3, S. 30). Bei Primern mit Schmelztemperaturen von 55°C oder darunter wurde eine T_a von 50°C gewählt, bei denen mit Schmelztemperaturen von über 55°C eine T_a von 55°C. Die Zyklenzahl wurde der template-Menge angepasst: Bei cDNA-Proben geringer Konzentration, wie sie beispielsweise bei cDNA von der Splint-Kern-Übergangszone aufgrund geringer Anteile lebenden Gewebes auftraten (Magel et al. 1991), wurden PCRs mit 35 Zyklen, bei cDNA-Proben höherer Konzentration (z.B. aus äußerem Splintholz) mit 30 Zyklen durchgeführt.

Mittels Agarose-Gelelektrophorese [1,5 % (w/v) Agarose] wurden jeweils 15-20 μ l der PCR-Ansätze wie in Kapitel 2.3.3 (S. 28) beschrieben analysiert. Bei erfolgreicher Amplifikation von PCR-Produkten mit den erwarteten Fragmentgrößen (siehe Tab. 3, S. 30) wurden diese kloniert, siehe folgendes Kapitel.

2.4.3 Klonierungen

2.4.3.1 Ligation von Vektor und PCR-Produkt

Die Klonierung der durch PCR erhaltenen Genfragmente aus *PAL*- und *CHS*-Genen wurde mit Hilfe des TOPO[®] TA Cloning Kits (Invitrogen) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese separiert und die mit Ethidiumbromid gefärbten, unter UV-Licht fluoreszierenden Banden mit den erwarteten Fragmentlängen mit einem Skalpell in Form von Gelblöcken ausgeschnitten. Extrahiert wurde die DNA durch Einfrieren der Gelblöcke bei -20°C und anschließendes Ausdrücken der Flüssigkeit aus den auftauenden Gelblöcken zwischen einem gefalteten Streifen Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA). Der entweichende Tropfen wurde in einem Eppendorfgefäß aufgefangen und direkt im Anschluss für die Ligation in den Vektor pCR[®]2.1 TOPO[®] eingesetzt.

Ligationsansatz 1x 8 µl

6,0 µl	DNA-Lösung (aus dem Gelblock)
1,0 µl	Salz-Lösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl ₂)
1,0 µl	Vektor pCR [®] 2.1-TOPO [®]
8,0 µl	

Dieser Ansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und gleich darauf für die Transformation eingesetzt.

Funktionsprinzip der Ligation: Das Plasmid pCR[®]2.1-TOPO[®] liegt in linearisierter Form vor und ist an den Enden mit einem 3'-Deoxythymidin-Überhang ausgestattet, an dem eine Topoisomerase aus dem *Vaccinia*-Virus kovalent gebunden ist. Die mit der Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte verfügen grundsätzlich über einen 3'-Deoxyadenosin-Überhang, so dass Vektor und PCR-Produkt zueinander komplementäre, klebrige Enden ('sticky ends') aufweisen, mit denen sie sich durch komplementäre Basenpaarung aneinander lagern. Diese werden durch die Topoisomerase kovalent miteinander verknüpft. Das Resultat ist ein zirkularisiertes, rekombinantes Plasmid. Die Ligation erfolgt ungerichtet, d.h. das PCR-Produkt kann in zwei Orientierungen in den Vektor ligiert werden.

2.4.3.2 Transformation von kompetenten *E.coli*

Als kompetenter *E.coli*-Stamm kam der Stamm *TOP 10* für die Transformation zum Einsatz (Genotyp siehe Benutzerhandbuch des TOPO TA Cloning[®] Kits, Invitrogen). Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Unmittelbar nach dem Auftauen wurden 6 µl

eines Ligationsansatzes zu 50 µl der *TOP 10*-Zellsuspension pipettiert und durch leichtes Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Nach einer dreißigminütigen Inkubation auf Eis wurden die Transformationsansätze in einem Wasserbad für 30 s einem Hitzeschock von 42°C ausgesetzt. Sofort danach wurden sie für 2 min in Eiswasser abgekühlt, anschließend je 250 µl S.O.C.-Medium (25°C) zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Transformationsansätze im Rotationsschüttler (120 U/min) bei 37°C für 50 min. Anschließend wurden die Transformationsansätze für die Selektion rekombinanter Klone ausplattiert.

2.4.4 Selektion von rekombinanten Klonen

2.4.4.1 Blau-Weiß-Selektion

Die Selektion von rekombinanten Klonen wurde mittels Blau-Weiß-Screening durchgeführt. Zur Vorbereitung der LB-Agarplatten (0,05 mg/ml Ampicillin) wurden jeweils 40 µl der X-Gal-Stammlösung unter sterilen Bedingungen ausplattiert und die Platten anschließend auf 37°C temperiert. Von den Transformationsansätzen (Kap. 2.4.3.2) wurden jeweils 40 µl auf den LB-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Von den sich entwickelnden blauen (transformiert mit nicht rekombinatem Vektor) und weißen (transformiert mit rekombinatem Vektor) Kolonien wurden weiße Kolonien mit sterilen Zahnstochern von den Platten gepickt und diese in je 3 ml LB-Flüssigmedium (0,05 mg/ml Kanamycin) über Nacht bei 37°C und im Rotationsschüttler mit 120 U/min subkultiviert.

2.4.4.2 M13-PCR

Zur Überprüfung, ob die selektierten und subkultivierten *E.coli*-Klone das *PAL*-, bzw. *CHS*-Genfragment mit der erwarteten Länge enthielten, wurden PCR-Reaktionen mit M13-Primern und Aliquots der *E.coli*-Kultivierungslösungen durchgeführt.

<u>Mastermix M13-PCR 1x 12,5 µl</u>	
7,825 µl	Reinstwasser
2,500 µl	Q-Solution
1,250 µl	10x Reaktionspuffer
0,250 µl	dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid)
0,150 µl	M13 forward Primer (100 µM)
0,150 µl	M13 reverse Primer (100 µM)
0,075 µl	Taq-Polymerase (5 U/µl)
<u>0,300 µl Kultivierungslösung</u>	
<u>12,500 µl</u>	

<u>PCR-Programm</u>	
98°C	4 min
94°C	30 s
50°C	30 s
72°C	60 s
72°C	7 min

} 35 Zyklen

M13-Primer:

Forward-Primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' ($T_m = 52^\circ\text{C}$),

Reverse-Primer: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' ($T_m = 50^\circ\text{C}$).

Es folgte eine Agarose-Gelelektrophorese von jeweils 3,5 µl der PCR-Reaktionsansätze [1,5 % (w/v) Agarose, gemäß Beschreibung in Kapitel 2.3.3, S. 28]. Da die Bindungsstellen für die M13-Primer im Vektor liegen und diese die Klonierungsstelle mit einem Abstand von 112 bp (M13-Forward-Primer), bzw. 90 bp (M13-Reverse-Primer) flankieren, wiesen die M13-PCR-Produkte bei einer gelungenen Klonierung eine um 202 bp längere Fragmentgröße als die erwartete auf.

2.4.4.3 Restriktionsanalysen

Die Klone, die bei der M13-PCR die erwarteten PCR-Produktlängen (Tab. 3, S. 30) aufwiesen, bzw. im Fall der 3'-, bzw. 5'-RACE die Klone mit Erfolg versprechenden Produktlängen (vgl. Kap. 2.4.7, S. 36), wurden einer weiteren Selektion durch Restriktionsanalysen unterzogen, um redundante Klone auszusortieren.

Dazu wurden die M13-PCR-Produkte in je zwei parallelen Ansätzen mit den Restriktionsenzymen Alu I und Rsa I (Fermentas, St. Leon-Rot) inkubiert.

Mastermix 1x 10 µl

5,9 µl Reinstwasser

1,0 µl 10x Reaktionspuffer Tango™ (Fermentas)

0,1 µl Restriktionsenzym (Alu I ,bzw. Rsa I, Fermentas)

3,0 µl M13-PCR-Ansatz

10,0 µl

Der Restriktionsverdau wurde 1 h bei 37°C durchgeführt, gefolgt von einer Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C.

Erkennungssequenz der Restriktionsenzyme (Pfeil deutet Schnittstelle an):

Alu I: AG↓CT,

Rsa I: GT↓AC.

Beide Enzyme erzeugen Schnittstellen ohne Einzelstrang-Überhang (engl. blunt ends).

Durch Agarose-Gelelektrophorese [2,5 % (w/v) Agarose] von jeweils 4,5 µl der Restriktionsansätze gemäß der Beschreibung in Kapitel 2.3.3 (S. 28) wurden die Restriktionsmuster analysiert und Klone mit individuellem Restriktionsmuster für die Sequenzierung ausgewählt. Von Klonen mit identischem Restriktionsmuster wurde je ein Klon stellvertretend ausgewählt.

2.4.5 Plasmidisolierung

Von den ausgewählten Klonen wurde anschließend das Plasmid isoliert. Jeweils 2 ml der Flüssigkulturen wurden für die Gewinnung von Zellmaterial eingesetzt. Die Plasmidisolierung erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse mit SDS (Sambrook und Russell 2001). Diese beinhaltet folgende Verfahrensschritte: (1) Zellgewinnung aus der Kultivierungslösung durch Zentrifugation, (2) Resuspendierung in einer Pufferlösung (Lösung I), (3) Zelllyse in alkalischer Tensid-Lösung (Lösung II), (4) Neutralisierung und Ausfällung des SDS (Lösung III), (5) Ausfällung der Plasmid-DNA im Überstand [Schritt (4)] mit Isopropanol,

(6) Waschen des DNA-Präzipitats mit einem Ethanol/Wasser-Gemisch, (7) Trocknung der gewaschenen DNA.

Die getrocknete Plasmid-DNA wurde abschließend in je 25 µl Reinstwasser gelöst. Eine Analyse von je 1 µl der Plasmid-DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese [1 % (w/v) Agarose] wie in Kapitel 2.3.3 (S. 28) beschrieben gab Aufschluss über die Ausbeute an Plasmid-DNA.

2.4.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der selektierten Klone wurde von Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft von Prof. Dr. Hedrich, Universität Würzburg, mit einem ABI PRISM[®] 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) unter Verwendung von Plasmid-DNA und M13-Primern durchgeführt.

Die anschließende Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten beinhaltete:

- (1) Zusammensetzung von Forward- und Reverse-Sequenzen zu einer Sequenz, dabei Fehlerkorrektur durch Abgleich mit den Sequenzierkurven.
- (2) Identifizierung der Genfragmente mittels BLASTN-Abgleich in *GenBank*
- (3) Vergleich der Sequenzen untereinander (Online-Tool ‚Blast 2 sequences‘)

Die für die Auswertung eingesetzten Programme und Online-Tools sind in Tabelle A1 im Anhang (S. 151) aufgeführt.

2.4.7 Bestimmung der 3'- und 5'-untranslatierten Regionen

Ausgehend von den erhaltenen *RpPAL*- und *RpCHS*-Sequenzfragmenten, die anfangs nur Abschnitte der codierenden Region darstellten, wurden die untranslatierten 3'-Regionen bestimmt (3'-UTRs, von engl. 3'-untranslated regions). Dafür wurde das 5'/3' RACE Kit eingesetzt (Roche Diagnostics; RACE = ‚rapid amplification of cDNA ends‘). Die 3'-RACE beruht auf zwei Verfahrensschritten, (1) einer cDNA-Synthese mit Hilfe eines Oligo-(dT)-Anchor Primers (Bestandteil des Kits) und (2) einer PCR-Amplifikation. Letztere wurde mit Hilfe von genspezifischen Primern, die anhand der bekannten *PAL*- und *CHS*-Genfragmente konstruiert wurden, und eines vom Kit gelieferten sogenannten Anchor Primers durchgeführt. (Abb. 4). Bei der cDNA-Synthese (1. Schritt) wird aus einer Gesamt-RNA-Probe selektiv die mRNA zu einzelsträngiger cDNA mit bekanntem 5'-Ende (die Anchor Primer-Sequenz)

transkribiert. Das 3'-Poly-A-Ende der mRNA fungiert dabei als Bindungsstelle für den Oligo-(dT)-Anchor. In der anschließenden PCR (2. Schritt) dient die am 5'-Ende modifizierte cDNA als template. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden wie in den Kapiteln 2.4.3 bis 2.4.6 beschrieben kloniert und sequenziert.

Neben der 3'-RACE wurde auch die 5'-RACE mit dem 5'/3' RACE Kit (Roche) durchgeführt (Abb. 4). Bei der 5'-RACE wird ausgehend von einer Gesamt-RNA zunächst mit einem genspezifischen Antisense-Primer die mRNA des Zielgens in eine cDNA umgeschrieben. Letztere besteht aus der 5'-UTR und einer partiellen cds des Zielgens. Nicht inkorporierte Nucleotide und Primer werden in einem Aufreinigungsschritt entfernt. Es folgt ein Poly-A-Tailing am 3'-Ende des cDNA-Erststrangs mit Hilfe einer Terminalen Transferase (enzymatische Anfügung eines Poly-A-Endes). Die anschließenden Schritte entsprechen dem Prinzip der 3'-RACE, mit dem Unterschied, dass der Oligo-(dT) Anchor-Primer nicht mit mRNA, sondern mit dem cDNA-Erststrang hybridisiert und dass ein eingerückter (engl. ‚nested‘) genspezifischer Primer (GSP1) eingesetzt wird. Im Anschluss wird der cDNA-Zweitstrang mit Hilfe eines weiteren ‚nested‘ GSP2 und des Anchor-Primers nochmals amplifiziert. Die resultierenden PCR-Produkte wurden wie in den Kapiteln 2.4.3 bis 2.4.6 beschrieben kloniert und sequenziert.

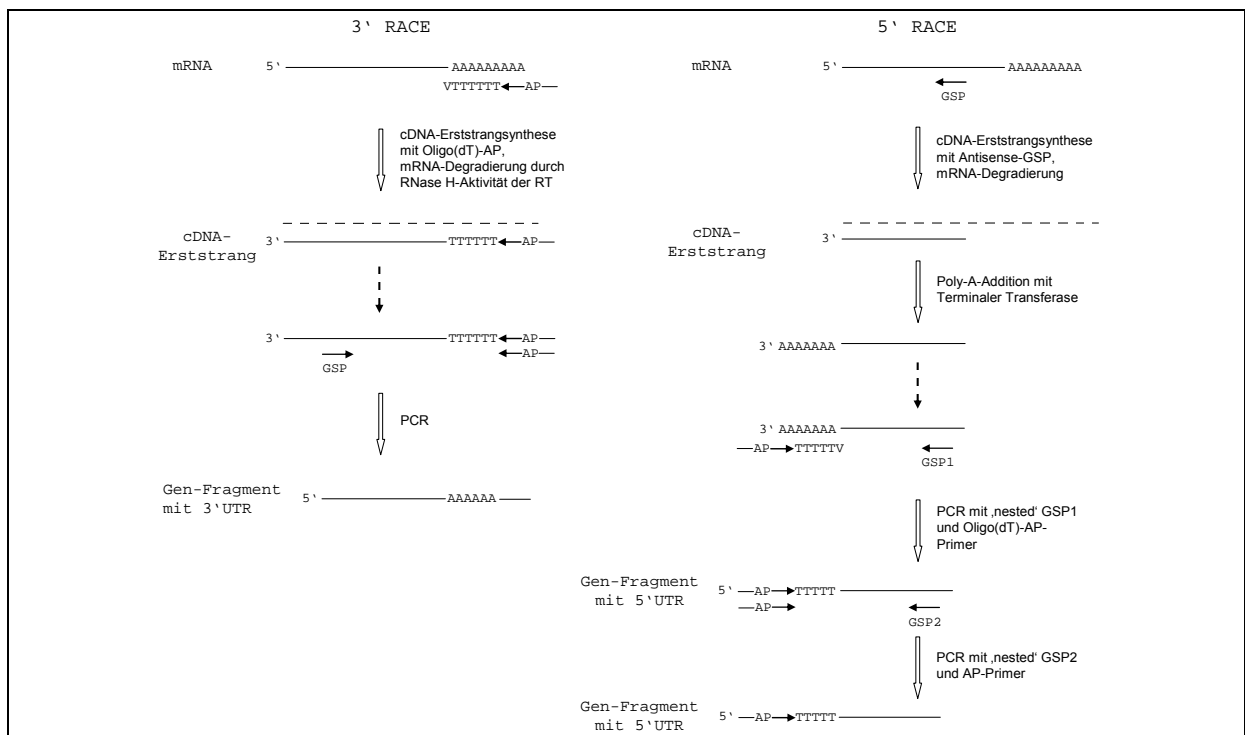


Abbildung 4 – Funktionsschema der 3'-RACE (links) und der 5'-RACE (rechts) in Anlehnung an das Bedienungshandbuch des 3'/5' RACE Kits (Roche). AP = Anchor Primer. Weitere Details siehe Text.

Die cDNA-Synthese für die 3'- und die 5'-RACE erfolgte mit den Komponenten des 5'/3'-RACE Kits (Roche Diagnostics) bis auf die verwendeten Primer nach identischem Protokoll.

cDNA-Synthese für die 3'- / 5'-RACE

4 µl	5x cDNA-Synthese-Puffer
2 µl	dNTPs (10 mM für jedes Nukleotid)
1 µl	Primer ^{1,2}
5 µl	Gesamt-RNA ³
1 µl	Reverse Transkriptase (25 U/µl)
7 µl	Reinstwasser
<hr/>	
20 µl	

¹ Primer 3'-RACE – Oligo-(dT)-Anchor-Primer (37,5 µM Stammlösung)

² Primer 5'-RACE – Genspezifischer 5'-RACE-Primer (24 µM), siehe Tab. 4

³ Die Gesamt-RNA wurde aus Holzgewebe der Splint-Kern-Übergangszone (Oktober 2005) und der Reaktionszone (30 d_{ai}) isoliert und separaten cDNA-Synthesereaktionen eingesetzt.

Die cDNA-Syntheseansätze wurden 60 min bei 55°C inkubiert, gefolgt von 5 min bei 85°C zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase.

Die für die 3'-RACE synthetisierte cDNA wurde direkt als template für die PCR eingesetzt.

Die für die 5'-RACE synthetisierte cDNA wurde zunächst nach Herstellerprotokoll mit Hilfe des High Pure PCR Product Purification Kits (Roche Diagnostics) aufgereinigt. Es folgte ein enzymkatalysiertes ‚Poly-A-Tailing‘ mittels Terminaler Transferase – ebenfalls nach Herstellerprotokoll. (Die Reaktionskomponenten für das ‚Poly-A-Tailing‘ sind Bestandteil des 5'/3'-RACE Kits.). Die mit einem Poly-A-Ende versehene, partielle cDNA diente in der darauf folgenden PCR als template.

Die PCR der 3'-RACE und die der 5'-RACE wurden analog zu dem in Kap. 2.4.2 (S. 30) aufgeführten Protokoll mit den Komponenten des Taq PCR Core Kit (Qiagen) durchgeführt. Annealing-Temperatur (T_a) und Elongationszeit (= Inkubationszeit bei 72°C) der PCR wurden den jeweils verwendeten Primern und den zu erwartenden PCR-Produktgrößen angepasst (siehe Tab. 4, Angewendete Faustregel: $T_a = T_m - 5$, Müller 2001). Die genspezifischen Primer für *PAL* und *CHS* wurden auf Grundlage der zuvor ermittelten Sequenzfragmente konstruiert. Einige Primer enthielten degenerierte Nukleotide. Da die Längen der 3'-, bzw. 5'-UTRs unbekannt waren und je nach Zielgen variierten, sind in Tabelle 4 die voraussichtlichen Distanzen zwischen den GSPs und dem Stopp-, bzw. Start-Codon als Anhaltspunkt für die zu erwartenden jeweiligen PCR-Produktgrößen angegeben. Diese Distanzen wurden aus den für die *Fabaceae* charakteristischen ORF-Längen abgeleitet. Durchschnittlich beträgt die Länge der 3'-UTR pflanzlicher Gene etwa 200 bp, die Länge der 5'-UTR durchschnittlich etwa 70 - 80 bp (Mazumder et al. 2003). Für die Abschätzung der notwendigen

Elongationszeit wurde eine Geschwindigkeit der Taq-Polymerase von 1 kb/min angenommen (Müller 2001).

Tabelle 4 – Sequenz, Spezifität und Schmelztemperaturen* (T_m) der genspezifischen Primer für die 3'- und 5'-RACE, sowie Distanzen zum Stopp- bzw. Startcodon. Schlüssel für die degenerierten Nukleotide: Y = C/T, W = A/T, R = A/G, H = A/C/T, D = A/G/T

Spezi- -fität	Name GSP	Sequenz (5' – 3')	T_m [°C]	Distanz zum Stopp-/ Startcodon [bp]
	3'-1	CATGATGTACCAACAAGGG	55	700
	3'-2	CATGATGTACCAACAAGGA	52	700
	3'-3	GCTGGGGGCACGGTGCTTC	65	675
	3'-4	GCAGGTGGTACGGTGCTCC	63	675
	3'-5	CACGGTGCTTCGTTTGGCCAAAG	64	667
	3'-6	AAAGACTTGGCTGARAAYAAC	54	648
	3'-7	GGATTGAGAAACCTTTGTTTGAGTTGGTG	64	477
<i>CHS</i>	5'-1	GCWCCATCTCCAAACAAGCTTGHC	65	656
	5'-2	GACCCACAAGGCTATCAAGATGAGTG	65	634
	5'-3	GTCCMACAAGACTGTCTAGATGAGTTTC	64	634
	5'-4	CAACAATGACAGCAGCTG	54	673
	5'-5	CCATCTCCAAACAAGCTTG	55	653
	5'-6	CTACAACCACCATGTCTTGC	57	301
	5'-7	CCTTCAGGATCTCTTCCGTCAAGTG	65	235
	5'-8	GAAGGTGCCATATACTCACAGATT	60	269
	3'-1	GAACAAGGCACTGCATGGTGGT	62	979
	3'-2	GGAGTCTCTATGGACAACACACGT	63	936
<i>PAL</i>	5'-1	TGGCAATTTTCAGCTCCCTTGAA	59	1393
	5'-2	CTCCTCTAAATGCCTCAAG	55	1599
	5'-3	GAGAGATTTGAAGGCAACCCATTG	61	1340
	5'-4	GCCTTTGAGTTTGGTCGG	56	680
	5'-5	GGACCAGATCCCCAGAAGCTG	62	631

[* Die Berechnung der Schmelztemperatur T_m erfolgte nach Formel (1), siehe Kap. 2.4.1, S. 29.]

2.4.8 Erweiterung der codierenden Regionen in 5'- und 3'-Richtung

Ausgehend von den bekannten Sequenzabschnitten wurde ein Teil der 5'-aufwärts gelegenen, codierenden Region der *PAL*- und *CHS*-Gene durch PCR mit zusätzlichen „Erweiterungs“-Primern und anschließender Klonierung und Sequenzierung bestimmt. Motivation dafür war der anfängliche Misserfolg bei der 5'-RACE. Aufgrund der zahlreichen Verfahrensschritte ist die 5'-RACE sehr ineffizient (Sambrook and Russell 2001) Mit zunehmender Länge des zu amplifizierenden RACE-Produkts nimmt die Effizienz weiter ab. Bei den *PAL*-Genen war mit 5'-RACE-Produkten mit Längen von 1,3 bis 1,6 kb (Tab. 4 in Kap. 2.4.7) zuzüglich einer 5'-UTR unbekannter Größe zu rechnen. Um diese mögliche Ursache für das Nicht-Funktionieren der 5'-RACE zu eliminieren, wurden Klonierungen mit dem Ziel der Erweiterung der codierenden Regionen durchgeführt. Dazu wurden

„Erweiterungs-Primer“ konstruiert (Tab. 5), wobei nach demselben Prinzip wie bei den degenerierten Primern vorgegangen wurde (siehe Kap. 2.4.1, S. 29). Als Gegenprimer für die Erweiterungs-Primer wurden genspezifische RACE-Primer verwendet (Tab. 5). Die durch diese Klonierungen hinzu gewonnenen Sequenzabschnitte dienten dann als Grundlage für die Konstruktion weiterer genspezifischer Primer für 5'-RACE-Amplifikationen (Dies waren die Primer PAL5'-4 und PAL5'-5, sowie CHS5'-6, CHS5'-7 und CHS5'-8, vgl. Tab. 4, S. 39). Die PCR-Reaktionen mit den Erweiterungs-Primern und die anschließenden Klonierungen und Sequenzierungen wurden wie in den Kapiteln 2.4.2 bis 2.4.6 beschrieben durchgeführt. Als template wurde cDNA aus Pathogenholz 30 Tage nach Inokulation eingesetzt. Die verwendeten „Erweiterungs“-Primer wurden nach demselben Prinzip konstruiert wie in Kap. 2.4.1 (S. 29) beschrieben. Annealing-Temperaturen und Elongationszeiten wurden nach den in Kap. 2.4.7 erläuterten Prinzipien angepasst (S. 38 - 39). Im Fall der *CHS* wurde die Erweiterung der codierenden Region auch in 3'-Richtung durchgeführt (Primer E3'>5' in Tab. 5).

Tabelle 5 – Spezifität, Name, Sequenz, Orientierung (f/r), Schmelztemperatur¹ (T_m) und voraussichtliche Länge der PCR-Produkte der Erweiterungs-Primer. f/r – Forward-/Reverse-Primer. Schlüssel für die degenerierten Nukleotide: Y = C/T, W = A/T, R = A/G, S = C/G, M = A/C.

Spezi- fität	Name	Sequenz (5'-3')	f/r	T_m [°C]	Länge PCR-Produkt [bp]
<i>CHS</i>	E3'>5'	CRGTGAGTCCAGGCCRAAAC	r	64	mit GSP3'-7 ² 444
	E5'>3'	GMATCACCAACAGYGASCACATG	f	62	mit GSP5'-1 ² 532
<i>PAL</i>	E5'>3'	CACACTTCTCCAAGGTTATTCAGG	f	61	mit GSP5'-3 ² 837

¹ siehe Formel (1) in Kap. 2.4.1, S. 29.

² GSP3'-7, GSP5'-1, GSP5'-3 siehe Tab. 4 auf S. 39]

2.4.9 Assemblierung der Teilfragmente, Sequenzbearbeitungen

Durch Klonierung und Sequenzierung der durch PCR mit degenerierten Primern, 3'- bzw. 5'-RACE und PCR mit Erweiterungs-Primern wurden sukzessive zahlreiche Teilfragmente von *PAL*- und *CHS*-Genen der Robinie erhalten. Diese wurden mit Hilfe des Programms BLAST 2 Sequences paarweise miteinander verglichen (Details siehe Tab. A1, S. 151). Bei Identität zweier Teilfragmente wurden diese *in silico* zu einem Genfragment zusammengesetzt.

Die codierenden Abschnitte der zusammengesetzten *PAL*- und *CHS*-Genfragmente wurden mit Hilfe des Programms „ExPaSy Translate Tool“ translatiert (Details siehe Tab. A1). Die DNA- und Proteinsequenzen wurden mittels des Programms BLAST 2 Sequences paarweise miteinander verglichen. Von Genen mit vollständiger codierender Region wurde die

molekulare Masse des Proteins und dessen isoelektrischer Punkt berechnet (Compute pI/Mw Tool, Details siehe Tab. A1).

Multiple Sequenzalignments wurden mit Hilfe des Programms Clustal X erstellt und mit den Programmen Genedoc und Microsoft Word weiter editiert (Details siehe Tab. A1).

2.5 Genexpressionsanalysen

Nachdem die Identifizierung von *PAL*- und *CHS*-Genen der Robinie abgeschlossen war, wurde die Expression der identifizierten Gene im Zusammenhang mit Verfärbungsprozessen, bzw. deren räumlich-zeitliches Expressionsverhalten im Xylem der Robinien analysiert. Die relative Expression der Zielgene in Robinienstammquerschnitten und in Pathogenholz wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR und der Real-Time PCR bestimmt. Für beide Methoden wurden eigens genspezifische Primer konstruiert.

2.5.1 Konstruktion genspezifischer Primer

Die Konstruktion genspezifischer Primer (GSPs) wurde in Anlehnung an die Strategie von Simpson und Mitarbeitern (1992) durchgeführt. Hierbei wurde für die Mitglieder der jeweiligen Genfamilien (*PAL*, bzw. *CHS*) ein gemeinsamer Forward-Primer konstruiert, der nicht zwischen den Mitgliedern einer Genfamilie unterscheidet. Die Reverse-Primer wurden in der variablen 3'-UTR der Einzelgene positioniert und waren damit genspezifisch. Konstruiert wurden diese Primer auf Grundlage von multiplen Sequenzalignments der ermittelten *RpPAL*- und *RpCHS*-Genfragmente. Wenn möglich, wurde der Abstand der Primer so gewählt, dass die PCR-Produkte im Agarosegel unterscheidbare Längen aufwiesen. Ihre Eignung als Primer wurde mit Hilfe der Software Primer Premier 5 überprüft (Details siehe Tab. A1, S. 151). Neben den allgemeinen Anforderungen an einen Primer, wie z.B. den optimalen Werten für Länge und Schmelztemperatur, sowie eine geeignete Basenzusammensetzung und das Vorhandensein von GC-Enden, wurde eine möglichst geringe Tendenz zur Bildung unerwünschter Sekundärstrukturen, wie Haarnadelschleifen (Hairpins), Dimere und Cross-Dimere angestrebt. Die Schmelztemperatur T_m [°C] der GSPs wurde nach Formel (1) berechnet (S. 29).

Als interne Referenz, bzw. zur Normalisierung der cDNA wurde die 18S Untereinheit der ribosomalen RNA der Robinie (*Rp18S*) herangezogen [Details siehe Kapitel 2.3.3, S. 28].

Für die beiden angewendeten Genexpressionsanalysemethoden, der semiquantitativen RT-PCR und der Real-Time PCR, wurden aufgrund unterschiedlicher Anforderungen separate Paare von GSPs konstruiert (Details in Kapitel 3.2, S. 69). Diese wurden von der Firma Biomers.net GmbH (Ulm) hergestellt.

Zur Überprüfung der Primerspezifität wurde eine PCR durchgeführt. Als template wurde genomische DNA verwendet (siehe Kap. 2.3.1, S. 26). Die PCR-Mastermixe wurden analog zu dem in Kap. 2.4.2 aufgeführten Mastermix angesetzt (S. 31).

PCR-Programm

94°C	4 min	} 35 Zyklen
94°C	30 s	
T _a *	30 s	
72°C	60 s	
72°C	7 min	

* GSPs für semiquantitative RT-PCR: T_a = 55°C,
GSPs für Real-Time PCR: T_a = 60°C

Jeweils 3,5 µl der erhaltenen PCR-Produkte wurden per Agarose-Gelelektrophorese gemäß Kapitel 2.3.3 (S. 28) analysiert [2,5 % (w/v) Agarose]. Bei Erhalt der erwarteten Produktgrößen (vgl. Tab. 15, S. 73) wurden die verbleibenden PCR-Produkte mit dem High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics) entsprechend Herstellerprotokoll aufgereinigt und unter Verwendung der zugehörigen GSPs sequenziert (AG Hedrich, Universität Würzburg, vgl. Kap. 2.4.6, S. 36). Wiesen die PCR-Produkte die erwarteten Sequenzen auf, so wurden die GSPs für Expressionsanalysen eingesetzt.

2.5.2 Semiquantitative RT-PCR

2.5.2.1 Normalisierung der cDNA-Proben

Die cDNA-Proben wurden vor Verwendung normalisiert, um in den Genexpressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR gleiche cDNA-Mengen als template einzusetzen. Mit der Normalisierung wurden unterschiedliche Ausbeuten an Gesamt-RNA bei der Extraktion (vgl. Abb. 22 und 23, S. 78 und 79), sowie Variationen bei der Herstellung der cDNA (Stürzenbaum und Kille 2001) kompensiert. Für jede cDNA-Probe wurden individuelle Verdünnungsfaktoren und template-Volumina ermittelt. Dazu wurde die Expression der 18S Untereinheit der ribosomalen RNA der Robinie (*Rp18S rRNA*) als Referenz herangezogen.

Das *18S rRNA*-Gen hat sich als stabil exprimiertes, d.h. von einer Vielzahl von Entwicklungs- und Reizzuständen unbeeinflusstes Gen erwiesen (Kim et al. 2003, Nicot et al. 2005).

Die Normalisierung erfolgte durch wiederholte PCR-Läufe mit GSPs für *Rp18S* [vgl. Kapitel 2.3.3, S. 28], den cDNAs als template, sowie mit Zyklenzahlen, bei denen sich die Amplifikation in der exponentiellen Phase befand (Details siehe unten). Nach jeder PCR wurden die relativen Bandenintensitäten der Amplifikationsprodukte im Agarosegel (2,5 %) densitometrisch quantifiziert (Gel documentation system, Biorad, Quantity One v.4,5 Software, Biorad) und auf dieser Basis der Verdünnungsfaktor und das template-Volumen jeder cDNA-Probe für die darauffolgende PCR modifiziert. Durch mehrfache Wiederholung von PCR, Gelelektrophorese und Densitometrie wurden die Verdünnungsfaktoren und template-Volumina sukzessive angepasst, bis gleiche Bandenintensitäten des *Rp18S*-PCR-Produkts in allen Proben eines Probensatzes erhalten wurden.

Abweichend von dieser Vorgehensweise wurden bei zwei Zielgenen (*RpCHS4* und *RpCHS5*, siehe Tab. 6, S. 45) die template-Volumina – bezogen auf die durch Normalisierung ermittelten template-Volumina – verdoppelt, um PCR-Produkte mit densitometrisch messbaren Bandenintensitäten zu erhalten.

Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes von ca. 12,5 µl:

Mastermix PCR 1x ~12,5 µl

7,825 µl Reinstwasser
2,500 µl Q-Solution
1,250 µl 10x Reaktionspuffer
0,250 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid)
0,150 µl *Rp18S* forward Primer (100 µM, Biomers)
0,150 µl *Rp18S* reverse Primer (100 µM, Biomers)
0,075 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

~0,300 µl cDNA¹

~12,5 µl

¹ Das Volumen an eingesetzter cDNA-Lösung wurde bei der Normalisierung schrittweise modifiziert und variierte abhängig von der Probe zwischen 0,075 µl und 0,63 µl.

PCR-Programm

94°C	4 min	
94°C	30 s	} 20/19 Zyklen*
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	

* Zyklenzahlen: Robinienstammquerschnitte 20 Zyklen, Pathogenholz 19 Zyklen (vgl. Tab. 6 auf S. 45)

Sequenzen der *Rp18S* GSPs (PCR-Produkt 371 bp):

Forward: 5'-CTTCGGGATCGGAGTAATGA-3' ($T_m = 57^\circ\text{C}$)

Reverse: 5'-GGTAAGTTTCCCCGTGTTGA-3' ($T_m = 57^\circ\text{C}$)

Nach Ermittlung der probenspezifischen Verdünnungen und template-Einsatzvolumina traten geringe Variationen in den *Rp18S*-Bandenintensitäten auf. Aus diesem Grund wurde für jede cDNA-Probe ein Korrekturfaktor (F) ermittelt, der diese Variationen kompensierte. Dazu wurde die PCR mit der normalisierten cDNA und den *Rp18S*-GSPs fünfmal wiederholt. Es folgte eine Analyse per Agarose-Gelelektrophorese und die densitometrische Quantifizierung der PCR-Produktbanden (Programm: Quantity One v.4.5, Biorad, Details siehe Kap. 2.5.2.3, S. 46). Es wurde der prozentuale Anteil (R_{probe} [%]) einer jeden Bandenintensität (BI_{probe}) an der Gesamt-Bandenintensität aller Proben eines Probensatzes (BI_{Summe}) errechnet [$R_{\text{probe}} = (BI_{\text{probe}}/BI_{\text{Summe}}) \times 100$]. Der Korrekturfaktor F wurde berechnet durch Division des prozentualen Anteils R_{real} durch den idealen Anteil ($R_{\text{ideal}} = 100\%/ \text{Probenzahl}$) ($F = R_{\text{probe}}/R_{\text{ideal}}$).

F floss in die Berechnung der relativen Expressionswerte aus der semiquantitativen RT-PCR ein.

2.5.2.2 Durchführung der semiquantitativen RT-PCR

Vor Beginn der Expressionsanalysen wurden mit Hilfe von vorab durchgeführten PCR-Experimenten individuelle Zyklenzahlen für jedes Zielgen und für den jeweiligen Probensatz ermittelt (Robinienstammquerschnitte, bzw. Pathogenholz; siehe Tab. 6). Mit diesen Zyklenzahlen und den normalisierten cDNA-Proben wurden PCRs in Ansätzen von

ca. 12,5 µl durchgeführt (geringe Abweichungen ergaben sich durch die individuell eingestellten cDNA-template-Volumina).

Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes und PCR-Programm:

Mastermix PCR 1x ~12,5 µl

7,825 µl Reinstwasser
 2,500 µl Q-Solution
 1,250 µl 10x Reaktionspuffer
 0,250 µl dNTP-Mix (10 mM für jedes Nukleotid)
 0,150 µl Forward GSP (100 µM, Biomers)
 0,150 µl Reverse GSP (100 µM, Biomers)
 0,075 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

~0,300 µl normalisierte cDNA¹

~12,5 µl

¹ cDNA-Volumina und –Verdünnungen variierten infolge der Normalisierung, vgl. Kap. 2.5.2.1, S. 42

PCR-Programm

94°C	4 min	} 26-39 Zyklen, siehe Tab. 6
94°C	30 s	
55°C	30 s	
72°C	45 s	
72°C	7 min	

Tabelle 6 – Übersicht der in der semiquantitativen RT-PCR angewendeten Zyklenzahlen. Sterne (*) markieren die Assays, bei denen die template-Volumina – bezogen auf die durch Normalisierung ermittelten template-Volumina – verdoppelt wurden.

Zielgen	Robinienstammquerschnitte	Pathogenholz
<i>RpPAL1</i>	30	26
<i>RpPAL2</i>	34	30
<i>RpPAL3</i>	39	34
<i>RpCHS3</i>	34	30
<i>RpCHS4</i>	34*	34
<i>RpCHS5</i>	34*	34
<i>Rp18S</i>	20 (Normalisierung)	19 (Normalisierung)

Für die Expressionsanalysen in Robinienstammquerschnitten wurde pro Jahreszeit jeweils ein Baum untersucht, was einem Probensatz von 23 cDNA-Proben entsprach (vgl. Tab. 1 auf S. 24).

Für die Expressionsanalysen im Pathogenholz wurden vier Replikate (P1 - P4) und für die nicht infizierten Kontrollen zwei Replikate verwendet (K1, K2), was einem Probensatz von 34 cDNA-Proben entsprach. Dieser Probensatz wurde unterteilt in 12 Proben (P1, P4) und 22 Proben (P2, P3, K1, K2) (vgl. Tab. 2 in Kap. 2.2.2, S. 25).

Mit einer PCR wurde die Expression jeweils eines Zielgens innerhalb dieser Probensätze analysiert. Jede PCR wurde unabhängig voneinander mindestens dreimal wiederholt.

Parallel zu den Proben wurden bei jeder PCR Negativkontrollen ohne template durchgeführt (0,3µl Reinstwasser anstelle von cDNA).

2.5.2.3 Auswertung semiquantitative RT-PCR

Jeder PCR folgte eine Analyse der Amplifikationsprodukte durch Gelelektrophorese von jeweils 3,5 µl der PCR-Ansätze im Agarosegel [2,5 % (w/v) Agarose] wie in Kapitel 2.3.3 (S. 28) beschrieben. Die Intensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produktbanden wurden densitometrisch quantifiziert (Programm: Quantity One v.4.5, Biorad). Dazu wurde mit Hilfe der Software für jede Bande der zu quantifizierende Bereich in Form eines rechteckigen Kästchens festgelegt. Die Kästchengrößen waren bei allen Proben identisch. Hintergrundintensitäten wurden mit Kästchen derselben Größe in unmittelbarer Nähe einer jeden Bande gemessen. Die Messwerte wurden mit Hilfe von Microsoft Excel weiterverarbeitet. Die Auswertung beinhaltete folgende Schritte:

- (1) Subtraktion der Hintergrundintensitäten von den Bandenintensitäten,
- (2) Berechnung der prozentualen Bandenintensität (= R_{Probe} , siehe Kap. 2.5.2.1, S. 44),
- (3) Berechnung der Mittelwerte aus den prozentualen Bandenintensitäten der PCR-Replikate
- (4) Multiplikation der Mittelwerte mit dem Korrekturfaktor F aus der Normalisierung (siehe Kap. 2.5.2.1, S. 44)
- (5) Umrechnung der Werte in Bezug auf die Probe mit der höchsten Bandenintensität ¹ (Expression der Probe mit höchster Bandenintensität = 1).
- (6) Multiplikation der Werte mit dem Korrekturfaktor K. ²

¹ Für Schritt (5) wurde bei den Proben der Robinienstammquerschnitte die TZ-Sommer-Probe als Bezugsprobe gewählt. Bei den Proben aus Pathogenholz wurde der Mittelwert der vier 360 d_{ai}-Proben der Pathogenholzparallelen P1, 2, 3 und 4 als Bezugsprobe gewählt (vgl. Tab. 2, S. 25).

² Es wurde ein Korrekturfaktor K errechnet, der die unterschiedlichen Zyklenzahlen bei der semiquantitativen RT-PCR kompensiert und in dessen Berechnung die Amplifikations-effizienzen (E) bei den PCRs mit den GSP-Paaren einfluss. E wurde analog zu der in Kap. 2.5.3.4 (S. 52) beschriebenen Vorgehensweise ermittelt und stellte sich als annähernd konstant heraus ($E = 2$). K wurde berechnet nach der Gleichung $K = (2^{n_2}) / (2^{n_1})$, mit n_2 und n_1 = Zyklenzahlen der PCRs für Zielgen 1 und 2. Hierbei stellt n_1 die jeweils niedrigste Zyklenzahl dar, die innerhalb der jeweiligen Genfamilie angewendet wurde (*RpPAL1*, bzw. *RpCHS3*, vgl. Tab. 6 auf S. 45). K wurde somit nur für die Korrektur der Expressionswerte der Zielgene berechnet, bei denen jeweils höhere Zyklenzahlen angewendet wurden (*RpPAL2* und 3, bzw. *RpCHS4* und 5).

2.5.3 Real-Time PCR

2.5.3.1 Versuchsdesign und Probenaufteilung

Bei der Konzipierung des Versuchsdesigns wurde die von Hellemans und Mitarbeitern (2007) empfohlene Strategie der Probenmaximierung angewendet. Diese beinhaltet, dass bei einem Experiment mit einer Proben- und Zielgen-Anzahl, welche mit mehr als einem PCR-Lauf (Einzelexperiment) „abgearbeitet“ werden muss, die Anzahl der in ein Einzelexperiment einbezogenen Proben maximiert werden sollte.

In dieser Arbeit wurde die Expression von sechs Zielgenen (3x *RpPAL*, 3x *RpCHS*) und die Expression von *Rp18S* als interner Referenz analysiert. Dies galt für die Robinienstammquerschnitte und das Pathogenholz.

Der Probensatz für die Expressionsanalysen in Robinienstammquerschnitten bestand aus jeweils drei biologischen Replikaten (Einzelbäumen) von jedem der fünf Probennahmezeitpunkte (Frühjahr, Sommer, Spätsommer, Herbst, Spätherbst). Aus jedem Einzelbaum wurden zwischen drei und fünf Gewebeabschnitte analysiert (DX, EW, OS, IS, TZ, siehe Tab. 7), was insgesamt 54 Proben ergab. Die mittlere Splintholzzone (MS) wurde im Interesse einer Reduktion der Probenzahlen und aufgrund der Erkenntnis, dass die *PAL*- und *CHS*-Gene im MS nicht oder nur äußerst schwach exprimiert sind, aus den Analysen ausgeschlossen. In einem PCR-Lauf (Einzelexperiment) wurde die Expression eines Zielgens in 18 Proben analysiert, bestehend aus den Gewebeabschnitten jeweils eines Einzelbaums für jeden Probennahmezeitpunkt während der Vegetationsperiode. (Tab. 7). Auf diese Weise wurde mit drei Einzelexperimenten die relative Expression eines Zielgens in allen 54 Proben gemessen. Für jede Probe wurde die PCR in drei parallelen Ansätzen (Triplikaten) durchgeführt.

Tabelle 7 – Probenübersicht der Gewebebereiche aus Robinienstammquerschnitten, die in die Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR einbezogen wurden. Abkürzungen: × – einbezogen mit 3 biologischen Replikaten, n.p. – nicht präpariert, DX – differenzierendes Xylem, EW – Frühholz (engl. early wood), OS – äußeres Splintholz (engl. outer sapwood), IS – Inneres Splintholz, TZ – Splint-Kern-Übergangszone (engl. transition zone).

	DX	EW	OS	IS	TZ
Frühjahr (Bäume 1, 2, 3)	×	n.p.	×	×	×
Sommer (Bäume 4, 5, 6)	×	×	×	×	×
Spätsommer (Bäume 7, 8, 9)	n.p.	n.p.	×	×	×
Herbst (Bäume 10, 11, 12)	n.p.	n.p.	×	×	×
Spätherbst (Bäume 13, 14, 15)	n.p.	n.p.	×	×	×

Der Probensatz aus dem Pathogenholz bestand aus insgesamt 34 Proben, die sich aus der Summe von vier biologischen Replikaten von infizierten Holzproben (P 1-4), zwei biologischen Replikaten von nicht infizierten Kontrollen (K1, K2) und sechs Beprobungszeitpunkten [0, 3, 7, 30, 90 und 360 Tage nach Inokulation (d_{ai} – days after inoculation)] ergaben (vgl. Tab. 2, S. 25). Von P2 und P3 wurden 0 d_{ai} keine Proben präpariert.

Der Probensatz wurde in zwei Sätze aus jeweils 18 Proben (P1, P4, K1), bzw. 16 Proben (P2, P3, K2) aufgeteilt. In den Einzelexperimenten wurde die Expression jeweils eines Zielgens in diesen beiden Probensätzen analysiert, so dass mit zwei Einzelexperimenten die Expression eines Zielgens im gesamten Probensatz gemessen wurde. Für jede Probe wurde die PCR in drei parallelen Ansätzen (Triplikaten) durchgeführt.

2.5.3.2 Durchführung der Real-Time PCR

Als Messapparatur für die Real-Time PCR wurde das MX3005P QPCR System (Stratagene) verwendet. Mit der Software MX Pro (Stratagene) wurde das System gesteuert, die Messwerte aufgenommen und für die Auswertung aufbereitet.

Die bei allen Einzelproben identischen Komponenten (Pufferlösung, DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, Fluoreszenzfarbstoff) wurden durch den Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix (Stratagene) bereitgestellt. Genspezifische Primer wurden wie in Kapitel 2.5.1 (S. 41) beschrieben konstruiert (Details siehe Tab. 16, S. 75). Von der Firma Biomers.net

GmbH (Ulm) wurden sie hergestellt. Die cDNA-Proben wurden wie in Kapitel 2.3 (S. 26 – 28) beschrieben hergestellt.

Eine PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 15 µl durchgeführt und hatte folgende Zusammensetzung:

Mastermix Real-Time PCR 1x 15 µl

7,500 µl 2x Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix

3,825 µl Reinstwasser

3,000 µl Primer-Mix¹ (Forward- und Reverse-Primer mit jeweils 3 µM)

0,225 µl Referenzfarbstoff² (2 µM)

0,450 µl template (cDNA bzw. Standardtemplate)

15,000 µl

[¹ Primer-Mix: Je 3 µM von Forward- und Reverse-Primer in Reinstwasser.
Endkonzentration jedes Primers im PCR-Ansatz: 600 nM.]

[² Referenzfarbstoff: Fluoreszenzfarbstoff ROX (6-Carboxy-X-Rhodamin),
Komponente des Brilliant® II SYBR® Green QPCR Master Mix Kit,
Endkonzentration im PCR-Ansatz 30 nM.]

Das Temperatur-Zeit-Programm der Real-Time PCR war für alle Analysen identisch. Es gliederte sich in drei Segmente: Segment 1: Inkubation für zehn Minuten bei 95°C zur Denaturierung der DNA und Aktivierung der Taq-Polymerase, Segment 2: Amplifikation, Segment 3: Erstellung einer Dissoziationskurve (siehe Abb. 5, S. 50). Die Amplifikation (Segment 2) wurde mit 50 Zyklen durchgeführt, wobei jeder Einzelzyklus aus den Abschnitten Denaturierung (30 s 95°C), Primer-Annealing (30 s 60°C) und Elongation (30 s 72°C) bestand. Nach jeder Elongation wurde die Fluoreszenz von (dsDNA-gebundenem) SYBR Green und die des Referenzfarbstoffs ROX am Ende jedes Zyklus bei 72°C gemessen.

- Fluoreszenz von SYBR Green: Excitation 492 nm, Emission 516 nm,
- Fluoreszenz von ROX: Excitation 584 nm, Emission 612 nm.

Die Dissoziationskurven (segment 3) wurden erstellt, indem die PCR-Reaktionsansätze von 60 auf 95°C in Intervallen von 0,5°C erhitzt und nach jedem Intervall die SYBR Green-Fluoreszenz gemessen wurde. Zuvor wurde für eine Minute bei 95°C inkubiert (Abb. 5).

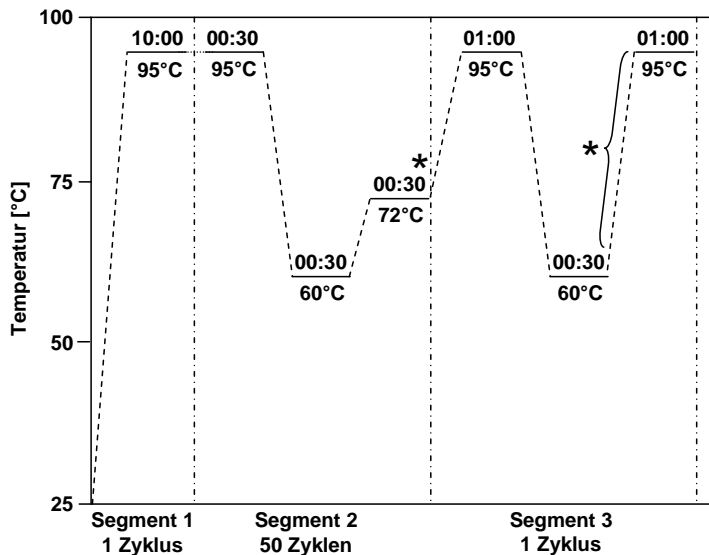


Abbildung 5 – Zeit-Temperatur-Diagramm der Real-Time PCR (schematisch nach Darstellung in der Mx Pro Software). Unterhalb der Stufen ist die Temperatur eines Abschnitts, oberhalb die Dauer aufgeführt. Schräge gestrichelte Linien symbolisieren Heiz-, bzw. Kühlphasen. Die Sterne zeigen die Zeitpunkte der Fluoreszenzmessungen an.

Die Dissoziationskurve gab Aufschluss darüber, ob das erwartete PCR-Produkt gebildet wurde, bzw. lieferte einen Anhaltspunkt über die Zusammensetzung der Amplifikationsprodukte. Funktionsprinzip: Nach vollendeter Amplifikation werden die PCR-Ansätze erhitzt, simultan die SYBR Green-Fluoreszenz gemessen und die Messwerte als Funktion der Temperatur graphisch aufgetragen (automatisch von der MX Pro Software durchgeführt). Es wird eine Dissoziationskurve mit charakteristischem Verlauf erhalten. Die Kurve beruht auf der gleichzeitigen Dissoziation der DNA-Doppelstränge des Amplifikationsprodukts und des daran gebundenen SYBR Green Farbstoffs, dessen Fluoreszenz im ungebundenen Zustand geringer ist als im dsDNA-gebundenen Zustand. Die Dissoziation beginnt bei einer bestimmten Temperatur (der für das Produkt charakteristischen „Schmelztemperatur“) und macht sich durch eine messbare Abnahme der Fluoreszenz F bemerkbar. Eine Umformung der Dissoziationskurve [$F = f(T)$] durch Bildung der 1. Ableitung nach der Temperatur und Vorzeichenumkehrung ($-dF/dT$) liefert einen Kurvenverlauf mit charakteristischem Peak, dessen Maximum bei der produktspezifischen Schmelztemperatur liegt.

Die Schmelztemperaturen der erwarteten Produkte wurden vor Beginn der Analysen für jedes GSP-Paar ermittelt (siehe Tab. 16, S. 75). Unerwünschte Amplifikationsprodukte, wie z.B. Primerdimere, wurden anhand von Peaks mit abweichenden Schmelztemperaturen identifiziert. Diese traten vornehmlich bei Proben auf, in denen das jeweilige Zielgen sehr schwach oder überhaupt nicht exprimiert wurde. Solche PCR-Ansätze wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Während der Real-Time PCR wurden die Fluoreszenzmesswerte von der MX Pro Software in Form einer Datei gespeichert und für die weitere Auswertung aufbereitet. Letztere

beinhaltete die Normalisierung der SYBR Green-Fluoreszenz relativ zur ROX-Fluoreszenz des Referenzfarbstoffes, die Darstellung der Amplifikations- und Dissoziationskurven jedes einzelnen PCR-Reaktionsansatzes und die Erstellung der Standardgeraden für die Ermittlung der Amplifikationseffizienz (Kap. 2.5.3.4).

2.5.3.3 Kalibrierung der Einzelexperimente

Um die Vergleichbarkeit der Einzelexperimente untereinander zu gewährleisten, wurden bei jedem Einzelexperiment parallel zu den Proben Kontrollreaktionen (interplate controls, IPCs) zur Kalibrierung durchgeführt. Für die IPCs wurden die genspezifischen Primer für *RpPAL1* verwendet (siehe Tab. 16, S. 75). Als template kam Plasmid-DNA mit einem *RpPAL1*-Sequenzfragment zum Einsatz, welche auch für die Ermittlung der Amplifikationseffizienzen herangezogen wurde (siehe nachfolgendes Kapitel). Das template hatte eine Konzentration von ca. 5,2 pg DNA/ μ l und wurde mit 0,03 μ l pro Mikroliter PCR-Ansatz eingesetzt (ca. 0,156 pg/ μ l Endkonzentration, Einsatzmenge identisch mit Verdünnungsfaktor 10^5 in Tab. 8, S. 52). Die PCR-Ansätze der IPCs hatten dieselbe Zusammensetzung wie der in Kap. 2.5.3.2 aufgeführte Mastermix (S. 49) und wurden in Triplikaten durchgeführt.

Prinzip der Kalibrierung: Die Kalibrierung erfolgte nach einem Einzelexperiment mittels manueller Anpassung der jeweiligen „threshold“-Werte in den von der MxPro Software erstellten Amplifikationskurven. Der „threshold“ (Schwellwert) stellt SYBR Green-Fluoreszenzwert dar und entspricht im Diagramm der Amplifikationskurven einer horizontalen Gerade. Er wird in den unteren Bereich der Amplifikationskurven, der exponentiellen Phase entsprechend, gelegt. Der Zyklus, bei dem sich die threshold-Gerade und die Amplifikationskurve schneiden, ist der C_T -Wert („threshold cycle“), der in die Berechnung der (relativen) Transkriptmenge des Zielgens einfließt. Die Kalibrierung der Einzelexperimente erfolgte durch manuelle Einstellung des „thresholds“ auf einen Wert, der bei den IPCs der Einzelexperimente in einem konstanten C_T -Wert resultierte. Dieser konstante C_T -Wert wurde bei den IPCs aller Einzelexperimente auf 17,77 Zyklen festgelegt (Mittelwert der C_T -Werte der drei Replikate).

Die auf diese Weise kalibrierten C_T -Werte wurden in eine Microsoft Excel-Datei exportiert und zur Ermittlung der relativen Expressionswerte weiterverarbeitet (siehe Kap. 2.5.3.5, S. 53).

