

Friedrich-Schiller-Universität Jena
Fakultät für Biowissenschaften



Max-Planck-Institut für chemische Ökologie
Abteilung Biochemie



Untersuchung Pathogen-induzierter Abwehrverbindungen in *Populus trichocarpa* Wurzeln

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science

vorgelegt von

Jennifer Morawetz

geboren am 20.09.1991 in Siegburg

Jena, den 30.09.2020

Gutachter:

Prof. Dr. Ralf Oelmüller

Dr. Tobias Köllner

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 Einleitung	1
1.1 Die pflanzliche Pathogenabwehr	1
1.2 Phytohormone	4
1.3 Aromaten	5
1.4 Salicinoide.....	6
1.5 Fettsäuren.....	7
1.6 Terpene.....	7
1.7 Terpen-Biosynthese.....	8
1.8 Terpensynthase	10
1.9 Die Modellorganismen	11
1.9.1 <i>Populus trichocarpa</i>	11
1.9.2 <i>Phytophthora cactorum</i>	12
1.10 Zielsetzung.....	13
2 Material	14
2.