2.5.3.4 Ermittlung der Amplifikationseffizienzen

Es wurde eine Amplifikationseffizienz E für die PCR mit jedem genspezifischen Primerpaar (GSP) ermittelt. Dazu wurden bei jedem Einzelexperiment parallel zu den analysierten Proben PCRs mit den Zielgen-GSPs und mit seriell verdünnten templates durchgeführt. Als templates dienten Plasmide, bestehend aus dem Klonierungsvektor pCR 2.1 TOPO (Invitrogen) und einem für das jeweilige Zielgen spezifischen Sequenzfragment (Fragment der *cds* + 3'-UTR). Die Plasmide stammten aus den Klonierungen, die bei der Identifizierung von *PAL*- und *CHS*-Genen durchgeführt wurden (vgl. Kap. 2.4.3, S. 32). Für jedes Zielgen wurde die Plasmid-DNA seriell mit Reinstwasser verdünnt und die in Tabelle 8 aufgeführten Verdünnungsstufen als template eingesetzt. Für *Rp18S* (interne Referenz) wurde anstelle von Plasmid-DNA genomische DNA aus der Robinie eingesetzt, die aus Splintholz extrahiert und analog verdünnt wurde (vgl. Kap. 2.3.1, S. 26 und Tab. 8). Die Konzentration der Plasmid-DNA-Stammlösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm (OD_{260}) mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) gemessen und nach der Beziehung $1 OD_{260} = 50 \mu\text{g/ml dsDNA}$ berechnet (Sambrook und Russell 2001).

Tabelle 8 – Spezifikationen der als template verwendeten Plasmid-DNA (Vektor pCR 2.1 TOPO, Invitrogen). Aufgelistet ist die Spezifität (Zielgen), das in den Vektor jeweils einklonierte Teilfragment (vgl. Abb. 10 und 12 in Kap. 3.1), die DNA-Konzentrationen der Plasmid-DNA, die durch OD_{260} -Messung bestimmt wurden (Mittelwerte von 4 unabhängigen Messungen), sowie die für die PCR verwendeten Verdünnungsstufen der templates. n.b. – nicht bestimmt.

Zielgen	Teilfragment	DNA-Konz. [ng/ μ l]	Verdünnungsstufen
<i>RpPAL1</i>	<i>RpPAL1.2</i>	520	$10^4 / 10^5 / 10^6 / 10^7$
<i>RpPAL2</i>	<i>RpPAL2.4</i>	891	$10^5 / 10^6 / 10^7 / 10^8$
<i>RpPAL3</i>	<i>RpPAL3</i>	504	$10^4 / 10^5 / 10^6 / 10^7 / 10^8$
<i>RpCHS3</i>	<i>RpCHS3.2</i>	741	$10^4 / 10^5 / 10^6 / 10^7 / 10^8$
<i>RpCHS4</i>	<i>RpCHS4.3</i>	623	$10^4 / 10^5 / 10^6 / 10^7 / 10^8$
<i>RpCHS5</i>	<i>RpCH5.2</i>	568	$10^4 / 10^5 / 10^6 / 10^7 / 10^8$
<i>Rp18S</i>	-	n.b.	$10^0 / 10^1 / 10^2 / 10^3 / 10^4$

Die Zusammensetzung der PCR-Reaktionsansätze war identisch mit dem in Kap. 2.5.3.2 aufgeführten Mastermix (S. 49). Jede PCR-Reaktion wurde in Triplikaten durchgeführt.

Die erhaltenen C_T -Werte wurden als Funktion des dekadischen Logarithmus des reziproken Verdünnungsfaktors ($1/VF$) graphisch aufgetragen [$C_T = f(\log_{10} 1/VF)$, siehe Abb. 6] und aus der Steigung m der Regressionsgeraden die Amplifikationseffizienz E nach Gleichung (2) berechnet (Pfaffl et al. 2001).

$$E = 10^{-\left(\frac{1}{m}\right)} \quad (2)$$

Theoretisch gilt $1 \leq E \leq 2$.

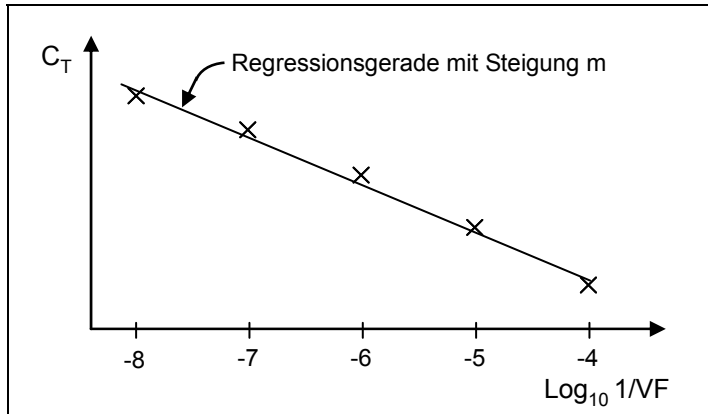


Abbildung 6 – Schematische Darstellung der aus der Funktion $C_T = f(\text{Log}_{10} 1/VF)$ abgeleiteten Standardgeraden zur Ermittlung der Amplifikationseffizienz E. VF – Verdünnungsfaktor des templates.

Die Amplifikationseffizienzen E der Zielgen-GSPs wurden insgesamt fünfmal unabhängig voneinander bestimmt.

Zur Überprüfung, ob die Beschaffenheit des templates einen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz hat, wurde die Bestimmung von E für jedes GSP-Paar nochmals mit seriellen Verdünnungsreihen von cDNA wiederholt. Für die PAL-spezifischen GSPs wurde hierfür cDNA aus differenzierendem Xylem (DX, Sommer) eingesetzt, für die CHS-spezifischen GSPs cDNA, die aus mehreren Pathogenholzproben (360 d_{ai}) zu gleichen Anteilen gemischt wurde. Die Durchführung erfolgte analog zum oben beschriebenen Protokoll.

2.5.3.5 Berechnung der relativen Expression

Die Berechnung der relativen Expression eines Zielgens in einer gegebenen Probe (NRQ – normalisierte relative Quantität), bezogen auf das konstant exprimierte Referenzgen *Rp18S*, wurde in Anlehnung an Pfaffl et al. (2001) durchgeführt [Gleichung (3)].

$$\text{NRQ} = \frac{E_{\text{Ref}}^{C_{T,\text{Ref}}(\text{Probe})}}{E_{\text{Ziel}}^{C_{T,\text{Ziel}}(\text{Probe})}} \quad (3)$$

NRQ – normalisierte relative Quantität

E_{Ziel} – Amplifikationseffizienz des Zielgens, vgl. Kap. 2.5.3.4, S. 52

E_{Ref} – Amplifikationseffizienz des Referenzgens, vgl. Kap. 2.5.3.4, S. 52

$C_T(\text{Probe})$ – threshold cycle („Schwellenwert-Zyklus“) einer gegebenen Probe.

3. Ergebnisse

3.1 Identifizierung von *PAL*- und *CHS*-Genen

3.1.1 Klonierungen

Die in Kapitel 2.4 (S. 29) beschriebenen Methoden zur Identifizierung von *PAL*- und *CHS*-Genfragmenten wurde mehrfach durchgeführt. Deshalb werden im Folgenden die Zwischenergebnisse der einzelnen Arbeitsschritte beispielhaft anhand einer Klonierung auf Basis von cDNA präsentiert und mit Gelfotos veranschaulicht. In weiteren, an dieser Stelle nicht detailliert beschriebenen Klonierungen diente auch genomische DNA der Robinie als PCR template (vgl. Kap. 2.3.1, S. 26).

Mit Hilfe der degenerierten Primerpaare FA/RA (spezifisch für *CHS*), F5/R3 (*CHS*), F2/R3 (*PAL*) und F3/R3 (*PAL*) und cDNA aus der Splint-Kern-Übergangszone (Herbst), sowie genomischer DNA als template wurden PCRs durchgeführt. Im Folgenden wird exemplarisch die Klonierung der aus cDNA erhaltenen Amplifikationsprodukte beschrieben. Diese entsprachen gemäß der gelelektrophoretischen Analyse den erwarteten Fragmentgrößen von 443 bp (FA/RA), 423 bp (F5/R3), 488 bp (F2/R3), bzw. 448 bp (F3/R3) (Abb. 7).

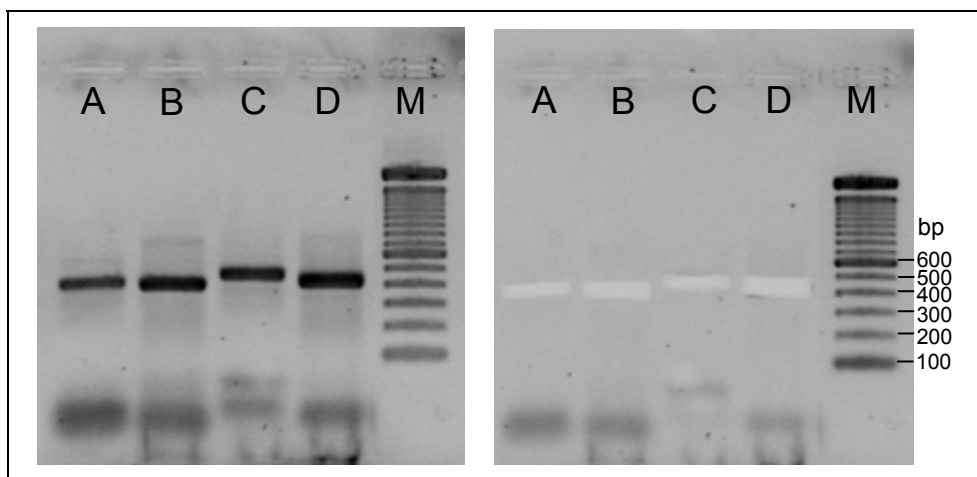


Abbildung 7 – Präparatives Gel zur Klonierung von *PAL*- und *CHS*-Genfragmenten vor (links) und nach (rechts) der Präparation. PCR-Produkte: **A** – Primerpaar FA/RA (*CHS*, 443 bp), **B** – Primerpaar F5/R3 (*CHS*, 423 bp), **C** – Primerpaar F2/R3 (*PAL*, 488 bp), **D** – F3/R3 (*PAL*, 448 bp), **M** – Größenmarker 100 bp Ladder (Invitrogen).

Im Folgenden werden die mit dem Primerpaar FA/RA erhaltenen *CHS*-Fragmente und die daraus erhaltenen Klone mit **A** bezeichnet und die mit dem Primerpaar F5/R3 erhaltenen mit

B. Die weitere Aussortierung (Selektion) redundanter Klone wird im Folgenden repräsentativ für alle übrigen Klonierungen beschrieben.

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurden die PCR-Produkte von **A** und **B** aus dem Gel präpariert, in den Vektor pCR2.1 TOPO ligiert und mit diesen kompetente *E.coli*-Zellen transformiert. Von den auf Selektivmedium ausplattierten *E.coli*-Zellen (Blau-Weiß-Screening) wurden rekombinante Klone in LB-Flüssigmedium subkultiviert. Per M13-PCR mit einem Aliquot der Kultivierungslösung als template wurden die klonierten Genfragmente selektiv amplifiziert und abermals per Agarose-Gelelektrophorese analysiert. In Abb. 8 ist ein Agarosegel mit M13-PCR-Produkten von *CHS*-Klonen von **A** (10 Klone) und **B** (12 Klone) dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die erwarteten Produktgrößen von 644 (**A**), bzw. 624 bp (**B**) erhalten wurden und damit alle Klone die gewünschten Fragmente enthielten (443 bp Genfragment + 201 bp flankierende Vektorabschnitte, bzw. 423 + 201 bp).

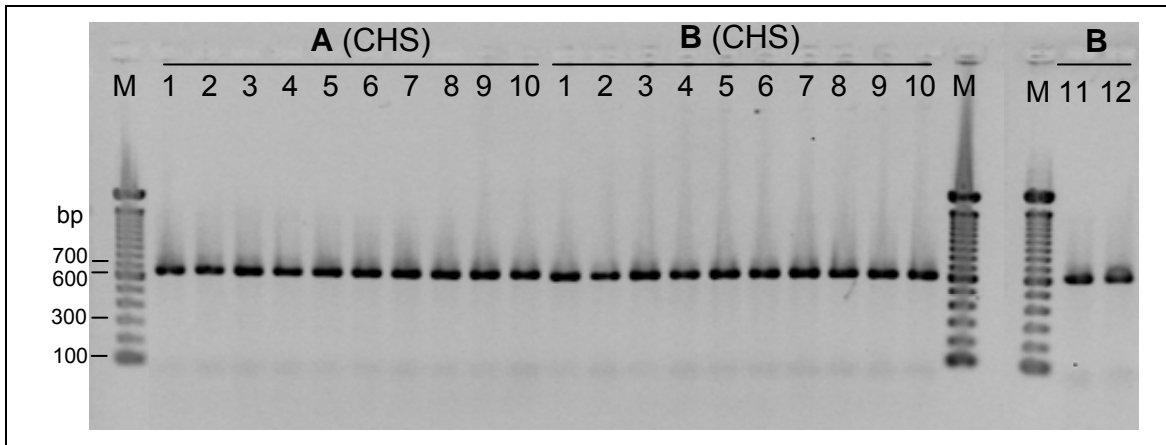


Abbildung 8 – Amplifikationsprodukte der M13-PCR am Beispiel der klonierten *CHS*-Genfragmente **A** (644 bp, 10 Klone) und **B** (624 bp, 12 Klone). M - Größenmarker 100 bp Ladder (Invitrogen)

Anschließend wurden die M13-PCR-Produkte einer Restriktionsanalyse mit den Restriktionsenzymen *Alu I* und *Rsa I* unterzogen. Die im Agarose-Gel sichtbar gemachten Restriktionsfragmente zeigten, dass ein Großteil der Klone identische Restriktionsmuster aufwies (Abb. 9). Es wurden von **A** die Klone 5 und 6 für die Sequenzierung ausgewählt. Klon 5 wurde stellvertretend für die Klone 2, 3, 4, 5, 7, 9, und 10, und Klon 6 stellvertretend für die Klone 1, 6 und 8 ausgewählt. Von **B** wurden die Klone 2, 5 und 11 ausgewählt. Das Restriktionsmuster von Klon 11 war einzigartig, Klon 2 wurde stellvertretend für die Klone 2, 4 und 12 und Klon 5 stellvertretend für die Klone 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 ausgewählt.

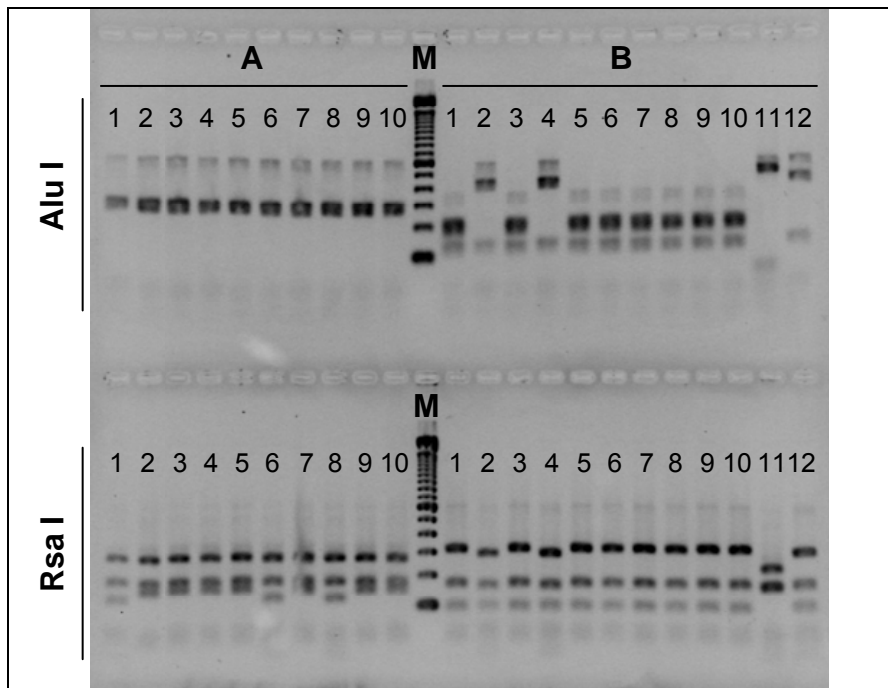


Abbildung 9 – Restriktionsanalyse der in Abb. 8 abgebildeten M13-PCR-Produkte von **A** (10 Klone) und **B** (12 Klone) mit den Restriktionsenzymen Alu I (oben) und Rsa I (unten). Gezeigt sind die im Agarosegel aufgetrennten Restriktionsfragmente. M - 100 bp Ladder (Invitrogen, Bandengrößen siehe Abb. 7).

Von den ausgewählten Klonen wurde die Plasmid-DNA isoliert und die klonierten Genfragmente sequenziert. Diese wurden im Nachhinein, d.h. nach Abschluss der Genidentifizierung, folgenden *CHS*-Genfragmenten zugeordnet:

A: Klon 5 = Klon 6 = *RpCHS3* (Beide entsprechen Teilfragment *RpCHS3.2* in Abb. 12, S. 65)

B: Klon 2 = Klon 11 = *RpCHS3*, Klon 5 = *RpCHS4* (Klone 2 und 11 entsprechen Teilfragment *RpCHS3.1*, vgl. Abb. 12, S. 65)

Mit den erhaltenen *CHS*-Sequenzfragmenten wurde *in silico* eine Restriktionsanalyse durchgeführt, um die mehrfache Identität der Klone mit *RpCHS3* trotz unterschiedlicher Restriktionsmuster herzuleiten (Verwendung des online verfügbaren Programms Restrictionmapper, www.restrictionmapper.org). Die *in silico* erhaltenen Restriktionsfragmente stimmten mit denen im Gel überein (Tab. 9). So zeigte sich, dass bei Klon 5 und 6 (**A**) die unterschiedlichen Restriktionsmuster des Rsa I-Verdau auf eine fehlende Schnittstelle bei Klon 5 zurückzuführen ist. Ursache hierfür ist ein Basenaustausch (T statt C). Die fehlende Schnittstelle liegt im Bereich des degenerierten Primers FA, und der Basenaustausch wurde durch das degenerierte Nukleotid Y (=C/T) an Position 12 verursacht (vgl. Tab. 3, S. 30). Die Identität der Klone 2 und 11 (**B**) mit dem Genfragment *RpCHS3*

- trotz unterschiedlicher Restriktionsmuster – wurde durch die unterschiedliche Orientierung der Genfragmente innerhalb des Vektors verursacht.

Tabelle 9 – Übersicht der durch *in silico*-Restriktionsverdau mit Alu I und Rsa I erhaltenen Fragmentgrößen [bp] der Klone 5 und 6 aus der Klonierung **A** und der Klone 2, 5 und 11 aus Klonierung **B**. Des Weiteren ist die Orientierung der PCR-Produkte (Prod) innerhalb der M13-PCR-Produkte angegeben. MCS - Multiple Cloning Site. Indices geben die Länge des DNA-Fragments an [bp]. MCS₁₁₂ = Abschnitt zwischen M13-Forward-Primer und Ligationsstelle, MCS₉₀ = Abschnitt zwischen M13-Reverse-Primer und Ligationsstelle.

Klon.	Nr.	Fragmente Alu I	Fragmente Rsa I	Orientierung
A	5	302/299/12/22/10	148/182/277/38	MCS ₁₁₂ -Prod ₄₄₃ -MCS ₉₀
	6	302/299/12/22/10	122/26/182/277/38	MCS ₁₁₂ -Prod ₄₄₃ -MCS ₉₀
B	2	10/22/12/444/137	38/97/164/9/26/291	MCS ₉₀ -Prod ₄₂₃ -MCS ₁₁₂
	5	134/223/9/11/204/12/22/10	317/173/97/138	MCS ₉₀ -Prod ₄₂₃ -MCS ₁₁₂
	11	510/71/12/22/10	157/164/9/26/231/38	MCS ₁₁₂ -Prod ₄₂₃ -MCS ₉₀

3.1.2 Die *RpPAL*-Genfragmente

Es wurden vier Mitglieder aus der *PAL*-Genfamilie der Robinie identifiziert (*RpPAL1*, 2, 3, und 4). Die vier *RpPAL*-Genfragmente wurden aus jeweils mehreren Teilfragmenten zusammengesetzt (Abb. 10). Die Basensequenzen der Genfragmente sind in Anhang I (S. 163-164) aufgeführt und in *GenBank* unter den Accession numbers EU650627 (*RpPAL1*), EU650628 (*RpPAL2*), EU650629 (*RpPAL3*) und EU650630 (*RpPAL4*) hinterlegt. *RpPAL4* ist ein 445 bp langes Fragment der codierenden Sequenz (cds), *RpPAL1* und 3 sind 1245, bzw. 1192 bp lange Fragmente, die aus Abschnitten der cds und der 3'-UTR bestehen, und *RpPAL2* ist eine 2478 bp lange Sequenz mit einer 2160 bp langen, vollständigen cds, einer 135 bp langen 3'-UTR und einer 183 bp langen 5'-UTR (Abb. 11). Die cds von *RpPAL2* codiert für ein Polypeptid aus 719 Aminosäuren mit einer berechneten molekularen Masse von 78,5 kDa und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,32 (www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

PAL-Gene aus Angiospermen enthalten in der Regel ein Intron, welches an einer hoch konservierten Insertionsstelle ein Codon für Arginin (Arg) spaltet (Gowri et al. 1991). In der cds von *RpPAL2* wurde die putative Intron-Insertionsstelle anhand der Sequenzkonservierung in dem in Frage kommenden Bereich gefunden (Codon für Arg). Sie teilt die cds in ein 410 bp langes Exon I und ein 1750 bp langes Exon II (siehe Abb. 11, S. 60 und DNA-Sequenz von *RpPAL2* in Anhang I, S. 163). Von den übrigen *RpPALs* wurde nur jeweils ein Teilabschnitt von Exon II bestimmt.

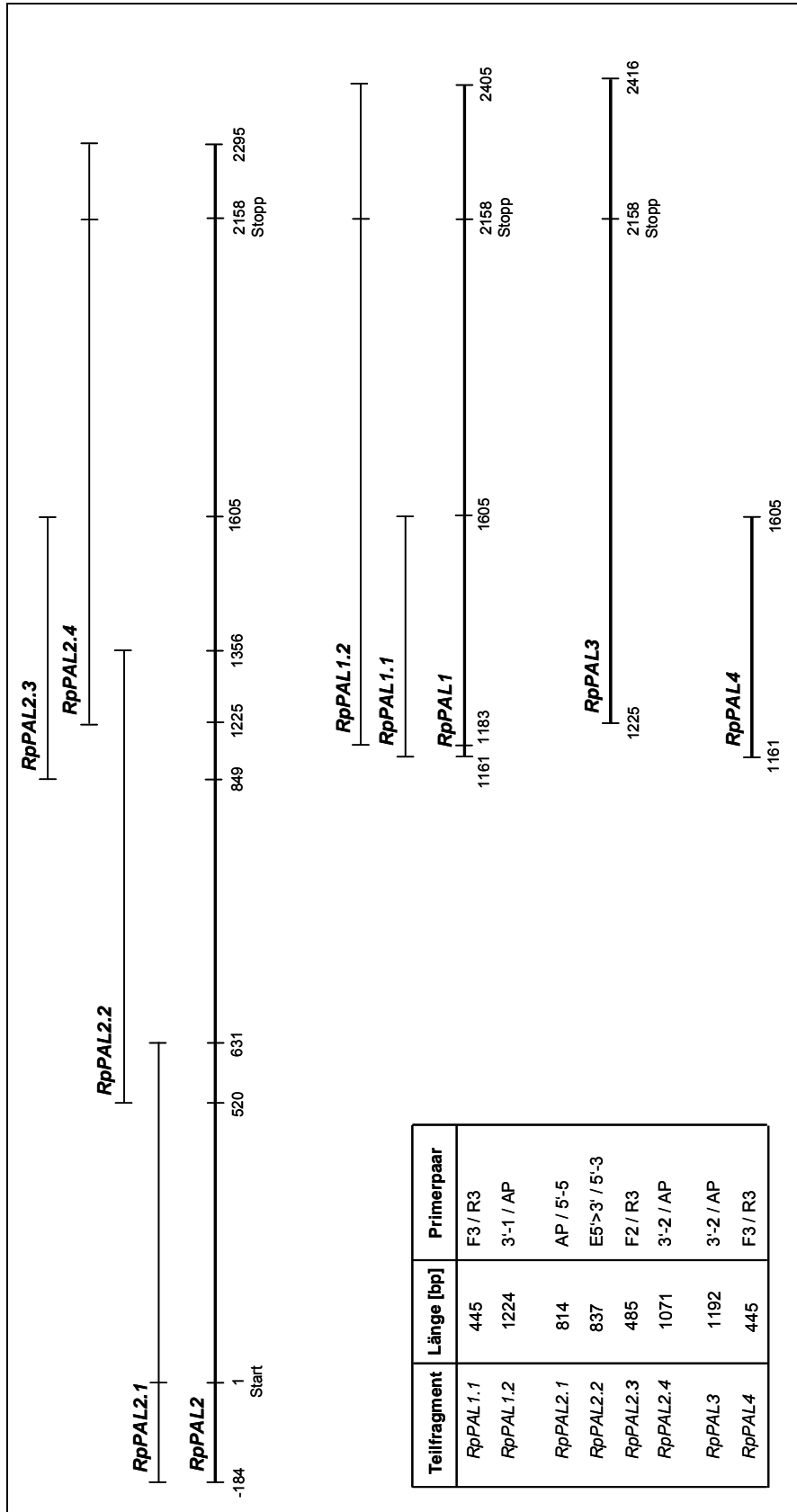


Abbildung 10 – Schematische Übersicht der Teilfragmente von RpPAL 1, 2, 3 und 4. Die horizontale Position der Teilfragmente (RpPALX; Y, dünn gezeichnete Geraden) entsprechen der Position relativ zu den Gesamtfragmenten (RpPALX; fett gezeichnete Geraden). Die Zahlen unterhalb der Gesamtfragmente geben die Position der Teilfragmente relativ zum Startcodon von RpPAL2 an. Die Tabelle links unten zeigt die Längen der Teilfragmente und die Primerpaare, mit denen diese amplifiziert wurden. Primer : F3, F2, R3 = degenerierte Primer (Tab. 3, S. 30), 3'-1, 3'-2, 5'-3, 5'-5 = genspezifische Primer für die 3'- bzw. 5'-RACE (Tab. 4, S. 39), E5'>3' = Erweiterungsprimer (Tab. 5, S. 38), AP = Anchor-Primer (Tab. 4, S. 39).

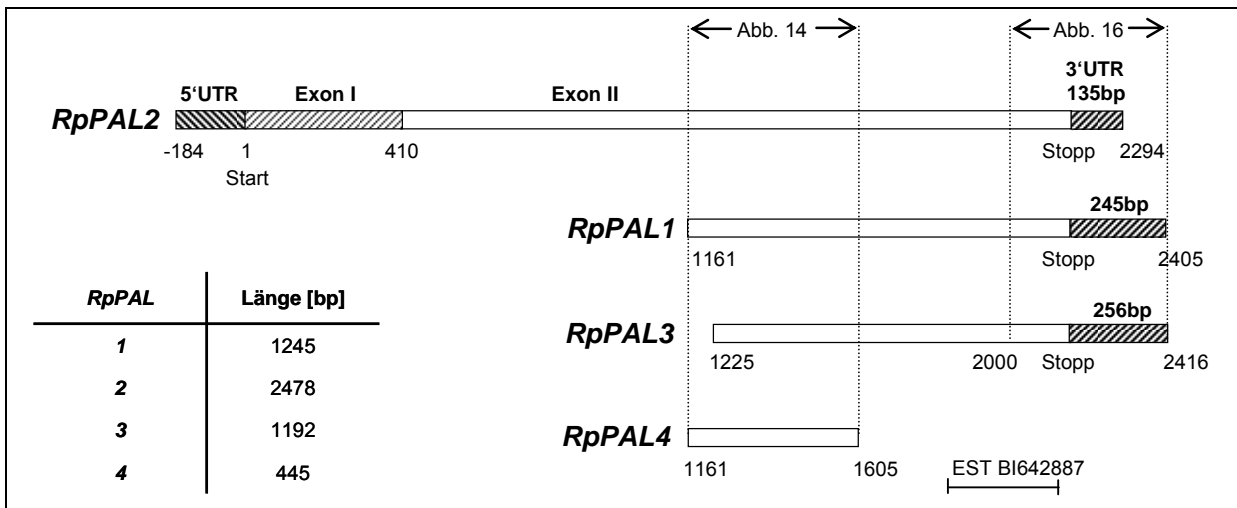


Abbildung 11 – Schematische Darstellung der identifizierten *RpPAL*-Genfragmente 1, 2, 3 und 4 aus der Robinie. Exon II = weiß, Exon I = hell schraffiert, 3'- und 5'-UTRs = fett schraffiert. Homologe Sequenzbereiche liegen untereinander. Zahlen unterhalb der Fragmente = Abstand zum Startcodon von *RpPAL2*. *RpPAL2* enthält eine putative Intron-Insertionsstelle an Position 410. Die Tabelle unten links zeigt die Gesamtlängen der *RpPAL*-Fragmente. Unten rechts ist das 287 bp lange, von Yang et al. (2004) bestimmte *PAL*-EST eingezeichnet (*GenBank* Accession number BI642887). Die gestrichelten vertikalen Linien rahmen die in Abb. 14 und 16 gezeigten Bereiche ein (siehe S. 69 und 71).

Das von Yang und Mitarbeitern (2004) sequenzierte *PAL*-EST (engl. ‚expressed sequence tag‘, *GenBank* Accession number BI642887) ist zur Veranschaulichung der relativen Lage und Länge (287 bp) ebenfalls in Abbildung 11 dargestellt. Es stellte sich als nicht identisch mit *RpPAL1*, 2 oder 3 heraus, und über eine Identität mit *RpPAL4* konnte mangels Überlappung keine Aussage getroffen werden. Eine weitere Erörterung erfolgt in Kap. 4.1.2.1 (S. 103).

Die DNA- und die daraus abgeleiteten Proteinsequenzen von *RpPAL1*, 2, 3 und 4 wurden paarweise miteinander verglichen (Tab. 10). Es zeigte sich, dass sowohl auf Ebene der DNA-, als auch auf der der Proteinsequenzen hohe Ähnlichkeiten bestehen. Auf Ebene der DNA-Sequenzen beträgt die mittlere Sequenzidentität $84 \pm 8 \%$, wobei sich *RpPAL4* mit maximal 77 % von den übrigen Isoformen stärker unterscheidet. *RpPAL1*, 2 und 3 hingegen weisen untereinander eine mittlere Sequenzidentität von $91 \pm 3\%$ auf. *RpPAL2* und *RpPAL3* sind sich mit 96 % in der cds und 82 % in der 3'-UTR am ähnlichsten und heben sich damit von *RpPAL1* und *RpPAL4* ab (89 und 90 % in der cds und jeweils 55 % in den 3'-UTRs).

Die Proteinsequenzen weisen untereinander eine Identität von durchschnittlich $91 \pm 4 \%$ auf und liegen damit höher als die Werte für die DNA-Sequenzen. Dies ist auf den degenerierten genetischen Code zurückzuführen, d.h. Basenunterschiede an 3. Codonposition resultieren nicht immer in einer unterschiedlichen Aminosäure (synonyme Basenaustausche).

Darüber hinaus ist ein Teil der Unterschiede in den Proteinsequenzen konservativ, was bedeutet, dass strukturell oder funktionell ähnliche Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht sind (Beispiel: die Aminosäuren Valin und Leucin mit aliphatischen Seitenketten). Dieser Sachverhalt spiegelt sich in den in Tabelle 10 aufgelisteten Werten für die „Sequenz-Positivität“ wider, die um durchschnittlich 2,8 Prozentpunkte höher liegen als die durchschnittlichen Werte für die Sequenzidentität. Die Differenz von Sequenzidentität und -Positivität ist bei *RpPAL4* mit durchschnittlich 4 % auffallend höher als bei den übrigen *RpPALs*, was gleichbedeutend ist mit einem höheren Anteil an konservativen Aminosäureaustauschen.

Tabelle 10 – Paarweise Sequenzidentität [%] von *RpPAL1*, 2, 3 und 4. Oberhalb der Diagonalen sind die Identitätswerte der Proteinsequenzen (1. Zeile – Identität, 2. Zeile – Positive*), unterhalb die der DNA-Sequenzen aufgeführt (1. Zeile – cds, 2. Zeile – 3'-UTR). Die Quotienten in Klammern geben die absoluten Zahlenverhältnisse wieder (identische Basen bzw. Aminosäuren bezogen auf den Überlappungsbereich).

<i>RpPAL</i>	1	2	3	4
1		91 (305/333) 94 (314/333)	93 (291/312) 95 (298/312)	89 (132/148) 93 (138/148)
2	89 (898/1000) 55 (65/119)		96 (300/312) 97 (303/312)	85 (127/148) 89 (133/148)
3	90 (848/936) 55 (126/230)	96 (901/936) 82 (98/119)		88 (112/127) 92 (117/127)
4	77 (345/445) ---	76 (341/445) ---	76 (289/381) ---	

[* Positive Übereinstimmungen in zwei miteinander verglichenen Proteinsequenzen liegen vor, wenn Aminosäuren gleicher Position entweder identisch oder strukturell ähnlich sind (Bsp. Val / Leu).]

Da sich *RpPAL4* von den übrigen *PAL*-Genen stärker unterscheidet und zudem keinerlei Expression von *RpPAL4* im Xylem nachgewiesen werden konnte (vgl. Abb. 26, S. 83), wurde nach Anhaltspunkten zur Funktionalität dieses Gens anhand von Sequenzeigenschaften gesucht. Dazu wurde die Verteilung der Basenunterschiede auf die drei möglichen Codonpositionen analysiert. Für diesen Zweck wurde die Sequenz von *RpPAL2* als dem einzigen Vollängenklon als Referenz herangezogen (Tab. 11, S. 62). Es zeigte sich, dass 75 % der Basenunterschiede zwischen *RpPAL4* und *RpPAL2* an dritter Codonposition liegen. Dieser Wert ist der höchste im Vergleich zu *RpPAL1* (71,6 %) und *RpPAL3* (74,3 %). Dies ist ein starkes Indiz für ein aktives Gen, bzw. gegen ein inaktives Pseudogen.

Tabelle 11 – Verteilung der Basenunterschiede auf die Codonpositionen im Vergleich zu *RpPAL2*.

<i>RpPAL</i>	Überlappung mit <i>RpPAL2</i> [nt]	B A S E N A U S T A U S C H E I N D E R C D S (relativ zu <i>RpPAL2</i>)			
		an 1. oder 2. Codonposition	an 3. Codonposition	Unterschiede gesamt	an 3. Codonposition [%]
1	1000	29	73	102	71,6
3	936	9	26	35	74,3
4	445	26	78	104	75,0

Die Abgleiche der *RpPAL*-Genfragmente mit *GenBank* wurden mittels BLASTN und BLASTP durchgeführt. Hier zeigten sich Parallelen zum Sequenzvergleich der *RpPALs* untereinander (Tab. 12). So weisen *RpPAL1*, 2 und 3 mit durchschnittlich 90 ± 1 % Sequenzidentität zu *PALs* aus anderen Angehörigen der *Fabaceae* (BLASTN) eine ähnlich hohe Sequenzidentität auf wie untereinander. *RpPAL4* hingegen hat als einzige die höchste Übereinstimmung mit einer *PAL* aus *Vitis vinifera* (Wein, *Vitaceae*), welche nicht zur Familie der *Fabaceae* gehört. Zudem ist diese Übereinstimmung mit 80 % vergleichsweise gering. Ähnliches gilt für den Abgleich von *RpPAL4* mittels BLASTP, bei dem die höchste Übereinstimmung mit einer *PAL* aus *Rudbeckia hirta* (*Asteraceae*) gefunden wurde (91% Identität). Darüber hinaus ist der überwiegende Teil der für *RpPAL4* erhaltenen BLASTP-Übereinstimmungen mit *PALs* aus Pflanzen, die ebenfalls nicht zu den *Fabaceae* gehören (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend betrachtet erweist sich die Sequenz von *RpPAL4* also nicht nur im Vergleich zu den übrigen *PALs* aus der Robinie als sehr unterschiedlich, sondern auch im Vergleich zu allen aus der Familie der *Fabaceae* bekannten *PALs*.

Tabelle 12 – BLASTN- und BLASTP-Abgleiche von *RpPAL1*, 2, 3 und 4 mit *GenBank* (Stand: April 2009), Bei den BLASTN-Abgleichen wurden die UTRs nicht einbezogen. Quotienten in Klammern geben die absoluten Zahlenverhältnisse wieder (identische Basen bzw. Aminosäuren bezogen auf den Überlappungsbereich).

	<i>RpPAL</i>	höchste Übereinstimmung mit PAL aus	GenBank Accession	Sequenzidentität
BLASTN	1	<i>Astragalus membranaceus</i> (<i>Fabaceae</i>)	AY986506	90 % (905/1000)
	2	<i>Lotus japonicus</i> (<i>Fabaceae</i>)	AB283036	89 % (1915/2146)
	3	<i>Lotus japonicus</i> (<i>Fabaceae</i>)	AB283036	91 % (858/936)
	4	<i>Vitis vinifera</i> (<i>Vitaceae</i>)	AM466869	80 % (359/445)
BLASTP	1	<i>Trifolium pratense</i> (<i>Fabaceae</i>)	AB236800	93 % (311/332)
	2	<i>Glycine max</i> (<i>Fabaceae</i>)	X52953	91 % (654/718)
	3	<i>Medicago sativa</i> (<i>Fabaceae</i>)	X58180	94 % (293/311)
	4	<i>Rudbeckia hirta</i> (<i>Asteraceae</i>)	EF070337	91 % (135/148)

3.1.3 Die *RpCHS*-Genfragmente

Es wurden sechs Mitglieder aus der *CHS*-Genfamilie der Robinie identifiziert (*RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6). Die sechs *RpCHS*-Genfragmente wurden aus jeweils mehreren Teilfragmenten zusammengesetzt (Abb. 12). Von vier Genfragmenten wurde die 3'-UTR bestimmt (*RpCHS3*, 4, 5 und 6), von den beiden übrigen nur Abschnitte der codierenden Region. Die 5'-UTR wurde von keiner der *RpCHS* bestimmt (Abb. 13). Die Basensequenzen der *RpCHS*-Genfragmente sind in Anhang II (S. 165-167) aufgeführt und in *GenBank* unter den Accession numbers EU650636 (*RpCHS1*), EU650635 (*RpCHS2*), EU650632 (*RpCHS3*), EU650633 (*RpCHS4*), EU650634 (*RpCHS5*) und EU669655 (*RpCHS6*) hinterlegt.

RpCHS3 erwies sich bis auf eine Basenabweichung (Abstand zum Startcodon 279 nt, A statt C) als identisch mit dem von Yang und Mitarbeitern (2004) identifizierten *CHS*-EST (*GenBank* Accession number BI642100, Länge 491 bp). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei diesen beiden Fragmenten um Abschnitte desselben Genfamilienmitglieds handelt. Der homologe Bereich (Überlappungsbereich) zwischen *RpCHS3* und dem EST umfasst 155 bp. Zusammengesetzt bilden sie ein vollständiges Transkript bestehend aus einer 76 nt langen 5'-UTR, einer 1170 nt langen vollständigen cds und einer 173 nt langen 3'-UTR. Diese ist in Abbildung 13 (S. 66) zur Veranschaulichung separat dargestellt. Die aus dem *CHS*-EST und *RpCHS3* zusammengesetzte cds ergibt ein abgeleitetes, 389 Aminosäuren langes Polypeptid mit einer berechneten molekularen Masse von 42,6 kDa und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,05 (www.expasy.org/tools/pi_tool.html).

Die Intron-Insertionsstelle des für *CHS*-Gene charakteristischen, einzigen Introns ist hoch konserviert (An et al. 1993 und Ref. darin). Unter der Voraussetzung, dass dies auch für die *CHS*-Gene der Robinie gilt, wurden von *RpCHS1* und 4 jeweils 64 Nukleotide lange Teilabschnitte von Exon I identifiziert, von den übrigen *RpCHS*-Fragmenten nur Teilabschnitte von Exon II (Abb. 13).

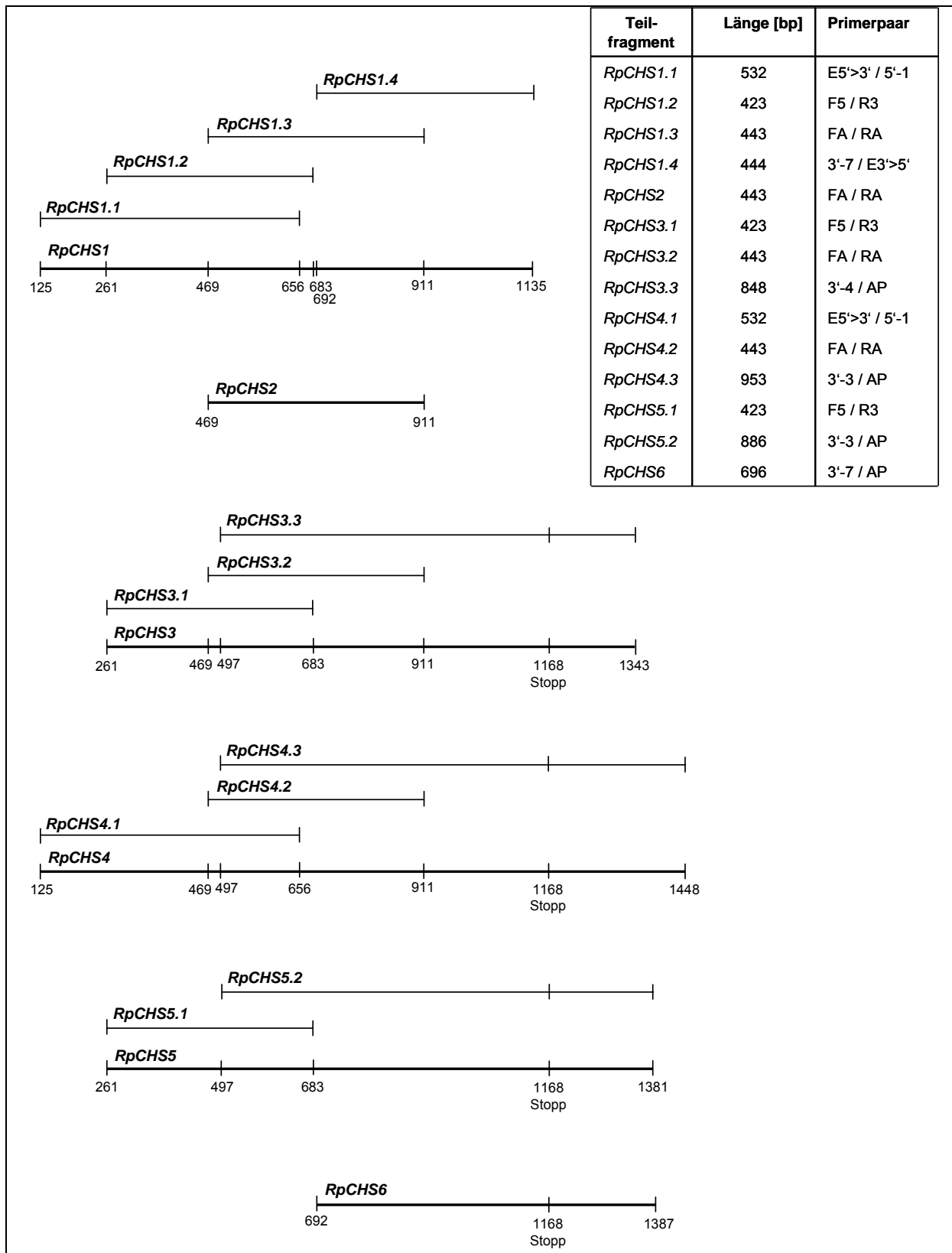


Abbildung 12 – Schematische Übersicht der Teilfragmente von *RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6. Die horizontale Position eines Teilfragments (*RpCHSX.Y*, dünn gezeichnete Striche) entspricht der Position relativ zum Gesamtfragment (*RpCHSX*, fett gezeichnete Striche). Die Zahlen an den Gesamtfragmenten geben den vermutlichen Abstand der Teilfragmente zum Startcodon an. Die Tabelle rechts oben zeigt die Teilfragmentlängen und die Primerpaare, mit denen die Teilfragmente amplifiziert wurden. Primer: FA, RA, F5, R3 = degenerierte Primer, 3'-3, 3'-4, 3'-7, 5'-1 = genspezifische Primer für die 3'- bzw. 5'-RACE, E5'>3', E3'>5' = Erweiterungsprimer, AP = Anchor Primer.

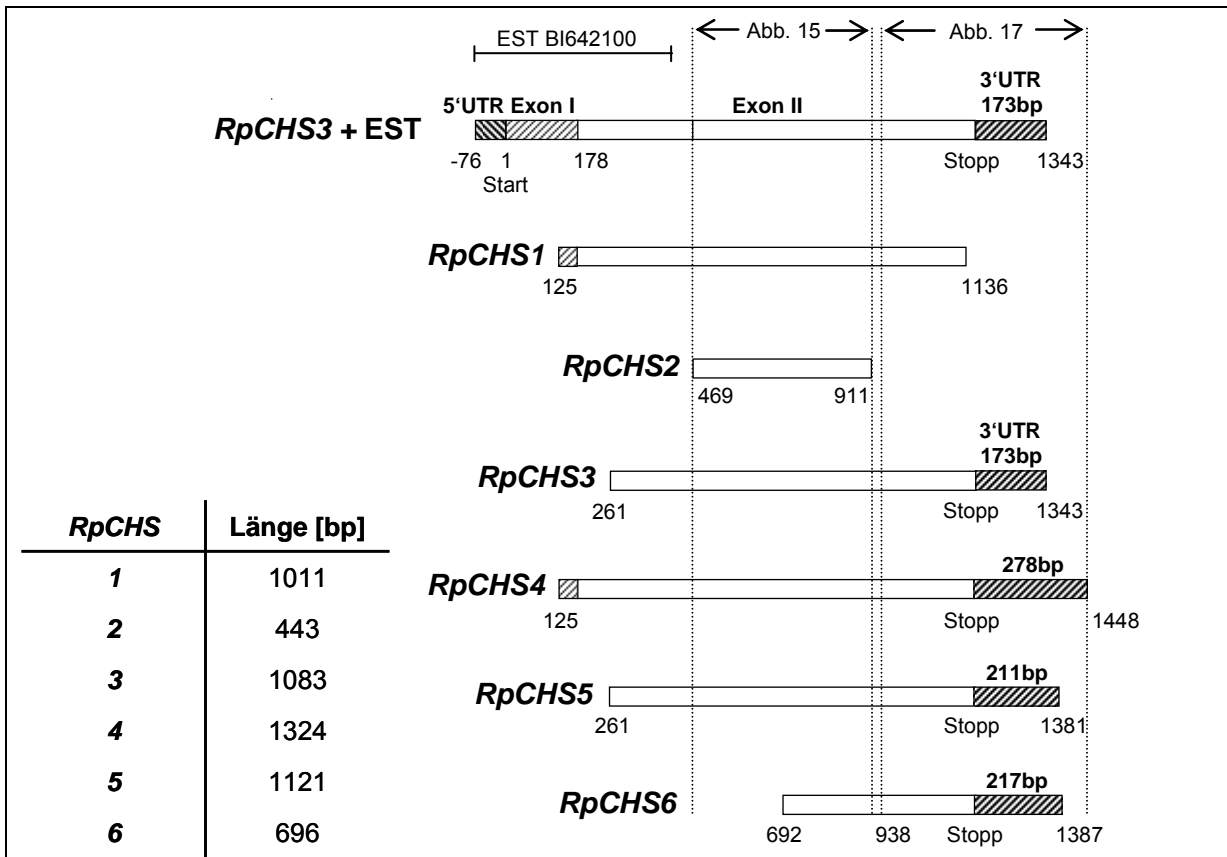


Abbildung 13 – Schematische Darstellung der *RpCHS*-Genfragmente 1, 2, 3, 4, 5 und 6 aus der Robinie. *RpCHS3* und das ebenfalls dargestellte *CHS*-EST (GenBank Accession number BI642100) erwiesen sich als identisch und wurden zur Veranschaulichung der wahrscheinlichen Gesamtlänge der *CHS*-Gene zusammengesetzt dargestellt („*RpCHS3* + EST“), mit dem 1. Nukleotid des Startcodons = 1. Homologe Abschnitte der *CHS*-Fragmente liegen untereinander, die Zahlen geben den vermutlichen Abstand zum Startcodon wieder. Tabelle unten links: Gesamtlängen der *RpCHS*-Fragmente. Die gestrichelten vertikalen Linien rahmen die in Abb. 15 und 17 gezeigten Bereiche ein (siehe Kap. 3.2.1, S. 69).

Der mit Hilfe des Programms Blast 2 Sequences durchgeführte paarweise Sequenzvergleich lieferte eine durchschnittliche Identität von 86 ± 5 %, mit einem Minimum von 79 % zwischen *RpCHS3* und *RpCHS6* und einem Maximum von 95 % zwischen *RpCHS2* und *RpCHS3* (Tab. 13). Bei den 3'-UTRs von *RpCHS3*, 4, 5 und 6 beträgt, abgesehen von dem mit 79 % deutlich höheren Wert für *RpCHS4* und 5, die durchschnittliche Sequenzübereinstimmung 44 ± 4 %.

Der paarweise Vergleich der Proteinsequenzen der *RpCHS*-Fragmente lieferte eine mittlere Sequenzidentität von 91 ± 3 %, mit den höchsten Werten zwischen *RpCHS4*, 5 und 6 (96 - 97 %). Die geringsten Ähnlichkeiten finden sich zwischen *RpCHS6* und *RpCHS2*, bzw. *RpCHS3* mit jeweils 86 %. *RpCHS3* weist mit 89 ± 3 % die geringste durchschnittliche Sequenzidentität mit den übrigen *RpCHS*-Fragmenten auf.

Tabelle 13 – Sequenzidentität [%] der Genfragmente *RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6 untereinander. Oberhalb der Diagonalen sind die paarweisen Identitätswerte der Proteinsequenzen, unterhalb die der DNA-Sequenzen aufgeführt (1. Zeile – cds, 2. Zeile – 3'-UTR). Die Quotienten in Klammern geben die absoluten Zahlenverhältnisse wieder (identische Basen bzw. Aminosäuren bezogen auf den Überlappungsbereich).

<i>RpCHS</i>	1	2	3	4	5	6
1	-	90 (133/147)	89 (261/291)	93 (315/336)	94 (276/291)	93 (138/147)
2	84 (376/445) -	-	94 (139/147)	90 (133/147)	91 (134/147)	86 (62/72)
3	83 (743/885) -	95 (419/443) -	-	89 (270/302)	90 (272/302)	86 (137/158)
4	87 (884/1006) -	82 (366/443) -	81 (740/903) 46 (73/158)	-	97 (292/301)	96 (151/157)
5	88 (766/870) -	83 (368/443) -	82 (750/903) 46 (73/158)	92 (1026/1115) 79 (160/202)	-	96 (152/158)
6	90 (398/439) -	82 (177/215) -	79 (377/473) 47 (74/158)	92 (423/456) 41 (82/202)	93 (435/466) 39 (79/202)	-

Neben den Sequenzvergleichen der *RpCHS*-Genfragmente untereinander wurden auch Datenbankabgleiche mittels BLASTN und BLASTP durchgeführt. Hierbei wurden bei allen *RpCHS*-Fragmenten die höchsten Übereinstimmungen mit *CHS*-Genen aus Angehörigen der *Fabaceae* gefunden (Tab. 14, S. 68). Die mittlere Sequenzidentität auf DNA-Ebene beträgt $89 \pm 1\%$ und ist damit um drei Prozentpunkte höher als die durchschnittliche Sequenzidentität von *RpCHS1* bis 6 untereinander. Auf Ebene der Aminosäuresequenzen (BLASTP) liegen die Durchschnittswerte mit $95 \pm 2\%$ Identität und $98 \pm 1\%$ Positivität ebenfalls höher als bei *RpCHS1* bis 6 untereinander.

Tabelle 14 – BLASTN- und BLASTP-Abgleiche von *RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6 mit *GenBank* (Stand: April 2009). Alle höchsten Übereinstimmungen sind mit *CHS*-Genen von Angehörigen der *Fabaceae*. Weitere Erläuterungen siehe Tab. 12 (S. 63).

	<i>RpCHS</i>	höchste Übereinstimmung mit <i>CHS</i> aus:	<i>GenBank</i> Accession	Sequenzidentität
BLASTN	1	<i>Glycine max</i>	FJ770471	88 % (892/1009)
	2	<i>Lotus japonicus</i>	AP009237	90 % (403/443)
	3	<i>Lotus japonicus</i>	AP009237	90 % (632/698)
	4	<i>Medicago truncatula</i>	AC146683	88 % (872/984)
	5	<i>Medicago truncatula</i>	AC146683	90 % (814/904)
	6	<i>Medicago truncatula</i>	AC146683	88 % (419/476)
BLASTP	1	<i>Glycine max</i>	X65636	95 % (321/336)
	2	<i>Medicago sativa</i>	L02903	93 % (137/147)
	3	<i>Cicer arietinum</i>	AJ012690	93 % (219/233)
	4	<i>Senna alata</i>	AF358432	94 % (326/346)
	5	<i>Senna alata</i>	AF358431	96 % (292/302)
	6	<i>Senna alata</i>	AF358432	93 % (148/158)

3.2 Konstruktion genspezifischer Primer

3.2.1 Genspezifische Primer für die semiquantitative RT-PCR

Die Konstruktion der genspezifischen Primerpaare (GSPs) erfolgte auf Basis der erhaltenen *PAL*- und *CHS*-Genfragmente aus der Robinie. Diese wiesen in der codierenden Region ein hohes Maß an Sequenzkonservierung auf (Abb. 14 und 15) und machten eine Konstruktion von GSPs auf Basis dieser Genabschnitte unmöglich (Ausnahme: *RpPAL4*).

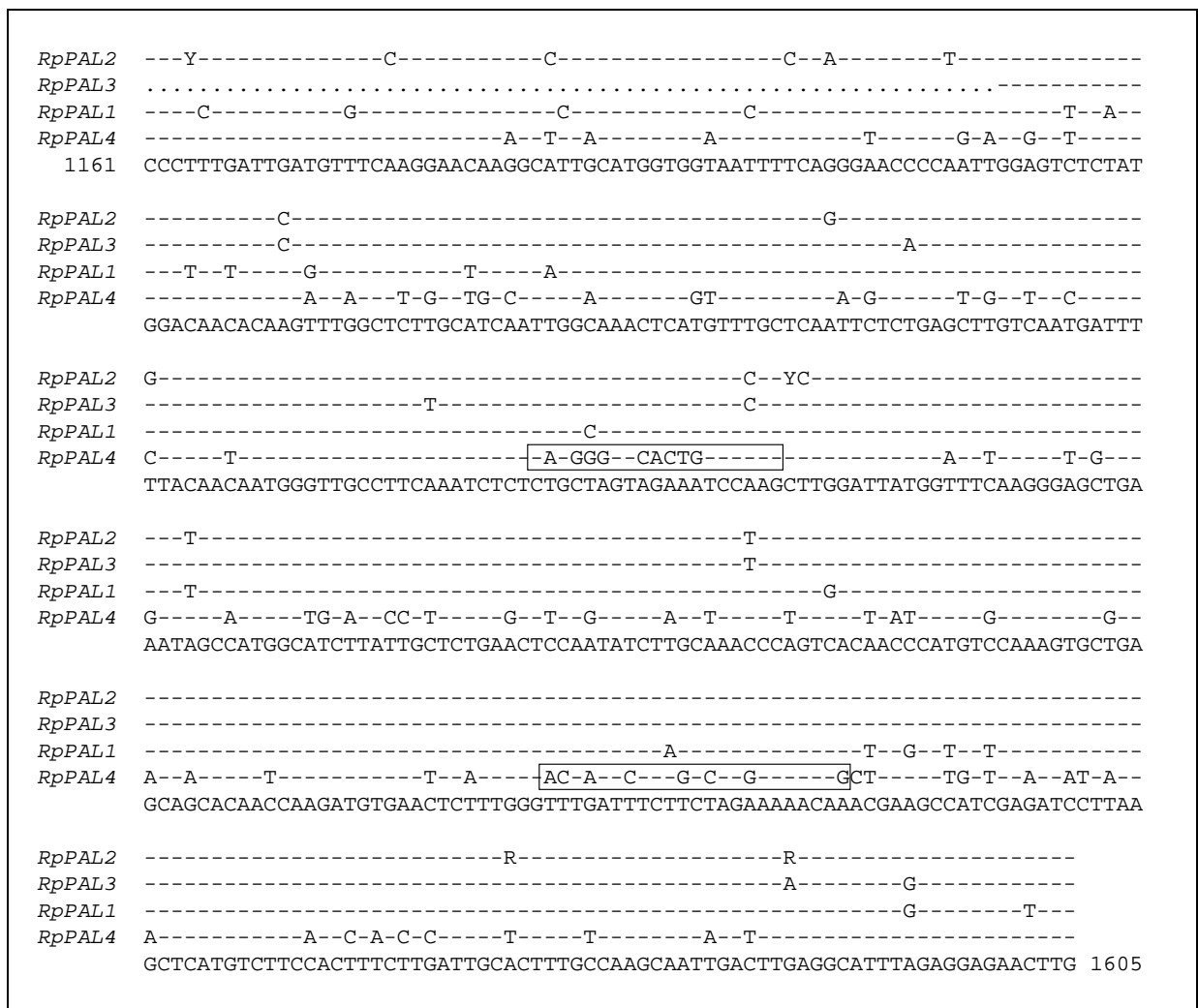


Abbildung 14 – Hohe Sequenzkonservierung in der cds der *RpPAL*-Gene. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von *RpPAL1*, 2, 3 und 4 im Bereich von *RpPAL4* (445 bp, vgl. Abb. 11, S. 60). Die Consensus-Sequenz (CS) ist unterhalb des Alignments gezeigt, Bindestriche = Übereinstimmungen mit der CS, Punkte = Lücken (*RpPAL3*, Basen 1-64). Von der CS abweichende Basen sind ausgeschrieben. Die Zahlen am Anfang und am Ende der CS geben den Abstand zum Startcodon von *RpPAL2* an (vgl. Abb. 11). Kästen = Primerbindungsstellen für *RpPAL4*-GSPs.

<i>RpCHS4</i>	--T-----A-----A--T---
<i>RpCHS5</i>	-----A-----A--T---
<i>RpCHS1</i>	-----G-----C-----
<i>RpCHS3</i>	--T-----T-----C---A---T-----C-----
<i>RpCHS2</i>	-----T-----C---A-----A-----
<i>RpCHS6</i>
469	TACATGATGTACCAACAAGGGTGTGTTTGGCTGGTGGCAGGTGCTTCGTTTGGCTAAAGACTTGGCTGAGAACAAC
<i>RpCHS4</i>	-----T-G-----C-----A---T-T-----A-----C-----
<i>RpCHS5</i>	--A-----T-G-A-----T-T-----A-----C-----
<i>RpCHS1</i>	--A-----A-T-----A-----T---T-----
<i>RpCHS3</i>	-----T-----T---T-----A-----A
<i>RpCHS2</i>	-----T-C---T-A-T-----A-----A
<i>RpCHS6</i>
	AAGGGTGTCTCGTGTGCTAGTGGTTTGTTCAGAGATCACTGCAGTCACATTCCGTGGCCCTAGTGACACTCATCTT
<i>RpCHS4</i>	-----G-----A-----C-----
<i>RpCHS5</i>	-----G-----A-----C-----G-----
<i>RpCHS1</i>	---C-----T---T-----TT---G-
<i>RpCHS3</i>	--C-----A-----AA-----T--T--T-----A
<i>RpCHS2</i>	--C-----T-----A-----AA-----T--T-----A
<i>RpCHS6</i>G-
	GATAGTCTTGTGGGACAAGCATTGTTTGGAGATGGTGCAGCTGCTGTCATTGTTGGTTCAGACCCAGTACCAGAG
<i>RpCHS4</i>	-----G--C-----AC-T-----T-----C-----
<i>RpCHS5</i>	G-----T-----A-G-----C---C-----
<i>RpCHS1</i>	-----T-----G-G-----C-----C--T-----C
<i>RpCHS3</i>	-----A-----C-----TGC-----T-----
<i>RpCHS2</i>	--A-----A-----T-----TGC-----CT-----
<i>RpCHS6</i>	-----T-----G-G-----C-----
	ATTGAGAAACCTATGTTTGGAGTTAGTATGGACTGCACAAACAATCCTTCCAGATAGTGAAGGAGCCATTGATGGT
<i>RpCHS4</i>	--T-----G-----C-----C-----
<i>RpCHS5</i>	-----C-----G-A---C-----
<i>RpCHS1</i>	-----T-----C-----T-----
<i>RpCHS3</i>	-----T-----T-A-----A-TG---C-----G---C---
<i>RpCHS2</i>	-----T-----T-A-----A-TG---C--T--T-C---C---
<i>RpCHS6</i>	-----C-----C-----
	CACCTTCGTGAAGTTGGGCTAACATTCCATCTCCTCAAGGATGTTCTGGGCTCATTTCAAAGAACATTGAGAAA
<i>RpCHS4</i>	--T-----C-----C-----T-----T-----
<i>RpCHS5</i>	--T-----C-----C-----T-----T-----C-----
<i>RpCHS1</i>	--C-----T-----T-----
<i>RpCHS3</i>	--C-A-----C-----A-----A-----C---
<i>RpCHS2</i>	--C-A-C--G--C-G-----A-----A-----T-----
<i>RpCHS6</i>	-----G-----C-----T---C---T---C-----
	GCATTGGTTGAAGCCTTTCAACCATTGGGCATATCTGATTACAACCTATCTTCTGGATTGCACACCC 911

Abbildung 15 – Hohe Sequenzkonservierung in der *cds* der *RpCHS*-Gene. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von Abschnitten von *RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6 im Bereich von *RpCHS2* (443 bp) (vgl. Abb. 13, S. 66). Die Consensus-Sequenz (CS) ist unterhalb des Alignments gezeigt, Bindestriche = Übereinstimmungen mit der CS, Punkte = Lücken (*RpCHS6*, Basen 1-223). Von der CS abweichende Basen sind ausgeschrieben. Die Zahlen am Anfang und am Ende der CS geben den Abstand zum Startcodon von „*RpCHS3*+EST“ an (vgl. Abb. 13).

Aus diesem Grund wurden mit Hilfe der 3'-RACE die sequenzvariablen 3'-UTRs der *PAL*- und *CHS*-Gene erarbeitet und in Anlehnung an die Strategie von Simpson und Mitarbeitern (1992) die GSPs konstruiert (Abb. 16 und 17). Für *RpPAL4* wurden aufgrund nicht verfügbarer 3'-UTR und der höheren Sequenzdivergenz die GSPs auf Basis der codierenden Region konstruiert (vgl. Abb. 14, S. 69 und Tab. 10, S. 61). Für *PAL* wurde ein universeller Forward-Primer konstruiert, während die Reverse-Primer an unterschiedliche Abschnitte der 3'-UTRs banden und damit die Genspezifität gewährleisteten (Abb. 16).

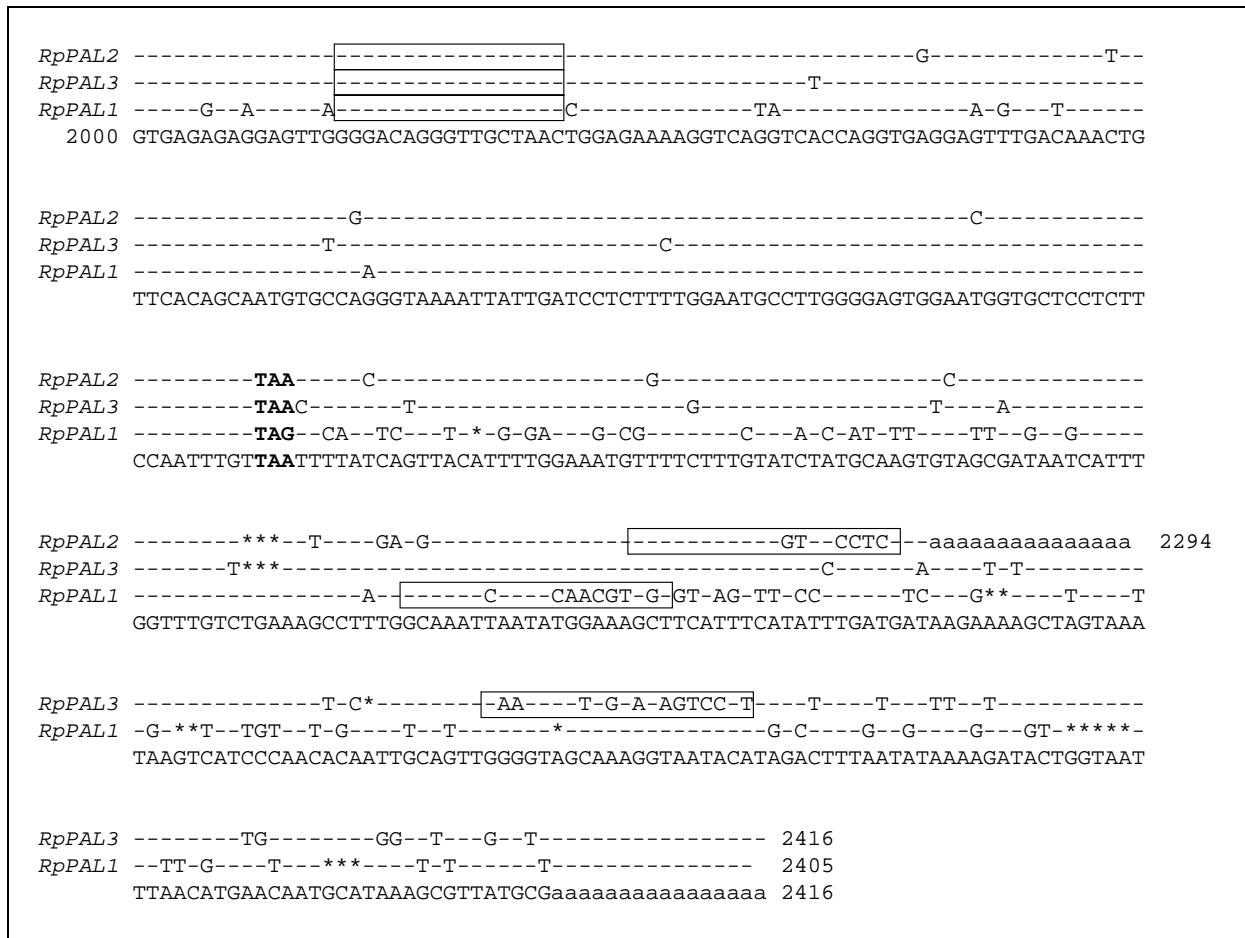


Abbildung 16 – GSP-Design für *RpPAL1*, 2 und 3 für die semiquantitative RT-PCR. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von den 3'-Enden der codierenden Regionen (159 bp aufwärts vom Stoppcodon TAA / TAG, fett gedruckt) und den 3'-UTRs (vgl. Abb. 11, S. 60). Unterhalb des Alignments ist die Consensussequenz (CS) dargestellt, Bindestriche = Übereinstimmungen mit der CS, * = Lücken. Von der CS abweichende Basen sind ausgeschrieben. Poly-A-Schwänze sind in Kleinbuchstaben. Kästen = Primerbindungsstellen, Alle Reverse-GSPs liegen 3' abwärt von den Stoppcodons.

Es wurden für die *CHS*-Gene *RpCHS3*, 4, 5 und 6 GSPs auf Basis der 3'-UTRs konstruiert, für *RpCHS1* und 2 wurden keine GSPs konstruiert, da deren 3'-UTR-Sequenzen nicht verfügbar waren. Der Forward-Primer für *RpCHS4*, 5 und 6 war identisch (universeller Forward-Primer), während für *RpCHS3* ein abweichender Forward-Primer konstruiert wurde (Abb. 17). Grund dafür ist eine Sequenzabweichung von *RpCHS3* im Bereich des

universellen Forward-Primers, der eine starke Tendenz zur Dimer- und Hairpinbildung hervorrief. Diese Abweichung machte den Sequenzbereich für die Primerkonstruktion für *RpCHS3* ungeeignet.

Für *RpCHS6* wurden drei verschiedene Reverse-Primer konstruiert (Abb. 17) und ihre Funktion durch PCR mit verschiedenen templates (cDNA aus verschiedenen Holzgeweben, genomische DNA) überprüft. Mit keinem der Reverse-Primer wurde ein spezifisches Produkt amplifiziert (Daten nicht gezeigt).

<i>RpCHS4</i>	-----G-----C-----T-A-----G-----
<i>RpCHS5</i>	-----C--C-----A-----
<i>RpCHS6</i>	-----GT-----C-----
<i>RpCHS3</i>	----CAA--G--GA-T-----T-----G-----GG-----A-A[G-A-----T-----]
938	TTGAGGCTAAATTAGGCTTGAAACCGGAAAAAATGAAAGCCACTCGTCATGTGCTCAGTGAATATGGTAACATGT
<i>RpCHS4</i>	-----A-----A-----
<i>RpCHS5</i>	-----
<i>RpCHS6</i>	-----T---CG-----G--C-
<i>RpCHS3</i>	-----A-----CC-A-----G-----A-A-----GCTA-G-----AAA--C-----
	CAAGTGCTTGTGTGTTGTTTCATCTTGGATGAAATGAGGAGGAAATCAAAGAAGATGGACTTGCCACAACAGGTG
<i>RpCHS4</i>	-----C--G--A-----C-----A-----
<i>RpCHS5</i>	-----G-----T-----G-----
<i>RpCHS6</i>	-----C-----C-----G-----C-----C-----GC-----T-
<i>RpCHS3</i>	-A-----C--A-----CT-G-----C--CA--A-----T-G-----
	AGGGACTTGATTGGGGTGTGCTATTTGGTTTTGGACCCGGACTTACTGTTGAGACTGTTGTGCTCCATAGTGTGG
<i>RpCHS4</i>	--CA- TAA -----***C-----*****-A-----]*-T-----T-----C-G-----A--T-C---T---
<i>RpCHS5</i>	--C-- TAA -----G-***-G--TT-----G-----]*-T-----T-----GT--T-G---T-T-
<i>RpCHS6</i>	-T-- TAA TT[G--C-----CG-----G--]GT-C-T--T-----AT-----C-----TTTT--C-----G-G-TGC
<i>RpCHS3</i>	-T-- ATGA *-----T-T-TC-G--AG-T**-[GG-CC--G-TT-----***--T--]A
	CCATCTAAATCCTAAATATACCATACTAGAGGCACACAACAACAATCATATTTGCACCTTATCATATTTGCAT
<i>RpCHS4</i>	---C---YG-----C-G-----T-----C---
<i>RpCHS5</i>	---C---A-G-----T-----G-----C---
<i>RpCHS6</i>	-A--T-TA---CT-G---TA-[CAAC--GAGC-A**-C--A--]-AC--T-T-T-AAGT-T---CA-T-AGA--AA-
<i>RpCHS3</i>	-GG-T-TT-GGCA-T--*****A---A-----T-CA-AC---TT***T-A--T-G---G--T--T-
	TTTAAGCCCAAAGAAAATGTATCTTTCTTTCTTTCTGTTTGTGTTTGTATCACCTACACATATTTCTTATAACCT
<i>RpCHS4</i>	-T-----G--G---R-----C--G-----G---G-----GT--C-GG--
<i>RpCHS5</i>	-***-----G-A---A-----*-----TG-----C-----C-----GTTaaaaaaa
<i>RpCHS6</i>	--T-AA---G-G-GT-G-G---C-GT-[T--A--CTCTC-C-C-*-----T--]TT--AATT--GAAaaaaaaaaaa
<i>RpCHS3</i>	G***-T--A--T---*--A-----C***TT---CATC---T-A-----G-TGGT-TATT-A--aaaaaaaaaa
	AAAAATTATATTCATCGTTATGTTATAAAACCTTTATGATATAAGCTTTAATTCGAAGGCACATTTAAAAA
<i>RpCHS4</i>	----- 1448
<i>RpCHS5</i>	aa 1381
<i>RpCHS6</i>	aaa 1387
<i>RpCHS3</i>	aaaaa 1343
	TGTTTACAATTCCATATGAATAATAAAAGACTTTTGTATTATTCTTCTCaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 1448

Abbildung 17 – GSP-Design für *RpCHS3*, 4, 5 und 6 für die semiquantitativen RT-PCR Analysen. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von den 3'-Enden der codierenden Region (231 bp aufwärts vom Stoppcodon TAA / TAG, fett gedruckt) und den 3'-UTRs von *RpCHS3*, 4, 5 und 6 (vgl. Abb. 13, S. 66). Zeichenerklärung siehe Abb. 16. Der Forward-Primer von *RpCHS3* weicht von den übrigen ab. Für *RpCHS6* wurden drei verschiedene GSPs konstruiert. Weitere Erläuterungen im Text.

Sequenzen und Schmelztemperaturen der GSPs, sowie die PCR-Produktgrößen sind in Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15 – Sequenzen, Schmelztemperaturen (T_m) und PCR-Produktgrößen der GSPs für die semiquantitative RT-PCR. f = forward, r = reverse.

Spezi- fität	Forward-Primer (5'-3')	Reverse-Primer (5'-3')	T_m f/r [°C]	Produkt [bp]
<i>RpPAL1</i>		ACGACGCTGTATTGATTTGC	55/55	249
<i>RpPAL2</i>	GGGACAGGGTTGCTAAC	CGAGGAAACTGAAATGAAGC	55/55	264
<i>RpPAL3</i>		AGGGACTCTTCTACTACTTC	55/55	326
<i>RpPAL4</i>	CAGGGGGTCACTGTCCAAG	CTGTTTTCTGGCAGAGATTAGT	61/59	174
<i>RpCHS3</i>	TAGAGAAGTGCTTAGTGAATATGG	TACAATGATAAAATCCAGGTCC	58/55	230
<i>RpCHS4</i>		TTGTGCCTTTGGTATGAGG	57/55	179
<i>RpCHS5</i>		GTGCCCTTAGTAAAGTACAACG	57/60	182
<i>RpCHS6</i>	AAGTGCTTGTGTGTTGTTTCATC	CATACGGTGGCTCAAGTTG	57/57	264
<i>RpCHS6</i>		AGCATGGCGTATTTGGGC	57/56	177
<i>RpCHS6</i>		AAATAAAGTGAGAGAGAGAATGTA	57/54	348
<i>Rp18S</i>	CTTCGGGATCGGAGTAATGA	GGTAAGTTTCCCCGTGTTGA	57/57	371

Die Spezifität der GSPs wurde durch PCR mit genomischer DNA als template, Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Ansätze (Abb. 18), sowie Sequenzierung der der PCR-Produkte bestätigt (Daten nicht gezeigt). Aus Abbildung 18 wird ersichtlich, dass die PCR-Produkte der GSPs die erwarteten Größen aufwiesen.

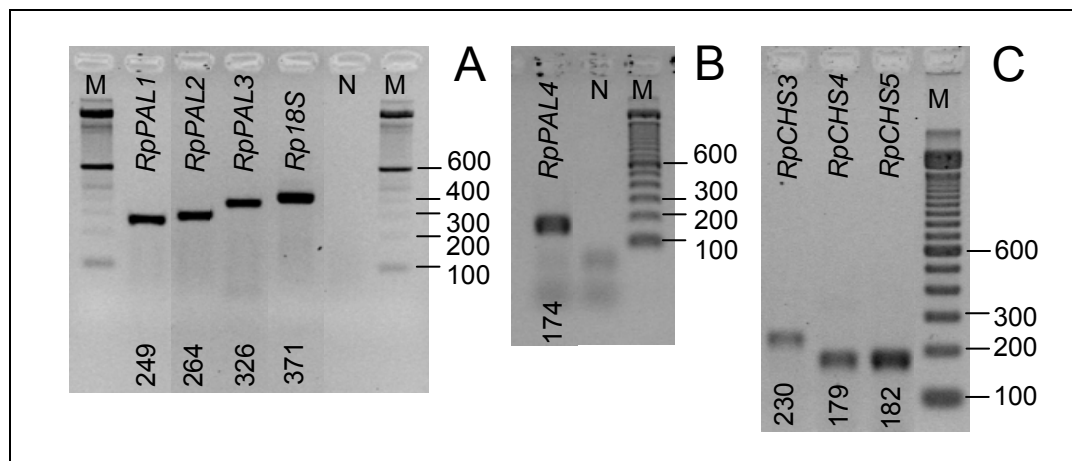


Abbildung 18 – Überprüfung der GSPs für die semiquantitative RT-PCR. **A** – PCR-Produkte für *RpPAL1*, 2 und 3, sowie für *Rp18S* im Agarosegel (2,5 %, Ethidiumbromidfärbung). **B** – PCR-Produkt für *RpPAL4*. **C** – PCR-Produkte für *RpCHS3*, 4 und 5. PCR: 35 Zyklen, $T_a = 55^\circ\text{C}$, template genomische DNA. Die erwarteten Produktgrößen [bp] sind unterhalb angegeben. M – Marker 100bp Ladder (Invitrogen).

3.2.2 Genspezifische Primer für die Real-Time PCR

Die Real-Time PCR stellt an die Primer neben den grundsätzlichen Anforderungen, wie Maximallänge, Spezifität, GC-Klammern und geringe Tendenz zu Bildung von Sekundärstrukturen, zusätzliche Anforderungen. So sollten die PCR-Produkte möglichst nicht länger als 200 bp sein und die Annealingtemperatur bei etwa 60°C liegen. Da die GSPs für die semiquantitativen RT-PCR diese Anforderungen nicht erfüllten, wurden weitere GSPs für die Real-Time PCR konstruiert (Abb. 19 und 20).

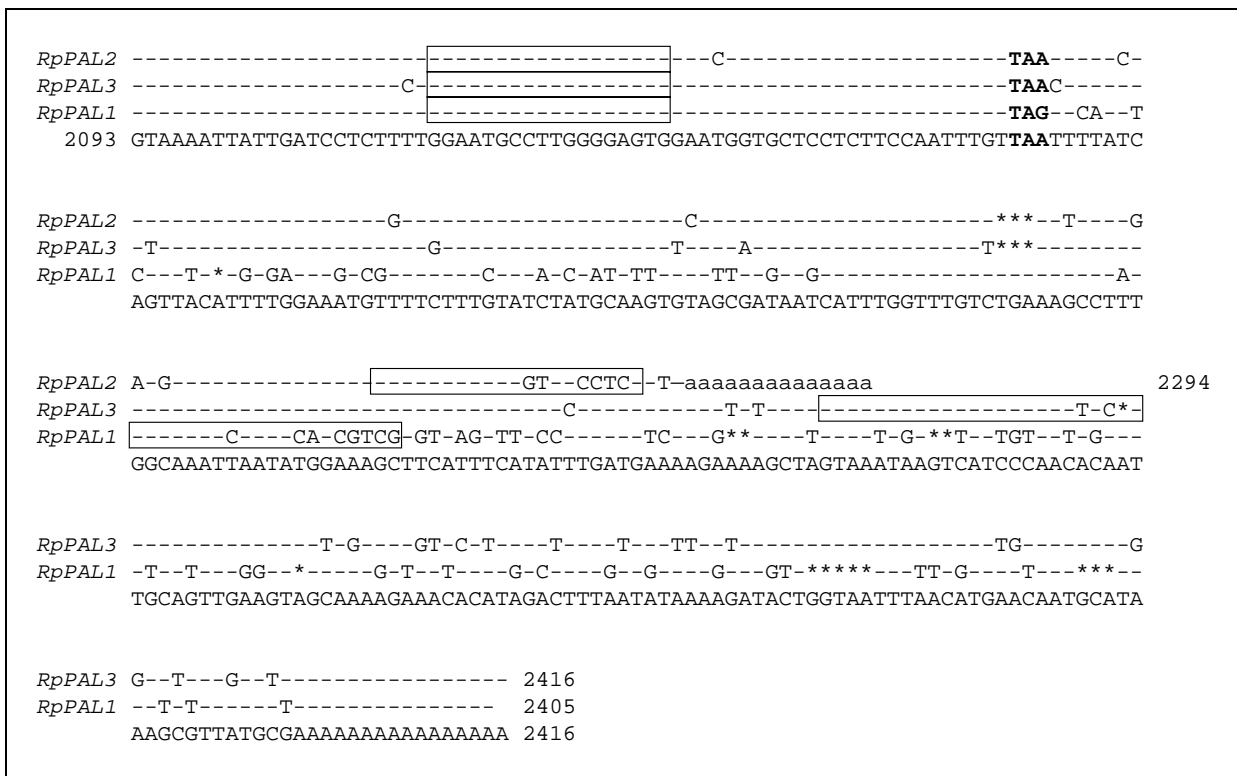


Abbildung 19 – GSP-Design für *RpPAL1*, 2 und 3 für die Real-Time PCR. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von den 3'-Enden der codierenden Region (65 bp aufwärts vom Stoppcodon TAA / TAG, fett gedruckt) und den 3'-UTRs. Kästen = Primerbindungsstellen. * = Lücken. Weitere Zeichenerklärungen siehe Abb. 16, S. 71.

Bei der GSP-Konstruktion für *RpCHS3*, 4 und 5 konnte die Strategie von Simpson et al. (1992) mit einem universellen Forward-Primer nicht realisiert werden. Es wurden für jedes der drei *RpCHS*-Gene individuelle Forward-Primer und individuelle Reverse-Primer konstruiert (Abb. 20). Für *RpCHS6* wurden die Primer, die bereits bei den semiquantitativen Analysen verwendet wurden, auch mit der Real-Time PCR überprüft und auch in diesem Fall keinerlei PCR-Produkte amplifiziert (Daten nicht gezeigt).



Abbildung 20 – GSP-Design für *RpCHS3*, 4 und 5 für die Real-Time PCR Analysen. Gezeigt ist ein multiples Sequenzalignment von den 3'-Enden der codierenden Region (113 bp aufwärts vom Stoppcodon TAA / TGA, fett gedruckt) und den 3'-UTRs von *RpCHS3*, 4 und 5 mit den eingerahmten Primerbindungsstellen. Weitere Erläuterungen siehe Text und Abb. 16, S. 71.

Die Sequenzen und Schmelztemperaturen der GSPs, sowie die Größen und Schmelztemperaturen der erhaltenen PCR-Produkte sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16 – Sequenzen, Schmelztemperaturen¹ (T_m) der GSPs für die Real-Time PCR, sowie Produktgrößen (Prod.) und Schmelztemperaturen² ($T_{m,P}$) der PCR-Produkte. Unterhalb der Primersequenzen sind die zugehörigen T_m aufgeführt.

Spezi- -fität	Forward-Primer (5'-3'), (T_m in °C)	Reverse-Primer (5'-3'), (T_m in °C)	Prod. [bp]	$T_{m,P}$ [°C]
<i>RpPAL</i>	1	CGACGCTGTATTGATTTGCC (57)	147	78,6
	2	GGAATGCCTTGGGGAGTG (58)	163	78,6
	3	AGGAGTTGGGATGACTTATTTAC (57)	199	77,7
<i>RpCHS</i>	3	ACCACAGGTGAAGGACTCG (59)	127	80,7
	4	CAGGTGAGGGACTTGATTGG (59)	111	81,2
	5	GCCACAACAGGTGAGGGAC (61)	167	81,8
<i>Rp18S</i>	GCTTTTAGGACTCCGCTGG (59)	GGTAAGTTTCCCGTGTGA (57)	155	83,4

[¹ Die Berechnung der Schmelztemperatur T_m erfolgte nach Formel (1), siehe S. 29.

[² Die Schmelztemperaturen der PCR-Produkte $T_{m,P}$ wurde anhand von Dissoziationskurven ermittelt, siehe Kap. 2.5.3.2, S. 48.]

Die Spezifität der GSPs für *RpPAL1*, 2 und 3, für *RpCHS3*, 4 und 5, sowie für *Rp18S* wurde durch PCR und Agarosegelelektrophorese (Abb. 21), sowie durch Sequenzierung der Amplifikationsprodukte (Daten nicht gezeigt) überprüft und bestätigt.

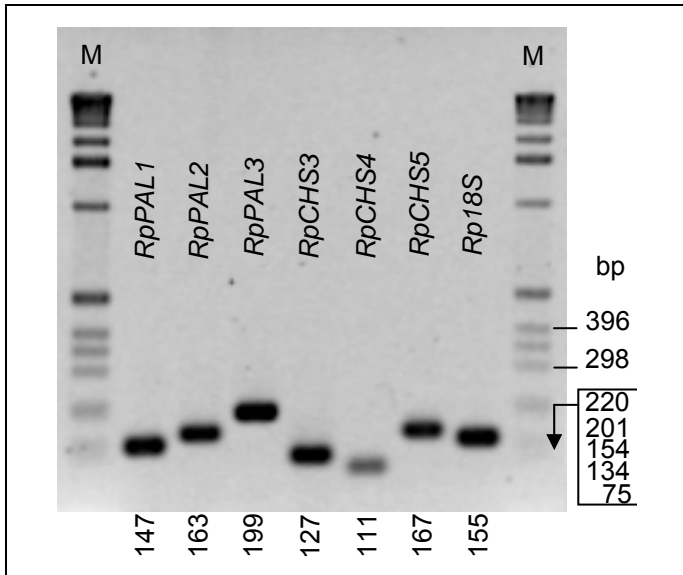


Abbildung 21 – Überprüfung der GSPs für die Real-Time PCR. Gezeigt ist ein Agarosegel mit den Ethidiumbromid-gefärbten Banden der mit den GSPs amplifizierten PCR-Produkte. Die erwarteten Produktgrößen [bp] sind unten aufgeführt. M – Marker 1kb Ladder (Invitrogen).

3.3 Extraktion von Gesamt-RNA

Aus den Proben aus Robinienstammquerschnitten und aus Pathogenholz wurde die Gesamt-RNA gemäß Kap. 2.3.2 (S. 26) extrahiert. Jeweils 1 µl der Gesamt-RNA-Lösungen wurde per Agarose-Gelelektrophorese analysiert (Abb. 22, S. 78 und Abb. 23, S. 79).

Bei den Proben aus Robinienstammquerschnitten zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der RNA-Konzentration der Extrakte und dem Alter der Jahrringe der Gewebezonen: Die Proben aus den äußeren Splintabschnitten (DX, EW, OS) wiesen stets die höchsten RNA-Konzentrationen auf, während aus den tieferliegenden Splintbereichen (MS, IS und TZ) meist deutlich geringere RNA-Mengen extrahiert wurden (Abb. 22). Erkennbar waren diese Unterschiede an den unterschiedlichen Bandenintensitäten der ribosomalen RNA (25S- und 18S-Untereinheiten). Diese Resultate sind Folge des nach innen abnehmenden Anteils lebenden Parenchymgewebes (Magel et al. 1991). Einige Gesamt-RNA-Proben wiesen RNA-Konzentrationen auf, die sowohl unterhalb der Nachweisgrenze der Ethidiumbromidfärbung, als auch unterhalb der Nachweisgrenze des UV-Spektrophotometers lagen. Eine Konzentrationbestimmung der RNA und damit auch die Anpassung der Einsatzmengen für den DNase I-Verdau war bei diesen Proben somit nicht möglich. Dies galt vor allem für die IS- und TZ-Proben. Dessen ungeachtet wurden die gering konzentrierten Gesamt-RNA-Proben für den DNase I-Verdau und die cDNA-Synthese eingesetzt. In den Expressionsanalysen stellten sie sich als geeignet heraus.

Bei den RNA-Extraktionen aus Pathogenholz (Abb. 23, S. 79) stammten sämtliche Proben aus den äußeren Splintabschnitten. Die RNA-Ausbeuten variierten in geringerem Maße als die Proben aus Robinienstammquerschnitten und zeigten ein uneinheitliches Muster. Als Ursache hierfür sind vermutlich zufällige Variationen bei der Extraktion zu nennen.

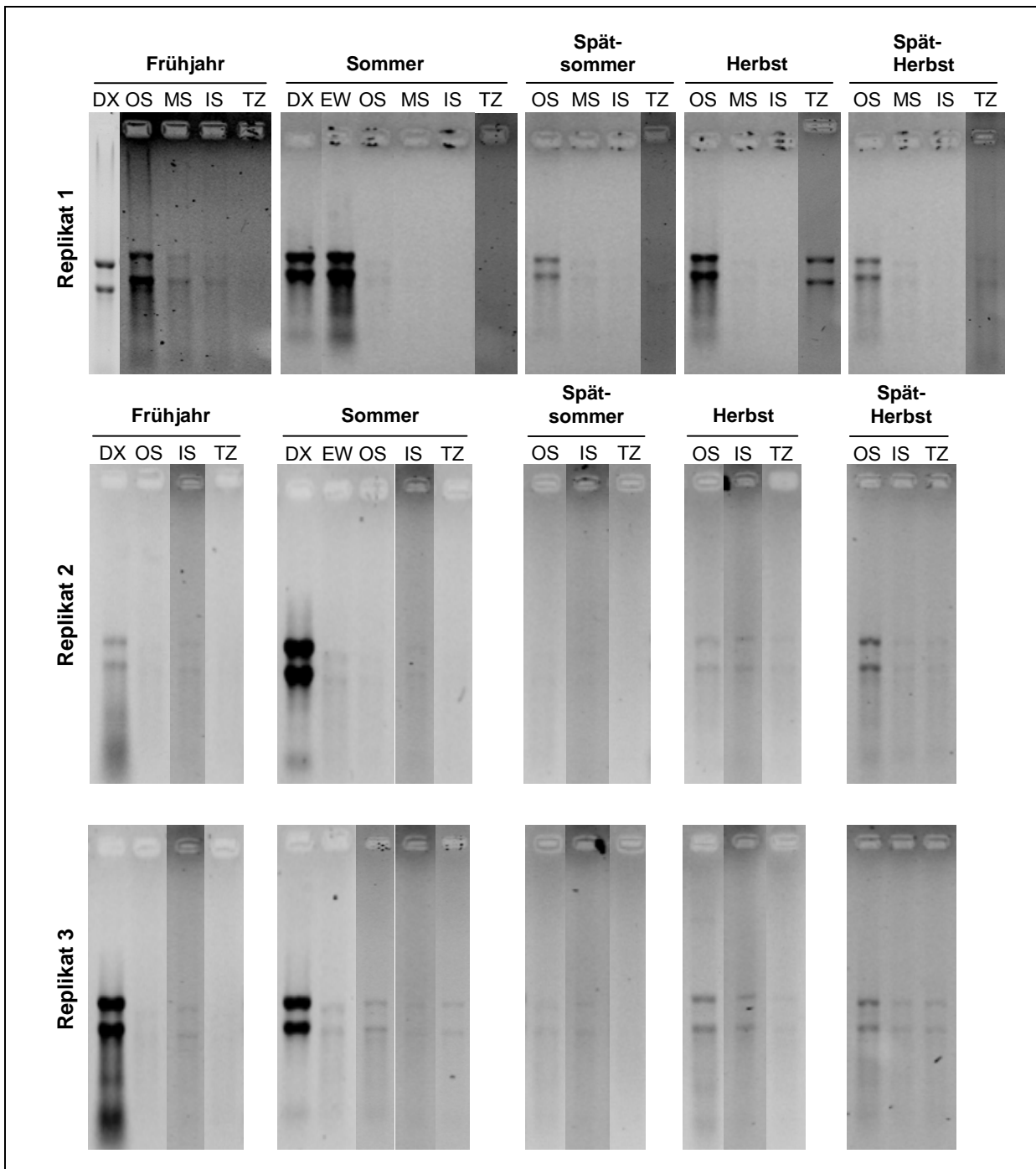


Abbildung 22 – Gesamt-RNA aus Robinienstammquerschnitten. Es wurde je Probe Gesamt-RNA, extrahiert aus ca. 1,5 mg Holzpulver, im Formaldehyd-Agarosegel (1,2%) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (Kap. 2.3.2, S. 26). Die Proben sind nach Jahreszeiten, Gewebeabschnitten und Replikaten geordnet. Die Proben aus Replikat 1 wurden sowohl für die semiquantitative RT-PCR, als auch für die Real-Time PCR eingesetzt, die Proben aus den Replikaten 2 und 3 nur für die Real-Time PCR. Da die Proben teilweise in separaten Gelen analysiert wurden, treten Helligkeitsunterschiede auf. Abkürzungen: DX – differenzierendes Xylem, EW – Frühholz, OS – äußeres, MS – mittleres und IS – inneres Splintholz, TZ – Splint-Kern-Übergangszone.

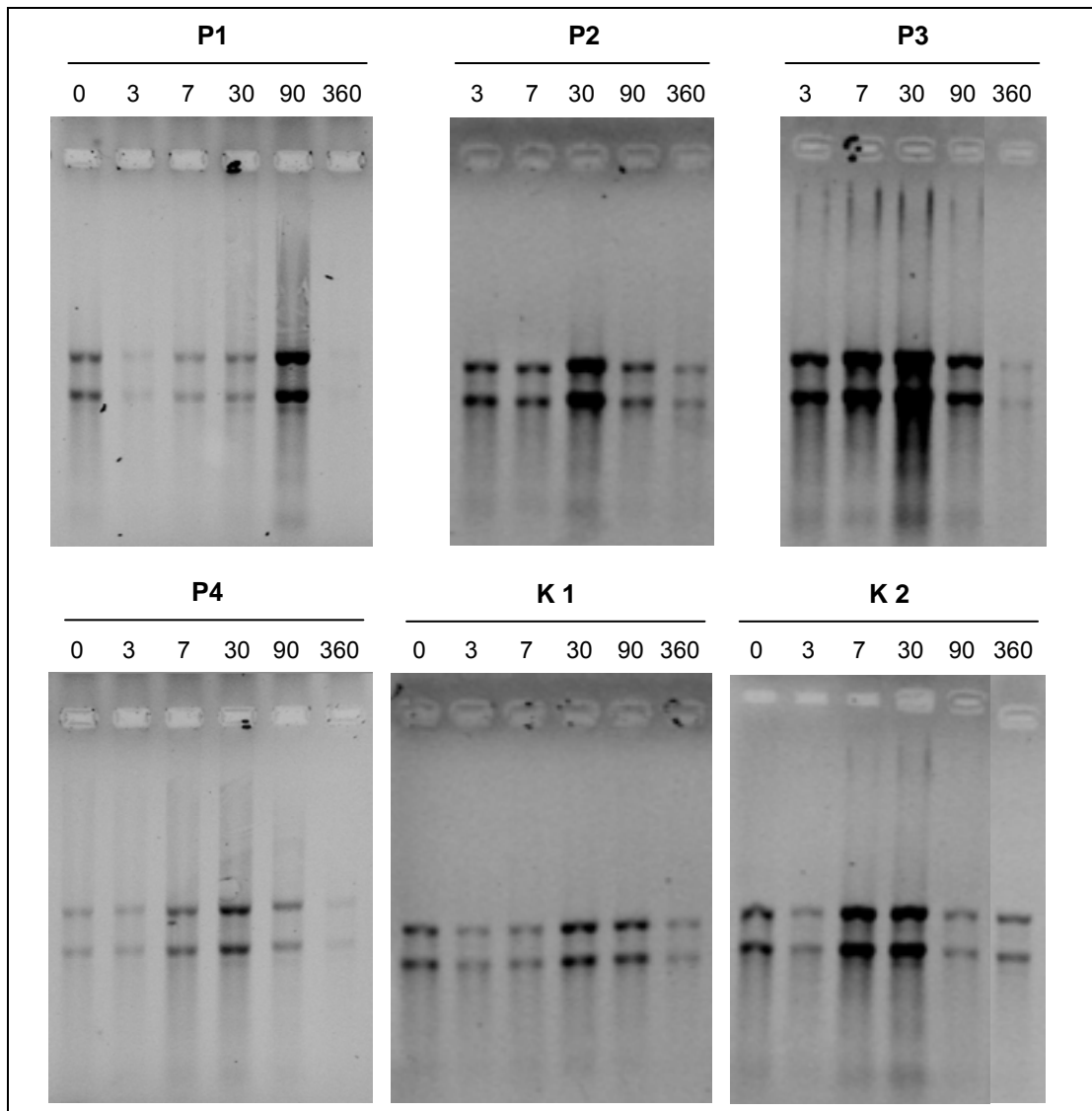


Abbildung 23 – Gesamt-RNA aus Pathogenholz. Es wurde je Probe Gesamt-RNA, extrahiert aus ca. 1,5 mg Holzpulver, im Formaldehyd-Agarosegel (1,2 %) aufgetrennt und mit Ethidiumbromid gefärbt (Kap. 2.3.2, S. 26). Die Proben sind nach Probensatz-zugehörigkeit (Patho 1-4, K1, K2) und nach dem Probennahmezeitpunkt geordnet (0, 3, 7, 30, 90, 360 d_{ai}). Da in separaten Gelen aufgetrennt wurde, treten Helligkeitsunterschiede auf. Abkürzungen: Patho 1, 2, 3 und 4 – parallele Proben aus Pathogenholz, K1, K2 – nicht infizierte Kontrollen.

3.4 Genexpressionsanalysen

3.4.1 PAL- und CHS-Expression im Xylem während der Vegetationsperiode

3.4.1.1 Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR

Es wurde die relative Expression der *PAL*-Gene *RpPAL1*, *2*, *3* und *4* und der *CHS*-Gene *RpCHS3*, *4* und *5* im gesunden Xylem der Robinie während der Vegetationsperiode (vereinfachende Bezeichnung: Robinienstammquerschnitte) mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht (Kap. 2.5.2, S. 42). Es zeigte sich, dass die *RpPAL*-Gene *1*, *2* und *3* im Xylem exprimiert werden, *RpPAL4* hingegen nicht. *RpCHS3*, *4* und *5* werden ebenfalls im Xylem exprimiert.

Die *RpPAL*-Gene *1*, *2* und *3* wiesen hinsichtlich Saisonalität und Gewebespezifität sehr ähnliche Expressionsmuster auf (Abb. 24 und 25). Die höchsten Transkriptmengen wurden zum einen im Stammäußeren in den Geweben mit Holzbildungsaktivität [differenzierendes Xylem (DX), Frühholz (EW) und äußerer Splint (OS)], zum anderen in der Splint-Kern-Übergangszone (TZ) gemessen. In den mittleren und inneren Splintabschnitten (MS, IS) lagen hingegen nur vergleichsweise geringe Transkriptmengen vor, teilweise wurden hier auch gar keine Transkripte nachgewiesen. Diese räumliche Zweiteilung der Expression der drei *RpPALs* wurde in unterschiedlicher Ausprägung während der gesamten Vegetationsperiode festgestellt. Bis auf eine Ausnahme (*RpPAL3* im DX im Frühjahr) wurden die höchsten relativen Transkriptgehalte im TZ im Sommer gemessen. Dieses Expressionsmaximum in der TZ im Sommer ist Ausdruck einer mehr oder weniger ausgeprägten saisonalen Hochregulierung der drei *RpPALs* in der Zeit von Sommer bis Herbst im Vergleich zum Frühjahr und Spätherbst.

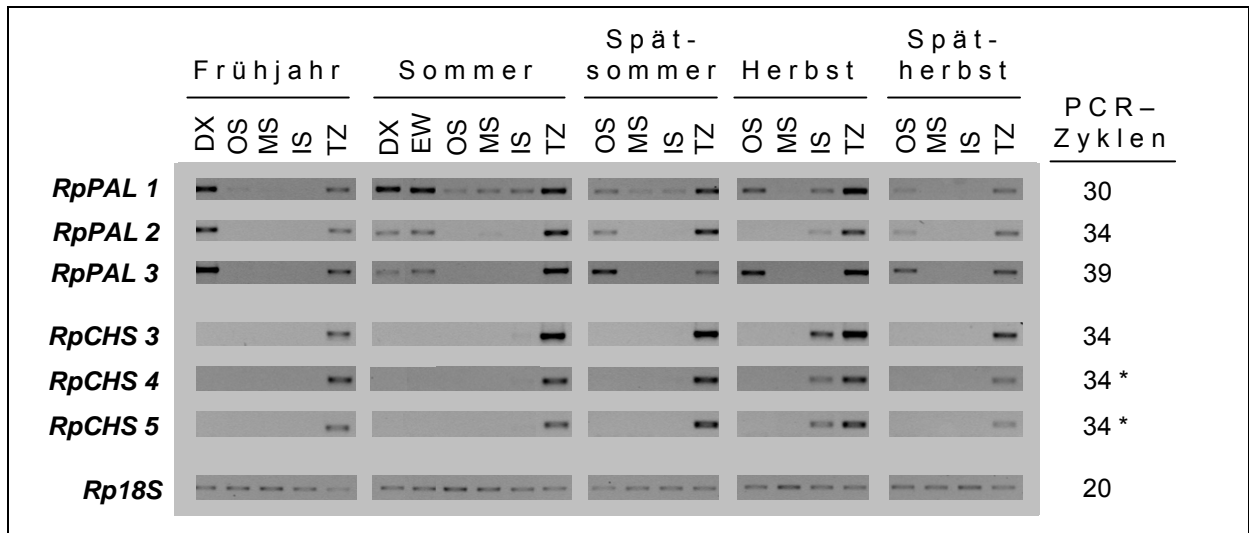


Abbildung 24 – Relative Expression von *RpPAL1-3* und *RpCHS3-5* in Robinienstammquerschnitten. Gezeigt ist ein repräsentatives Bandenmuster der PCR-Produktbanden der semiquantitativen RT-PCR. Unten: *Rp18S* – Produktbanden der normalisierten cDNA-Proben. Bei *RpCHS4* und *5* wurde bei allen Proben das template-Volumen im Vergleich zu *RpCHS3* verdoppelt (*). Abkürzungen: DX – differenzierendes Xylem, EW – Frühholz, OS – äußeres Splintholz, MS – mittleres Splintholz, IS – inneres Splintholz, TZ – Splint-Kern-Übergangszone.

Die relative Expression der drei *PAL*-Gene wurde untereinander verglichen, indem basierend auf den angewendeten Zyklenzahlen (Abb. 24) und den ermittelten Amplifikationseffizienzen (E) für die genspezifischen PCRs Korrekturfaktoren (K) errechnet wurden (vgl. Kap. 2.5.2.3, S. 46). Diese dienen der Kompensierung der im Vergleich zu *RpPAL1* (30 Zyklen) größeren Zyklenzahlen bei *RpPAL2* (34 Zyklen) und *RpPAL3* (39 Zyklen). Die Werte für K stellen somit Faktoren dar, die die Unterschiede der Gesamt-Expressionsniveaus zwischen *RpPAL1* und 2, sowie zwischen *RpPAL1* und 3 ausdrücken. Mit den ermittelten Amplifikationseffizienzen von $E_{RpPAL1} = E_{RpPAL2} = E_{RpPAL3} = 2$ beträgt K für das Verhältnis *RpPAL1/RpPAL2* $K_{1,2} = 2^{34}/2^{30} = 2^4 = 16$, bzw. für das Verhältnis *RpPAL1/RpPAL3* $K_{1,3} = 2^{39}/2^{30} = 2^9 = 512$. *RpPAL1* erweist sich damit als das am stärksten exprimierte *PAL*-Gen (Abb. 24), *RpPAL2* als das zweitstärkste und *RpPAL3* als das schwächste unter den drei *PAL*-Genen.

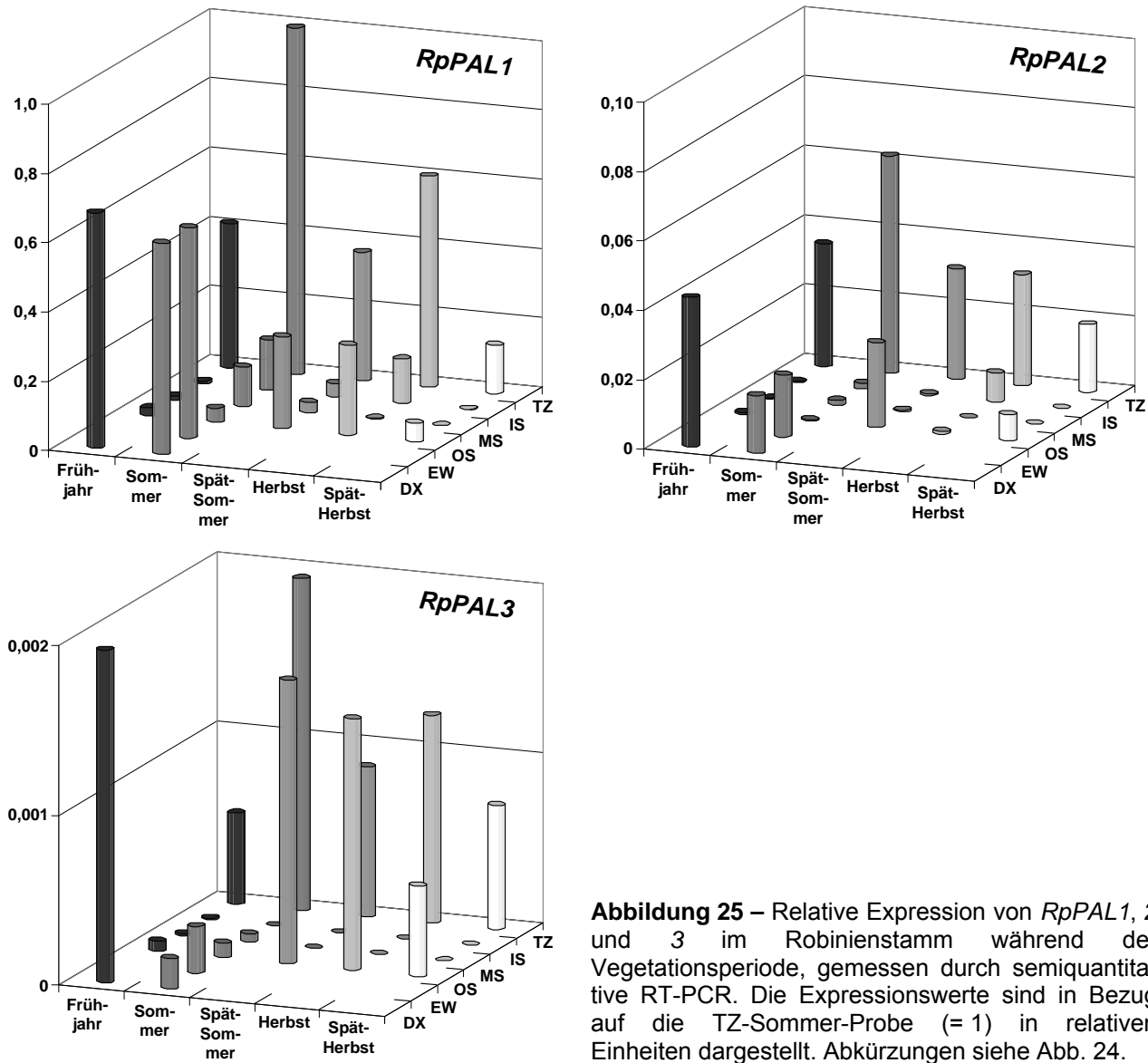


Abbildung 25 – Relative Expression von *RpPAL1*, *2* und *3* im Robinienstamm während der Vegetationsperiode, gemessen durch semiquantitative RT-PCR. Die Expressionswerte sind in Bezug auf die TZ-Sommer-Probe (= 1) in relativen Einheiten dargestellt. Abkürzungen siehe Abb. 24.

Von *RpPAL4* wurde keinerlei Expression im Robinienstamm gemessen: Mit *RpPAL4*-spezifischen Primern (siehe Kap. 3.2.1, S. 69) wurde versucht, Expressionsdaten von *RpPAL4* in diesen Proben zu erhalten. Es wurden keine PCR-Produkte amplifiziert (Abb. 26).

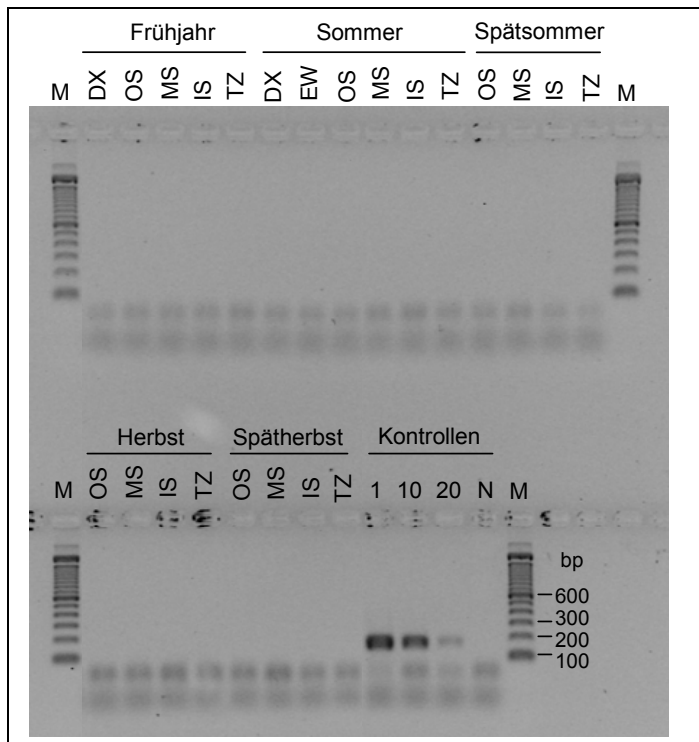


Abbildung 26 – *RpPAL4*-Expression im Robinienstammquerschnitt während der Vegetationsperiode. Kontrollen: template genomische DNA mit den Verdünnungsfaktoren 1, 10 und 20. N = Negativkontrolle ohne template; M = Marker (100 bp Ladder, Invitrogen).

Von den sechs identifizierten *CHS*-Genen *RpCHS1* - 6 wurde die Expression der drei *CHS*-Gene *RpCHS3*, 4 und 5 in Robinienstammquerschnitten analysiert. *RpCHS1* und 2 wurden aufgrund nicht bekannter 3'-UTRs nicht einbezogen, und für *RpCHS6* konnten keine genspezifischen Primer konstruiert werden (vgl. Kap. 3.2.1, S. 69).

Die drei *CHS*-Gene *RpCHS3*, 4 und 5 zeigen im Xylem der Robinie eine einheitliche Verteilung mit ausschließlicher Expression im Stamminneren nahe der Kerngrenze (IS, TZ, siehe Abb. 24). In der TZ, der Zone mit ausgeprägter Flavonoidsyntheseaktivität im Zuge der Kernholzbildung, wurde dabei die stärkste Expression festgestellt. Im IS ist im Sommer eine sehr schwache und im Herbst eine etwas stärkere Expression erkennbar. In allen Geweben und während der gesamten Vegetationsperiode ist *RpCHS3* am stärksten exprimiert, *RpCHS4* und 5 sind in etwa gleich stark exprimiert. Eine schwach ausgeprägte Saisonalität der *CHS*-Expression ist insofern auszumachen, als in den Sommermonaten und im Herbst die Gesamtexpression der drei *CHS*-Gene etwas stärker ist als im Frühjahr und im Spätherbst.

Bei den Expressionsanalysen der drei *RpCHS*-Gene 3, 4 und 5 konnten – anders als bei den *RpPAL*-Genen – identische Zyklenzahlen bei der PCR angewendet werden. Jedoch wurden bei *RpCHS4* und 5 die template-Volumina im Vergleich zu *RpCHS3* verdoppelt. Die Amplifikationseffizienzen der PCRs für *RpCHS3*, 4 und 5 erwiesen sich als identisch, mit $E_{RpCHS3} = E_{RpCHS4} = E_{RpCHS5} = 2$. Somit wurde unter Einbeziehung des Faktors 0,5, der den doppelten template-Volumina bei *RpCHS4* und 5 Rechnung trägt, ein Vergleich der relativen Expression der drei *RpCHS*-Gene möglich. Dieser Vergleich ist in Abbildung 27 graphisch dargestellt. Es wird deutlich, dass *RpCHS3* in der TZ unabhängig von der Jahreszeit am

stärksten exprimiert wird. *RpCHS3* ist in dieser Zone etwa 4- bis 16-fach stärker exprimiert als *RpCHS4* und 5. Ohne die Korrektur der relativen Expression von *RpCHS4* und 5, welche aus den densitometrisch bestimmten Bandenintensitäten der PCR-Produkte abgeleitet wurden (vgl. Abb. 24, S. 81), würden diese großen Unterschiede zu *RpCHS3* nicht direkt ersichtlich werden.

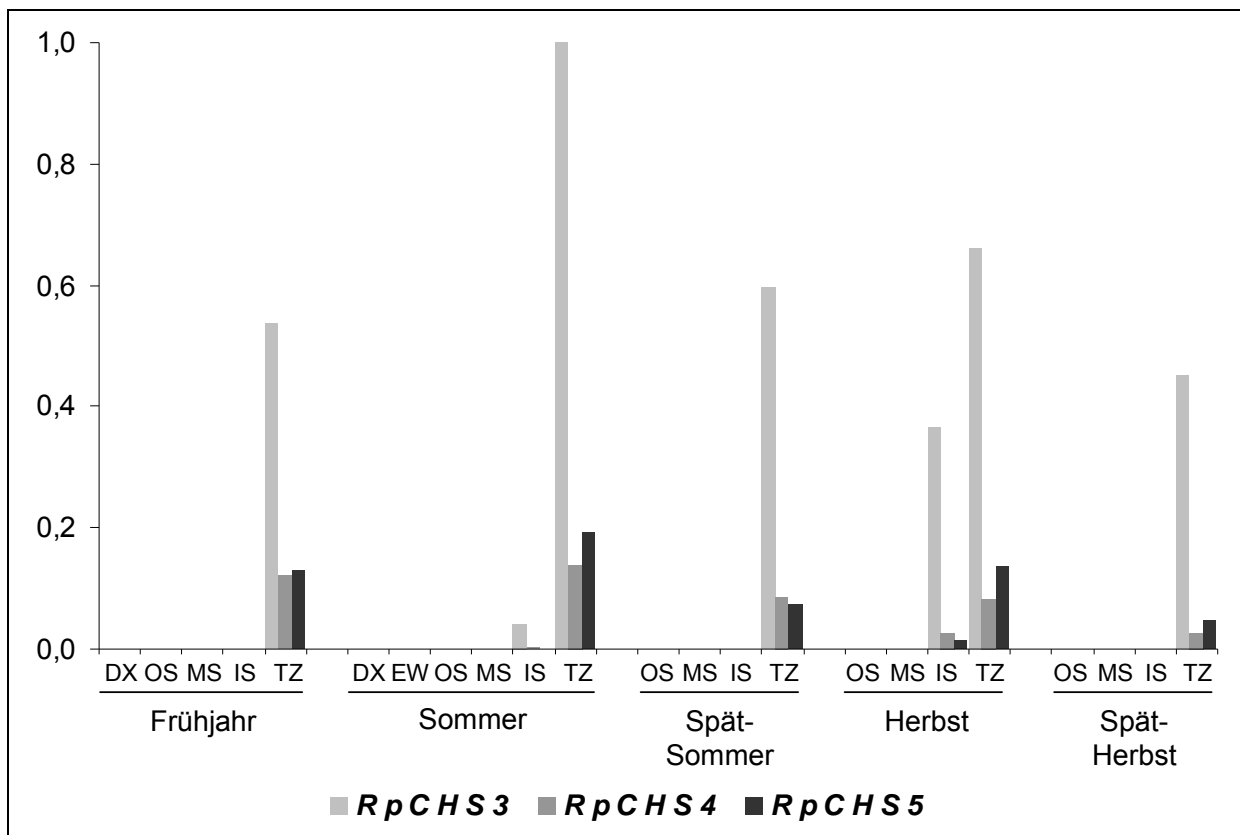


Abbildung 27 – Relative Expression von *RpCHS3*, 4 und 5 in Robinienstammquerschnitten, gemessen durch semiquantitative RT-PCR. Die Werte sind in relativen Einheiten und in Bezug auf die Expression in der TZ-Sommer-Probe (= 1) und unter Berücksichtigung der doppelten template-Menge bei *RpCHS4* und 5 dargestellt (Korrekturfaktor jeweils 0,5). Abkürzungen siehe Abb. 24.

3.4.1.2 Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR

Nachdem die Expression der *PAL*- und *CHS*-Gene im Xylem der Robinie während der Vegetationsperiode mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert wurde, wurden diese Untersuchungen mit Hilfe der Real-Time PCR ergänzt. Diese Methodik bietet die Möglichkeit eine größere Zahl an Proben zu analysieren, als dies bei der semiquantitativen RT-PCR möglich ist. Folglich wurden zwei weitere biologische Replikate, d.h. Einzelbäume, pro Probennahmezeitpunkt einbezogen (insgesamt drei individuelle Bäume pro Jahreszeit).

Beide Methoden – die semiquantitative RT-PCR und die Real-Time PCR – lieferten insgesamt gute Übereinstimmungen in den erhaltenen Expressionsmustern.

Die Analysen mit Hilfe der Real-Time PCR wurden in mehreren Einzelexperimenten durchgeführt. In jedem Einzelexperiment wurde die Expression von jeweils einem Zielgen in einem Replikat des Probensatzes (= Gewebeproben der fünf Probennahmezeitpunkte) untersucht. Parallel zu den Analysen wurde bei jedem Einzelexperiment die Amplifikationseffizienz (E) der GSPs des untersuchten Zielgens bestimmt (vgl. Kap. 2.5.3.4, S. 52). Aus den Amplifikationseffizienzen der Einzelexperimente wurden die Mittelwerte berechnet und diese für die Berechnung der relativen Expression herangezogen (Tab. 17). Die ermittelten Amplifikationseffizienzen der einzelnen GSPs bewegten sich einem Bereich zwischen 1,81 (*RpPAL3*) und 2,02 (*Rp18S*), wobei der Wert 2 eine Verdoppelung des PCR-Produkts (prozentual: 100 %) bedeutet. Die Variationskoeffizienten lagen zwischen 0,9 und 4,6 %.

Bei der Ermittlung der Amplifikationseffizienz unter Verwendung von cDNA (vgl. Kap. 2.5.3.4, S. 52) wurden Werte erhalten, die mit denen mit Plasmid-DNA erhaltenen weitgehend identisch waren (Daten nicht gezeigt). Für die Datenauswertung, bzw. Berechnung der relativen Expression wurden die mit Plasmid-DNA erhaltenen Werte verwendet.

Tabelle 17 – Amplifikationseffizienzen E der genspezifischen Primerpaare für die Real-Time PCR. Aufgelistet sind die Einzelwerte für E aus den fünf Wiederholungen (1 - 5), sowie die Mittelwerte und Standardabweichungen (MW ± SD), die in die Berechnung der relativen Expression einfließen. Eingeklammerte Werte („Ausreißer“) wurden aus der Mittelwertberechnung ausgeschlossen. CV – Variationskoeffizient.

GSP	A m p l i f i k a t i o n s e f f i z i e n z E					MW ± SD	CV [%]
	1	2	3	4	5		
<i>RpPAL1</i>	1,992	(2,078)	1,969	1,983	1,968	1,98 ± 0,012	1,2
<i>RpPAL2</i>	1,974	2,014	1,964	2,015	1,990	1,99 ± 0,023	2,3
<i>RpPAL3</i>	1,849	(1,914)	1,783	1,844	1,780	1,81 ± 0,038	4,6
<i>RpCHS3</i>	1,882	1,879	1,855	1,862	(1,929)	1,87 ± 0,013	1,5
<i>RpCHS4</i>	(2,094)	1,835	1,845	1,820	1,858	1,84 ± 0,016	1,9
<i>RpCHS5</i>	(1,940)	1,845	1,841	1,859	1,853	1,85 ± 0,008	0,9
<i>Rp18S</i>	2,018	1,992	2,066	1,974	2,044	2,02 ± 0,037	3,7

Aus den C_T-Werten und der Amplifikationseffizienz der Zielgene sowie den entsprechenden Werten für die interne Referenz *Rp18S* wurde die relative Expression der Zielgene in den Einzelproben nach Gleichung (3) berechnet (Kap. 2.5.3.5, S. 53).

Die für *RpPAL1*, 2 und 3 erhaltenen Expressionswerte weisen innerhalb der Einzelbäume, d.h. der Replikate jeweils eines Probennahmezeitpunkts, teilweise große Unterschiede auf, was sich in hohen Standardabweichungen widerspiegelt. Die entsprechenden Variationskoeffizienten (CV) bewegten sich bei den Proben mit „nennenswerter“ *PAL*-Expression zumeist bei Werten von etwa 40-50 %, bisweilen auch bei 80 bis 130 % (v.a.

RpPAL3 und *RpPAL2*, vgl. Abb. 28 und Tab. A3 und A4 im Anhang, S. 168-169). Ferner erwiesen sich die Expressionswerte aller untersuchten *PAL*- und *CHS*-Gene in einem Replikat (Einzelbaum) der Spätsommer-Probennahme und in einem aus dem Herbst als unbrauchbar, weil hier sowohl *PAL*- als auch *CHS*-Genexpression entweder nur schwach (TZ), meist jedoch gar nicht nachgewiesen wurde. Die Proben dieser Bäume wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt (vgl. Tab. A3 im Anhang, S. 168, kursiv gedruckte Werte an jeweils dritter Stelle).

Trotz dieser Unterschiede werden allgemeingültige Muster der *PAL*-Genexpression im Robinienstamm ersichtlich. Die drei *PAL*-Gene *RpPAL1*, 2 und 3 werden sowohl räumlich, d.h. gewebespezifisch, als auch zeitlich, d.h. saisonal im Xylem der Robinie reguliert. Darüber hinaus treten Unterschiede in den relativen Anteilen der drei *PAL*-Gene an der gesamten, aufsummierten *PAL*-Expression in den einzelnen Gewebeabschnitten auf. Hinsichtlich der Gewebespezifität (räumliche Komponente) zeichnet sich bei den drei *PAL*-Genen ein zweigeteiltes radiales Verteilungsmuster im Xylem ab, mit starker Expression in den äußeren Splintabschnitten (Zuwachszone, DX und EW) und den inneren Splintabschnitten an der Kerngrenze (Splint-Kern-Übergangszone, TZ). In den dazwischen liegenden Splintabschnitten (IS) kommen nur geringe Mengen an *PAL*-Transkripten vor. Dieses radiale Verteilungsmuster kommt mit unterschiedlicher Ausprägung zu allen Jahreszeiten vor. Eine saisonale Komponente der *PAL*-Genregulation wird bei Betrachtung der TZ deutlich, in der die stärkste Expression, aufsummiert etwa 50 % relative Expression, in den Sommermonaten auftritt, wobei *RpPAL1* mit durchschnittlich fast 94 % der Gesamt-Expression den mit Abstand höchsten Anteil ausmacht, gefolgt von *RpPAL2* (6 %) und *RpPAL3* (0,3 %). Im Frühjahr und Spätherbst sind in der TZ sehr viel geringere Transkriptmengen der drei *PAL*-Gene präsent (aufsummiert 1,8 % bzw. 1,0 %). Die TZ im Herbst liegt dazwischen (aufsummiert knapp 13 %), wobei *RpPAL1* hier den höchsten Anteil einnimmt (84 %, *RpPAL3* 10 %). In der Zuwachszone, repräsentiert durch DX und EW im Frühjahr und Sommer, beträgt die aufsummierte *PAL*-Expression mit durchschnittlich ca. 9 % relativer Expression etwa ein Fünftel der Expression in der TZ in den Sommermonaten. Keines der drei *PAL*-Gene ist auf eine der beiden, hinsichtlich der dort stattfindenden physiologischen Vorgänge grundsätzlich verschiedenen Zonen (Zuwachszone, bzw. Kernholzbildungszone) ausschließlich beschränkt.

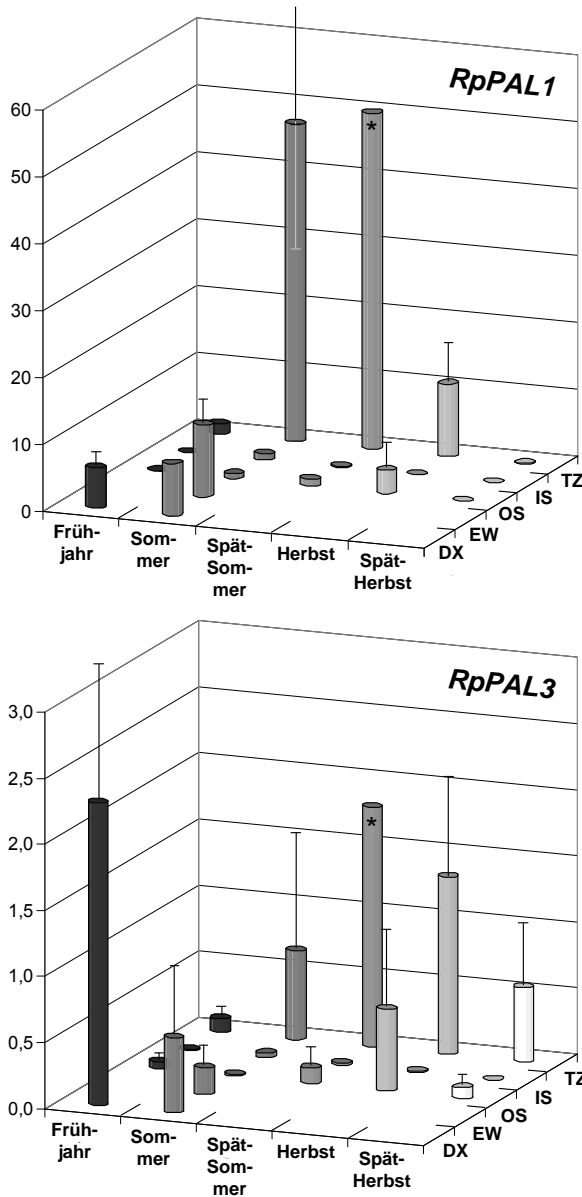


Abbildung 28 – Relative Expression [%] von *RpPAL1*, *2* und *3* im gesunden Xylem der Robinie unterteilt nach Jahreszeit (x-Achse) und Gewebeabschnitt (y-Achse). Die relativen Expressionswerte sind als prozentuale Anteile in Bezug auf die Expression von *Rp18S* dargestellt (z-Achse). Standardabweichungen (SD) beziehen sich auf den jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Bei Säulen ohne SD ist die Darstellung aus graphischen Gründen nicht möglich. SDs die den Rahmen eines Diagramms überschreiten, sind nach oben unvollständig und nach unten vollständig eingezeichnet. Mit Sternen (*) markierte Säulen beruhen auf jeweils einem einzelnen Messwert. Abkürzungen siehe Tab. 1, S. 24.

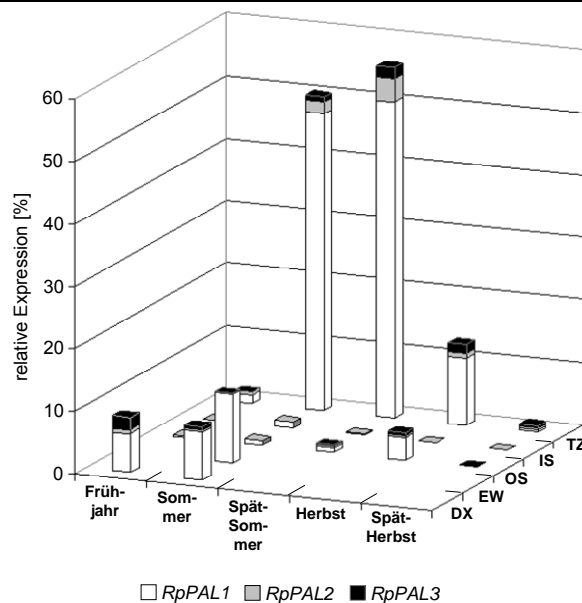


Abbildung 29 – Aufsummierte und anteilige relative Expression [%] der *PAL*-Genfamilienmitglieder *RpPAL1*, *2* und *3* im gesunden Xylem der Robinie während der Vegetationsperiode. Grundlage sind die berechneten Mittelwerte (vgl. Abb. 28 und Tab. A4 im Anhang, S. 169). Abkürzungen siehe Tab. 1, S. 24.

Die in den Abbildungen 28 und 29 gezeigten Expressionsmuster geben keinen Aufschluss über die relative Hochregulierung der *PAL*-Expression in Bezug auf Gewebe mit nur basaler *PAL*-Genaktivität. Werden die genspezifischen *PAL*-Expressionswerte auf die Expression im inneren Splintholz (IS) in der jeweiligen Jahreszeit bezogen – IS repräsentiert ein Xylemgewebe mit nur basaler *PAL*-Genaktivität –, so ergibt sich ein anderes Bild (Abb. 30). Der saisonale (relative) Höhepunkt von *RpPAL1* in der Splint-Kern-Übergangszone (TZ) „verschiebt“ sich in den Herbst und der von *RpPAL3* in den Spätherbst. Die stärkste relative Hochregulierung von *RpPAL2* ist im Frühjahr im differenzierenden Xylem (DX) vorzufinden, sie beträgt mehr als das doppelte der stärksten relativen Hochregulierung dieses Gens in der TZ. Diese stärkste Hochregulierung von *RpPAL2* in der TZ liegt im Frühjahr und im Spätherbst, während von Frühjahr bis in den Herbst eine schrittweise Abnahme zu verzeichnen ist. Zudem liegen die Werte für die relative Hochregulierung aller drei *PAL*-Gene in vergleichbaren Größenordnungen (erkennbar an identischen Skalierungen in Abb. 30), hinsichtlich der Steigerung der Genexpression in der TZ gegenüber der basalen „Hintergrund“-Aktivität im IS unterscheiden sich die drei *PAL*-Gene also nur wenig.

Bei Aufsummierung der Werte für die relative Hochregulierung der drei *PAL*-Gene wird ersichtlich, dass die stärkste relative Hochregulierung der *PAL*-Gesamtexpression in der TZ am Ende der Vegetationsperiode, im Herbst und Spätherbst auftritt, während der saisonale Tiefpunkt im Sommer liegt (Abb. 31). Die insgesamt stärkste relative Hochregulierung findet sich im Frühjahr im differenzierenden Xylem, wobei *RpPAL2* hier eine mehr als dreifach stärkere Hochregulierung zeigt als *RpPAL1* und *RpPAL3*.

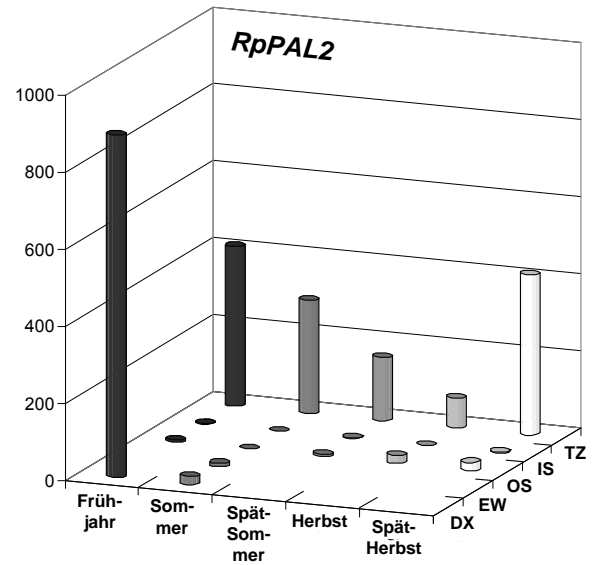
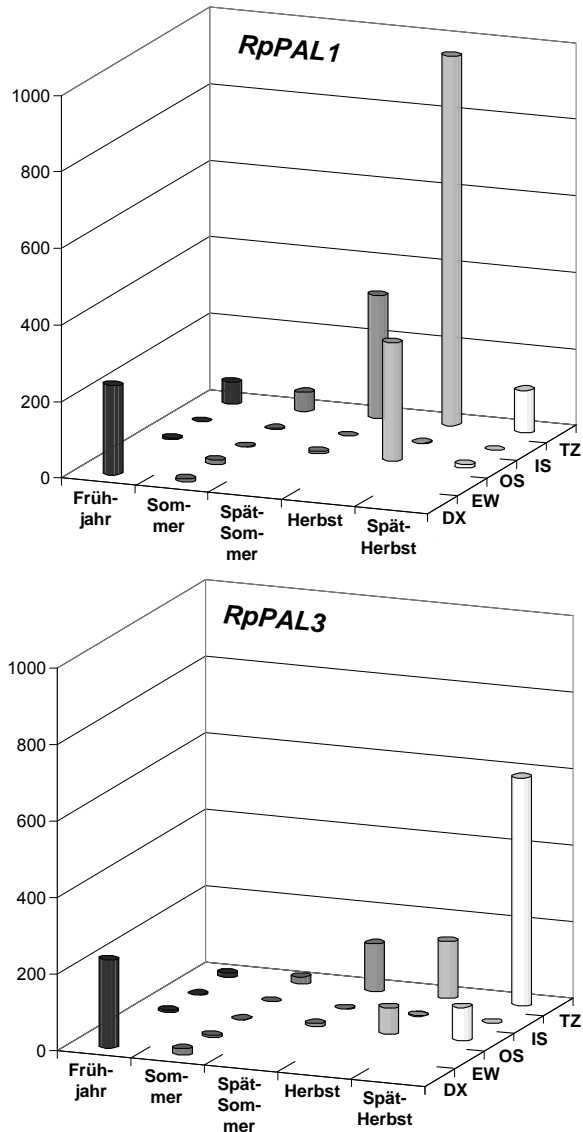


Abbildung 30 – Relative Hochregulierung von *RpPAL1*, 2 und 3 im gesunden Xylem der Robinie relativ zur seasonspezifischen Expression des jeweiligen Gens im inneren Splintholz (IS = 1). Werte in relativen Einheiten. Abkürzungen siehe Tab. 1, S. 24.

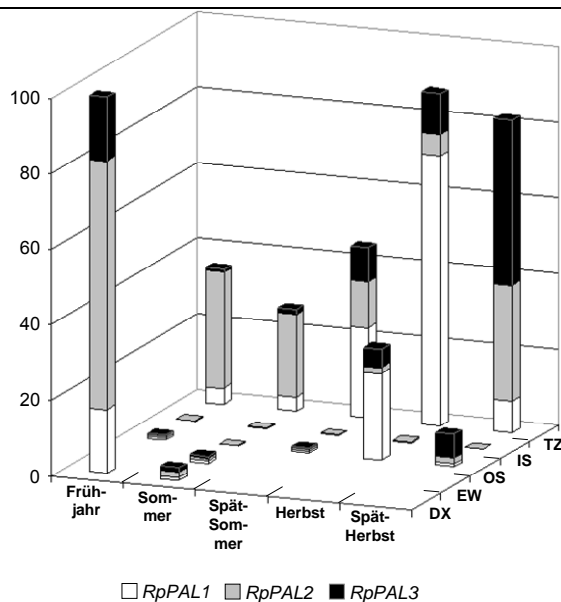


Abbildung 31 – Aufsummierte relative Hochregulierung (relativen Einheiten) von *RpPAL1*, 2 und 3 im gesunden Xylem der Robinie relativ zur seasonspezifischen Expression des jeweiligen Gens im inneren Splintholz (IS = 1). Abkürzungen siehe Tab. 1, S. 24.

Zusammenfassend betrachtet erweist sich *RpPAL1* als das im Xylem mit Abstand am stärksten exprimierte *PAL*-Gen mit einem durchschnittlichen Anteil von etwa 72 %, *RpPAL3* hat einen Anteil von knapp 19 % und *RpPAL2* von 9 %. Der saisonale Höhepunkt der Transkriptgehalte in der Kernholzbildungszone liegt bei allen drei Genen in der Zeit zwischen Sommer und Herbst. Zudem werden die drei *PAL*-Gene mit unterschiedlichen Anteilen im Zuwachsring, d.h. der Holzbildungszone exprimiert. *RpPAL4* wird im Xylem nicht exprimiert. Bei Betrachtung der Expression relativ zum inneren Splint mit nur basaler Expressionsaktivität – ein Maß für die relative Hochregulierung der *PAL*-Gene – verschiebt sich das Maximum in den Herbst und Spätherbst, allerdings sind in dieser Zeit insgesamt geringere Transkriptgehalte präsent.

Die drei untersuchten *RpCHS*-Gene 3, 4 und 5 zeigen ein streng gewebespezifisches Expressionsmuster mit einer nahezu vollständigen Beschränkung auf die Splint-Kern-Übergangszone (TZ) (Abb. 32). In den übrigen Stammabschnitten liegen nur Spuren dieser *RpCHS*-Transkripte vor (<0,04 % relative Expression). Trotz teilweise sehr großer individueller Unterschiede in den Expressionswerten der Parallelproben – resultierend in hohen Standardabweichungen – ist eine saisonale Regulation der drei *CHS*-Gene erkennbar: Die höchste relative Expression tritt im Sommer und Spätsommer auf, während sie im Frühjahr und Spätherbst deutlich herabgesetzt ist. Aufsummiert erreicht die Gesamtexpression der drei *CHS*-Gene im Sommer Werte von etwa 390 % (bezogen auf *Rp18S*), im Spätsommer von 270 % und im Herbst von 108 % (Abb 33). Im Frühjahr und Spätherbst werden Werte von ca. 20 % erreicht. Obwohl die zeitlich-räumlichen Expressionsmuster der drei *CHS*-Gene einander sehr ähnlich sind, weisen die Einzelgene deutliche Unterschiede in ihren Anteilen an der Gesamtexpression auf. *RpCHS3* nimmt mit durchschnittlich etwa 64 % den insgesamt größten Anteil in der TZ ein, *RpCHS4* etwa 21 % und *RpCHS5* 15 % (Abb. 33).

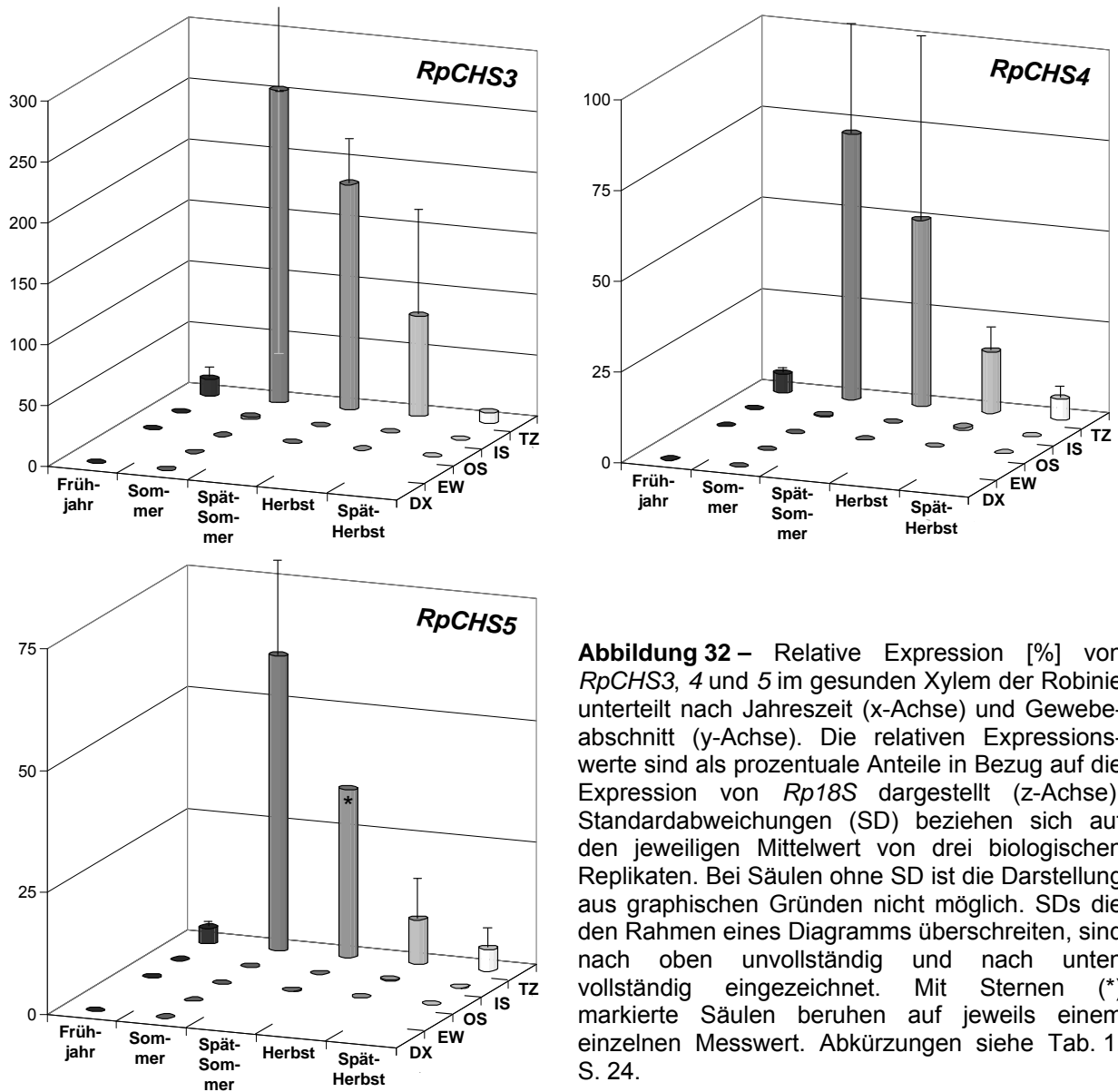


Abbildung 32 – Relative Expression [%] von *RpCHS3*, *4* und *5* im gesunden Xylem der Robinie unterteilt nach Jahreszeit (x-Achse) und Gewebeabschnitt (y-Achse). Die relativen Expressionswerte sind als prozentuale Anteile in Bezug auf die Expression von *Rp18S* dargestellt (z-Achse). Standardabweichungen (SD) beziehen sich auf den jeweiligen Mittelwert von drei biologischen Replikaten. Bei Säulen ohne SD ist die Darstellung aus graphischen Gründen nicht möglich. SDs die den Rahmen eines Diagramms überschreiten, sind nach oben unvollständig und nach unten vollständig eingezeichnet. Mit Sternen (*) markierte Säulen beruhen auf jeweils einem einzelnen Messwert. Abkürzungen siehe Tab. 1, S. 24.

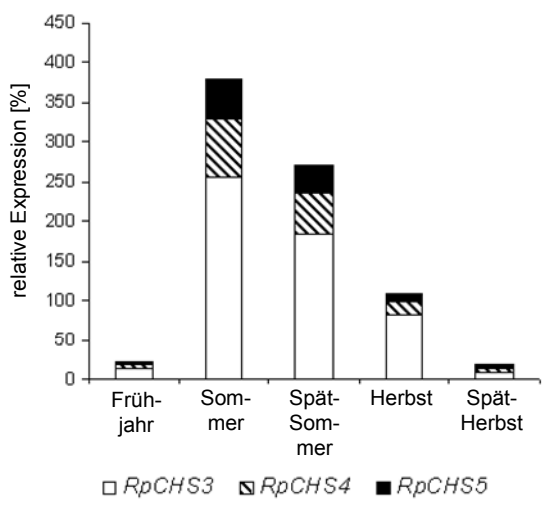


Abbildung 33 – Aufsummierte und anteilige relative Expression [%] der *CHS*-Genfamilienmitglieder *RpCHS3*, *4* und *5* in der Splint-Kern-Übergangszone. Grundlage sind die berechneten Mittelwerte (vgl. Abb. 32 und Tab. A4, S. 169).

Werden die Expressionswerte der drei *CHS*-Gene für die TZ auf die jahreszeitspezifische Expression im äußeren Splintholz bezogen (OS repräsentiert ein Gewebe mit nur basaler *CHS*-Expression), so erweist sich *RpCHS4* als das in der TZ am stärksten hochregulierte *CHS*-Gen, mit einem Faktor von etwa 116000 gegenüber dem äußeren Splintholz (Abb. 34). Diese sehr großen Zahlen resultieren aus der äußerst schwachen Expression der drei *CHS*-Gene in der OS-Zone (, häufig wurden in einzelnen Proben auch gar keine Transkripte detektiert, vgl. Tab. A3, S. 168). Bei *RpCHS4* und *RpCHS5* liegt der Höhepunkt der relativen Hochregulierung im Herbst, *RpCHS3* hingegen zeigt die stärkste relative Hochregulierung im Sommer (Faktor ca. 40000).

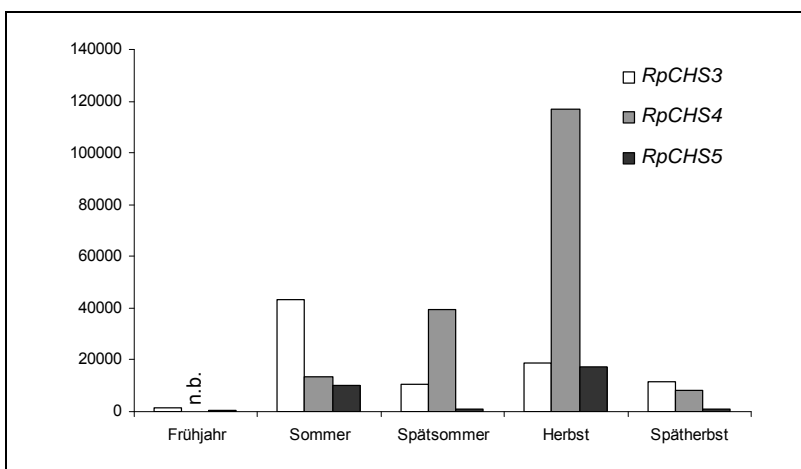


Abbildung 34 – Relative Hochregulierung von *RpCHS3*, 4 und 5 in der Splint-Kern-Übergangszone (TZ) während der Vegetationsperiode, bezogen auf die saison-spezifische Expression im äußeren Splintholz (OS), dargestellt in relativen Einheiten. n.b. – nicht bestimmt.

Vergleicht man die Expression der *PAL*-Gene mit der der *CHS*-Gene in der Splint-Kern-Übergangszone, so wird ersichtlich, dass die Transkriptgehalte von *CHS* auf einem insgesamt viel höheren Niveau liegen als die von *PAL* (vgl. Skalierungen von Abb. 29, S. 87 und Abb. 33, S. 91). So liegt die aufsummierte Expression von *RpCHS3*, 4 und 5 um etwa den Faktor 8 höher als die von *RpPAL1*, 2 und 3.

3.4.2 PAL- und CHS-Expression in pilzinfiziertem Splintholz

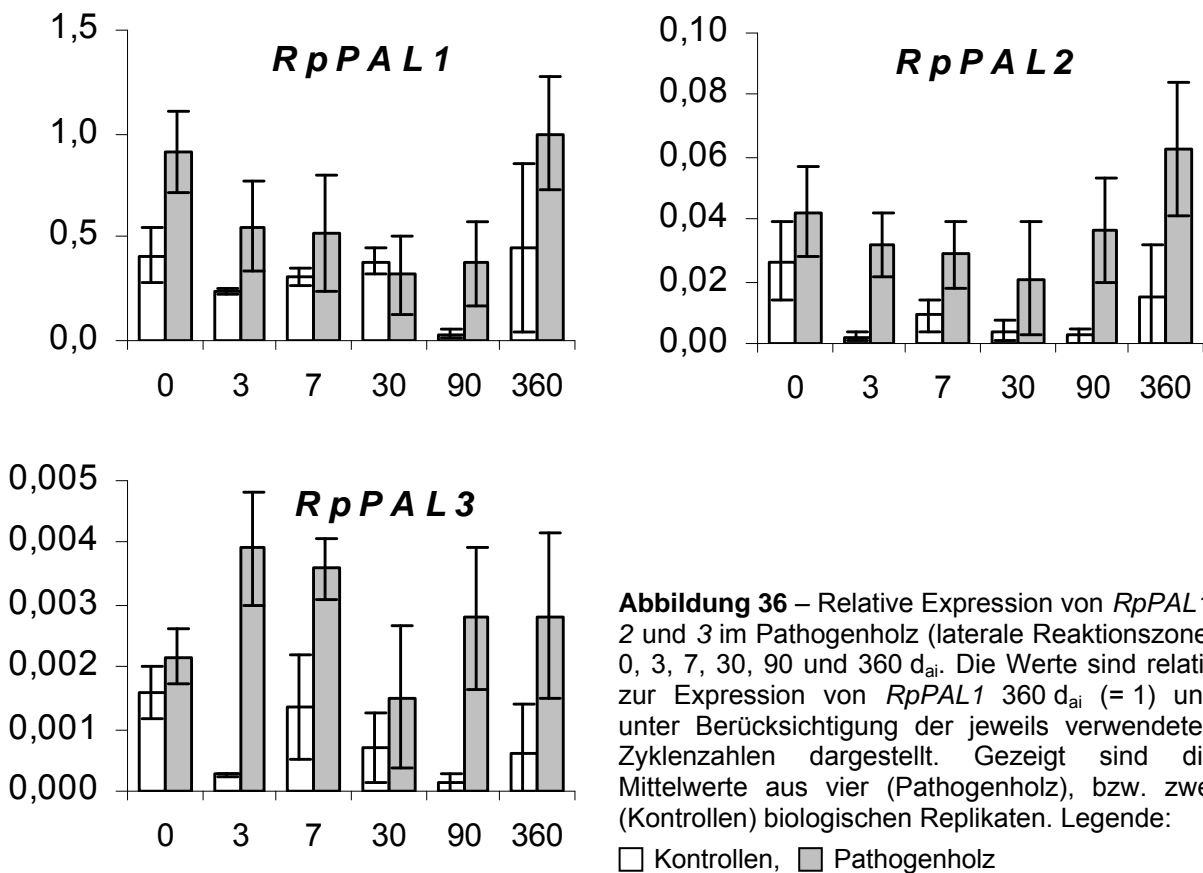
Durch die Verwundung des Splintholzes von *R. pseudoacacia* L. und Infektion mit dem holzerstörenden Pilz *Phellinus robiniae* wurde in der lateralen Reaktionszone in der Nähe der Infektionsstelle (Wand 3 nach CODIT) eine Hochregulierung der PAL-Gene *RpPAL2* und *RpPAL3* und der CHS-Gene *RpCHS3*, 4 und 5 induziert. *RpPAL1* zeigte keine spezifische Induktion, und *RpPAL4* wurde weder in der Reaktionszone noch in den nicht infizierten Kontrollen detektiert.

3.4.2.1 Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR

Für die Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR wurden von allen Proben gleiche cDNA-Mengen als template eingesetzt, erkennbar an annähernd gleichen Bandenintensitäten der *Rp18S*-PCR-Produkte (Abb. 35). Auf diese Weise kann von den erhaltenen Bandenintensitäten der Zielgene auf deren relative Expression rückgeschlossen werden. Die Analysen zeigten eine spezifische Induktion von *RpPAL2* und *RpPAL3* in der lateralen Reaktionszone der Infektionsstellen. *RpPAL1* hingegen wird nicht spezifisch induziert, da es auch in den nicht infizierten Kontrollen ähnlich hoch exprimiert wird. Bereits drei Tage nach Inokulation (3 d_{ai}) stiegen die Transkriptgehalte von *RpPAL2* und 3 im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen an und blieben zu allen weiteren Probennahmezeitpunkten auf einem erhöhten Niveau (Ausnahme *RpPAL3* 30 d_{ai}). *RpPAL3* weist 3 d_{ai} hinsichtlich der Bandenintensität die stärkste Reaktion auf, allerdings wurde die PCR von *RpPAL3* mit zusätzlichen acht Zyklen im Vergleich zu *RpPAL1*, bzw. vier im Vergleich zu *RpPAL2* durchgeführt, was einen direkten Vergleich verhindert und eine Korrektur der Expressionswerte notwendig macht (Korrekturfaktoren K, vgl. Kap. 2.5.2.3, S. 46). In Abbildung 36 (S. 94) sind die aus der Densitometrie abgeleiteten und „Zyklus-korrigierten“ relativen Expressionswerte von *RpPAL1*, 2 und 3 dargestellt. Der Korrekturfaktor K für *RpPAL2* beträgt $2^{30} / 2^{26} = 2^4 = 16$ und der für *RpPAL3* $2^{34} / 2^{26} = 2^8 = 256$. Somit hat *RpPAL1* den größten Anteil an der PAL-Gesamtexpression, auch wenn für dieses Gen keine spezifische Induktion durch Verwundung und Infektion vorzuliegen scheint. *RpPAL2* ist am zweitstärksten vertreten und wird spezifisch induziert, ebenso *RpPAL3*, welches zwar induziert wird, jedoch am schwächsten an der PAL-Gesamtexpression beteiligt ist.

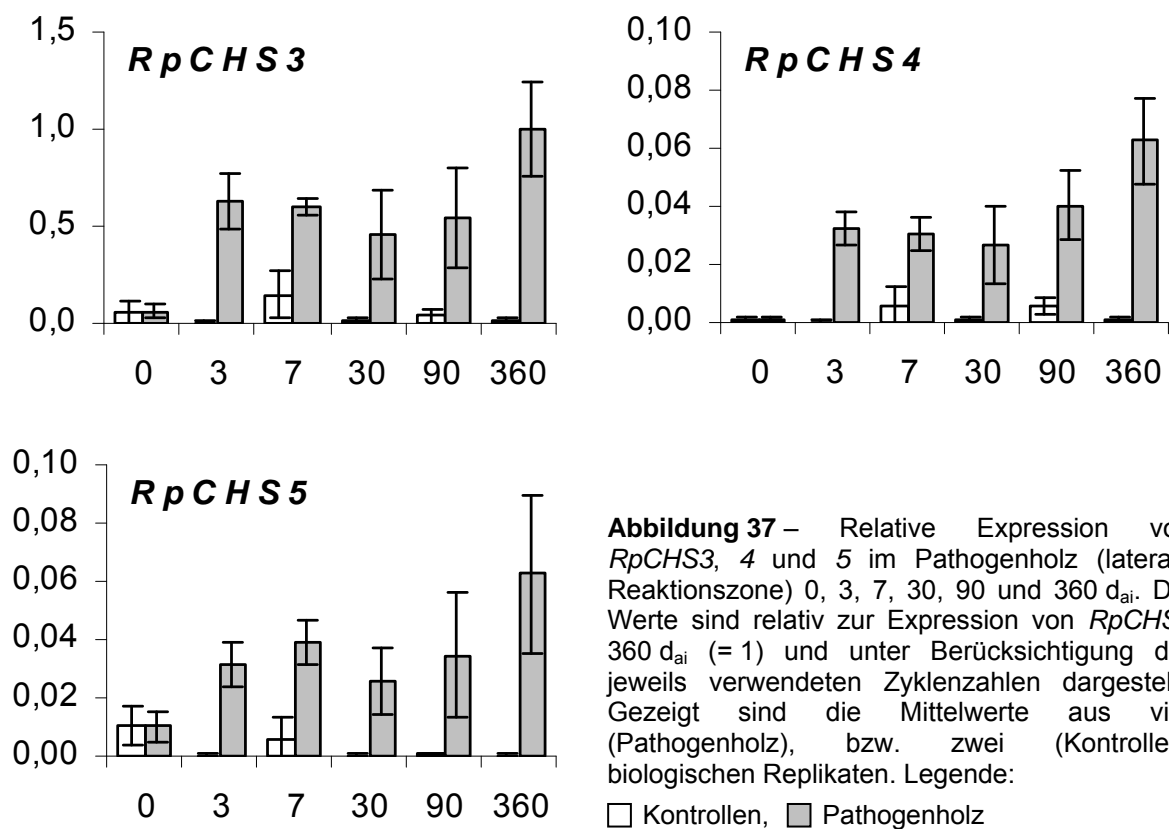
Tage n. Infektion	Kontrollen					Pathogenholz					PCR- Zyklen
	0	3	7	30	90	360	3	7	30	90	
RpPAL1											26
RpPAL2											30
RpPAL3											34
RpCHS3											30
RpCHS4											34
RpCHS5											34
Rp18S											19

Abbildung 35 – Relative Expression von *RpPAL1*, 2 und 3 und von *RpCHS3*, 4 und 5 in nicht infizierten Kontrollen und in Pathogenholz vor (0, nur bei Kontrolle) und 3, 7, 30, 90 und 360 Tage nach Inokulation mit *Phellinus robiniae*. Gezeigt ist ein repräsentatives Muster von PCR-Produktbanden von einem biologischen Replikate. Unten: Expression der internen Referenz *Rp18S* in der normalisierten cDNA.



In der Reaktionszone werden alle drei untersuchten *CHS*-Gene (*RpCHS3*, 4 und 5) exprimiert. Bereits drei Tage nach Inokulation wurden erhöhte Transkriptgehalte dieser Gene detektiert (Abb. 35). In den nicht infizierten Kontrollen sind diese hingegen nur schwach exprimiert. Im gesamten Beprobungszeitraum blieben die erhöhten Transkriptgehalte von *RpCHS3*, 4 und 5 bestehen. Analog zu der oben angegebenen Vorgehensweise wurden für *RpCHS4* und *RpCHS5* Korrekturfaktoren von jeweils $K = 16$ berechnet (in beiden Fällen 34 Zyklen gegenüber *RpCHS3* mit 30 Zyklen). Daraus ergibt sich die stärkste relative Expression für *RpCHS3*, gefolgt von *RpCHS4* und 5, welche jeweils etwa gleich stark exprimiert werden (Abb. 37).

Von *RpCHS6* konnte weder in der Reaktionszone, noch in den Kontrollen nachgewiesen werden, was jedoch auf nicht-funktionelle Primer zurückzuführen ist (Daten nicht gezeigt).



3.4.2.2 Expressionsanalysen mittels Real-Time PCR

Die mittels Real-Time PCR erhaltenen Expressionsdaten entsprechen qualitativ denen aus den semiquantitativen Analysen. Die Expressionswerte der Replikate wiesen jedoch teilweise große individuelle Unterschiede auf, was sich in hohen Standardabweichungen widerspiegelt (Abb. 38). In einigen Fällen wurden „Ausreißer“ aus der Mittelwertberechnung ausgeschlossen (siehe Tab. A5 und A6, S. 170-171). Beim Probenzeitpunkt 360 d_{ai} war die Expression der Gene *RpPAL1*, *RpPAL3*, *RpCHS4* und *RpCHS5* bei der Hälfte der biologischen Replikate (Bäume) deutlich höher als bei der anderen Hälfte, was eine Aufteilung der Bäume dieses Probenahmezeitpunkts in zwei separate Gruppen (A und B) nahe legte [vgl. Abb. 38, S. 97; Abb. 40, S. 99 und Tab. A5 und A6]. Trotz dieser Variationen innerhalb der Replikate zeichnet sich eine durch Verwundung und Infektion hervorgerufene Induktion der Gene *RpPAL2* und *RpPAL3* sowie *RpCHS3*, *RpCHS4* und *RpCHS5* in der Reaktionszone ab. Durch die Gegenüberstellung der Expressionswerte dieser Gene im Pathogenholz und in den nicht infizierten Kontrollen werden bereits drei Tage nach Inokulation deutliche Unterschiede ersichtlich, die sich in allen nachfolgenden Proben fortsetzen. Allein bei *RpPAL1* sind solche deutlichen Unterschiede zwischen Pathogenholz und Kontrollen nicht eindeutig erkennbar, da *RpPAL1* auch in den nicht infizierten Kontrollen auf niedrigem, 30 d_{ai} sogar auf höherem Niveau als im Pathogenholz exprimiert ist. *RpPAL1* wird demnach durch die Verwundung und Infektion nicht spezifisch induziert. *RpPAL2* ist im Pathogenholz zwar deutlich hochreguliert, allerdings auf einem verhältnismäßig niedrigen Niveau (zwischen etwa 1 und 3 % relativer Expression, Abb. 39). *RpPAL3* zeigt von den drei untersuchten *PAL*-Genen die stärkste Reaktion, und dies bereits 3 d_{ai} mit einer Verdreifachung der Transkriptgehalte gegenüber 0 d_{ai} (von knapp 5 auf knapp 15 %). Trotz der starken Induktion von *RpPAL3* im Pathogenholz im Vergleich zu *RpPAL1* und 2 nimmt das nicht spezifisch induzierte *RpPAL1*-Gen den höchsten Anteil an der Gesamtexpression ein (Ausnahme: 90 d_{ai}, vgl. Abb. 39).

Die drei *PAL*-Gene teilen die Eigenschaft, dass zwischen 3 und 30 d_{ai} eine mehr oder weniger starke Abnahme der Expression auftritt, gefolgt von einer unterschiedlich ausgeprägten Zunahme 90 und 360 d_{ai}. Diese Abnahme ist bei *RpPAL3* mit einer Abnahme um ca. 12 Prozentpunkte am stärksten. Des Weiteren sind die drei *PAL*-Gene bereits vor dem Inokulationsexperiment im nicht infizierten Holz exprimiert (Kontrollen und Pathogenholz 0 d_{ai}), und auch in den nicht infizierten Proben der späteren Probenahmezeitpunkte wurde eine Expression auf niedrigem Niveau nachgewiesen, wobei auch hier wieder *RpPAL1* das mit Abstand dominierende Transkript ist (Abb. 38 und 39).

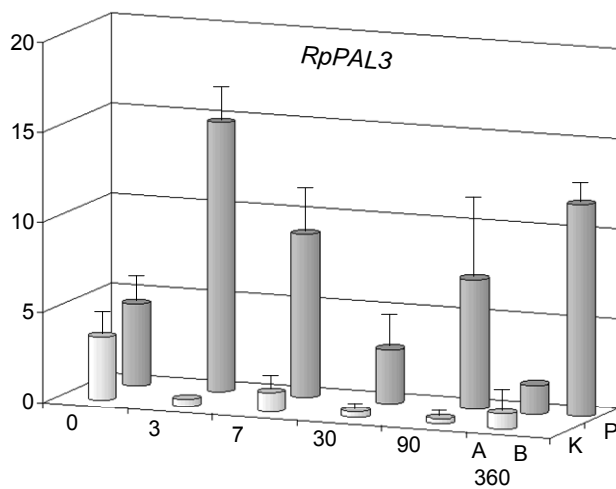
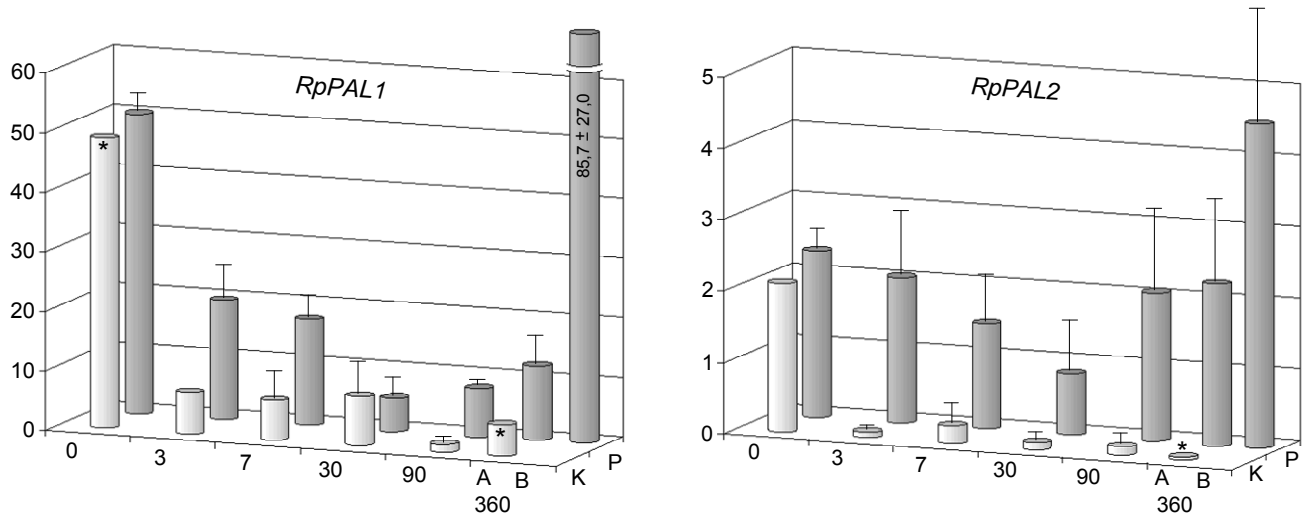


Abbildung 38 – Relative Expression [%] von *RpPAL1*, *2* und *3* in Pathogenholz (P, graue Säulen) und nicht infizierten Kontrollen (K, weiße Säulen) 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai}. Die Expressionswerte [%] sind relativ zur Expression von *Rp18S* dargestellt. Standard-abweichungen (SD) beziehen sich auf den Mittelwert von vier (Pathogenholz), bzw. zwei (Kontrollen) biologischen Replikaten. Bei Säulen ohne SD ist die Darstellung aus graphischen Gründen nicht möglich. Die Replikate (R) für 360 d_{ai} sind aufgrund sehr unterschiedlichen Expressionsverhaltens gruppiert in A und B, mit A = Mittelwert aus R2 und R3, bzw. B = Mittelwert aus R1 und R4 (vgl. Tab. A4, S. 169). Absolutwerte von B (360 d_{ai}) bei *RpPAL1* sind an die Säulen geschrieben. Säulen mit Stern (*) beruhen auf Einzelwerten.

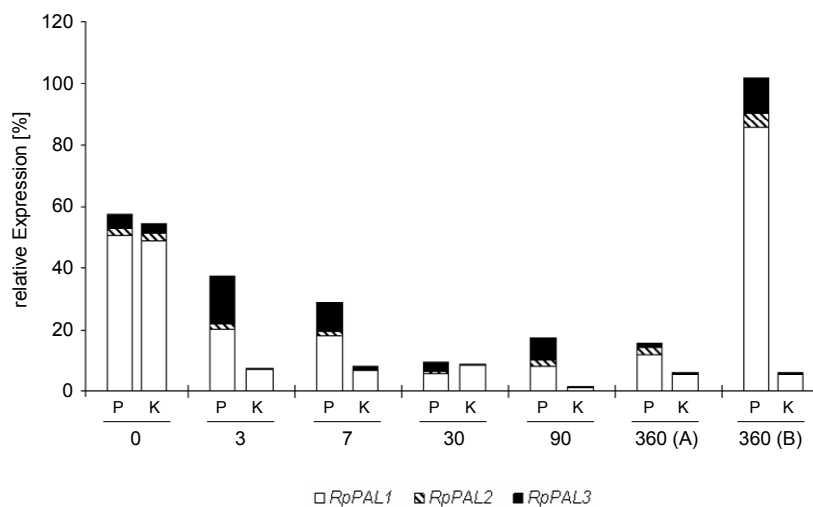


Abbildung 39 – Aufsummierte und anteilige relative Expression [%] der *PAL*-Gene *RpPAL1*, *2* und *3* in Pathogenholz (P) und in nicht infizierten Kontrollen (K) 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai}. Die dargestellten Expressionswerte sind die Mittelwerte aus Abb. 38. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 38.

Von den drei untersuchten *CHS*-Genen *RpCHS3*, *4* und *5* werden alle drei in der Reaktionszone induziert (Abb. 40). Bereits drei Tage nach Inokulation (3 d_{ai}) wurden im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen erhöhte Transkriptmengen nachgewiesen, und diese blieben über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten. Bei *RpCHS4* und *5* wurden ein Jahr nach der Inokulation (360 d_{ai}) bei zwei der vier Replikate (Gruppe B) sehr viel höhere Expressionswerte erhalten als in den zwei übrigen Replikaten (Gruppe A). Im Fall von *RpCHS3* tritt ein solch großer Unterschied nicht auf.

RpCHS5 zeigte die stärkste Reaktion auf den Verwundungs- und Infektionsreiz. Im Zeitraum zwischen 3 und 90 d_{ai} nimmt *RpCHS5* mit durchschnittlich etwa 61 % den größten Anteil am *CHS*-Transkriptpool ein (Abb. 41); *RpCHS3* und *4* sind in diesem Zeitraum mit ähnlichen Anteilen vertreten (22, bzw. 17 %). In der Gruppe B der 360 d_{ai}-Proben sind *RpCHS4* und *5* extrem stark exprimiert, hier erreichen die Werte der relativen Expression 240 ± 75 % (*RpCHS4*), bzw. 304 ± 172 % (*RpCHS5*).

Eine *RpCHS6*-Expression wurde nicht nachgewiesen (Daten nicht gezeigt).

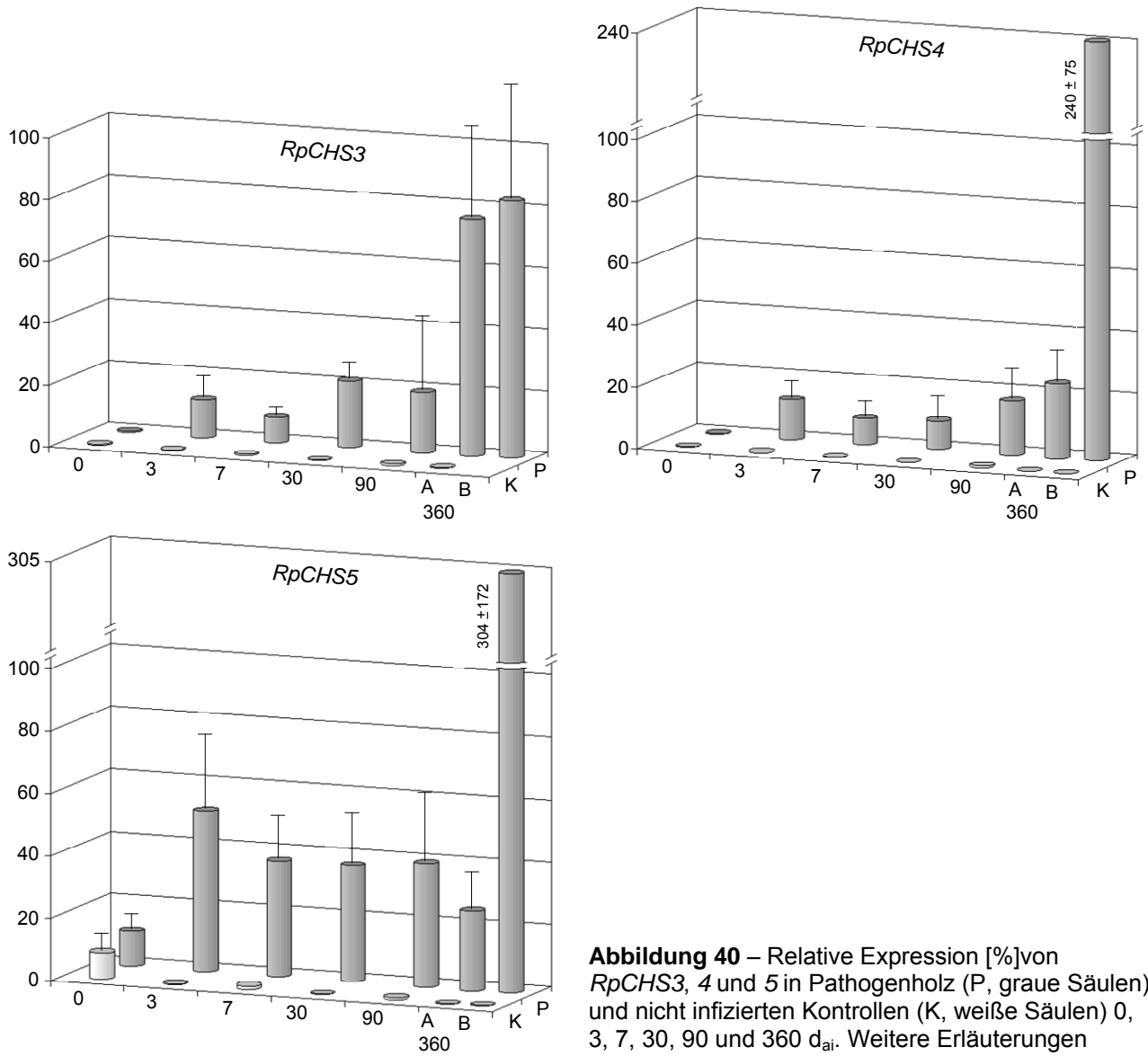


Abbildung 40 – Relative Expression [%] von *RpCHS3*, 4 und 5 in Pathogenholz (P, graue Säulen) und in nicht infizierten Kontrollen (K, weiße Säulen) 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai}. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 38.

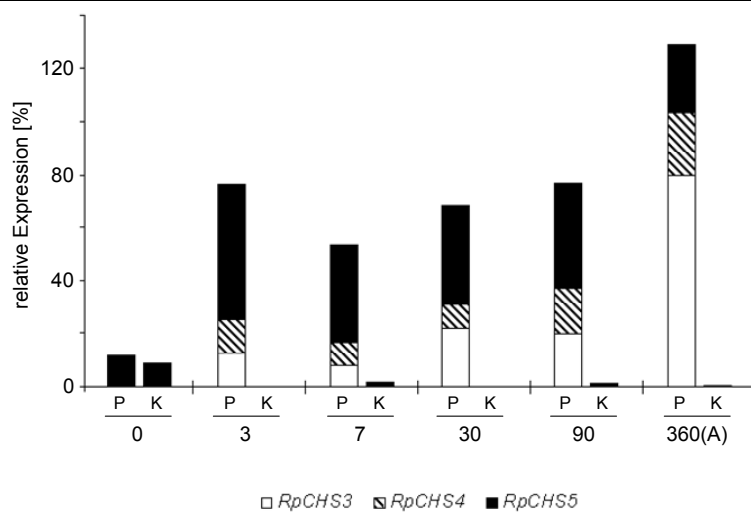


Abbildung 41 – Anteilige relative Expression der *CHS*-Genfamilienmitglieder *RpCHS3*, 4 und 5 an der Gesamtexpression [%] in Pathogenholz (P) und in nicht infizierten Kontrollen (K) 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai}. Zugunsten der Anschaulichkeit wurde auf die Darstellung von 360 (B) verzichtet. Weitere Erläuterungen siehe Abb. 38.

Die Gegenüberstellung des Expressionsniveaus der drei *PAL*-Gene insgesamt mit dem der drei *CHS*-Gene insgesamt macht deutlich, dass die drei *PAL*-Gene auf einem deutlich niedrigeren Niveau als die drei *CHS*-Gene exprimiert werden. Im Pathogenholz erreicht die aufsummierte Expression von *RpPAL1*, 2 und 3 in einer Probe nur knapp 40 % (360 d_{ai} Gruppe B), in den übrigen Proben nur um 20 % oder sogar noch weniger (Abb. 39), während die aufsummierte Expression von *RpCHS3*, 4, und 5 im Pathogenholz 50 % nicht unterschreitet und mit Werten zwischen 68 und 504 % meist sogar deutlich darüber liegt (Abb. 41).

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den genspezifischen Beitrag von Genfamilienmitgliedern der Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) und der Chalkonsynthase (CHS) aus *Robinia pseudoacacia* L. (*Fabaceae*) an zwei Typen von Verfärbungsprozessen, der konstitutiven Kernholzbildung und der Verwundungs- und pathogeninduzierten Bildung von Reaktionszonen, im Xylem dieser Baumart aufzudecken. PAL und CHS nehmen als einleitende Enzyme des Phenylpropanstoffwechsels, bzw. der Flavonoidsynthese eine Schlüsselposition bei der Synthese der farbgebenden (phenolischen) Inhaltsstoffe ein. Zu diesem Zweck wurden die Mitglieder dieser beiden Genfamilien sequenziert, um auf Grundlage der DNA-Sequenzen PCR-basierte Genexpressionsstudien durchzuführen. Durch diese detailliertere Aufschlüsselung der genspezifischen PAL- und CHS-Expression im Zusammenhang mit zwei Typen von Verfärbungsprozessen sollte ein vertiefter Einblick in die molekularen Grundlagen und Regulationsmechanismen – insbesondere im Hinblick auf mögliche funktionelle Differenzierungen oder Redundanzen der Genfamilienmitglieder – ermöglicht werden.

4.1 Identifizierung von PAL- und CHS-Genen der Robinie

4.1.1 Verwendung degenerierter Primer für die Genidentifizierung

Voraussetzung für die Expressionsanalysen von Mitgliedern der PAL- und CHS-Genfamilien aus der Robinie (*Robinia pseudoacacia* L., *Fabaceae*) ist die Kenntnis der entsprechenden Gensequenzen oder Teilen davon. Diese wurden zunächst sequenziert. Dafür wurden auf Basis von PAL-, bzw. CHS-Gensequenzen aus der Familie der *Fabaceae*, welche aus der online verfügbaren Sequenzdatenbank *GenBank* beschafft wurden, konservierte Abschnitte in den codierenden Regionen der Zielgene identifiziert, degenerierte Primer konstruiert und mit diesen einzelne PAL- und CHS-Genabschnitte aus der Robinie kloniert. Auf diese Weise wurden mehrere Mitglieder der beiden Genfamilien identifiziert. Die PCR mit degenerierten Primern ermöglicht die Amplifikation und Klonierung von zuvor unbekanntem Genfragmenten und macht sich die artübergreifende Sequenzkonservierung homologer Gene zunutze. Diese Strategie wurde auch von anderen Autoren für die Identifizierung von PAL-Genfamilienmitgliedern angewendet (z.B. Butland et al. 1998, Kumar und Ellis 2001). Im

Folgenden werden einige Eigenschaften von degenerierten Primern erläutert und deren mögliche Auswirkung auf den Prozess der Genidentifizierung diskutiert.

Degenerierte Primer stellen ein Gemisch aus mehreren, ein- oder mehrfach sequenzdivergenten Primern dar (Primer-Individuen), dessen Vielfalt mit dem Grad der Degenerierung, d.h. mit der Zahl der divergenten Basen, zunimmt. Die Degenerierung eines solchen Gemischs berechnet sich durch Multiplikation der Anzahlen möglicher Nukleotide an jeder Position. Mit zunehmender Degenerierung nimmt die Konzentration eines jeden Primer-Individuums im Gemisch ab. Bindet aus diesem Gemisch nur ein einziges Primer-Individuum an das template, so kann die Amplifikation des templates ab einer gewissen Konzentration des Primer-Individuums limitiert werden. Diese Limitierung gewinnt vor allem dann an Bedeutung, wenn aus einem Pool von stark exprimierten Genfamilienmitgliedern (häufige Transkripte) ein schwach exprimiertes Genfamilienmitglied (seltene Transkripte) selektiv amplifiziert werden soll. Die Wahrscheinlichkeit ein seltenes Transkript zu amplifizieren wird durch die Präsenz der häufigen Transkripte ohnehin stark verringert, das seltene Transkript wird von den häufigen gewissermaßen „maskiert“, bzw. dessen Amplifikation „unterdrückt“. Eine geringe Konzentration des hybridisierenden Primer-Individuums infolge hoher Degenerierung verringert die Amplifikationswahrscheinlichkeit zusätzlich. Diese Selektivität wurde durch folgende Maßnahmen reduziert: (1) Die Degenerierung der Primer wurde mit einer maximalen Degenerierung von 16 so gering wie möglich gehalten (Gemisch aus 16 Primer-Individuen = vier zweifach degenerierte Nukleotide $\rightarrow 2^4 = 16$, bei einer minimalen Länge von 18 Nukleotiden, vgl. Tab 3, S. 30). Dies wurde realisiert, indem möglichst hoch konservierte Abschnitte aus den multiplen Sequenzalignments der Fabaceae-PALs, bzw. -CHSs für das Primerdesign ausgewählt wurden [vgl. Abb. A1 (1) – A1 (7) und Abb. A2 (1) – A2 (3), S. 153-162]. Nach Sambrook und Russell (2001) ist eine PCR sogar noch mit einer Degenerierung von 60 möglich. (2) Die Primerkonzentration wurde mit jeweils 1,2 μM für den Sense- und Antisense-Primer verhältnismäßig hoch angesetzt. Bei einer maximalen Degenerierung von 16 entsprach dies einer minimalen Konzentration jedes einzelnen Primer-Individuums von 75 nM, was noch oberhalb der in der Literatur angegeben, für eine effektive Amplifikation ausreichende Primer-Konzentration liegt (z.B. Marone et al. 2001, 50 nM pro Primer). Eine Limitierung der Amplifikation durch zu geringe Primer-Konzentrationen konnte somit ausgeschlossen werden. (3) Bei den Klonierungen und der anschließenden Selektion durch Restriktionsanalysen wurden möglichst viele rekombinante Klone untersucht, um auf diese Weise die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, auch seltene Transkripte zu identifizieren. Dass diese Maßnahmen zur Reduzierung der Selektivität erfolgreich waren, zeigen die identifizierten CHS-Fragmente *RpCHS1*, 2 und 6, sowie *RpPAL4*, welche während der zahlreichen Klonierungen und der Selektion nur selten, bisweilen nur einmalig auftraten (siehe folgendes Kapitel 4.1.2).

Eine weitere Eigenschaft von degenerierten Primern ist die erhöhte Tendenz zur Bildung von unerwünschten Sekundärstrukturen, wie Hairpins, Dimere und Cross-Dimere. Diese resultiert aus der höheren Variabilität der Primersequenzen. Die Bildung solcher Sekundärstrukturen kann ebenfalls eine Verringerung der Amplifikationseffizienz zur Folge haben. Im Agarosegel wären diese an ausgeprägten (breiten) Banden bzw. Schmierern unterhalb 100 bp erkennbar gewesen, wurden jedoch nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt). Demzufolge wiesen die verwendeten Primer eine ausreichend niedrige Degenerierung auf, um die Bildung solcher Sekundärstrukturen zu unterbinden.

4.1.2 Die *PAL*- und *CHS*-Genfamilien und deren Expression im Xylem

4.1.2.1 Vollständigkeit der Genfamilien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Genfragmente von vier *PAL*- und sechs *CHS*-Genen aus *Robinia pseudoacacia* L. (*Fabaceae*) identifiziert. Die Anzahlen der ermittelten Genfamilienmitglieder sind in guter Übereinstimmung mit den aus anderen Vertretern der *Fabaceae* bekannten Genfamiliengrößen, die bei *PAL* typischerweise 3 bis 4, seltener bis zu 10 Mitglieder, bei *CHS* zumeist 6 bis 8 Mitglieder umfasst (Tab. 18, S. 104). In der vorliegenden Arbeit wurden die *PAL*- und *CHS*-Gene identifiziert und auf ihr Expressionsverhalten untersucht, die an den physiologischen Prozessen der zu untersuchenden Xylemgewebe maßgeblich beteiligt sind, d.h. in den jeweiligen Transkriptpools dominieren.

Neben den in der vorliegenden Arbeit identifizierten *PAL*- und *CHS*-Genfragmenten aus der Robinie wurden von Yang und Mitarbeitern (2004) ESTs ('expressed sequence tags', d.h. cDNA-Abschnitte) von jeweils einem *PAL*- und einem *CHS*-Gen identifiziert und deren Expression in der Splint-Kern-Übergangszone analysiert (*GenBank* Accession numbers BI642887 und BI642100). Das *CHS*-EST erwies sich hierbei als identisch mit *RpCHS3* (Ausnahme: ein Basenaustausch, siehe Kap. 3.1.3, S. 64). Im Fall des 287 bp langen *PAL*-ESTs liegt der homologe Bereich zwischen den Basen 1834 und 2118 von *RpPAL2* und damit 39 Basen vor dem Stoppcodon (vgl. Abb. 11, S. 60). Mit *RpPAL1*, 2 und 3 weist das EST keine Identität auf und mit *RpPAL4* keinen homologen Bereich. Die größte Ähnlichkeit hat das *PAL*-EST mit *RpPAL1* (94 % in einem Überlappungsbereich von 287 bp), mit den beiden anderen nur jeweils etwa 82 %. Es gibt Hinweise darauf, dass das *PAL*-EST und *RpPAL4* nicht Abschnitte ein und desselben Gens sind, bzw. dass das *PAL*-EST möglicherweise ein weiteres Mitglied der *PAL*-Genfamilie der Robinie darstellt: Erstens wird *RpPAL4* im Gegensatz zum *PAL*-EST im Xylem nicht exprimiert, und zweitens besteht eine

vergleichsweise hohe Ähnlichkeit des *PAL*-ESTs mit *RpPAL1* (94 %) – bei gleichzeitig relativ geringer Ähnlichkeit zwischen *RpPAL4* und *RpPAL1* (77 %). Somit ist eine Zusammengehörigkeit von *RpPAL4* und dem *PAL*-EST mit ziemlicher Sicherheit auszuschließen.

Der Versuch, ausgehend vom *PAL*-EST genspezifische Primer zu konstruieren, um damit 3'-, bzw. 5'-RACE-Amplifikationen durchzuführen und auf diesem Wege die zugehörigen nicht-translatierten Regionen zu ermitteln, wurde unternommen, konnte jedoch mangels genspezifischer Sequenzabschnitte nicht realisiert werden. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit des *PAL*-ESTs mit *RpPAL1* (siehe oben) und des zudem verhältnismäßig kurzen Überlappungsbereichs (287 bp) konnten keine Primerbindungsstellen mit ausreichend hoher Spezifität gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Tabelle 18 – Eigenschaften von *PAL*- und *CHS*-Genfamilien aus Leguminosen (*Fabaceae*). Die Anzahl der Gene (*) gibt die Anzahl der in *GenBank* gefundenen, sequenzdivergenten Einträge an. Die Sequenzidentität bezieht sich auf die codierenden Regionen der Gene.

	Spezies	Anzahl Gene*	<i>GenBank</i> Accession	Sequenzidentität [%]
<i>PAL</i>	<i>Pisum sativum</i>	4	D10003, D10002, D10001, E04042	93 – 100
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	4	M11939, CV670735, CV670734, E04043	77 – 99
	<i>Glycine max</i>	4	X52953, S46988, BE610367, BE020072	79 – 94
	<i>Lotus japonicus</i>	10	AB283031 – AB283040	80 – 98
	<i>Stylosanthes humilis</i>	2-3	EU404160, L36822	95
<i>CHS</i>	<i>Pisum sativum</i>	8	X80007.1, X80007.2, X63333 - X63335, D88260 - D88262	77 – 97
	<i>Glycine max</i>	8	X54644, X53958, X65636, X52097, L07647, L03352, AY237728, M98871	80 – 99
	<i>Trifolium subterraneum</i>	6	M91193 – M91195, L24515 – L24517	91 – 95
	<i>Medicago sativa</i>	6	L02901 – L02905, U01020	88 – 97
	<i>Lupinus luteus*</i>	7	AY289103, AY289104, DQ507388 - DQ507392	80 – 99

4.1.2.2 Allele Varianten

Die Robinie (in ihrer ursprünglichen, wildwachsenden Form) hat einen diploiden Chromosomensatz, wenn auch Polyploidie bei Individuen dieser Art beschrieben wurden (Hanover und Mebrahtu 1991). Das bedeutet, dass von jedem Genlocus jeweils zwei allele Varianten im Genom existieren. Da für die Genidentifizierung Gewebe mit diploidem Chromosomensatz verwendet wurde, wäre es also prinzipiell möglich, dass unter den identifizierten *PAL*- und *CHS*-Genfragmenten allele Varianten nur jeweils eines Genlocus' vertreten sind. (Um diese Möglichkeit von vornherein auszuschließen, hätte Gewebe mit haploidem Chromosomensatz, z.B. das aus Megagametophyten verwendet werden müssen, siehe z.B. Butland et al. 1998). Jedoch liefern die Sequenzen selbst einen Anhaltspunkt zur Beantwortung dieser Frage. Zumindest für die Fragmente mit 3'-UTR lässt sich die Möglichkeit der Allelität ausschließen, da diese untereinander hohe Sequenzdivergenzen aufweisen (siehe Tab. 10, S. 61 und Tab. 13, S. 67). Da die 3'-UTR eine wichtige Funktion für die Translationskontrolle hat (Mazumder et al. 2003) und allele Varianten eines Genlocus' funktionell – und damit auch regulatorisch – homolog sind, weisen 3'-UTRs allerer Varianten ebenfalls eine ausgeprägte Sequenzkonservierung auf. Die Vergleiche der 3'-UTRs der *RpPAL*- Gene zeigen, dass *RpPAL1* und 2, sowie *RpPAL1* und 3 nach diesem Kriterium nicht als allele Varianten in Frage kommen (jeweils nur 55 % Identität). *RpPAL2* und 3 weisen zwar eine deutlich höhere Ähnlichkeit in den 3'-UTRs auf (82 %), allerdings unterscheiden sie sich in der 3'-UTR-Länge (135 vs. 256 bp), was ebenfalls als Beleg für „Nicht-Allelität“ zu werten ist. Von Appert und Mitarbeitern (1994) wurden zwei *PAL*-Gene der Petersilie (*Petroselinum crispum*, *PAL-1* und *PAL-2*), die in der codierenden Region zu 98,2 % und in der 3'-UTR zu 97,5 % identisch sind, sogar als unterschiedliche Genfamilienmitglieder ausgewiesen. Somit kann bei 82% Identität der 3'-UTRs von *RpPAL2* und *RpPAL3* ebenfalls von nicht-allelen Varianten ausgegangen werden.

Von *RpPAL4* wurde nur ein Abschnitt der codierenden Region sequenziert, welcher eine deutlich höhere Sequenzdivergenz zu den übrigen *RpPALs* aufweist (siehe Kap. 3.1.2, S. 58). Über die Sequenzähnlichkeit in der codierenden Region von allelen Varianten eines *PAL*-Gens ist in der Literatur nichts bekannt. Die hohe Sequenzdivergenz von *RpPAL4* ist zwar kein Beweis, kann jedoch als starkes Indiz für die Nicht-Allelität zwischen *RpPAL4* und den übrigen *RpPALs* gewertet werden.

Auch bei den *RpCHS*-Genen kann die Möglichkeit der Allelität zumindest für diejenigen mit bekannter 3'-UTR ausgeschlossen werden. Die 3'-UTRs von *RpCHS3*, 4, 5 und 6 weisen bis auf die Paarung *RpCHS4* und 5 (mit 79 %) eine Sequenzdivergenz von durchschnittlich 44 ± 4 % auf, was eine Konservierung regulatorischer Elemente ausschließt. In der Literatur wurden zudem weitere, diese Annahme stützende Daten gefunden: Die 3'-UTRs von *RpCHS3*, 4 und 5 divergieren in einem vergleichbaren Maß, wie die 3'-UTRs von fünf

verschiedenen, nachweislich nicht-allelen *CHS*-Genen aus *Phaseolus vulgaris* (Ryder et al. 1987).

4.1.2.3 Expression der nicht analysierten *CHS*-Gene

Neben den in die Expressionsanalysen einbezogenen Genen (*RpPAL1, 2, 3, 4, RpCHS3, 4, 5*) wurden weitere Genfragmente identifiziert, deren 3'-UTRs nicht bestimmt werden konnten und infolgedessen auch nicht auf ihre Expression im Xylem untersucht wurden (*RpCHS1, 2*). *RpCHS6* ist ein Sonderfall, da zwar die 3'-UTR bekannt ist, genspezifische Primer jedoch nicht konstruiert werden konnten. Es stellt sich die Frage, ob diese *CHS*-Gene im Xylem exprimiert sind und wenn ja, welchen Anteil sie an den *CHS*-Transkriptpools einnehmen, bzw. welche Rolle sie im Stoffwechsel der verschiedenen Xylemgewebe spielen. Aufgrund der Tatsache, dass jedes dieser drei *CHS*-Genfragmente mindestens einmal auf Basis einer cDNA isoliert (und sequenziert) wurde, kann von einer Expression von *RpCHS1, 2* und *6* im Xylem ausgegangen werden, wenn auch mit nur sehr geringem Anteil am gesamten *CHS*-Transkriptpool. Letztere Annahme leitet sich aus der Beobachtung ab, dass die Fragmente von *RpCHS1, 2* und *6* im Vergleich zu den anderen *RpCHS*-Fragmenten nur sehr selten – *RpCHS1* und *6* sogar nur jeweils einmal – sequenziert wurden, und zudem bei den Restriktionsanalysen der M13-PCR-Produkte nicht mehrfach auftraten. Von *RpCHS3, 4* und *5* hingegen wurden während der Klonierungen und Sequenzierung wiederholt Klone identifiziert, bzw. traten deren charakteristische Restriktionsmuster mehrfach auf (Daten nicht gezeigt). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die drei *RpCHS*-Gene *1, 2* und *6* nur eine untergeordnete Rolle in der Physiologie der Xylemgewebe spielen und dass mit den Expressionsanalysen von *RpCHS3, 4* und *5* die Gene mit dem höchsten Anteil am gesamten *CHS*-Transkriptpool untersucht worden sind.

Es ist denkbar, dass *RpCHS6*, theoretisch aber auch die übrigen *CHS*-Mitglieder, in anderen Pflanzenorganen exprimiert werden und somit an der Synthese anderer Flavonoide beteiligt sind. So wurde z.B. unter den aus Robinienwurzeln ausgeschiedenen Substanzen eine ganze Reihe von Flavonoiden identifiziert (Scheidemann und Wetzler 1997), die im Holz der Robinie nicht gebildet werden (Freudenberg und Hartmann 1953, Roux und Paulus 1962), und die als Signalstoff für symbiotische, Stickstoff fixierende Bakterien (*Rhizobiaceae*) im Rahmen der Wurzelknöllchenbildung (Nodulation) fungieren. In der Borke der Robinie kommen die Flavonoide Catechin und Epicatechin vor (Putman et al. 1989). Ferner sind verschiedene Flavonoide, und damit einhergehend die *CHS*-Genexpression, auch in Blättern und Blüten z.B. als Fraß- oder UV-Schutz, sowie als Blütenpigmente präsent (Ververidids 2007). Es gibt somit in der Robinie eine Reihe von Organen und Geweben, in denen die Flavonidsynthese unter Beteiligung diverser *CHS*-Gene stattfindet – darunter sicherlich

auch diejenigen, die in die Genexpressionsanalysen der vorliegenden Arbeit nicht einbezogen wurden (*RpCHS1*, 2 und 6).

4.1.2.4 Vergleich der *RpPAL*- und *RpCHS*-Genfragmente

Der Vergleich der Basensequenzen der *RpPAL*- und *RpCHS*-Gene zeigte bei beiden Genfamilien eine stark ausgeprägte Konservierung der codierenden Abschnitte, mit Werten für die Sequenzidentität zwischen 76 und 96 % (*PAL*), bzw. zwischen 79 und 95 % (*CHS*). Sie bewegen sich damit in Bereichen, wie sie auch in den entsprechenden Genfamilien von anderen Angehörigen der *Fabaceae* zu finden sind (Tab. 18, S. 104). Allerdings ist zumindest im Fall der *RpPAL*-Gene davon auszugehen, dass die ermittelten Werte von den realen Werten, die man mit den vollständigen codierenden Regionen erhalten hätte, abweichen, denn bei *PAL*-Genen ist die Verteilung hochkonservierter und variablerer Abschnitte ungleichmäßig verteilt, mit höherer Divergenz in Exon I als in Exon II (Cramer et al. 1989, Yamada et al. 1992, Kumar und Ellis 2001). Da bei den Sequenzvergleichen zwischen den *RpPAL*-Genfragmenten Exon I in keinem Fall einbezogen wurde (vgl. Abb. 11, S. 60), kann angenommen werden, dass die ermittelten Werte aus Tabelle 10 (S. 61) etwas höher als die realen sind.

Von den vier identifizierten *PAL*-Genfragmenten weist *RpPAL4* mit 76 - 77 % Sequenzidentität in der *cds* eine geringere Ähnlichkeit zu den übrigen *RpPALs* auf als diese untereinander. Darüber hinaus lieferte der Abgleich von *RpPAL4* mit *GenBank* mittels BLASTN und BLASTP die höchsten Übereinstimmungen mit *PALs* aus Pflanzenarten, die nicht zu den *Fabaceae* gehören (Tab. 12, S. 63). Zudem fielen die gefundenen Werte für die Sequenzübereinstimmung deutlich geringer aus, als bei den übrigen *RpPAL*-Genen (78 % vs. 88 - 90 %, BLASTN-Abgleiche). Bei den Expressionsanalysen zeigte sich, dass *RpPAL4* weder im gesunden Xylem, noch im Pathogenholz exprimiert wird (Abb. 26, S. 83). Ob *RpPAL4* in anderen Teilen der Robinie exprimiert wird, wurde bei dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Dass einzelne Mitglieder aus *PAL*-Genfamilien durchaus eine höhere Sequenzdivergenz zu den übrigen Familienmitgliedern aufweisen können, zeigt das Beispiel der *PAL*-Genfamilie von *Lotus japonicus*, bei der das Gen *LjPAL10* von den übrigen *PALs* deutlich abweicht (*GenBank* Accession number AB283040, eigene Beobachtung). Der bei *RpPAL4* vorhandene hohe Anteil an Basenaustauschen an 3. Codonstelle (stille Mutationen, siehe Tab. 11, S. 62), sowie der hohe Anteil an konservativen Aminosäureaustauschen (Sequenz-„Positive“, Tab. 10, S. 61) weist analog zu den Ergebnissen von Koes et al. (1989) darauf hin, dass *RpPAL4* kein inaktives Pseudogen, sondern ein aktives Gen ist, welches einem Selektionsdruck unterworfen ist. Wäre *RpPAL4* ein inaktives Pseudogen, so hätten sich im Laufe der Evolution abhängig vom Zeitpunkt der Inaktivierung durch den

weggefallenen Selektionsdruck zufällige Mutationen angehäuft (Gerstein und Zheng 2006) und damit eine merkliche Steigerung des Anteils an Basenaustauschen an erster und zweiter Codonposition bewirkt. Demnach hat *RpPAL4* vermutlich eine Funktion bei anderen physiologischen Prozessen in anderen Pflanzenteilen der Robinie.

Beim Abgleich der *RpCHS*-DNA-Sequenzen und der daraus abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit *Genbank* (BLASTN, BLASTP) wurden Sequenzähnlichkeiten zu *CHS*-Genen, bzw. -Proteinen aus Angehörigen der *Fabaceae* gefunden, die größer sind als die Sequenzähnlichkeiten der *RpCHS*-Fragmente untereinander (Tab. 14, S. 68). Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die Ausbildung der *CHS*-Genfamilien in Leguminosen vermutlich schon in gemeinsamen Vorfahren der heutigen *Fabaceae* oder deren Gattungen stattgefunden hat, bzw. dass die Artaufspaltung (Speziation) der *Fabaceae* zeitlich nach der (zumindest teilweisen) Ausbildung der *CHS*-Genfamilie erfolgte. Dies schließt natürlich nicht aus, dass innerhalb der einzelnen Arten eine weitere individuelle Diversifikation der *CHS*-Genfamilien vorgekommen ist, beispielsweise durch weitere Gen-Duplikationen. Eine grundlegende phylogenetische Analyse dieser komplexen evolutionären Vorgänge würde jedoch eine vollständige Sequenzierung der *CHS*-Genfamilie der Robinie und weiterer Arten erfordern.

4.2 Zur Methodik PCR-basierter Expressionsanalysen

4.2.1 Vergleich von semiquantitativer RT-PCR und Real-Time PCR

Für die Quantifizierung von mRNA in biologischen Proben wurde in den vergangenen Jahrzehnten eine Reihe von Verfahren und Techniken entwickelt, von denen Methoden, die auf der Real-Time PCR basieren, die gegenwärtig wahrscheinlich am weitesten verbreiteten bzw. am häufigsten angewendeten sind. Als Vorteil von PCR-basierten Quantifizierungsmethoden ist zum einen die hohe Sensitivität zu nennen, die es erlaubt, auch schwach exprimierte Gene zu detektieren (Liu und Saint 2002), zum anderen die Spezifität, die auch Expressionsanalysen von einzelnen Genfamilienmitgliedern mit hoher Sequenzkonservierung ermöglicht. Nachteilig hingegen ist die hohe Empfindlichkeit der Quantifizierungsergebnisse gegenüber Variationen in der Effizienz der Amplifikation, die daraus resultiert, dass die PCR ein exponentieller Prozess ist. Geringe Variationen bei der Amplifikationseffizienz führen mit jedem PCR-Zyklus zu immer größeren Variationen bei der PCR-Produktmenge (Sambrook und Russell 2001).

Die Amplifikation des PCR-Produkts verläuft bis zu einem gewissen Punkt exponentiell, bis eine der Reaktionskomponenten limitierend wirkt (Sambrook und Russell 2001), wodurch die

Amplifikation verlangsamt und der Übergang in die Plateau- oder Sättigungs-Phase eingeleitet wird (= Abflachung der Amplifikationskurve). Auch das akkumulierende PCR-Produkt bewirkt eine Inhibierung der Aktivität der Taq-Polymerase (Kainz 2000). Die allgemein angewendete Exponentialgleichung zur mathematischen Beschreibung der Amplifikation ist nur in der exponentiellen Phase gültig, d.h. bevor die Limitierung einsetzt ($X_n = X_0 E^n$, mit X_n = Produktmenge nach Zyklus n , X_0 = initiale template-Menge, E = Amplifikationseffizienz). Aus dieser Gleichung leitet sich die in dieser Arbeit verwendete Gleichung (3) zur Ermittlung der relativen Expression ab (siehe S. 54). Um die relative Expression eines Zielgens anhand von PCR-Produktmengen und unter Verwendung dieser Gleichung zu bestimmen, muss gewährleistet sein, dass sich die Amplifikation zum Zeitpunkt der Messung in der exponentiellen Phase befindet. Bei der Real-Time PCR wird diese Anforderung durch Erfassung der gesamten Amplifikationskurve und Ermittlung des C_T -Wertes erfüllt (vgl. Kap. 2.5.3.3, S. 51). Die Real-Time PCR ermöglicht zudem eine vergleichsweise schnelle und einfache Bestimmung der Amplifikationseffizienz (E) der PCR mit dem jeweiligen Zielgen mit Hilfe der sogenannten Standardkurven-Methode (Kap. 2.5.3.4, S. 52). Die Amplifikationseffizienz E fließt in die Berechnung der relativen Expression des Zielgens ein. Für die Bestimmung von E wurden die Standard-Kurven anhand von PCRs mit Plasmid-DNA als template erstellt. Die Plasmid-DNA wurde in Wasser gelöst eingesetzt und unterschied sich damit in ihrer chemischen Zusammensetzung, aber auch in der Beschaffenheit des templates von den cDNA-Proben (Beispiel: Plasmid-DNA doppelsträngig, cDNA einzelsträngig). Solche Unterschiede können einen Einfluss auf die Amplifikationseffizienz haben (Wilson 1997 und Ref. darin), so dass eine gewisse Abweichung bei der Amplifikationseffizienz der PCRs mit cDNA-template möglich war. Da jedoch stets gleiche Volumina sowohl von Plasmid-DNA, als auch von cDNA eingesetzt wurden, wären die aufgetretenen Abweichungen von E vermutlich bei allen Proben auch gleich. Um das Ausmaß dieser (möglichen) Abweichungen abschätzen zu können, wurde E zusätzlich mit seriellen Verdünnungen von cDNA als template bestimmt (Kap. 2.5.3.4, S. 52). Es zeigte sich, dass die Amplifikationseffizienzen die mit diesen beiden unterscheidlichen template-Typen ermittelt wurden, identisch waren und dass diese mögliche Fehlerquelle somit vernachlässigbar war.

Die Standardkurven-Methode geht zudem von der Annahme aus, dass E bei jeder Probe gleich ist. Tatsächlich variiert E von Probe zu Probe, z.B. infolge von Pipettierungenauigkeiten (Peirson et al. 2003) und unterschiedlichen Gehalten an PCR-inhibierenden Substanzen, welche aus den untersuchten Geweben stammen. Bei pflanzlichem Gewebe sind dies v.a. Polysaccharide und Polyphenole (Staub et al. 1995, Koonjul et al. 1999). Nach eigenen Beobachtungen traten solche Variationen in der vorliegenden Arbeit nicht, bzw. in vernachlässigbarem Ausmaß auf. Es ist zwar davon auszugehen, dass aus dem Robinienxylem neben der Gesamt-RNA auch in geringem Umfang kontaminierende

Polysaccharide und Polyphenole extrahiert wurden, jedoch wurden diese in den weiteren Verarbeitungsschritten (DNase-Verdau, Reverse Transkription) stetig verdünnt. Zusammen mit der Verdünnung des templates im PCR-Ansatz war dies eine Verdünnung um den Faktor 416, so dass eine inhibierende Wirkung dieser Kontaminationen unwahrscheinlich ist. Bestätigt wurde dies durch die Kurvenverläufe der bei der Real-Time PCR aufgezeichneten Amplifikationskurven der gen- und probenspezifischen Assays. Die Kurven wiesen in der exponentiellen Phase durchweg gleiche Steigungen auf, was nicht nur visuell, sondern auch durch Bestimmung der Steigung anhand der Fluoreszenz-Rohdaten überprüft wurde (Daten nicht gezeigt). Somit waren Variationen der Amplifikationseffizienzen von Probe zu Probe ohne Bedeutung.

Bei den Expressionsanalysen mittels semiquantitativer RT-PCR wurde ein Verfahren zur Quantifizierung angewendet, welches sich von der Real-Time PCR in vielerlei Hinsicht unterscheidet. Bei den zu untersuchenden Probensätzen wurde die PCR für jedes Zielgen (GSP-Paar) mit jeweils identischen Zyklenzahlen durchgeführt, und mittels der densitometrisch bestimmten Bandenintensitäten der PCR-Produkte wurde die relative Expression der Zielgene ermittelt. Die Normalisierung der cDNA erfolgte präparativ durch individuelle Verdünnung der cDNA und Anpassung der eingesetzten Volumina. Zusätzlich wurde zur Kompensierung der verschiedenen Zyklenzahlen ein Korrekturfaktor berechnet. Hierbei wurden folgende vereinfachende Annahmen getroffen: (1) Die Amplifikation befindet sich zum Zeitpunkt des Reaktionsabbruchs, also bei der Zielgen-spezifischen Zyklenzahl, in jeder Probe in der exponentiellen Phase (Gültigkeit der Exponentialgleichung), (2) die Amplifikationseffizienzen sind bei allen Zielgenen gleich, und (3) es besteht eine Proportionalität zwischen der Bandenintensität im Agarosegel und der PCR-Produktmenge (Linearität des Quantifizierungssystems). Mit der Voraussetzung dieser Annahmen wurde anhand der ermittelten Bandenintensitäten und der angewendeten Zyklenzahlen die relative Expression berechnet. Diese Annahmen haben zum einen Auswirkungen auf die Beurteilung der relativen Expression eines Zielgens innerhalb eines Probensatzes, vor allem aber auf den Vergleich der Expression der Zielgene untereinander. Im Folgenden werden diese Auswirkungen erörtert.

Zu Annahme (1) (Gültigkeit der Exponentialgleichung): Bei den Expressionsanalysen wurden teilweise sehr hohe *PAL*- und *CHS*-Expressionswerte festgestellt, vor allem in den Xylemgewebe mit intensiver Verfärbungs-, bzw. Flavonoidsyntheseaktivität (TZ, pathogenbedingte Reaktionszone). Bei den gewählten Zyklenzahlen äußerte sich dies in intensiv gefärbten PCR-Produktbanden, was bei einigen Proben zwangsläufig eine Überschreitung der exponentiellen Phase bedeutete. Die Zyklenzahlen wurden jedoch nicht reduziert, da dies bei den Proben mit schwacher Zielgenexpression in nicht quantifizierbaren Bandenintensitäten und damit zu einer Unterschätzung der Expression in diesen Geweben resultiert hätte. Andererseits führte dies bei den Proben mit starker Zielgenexpression zu

einer Unterschätzung der Expression. Dies wird beispielsweise deutlich beim Vergleich der saisonalen Expressionsunterschiede von *RpPAL1* und *2* in der Splint-Kern-Übergangszone nach Ergebnissen der semiquantitativen RT-PCR und nach denen der Real-Time PCR (vgl. Abb. 25, S. 82 mit Abb. 28, S. 87). Bei der Real-Time PCR ist die Erfassung der exponentiellen Phase gewährleistet, und hier offenbaren sich große Unterschiede zwischen der *RpPAL1*- und *RpPAL2*-Expression im Frühjahr und Spätherbst im Vergleich zu den Sommermonaten. Nach den semiquantitativen Analysen hingegen fallen diese Unterschiede deutlich geringer aus, was daran liegt, dass sich die PCR bei den Proben mit sehr starker *RpPAL1*- und *RpPAL2*-Expression (Sommer, Spätsommer, Herbst) bei den angewendeten Zyklenzahlen bereits außerhalb der exponentiellen Phase befand. Auch die Expressionswerte der *PAL*-Gene im differenzierenden Xylem und in der TZ weisen nach den semiquantitativen Analysen weitaus geringere Unterschiede auf (z.B. *RpPAL1* in Abb. 25, S.80), als bei den Analysen per Real-Time PCR, was auf dieselbe Ursache zurückzuführen ist. Somit wurden die Expressionsunterschiede eines betrachteten Zielgens in den Gewebeabschnitten des Robinienstamms mit der semiquantitativen RT-PCR unterbewertet. Beide Analysemethoden lieferten qualitativ jedoch grundsätzlich gleiche Aussagen über die *PAL*- und *CHS*-Expressionsmuster.

Zu Annahme (2) (gleiche Amplifikationseffizienzen): Die Amplifikationseffizienz E einer PCR hängt von einer Reihe von Faktoren ab, welche alle in unterschiedlichem Maße einen Einfluss auf diese ausüben. Zu den wichtigsten Faktoren zählt u.a. das Bindungsverhalten der verwendeten Primer an die zu amplifizierende Zielsequenz. Diese Bindungseigenschaften hängen in erster Linie von der Nukleotidsequenz des Primers ab. Bei konstanten PCR-Bedingungen (chemische Zusammensetzung, Temperatur- und Zeitprofile) ist es deshalb berechtigt, dem verwendeten Primerpaar eine bestimmte Amplifikationseffizienz zuzuordnen, wie es auch in der vorliegenden Arbeit vorgenommen wurde. Die Amplifikationseffizienzen der GSPs für die semiquantitativen Analysen wurden nach der Standardkurven-Methode bestimmt (Kap. 2.5.3.4, S. 52) und erwiesen sich als annähernd gleich ($E \approx 2$). Die Bestimmung von E wurde mit Hilfe nur jeweils einer cDNA als template vorgenommen (cDNA aus differenzierendem Xylem für *RpPAL*-GSPs, cDNA aus Pathogenholz für *RpCHS*-GSPs, vgl. Kap. 2.5.3.4, S. 52). Es gibt Hinweise in der Literatur, dass die Amplifikationseffizienz auch von cDNA zu cDNA variieren kann, was vermutlich durch Variationen in der Zusammensetzung der cDNA, beispielsweise durch schwankende Gehalte PCR-inhibierender Komponenten verursacht wird (Staub et al. 1995, Koonjul et al. 1999). Insbesondere die bei der Normalisierung vorgenommene Verdünnung der cDNA (mit Wasser) hat zu Unterschieden in der Zusammensetzung der cDNA-Proben geführt. Allerdings ist aufgrund des geringen Volumenanteils der cDNA am PCR-Ansatz (ca. 2-4 Vol.-%, abhängig vom individuellen template-Volumen) von nur geringen

Auswirkungen solcher Variationen auszugehen. Zudem erwiesen sich die Unterschiede der Amplifikationseffizienzen für die einzelnen GSP-Paare, die einerseits mit cDNA, andererseits mit Plasmid-DNA als templates bestimmt wurden, als vernachlässigbar gering (Daten nicht gezeigt). Und letztendlich würden angesichts der zumeist großen saison- und gewebespezifischen Expressionsunterschiede bei den *PAL*- und *CHS*-Genen im Robinienxylem solche verhältnismäßig kleinen Amplifikationseffizienz-Unterschiede von cDNA zu cDNA auch nur geringe Veränderungen bei den Expressionsmustern bewirken.

Zu Annahme (3) (Linearitätsbereich des Quantifizierungssystems / der Densitometrie): Die für die Densitometrie verwendete Software ermöglichte die Anzeige der gesättigten Bereiche (= maximale Schwärzung) der PCR-Produktbanden auf den Gelfotos. Solche gesättigten Bereiche kamen bei einigen Proben mit sehr starker Zielgenexpression vor, beispielsweise bei *RpCHS3* in der TZ von Sommer bis Herbst (vgl. Abb. 24, S. 81). Diese gesättigten Bereiche nahmen unterschiedlich große Anteile der Bandenfläche ein. Die Sättigungsbereiche befanden sich außerhalb des Proportionalitätsbereichs des Messsystems, d.h. hier bestand kein linearer Zusammenhang zwischen Bandenintensität und PCR-Produktmenge. Eine rechnerische Korrektur war nicht möglich, und zwar zum einen aufgrund der von Bande zu Bande unterschiedlichen Flächenanteile der gesättigten Bereiche und zum anderen aufgrund der Ungewissheit, wie weit der Proportionalitätsbereich verlassen wurde. Eine Möglichkeit zur Korrektur wäre die (sehr aufwändige) Verdünnung und nochmalige densitometrische Vermessung der betreffenden Proben gewesen. Es zeigte sich jedoch, dass dies nicht notwendig war, denn die annähernd gleichen Expressionsmuster der Zielgene im Pathogenholz, die mittels semiquantitativer RT-PCR und mittels Real-Time PCR erhalten wurden, belegen, dass diese Fehlerquelle zu vernachlässigen ist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die semiquantitative RT-PCR trotz der getroffenen Annahmen Expressionsmuster von *PAL* und *CHS* lieferte, die mit denen der mittels Real-Time PCR erhaltenen Muster in qualitativer Hinsicht übereinstimmen, dass bei der semiquantitativen RT-PCR es jedoch oftmals zu einer Unterschätzung bzw. Unterbewertung der relativen Expressionsunterschiede kam. Der Vergleich dieser beiden PCR-basierten Methoden zur Quantifizierung von relativen Transkriptmengen zeigt somit die Grenzen des quantitativen Potentials der semiquantitativen RT-PCR auf. Im Falle von großen Expressionsunterschieden des Zielgens in den zu vergleichenden Proben mit Schwankungsbreiten zwischen „extrem schwach exprimiert“ und „extrem stark exprimiert“, wie es bei den *PAL*- und *CHS*-Genen in den verschiedenen Zonen des gesunden Robinienxylems nachgewiesen wurde, stößt die semiquantitative RT-PCR an ihre Grenzen. Bei nur geringen Expressionsunterschieden hingegen sind die erhaltenen Expressionsdaten bei beiden Methoden vergleichbar.

4.2.2 Die 18S ribosomale Untereinheit als interne Referenz

Voraussetzung für eine Quantifizierung relativer Transkriptmengen in einer gegebenen cDNA-Probe mittels PCR ist die Auswahl einer geeigneten Referenz, mit dem die Amplifikationsergebnisse in Beziehung gesetzt und auf diese Weise normalisiert werden können. In den meisten Fällen wird für diesen Zweck ein Gen als interne Referenz ausgewählt, von dem bekannt ist, dass es unabhängig vom Entwicklungs- und Reizzustand des untersuchten Gewebes konstant exprimiert wird. Die dafür ausgewählten Gene codieren zumeist für Enzyme, Strukturproteine oder RNA-Moleküle, die an elementaren Lebensfunktionen der Zelle beteiligt sind und werden deshalb auch als sogenannte „Haushalts-Gene“ (engl. ‚housekeeping genes‘) bezeichnet. Durch die Normalisierung wird Schwankungen in den cDNA-Konzentrationen einzelner Proben, die durch Variationen bei der Probenpräparation (RNA-Extraktion, Reverse Transkription) entstehen, Rechnung getragen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Normalisierung der cDNAs für die semiquantitativen RT-PCR-Analysen auf präparativem Wege, indem – basierend auf der Expression des Referenzgens – für jede einzelne cDNA eine individuelle Verdünnung und ein individuelles Einsatzvolumen für die PCR ermittelt wurde (vgl. Kap. 2.5.2.1, S. 42). Für die Real-Time PCR hingegen wurde eine rein rechnerische Normalisierung durchgeführt (mittels Gleichung (3), S. 54). Beide methodischen Ansätze zur Normalisierung sind gleichwertig.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der Gene für die 18S Untereinheit der ribosomalen RNA (rRNA) der Robinie (*Rp18S*) als interne Referenz verwendet. Neben den Genen für Actin und die Glycerinaldehyd-Dehydrogenase ist das Gen für die 18S rRNA die mit am häufigsten verwendete interne Referenz für Genexpressionsanalysen in Pflanzen. Die Forderung, unabhängig von endo- und exogenen Faktoren im Zielgewebe konstant exprimiert zu werden, wurde in vergleichenden Studien überprüft und bestätigt (Kim et al. 2003, Nicot et al. 2005, Olbrich et al. 2008).

Nach Huggett und Mitarbeitern (2005) erfordert die Verwendung der 18S rRNA als interne Referenz den Einsatz von Random-Oligonukleotiden (= Oligonukleotide mit zufälliger Nukleotidsequenz) als Primer für die Reverse Transkription der RNA (cDNA-Synthese), da die 18S-Transkripte nicht über Poly-A-Schwänze verfügen. In Übereinstimmung mit Olbrich und Mitarbeitern (2008) wurden in der vorliegenden Arbeit die cDNA-Synthesen auch mit Oligo-dT-Primern erfolgreich durchgeführt.

4.3 PAL- und CHS-Expression im Xylem während der Vegetationsperiode

Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) und die Chalkonsynthase (CHS) nehmen als Eingangsenzyme des allgemeinen Phenylpropanstoffwechsels (PPS) bzw. der Flavonoidbiosynthese bei der Entwicklung der Sprossachse von Bäumen mit obligater Farbkernbildung eine Schlüsselrolle ein. Die Beteiligung dieser beiden Enzyme an der Synthese (farbgebender) phenolischer Verbindungen (Flavonoide) in der Splint-Kern-Übergangszone, bzw. bei der PAL auch an der Ligninbiosynthese in der kambialen Differenzierungszone, wurde bereits mehrfach auf Enzym- und Genexpressionsebene in verschiedenen Baumarten untersucht (Magel et al. 1991, Magel und Hübner 1997, Beritognolo et al. 2002, Kao et al. 2002, Yang et al. 2004, Hertzberg et al. 2005). In diesen Studien wurde stets eine streng gewebespezifische und saisonale Regulation der *PAL*- und *CHS*-Gen-, bzw. -Enzymaktivität festgestellt. Es wurde jedoch bis auf eine Ausnahme (Kao et al. 2002, siehe auch nachfolgendes Kap. 4.3.1) außer Acht gelassen, dass beide Enzyme von Genfamilien codiert werden, und dass einzelne Mitglieder dieser Genfamilien oftmals einer differentiellen Regulation unterliegen, d.h. entweder mit unterschiedlichen Anteilen zur Gesamtexpression beitragen oder unterschiedliche gewebespezifische Verteilungsmuster aufweisen. Mit den für diese Arbeit durchgeführten Expressionsanalysen werden erstmals Daten von den zeitlich-räumlichen Expressionsprofilen einzelner Mitglieder der *PAL*-, bzw. *CHS*-Genfamilien im Xylem eines Laubbaums während der Vegetationsperiode vorgelegt.

4.3.1 PAL-Expression

Von den vier untersuchten *PAL*-Genen der Robinie werden drei (*RpPAL1*, 2 und 3) sowohl in der Splint-Kern-Übergangszone im Stamminneren (TZ) als auch in der kambialen Wachstumszone des neuen Jahrrings im Stammäußeren exprimiert (differenzierendes Xylem, Frühholz, äußerer Splint). In den mittleren und inneren Splintabschnitten (MS, IS) wurden hingegen nur Spuren oder keinerlei *PAL*-Transkripte detektiert. In diesem in radialer Richtung zweigeteilten Verteilungsmuster spiegelt sich die metabolische Multifunktionalität von *PAL*, bzw. die zentrale Stellung des Phenylpropanstoffwechsels wider: *PAL* ist sowohl an der Synthese der Ligninmonomere während der Zellwandbildung im differenzierenden Xylem als auch an der Flavonoidsynthese während der Kernholzbildung beteiligt (Magel et al. 1991, siehe auch Abb. 1, S. 9). Das Expressionsmuster der *CHS*-Gene mit nahezu ausschließlicher Präsenz in der TZ stützt diese Interpretation (Abb. 32, S. 91).

Von Magel und Mitarbeitern (1991, 1997) wurde die radiale Verteilung von PAL- und CHS-Proteingehalten, bzw. -Enzymaktivitäten im Robinienstamm an mehreren Zeitpunkten im Jahresverlauf analysiert. Die hier gefundenen Verteilungsmuster im Robinienstamm stimmen in hohem Maß mit den Genexpressionsmustern der vorliegenden Arbeit überein. So weist die PAL-Enzymaktivität dieselbe radiale Verteilung im Splint auf, wie die Verteilung von PAL-Transkripten. Darüber hinaus wurde im Sommer in den mittleren Splintabschnitten (MS) eine schwache Expression von *RpPAL1* mittels semiquantitativer RT-PCR gemessen (Abb. 24, S. 81). Nach Magel und Hübner (1997) liegt in dieser Zone (im Spätherbst) auch inaktives PAL-Enzym vor, welches vermutlich posttranslational durch Phosphorylierung inaktiviert wird (Bolwell 1992). Das für die Phosphorylierungsstelle charakteristische Sequenzmotiv (Allwood et al. 1999) findet sich bei den abgeleiteten Proteinsequenzen von *RpPAL1*, 2 und 3 wieder (siehe Anhang I, S. 163-164). Magel und Mitarbeiter (1997) interpretierten die Pools inaktiven PAL-Proteins im mittleren Splint als Bestandteil eines präformierten Abwehrmechanismus' gegen Verwundung und Pathogenbefall. Da diese PAL-Pools offenbar auf der Expression von *RpPAL1* beruhen, kann *RpPAL1* eine maßgebliche Beteiligung an der vermuteten präformierten Abwehr zugeschrieben werden (vgl. Kap. 4.4.2, S. 124).

In der Vergangenheit wurden bei Expressionsanalysen von PAL-Genen im Xylem von Bäumen zumeist nur Einzelgene untersucht, bzw. aufgrund nicht genspezifischer Nachweismethoden die Aktivität der PAL-Genfamilienmitglieder zusammenfassend analysiert. Der Anteil einzelner Mitglieder an der Gesamtexpression wurde in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht. Eine Ausnahme bildet eine Studie, bei der durch Expressionsanalysen zweier PAL-Gene in jungen Trieben und Wurzeln der Pappel (*Populus tremuloides* Michx.) eine Zuordnung dieser beiden Gene zu spezifischen metabolischen Funktionen, nämlich der Ligninsynthese und der Synthese von kondensierten Tanninen, vorgenommen wurde (Kao et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wird ebenfalls der genspezifische Beitrag einzelner PAL-Gene zur PAL-Gesamtexpression in der Sprossachse eines Laubbaums aufgezeigt. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kao und Mitarbeitern (2002) zeigen die Ergebnisse, dass keines der drei exprimierten PAL-Gene einer spezifischen Funktion im Stoffwechselgeschehen zuzuordnen ist, da alle drei PAL-Gene sowohl in der Differenzierungszone des Zuwachsrings, als auch in der Splint-Kern-Übergangszone exprimiert werden. Sie sind offenbar sowohl an der Lignin- als auch an der Flavonoidsynthese beteiligt – wenn auch mit unterschiedlichen relativen Anteilen. Eine funktionelle Differenzierung der PAL-Gene im Sinne einer strikten Beschränkung auf nur einen dieser beiden verschiedenen Entwicklungsprozesse, bzw. Stoffwechselwege liegt demnach nicht vor, vielmehr scheinen die drei PAL-Gene zumindest im Rahmen der

normalen, genetisch determinierten Sprossachsenentwicklung funktionelle Redundanzen aufzuweisen.

Es ist anzunehmen, dass diese simultane Expression mehrerer *PAL*-Gene (mit variierenden relativen Anteilen) eine andere biologische Funktion hat. An späterer Stelle wird diese Thematik nochmals aufgegriffen (siehe Kap. 4.5, S. 129).

Die Expression der drei *PAL*-Gene in der inneren Splintholzzone (IS) ist - wie bei der TZ - einer Saisonalität unterworfen, mit Höhepunkt in den Sommermonaten, wenn auch auf sehr viel niedrigerem Niveau im Vergleich zur TZ (siehe Expressionswerte in Tab. A4, S. 169). Wird die Expression der *PAL*-Gene in den stärker „*PAL*-aktiven“ Gewebeabschnitten, wie der Splint-Kern-Übergangs- und der Xylemdifferenzierungszone, auf die *PAL*-Expression in der IS der jeweiligen Jahreszeit bezogen, so liefert dies eine (gewissermaßen „saisonbereinigte“) relative Hochregulierung, bzw. Aktivitätssteigerung der *PAL*-Gene im Vergleich zur basalen „Hintergrund“-*PAL*-Expression eines Gewebes mit Erhaltungsstoffwechsel (Abb. 30, S. 89). Mathematisch gleicht diese Art der Darstellung der von Pfaffl (2001) vorgeschlagenen Gleichung zur Berechnung der relativen Expression eines Zielgens in Relation zu einer „Kalibrator-Probe“, d.h. einer Probe aus „unbehandeltem“ Gewebe. Im Robinienstamm entspricht diese Kalibrator-Probe einem Gewebe mit eben jener basalen Hintergrund-*PAL*-Expression. Hierfür kam einzig die IS-Zone in Frage.

Die durch diese „IS-Kalibrierung“ erhaltenen Muster der relativen Hochregulierung in der Splint-Kern-Übergangszone unterscheiden sich von den Mustern, bei denen die IS nicht als Referenz verwendet wurde, durch eine Verschiebung des Höhepunkts der *PAL*-Expression in den Herbst und Spätherbst (Ausnahme: *RpPAL2*, vgl. Abb. 28, S. 87). Bei Aufsummierung dieser Werte für die relative Hochregulierung wird die Verschiebung zum Ende der Vegetationsperiode noch deutlicher (siehe Abb. 31, S. 89). Zudem bewirkt die „IS-Kalibrierung“ eine weitere Annäherung der *PAL*-Expressionsmuster an die von Magel et al. (1991) gezeigten räumlich-zeitlichen Muster der *PAL*-Enzymaktivität im Robinienstamm, welche den Höhepunkt der *PAL*-Aktivität ebenfalls am Ende der Vegetationsperiode aufweisen.

Vom *PAL*-Gen *RpPAL4* wurde keinerlei Expression im Robinienstamm detektiert (Abb. 26, S. 83). Aufgrund der Sequenz des *RpPAL4*-Fragments wurde die Möglichkeit ausgeschlossen, dass es sich bei diesem Genfamilienmitglied um ein inaktives Pseudogen handeln könnte (vgl. Kap. 3.1.2, S. 58 und Kap. 4.1.2.4, S. 107). Es kann somit davon ausgegangen werden, dass *RpPAL4* – analog zu den in Kap. 4.1.2.3 (S. 106) erörterten Möglichkeiten für die *CHS*-Genfamilienmitglieder – in anderen Organen der Robinie exprimiert wird.

4.3.2 *CHS*-Expression

Die Chalconsynthase (*CHS*) ist das einleitende Enzym der Flavonoidsynthese. Infolge der vielfältigen Funktionen von Flavonoiden im Pflanzenreich [einen Überblick geben z.B. Ververidis et al. (2007)] ist die Expression der *CHS*-Multigenfamilienmitglieder einer strengen Kontrolle unterworfen. Diese scheint vornehmlich auf transkriptionellem Wege zu erfolgen (z.B. Beritognolo 2002), wenn auch es inzwischen einige Hinweise auf posttranskriptionelle Kontrollmechanismen gibt (Todd und Vodkin 1996, Senda et al. 2004, Tuteja et al. 2004). Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird auch die Flavonoidsynthese bei der Kernholzbildung der Robinie maßgeblich durch die Regulation der Transkription kontrolliert, denn mit dem Einsetzen der Kernholzbildung in der Splint-Kern-Übergangszone im Sommer (Nobuchi et al. 1984) wurde in dieser Zone eine massive Steigerung der relativen Transkriptmengen von *RpCHS3*, 4 und 5 gemessen (Abb. 32, S. 91). In den übrigen Splintabschnitten kommen lediglich Spuren von *CHS*-Transkripten vor. Diese Resultate decken sich mit der radialen Verteilung von *CHS*-Protein und -Enzymaktivität (Magel et al. 1991, Magel und Hübner 1997). Offenbar ist eine solch starke Steigerung der *CHS*-Transkriptgehalte eine Voraussetzung für die Steigerung der *CHS*-Enzymgehalte, welche wiederum für die Akkumulation der Kernholz-spezifischen Flavonoide benötigt wird.

Neben der Gewebespezifität zeigen die drei *CHS*-Gene nahezu identische saisonale Expressionsmuster mit dem Höhepunkt in den Sommermonaten und einer schrittweisen Abnahme im Herbst und Spätherbst (Abb 32 und 33, S. 91). Diese beinahe gleiche räumliche und zeitliche Regulation der drei *CHS*-Gene weist analog zur *PAL*-Expression auf funktionelle Redundanzen hin (vgl. Kap. 4.3.1, S. 114). In Übereinstimmung mit dem festgestellten sommerlichen Höhepunkt der *CHS*-Genexpression fanden auch Yang und Mitarbeiter (2004) mit Hilfe von Microarray-basierten Expressionsstudien und mittels Northern Hybridisierung die stärkste *CHS*-Expression in der TZ der Robinie im Sommer, wobei das als genspezifische Sonde eingesetzte *CHS*-Genfragment sich als identisch mit *RpCHS3* herausstellte (vgl. Kap. 3.1.3, S. 64).

In der Schwarznuss (*Juglans nigra*), die wie die Robinie ein obligater Farbkernbildner ist, wurde die Expression von Genen des Flavonoidstoffwechsels untersucht und die stärkste *CHS*-Expression ebenfalls in der TZ gemessen (Beritognolo et al. 2002). Hier erstreckt sie sich vom Sommer bis in den Winter auf hohem Niveau. Allerdings liegen – verglichen mit der Robinie – auch in den übrigen Splintabschnitten größere Mengen an *CHS*-Transkripten vor. Dieser Unterschied ist darauf zurückzuführen, dass die Kernholzbildung der Schwarznuss anders verläuft als bei der Robinie. Nach Magel (2000) kann bei der Kernholzbildung zwischen mindestens zwei unterschiedlichen Typen, dem sogenannten *Robinia*-Typ (Typ 1)

und dem *Juglans*-Typ (Typ 2), unterschieden werden. Beim *Robinia*-Typ werden die Kernholz-spezifischen Polyphenole direkt und in-situ in der Splint-Kern-Übergangszone unter Abbau der eingelagerten Reservestoffe synthetisiert. Beim *Juglans*-Typ werden Vorstufen (z.B. Glykoside) der Kernholz-spezifischen Polyphenole bereits im noch nicht verfärbten Splint synthetisiert. Im Zuge der Kernholzbildung werden diese Vorstufen dann zu den endgültigen (farbgebenden) polyphenolischen Verbindungen umgesetzt; daneben findet auch in geringem Umfang eine Kerninhaltsstoff-Synthese in der TZ statt (Burtin et al. 1998, Magel 2000).

Trotz des verhältnismäßig ähnlichen Expressionsverhaltens der drei *RpCHS*-Gene 3, 4 und 5 hinsichtlich Gewebespezifität und Saisonalität wiesen die relativen Anteile dieser Gene an der *CHS*-Gesamtexpression ausgeprägte Unterschiede auf. So ist *RpCHS3* insgesamt am stärksten und *RpCHS5* am schwächsten exprimiert. Von einem differentiellen Expressionsmuster kann bei den drei *CHS*-Genen demnach nur hinsichtlich der Quantität gesprochen werden. Der biochemische Hintergrund für diese variierenden Anteile der drei *CHS*-Transkripte ist nicht bekannt; mögliche Funktionen werden in Kap. 4.5 (S. 129) erörtert.

Vom äußeren Splint (DX, EW, OS) bis an den Rand der Splint-Kern-Übergangszone (innerer Splint, IS) werden die drei untersuchten *CHS*-Gene auf sehr niedrigem Niveau exprimiert. Da im Splintholz geringe Mengen des Flavonoids Dihydrorobinetin vorliegen, die Konzentrationen dieser Verbindung mit zunehmendem Splintholzalter jedoch nicht zunehmen (ca. 1% der Konzentration im Kernholz oder noch weniger, Magel et al. 1994), ist von einer initialen Flavonoidsynthese während der Xylemdifferenzierung auszugehen. Die Präsenz von geringen Mengen an *CHS*-Transkripten im ausdifferenzierten Splintholz ist folglich nicht mit einer Synthese von Flavonoidverbindungen verbunden und ist somit eher einem „Erhaltungsstoffwechsel“ zuzuordnen, der einer schnellen Aktivierung des Flavonoidsyntheseweges dienen könnte. Die im jungen Xylem akkumulierten Flavonoide fungieren wahrscheinlich als präventiver Schutz vor Insektenfraß und holzpathogenen Pilzen (Magel et al. 1994). Die auch in anderen Baumarten vorkommende konstitutive Einlagerung von polyphenolischen Verbindungen im äußeren Splint unterstützt diese Annahme (Beritognolo et al. 2001, Pearce 1996 und Ref. darin).

Von *RpCHS6* wurde keinerlei Expression nachgewiesen, da mit keinen der konstruierten GSPs (Abb. 17, S. 72, Tab. 15, S. 73) ein PCR-Produkt erhalten wurde. Auch mit genomischer DNA der Robinie als template wurde kein PCR-Produkt erhalten. Die Ursache dafür kann nicht genannt werden. Dass *RpCHS6* bei der Genidentifizierung in Form nur eines einzigen Klons auftrat, deutet auf eine nur untergeordnete Rolle dieses *CHS*-Genfamilienmitglieds im Xylem hin. Möglicherweise wird *RpCHS6* in anderen Organen der Robinie exprimiert, in denen die dort synthetisierten Flavonoide andere physiologische

Funktionen wahrnehmen, wie z.B. in den Wurzeln im Zusammenhang mit der Nodulation, in den Blättern mit Flavonoiden als UV-Schutz oder bei der Synthese der Blütenpigmente (vgl. Kap. 4.1.2.3, S. 106).

4.3.3 Biochemie und Saisonalität der Kernholzbildung

Umfangreiche Untersuchungen zur Biochemie und Physiologie der Kernholzbildung, welche häufig an der Robinie durchgeführt wurden, zeigen, dass die Kernholzbildung einer ausgeprägten saisonalen Regulierung unterworfen und durch eine erhöhte metabolische Aktivität des Xylemparenchyms der Splint-Kern-Übergangszone gekennzeichnet ist, bevor es mit Abschluss der Kernholzbildung abstirbt (Ziegler 1968, Höll und Lenzian 1973, Nobuchi et al. 1984, Magel et al. 1991, Magel et al. 1992, Magel et al. 1994, Magel und Hübner 1997, Hauch und Magel 1998, Magel et al. 2001). In der Regel setzt die Kernholzbildung in den Sommermonaten ein und erstreckt sich bis weit in die Zeit der Winterruhe. Diese Jahresrhythmik gilt für zahlreiche Kernholz bildende Baumarten der gemäßigten Breiten und ist sowohl bei Nadel- als auch bei Laubbäumen anzutreffen (Hillis 1987 und Ref. darin). Auch für die Robinie wurde diese Saisonalität durch mikroskopische Untersuchungen nachgewiesen (Nobuchi et al. 1984). Yang und Mitarbeiter (2004) führten Expressionsanalysen mit Hilfe von Microarrays und genspezifischen Sonden auf Basis von ‚Expressed Sequence Tags‘ (ESTs) durch und stellten ebenfalls eine im Sommer hochregulierte *PAL*- und *CHS*-Expression in der TZ der Robinie fest – verglichen mit der TZ im Herbst. Anhand von Messungen der radialen Verteilung von nicht-strukturellen Kohlenhydraten (Stärke, Saccharose, Glucose, Fructose) im Robinienstamm während der Vegetationsperiode wurde die TZ im Spätsommer und Herbst als ausgeprägtes sink-Gewebe für Kohlenhydrate identifiziert (Magel et al. 1994). Diese nicht-strukturellen Kohlenhydrate fungieren einerseits als Energielieferant, andererseits als Bausteine in Form von Kohlenstoffgerüsten für den Sekundärmetabolismus (Phenolsynthese). In der TZ wurde vom Spätsommer bis in den Spätherbst ein Abbau der Stärkespeicher, einhergehend mit erhöhten Saccharosegehalten gemessen, bei gleichzeitig gesteigerten Aktivitäten der Enzyme Saccharose-Synthase (SuSy, E.C. 2.4.1.13) und Neutrale Invertase (NI, E.C. 3.2.1.26) (Hauch und Magel 1998). Damit korrespondierend wurden von SuSy im Sommer erhöhte Transkriptmengen in der TZ nachgewiesen (Hauch und Magel 1998). Die Reaktionsprodukte von SuSy und NI (UDP-Glucose, Fructose, Glucose) werden zum einen der Glycolyse, zum anderen dem oxidativen Pentose-Phosphat Zyklus (oPPZ) zugeleitet (Magel et al. 2001). Der oPPZ, von dem gesteigerte Aktivitäten zweier Schlüsselenzyme, die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (E.C 1.1.1.49) und die 6-Phosphogluconat

Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.44) in der TZ im Spätsommer und Herbst nachgewiesen wurden (Magel et al. 2001), dient der Bereitstellung verschiedener Zuckerphosphate und versorgt u.a. den Shikimatweg, welcher wiederum als Bindeglied zwischen Kohlenhydrat-metabolismus und der Synthese aromatischer Verbindungen fungiert. Der Shikimatweg liefert die Grundbausteine für den Phenylpropanstoffwechsel (erstes Enzym: PAL) und letztlich die Flavonoidsynthese (erstes Enzym: CHS). Die mit dem oPPZ einhergehende Erhöhung des Pools an NADPH (Reduktionsäquivalente) relativ zu NADH in der TZ (Magel et al. 1992, Magel et al. 2001), ein Charakteristikum eines durch anabole Reaktionen dominierten Stoffwechsels, untermauern diese verstärkte Stoffwechselaktivität mit einer Umsetzung der Kohlenhydrat-basierten Kohlenstoffgerüste zu phenolischen Kerninhaltsstoffen. Gesteigerte Aktivitäten der beiden Schlüsselenzyme PAL und CHS wurden ebenfalls in der TZ des Robinienstamms am Ende der Vegetationsperiode detektiert (Magel et al. 1991, Magel et al. 1997). Gleichzeitig kommt es zu einer Akkumulation der für das Robinienkernholz charakteristischen Flavonoide Dihydrorobinetin und Robinetin (Magel et al. 1994). Mit diesen bisher erarbeiteten Erkenntnissen wurde ein schlüssiges Bild von den die Kernholzbildung charakterisierenden biochemischen Prozessen geschaffen, angefangen bei den als Bausteine und Energielieferanten fungierenden Kohlenhydraten bis hin zur Synthese der Kernholzphenole.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wird dieses Bild um den Aspekt der Regulation der für die zwei Schlüsselenzyme PAL und CHS codierenden Gene erweitert. Es wurden zeitliche und räumliche Profile der *PAL*- und *CHS*-Genexpression im Robinienstamm im Lauf der Vegetationsperiode und unter Berücksichtigung des genspezifischen Beitrags von Mitgliedern beider Genfamilien ermittelt. Diese zeigen in Übereinstimmung mit den bisherigen Erkenntnissen zur Biochemie der Kernholzbildung einen Expressionshöhepunkt in den Sommermonaten im Vergleich zum Frühjahr und Spätherbst. Auch das für die Sucrose-Synthase (SuSy) codierende Gen zeigt einen sommerlichen Expressionshöhepunkt, während der Enzymaktivitätshöhepunkt von SuSy um einige Wochen verzögert auftritt (Hauch und Magel 1998). Diese hohe Übereinstimmung in den saisonalen Profilen von PAL, CHS und SuSy sowohl auf Genexpressions- als auch auf Enzymaktivitätsebene macht die enge Verflechtung, bzw. koordinierte Regulierung von primärem und sekundärem Stoffwechsel bei den Syntheseprozessen der Kernholzbildung deutlich.

Das für die *PAL*- und *CHS*-Gene ermittelte Expressionsverhalten liefert einen weiteren Beleg für die festgestellte Jahresrhythmik der Kernholzbildung und zeigt, dass auch bei diesem sekundären Differenzierungsprozess der Sprossachse die transkriptionelle Kontrolle der *PAL*- und *CHS*-Enzymaktivität eine tragende Rolle zu spielen scheint. Zudem weisen die untersuchten *PAL*- und *CHS*-Gene funktionelle Redundanzen auf, deren mögliche biologische Bedeutung an späterer Stelle diskutiert wird (siehe Kap. 4.5, S. 129).

4.4 PAL- und CHS-Expression nach Verwundung und Pathogenbefall des Xylems

Durch Verwundung und Pathogenbefall induzierte Verfärbungen im Xylem von Bäumen sind ein häufig beobachtetes Phänomen und ein wichtiger Bestandteil der von Bäumen entwickelten Abwehrstrategien. Grundprinzip dieser Abwehrstrategien ist die Kompartimentierung („Abschottung“) der defekten Zone durch verschiedene Reaktionen des Xylemparenchyms (siehe Einleitung Kap. 1.1.2, S. 13). Auf diesem Prinzip beruht das von Shigo und Marx (1977) entwickelte CODIT-Modell, welches von Dujesiefken und Liese zum sogenannten CODIT-Prinzip erweitert wurde (2006 und 2008, vgl. auch Kap. 1, S. 7). Nach dem CODIT-Prinzip werden die induzierten Reaktionen im Xylem weniger als Abwehrmechanismen gegenüber Holzpathogenen, sondern in erster Linie als Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der Funktionalität des noch gesunden Xylems verstanden. Der in Wundnähe erfolgende Aufbau von Grenzschichten in Form von verfärbten Reaktionszonen, wie er auch im Robinienxylem in Wundnähe nach Inokulation mit *Phellinus robiniae* festgestellt wurde, stellt hierbei nur einen Teil der induzierten Reaktionen dar und beruht auf der Akkumulation von antimikrobiellen Substanzen (Phytoalexinen, Shigo 1979, Pearce 1996). Voraussetzung für die Synthese dieser Verbindungen im wundnahen Xylemparenchym ist die Aktivierung der Gene, die für die Enzyme der beteiligten Stoffwechselwege codieren. In den verfärbten Reaktionszonen der Robinie sind Flavonoide die dominierenden Verbindungen (Busch 1999). Dementsprechend ist hier eine gesteigerte Expression von *PAL*- und *CHS*-Genen zu erwarten. Detaillierte Expressionsstudien von diesen beiden Schlüsselgenen im Zusammenhang mit der wund- und pathogeninduzierten Reaktionszonenbildung - insbesondere im Hinblick auf die Beteiligung der jeweiligen Genfamilienmitglieder – wurden bislang nicht durchgeführt. Mit der vorliegenden Arbeit werden erstmals Expressionsdaten von mehreren *PAL*- und *CHS*-Genen in der Reaktionszone einer Verwundungs- und Infektionsstelle im Xylem eines Laubbaums vorgelegt. Hierzu wurde Gewebe aus der lateralen, d.h. seitlich zum Wundrand in radialer Richtung verlaufenden Reaktionszone (auch als Grenzschicht bezeichnet) analysiert, welche eine tangentiale Schadensausbreitung unterbinden soll. In dieser Reaktionszone wurde eine Induktion von zwei der vier untersuchten *PAL*-Gene (*RpPAL2* und 3) als Reaktion auf Verwundung und Infektion nachgewiesen. Die beiden übrigen *PAL*-Gene werden entweder gar nicht exprimiert (*RpPAL4*), oder zeigen keine Induktion im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollen (*RpPAL1*). Von den untersuchten *CHS*-Genen *RpCHS3*, 4 und 5 zeigen alle drei eine ausgeprägte Induktion.

Bei den hierzu durchgeführten Genexpressionsanalysen wurden bei den Baumindividuen (d.h. den biologischen Replikaten) der jeweiligen Probennahmezeitpunkte teilweise große

Unterschiede in den relativen Transkriptmengen der untersuchten *PAL*- und *CHS*-Gene gemessen. Hierfür sind vermutlich die jeweiligen Standortbedingungen, unter denen die Einzelbäume wuchsen, wie z.B. Nährstoff- und Wasserversorgung, Sonneneinstrahlung, Konkurrenzdruck und andere Umweltfaktoren verantwortlich, wenn auch durch sorgfältige Auswahl der Bäume diese Faktoren zu minimieren versucht wurden. Darüber hinaus können genetisch bedingte Unterschiede in der Effizienz der Pathogenabwehr, bzw. der Effizienz der Wund-Kompartimentierung bei den Einzelbäumen eine Rolle gespielt haben (Shigo et al. 1977). Solche individuellen Unterschiede wurden auch für die Fäulnisresistenz von (konstitutiv gebildetem) Kernholz gefunden (Scheffer und Cowling 1966 und Ref. darin). Da aus Gründen der praktischen Durchführbarkeit der Inokulationsexperimente und der Probengewinnung pro Probennahmezeitpunkt jeweils unterschiedliche Baumindividuen gefällt wurden, zeigen die in Zeitreihen dargestellten Expressionswerte keine zeitlichen *PAL*- und *CHS*-Expressionsprofile in jeweils einem Baumindividuum. Solche zeitlichen Profile hätten nur erstellt werden können, indem vor den Inokulationsexperimenten ausgewählte Bäume generativ vermehrt worden wären, was jedoch sehr lange Wartezeiten bis zum Erreichen der notwendigen Baumgrößen erfordert hätte.

Trotz dieser Einschränkungen, die sich zwangsläufig aus oben den genannten praktischen Gründen ergaben, sind die gemessenen Unterschiede zwischen den im Pathogenholz und den in den nicht infizierten Kontrollen ermittelten Expressionswerten der *PAL*- und *CHS*-Gene so groß, dass bei den oben genannten Genen eine spezifische Hochregulierung als Reaktion auf den Verwundungs- und Infektionsreiz eindeutig vorliegt.

4.4.1 *PAL* und *CHS*-Induktion durch Verwundung oder Infektion?

Ein Problem bei der Versuchsdurchführung ergab sich aus dem Umstand, dass unter Freilandbedingungen eine Wunde im Xylem nicht steril gehalten werden kann. Das zu Beginn der Experimente angestrebte Ziel, neben den eigentlichen Inokulationen (Pathogenholz) auch Proben mit sterilen Wunden als Kontrollen zu erzeugen (Wundkontrollen), um auf diese Weise zwischen Pathogen-verursachten und Wund-verursachten Reaktionen des Xylems unterscheiden zu können, musste aufgegeben werden. Auch die Wundkontrollen waren mit (holzerstörenden Mikro-) Organismen infiziert (vgl. Busch 1999) und zeigten eine entsprechende *PAL*- und *CHS*-Induktion (Replikat 4, in Tab. A5 und A6, S. 170-171). Diese beiden Probenpopulationen – Pathogenholz- und Wundkontrollproben – wurden somit im Weiteren als ein Probenkollektiv betrachtet. Folglich wird auf eine Aussage über den tatsächlich wirksamen, die Reaktionszonenbildung induzierenden Reiz – die Verwundung oder der Pathogenbefall – in der vorliegenden Arbeit bewusst verzichtet. Dies kann insofern als berechtigt angesehen werden, als Verwundungen

des Xylems von Bäumen zwangsläufig mit der Besiedelung durch (holzerstörenden Mikro-) Organismen einhergehen, eine sterile Wunde also einen in der Natur gar nicht existenten Zustand darstellt.

Die erhaltenen Expressionsdaten erlauben zumindest für die frühe Phase der Infektion (3 und 7 d_{ai}) eine tendenzielle Beantwortung der Frage, ob allein die Verwundung oder die Infektion mit dem Pilzinokulum die Ausbildung der Reaktionszone bewirkt hat. Das verwendete Probenmaterial aus der sich lateral zur Wunde bildenden Reaktionszone lag etwa 2 bis 3 mm von der Wundoberfläche entfernt, d.h. es wurde von der Wunde und den eingebrachten Inokula – es handelte sich um vorkultiviertes Pilzmycel von *Phellinus robiniae* – durch eine etwa 2 bis 3 mm dicke Xylemschicht getrennt. Folglich hatte zumindest das Probengewebe der frühen Probennahmezeitpunkte (3 und 7 d_{ai}) noch keinen direkten Kontakt mit dem Pilz. Bestätigt wird dies durch die von Busch (1999) durchgeführten Messungen der pilzlichen Metabolite Ergosterin, Mannit und Trehalose in der Reaktionszone, welche dort bis mindestens 7 d_{ai} nicht nachzuweisen waren. Zudem ist aufgrund der Holzanatomie die tangentialen Ausbreitung pilzlicher Pathogene im Vergleich zur axialen und radialen Ausbreitung sehr viel geringer ausgeprägt (Pearce 1996). Ein direkter Kontakt zwischen Pilzhyphen und dem Xylemparenchym der untersuchten Reaktionszone kann also als induzierender Reiz der frühen Infektionsphase ausgeschlossen werden. Dementsprechend muss die zur Reaktionszonenbildung führende Umprogrammierung des Stoffwechsels des Xylemparenchyms – eingeleitet durch Veränderungen in der Genexpression – entweder durch niedermolekulare Substanzen ausgelöst worden sein, welche das feste Xylemgewebe durchdringen und als Signale fungieren konnten, oder es müssen gänzlich andere Signalübertragungswege wirksam gewesen sein. Als niedermolekulare, volatile Botenstoffe fungieren beispielsweise Ethylen und Stickstoffmonoxid, welche von Pflanzenzellen u.a. als eine der ersten Reaktionen auf Pathogenbefall gebildet werden und in der Zelle eine Aktivierung von Pathogenabwehr-assoziierten Genen hervorrufen (Ecker und Davis 1987, Romero-Puertas et al. 2004 und Ref. darin). Sowohl Ethylen als auch Stickstoffmonoxid induzieren die Expression von *PAL*- und *CHS*-Genen (Ecker und Davis 1987, Romero-Puertas et al. 2004). Im Inokulationsexperiment sind vermutlich die durch die Verwundung direkt freigelegten und in direkten Kontakt mit dem Pilz gelangten Parenchymzellen des Xylems die Bildungsorte solcher volatiler Botenstoffe gewesen.

Es kann somit davon ausgegangen werden, dass beim Inokulationsversuch für die vorliegende Arbeit zumindest in der frühen Infektionsphase die im Rahmen der Reaktionszonenbildung gesteigerte *PAL*- und *CHS*-Expression auch ohne direkten Kontakt mit dem Pathogen ausgelöst wurde.

4.4.2 PAL-Expression

In der Reaktionszone wurde eine Induktion der *PAL*-Gene *RpPAL2* und *RpPAL3* nachgewiesen. Für *RpPAL1* wurde im Vergleich zu den nicht infizierten Kontrollen („Jahreszeitenkontrollen“) keine solch deutliche Antwort, bzw. Induktion festgestellt, da auch in den Kontrollen größere Mengen von *RpPAL1*-Transkripten gemessen wurden. Die drei *PAL*-Mitglieder trugen zu unterschiedlichen Anteilen zu der gesteigerten Gesamtexpression im Pathogenholz bei, mit *RpPAL1* als dem dominierenden *PAL*-Transkript. *RpPAL2* wurde zwar induziert, war aber nur mit geringem Anteil an der Gesamtexpression beteiligt, und *RpPAL3* wurde stark induziert und war mit höherem Anteil als *RpPAL2*, aber niedrigerem Anteil als *RpPAL1* im *PAL*-Transkriptpool vertreten. Die *PAL*-Gesamtexpression in der Reaktionszone setzt sich demnach aus einem großen Anteil an konstitutiver (*RpPAL1*) und einem geringen Anteil an induzierter Expression (*RpPAL2* und 3) zusammen. In der Reaktionszone sind also, ähnlich wie auch bei Wachstums-, bzw. Entwicklungsprozessen wie der Differenzierung der Zellwände (Ligninsynthese), bzw. der Kernholzbildung (Flavonoidsynthese) im gesunden Xylemgewebe (siehe Abb. 28, S. 87), die drei *PAL*-Gene aktiv und tragen zur Pathogenabwehr bei. Bis auf die differierenden relativen Anteile der drei *PAL*-Gene an der Gesamtexpression im Zusammenhang mit diesen beiden Typen von Verfärbungsprozessen, liegt demnach keine differentielle Regulation der drei *PAL*-Gene im Sinne einer strikten Beteiligung an nur einem dieser Prozesse vor.

In der Rotfichte (*Picea abies* (L.) Karst.) wurde analog zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in verschiedenen gesunden (keinem Stress ausgesetzten) Gewebetypen eine konstitutive Expression zweier *PAL*-Gene (*PaPAL1* und 2) festgestellt. Im Xylem, welches einem mechanischen Stress ausgesetzt wurde (Druckholz), sowie im pathogeninfizierten Phloem wurde jedoch – neben dem weiterhin aktiven *PaPAL1* – selektiv das *PAL*-Gen *PaPAL2* induziert (Koutaniemi et al. 2007). Dieses Expressionsverhalten weist somit Analogien zur selektiven Induktion von *RpPAL2* und 3 neben der gewissermaßen konstitutiven Expression von *RpPAL1* in der wundnahen Reaktionszone im Robinienxylem auf.

Eine koordinierte, simultan erfolgende Expression mehrerer *PAL*-Genfamilienmitglieder als Reaktion auf Verwundung und/oder Infektion mit einem Pathogen (bzw. durch Behandlung mit einem Elicitor) ist eine bei zahlreichen Pflanzen zu beobachtende Reaktion, wie beispielsweise bei der Petersilie (*Petroselinum crispum*, Logemann et al. 1995), der Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*, Wanner et al. 1995) oder auch der Kiefer (*Pinus banksiana*, Butland et al. 1998). Offenbar ist eine solche Redundanz in der *PAL*-Expression für Pflanzen von Vorteil, bzw. aus biochemischen oder regulatorischen Gesichtspunkten notwendig. In Kapitel 4.5 (S. 129) werden mögliche biologische Funktionen dieses Phänomens erörtert.

Bei *RpPAL2* kann bei ausschließlicher Betrachtung der Expressionswerte im Pathogenholz nicht von einer Hochregulierung nach Inokulation gesprochen werden, da die Absolutwerte von 0 d_{ai} und 3 d_{ai} in etwa gleich sind und in der Folge sogar absinken. Einzig durch den Vergleich der Pathogenholz- mit den Kontrollproben (gesunder Splint nicht behandelter Bäume) des jeweiligen Probennahmezeitpunkts ergibt sich die Induktion, bzw. Hochregulierung. Bei *RpPAL3* hingegen ist zwischen 0 und 3 d_{ai} eine starke Zunahme der relativen Expression zu verzeichnen, so dass hier auch ohne die Kontrollen von einer Hochregulierung infolge Verwundung (und Infektion) gesprochen werden kann.

Bei allen drei *RpPALs* ist eine Verringerung der relativen Expression zwischen 3 und 30 d_{ai} zu beobachten (Abb. 36, S. 94 und Abb. 38, S. 97). Die Ursache hierfür ist unbekannt. Eine Überlagerung der infektionsbedingten *PAL*-Induktion durch eine saisonale Herunterregulierung zum Ende der Vegetationsperiode, wie sie in der Splint-Kern-Übergangszone nachgewiesen wurde (siehe Abb. 28, S. 87), ist ein möglicher Erklärungsansatz. Der bei den drei *PAL*-Genen zu beobachtende leichte Anstieg der Expressionswerte 90 Tage nach Inokulation (= November) widerspricht jedoch dieser Interpretation. Möglicherweise ist die Abnahme der *PAL*-Transkriptmengen innerhalb von 30 Tagen Ausdruck einer transienten Hochregulierung, die bereits wenige Tage nach der Verwundung ihren Höhepunkt hatte. Der danach zu verzeichnende Anstieg der relativen Transkriptmengen 90 und 360 d_{ai} muss in diesem Fall auf andere Ursachen zurückgeführt werden. Möglicherweise kam es in dieser späten Phase der Infektion zu einer nochmals verstärkten Interaktion zwischen dem ins Holz eindringenden Pilz und dem umgebenden Xylem, welche eine zweite, nochmals verstärkte Induktion der pathogen-assoziierten Abwehrmechanismen – darunter die Aktivierung der *PAL*-Genexpression – auslöste. Die 360 d_{ai}-Proben zeigten bei einer Hälfte der Proben eine vergleichsweise geringe, bei der anderen Hälfte hingegen eine sehr viel stärkere *PAL*-Expression (Gruppe A und B in Abb. 38, S. 97). Diese großen Unterschiede sind vermutlich ebenfalls auf grundsätzlich unterschiedliche Infektionsverläufe zurückzuführen, d.h. bei den Baum-Individuen mit verhältnismäßig schwacher *PAL*-Expression fand eine solche nochmalig verstärkte Interaktion zwischen dem Pilz und dem Robinienxylem nicht statt. Eine individuell unterschiedlich ausgeprägte Pathogenresistenz (Shigo et al. 1977), die sich in diesem Fall in unterschiedlich effektiver Eindämmung des Pathogens äußerte (Gruppe A bzw. B), hat hier möglicherweise auch eine Rolle gespielt.

Neben der gesteigerten *PAL*-Expression im Pathogenholz wurden auch in den nicht infizierten Kontrollen, d.h. im gesunden Splintholz geringe Mengen von *PAL*-Transkripten nachgewiesen, in denen *RpPAL1* dominierte (Abb. 38 und 39, S. 97). Das Probenmaterial für die nicht infizierten Kontrollen wurde aus dem ersten und zweiten äußeren Jahrring präpariert (Busch 1999) und ist damit mit den Proben der OS- (und MS-) Zone des gesunden Splints (Robinienstammquerschnitte) vergleichbar (vgl. Abb. 24, S. 81). In diesen

Xylemabschnitten ist die Ligninsynthese abgeschlossen, so dass die Expression von *PAL*-Genen hier eine andere Funktion hat. Vermutlich ist sie Bestandteil einer präformierten Abwehr des Xylems gegenüber Verwundung und Pathogenbefall (Magel und Hübner 1997, siehe hierzu auch Diskussion in Kap. 4.3.1, S. 114). Interessanterweise wird diese vermutete präformierte Abwehr zum größten Teil durch Expression von *RpPAL1* realisiert, dem Gen, welches im Pathogenholz keine spezifische Induktion zeigte. *RpPAL1* scheint sich an der Pathogenabwehr also nicht durch eine Hochregulierung zu beteiligen, sondern vielmehr durch eine stetige Expression bereits im gesunden Xylem auf vergleichsweise hohem Niveau. Der Beitrag von *RpPAL1* an der Pathogenabwehr hat damit eher einen prophylaktischen Charakter.

Die gleichzeitige Erhöhung von *PAL*- und von *CHS*-Transkripten in der Reaktionszone (siehe Abb. 38, S. 97 und Abb. 40, S. 99) sowie die von Busch (1999) festgestellte Akkumulation von Flavonoiden in dieser Zone deuten darauf hin, dass der größte Anteil des durch den Phenylpropanstoffwechsel (PPS) fließenden Kohlenstoffs in die Flavonoidsynthese kanalisiert wird. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass auch andere vom PPS abgeleitete polyphenolische Verbindungen mit antimikrobieller Wirkung in der Reaktionszone der Robinie gebildet werden. So ist nach Verwundung des Xylems verschiedener Laubbäume im wundnahen Strahl- und Axialparenchym, teilweise auch in Fasern und Gefäßen, eine ausgeprägte Suberinisierung der Zellwände zu beobachten (Biggs 1987, Schmitt und Liese 1993). Durch diese Suberinisierung wird eine Grenzschicht zwischen defekten und intakten Splintabschnitten aufgebaut, die zum einen als Schutz vor holzpathogenen Pilzen dienen, zum anderen eine Austrocknung bzw. ein Eindringen von Luft ins Xylem verhindern soll (Pearce 1996 und Ref. darin). Auch eine Verstärkung von Zellwänden des wundnahen Parenchyms, sowie von Fasern und Gefäßen durch zusätzliche Lignifizierung ist Teil der durch Pathogenbefall induzierten Abwehrreaktionen (sogenanntes ‚defense lignin‘, Hawkins und Boudet 2003, Pearce 1996 und Ref. darin). Darüber hinaus kommt im wundnahen Gewebe von verschiedenen Pflanzen eine große Vielfalt an PPS-abgeleiteten Substanzen vor, welche zumeist in kondensierter Form oder als Glykoside, bzw. kovalent an Zellwandkomponenten gebunden vorliegen (Dixon und Paiva 1995 und Ref. darin). Auch die verwundungs- und pathogeninduzierte Bildung von Salicylsäure, welche vermutlich als Signalmolekül für die Aktivierung von Pathogenabwehrreaktionen in weiter entfernten Pflanzengewebe und -organen fungiert, leitet sich vom PPS ab und ist damit abhängig von der *PAL*-Aktivität.

Folglich dient die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene *PAL*-Geninduktion in der Reaktionszone (und die damit verbundene, gesteigerte *PAL*-Enzymaktivität) nicht nur einer Akkumulation von Flavonoiden. Sie ist wahrscheinlich auch für eine mit der Pathogenabwehr assoziierte Suberinisierung und Lignifizierung der Zellwände des wundnahen Xylemparenchyms, sowie möglicherweise für die Synthese weiterer, als Phytoalexine und/oder Signalmoleküle wirkende Phenylpropanderivate verantwortlich.

Da die Regulierung der PAL neben der transkriptionellen Komponente auch auf posttranslationalem Wege via Phosphorylierung erfolgt (vgl. Kap. 1.1.3, S. 14), könnte zudem eine verwundungs- und pathogeninduzierte Aktivierung von zuvor inaktiven PAL-Enzymen eine Rolle spielen. Ein solcher zusätzlicher Regulationsmechanismus würde aufgrund der dadurch ermöglichten, sehr schnellen Aktivierung des PPS für den Baum einen Vorteil bei der Pathogenabwehr darstellen. Dass solche inaktiven PAL-Enzymen im Xylem der Robinie präsent sind, wurde gezeigt (Magel und Hübner 1997).

4.4.3 CHS-Expression

Über die verwundungs- und pathogeninduzierte CHS-Genexpression im Xylem von Bäumen ist bisher wenig bekannt. Alle bisher durchgeführten Studien zur CHS-Expression in Bäumen befassen sich entweder mit der entwicklungspezifischen CHS-Genaktivität im Xylem (Kernholzbildung: Beritognolo et al. 2002) oder es wurden andere Pflanzenorgane und nicht das Xylem untersucht (pathogeninduzierte CHS-Expression im Phloem: Nagy et al. 2004). Eine Ausnahme bildet eine Studie zur Genexpression in der Japanischen Rotkiefer (*Pinus densiflora*) nach Befall des Xylems mit einer Kiefernholz nematode (Shin et al. 2009). In dieser wurden durch den Nematodenbefall induzierte CHS-Transkripte nachgewiesen. Differentielle Expressionsanalysen, d.h. Untersuchungen zum Beitrag einzelner Mitglieder der CHS-Genfamilie zur Gesamtexpression in diesem Zusammenhang liegen überhaupt nicht vor. Auf indirektem Wege hingegen, nämlich durch Analyse von im Xylem nach Verwundung und Infektion induzierte polyphenolische Verbindungen, wurde die Aktivität der Chalkonsynthase bereits in mehreren Studien nachgewiesen, unter anderem aufgrund der wichtigen Funktion der CHS-Folgeprodukte für die (konstitutive und induzierte) Pathogenabwehr. So wurde im Xylem der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) eine Anhäufung von Flavanolen nach Infiltration der Gefäße mit *Verticillium dahliae* festgestellt (Bell und Stipanovic 1978). Und im Splint der Banks-Kiefer (*Pinus banksiana*) wird nach mechanischer Beschädigung das Flavanon Pinocembrin gebildet (Hillis und Inoue 1968). Einen Überblick über weitere wund- oder infektionsinduzierte Flavonoide und Isoflavonoide, sowie Vertreter anderer Stoffklassen geben Kemp und Burden (1986).

Vor allem aber ist die CHS und die zugrunde liegende Genexpression im Zusammenhang mit diversen Stressfaktoren in krautigen, d.h. nicht verholzenden Pflanzen und auch in pflanzlichen Suspensionszellkulturen intensiv untersucht worden (vgl. Kap. 1.1.3, S. 14). Stets wurden deutliche Steigerungen bei der CHS-Genexpression festgestellt. Diese lassen auf eine transkriptionelle Kontrolle der CHS-Aktivität schließen. Bei diesen Studien wurden jedoch nicht die speziellen Bedingungen berücksichtigt, die sich aus der Anatomie von verholztem Xylem ergeben, wie z.B. die hohe Festigkeit des Gewebes und der

vergleichsweise geringe Anteil lebender Zellen. Dieser Umstand macht einen Vergleich dieser Expressionsdaten, insbesondere von Expressionskinetiken, mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nur eingeschränkt möglich. So wurde bei Elicitationsversuchen von pflanzlichen Suspensionskulturen häufig eine Induktionszeit von wenigen Stunden nachgewiesen (z.B. Ryder et al. 1987, Wingender et al. 1989). Solche kurzen Induktionszeiten sind sicherlich auf den intensiven Kontakt zwischen den in Lösung frei zugänglichen Wirtszellen und den Elicitoren zurückzuführen. Im Xylemgewebe der Robinie ist dagegen eine verzögerte Induktion der Pathogenantwort infolge der Diffusionshemmnisse durch das vergleichsweise feste Holzgewebe anzunehmen. Trotz dieser Unterschiede weist der zeitliche Verlauf der *CHS*-Gesamtexpression (siehe Abb. 41, S. 99) einen ähnlichen Verlauf auf, wie er bei der *CHS*-Expression in Zellkulturen der Bohne (*Phaseolus vulgaris*) vorkommt (Ryder et al. 1987). Nach einer schnell erfolgenden Induktion innerhalb von 3 Tagen nimmt die *CHS*-Expression im weiteren Verlauf ab und später allmählich wieder zu; allerdings erstrecken sich diese Verläufe über jeweils unterschiedliche Zeitskalen (Bohne: Stunden, Robinie: Monate). Diese offenbar massive und schnell erfolgte Aktivierung der Flavonoidbiosynthese in Wundnähe bewirkte eine schnelle Ausbildung einer Reaktionszone, denn diese war in den Querschnitten der beernteten Bäume bereits sieben Tage nach Inokulation mit bloßem Auge zu erkennen (Busch 1999). Eine derart schnell erfolgende Kompartimentierung von Wunden innerhalb von Tagen könnte ein Faktor (von mehreren) sein, der erklärt, warum die Robinie Verletzungen des Xylems zumeist gut übersteht (eigene Beobachtung) und damit zu den effektiven Kompartimentierern gezählt wird (Magel, pers. Mitt.).

Nach Untersuchungen von Busch (1999) bestehen die farbgebenden Substanzen der Reaktionszone in der Robinie vorwiegend aus Flavonoiden. Dies wurde aus der Fluoreszenz der Verfärbungszone unter UV-Licht, sowie aus dem Absorptionsspektrum (290 - 400 nm) des methanolischen Extrakts aus dieser Zone abgeleitet. Dihydrorobinetin und Robinetin sind hier vermutlich die dominierenden Verbindungen (Busch 1999). Im Allgemeinen gelten jedoch die Pterocarpane, Derivate der Isoflavonoide, als die für Leguminosen charakteristischen Phytoalexine. Nach Hijwegen (1973) bildet auch die Robinie Pterocarpane, wenn auch der Autor die Syntheseorte nicht spezifiziert. In der leguminosen Baumart *Dalbergia odorifera* und im Gelbholz (*Cladrastis platycarpa*, *Fabaceae*) wurden Pterocarpane als Bestandteile des Kernholzes identifiziert (Liu et al. 2005, Mizuno et al. 1990). Folglich besteht die Möglichkeit, dass auch in der Reaktionszone von Robinienholz Pterocarpane synthetisiert werden und zur Pathogenabwehr beitragen.

Anhand der *CHS*-Expressionsmuster (Abb. 40 und 41, S. 99) wird deutlich, dass die drei untersuchten Gene *RpCHS3*, *4* und *5* durch den Verwundungsreiz bzw. Pathogenbefall induziert werden, wobei diese mit jeweils unterschiedlichen relativen Anteilen zur *CHS*-Gesamtexpression beitragen. *RpCHS5* nimmt hierbei den größten Anteil ein, bzw. zeigt die

stärkste Induktion. Im Gegensatz zur *PAL*-Expression wurden in den nicht infizierten Kontrollen praktisch keine *CHS*-Transkripte gemessen, was die massive Induktion dieser Gene in der Reaktionszone sowie die transkriptionelle Regulierung der *CHS*-Aktivität unterstreicht. Hierbei scheint dem *CHS*-Genfamilienmitglied *RpCHS5* eine besondere Rolle bei der Pathogenabwehr zuzukommen, denn während dieses Gen bei der konstitutiven Kernholzbildung nur einen verhältnismäßig kleinen Beitrag zur *CHS*-Expression leistet (vgl. Abb. 33, S. 91), ist es in der Reaktionszone das dominierende Transkript (Abb. 41, S. 99). Trotzdem, und in Analogie zu den Erkenntnissen über die *PAL*-Expression im Robinienxylem, weist die simultane Expression der drei *CHS*-Gene in der Reaktionszone – ebenso wie die der Splint-Kern-Übergangszone – auf funktionelle Redundanzen bei den untersuchten *CHS*-Genen hin. Von einer differentiellen Regulation hinsichtlich der Beteiligung nur einzelner *CHS*-Gene an der pathogenabwehr-assoziierten Flavonoidsynthese kann also nicht gesprochen werden; lediglich die variierenden relativen Anteile weisen auf unterschiedliche regulatorische Elemente oder Mechanismen bei den *CHS*-Genfamilienmitgliedern hin.

Auffällig bei den drei *CHS*-Genen ist die bei einem Teil der Replikate auftretende sehr starke Expression 360 Tage nach Inokulation (Gruppe B bei *RpCHS4* und 5, vgl. Abb. 40, S. 99 und Tab. A6, S. 172), während in der anderen Hälfte des Probenkollektivs (Gruppe A) sehr viel geringere relative Transkriptmengen von *RpCHS4* und 5 gemessen wurden. Die Ursache für dieses unterschiedliche Expressionsverhalten bei den jeweiligen Baumindividuen ist unbekannt, könnte aber analog zur Interpretation der entsprechenden *PAL*-Expression, welche ähnliche Muster aufweist (Abb. 38, S. 97), auf unterschiedliche Infektionsverläufe in den beiden Probenkollektiven zurückgeführt werden, siehe Kap. 4.4.2, S. 124.

4.5 Biologische Bedeutung von paralleler Expression mehrerer *PAL*- und *CHS*-Gene

In der vorliegenden Arbeit wurden bei den untersuchten *PAL*- und *CHS*-Genen teilweise qualitativ sehr ähnliche Expressionsmuster ermittelt, d.h. die Mitglieder der beiden Genfamilien werden mit ähnlichen zeitlich-räumlichen Profilen in den verschiedenen Abschnitten des Xylems während der Vegetationsperiode exprimiert. Auch im Pathogenholz werden mindestens zwei *RpPAL*-Gene hochreguliert und mindestens drei *RpCHS*-Gene induziert, die vor Inokulation praktisch inaktiv sind. Die Organisation von mehreren Genen ähnlicher Sequenz und Funktion in einer Genfamilie und deren parallele Expression ist Teil eines allgemein bei Pflanzen zu beobachtenden Phänomens, das als genetische Redundanz bezeichnet wird (Nowak et al. 1997). Die Entstehung genetischer Redundanz wird auf

verschiedene Mechanismen zurückgeführt, wie z.B. auf Duplikationen einzelner Gene oder Chromosomenabschnitte sowie auf Auto- und/oder Allopolyploidisierungsereignisse ganzer Genome während der phylogentischen Entwicklung der Arten (Wagner 1996, Gottlieb 2003). Sie äußert sich in Form von paralleler Expression mehrerer *PAL*- und *CHS*-Gene auch in anderen Pflanzenarten, wie der Bohne (*Phaseolus vulgaris*), der Luzerne (*Medicago sativa*) der Pappel (*Populus tremuloides* Michx.) oder der Sojabohne (*Glycine max*) (z.B. Bolwell et al. 1985, Liang et al. 1989, Jorin und Dixon 1990, Kao et al. 2002, Grab et al. 1985, Ryder et al. 1987, Estabrook et al. 1991, Junghans et al. 1993). Offenbar hat ein solches Expressionsverhalten eine metabolische Funktion, und verschiedene Erklärungsansätze dafür werden in der Literatur angeführt. Beispielsweise kann durch genetische Redundanz die Robustheit von essentiellen Stoffwechselfunktionen gegenüber Störungen erhöht werden (Wagner 1996, Nowak et al. 1997). So kann etwa ein Ausfall einzelner Gene, z.B. infolge Geninaktivierung durch Mutation, dadurch kompensiert werden (Gu et al. 2003). Des Weiteren schafft genetische Redundanz auch die Voraussetzungen für evolutionäre Neuerungen hinsichtlich der biochemischen Funktion einzelner Genprodukte oder der Ausgestaltung und Anpassung regulatorischer Netzwerke (Wagner 1996). Denkbar ist auch eine durch genetische Redundanz erhöhte katalytische oder regulatorische Flexibilität, indem durch simultane Expression mehrerer Gen-Isoformen, bzw. deren Variation eine flexibel einstellbare Assemblierung von multimeren Proteinen aus isoformen Protein-Untereinheiten ermöglicht wird (Appert et al. 1994 und Ref. darin). Dies ist ein möglicher Mechanismus, mit dem die katalytische Aktivität oder die Wechselwirkung mit anderen zellulären Komponenten im Sinne einer Feinjustierung angepasst wird. Er ist sowohl für das als Dimer aktive CHS-Protein (Martin 1993), als auch für das im nativen Zustand tetramere PAL-Enzym denkbar - in diesem Fall spräche man von heterodimeren (CHS), bzw. heterotetrameren (PAL) Enzymen. Von PAL wurden bereits verschiedene Isoformen, die aufgrund ihrer Sequenzdivergenz unterschiedliche pI - und K_m -Werte aufweisen, identifiziert und Veränderungen in den relativen Anteilen der Isoformen nach Elicitation / Infektion nachgewiesen, wobei sich das Verhältnis zugunsten der Isoformen mit höherer Substrataffinität verschob (Bolwell et al. 1985, Cramer et al. 1989, Jorin und Dixon 1990).

Solche, auf redundanter Genexpression beruhenden Mechanismen zur Regulierung der katalytischen Flexibilität von PAL- und CHS-Enzymen könnten auch im Xylem von Laubbäumen entwickelt sein, um je nach Entwicklungs- oder Reizzustand die entsprechenden Polyphenole synthetisieren zu können (Kernholzextraktstoffe bei der Umwandlung zu Kernholz, Phytoalexine bei Pathogenabwehr, Ligninmonomere für die Lignifizierung der Zellwände).

4.6 Konstitutive und induzierte Verfärbungen im Xylem – Gemeinsamkeiten und Unterschiede

Die im Holz von Laub- und Nadelbäumen zu beobachtenden Verfärbungen können nach dem Kriterium unterteilt werden, ob sie konstitutiv, d.h. im Zuge der regulären und genetisch determinierten Ausbildung eines Farbkerns auftreten (obligate Kernholzbildung), oder ob sie durch exogene Einflüsse induziert werden – insbesondere durch Verletzungen des Holzkörpers (Astabbrüche, Anfahr- und Rückeschäden, etc.) und der damit einhergehenden Infektion mit holzerstörenden Mikroorganismen. Beide Verfärbungstypen haben die Gemeinsamkeit, dass im Xylem polyphenolische Verbindungen akkumuliert werden. Des Weiteren dienen beide Verfärbungstypen dem Schutz des Holzes vor der Zerstörung durch holzerstörende Mikroorganismen. Mit der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch die für die Polyphenolsynthesen aktivierten Stoffwechselwege (in der Robinie: Flavonoid-synthese) im Fall der beiden Schlüsselenzyme Phenylalanin Ammonium-Lyase (PAL) und Chalkonsynthase (CHS) auf der Aktivität derselben Gene beruhen (*RpPAL1*, 2 und 3, *RpCHS3*, 4, und 5), wenn auch differierende relative Anteil einzelner Genfamilienmitglieder gemessen wurden.

Neben diesen Gemeinsamkeiten sind jedoch auch einige Unterschiede zwischen diesen beiden Verfärbungstypen festzustellen. Diese betreffen vor allem die Art der Ein- und Ablagerung (Akkumulation) der polyphenolischen Verbindungen. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen von wundinduzierten, verfärbten Grenzschichten im Holz verschiedener Baumarten zeigen, dass die polyphenolischen Verbindungen (Dujesiefken et al. 1989), bzw. andere als Phytoalexine wirkende Stoffe (z.B. das Sesquiterpen Calamenen in *Tilia spec.*, Melcher et al. 2003) vor allem in den Zelllumina in Form granulärer Partikel eingelagert werden. Oftmals liegen diese als sogenannte Akkrustierungen den inneren Zellwänden auf, infiltrierten diese jedoch nicht oder nur in geringem Maße. Ähnliche Befunde wurden für die Akkumulation von farbgebenden Inhaltsstoffen des Falschkerns der Rotbuche gefunden, einer Sonderform von induzierten Verfärbungsprozessen, die nach dem verletzungsbedingten Eindringen von Luftsauerstoff ins Stammesinnere entsteht (Koch et al. 2000, Koch 2004). Die konstitutive Kernholzbildung ist im Gegensatz hierzu durch eine intensivere Infiltration der Zellwandschichten mit den polyphenolischen Verbindungen gekennzeichnet, wobei der zugrunde liegende Mechanismus dieser Infiltration noch unbekannt ist. Dieser Unterschied in der räumlichen Verteilung im Gewebe (die Topochemie) ist möglicherweise ein Grund für die von Hart und Johnson (1970) festgestellte höhere Fäulnisresistenz des Robinienkernholzes im Vergleich zum Robinienholz aus wundinduzierten Verfärbungszonen.

In einer kürzlich erschienenen Studie über die Wundreaktionen im Xylem der Gemeinen Kiefer (*Pinus sylvestris* L.) wurde ein genetischer Zusammenhang zwischen den im

wundnahen Xylem akkumulierten Inhaltsstoffen und den Kernholzinhaltsstoffen nachgewiesen. Hierbei handelte es sich vor allem um das Stilben Pinosylvin (Harju et al. 2009). Dies bedeutet, dass Baumindividuen, die vergleichsweise hohe Konzentrationen an Pinosylvin im Kernholz akkumulieren, auch in wundinduzierten Verfärbungszonen zur Einlagerung größerer Mengen dieser Substanz befähigt zu sein scheinen.

4.6.1 Unterschiedliche Expressionsniveaus der *PAL*- und *CHS*-Gene

Der Vergleich der Werte für die relative Expression der drei *PAL*-Gene mit denen der drei *CHS*-Gene macht deutlich, dass die *CHS*-Gene in den Geweben, in denen sie exprimiert werden, mit zumeist deutlich größeren relativen Transkriptmengen vorliegen als die *PAL*-Gene (Tab. 19, S. 133). Dies gilt insbesondere für die TZ in den Sommermonaten (siehe Abb. 39 und 41, S. 97, bzw. S. 99). Ein Beispiel ähnlich großer Expressionsunterschiede zwischen *PAL* und *CHS* wurde von Zabala und Mitarbeitern (2006) geliefert, die in der Sojabohne (*Glycine max*) nach bakterieller Infektion eine durchschnittliche Hochregulierung von *PAL* um den Faktor 3,1, von *CHS* jedoch um den Faktor 31,6 fanden. Dieses Beispiel macht deutlich, dass ähnlich hohe Expressionsunterschiede auch bei anderen Pflanzen im Rahmen der Pathogenabwehr vorkommen. Über den biologischen Hintergrund für ein solches Expressionsverhalten liegen in der Literatur keine Angaben vor. Daten über die Umsatzzahlen (‘turnover number’) der beiden Enzyme bei verschiedenen Pflanzenarten bieten einen möglichen Erklärungsansatz, denn die *CHS* weist im Allgemeinen um ein bis zwei Größenordnungen niedrigere Umsatzzahlen auf als die *PAL* (www.brenda-enzymes.info). Eine höhere Transkriptions- und Translationsrate von *CHS* könnte also einen möglichen Mechanismus zur Kompensierung dieser unterschiedlichen Umsatzzahlen, bzw. enzimspezifischen Reaktionsraten darstellen.

Eine ebenfalls in dieses Erklärungsschema passende Studie wurde von Magel und Hübner (1997) vorgelegt. Diese stellten die spezifischen *PAL*- und *CHS*-Enzymaktivitäten den entsprechenden enzimspezifischen Proteinbanden (Western Blot) in der TZ der Robinie im November gegenüber: Während die spezifischen Enzymaktivitäten von *PAL* und *CHS* in dieser Zone sich lediglich um etwa Faktor 2 unterschieden (*PAL*: 12 pkat/mg Protein, *CHS*: 27 pkat/mg Protein), betrug die Intensität der *CHS*-spezifischen Proteinbande ein Vielfaches der von *PAL* (von den Autoren nicht quantifiziert, jedoch nach eigener Einschätzung deutlich größer als Faktor 2). Dies weist auf eine offenbar geringere Umsatzrate des *CHS*-Enzyms im Vergleich zum *PAL*-Enzym hin und bestätigt damit den oben erörterten Erklärungsansatz für die im Allgemeinen höheren *CHS*-Transkriptmengen.

Die Unterschiede in der *PAL*- und *CHS*-Gesamtexpression in der verwundungs- und pathogeninduzierten Reaktionszone (Aufsummierung der Werte für *RpPAL1*, 2 und 3, bzw. *RpCHS3*, 4, und 5, siehe Abb. 39 und 41, S. 97 bzw. 99) fallen im Vergleich zur Splint-Kern-Übergangszone (TZ) geringer aus, weil die Gesamtexpression der *CHS*-Gene in der Reaktionszone im Vergleich zur TZ deutlich geringer ist (siehe Tab. 19). Die *PAL*-Gesamtexpression hingegen bewegt sich sowohl in der TZ als auch in der Reaktionszone in vergleichbaren Größenordnungen. Im Rahmen der Pathogenabwehr sind die *CHS*-Gene offenbar vergleichsweise schwächer exprimiert, was sich in niedrigeren Flavonoidgehalten in der Reaktionszone – verglichen mit der TZ – äußert (Busch 1999). Die Abwehrreaktionen in der Reaktionszone beruhen also nicht allein auf der Akkumulation von Flavonoiden, sondern vermutlich auch auf der Bildung anderer Phenylpropanderivate, wie beispielsweise Suberin, Lignin und anderen Polyphenolen (vgl. Kap. 4.4.2, S. 124). Im Kernholz der Robinie hingegen werden nahezu ausschließlich Flavonoide akkumuliert (Roux und Paulus 1962), so dass hier eine massive Expression der Chalkonsynthase (vgl. Magel und Hübner (1997), sowie Expressionswerte der vorliegenden Arbeit) die Kanalisierung der PPS-Intermediate in die Flavonoidsynthese sicherzustellen scheint.

Tabelle 19 – *PAL*- und *CHS*-Gesamtexpression in Verfärbungszonen des Xylems der Robinie. Gezeigt sind die ungefähren Summen der Expressionswerte *RpPAL1*, 2 und 3 (*PAL*), und von *RpCHS3*, 4 und 5 (*CHS*) in der Reaktionszone (RZ) und in der Splint-Kern-Übergangszone (TZ).

	RZ (3-90 d _{ai})	TZ (Sommer-Herbst)
<i>PAL</i>	10 – 40	10 – 60
<i>CHS</i>	50 – 80	110 – 390

4.7 Ausblick

Die Phenylalanin Ammonium Lyase (PAL) und die Chalkonsynthase (CHS) waren in den vergangenen Jahrzehnten intensiv untersuchte Gene bzw. Enzyme des pflanzlichen Sekundärmetabolismus. Die Erkenntnisse, die anhand von PAL und CHS über die genetische Organisation, die entwicklungs- und reizspezifische Genregulation und -expression und über die Beziehung zwischen Enzymstruktur und -funktion gewonnen wurden, haben einen wichtigen Beitrag zum grundsätzlichen Verständnis der molekularen Biologie von Pflanzen geleistet. Die Kenntnis solcher molekularen Mechanismen schafft die Voraussetzungen für ein zukünftiges gezieltes ‚metabolic engineering‘, welches auch auf dem Gebiet der Forstpflanzenzüchtung interessante Möglichkeiten eröffnen könnte. Da biologisch verursachte Verfärbungsprozesse in Hölzern je nach Verwendung erwünscht oder unerwünscht sind, könnte die Möglichkeit der gezielten Anpassung der farbgebenden Extraktstoffgehalte in forstlich genutzten Baumarten ein vielversprechendes züchterisches Ziel darstellen. Die genetischen Grundlagen der Flavonoidbiosynthese als einer der wichtigsten Stoffwechselwege für die Extraktstoffbildung sind in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. Mit der vorliegenden Arbeit, in der mehrere Gene der beiden Schlüsselenzyme PAL und CHS identifiziert und das Expressionsverhalten dieser Gene im Zusammenhang mit Verfärbungsprozessen analysiert wurde, wurden Grundlagen für das Verständnis der molekularen Mechanismen von Verfärbungsprozessen in Laubhölzern erarbeitet und damit eine Basis für weiterführende Untersuchungen gelegt.

5. Zusammenfassung

Verfärbungsprozesse in der verholzten Sprossachse von Bäumen treten zum einen konstitutiv in Form der Kernholzbildung auf, zum anderen werden sie induziert durch Verwundung und Pathogenbefall des Xylems und äußern sich in der Ausbildung von verfärbten Reaktionszonen. Diese Prozesse beruhen auf StoffwechsellLeistungen des Xylemparenchyms und sind verbunden mit der Aktivierung von Enzymsystemen, die die Synthesen der farbgebenden Verbindungen katalysieren. Die Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL), das einleitende Enzym des Phenylpropanstoffwechsels, und die Chalkon-Synthase (CHS), das einleitende Enzym der Flavonoidsynthese, nehmen bei diesen Verfärbungsprozessen eine Schlüsselposition ein. Voraussetzung für die Umstellung des Stoffwechsels im Zuge der Verfärbungsprozesse ist die Aktivierung der für die beteiligten Enzyme codierenden Gene. Am Beispiel der Robinie (*Robinia pseudoacacia* L.), einer Baumart mit obligater Farbkernbildung, wurde die Expression von *PAL*- und *CHS*-Genen in diesen Verfärbungszonen, sowie im übrigen (unverfärbten) Splintholz während der Vegetationsperiode untersucht. Dazu wurden die in Multigenfamilien organisierten *PAL*- und *CHS*-Gene kloniert und sequenziert und auf diese Weise vier *PAL*-Gene (*RpPAL1*, 2, 3 und 4), und sechs *CHS*-Gene identifiziert (*RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6). Diese wiesen ein hohes Maß an Sequenzkonservierung in der codierenden Region auf. Basierend auf den stärker divergierenden 3'-untranslatierten Regionen wurden genspezifische Primer (GSPs) für jeweils vier *PAL*- und vier *CHS*-Gene konstruiert. Mit Hilfe der GSPs wurde durch semiquantitative RT-PCR und durch Real-Time PCR die Expression von *RpPAL1-4* und von *RpCHS3-5* in den betreffenden Xylemgewebeabschnitten analysiert.

Im gesunden Xylem der Robinie zeigen drei *PAL*- und drei *CHS*-Gene eine saisonale und gewebespezifische Regulation mit qualitativ ähnlichen, quantitativ jedoch unterschiedlichen Expressionsmustern. Ein *PAL*-Gen wird im Xylem gar nicht exprimiert (*RpPAL4*). Transkripte von *RpPAL1*, 2 und 3 weisen im Stammquerschnitt in radialer Richtung ein zweigeteiltes Verteilungsmuster auf, mit starker Expression in der Xylemdifferenzierungszone (DX) und in der Splint-Kern-Übergangszone (TZ). Dies weist auf die Beteiligung der *PAL*-Gene sowohl an der Lignin- als auch an der Flavonoidsynthese hin. Eine saisonale Komponente der Regulation besteht in einem Expressionshöhepunkt der drei *PAL*-Gene in der TZ in den Sommermonaten. Die drei untersuchten *CHS*-Gene *RpCHS3*, 4 und 5 werden strikt gewebespezifisch und mit jeweils unterschiedlichen Anteilen in der TZ exprimiert. Sie haben ihren saisonalen Expressionshöhepunkt vom Sommer bis in den Herbst. *RpPAL1* und *RpCHS3* erwiesen sich als die jeweils am stärksten exprimierten Mitglieder der beiden Genfamilien.

Zusammenfassend betrachtet erweisen sich die Expressionsmuster der untersuchten *PAL*- und *CHS*-Gene bei der konstitutiven Kernholzbildung, sowie im übrigen gesunden Robinienstamm als qualitativ ähnlich, eine differentielle Genexpression liegt lediglich in quantitativer Hinsicht, d.h. in den anteiligen Beiträgen der Gene an der Gesamtexpression vor. Eine funktionelle Differenzierung liegt bei den betrachteten *PAL*- und *CHS*-Genfamilienmitgliedern nicht vor (Ausnahme: *RpPAL4*, welches im Xylem nicht exprimiert wird). Zudem wurden deutliche saisonale Schwankungen in der Expression aufgezeigt, die mit den bisherigen Erkenntnissen über die Jahresrythmik der Kernholzbildung übereinstimmen.

Ferner wurde die *PAL*- und *CHS*-Genexpression in der sich bildenden Reaktionszone des Robinienstamms nach Verwundung und Infektion mit dem holzerstörenden Basidiomyceten *Phellinus robiniae* untersucht (Infektionsexperiment: Busch 1999). Von den vier untersuchten *PAL*-Genen wurden drei in der Reaktionszone exprimiert (*RpPAL1-3*), wobei bereits drei Tage nach Verwundung und Infektion ein Anstieg der Transkriptgehalte im Vergleich zum gesunden äußeren Splintholz unbehandelter Bäume (Jahreszeitenkontrollen) auftrat, und welcher über den gesamten Untersuchungszeitraum von 360 Tagen erhöht blieb. Anteilsmäßig dominierte *RpPAL1*, wurde jedoch, bezogen auf die Expression im gesunden Xylem, nicht spezifisch induziert. *RpPAL2* und *3* wurden induziert, nahmen im Vergleich zu *RpPAL1* jedoch nur einen geringen Anteil an der Gesamtexpression ein. Von den drei untersuchten *CHS*-Genen *RpCHS3*, *4* und *5* wurden alle drei bereits drei Tage nach Infektion in der Reaktionszone massiv induziert. In den Jahreszeitenkontrollen wurden hingegen nur Spuren an *CHS*-Transkripten detektiert. Diese Hochregulierung blieb über den gesamten Untersuchungszeitraum erhalten. *RpCHS5* nahm hier den höchsten Anteil an der *CHS*-Gesamtexpression ein.

Mit den vorliegenden Expressionsmustern der *PAL*- und *CHS*-Gene wurde eine deutliche Beteiligung der untersuchten Gene an zwei unterschiedlichen Typen von Verfärbungsprozessen im Xylem der Robinie aufgezeigt und ein weiterer Beleg für die Schlüsselfunktion von *PAL* und *CHS* an diesen ökologisch und ökonomisch wichtigen Prozessen geliefert.

6. Literaturverzeichnis

Allwood EG, Davies DR, Gerrish C, Ellis BE, Bolwell GP (1999) Phosphorylation of phenylalanine ammonia-lyase: evidence for a novel protein kinase and identification of the phosphorylated residue. *FEBS letters* 457: 47-52

An C, Ichinose Y, Yamada T, Tanaka Y, Shiraishi T, Oku H (1993) Organization of the genes encoding chalcone synthase in *Pisum sativum*. *Plant Mol Biol* 21: 789-803

Appert C, Logemann E, Hahlbrock K, Schmid J, Amrhein N (1994) Structural and catalytic properties of the four phenylalanine ammonia-lyase isoenzymes from parsley (*Petroselinum crispum* Nym.). *Eur J Biochem* 225: 491-499

Bell AA, Stipanovic RD (1979) Biochemistry of disease and pest resistance in cotton. *Mycopathologia* 65: 91-106

Beritognolo I, Magel EA, Abdel-Latif A, Charpentier JP, Jay-Allemand C, Breton C (2002) Expression of genes encoding chalcone synthase, flavanone 3-hydroxylase and dihydroflavonol 4-reductase correlates with flavanol accumulation during heartwood formation in *Juglans nigra*. *Tree Physiol* 22: 291-300

Biggs AR (1987) Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 tree species. *Phytopathol* 77: 718-725

Boddy L, Rayner AD (1983) Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-appraisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol* 94: 623-641

Bolwell GP, Bell JN, Cramer CL, Schuch W, Lamb CJ, Dixon RA (1985) L-Phenylalanine ammonia-lyase from *Phaseolus vulgaris* - Characterisation and differential induction of multiple forms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Eur J Biochem* 149: 411-419

Bolwell GP (1992) A role for phosphorylation in the down-regulation of phenylalanine ammonia-lyase in suspension-cultured cells of french bean. *Phytochem.* 31(12): 4081-4086

Bosshard HH (1966) Notes on the biology of heartwood formation. *IAWA Bull* 1: 11-14

Burtin P, Jay-Allemand C, Charpentier JP, Janin G (1998) Natural wood colouring process in *Juglans* sp. (*J. nigra*, *J. regia* and hybrid *J. nigra* x *J. regia*) depends on native phenolic compounds accumulated in the transition zone between sapwood and heartwood. *Trees* 12: 258-264.

Busch H (1999) Pathogenabwehr im Stamm der Scheinakazie (*R. pseudoacacia* L.) und der Fichte (*Picea abies* L. Karst.): Einfluss von Verwundung und Infektion auf den Saccharosestoffwechsel. Dissertation, Fakultät für Biologie, Universität Tübingen

Butland SL, Chow ML, Ellis BE (1998) A diverse family of phenylalanine ammonia-lyase genes in pine trees and cell cultures. *Plant Mol Biol* 37: 15-24

Campbell MM, Ellis BE (1992) Fungal elicitor-mediated responses in Pine cell cultures III. Purification and Characterization of Phenylalanine Ammonia-Lyase. *Plant Physiol* 98: 62-70

Claudot AC, Ernst D, Sandermann H, Drouet A (1999) Cloning and characterization of two members of the chalcone synthase gene family from walnut. *Plant Physiol Biochem* 37(19): 721-730

Cramer CL, Edwards K, Dron M, Liang X, Dildine SL, Bolwell GP, Dixon RA, Lamb CJ, Schuch W (1989) Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol* 12: 367-383.

Dehon L, Macheix JJ, Durand M (2002) Involvement of peroxidases in the formation of the brown coloration of heartwood in *Juglans nigra*. *J Exp Bot* 53: 303-311

DeGomez T, Wagner MR (2001) Culture and use of black locust. *Hort Technol* 11: 171-331

Dellus V, Mila I, Scalbert A, Menard C, Michon V, Herve Du Penhoat CLM (1997) Douglas-fir polyphenols and heartwood formation. *Phytochem* 45: 1573-1578

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7: 1085-1097

Dujesiefken D, Ebenritter S, Liese W (1989) Wundreaktionen im Holzgewebe bei Birke, Buche und Linde. *Holz Roh-Werkstoff* 47: 495-500

Dujesiefken D, Liese W (2006) Die Wundreaktionen von Bäumen – CODIT heute. Jahrbuch der Baumpflege 2006, ISBN 3-87815-215-9

Dujesiefken D, Liese W (2008) Das CODIT-Prinzip. Haymarket Media GmbH & Co. KG, Braunschweig

Durbin ML, McCaig B, Clegg MT (2000) Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome. *Plant Mol Biol* 42: 79-92

Ecker JR, Davis RW (1987) Plant defense genes are regulated by ethylene. *Proc Natl Acad Sci* 84: 5202-5206

Edwards K, Cramer CL, Bolwell GP, Dixon RA, Schuch W, Lamb CJ (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6731-6735

Estabrook EM, Sengupta-Gopalan C (1991) Differential expression of Phenylalanine ammonia-lyase and Chalcone synthase during soybean nodule development. *Plant Cell* 3: 299-308

Franken P, Niesbach-Klößgen U, Weydemann U, Maréchal-Drouard L, Saedler H, Wienand U (1991). The duplicated chalcone synthase genes C2 and WHP (white pollen) of *Zea mays* are independently regulated; evidence for translational control of WHP expression by the anthocyanin intensifying gene. *EMBO J.* 10: 2605-2612

Freudenberg K, Hartmann L (1953) Inhaltsstoffe der *Robinia pseudacacia*. *Naturwissenschaften* 40: 413

Frey-Wyssling A, Bosshard HH (1959) Cytology of the ray cells in sapwood and heartwood. *Holzforsch* 13: 129-137

Fukuda H (1996) Xylogenesis: Initiation, progression, and cell death. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 299-325

Gerstein M, Zheng D (2006) The real life of pseudogenes. *Sci Am* 295: 48-55

Gottlieb LD (2003) Plant polyploidy: gene expression and genetic redundancy. *Heredity* 91: 91-92

Goujon T, Sibout R, Eudes A, MacKay J, Jouanin L (2003) Genes involved in the biosynthesis of lignin precursors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* 41: 677-687

Gowri G, Paiva NL, Dixon RA (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) 12. Sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) cDNA clones and appearance of *PAL* transcripts in elicitor-treated cell cultures and developing plants. *Plant Mol Biol* 17: 415-429

Grab D, Loyal R, Ebel J (1985) Elicitor-induced phytoalexin synthesis in soybean cells: changes in the activity of chalcone synthase mRNA and the total population of translatable mRNA. *Arch Biochem Biophys* 243: 523-529

Gu Z, Steinmetz LM, Gu X, Scharfe C, Davis RW, Li WH (2003) Role of duplicate genes in genetic robustness against null mutations. *Nature* 421: 63-66

Hanover JW, Mebrahtu T (1991) *Robinia pseudoacacia*: Temperate legume tree with worldwide potential. NFTA 91-03. (http://www.winrock.org/fnrm/factnet/factpub/FACTSH/R_pseudoacacia.html)

Harju AM, Venäläinen M, Laakso T, Saranpää P (2009) Wounding response in xylem of Scots pine seedlings shows wide genetic variation and connection with the constitutive defence of heartwood. *Tree Physiol* 29: 19-25

Hart JH (1968) Morphological and chemical differences between sapwood, discolored sapwood, and heartwood in Black Locust and Osage Orange. *Forest Sci* 14: 334-338

Hart JH, Johnson KC (1970) Production of Decay-resistant sapwood in response to injury. *Wood Sci Technol* 4: 267-272

Hauch S, Magel EA (1998) Extractable activities and protein content of sucrose-phosphate synthase, sucrose synthase and neutral invertase in trunk tissues of *Robinia pseudoacacia* L. are related to cambial wood production and heartwood formation. *Planta* 207: 266-274

Hawkins S, Boudet A (2003) 'Defence lignin' and hydroxycinnamyl alcohol dehydrogenase activities in wounded *Eucalyptus gunnii*. *For Pathol* 33: 91-104

Hellemans J, Mortier G, De Paepe A, Spelemann F, Vandesompele J (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19

Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlén M, Teeri TT, Lundeberg J, Sundberg B, Nilsson P, Sandberg G (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98: 14732-14737

Hijwegen T (1973) Autonomous and induced pterocarpanoid formation in the Leguminosae. *Phytochem* 12: 375-380

Hillis WE, Inoue T (1968) The formation of polyphenols in trees – IV. The polyphenols formed in *Pinus radiata* after Sirex attack. *Phytochem* 7: 13-22

Hillis WE (1987) Heartwood and tree exudates. Springer Series in Wood Science. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York

Höll W, Lenzian K (1973) Respiration in the sapwood and heartwood of *Robinia pseudoacacia*. *Phytochem* 12: 975-977

Ito M, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Yamada T (1997) Molecular evolution and functional relevance of the chalcone synthase genes of pea. *Mol Gen Genet* 255: 28-37

Joos HJ, Hahlbrock K (1992) Phenylalanine ammonia-lyase in potato (*Solanum tuberosum* L.). Genomic complexity, structural comparison of two selected genes and modes of expression. *Eur J Biochem* 204: 621-629

Jorin J, Dixon RA (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.) II. Purification, characterization, and induction of Phenylalanine Ammonia-Lyase isoforms from elicitor-treated cell suspension cultures. *Plant Physiol* 92: 447-455

Junghans H, Dalkin K, Dixon RA (1993) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 15. Characterization and expression patterns of members of a subset of the chalcone synthase multigene family. *Plant Mol Biol* 22: 239-253.

Kainz P (2000) The PCR plateau phase – towards an understanding of its limitations. *Biochim Biophys Acta* 1494: 23-27

Kao YY, Harding SA, Tsai CJ (2002) Differential expression of two distinct Phenylalanine Ammonia-Lyase genes in condensed tannin-accumulating and lignifying cells of quaking aspen. *Plant Physiol* 130: 796-807

Kemp MS, Burden RS (1986) Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. *Phytochem* 25: 1261-1269

Kim Br, Nam HY, Kim SU, Kim SI, Chang YJ (2003) Normalization of reverse transcription quantitative-PCR with housekeeping genes in rice. *Biotechnol Lett* 25: 1869-1872

Koch G, Bauch J, Puls J, Schwab E, Welling J (2000) Holzverfärbungen der Rotbuche (*Fagus sylvatica* L.) und Möglichkeiten vorbeugender Maßnahmen. *Holz-Zentralblatt* 126: 74-75

Koch G (2004) Biologische und chemische Untersuchungen über Inhaltsstoffe im Holzgewebe von Buche (*Fagus sylvatica* L.) und Kirschbaum (*Prunus serotina* Borkh.) und deren Bedeutung für Holzverfärbungen. Hamburg: Max Wiedebusch Kommiss.-Verl. 2004, 84 S. = Mitt. Bundesforschungsanst. Forst- Holzwirtsch., Nr. 216

Koes RE, Spelt CE, van den Elzen PJM, Mol JNM (1989) Cloning and molecular characterization of the chalcone synthase multigene family of *Petunia hybrida*. *Gene* 81: 245-257.

Koonjul PK, Brandt WF, Farrant JM, Lindsey GG (1999) Inclusion of polyvinylpyrrolidone in the polymerase chain reaction reverses the inhibitory effects of polyphenolic contamination of RNA. *Nucl Acids Res* 27: 915-916

Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpää P, Laakso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S, Teeri TH (2007) Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Mol Biol* 65: 311-328

Kreuzaler F, Ragg H, Heller W, Tesch R, Witt I, Hammer D, Hahlbrock K (1979) Flavanone synthase from *Petroselinum hortense* – Molecular weight, subunit composition, size of messenger RNA, and absence of pantetheinyl residue. *Eur J Biochem* 99: 89-96

- Krokene P, Solheim H, Krekling T, Chrstiansen E (2003) Inducible anatomical defense responses in Norway spruce stems and their possible role in induced resistance. *Tree Physiol* 23: 191-197
- Kuhn DN, Chappell J, Boudet A, Hahlbrock K (1984) Induction of phenylalanine ammonia-lyase and 4-coumarate: CoA ligase mRNAs in cultured plant cells by UV light or fungal elicitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 1102-1106
- Kumar A, Ellis BE (2001) The Phenylalanine Ammonia-Lyase gene family in raspberry. Structure, expression, and evolution. *Plant Physiol* 127: 230-239
- Lawton MA, Lamb CJ (1987) Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding, and infection. *Mol Cell Biol* 7: 335-341
- Liang X, Dron M, Cramer CL, Dixon RA, Lamb CJ (1989) Differential regulation of Phenylalanine Ammonia-Lyase genes during plant development and by environmental cues. *J Biol Chem* 264: 14486-14492
- Liese W, Dujesiefken D (1989) Wundreaktionen bei Laubbäumen. Tagungsbericht, 2. Symposium, Ausgewählte Probleme der Gehölzphysiologie - Gehölze, Mikroorganismen und Umwelt, Tharandt, 13. – 16. Juni. 75-80
- Lin Q, Northcote DH (1990) Expression of Phenylalanine Ammonia-Lyase gene during tracheary-element differentiation from cultured mesophyll cells of *Zinnia elegans* L. *Planta* 182: 591-598.
- Liu W, Saint DA (2002) Validation of a quantitative method for real time PCR kinetics. *Biochem Biophys Res Comm* 294: 347-353
- Liu R, Ye M, Guo H, Bi K, Guo D (2005) Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. *Rapid Commun Mass Spectrom* 19: 1557-1565
- Logemann E, Parniske M, Hahlbrock K (1995) Modes of expression and common structural features of the complete phenylalanine ammonia-lyase gene family in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 5905-5909

Magel EA, Drouet A, Claudot AC, Ziegler H (1991) Formation of heartwood substances in the stem of *Robinia pseudoacacia* L. I. Distribution of phenylalanine ammonium lyase and chalcone synthase across the trunk. *Trees* 5: 203-207

Magel EA, Höll W, Ziegler H (1992) Radial distribution of pyridine nucleotides in the trunk of hardwoods and its relation to heartwood formation. *Plant Physiol Suppl* 148 (No.891)

Magel EA, Jay-Allemand C, Ziegler H (1994) Formation of heartwood substances in the stemwood of *Robinia pseudoacacia* L. II. Distribution of non-structural carbohydrates and wood extractives across the trunk. *Trees* 8: 165-171

Magel EA, Hübner B (1997) Distribution of phenylalanine ammonia-lyase (*PAL*) and chalcone synthase (*CHS*) within trunks of *Robinia pseudoacacia* L.. *Bot Acta*, 110: 314-322

Magel EA (2000) Biochemistry and physiology of heartwood formation. Aus: Savidge R, Barnett J, Napier R (ed.): *Cell and Molecular Biology of Wood Formation*. BIOS Scientific Publishers, Oxford, ISBN 1 85996 123 1

Magel EA, Hillinger C, Wagner T, Höll W (2001) Oxidative pentose phosphate pathway and pyridine nucleotides in relation to heartwood formation in *Robinia pseudoacacia* L. *Phytochem* 57: 1061-1068

Marone M, Mozzetti S, De Ritis D, Pierelli L, Scambia G (2001) Semiquantitative RT-PCR analysis to assess the expression levels of multiple transcripts from the same sample. *Biol Proced Online* 3: 19-25

Martin CR (1993) Structure, function and regulation of the chalcone synthase. *Int Rev Cytol* 147: 233-284

Mazumder B, Seshadri V, Fox PL (2003) Translational control by the 30-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28: 91-98

Melcher E, Jüngel P, Möllendorf B, Schmitt U (2003) Identification of a hydroxy substituted calamenene – a sesquiterpene associated with wound reactions in non-infected xylem of *Tilia* spp. *Phytochem* 62: 707-713

Mizuno M, Tanaka T, Katsuragawa M, Saito H, Iinuma M (1990) A new pterocarpan from the heartwood of *Cladrastis platycarpa*. *J Nat Prod* 53: 498-499

Müller HJ (2001) PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Spektr Akad Verl Heidelberg, Berlin

Nagy NE, Fossdal CG, Krokene P, Krekling T, Lonneborg A, Solheim H (2004) Induced responses to pathogen infection in Norway spruce phloem: changes in polyphenolic parenchyma cells, chalcone synthase transcript levels and peroxidase activity. *Tree Physiol* 24: 505-515

Nagy NE, Krokene P, Solheim H (2006) Anatomical-based defense responses of Scots pine (*Pinus sylvestris*) stems to two fungal pathogens. *Tree Physiol* 26: 159-167

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot.* 56: 2907-2914

Nobuchi T, Sato T, Iwata R, Harada H (1984) Season of heartwood formation and the related cytological structure of ray parenchyma cells in *Robinia pseudoacacia* L. *Mokuzai Gakkaishi* 30: 628-636

Nowak MA, Boerlijst MC, Cooke J, Smith Jm (1997) Evolution of genetic redundancy. *Nature* 388: 167-171

Olbrich M, Gerstner E, Welzl G, Fleischmann F, Oßwald W, Bahnweg G, Ernst D (2008) Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in European Beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. *Z Naturforsch* 63c: 574-582

Pearce (1996) Antimicrobial defences in the wood of living trees. *New Phytol* 132: 203-233

Pearce RB, Edwards PP, Green TL, Anderson PA, Fisher PJ, Carpenter TA, Hall LD (1997) Immobilized long-lived free radicals at the host-pathogen interface in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.). *Physiol Mol Plant Pathol* 50: 371-390

Pearce RB (2000) Decay development and its restriction in trees. *J Arboricult* 26: 1-10

Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl. Acids Res.* 9: 2002-2007

Putman LJ, Laks PE, Pruner MS (1989) Chemical constituents of black locust bark and their biocidal activity. *Holzforschung* 43: 219-224

Richter HG, Waitkus C (2001) Die Robinie und ihr Holz. Merkblatt: Eigenverlag Bundesforschungsanst. Forst-Holzwirtsch. Hamburg

Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellul Microbiol* 6: 795-803

Roux DG, Paulus E (1962) Condensed tannins. 13. Interrelationships of flavonoid components from the heartwood of *Robinia pseudoacacia*. *Biochem J* 82: 324-330

Ryder TB, Hedrick SA, Bell JN, Liang X, Clouse SD, Lamb CJ (1987) Organization and differential activation of a gene family encoding the plant defense enzyme chalcone synthase in *Phaseolus vulgaris*. *Mol Gen Genet* 210: 219-233

Sambrook J, Russell W (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd. edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Scheffer TC, Cowling EB (1966) Natural resistance of wood to microbial deterioration. *Annu Rev Phytopathol* 4: 147-168

Scheidemann P, Wetzel A (1997) Identification and characterization of flavonoids in the root exudate of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* 11: 316-321

Schmitt U, Liese W (1993) Response of xylem parenchyma by suberization in some hardwoods after mechanical injury. *Trees* 8: 23-30

Schmitt U, Liese W (1994) Wound tyloses in *Robinia pseudoacacia* L. *IAWA J* 15: 157-160

Schütt P (2006) *Robinia pseudoacacia* L. In: Schütt, Weisgerber, Schuck, Lang, Stimm, Roloff (Hrsg.), *Enzyklopädie der Laubbäume* (Sonderausgabe 2006). Nikol Verlagsgesellschaft mbH & Co. KG, Hamburg

Schwarze FWMR, Fink S, Deflorio G (2003) Resistance of parenchyma cells in wood to degradation by brown rot fungi. *Mycol Progr* 2: 267-274

Senda M, Masuta C, Ohnishi S, Goto K, Kasai A, Sano T, Hong JS, MacFarlane S (2004) Patterning of virus-infected *Glycine max* seed coat is associated with suppression of endogenous silencing of chalcone synthase genes. *Plant Cell* 16: 807-818

Shigo AL, Shortle W, Garrett PW (1977) Genetic control suggested in compartmentalization of discolored wood associated with tree wounds. *Forest Sci* 23: 179-182

Shigo AL, Marx H (1977) Compartmentalization of decay in trees. U.S. Department of Agriculture, Forest Service. *Agricult. Inform. Bulletin No. 405*

Shigo AL (1979) Tree decay – an expanded concept. *USDA Forest Service Agriculture Information Bulletin No. 419*, 73 pp.

Shigo AL (1984) Compartmentalization: a conceptual framework for understanding how trees grow and defend themselves. *Ann Rev Phytopathol* 22: 189-214

Simpson CG, Sawbridge TI, Jenkins GI, Brown JWS (1992) Expression analysis of multigene families by RT-PCR. *Nucl Acids Res* 20: 5861-5862

Smith AL, Campbell CL, Diwakar MP, Hanover JW, Miller RO (1989) Extracts from black locust as wood preservatives: A comparison of the methanol extract with pentachlorophenol and chromated copper arsenate. *Holzforschung* 43: 421-423

Spicer R, Holbrook NM (2007) Parenchyma cell respiration and survival in secondary xylem: does metabolic activity decline with cell age? *Plant Cell Environ* 30: 934-943

Staub U, Polivka H, Gross HJ (1995) Two rapid microscale procedures for isolation of total RNA from leaves rich in polyphenols and polysaccharides: application for sensitive detection of grapevine viroids. *J Virol Methods* 52: 209-218

Stürzenbaum SR, Kille P (2001) Control genes in quantitative molecular biological techniques: the variability of invariance. *Comp Biochem Physiol, B: Biochem Mol Biol* 130: 281 - 289

Todd JJ, Vodkin LO (1996) Duplications that suppress and deletions that restore expression from a chalcone synthase multigene family. *Plant Cell* 8: 687-699

Tautz D (1992) Redundancies, development and the flow of information. *BioEssays* 14: 263-266

Tuteja JH, Clough SJ, Chan WC, Vodkin LO (2004) Tissue-specific gene silencing by a naturally occurring chalcone synthase gene cluster in *Glycine max*. *Plant Cell* 16: 819-835

Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G, Panopoulos N (2007) Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J* 2: 1214-1234

Wagner A (1996) Genetic redundancy caused by gene duplications and its evolution in networks of transcriptional regulators. *Biol Cybern* 74: 557-567

Wanner LA, Li G, Ware D, Somssich IE, Davis KR (1995) The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 27: 327-338

Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ (1988) Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiol* 87: 206-210

Wingender R, Röhrig H, Hörnicke C, Wing D, Schell J (1989) Differential regulation of soybean chalcone synthase genes in plant defence, symbiosis and upon environmental stimuli. *Mol Gen Genet* 218: 315-322

Yamada T, Tanaka Y, Sriprasertsak P, Kato H, Hashimoto T, Kawamata S, Ichinose Y, Kato H, Shiraishi T, Oku H (1992) Phenylalanine Ammonia-Lyase Genes from *Pisum sativum*: Structure, Organ-Specific Expression and Regulation by Fungal Elicitor and Suppressor. *Plant Cell Physiol* 33: 715-725

Yang J, Park S, Kamdem DP, Keathley DE, Retzel E, Paule C, Kapur V, Han KH (2003) Novel gene expression profiles define the metabolic and physiological processes characteristic of wood and its extractive formation in a hardwood tree species, *Robinia pseudoacacia*. *Plant Mol Biol* 52: 935-956

Yang J, Kamdem DP, Keathley DE, Han KH (2004) Seasonal changes in gene expression at the sapwood-heartwood transition zone of black locust (*Robinia pseudoacacia*) revealed by cDNA microarray analysis. *Tree Physiol* 24: 461-474

Zabala G, Zou J, Tuteja J, Gonzales DO, Clough SJ, Vodkin LO (2006) Transcriptome changes in the phenylpropanoid pathway of Glycine max in response to pseudomonas infection. BMC Plant Biol 6:26

Ziegler H (1968) Biological aspects of heartwood formation. Holz Roh-Werkst 26: 61-68

7. Abkürzungen

3'-UTR –	3' untranslated region (3' nicht translatierte Region)
5'-UTR –	5' untranslated region (5' nicht translatierte Region)
AP –	Anchor Primer
B –	Borke
Ba –	Bast
BI –	Bandenintensität
BLAST –	Basic Local Alignment Search Tool
bp –	base pairs (Basenpaare)
cDNA –	complementary DNA (komplementäre DNA)
cds –	coding sequence (codierende Region)
CHS –	Chalkonsynthase
D –	Degenerierung
d _{ai} –	days after inoculation (Tage nach Inokulation)
degen. –	degeneriert
deion. –	deionisiert
DEPC –	Diethylpyrocarbonat
DNA –	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNase –	Desoxyribonuklease
dNTP –	Desoxyribonukleosidtriphosphat [dNTPs' steht für ein Gemisch aus den Nukleotiden dATP, dTTP, dGTP und dCTP, entsprechend den Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C)]
dsDNA –	doppelsträngige DNA
DTT –	Dithiothreitol
DX –	differenzierendes Xylem
EDTA –	Ethylendiamintetracetat
EST –	expressed sequence tag (= transkribierte Nukleotidsequenzen)
EW –	early wood (Frühholz)
F –	Fluoreszenz
GSP –	genspezifischer Primer
HW –	heartwood (Kernholz)
IPC –	interplate control (Kontrollreaktionen zur Kalibrierung von PCR-Einzelläufen)
IS –	inneres Splintholz
IUPAC –	International Union of Pure and Applied Chemistry (Internationale Union für reine und angewandte Chemie)
kb –	Kilobasen (= 1000 bp)
LB –	Luria-Bertani
Leu –	Leucin
MCS –	multiple cloning site (Multipler Klonierungsbereich)
MOPS –	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA –	messenger RNA (Boten-RNA)
MS –	mittleres Splintholz
NRQ –	normalisierte relative Quantität
OD –	optische Dichte
oPPZ –	oxidativer Pentose-Phosphat-Zyklus
ORF –	Open reading frame (offenes Leseraster)
OS –	outer sapwood (äußeres Splintholz)
PAL –	Phenylalanin-Ammonium-Lyase
pers. Mitt. –	persönliche Mitteilung
PCR –	Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
pI –	isoelektrischer Punkt
pkat –	picokatal (1 katal = 1 mol s ⁻¹)

PPS –	Phenylpropanstoffwechsel
R –	Ratio (prozentuale Bandenintensität)
RACE –	rapid amplification of cDNA ends
Ref. –	Referenzen
RNA –	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA –	ribosomale RNA
RT –	Reverse Transkription
rz –	reaction zone (Reaktionszone)
SDS –	sodium dodecylsulfate (Natriumdodecylsulfat)
T _a –	Annealing-Temperatur [°C]
T _m –	Schmelztemperatur [°C]
TAE –	Tris, Acetat, EDTA
Tris –	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZ –	transition zone (Splint-Kern-Übergangszone)
tz –	transition zone (Übergangszone zwischen gesundem Splintholz und Reaktionszone)
U –	units (Enzymaktivitätseinheit: 1 U entspricht einer Umsetzung von 1 µmol Substrat pro Minute unter Standardbedingungen. Standardbedingungen werden für jedes Enzym individuell definiert)
U/min –	Umdrehungen pro Minute
Val –	Valin
VF –	Verdünnungsfaktor
vgl. –	vergleiche
vs. –	<i>versus</i>
X-Gal –	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

8. Anhang

Tabelle A1 – Programme, die für die Verarbeitung und Analyse von DNA-, bzw. Aminosäuresequenzen verwendet wurden.

Zweck	Software / Tool	Zugang / Internetpräsenz / Quelle
Multiple Sequenz-Alignments	ClustalX (Freeware)	http://bips.u-strasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/
Überprüfung von Primer-Wechselwirkungen	Primer Premier 5 (Demo-Version)	www.premierbiosoft.com/
Invertierung und Komplementierung von DNA-Sequenzen	WinGene (Freeware)	http://n.ethz.ch/student/lhennig/wingene.html
Darstellung von Sequenzierkurven	ChromasLite 2.01 (Freeware)	www.technelysium.com.au
Editierung von multiplen Sequenz-Alignments	GeneDoc	www.nrbsc.org/gfx/genedoc/index.html
Textverarbeitung	Microsoft Word	Microsoft
Paarweises Alignment zweier DNA-Sequenzen	BLAST 2 SEQUENCES	National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi
<i>GenBank</i> Datenbankabgleich	BLASTN	National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov
Berechnung von pI-Werten und Molekulargewichten von Aminosäuresequenzen	ExPASy Compute pI/MW Tool	Expert Protein Analysis System des Swiss Institute of Bioinformatics www.expasy.org/tools/pi_tool.html
6-Phasen-Translatierung von DNA-Sequenzen	ExPASy Translate Tool	Expert Protein Analysis System des Swiss Institute of Bioinformatics www.expasy.org/tools/dann.html
Restriktionsanalysen von DNA-Sequenzen	RestrictionMapper	www.restrictionmapper.org/
Densitometrie	Quantity One v.4.5	BIO-RAD Laboratories GmbH, München

Tabelle A2 – Für Design degenerierter Primer herangezogene *CHS*- und *PAL*-Gensequenzen aus Leguminosen

<i>CHS</i>		<i>PAL</i>	
Spezies	GenBank Accession	Spezies	GenBank Accession
<i>Glycine max</i>	X54644	<i>Astragalus membranaceus</i>	AY986506
<i>Glycine max</i>	X53958	<i>Glycine max</i>	X52953
<i>Glycine max</i>	X65636	<i>Glycine max</i>	S46989
<i>Glycine max</i>	X52097	<i>Medicago sativa</i>	X58180
<i>Glycine max</i>	L07647	<i>Phaseolus vulgaris</i>	E04043
<i>Glycine max</i>	L03352	<i>Phaseolus vulgaris</i>	M11939
<i>Glycine max</i>	AY237728	<i>Pisum sativum</i>	E04042
<i>Glycine max</i>	S46989	<i>Pisum sativum</i>	D10001
<i>Glycine max</i>	M98871	<i>Pisum sativum</i>	D10002
<i>Medicago sativa</i>	X68107	<i>Pisum sativum</i>	D10003
<i>Medicago sativa</i>	X68106	<i>Trifolium subterraneum</i>	M91192
<i>Medicago sativa</i>	DQ122840		
<i>Pisum sativum</i>	X80007		
<i>Pisum sativum</i>	D10661		
<i>Pisum sativum</i>	D88260		
<i>Pisum sativum</i>	D88261		
<i>Pisum sativum</i>	D88262		
<i>Pisum sativum</i>	X63333		
<i>Pisum sativum</i>	X63334		
<i>Pisum sativum</i>	X63335		
<i>Trifolium subterraneum</i>	L24515		
<i>Trifolium subterraneum</i>	L24517		
<i>Trifolium subterraneum</i>	M91193		
<i>Trifolium subterraneum</i>	M91194		
<i>Trifolium subterraneum</i>	M91195		
<i>Vigna unguiculata</i>	X74821		

```

D88262  -A-----G-----A-----T-C-A----- 1007
D88260  -A-----C-----A-----T-C-A----- 832
D88261  -A-----C-----A-----T-C-A----- 1270
X68106  -A-----AT-----T-----G-----A----- 412
L24515  -C-----T-A-----A-----T-----T 1058
M91194  -A-----G-----A-----A-G-----T 1724
X63333  -C-----C-----C-C-----G-----C----- 361
D10661  -C-----C-----C-C-----G-----C----- 2000
X63334  -A-----C-----T-----C-C-----G-----A----- 405
X63335  -A-----C-----T-----C-C-----G-----A----- 361
M91193  -A-----A-----T-----A-----A-G-----C-C 1643
L24517  -A-----A-----G-----T-----A-----C-C 1051
M91195  -C-----T-----A-----A-----C-C-----C-C 1040
X74821  -A-CA-G--CT-----T-----A--A--GT--A-----C 446
X52097  -C-----C--T-----G-----TA-G-----A-AGT-G-A--ACT--A-C 1332
L07647  -C-----C--T-----G-----TA-G-----A-AGT-G-A--ACT--A-C 1040
X65636  -G-----C--T-----T-----G-----A-AGT-G-A--ACT--A-C 1212
X53958  -G-----CT-----G-----T-----G-----A-AGT-G-A--ACT--A-C 699
X54644  -G-----CT-----G-----T-----G-----A-AGT-G-A--ACT--A-C 626
X80007  -T-G-----G-----A--G--T-----T-G-A--G--A--ACA--C 1491
AY237728 -A-ACA-G--CT-----T-----T-----A-AG-----A--C 1647
M98871  -A-ACA-G--CT-----T-----T-----A-AG-----A--C 1584
S46989  -A-ACA-G--CT-----T-----T-----A-AG-----A--C 168
L03352  -A-----CC--T--A-----T-G-----A-AGT-G-A--ACA--A-C 1633
GAGAACTAGTGTGGAATACATGGCACCTTCATTGGATGCAAGGCAAGCATGGTGGTGGTAGAGGTACCTAGACTAGGAAAGAGGCTGCAGTGAAGGTATA

```

Primer F1 GGATGCDAGGCAAGACATGG

Primer F5 GGCACCTTCDTTGGATGCAAG

Abbildung A1 (1) – Multiples Sequenzalignment von *CHS*-Genen aus verschiedenen Leguminosen. Abgebildet sind zum Alignment zusammengestellte Teilschnitte der *cds* von *CHS*-Genen aus Leguminosen (vgl. Tab. A2, S. 152). Unterhalb ist die Consensus-Sequenz (CS) aufgeführt, Übereinstimmungen mit der CS sind durch Bindestriche und Lücken durch Sterne symbolisiert. Lage und Sequenz der degenerierten Forward- und Reverse Primer sind unterhalb der Alignments aufgeführt (vgl. Tab. A1, S. 151), die Primer-Bindungsstellen sind in der CS fett gedruckt und/oder unterstrichen.

D88262	-----C-----A-----T-----T-----A-----T-----T-G-----	1115
D88260	-----A-----A-----T-----T-----A-----T-----T-G-----	940
D88261	-----C-----A-----C-----T-----T-----A-----T-----T-G-----	1378
X68106	-----G-----G-----A-----G-----A-----A-----A-----	520
L24515	-----A-T-----A-----T-----A-----G-----A-----A-----	1166
M91194	-----A-----A-----T-----T-----A-----T-----T-A-----	1832
X63333	-----G-----A-C-----A-C-----C-A-C-----C-A-C-----	469
D10661	-----G-----A-C-----A-C-----C-A-C-----C-A-C-----	2108
X63334	-----G-----A-C-----A-C-----C-A-C-----C-A-C-----	513
X63335	-----G-----A-C-----A-C-----T-----C-A-C-----C-A-C-----	469
M91193	-----C-----A-T-----A-T-----T-----T-----T-----A-----G-----	1751
L24517	-----C-----A-T-----A-T-----T-----T-----T-----A-----	1159
M91195	-----C-----A-T-----A-T-----T-----T-----T-----A-----	1148
X74821	-----G-G-----A-----A-----C-----C-----C-T-----C-T-A-----	554
X52097	-----G-----C-----C-----TC-C-----T-----T-----T-G-----T-A-----	1440
L07647	-----G-----C-----C-----TC-C-----T-----T-----T-G-----T-A-----	1148
X65636	-----G-----C-----C-----TC-C-T-----C-C-----C-----T-----AC-G-----	1320
X53958	-----G-----C-----C-----TC-C-----T-----T-----C-----T-----A-----	807
X54644	-----G-----C-----C-----TC-C-----T-----T-----C-----T-----A-----	734
X80007	-----G-----G-----T-----T-----G-----T-----G-----C-T-----G-----	1599
AY237728	-----G-G-----C-G-----C-----C-----C-----T-----G-----AA-G-----	1755
M98871	-----G-G-----C-G-----C-----C-----C-----T-C-----G-----AA-G-----	1692
S46989	-----G-G-----C-G-----C-----C-----C-----T-C-----G-----AA-G-----	276
L03352	-----G-----C-----C-----TC-C-----T-----T-----T-----G-----GC-----	1741
	AAAGAA TGGGGTCAACCAAGTCAAAGATTACTCACTTGTGATCTTTTGCACCAACAGTGGTGTAGACATGCTGGTGTGATTACCAACTCACCAAACTCTTAGGTCTT	

Abbildung A1 (2) – Multiples Sequenzalignment von *CHS*-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1).

D88262	---	A---	T---	T---	-----	A-----	-----	1223
D88260	---	A---	T---	T---	-----	A-----	-----	1048
D88261	---	A---	T---	T---	-----	A-----	-----	1486
X68106	---	A---	T---	A---	-----	T-A-T---	-----	628
L24515	---	A---	T---	G---	-----	T-A-T-A-C-	-----	1274
M91194	---	G-C-A-	T---	A---	-----	T-A-T---	-----	1940
X63333	---	A---	T---	G---	-----	T-A-C-	-----	577
D10661	---	A---	T---	G---	-----	T-A-C-	-----	2216
X63334	---	A---	T---	G---	-----	T-T-C-	-----	621
X63335	-T-	G-T---	C---	G---	-----	T-T-A-C-	-----	577
M91193	---	A---	T---	G---	-----	A-T---	-----	1859
L24517	---	G-T-	C-T-	G---	-----	T-T-C-	-----	1267
M91195	---	A---	T---	C---	-----	T-A-T---	-----	1256
X74821	---	C---	T---	A---	-----	T-T---	-----	662
X52097	-T-	C-C-	C-T-	C---	-----	A-C-C-	-----	1548
L07647	-T-	C-C-	C-T-	C---	-----	A-C-C-	-----	1256
X65636	-T-	C-C-	C-T-	C---	-----	A-C-C-	-----	1428
X53958	---	C-C-	C-T-	C---	-----	A-C-C-	-----	915
X54644	---	C-C-	C-T-	C---	-----	A-C-C-	-----	842
X80007	-T-	G---	T---	T---	-----	T-A-T---	-----	1707
AY237728	---	C---	T---	T---	-----	T-T---	-----	1863
M98871	---	T---	T---	T---	-----	T-T---	-----	1800
S46989	---	T---	T---	T---	-----	T-T---	-----	384
L03352	-T-	C-C-	C-T-	C---	-----	T-T-G-A-	-----	1849
	CGCCCATATGTGAAGAGG	TACATGAT	GTACCAA	CAAGG	TTGCTTTGCAGGTGGCACGGTGTTCGTTTTGGCCCAAGGACTTGGCTGAGAACAA	CAAGGGTCTCGTGTG		

Primer FA TAYATGATGTAYCAACAAGG

Abbildung A1 (3) – Multiples Sequenzalignment von *CHS*-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1)

D88262	T-A-----G-----C-T-----C-----C-----A---	1331
D88260	T-G-----C-----C-T-----C-----A---	1156
D88261	T-G-----C-----C-T-----C-----A---	1594
X68106	T-G-----T-----T-----C-----A-G	736
L24515	T-G-----A-C-----T-----C-----1382	
M91194	T-C-----C-T-T-----T-A-----T	2048
X63333	T-G-----G-----T-----C-T-----A-T	685
D10661	T-G-----G-----T-----C-T-----A-T	2324
X63334	-A-A-C-----T-C-G-----G-----A---A-T	729
X63335	T-G-----C-G-T-----T-----C-----A-T	685
M91193	T-----T-----A-T-C-----T-----G---1967	
L24517	T-----T-----T-----C-----1375	
M91195	-A-C-G-----T-C-----T-----T-----T	1364
X74821	-C-G-----GA-----C-T-----C-A-----G-T	-A-AG-G
X52097	-C-----GA-----C-----C-----C-TC-T-T-C	-G-T-C-G-T-A-C-G-
L07647	-C-----GA-----C-----C-----C-TC-T-T-C	-G-T-C-G-T-A-C-G-
X65636	-G-----GA-----G-----C-----C-TC-T-T-C	-G-T-C-G-T-A-C-G-
X53958	-C-----GA-----C-----C-----C-TC-T-T-C	-G-T-C-G-T-A-C-G-
X54644	-C-----GA-----C-----C-----C-TC-T-T-C	-G-T-C-G-T-A-C-G-
X80007	T-G-----GA-----T-----G-----G-----C	-G-G-G-G-G-G-G-1815
AY237728	-C-----GA-----A-----C-T-T-----G-C	-G-T-A-C-G-1971
M98871	-C-C-----GA-----G-----C-T-T-----G-C	-G-T-A-C-G-1908
S46989	-C-C-----GA-----G-----C-T-T-----G-C	-G-T-A-C-G-492
L03352	-C-C-----A-GA-----A-----T-C-T-T-C	-G-T-A-C-G-1957
CTTGTGTTTGTGAACTGACATCCAGTCCGTTGGCCCAAGTGCACACTCACTTGGACAGTCTTGTGGACAAAGCATTATTTGGAGATGGAGCTGCTCTC		

Primer R3 (3'-5') CAS

Abbildung A1 (4) – Multiples Sequenzalignement von CHS-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1).

```

D88262      T-A-----G-----T-T-----A-----A-----A-----1439
D88260      T-C-----T-----T-T-----A-----A-----A-----1264
D88261      T-C-----C-----T-----T-----A-----A-----A-----1702
X68106      A-T-----G-----T-----T-----T-----T-----844
L24515      T-----G-----A-----T-----A-----T-----T-----1490
M91194      T-----G-----A-----A-----T-----T-----T-----2156
X63333      T-----G-----A-----A-----T-----T-----T-----793
D10661      T-----G-----G-----T-----T-----T-----T-----2432
X63334      T-----G-----A-----A-----A-----T-----T-----C-----837
X63335      TC-----T-----T-----C-----C-----T-----T-----T-----793
M91193      T-----G-----A-----A-----T-----G-----T-----T-----2075
L24517      T-----G-----G-----A-----T-----T-----T-----T-----1483
M91195      T-----G-----G-----A-----T-----T-----T-----T-----1472
X74821      A-T-----C-G-----G-AT-G-----AC-T-----G-C-----T-----T-----878
X52097      A-A-----CT-----**-----G-T-G-----C-C-T-C-----C-G-----CCT-----G-T-----A-----1761
L07647      A-A-----CT-----**-----G-T-G-----C-C-T-C-----C-G-----CCT-----G-T-----A-----1469
X65636      A-A-----CT-----**-----G-T-G-----C-C-T-C-----C-G-----CCT-----G-T-----C-----1641
X53958      A-A-----CT-----**-----G-T-G-----C-C-T-C-----C-G-----CCT-----G-T-----A-----1128
X54644      A-A-----CT-----**-----G-T-G-----C-C-T-C-----C-G-----CCT-----G-T-----A-----1055
X80007      A-----GT-----CG-----G-G-----T-G-----AT-----A-----T-----T-----T-----C-----1923
AY237728   A-T-----C-G-----G-G-----T-G-A-----C-T-----T-----T-----A-----2079
M98871      A-T-----C-G-----G-G-----T-G-A-----C-T-----T-----T-----A-----2016
S46989      A-T-----C-G-----G-G-----T-G-A-----C-T-----T-----T-----A-----600
L03352      A-A-----**TTGCTGC-----G-T-G-----C-T-----G-----CCTG-----G-T-----C-----2062
ATTGTTGGTTCTGACCAGTACCAGAAAATTGAAAAACCTATATTTGAGATGGTTGGACTGCACAAACAATGTCTCCAGACAGTGAAGGAGCCATTGATGGTCACCTT
R3  TAACAACCWAGWCTGGG

```

Abbildung A1 (5) – Multiples Sequenzalignment von *CHS*-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1).

D88262	-----G-----C-----CA-----A-----A-----T-----T-----T-----	1547
D88260	-----G-----C-----CA-----A-----A-----T-----T-----T-----	1372
D88261	-----G-----C-----CA-----A-----A-----T-----T-----T-----	1810
X68106	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	952
L24515	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	1598
M91194	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	2264
X63333	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	901
D10661	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	2540
X63334	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	945
X63335	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	901
M91193	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	2183
L24517	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	1591
M91195	-----C-----A-----C-----T-----CA-----TG-----T-----	1580
X74821	-----T-----C-----T-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	986
X52097	-----C-----T-----T-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	1869
L07647	-----T-----T-----C-----T-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	1577
X65636	-----A-----T-----C-----T-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	1749
X53958	-----G-----C-----T-----T-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	1236
X54644	-----C-----T-----T-----C-----T-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	1163
X80007	-----G-----T-----G-----G-----G-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	2031
AY237728	-----G-----T-----G-----G-----G-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	2187
M98871	-----T-----T-----C-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	2124
S46989	-----T-----T-----C-----C-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	708
L03352	-----C-----TA-----C-----T-----C-----G-----G-----G-----C-----TTC-----C-----G-----T-----AAC-----	2170
CGTGAAGCTGGACTAACATTTTCATCTTTAAAGATGTTCCCTGGGATTGTCCTCAAGAGACATTGATAAGCATTTGGTTGAGGCTTTCCAAACCATTGGGAATCTCTGAT		

Abbildung A1 (6) – Multiples Sequenzalignment von CHS-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1).

```

D88262      -----C-T-T-A-----CT-----A-----1655
D88260      -----C-T-T-A-----CT-----A-----1480
D88261      -----C-T-T-A-----CT-----A-----1918
X68106      -----T-T-A-----C-A-----C-----1060
L24515      -----A-T-----A-A-G-C-C-----A-T-----A-C 1706
M91194      -----T-A-T-----A-A-----C-C-----G-A-T-----T 2372
X63333      -----T-T-T-C-----G-----G-----G-A-A 1009
D10661      -----T-T-T-C-----G-----G-----G-A-A 2648
X63334      -----T-----G-A-----C-----G-----G-A-A 1053
X63335      -----T-T-C-----G-----A-----A-----A-G-A 1009
M91193      -----T-T-A-----T-A-A-----TC-----G-----A 2291
L24517      -----T-A-----A-----G-C-A-----G-----A 1699
M91195      -----T-T-A-----T-----CT-----A-----G-----T 1688
X74821      -----C-----G-----CA-----G-TC-A-A-----C-----T 1094
X52097      -----T-T-CA-----T-G-----G-GCT-----A-G-A-T-----GC 1977
L07647      -----T-T-C-----C-----T-G-----G-GCT-----A-G-A-T-----GC 1685
X65636      -----T-T-C-----G-----T-----C-----GCT-----A-G-A-T-----C 1857
X53958      -----T-T-C-----C-----T-G-----GCT-----A-G-A-T-----C 1344
X54644      -----T-T-C-----C-----T-G-----GCT-----C-----G-A-T-----C 1271
X80007      -----T-T-C-----A-----AGCC-A-----AGAGG-A-----C-A-----C 2139
AY237728   -----C-----G-----T-----TC-C-A-----G-----C-----A 2295
M98871      -----C-----G-----G-----T-----G-TC-C-A-----G-----C-----A 2232
S46989      -----C-----G-----G-----T-----G-TC-C-A-----G-----C-----A 816
L03352      -----T-----A-----AT-G-----GCT-----A-----A-G-A-T-----C 2278
TACAACCAATCTTTTGGATTGCACACCCTGGACCTGCAATTCTAGACCAAAGTTGAGCAAAAGTTAGGCTTGAAGCCTGAAAAGATGAAGGCCACTAGAGATGTG

```

```

Primer RA (3'-5')  GAARWCCTAACCGWTRGG
Primer R1 (3'-5')  GAAAAACCTAACGTTGGGRC

```

Abbildung A1 (7) – Multiples Sequenzalignment von CHS-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1).

X58180	-----T-GG-----G-----A-----C-----A-----	1308
D10003	-----T-----T-----T-----	3383
D10002	-----T-----T-----T-----	3266
D10001	-----T-----T-----T-----	1262
E04042	-----T-----T-----T-----	1490
M91192	-----T-G-----T-----A-C-----T-----A-----	2189
X52953	-----G-----C-T-----A-----A-----G-----G-----A-----	2883
E04043	-----C-----C-T-----C-----T-----C-G-----C-T-----G-----A-----	553
M11939	-----C-----C-T-----C-----T-----C-G-----C-T-----G-----A-----	552
AY986506	-----T-G-----T-A-----T-----A-----C-C-C-----G-----A-----	1328
S46988	-----A-----A-----G-----T-----A-----C-----G-----G-----AC-T-----	285
GTCCCTTTATTGAAGTCATTAGATTCTTACCAAGTCAATTGAGAGGGAGATCAACTCTGTTAATGACAAACCCCTTTGATGATGTTTCAAGAAAACAAGGCTTTGC		
Primer F2 CYAAGTCWATTGAGAGRGAG		
Primer F3 CCCYTKATTGATGTTKTCAAAG		
X58180	-----C-----C-----T-----C-----T-----	1413
D10003	-----T-----T-----G-----T-----A-----C-----	3488
D10002	-----T-----T-----G-----T-----A-----C-----	3371
D10001	-----T-----T-----G-----T-----A-----C-----	1367
E04042	-----T-----T-----G-----T-----A-----C-----	1595
M91192	-----T-----C-----C-----T-----A-----TT-----	2294
X52953	-----C-----T-----C-----C-----T-----A-----T-----C-----	2988
E04043	-----T-----T-----C-----A-----C-----C-----T-----C-----C-----	658
M11939	-----T-----T-----C-----A-----C-----C-----T-----T-----C-----C-----	657
AY986506	-----T-----T-----C-----T-----A-----A-----T-----T-----T-----A-----	1433
S46988	-----T-----T-----C-----T-----C-----T-----T-----T-----T-----T-----	390
ATGGTGGAAACTTTCAAGGAACACCTATTGGAGTATCCATGGATAATACACGTTTGGCTCTTGCATCAATTGGTAAACATCATGTTTGTCAATTTCTCTGAGCTTG		

Abbildung A2 (1) – Multiples Sequenzalignment von PAL-Genen aus Leguminosen. Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1), S. 153.

```

X58180 -T---C-----T---A-----T-----T-----T-----T-----C----- 1518
D10003 -----T-----A-----T-----T-C----- 3593
D10002 -----G-----A-----T-C----- 3476
D10001 -----G-----A-----T-C----- 1472
E04042 -----G-----A-----T-C----- 1700
M91192 -T-----T-----G-----T-----C----- 2399
X52953 -C-----T---A-----C-----T-----C----- 3093
E04043 -C-----TC-----A-----T-----T-----C----- 763
M11939 -C-----TC-----A-----T-----T-----C----- 762
AY986506 -T-----A-----G-----C-----T-----A----- 1538
S46988 -A-----T---T-----A-----C-----C-----G-----A----- 495
TCAATGATTTTACAACACGGGTTGCCTTCAAAATCTCTCTGCTAGTAGAAATCCAGCTTGGATTATGGATTCAAGGGAGCTGAAATTCACATGGCTTCTTATT

X58180 -----G-----G-----C-----G-----***-----G----- 1620
D10003 -----G-----G-----C-----T-----T-----T-----***-----A----- 3695
D10002 -----C-----C-----T-----T-----T-----***-----A----- 3578
D10001 -----C-----C-----T-----T-----T-----***-----A----- 1574
E04042 -----C-----C-----T-----T-----T-----***-----A----- 1805
M91192 -----C-----AC-C-----A-----T-----C-----T-----***-----C-A----- 2501
X52953 -C-----AC-C-----G-----A-----T-----A-----T-----G-----C-----C-----A----- 3195
E04043 -C-----AC-C-----G-----A-----G-----A-----G-----***-----A-----AG----- 865
M11939 -C-----AC-C-----G-----A-----G-----A-----G-----***-----A-----AG----- 864
AY986506 -C-----A-----T---C-----G-----G-----C-----G-----G-----T-----***-----C-----A----- 1640
S46988 -----AC-T-----T-G-G-----G-----G-----C-----G-----C-----G-----C-----G-----A----- 597
GTTCTGAGTTACAAATATCTTTGCAATCCAGTTACAAACCCATGTCCAAAGTGTGAGCAACAACACCAAGATGGAAGTGGGTTGATTTCTTTCTAGGA

Primer R2 GTYCTACASTTRAGARACC
    
```

Abbildung A2 (2) – Multiples Sequenzalignment von PAL-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1), S. 153.

X58180	-----C-----T-----C-----	1725
D10003	-----G-----T-----C-----	3800
D10002	---A---T---G---	3683
D10001	---A---G---	1679
E04042	---A---G---	1910
M91192	-A-----T-----C-----	2606
X52953	-G-----C---A-----G-G---A-----	3300
E04043	-G-----T-T-----G-G---G-G---G---	970
M11939	-G-----T-T-----G-G---G-G---G---	969
AY986506	-G-T-----T-GA---C---T---G-G---A-----A	1745
S46988	-G-TC---G-T-----CA-----C---T---C-G-C-C---G-G---G-G---G---A	702
	AAACAAATGAAAGCCATTGAGATCCTTCAGCTCATGTCTTCCACATTCTTGATTGCACCTTTGCCAAGCAATFGACTTAAGACATTTGGAGGAGAAATTTGAAAAA	

Primer R3 CYGTAAAYCTYCTCTTTRAAC

Abbildung A2 (3) – Multiples Sequenzalignment von PAL-Genen aus Leguminosen (Fortsetzung). Für weitere Erläuterungen siehe Abb. A1 (1), S. 153.

Anhang I – DNA- und Proteinsequenzen von *RpPAL1*, 2, 3 und 4. Start- und Stopp-Codons sind fettgedruckt. Die putative Intron-Insertionsstelle in *RpPAL2* ist durch Schrägstriche (/ /) markiert. Die putativen Phosphorylierungsstellen im Protein (Allwood et al. 1999) von *RpPAL1*, 2 und 3 sind unterstrichen und das vermutlich phosphorylierte Threonin (T) fettgedruckt.

>*RpPAL1*

CCCTCTGATTGATGTGTCAAGGAACAAGGCACTGCATGGTGGTAACCTTTCAGGGAACCCCAATTGGAGTTTCAAT
GGATAATACAAGGTTGGCTCTTGCTTCAATAGGCAAACCTCATGTTTGTCTCAATTCTCTGAGCTTGTCAATGATTT
TTACAACAATGGGTTGCCTTCAAATCTCTCTGCCAGTAGAAATCCAAGCTTGGATTATGGTTTCAAGGGAGCTGA
AATTGCCATGGCATCTTATTGCTCTGAACTCCAATATCTTGCAAACCCAGTGACAACCCATGTCCAAAGTGCTGA
GCAGCACAAACCAAGATGTGAACCTCTTTGGGTTTGAATTCATCTAGAAAAACAAATGAGGCTATTGAGATCCTTAA
GCTCATGTCTTCCACTTTCTTGATTGCACCTTGCCAAGCAATTGACTTGAGGCATTTGGAGGAGAATTTGAAGAA
CACTGTCAAGAACACTGTAAGCCAAATGCAAAGAGGACACTCACCACAGGTGTCAATGGAGAACTCCATCCTTC
TAGATTTTGTGAGAAGGATTTGCTCAAAGTTGTTGATAGGGAGTATGTATTTGCCTACGTTGATGACGCCTGCAG
TGCTACATACCCATTGATGCAaAAACTAAGGCAAGTGTCTTGTGGATCATGCATTGGCAAATGCAGATGGTGAGAA
GAACTTGAACACGTCTATTTTCCAAAAGATTACAACATTTGAGGAGGAGTTGAAGACCCTCTTGCCAAAGGAGGT
TGAAAGTGCAAGGTTGCATATGAGAATGGCCAATGTGCAATTCCAAACAAGATTGAGGAATGTAGGTCTTACCC
ATTGTACAAGTTCGTGAGGGAAGAGTTAGGGACAGGGTTGCTAACCGGAGAAAAGGTTCATATCACCAGGTGAGGA
ATGTGATAAACTGTTACACAGCAATGTCCAAGGTAATAATTATGATCCTCTTTTGGAAATGCCTTGGGGAGTGAA
TGGTGCTCCTCTTCCAATTTGTT**TAG**TTCAATTCGTTTCTGTGAGAAGTCGTTTCTTTCTATATCTATATTTGTAT
TGAGAAGCATTGGTTTGTCTGAAAGCCTATGGCAAATCAATACAGCGTCGTGTAAGTTTTCTTGTATGTCAAGG
AGCTTGTAAATGATATTGTAATAGAATTTCAATTTGGGGTGCAAAGGTAATACATGGCCTTTGATGTAAAGGATGT
TTTTTTCGTGAATAATTAATCTTTATGCTAAAAAAAAAAAAAAAAA

>*RpPAL1*

PLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMDNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDFYNNGLPSNLSASRNPSLDYGFKGAE
IAMASYCSELQYLANPVTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTNEAIEILKLMSSFTFLIALCQAIIDLRHLEENLKN
TVKNTVVSQIAKR**TLT**TVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYVDDACSATYPLMQKLRQVLVDHALANADGEK
NLNTSIFQKITTFEELKTLPLKEVESARVAYENGQCAIPNKIEECRSYPLYKQVREELGTGLLTGEEKVISPGEE
CDKLFTAMCQGIIDPILLECLGEWNGAPLPIC

- - - - -

>*RpPAL2*

CTGCTCAGGAAATCCATATATAACTCTCCAAAACCAAAGATTTCTTTACTCTTCAAACCTTCTCTCTCTCTCTC
ACACACACACACACACATATAATATAACTTGCTTGAGCTTTGCATTCTCTCGAAACTACCACTACCCACAACA
ACCACAGGGAGGGATAACACAGTTTGCATTAAC**ATG**GGAAGCAACTAGAGTGAGCAATGGCTACCACCAAAGCCAA
AACGGGTCTTGTGCTTGAAGAGCAATAATACTAGCAGTGACCCATTGAATTGGGGTGTGGCGGCGGAGTCAATG
AAGGGGAGCCACTTGGATGAGGTGAAGCGCATGGTGGAGGAGTACCGGAATCCCCTGGTCCGGATTGGCGGCGAG
ACACTGACTATCTCGCAGGTGGCTGCCATCGCCACACGTGACCAAGACGTGAGTTTGGAGCTGTCCGAATCTGCT
AGGGCTGGTGTAAAGGCAAGCAGTGACTGGGTGATGAATAGCATGAACAATGGCACTGACAGTTACGGTGTCCACC
ACCGGCTTCGGTGCCACCTCTCACCGTAGAACCAAAACAAGGTGGTGTCTTGCAGAAAGAGCTCATCAG//GTTTT
TGAACGCTGGAATATTTGGCAATGGTGTGTGTATGCCACACACTGCCACATTCTGCAACCAGAGCAGCCATGC
TTGTGAGAATCAACACTCTTCTCCAAGGTTATTCAGGCATCAGATTTGAAATCTTAGAAGCCATCACCAGCTCC
TTAAACAACAACATTACCCCATGYTTACCACTTCGTGGTACAATCACAGCTTCTGGGGATCTGGTCCCTCTTTCTT
ACATTGCCGGTTTGCCTTACTGGCCGACCAAACCTCAAAGGCTGTGGGACCCTCTGGAGAGGTACTTAATGCCAAGG
AAGCTTTCCAATTTGGCTGGCATCAACTCTGAGTCTTTGAAATTAACAACCAAGGAAGGCCTTGCATTTGTTAATG
GCACTGCTGTGGTCTGGCTTAGCTTCTATTTGTTCTCTTTGAGGCAACACTACTAGCTGTGTGTCTGAAGTTC
TATCAGCTATTTTTGCTGAAGTGAATGCAAGGAAACCTGAATTCAGTACCATTTGACACATAAGCTAAAGCACCC
ACCCTGGCCAAATTGAGGCTGCTGCTATTATGGAACACATTTGGATGGAAGTTCATACATGAAAGATGCTAAGA
AGTTGCATGAGATGGATCCATTGCAAAGCCAAAACAAGATCGATATGCCCTTAGAACTTACCACAATGGCTTG
GTCTCTGATTGAAGTGATTAGATTCTCAACCAAGTCAATTGAGAGAGAGATTAACCTCTGTGAATGACAACCCYT
TGATTGATGTTTCCAGGAACAAGGCCCTTGATGGTGGTAATTTCCAAGGAACCCCTATTGGAGTCTCTATGGACA
ACACACGTTTGGCTCTTGATCAATTGGCAAACCTCATGTTTGTCTCAGTTCTCTGAGCTTGTCAATGATTTGTACA
ACAATGGGTTGCCCTCAAATCTCTCTGCTAGTAGAAATCCCAGYCTGGATTATGGTTTTCAAGGGAGCTGAAATTG
CCATGGCATCTTATTGCTCTGAACTCCAATATCTTGCAAATCCAGTCACAACCCATGTCCAAAGTGCTGAGCAGC
ACAACCAAGATGTGAACCTTTTGGGTTTGAATTTCTTCTAGAAAAACAAACGAAGCCATCGAGATCCTTAAGCTCA
TGTCTTCCACTTTCTTGATTGCRCTTTGCCAAGCAATTGACTTRAGGCATTTAGAGGAGAAGCTTGAAGGCTCGG

CCAAGAACTGTAAGCCAAGTTGCCAAGAGGACTCTTACCACAGGTGTCAATGGAGAACTCCACCCCTCCAGAT
 TTTGTGAAAAAGATTTGCTGAAAAGTGGTTGATAGGGAGTATGTATTTGCCCTATATTGATGATCCCTGCAGTGCTA
 CATACCCATTTGATGCAGAAACTCAGGCAAGTGCCTTGTGGATCATGCMTTAGTAAATGGAGAATATGAGAAGAACT
 TGAACACATCAATCTTCCAAAAGATTGCAACTTTTGGAGGATGAGTTGAAGGCTCTCTTGCCAAAGGAGGTAGAAA
 GTGCAAGGGCTGCATACGAAAAGTGGCAATCCAGCAATTCAAAACAAGATCAAGGAATGTAGATCTTACCCACTTT
 ACAAGTTTGTGAGAGAGGAGTTGGGGACAGGGTTGCTAACTGGAGAAAAGGTCAGGTCACCAGGTGGGGAGTTTG
 ACAAATTTGTTACAGCAATGTGCCGGGTAAAAATTATTGATCCTCTTTTGGAAATGCCCTTGGGGAGTGGAAACGGTG
 CTCCTCTTCCAATTTGT**TAAT**TTTACCAGTTACATTTTGGAAATGTGTTCTTTGTATCTATGCAAGTGCAGCGAT
 AATCATTTGGTTTGTCAATCCTTGAGGAAATTAATATGAAAAGCTTCATTTTCAGTTTCTCGATAAAAAAAAAA
 AAAA

>RpPAL2

MEATRVSNQYHQSQNGSLCLKSNNTSSDPLNWGVAAESMKGSHLDEVKRMVEEYRNPVVRIGGETLTISQVAAIA
 TRDQDVSLELSE SARAVKASSDWMNSMNNGTDSYGVTTGFGATSHRRTKQGGALQKELIRFLNAGIFGNVAVS
 CHTLPHSATRAAMLVRIINTLLQYSGIRFEILEAITKLLNINI TPCLPLRGTITASGDLVPLSYIAGLLTGRPN
 KAVGPSGEVLNAKEAFQLAGINSEFFELQPKEGLALVNGTAVGSGLASIVLFEANILAVLSEVLSAIFAEVMQGK
 PEFTDHLTHKLNKHPGQIEAAAIMEHILDGSSYMKDAKLLHEMDPLQPKQDRYALRTSPQWLGLPIEVIRFSTK
 SIEREINSVNDNPLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDLYNGLPSNLSASR
 NPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQYLANPVTHVQSAEQHNQDVNSLGLISSRKTNEAIEILKLSSTFLIALCQA
 IDLRHLEENLKSSAKNTVSQVAKRTL**TT**GVNGELHPSRFCEKDLLKVVVDREYVFAYIDDPSCATYPLMQKLRQVL
 VDHALVNGEYKLNLSIFQKIATFEDELKALLPKEVESARAAYESGNPAIPNKIKECRSYPLYKRVREELGTGL
 LTGEKVRSPGGEFDKLFAMCRGKIIDPLLECLGEWNGAPLPIC

- - - - -

>RpPAL3

GGAGTCTCTATGGACAACACACGTTTGGCTCTTGCATCAATTGGCAAACCTCATGTTTGCCTCAATTCTCAGAGCTT
 GTCAATGATTTTTACAACAATGGGTTGCCCTTCTAATCTCTCTGCTAGTAGAAATCCCAGCTTGGATTATGGTTTC
 AAGGGAGCTGAAATAGCCATGGCATCTTATTGCTCTGAACTCCAATATCTTGCAAATCCAGTCACAACCCATGTC
 CAAAGTGCTGAGCAGCACAACCAAGATGTGAACTCTTTGGGTTTGTATTCTTCTAGAAAAACAAACGAAGCCATC
 GAGATCCTTAAGCTCATGTCTTCCACTTTCTTGATTGCACTTTGCCAAGCAATTGACTTAAGGCATTTGGAGGAG
 AACTTGAAAAGCTCGGCCAAGAACACTGTAAGCCAAGTTGCCAAGAGGACTCTTACCACAGGTGTCAATGGAGAA
 CTCCACCCCTCCAGATTTTGTGAAAAAGATTTGCTGAAAAGTTGTAGATAGGGAGCATGTGTTTGCCTATATTGAT
 GATCCCTGCAGTGTACATACCCATTGATGCAAAAACCTCAGGCAAGTGCTCGTGGATCATGCATTAGTTAATGGA
 GAAAATGAGAAAGAACTTGAACACGTCATCTTTCAAAGATTGCAACTTTTGGAGGAGGTTGAAGGCTCTCTTG
 CCAAAGGAGGTAGAAAAGTGAAGGGCTGCATACGAGAGTGGCAATGCAGCAATTCCAAACAAGATCAATGAATGC
 AGATCTTACCATTGTACAAGTTTGTGAGAGAGGAGTTGGGGACAGGGTTGCTAACTGGAGAAAAGGTCAGGTCT
 CCAGGTGAGGAGTTTGACAACTGTTACAGCAATGTGTGAGGGTAAAAATTATTGATCCTCTTCTGGAATGCCCTT
 GGGGAGTGAATGGTGCTCCTCTTCAAATTTGT**TAAC**TTTTATCATTTACATTTTGGAAATGTTTTGTTTGTATCT
 ATGCAAGTTTAGCAATAATCATTTGGTTTGTAAAGCCTTTGGCAAATTAATATGAAAAGCTTCATTTCATATCTG
 ATGAAAAGATATGCTAGTAAATAAGTCATCCCACTCCTTGCAGTTGAAGTAGTAGAAGAGTCCCTTAGATTTTA
 TTATTTAATAATACTGGTAATTTAACATGTGCAATGCATGGAGTGTGTGTGAAAAAAAAAAAAAAAAA

>RpPAL3

GVSMNTRLALASIGKLMFAQFSELVNDLYNGLPSNLSASRNPSLDYGFKGAEIAMASYCSELQYLANPVTHV
 QSAEQHNQDVNSLGLISSRKTNEAIEILKLSSTFLIALCQAIDLRHLEENLKSSAKNTVSQVAKRTL**TT**GVNGE
 LHPSRFCEKDLLKVVVDREHVFAYIDDPSCATYPLMQKLRQVLVDHALVNGENEKLNLSIFQKIATFEELKALL
 PKEVESARAAYESGNAAIPNKINECRSYPLYKRVREELGTGLLTGEKVRSPGGEFDKLFAMCQGIIDPLLECL
 GEWNGAPLPIC

- - - - -

>RpPAL4

CCCTTTGATTGATGTTTCAAGGAACAAAGCTTTACATGGTGGAAATTTTTCAGGGTACCCAGTAGGGGTTTCTAT
 GGACAACACAAGATTAGCTTTGGCTGCCATTGGAAAACCTCAGTTTTGCTCAAATGTCTGAGTTGGTTAACGATTT
 CTACAATAATGGGTTGCCCTTCAAATCTCTCAGGGGGTCACTGTCCAAGCTTGGATTATGGATTTAAGGGTGGTGA
 GATAGCAATGGCTGCATACCGTTCTGAGCTTCAATCTAGCTAACCCGTGCTACTAATCATGTGCAAAGTGCAGGA
 ACAACACAATCAAGATGTGAATTCATTGGGACTAATCTCTGCCAGGAAAACAGCTGAAGCTGTTGAAATATTTAA
 ACTCATGTCTTCAACCTACCTCATTTGCTCTTTGTCAAGCAATAGATTTGAGGCATTTAGAGGAGAACTTG

>RpPAL4

PLIDVSRNKALHGGNFQGTPIGVSMNTRLALAAIGKLSFAQMSSELVNDLYNGLPSNLSGGHCPSLDYGFKGGE
 IMAAYRSELQYLANPVTHVQSAEQHNQDVNSLGLISARKTAEAVEILKLSSTYLIALCQAIDLRHLEENL

Anhang II – DNA- und Proteinsequenzen von *RpCHS1*, 2, 3, 4, 5 und 6. Stopp-Codons sind fettgedruckt. Die putativen Intron-Insertionsstellen von *RpCHS1* und *RpCHS4* sind durch Schrägstriche (/ /) markiert.

>*RpCHS1*

GAATCACCAACAGTGAGCACATGACAGAGCTCAAACAAAATTCAAACGCATGT//GTGAAAAGTCAATGATTAA
 GAAGCGATACATGTATCTGACAGAGGAAATCTGAAAGAAAATCCCAATGTTTGTGCTTACGTGGCACCACCATT
 GGATGCAAGGCAAGACATGGTGGTTGTAGAGGTACCAAGGTTGGGAAAAGAGGCAGCAACAAAGGCAATTAAGGA
 ATGGGGTCAACCCAAGTCAAAGATCACCCACCTCATCTTCTGCACCACAAGTGGTGTGGACATGCCTGGTGTGTA
 TTATCAACTCACAAAACCTCCTAGGACTTCGTCCATCAGTGAAGCGTTACATGATGTACCAACAAGGGTGTTTTGC
 TGGGGGCACGGTGCCTTCGTTTGGCCAAAGACTTGGCTGAGAACAACAAGGTGCTCGTGTACTTGTGGTTTGTTC
 AGAAATCACTGCAGTCACATTTCTGTGGTCCTAGTGACACTCATCTTGATAGCCTTGTGGGACAAGCTTTGTTTGG
 AGATGGAGCAGCTGCTGTGATTGTTGGATCTGACCCTTTACCAGGGATTGAGAAAACCTTTGTTTGTGTTGGTGTG
 GACTGCACAAAACAACTCCAGATAGTGAAGGCGCTATTGATGGCCACCTTCGTGAAGTTGGGTTAACATTCCA
 TCTCCTCAAGGATGTTCCCTGGGCTCATCTCAAAGAATATTGAGAAAGCCTTGGTTGAAGCCTTTCAACCTTTGGG
 CATATCTGATTATAACTCTATCTTCTGGATTGCACACCCTGGTGGGCCAGCTATTCTAGACCAAGTTGAGGCCAA
 ATTAGGCTTGAAGCCTGAAAAAATGGAAGCCACTCGGCATGTGCTAAGTGAGTATGGTAACATGTCAAGTGCATG
 TGTGCTGTTTTCATCTTGGATGAAATGAGGAAGAAGTCAATAGAAAATGGACTTGGCACAACAGGTGAGGGACTTGA
 ATGGGGTGTGCTATTTGGTTTYGGYCCTGGACTCACCG

>*RpCHS1*

ITNSEHMTLQKFKRMCEKSMIKKRYMYLTEEILKENPNVCAYVAPPLDARQDMVVVEVPRLGKEATKAIKEW
 GQPKSKI THLI FCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPSVKRYMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSE
 ITAVTFRGPSTHLDLSLVGQALFGDGA AVIVGSDPLPGIEKPLFELVWTAQTI LPDSEGAIDGHLREVGLTFHL
 LKDVPLGISKNI EKALVEAFQPLGISDYNSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLKPEKMEATRHLV LSEYGNMSSACV
 LFI LDEMRRKSIENGLGTTGEGLEWGVLF GXXPGLT

>*RpCHS2*

TACATGATGTATCAACAAGGGTGCCTTTCAGAGTGGCAGCGTGCCTTCGTTTGGCAAAGACTTGGCTGAGAACAAC
 AAGGTGCTCGTGTGCTAGTTGTCTGTTCTGAAATTACTGCAGTCACATTCCTGGCCCTAGTGAAACTCATCTA
 GACAGTCTTGTGGACAAGCATTGTTTGGAGATGGAGCAGCTGCAATCATTGTTGGTTCTGATCCAGTACCAGAA
 ATAGAGAAACCTATATTTGAGTTAGTTTGGACTGCACAAAACAATTGCTCCAGATAGTGCTGGAGCCATTGATGGT
 CACCTTCGTGAAGTTGGGCTAACATTTTCATCTCCTTAAAGATGTTTCTGGGATTGTTTCCAATAATACTGACAAA
 GCACTAGCTGAGGCCTTCCGACCATTAGGCATATCTGATTACAACCTCAATCTTCTGGATTGCTCACCC

>*RpCHS2*

YMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPSETHLDLSLVGQALFGDGA AAVIVGSDPVPE
 IEKPI FELVWTAQTIAPDSAGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGIVSNNTDKALAEAFRPLGISDYNSIFWIAH

>*RpCHS3*

GGCACCTTCTTTGGATGCAAGACAAGACATGGTGGTTGTAGAGGTACCTAGACTTGGAAAAGAGGCTGCAGTAAA
 GGCTATAAAAAGAAATGGGGTCAGCCAAAGTCCAAGATTACCCACTTGGTCTTTTGCACCAGGAGTGGTGTAGACAT
 GCCTGGTGCCTGATTACCAACTCACCAAACCTCTGGGTCTTCGCCCATATGTGAAAAGGTACATGATGTATCAACA
 AGGGTGCCTTTCAGGTGGTACGGTGCCTTCGTTTGGCCAAAGACTTGGCTGAGAACAACAAGGGTGCCTCGTGTGCT
 AGTTGTTTGYTCTGAGATTACTGCAGTCACATTCCTGGCCCTAGTGAAACTCATCTAGACAGTCTTGTGGGACA
 AGCATTTGTTGGAGATGGAGCAGCTGCAATCATTGTTGGTTCTGATCCTGTACCAGAAATTGAGAAACCTATATT
 TGAGTTAGTCTGGACTGCACAAAACAATTGCTCCAGATAGTGATGGAGCCATTGATGGTCACCTTCGTGAAGTTGG
 GCTAACATTTTCATCTCCTTAAAGATGTTTCTGGGATTGTTTCCAAGAACGTTGACAAAAGCACTAGTTGAAGCCTT
 CCAACCATTAGGCATATCTGATTACAACCTCAATCTTYTGGATTGCACMCCAGGTGGACCAGCAATATTGGACCA
 AGTTGAGCAAAAGTTGAGTTTGA AACCTGAAAAGATGAGGGCCACTAGAGAAGTGCTTAGTGAATATGGTAACAT
 GTCAAGTGCATGTGTCCATTTTCATCTTGGATGAGATGAGAAAGAAATCAGCTAAGGATGGACTTAAAACACAGG
 TGAAGGACTCGAATGGGGTGTCTTGTGGTTTGGACCCGGACTCACCATTTGAAACTGTTGTTCTGCATAGTGT
 GGCTATA**TG**AGATGTATCAGAAAGCTTTGGACCTGGATTTTATCATTGTAATGGATGTTTCGGCAATAAATCTATC
 TGTTTTTTCATACTCATTTAAATTTGTCTGATTACTTGTTTAATCTTCGTAAGTTATCTTTTTTCATCTATTAACCT
 TAAGTTGGTGTATTAATTA AAAAAAAAAAAAAAAAAA

>RpCHS3

APSLDARQDMVVVEVPRLGKEAAVKAIKEWGQPKSKI THLVFCTASGVDMPGADYQLTKLLGLRPYVKRYMMYQQ
GCFAGGTVXRLAKDLAENNKGARVLVXSEITAVTFRGPSETHLDSL VGQALFGDGAAAIIVGSDPVPEIEKPIF
ELVWTAQTIAPDSDGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGIVSKNVDKALVEAFQPLGISDYSIXWIAXPGGPAILDQ
VEQKLSLKPEKMRATREVLSEYGNMSSACVLFILDEMRRKSAKDGLKTTGEGLEWGVLF GFGPGLTIETVVLHSV
AI

- - - - -

>RpCHS4

GAATCACCAACAGTGACCACATGACGGAGCTCAAAGAAAAATTCAAGCGCATGT//GCGATAAGTCAATGATTAA
GAAGCGATACATGCACTTGACGGAAAGAGATCCTGAAGGAGAATCCCAAATCTGTGAGTATATGGCACCTTCATT
GGATGCAAGACAAGACATGGTTGTAGTAGAAGTACCAAAGTTAGGAAAAGAAGCAGCAACAAAGGCCATCAAGGA
ATGGGGTCAACCAAGTCCAAGATTACCCACCTTATCCTTTGCACCACAAGTGGTGTGGACATGCCAGGAGCTGA
CTACCAGTCACTAAGCTCTTGGGACTTCGCCCATATGTGAAGAGATACATGATGTACCAACAAGGATGTTTTGC
TGGKGGCACGGTGCCTTCGTTTGGCTAAAGACTTGGCTGAAAATAACAAGGGTGCCTCGTGTGTTGGTGGTTTTGC
AGAGATCACAGCAGTTACTTTCCGTGGCCCAAGTGACACCCATCTTGATAGTCTTGTGGGGCAAGCATTGTTTTGG
AGATGGTGCAGCAGCTGTCAATTGTTGGTTCAGACCCACTACCAGAGATTGAGAAGCCTCTGTTTGAACCTGTATG
GACTGCTCAAAACAATCCTTCCAGACAGTGAAGGAGCCATTGATGGTCATCTTCGTGAGGTTGGGCTCACATTCCA
TCTCCTCAAGGATGTTCTTGGGCTCATCTCAAAGAACATTGAGAAAGCTTTGGTTGAAGCCTTTCAACCCTTGGG
CATCTCTGATTACAACCTATCTTTTTGGATTGCACACCCCTGGTGGACCTGCAATTCCTAGACCAAGTTGAGGCTAA
ATTAGGCTTGAAGCCGAAAAAATGCAAGCCACTCGTCATGTGTTAAGTGAGTATGGTAACATGTCAAGTGCTTG
TGTGTTGTTTTCATCTTGGATGAAATGAGGAGAAAATCAAAGAAAATGGACTTGCCACAACAGGTGAGGGACTTGA
TTGGGGTGTGCTATTTGGTTTCGGGCCAGGACTTACTGTTGAGACCGTTGTGATCCATAGTGTGGCCACTAAAA
TCCTCATACCAAAGGCACAAATCACATATCCTGTTTGCACCTAATCTTCTTTTTCATTTTCAGCCYGAAGAAAATG
TATTCTTTCTTTCTTTCTCTGTGTTTTGATCACTCTACACATATTTCTTATAACCCTATAATTATGTTGATCRTTA
TGTATAAAAAACCTTGTGATATAGGCTGTAATCCAAGGCACATTTGTAACAGGAATGGTTACAATTCATATGA
ATAATAAAAAGACTTTTGTATTATTTCTTCCAAAAA

>RpCHS4

ITNSDHMTLKEKFKRMCDKSMIKKRYMHLTEEILKENPKICEYMAPSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEW
GQPKSKI THLILCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPYVKRYMMYQQGCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSE
ITAVTFRGPDTHLDSL VGQALFGDGAAAVIVGSDPLPEIEKPLFELVWTAQTI LPDSEGAIDGHLREVGLTFHL
LKDVPGGLISKNIEKALVEAFQPLGISDYSIFWIAHPGGPAILDQVEAKLGLKPEKMQATRHVLSYGNMSSACV
LFI LDEMRRKSKENGLATTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVIHVAH

- - - - -

>RpCHS5

GGCACCTTCTTTGGATGCAAGACAAGACATGGTTGTAGTGGAAGTACCAAAGTTAGGAAAAGAAGCAGCAACCAA
GGCCATCAAGGAATGGGGTCAACCAAGTCCAAGATTACCCACCTCATCTTTTGCACCACAAGTGGTGTGGACAT
GCCAGGAGCTGACTACCAGCTCACTAAGCTCTTGGGCCTTCGCCCATATGTGAAGCGATACATGATGTACCAACA
AGGATGTTTTGCTGGTGGCACGGTGCCTTCGTTTGGCTAAAGACTTGGCTGAAAATAACAAGGTGCCTCGTGTGTT
GGTAGTTTTGTTT CAGAGATCACTGCAGTTACTTTCCGTGGCCCAAGTGACACCCATCTTGATAGTCTTGTGGGGCA
AGCATTGTTTTGGAGATGGTGCAGCAGCTGTCACTGTTGGTTCAGACCCAGTGCCAGAGGTTGAGAAACCTTTGTT
TGAATTGGTATGGACTGCACAAACAATCCTCCAGACAGTGAAGGAGCCATTGATGGTCACCTTCGTGAAGTTGG
GCTCACATTCCATCTCCTCAAGGATGTTCTTGGGCTCATTTTCGAAAAACATCGAGAAAGCTTTGGTTGAAGCCTT
TCAACCCTTGGGCATCTCTGATTACAATCTATCTTTTTGGATCGCACACCCCTGGTGGACCTGCAATTCCTAGACCA
AGTTGAGGCTAAACTAGCCTTGAAACCAGAAAAAATGAAAGCCACTCGTCATGTGCTCAGTGAATATGGTAACAT
GTCAAGTGCTTGTGTGTTGTTTTCATCTTGGATGAAAATGAGGAGGAAATCAAAGAAGATGGACTTGCCACAACAGG
TGAGGGACTTGTATTGGGGTGTGCTGTTTGGTTTTGGACCTGGACTTACTGTTGAGACTGTTGTGCTCCGTAGTGT
GGCCCTCTAAAAATCGTTGTACTTTACTAGGGGCACAAATCACAAATCTTATTTGCACCTGTTCTTGTTTTCTTTT
TCAGCCAAGAGAAAAATGTATTCTTTCTTTCTTTCTTTTGTTTTGGATCACCCTTCACATGTTCTTATACCCTAT
TATGTACATCATTATGTTATAAACCTTTATGATTGAAGCTTCAATTCACACGACATTTGTTAAAAA

>RpCHS5

APSLDARQDMVVVEVPKLGKEAATKAIKEWGQPKSKI THLIFCTTSGVDMPGADYQLTKLLGLRPYVKRYMMYQQ
GCFAGGTVLRLAKDLAENNKGARVLVVCSEITAVTFRGPDTHLDSL VGQALFGDGAAAVIVGSDPVPEVEKPLF
ELVWTAQTI LPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGGLISKNIEKALVEAFQPLGISDYSIFWIAHPGGPAILDQ
VEAKLALKPEKMATRHVLSYGNMSSACVLFILDEMRRKSKEDGLATTGEGLDWGVLF GFGPGLTVETVVLRSV
AL

- - - - -

>RpCHS6

GGATTGAGAAACCTTTGTTTGGAGTTGGTGTGGACTGCACAAACAATCCTCCCAGACAGTGAAGGAGCCATTGATG
GTCACCTTCGTGAAGTTGGGCTCACATTCATCTCCTCAAGGATGTTCCCTGGGCTCATCTCAAAGAACATTGAGA
AAGCTTTGGTTGAGGCCTTTCAACCCCTGGGCATCTCTGATTATAACTCCATCTTTTGGATCGCACACCCTGGTG
GACCTGCAATTCTTGATCAAGTTGAGGCTAAATTAGGCTTGAAGTCGGAAAAAATGCAAGCCACTCGTCATGTGC
TCAGTGAATATGGTAACATGTCAAGTGCCTTGTGTGTTGTTTCATCTTGGATGAAATGAGGAGGAAATCAAAGAAG
ATGGTCTTCGCACAACGGGCGAGGGACTTGACTGGGGTGTGCTATTTCGGTTTTGGGCCCGACTTACTGTCGAGA
CTGTTGTCCTCCGCAGTGTGCTATTT**TA**ATTGCCCAAATACGCCATGCTGTACGTACTACAACAATAATCACATT
TGTTTTTTCTCATAGTGGTGCTATATGTACAAC TAGAATTAACAAC TTGAGCCACCGTATGTACTGTTTATCAAG
TATATACATTTAGAAAAATAATAAAATAGTGAGTGGTGTGTCAGTATACATTCTCTCTCTCACTTTATTTTTAAA
ATTCAGAAAAAAAAAAAAAAAA

>RpCHS6

IEKPLFELVWTAQTILPDSEGAIDGHLREVGLTFHLLKDVPGLISKNIEKALVEAFQPLGISDYNSIFWIAHPGG
PAILDQVEAKLGLKSEKMQATRHVLS EYGNMSSACVLFILDEMRRKSKEDGLR TTGEGLDWGVLF GFGPGLTVET
VVLRSVAI

Tabelle A3 – Relative Expression [%] von *RpPAL1*, 2 und 3 und *RpCHS3*, 4 und 5 in den Gewebestrukturen des Robinienstammes während der Vegetationsperiode und bezogen auf die Expression von *Rp18S*. Aufgelistet sind die durch Real-Time PCR ermittelten Einzelwerte der drei biologischen Parallelen (Einzelbäume), getrennt durch Schrägstriche. Legende: 0 = Werte <0,005 %, - = kein C_T-Wert erhalten, kursiv gedruckte Zahlen wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt, n.b. = nicht bestimmt. Abkürzungen: DX – differenzierendes Xylem, EW – Frühholz, OS – äußeres Splintholz, IS – inneres Splintholz, TZ – Splint-Kern-Übergangszone.

		<i>Frühjahr</i>	<i>Sommer</i>	<i>Spätsommer</i>	<i>Herbst</i>	<i>Spätherbst</i>
<i>RpPAL1</i>	<i>DX</i>	8,2 / 5,5 / 4,4	7,6 / 6,8 / 8,9	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	7,0 / 12 / 13,7	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	0,08 / 0,06 / 0,15	0,27 / 0,57 / 1,3	1,3 / 0,51 / 1,2	0,93 / 6,0 / 0,36	0,22 / 0,49 / 0,35
	<i>IS</i>	0,03 / - / 0,02	1,0 / 0,37 / 1,5	0,10 / 0,21 / 0,04	0,26 / 0,01 / 0,05	0,01 / 0,06 / 0,03
	<i>TZ</i>	1,2 / 1,7 / 1,5	55 / 26 / 61	2,1 / 50 / 0,2	15 / 6,8 / 0,03	9,2 / 2,0 / 0,9
<i>RpPAL2</i>	<i>DX</i>	0,60 / 0,81 / 0,04	0,12 / 0,16 / 0,18	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	0,1 / 0,04 / 0,04	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0	0,18 / 0,05 / 0,02	0,01 / 0,42 / 0,01	0,05 / 0 / 0
	<i>IS</i>	0 / - / 0	0,01 / 0 / 0,01	0 / 0,05 / 0	0,02 / 0 / -	0 / 0 / -
	<i>TZ</i>	0,13 / 0,47 / 0,08	3,0 / 1,1 / 2,2	0,22 / 4,0 / -	0,66 / 0,89 / -	0,90 / 0,08 / 0,06
<i>RpPAL3</i>	<i>DX</i>	1,1 / 2,9 / 2,8	0,10 / 0,49 / 1,1	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	0,05 / 0,21 / 0,34	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	0,01 / 0,03 / 0,11	- / 0,01 / 0,01	0,21 / 0,02 / 0,24	0,21 / 1,0 / 0,20	0,02 / 0,07 / 0,16
	<i>IS</i>	0 / 0,02 / 0,01	0,04 / - / -	0,01 / - / -	0,01 / - / -	0 / - / -
	<i>TZ</i>	0,16 / 0,09 / 0,05	1,67 / 0,11 / 0,24	0,19 / 1,8 / 0,05	0,81 / 1,9 / 0	0,88 / 0,03 / 0,77
<i>RpCHS3</i>	<i>DX</i>	0 / 0,01 / 0,02	0 / 0 / 0,02	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	0 / 0 / 0,01	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	- / - / 0,01	0 / - / 0,01	0,02 / 0,01 / 0,06	0 / 0,01 / -	0 / 0 / -
	<i>IS</i>	0,02 / 0 / 0,01	1,2 / 0,25 / 4,6	0,01 / 0,32 / 0,02	0,45 / 0 / -	- / 0,03 / -
	<i>TZ</i>	0,43 / 10 / 18	1580 / 103 / 410	160 / 210 / 0,73	143 / 22 / 0,02	7,7 / 9,5 / 1,1
<i>RpCHS4</i>	<i>DX</i>	0,08 / 0,03 / 0,01	0 / 0,01 / 0,01	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	0 / 0 / 0	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	0 / 0 / -	0 / - / 0,01	0 / - / -	0 / 0 / 0	0 / 0 / 0
	<i>IS</i>	0,01 / 0,01 / -	0,37 / 0,07 / 0,47	0,01 / - / -	0,66 / - / -	0 / 0,01 / 0
	<i>TZ</i>	6,7 / 4,5 / 4,1	297 / 52 / 94	15 / 87 / 0,27	21 / 13 / 0,04	7,8 / 7,1 / 2,6
<i>RpCHS5</i>	<i>DX</i>	0,01 / 0 / 0	0 / 0,02 / 0,04	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>EW</i>	n.b.	0 / 0 / 0,01	n.b.	n.b.	n.b.
	<i>OS</i>	- / 0 / 0,01	- / - / 0,01	0,05 / 0,01 / 0,03	0 / - / 0,01	0,01 / - / 0,01
	<i>IS</i>	- / 0 / 0	0,06 / 0,01 / 0,18	0 / - / -	0,24 / - / -	0 / 0,03 / -
	<i>TZ</i>	3,3 / 2,2 / 4,2	74 / 16 / 47	- / 34 / 0,05	15 / 3,2 / 0,03	8,9 / 2,0 / 2,5

Tabelle A4 – Relative Expression \pm Standardabweichung [%] von *RpPAL1*, 2, 3 und von *RpCHS3*, 4 und 5 in den Gewebezonen des Robinienstamms während der Vegetationsperiode. Aufgelistet sind die Mittelwerte der in Tab. A3 gezeigten Einzelwerte. Werte ohne Standardabweichung beruhen auf Einzelwerten. Abkürzungen: CV – Variationskoeffizient, übrige Abkürzungen siehe Tab. A3.

		<i>RpPAL1</i>		<i>RpPAL2</i>		<i>RpPAL3</i>	
<i>Jahreszeit / Gewebe</i>		<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>	<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>	<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>
<i>Frühjahr</i>	<i>DX</i>	6,04 \pm 1,93	32	0,485 \pm 0,400	83	2,29 \pm 1,02	45
	<i>OS</i>	0,096 \pm 0,05	53	0,002 \pm 0,002	89	0,052 \pm 0,051	98
	<i>IS</i>	0,026 \pm 0,01	44	0,0005 \pm 0,0001	35	0,010 \pm 0,006	59
	<i>TZ</i>	1,48 \pm 0,29	20	0,227 \pm 0,209	93	0,101 \pm 0,057	56
<i>Sommer</i>	<i>DX</i>	7,77 \pm 0,02	0,3	0,154 \pm 0,030	19	0,568 \pm 0,513	90
	<i>EW</i>	10,80 \pm 3,46	32	0,063 \pm 0,034	54	0,201 \pm 0,147	73
	<i>OS</i>	0,71 \pm 0,53	74	0,001 \pm 0,001	54	0,011 \pm 0,003	25
	<i>IS</i>	0,96 \pm 0,58	60	0,007 \pm 0,006	91	0,036	-
	<i>TZ</i>	47,49 \pm 18,93	40	2,080 \pm 0,984	47	0,671 \pm 0,865	129
<i>Spät-Sommer</i>	<i>OS</i>	0,93 \pm 0,59	64	0,11 \pm 0,091	81	0,118 \pm 0,135	115
	<i>IS</i>	0,16 \pm 0,08	49	0,024 \pm 0,030	122	0,015	-
	<i>TZ</i>	50,20	-	4,02	-	1,81	-
<i>Herbst</i>	<i>OS</i>	3,466 \pm 3,59	104	0,22 \pm 0,29	136	0,620 \pm 0,573	92
	<i>IS</i>	0,011	-	0,010 \pm 0,014	139	0,009	-
	<i>TZ</i>	10,83 \pm 5,69	53	0,775 \pm 0,162	21	1,342 \pm 0,750	56
<i>Spät-herbst</i>	<i>OS</i>	0,007 \pm 0,003	38	0,017 \pm 0,028	160	0,082 \pm 0,069	84
	<i>IS</i>	0,0008 \pm 0,0005	67	0,001 \pm 0,001	67	0,0009	-
	<i>TZ</i>	0,084 \pm 0,095	113	0,345 \pm 0,481	139	0,560 \pm 0,461	82
		<i>RpCHS3</i>		<i>RpCHS4</i>		<i>RpCHS5</i>	
<i>Jahreszeit / Gewebe</i>		<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>	<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>	<i>Rel. Expression [%]</i>	<i>CV [%]</i>
<i>Frühjahr</i>	<i>DX</i>	0,0126 \pm 0,0114	91	0,0384 \pm 0,0337	88	0,045 \pm 0,0052	114
	<i>OS</i>	0,0087	-	10 ⁻⁵ \pm 3x10 ⁻⁶	30	0,0080 \pm 0,0084	106
	<i>IS</i>	0,0114 \pm 0,0098	86	0,0102 \pm 0,0057	56	0,0041 \pm 0,005	13
	<i>TZ</i>	13,86 \pm 5,32	38	5,128 \pm 1,392	27	3,205 \pm 0,970	30
<i>Sommer</i>	<i>DX</i>	0,0080 \pm 0,0085	106	0,0070 \pm 0,0046	66	0,0195 \pm 0,0162	83
	<i>EW</i>	0,0039 \pm 0,0039	102	0,0012 \pm 0,0003	28	0,0051 \pm 0,0051	100
	<i>OS</i>	0,0059 \pm 0,0077	131	0,0054 \pm 0,0070	128	0,0060	-
	<i>IS</i>	2,905 \pm 2,379	82	0,3032 \pm 0,2098	69	0,0813 \pm 0,0853	105
	<i>TZ</i>	256,3 \pm 217,3	85	72,94 \pm 29,97	41	60,45 \pm 19,49	32
<i>Spät-Sommer</i>	<i>OS</i>	0,0174 \pm 0,0040	23	0,0013	-	0,0323 \pm 0,0289	90
	<i>IS</i>	0,168 \pm 0,219	131	0,0051	-	0,0021	-
	<i>TZ</i>	184,7 \pm 35,6	19	51,18 \pm 50,74	99	34,4291*	-
<i>Herbst</i>	<i>OS</i>	0,0044 \pm 0,0061	140	0,0001 \pm 0,0002	127	0,0005	-
	<i>IS</i>	0,2273 \pm 0,3183	140	0,6587	-	0,2448	-
	<i>TZ</i>	82,30 \pm 85,48	104	16,91 \pm 6,14	36	9,08 \pm 8,27	91
<i>Spät-herbst</i>	<i>OS</i>	0,0007 \pm 0,00080	107	0,0007 \pm 0,0010	143	0,0060 \pm 0,0005	9
	<i>IS</i>	0,029	-	0,0058 \pm 0,0072	125	0,0148 \pm 0,0181	123
	<i>TZ</i>	8,590 \pm 1,252	15	5,82 \pm 2,85	49	4,463 \pm 3,829	86

Tabelle A5 – Relative Expression [%] von *RpPAL1*, 2 und 3 in Pathogenholz und nicht infizierten Kontrollen 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai} , bezogen auf die Expression von *Rp18S*, ermittelt durch Real-Time PCR. Gezeigt sind die Werte der biologischen Replikate (jeweils 4 für Pathogenholz und 2 für Kontrollen) und die Mittelwerte \pm Standardabweichung (MW \pm SD), sowie die Variationskoeffizienten (CV).

		d_{ai}	1	2	3	4	MW \pm SD	CV [%]
RpPAL1	Pathogenholz	0	19,03	16,18	(3,88)	16,66	50,35 \pm 2,95	5,9
		3	6,86	(0,70)	4,48	7,43	20 \pm 5,49	27,4
		7	4,32	7,12	(0,09)	6,16	17,79 \pm 3,66	20,6
		30	1,53	2,93	0,92	(9,21)	5,54 \pm 3,06	55,3
		90	2,73	2,16	2,82	2,68	8,16 \pm 0,88	10,8
		360	20,65 (B)	2,95 (A)	4,94 (A)	32,88 (B)	12,5 \pm 4,8 (A) 85,7 \pm 27,0 (B)	38,1 31,5
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			MW \pm SD	CV [%]
		0	16,19	(3,88)			48,8	-
		3	2,30	2,09			6,96 \pm 0,84	12,1
		7	1,17	3,51			6,63 \pm 4,59	69,1
		30	1,59	4,24			8,3 \pm 5,44	65,5
		90	0,14	0,50			1,18 \pm 0,93	79,0
360	1,43	(22,2)			5,15	-		
RpPAL2	Pathogenholz	0	2,51	2,11	2,06	2,62	2,33 \pm 0,28	12,1
		3	1,10	(0,49)	2,87	2,16	2,04 \pm 0,89	43,4
		7	1,27	2,45	1,17	0,99	1,47 \pm 0,66	44,9
		30	0,37	(3,44)	0,54	1,66	0,86 \pm 0,7	81,3
		90	1,43	2,13	3,65	1,09	2,08 \pm 1,14	54,8
		360	3,42 (B)	1,47 (A)	3,10 (A)	5,67 (B)	2,3 \pm 1,2 (A) 4,6 \pm 1,6 (B)	50,6 34,9
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			MW \pm SD	CV [%]
		0	2,11	2,06			2,09 \pm 0,04	1,7
		3	0,04	0,12			0,08 \pm 0,06	75,7
		7	0,05	0,44			0,25 \pm 0,28	113,2
		30	0,02	0,17			0,1 \pm 0,11	116,9
		90	0,01	0,22			0,12 \pm 0,15	127,2
360	0,04	(1,62)			0,04	-		
RpPAL3	Pathogenholz	0	5,42	4,42	2,66	5,72	4,55 \pm 1,38	30,3
		3	14,28	(2,85)	13,57	17,03	14,96 \pm 1,83	12,2
		7	10,71	11,37	6,24	7,99	9,08 \pm 2,39	26,3
		30	1,79	5,27	1,47	3,47	3,00 \pm 1,75	58,4
		90	6,21	4,29	13,70	4,68	7,22 \pm 4,40	60,9
		360	11,68 (B)	0,92 (A)	2,43 (A)	11,89 (B)	1,68 \pm 1,06 11,79 \pm 0,15	63,5 1,3
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			MW \pm SD	CV [%]
		0	4,42	2,66			3,54 \pm 1,24	35,2
		3	0,30	0,44			0,37 \pm 0,10	26,4
		7	0,58	1,60			1,09 \pm 0,72	66,0
		30	0,16	0,52			0,34 \pm 0,25	73,5
		90	0,04	0,48			0,26 \pm 0,31	120,2
360	0,06	1,68			0,87 \pm 1,15	132,2		

Tabelle A6 – Relative Expression [%] von *RpCHS3*, 4 und 5 in Pathogenholz und nicht infizierten Kontrollen 0, 3, 7, 30, 90 und 360 d_{ai} . Weitere Erläuterungen siehe Tab. A4 (S. 169). Mit Stern (*) markierte Einzelwerte wurden aus der Mittelwertberechnung ausgeschlossen.

		d_{ai}	1	2	3	4	$MW \pm SD$	CV [%]
RpCHS3	Pathogenholz	0	0,41	0,39	0,18	0,41	$0,35 \pm 0,11$	32,2
		3	9,09	(1,42)	7,36	20,16	$12,20 \pm 6,95$	56,9
		7	9,72	6,04	5,38	11,08	$8,05 \pm 2,61$	32,4
		30	(3,07)	25,21	(1,61)	18,02	$21,61 \pm 5,09$	23,5
		90	(1,04)	46,84	8,45	3,67	$19,66 \pm 23,67$	120,4
		360	57,19 (B)	55,92 (A)	97,52 (A)	109,2 (B)	$76,7 \pm 29,4$ (A) $83,2 \pm 36,7$ (B)	38,3 44,2
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			$MW \pm SD$	CV [%]
		0	0,39	0,18			$0,29 \pm 0,15$	52,7
		3	0,03	0,03			$0,03 \pm 0,0002$	0,5
		7	0,12	0,61			$0,36 \pm 0,35$	95,9
		30	0,01	0,009			$0,052 \pm 0,058$	112,3
		90	0,66	0,11			$0,384 \pm 0,385$	100,4
RpCHS4	Pathogenholz	d_{ai}	1	2	3	4	$MW \pm SD$	CV [%]
		0	0,24	0,14	(0,07)	0,26	$0,21 \pm 0,06$	30,0
		3	11,67	(1,58)	8,07	18,94	$12,89 \pm 5,54$	42,9
		7	14,95	6,15	3,63	8,86	$8,40 \pm 4,86$	57,9
		30	3,89	15,51	2,15	15,80	$9,34 \pm 7,33$	78,5
		90	6,92	18,52	30,05	14,13	$17,40 \pm 9,69$	55,7
	360	186,8 (B)	16,09 (A)	30,41 (A)	292,8 (B)	$23,3 \pm 10,1$ (A) 240 ± 75 (B)	43,5 31,3	
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			$MW \pm SD$	CV [%]
		0	0,14	0,07			$0,107 \pm 0,048$	44,6
		3	0,024	0,017			$0,021 \pm 0,005$	24,8
		7	0,13	0,15			$0,141 \pm 0,013$	9,3
		30	0,0063	0,048			$0,027 \pm 0,029$	108,5
90		0,46	0,35			$0,404 \pm 0,079$	19,5	
360	0,064	0,063			$0,064 \pm 0,001$	1,3		
RpCHS5	Pathogenholz	d_{ai}	1	2	3	4	$MW \pm SD$	CV [%]
		0	15,69	12,23	4,50	12,62	$11,3 \pm 4,8$	42,3
		3	47,91	(5,90)	29,41	76,49	$51,3 \pm 23,7$	46,3
		7	55,68	23,23	31,79	37,53	$37,1 \pm 13,7$	37,1
		30	20,83	38,16	(9,35)	52,80	$37,3 \pm 16,0$	43,0
		90	14,46	41,59	67,46	34,84	$39,6 \pm 21,9$	55,2
	360	182,0 (B)	17,59 (A)	34,39 (A)	425,9 (B)	$26,0 \pm 11,9$ (A) 304 ± 172 (B)	45,7 56,7	
	Kontrollen	d_{ai}	1	2			$MW \pm SD$	CV [%]
		0	12,23	4,50			$8,36 \pm 5,47$	65,4
		3	0,072	0,088			$0,080 \pm 0,011$	14,2
		7	0,823	1,377			$1,100 \pm 0,391$	35,6
		30	0,032	0,191			$0,111 \pm 0,113$	101,0
90		0,524	0,551			$0,538 \pm 0,019$	3,6	
360	0,114	0,104			$0,109 \pm 0,007$	6,8		

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften, Zentrum Holzwirtschaft der Universität Hamburg. Sie wurde finanziell unterstützt von der Gesellschaft der Freunde und Förderer des Zentrums Holzwirtschaft der Universität Hamburg e.V.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern, die mich bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben:

Prof. Dr. Elisabeth Magel

Ute Moreth

Gabriele Lütje

Steven Dewitz

Stefanie Ruben

Dr. Eckardt Melcher

Außerdem möchte ich mich bedanken bei:

Gesellschaft der Freunde und Förderer des Zentrums Holzwirtschaft
der Universität Hamburg e.V.

AG Hedrich, Universität Würzburg

Christine Franke, Försterin der Revierförsterei Bergedorf

Ferner möchte ich meiner Frau Robina danken für ihre Geduld und den Glauben an mich.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Außerdem erkläre ich, dass ich mich weder an einer anderen Universität um eine Promotion beworben, noch die Dissertation an einer anderen Universität eingereicht habe.

Hamburg, August 2009

H. Lauge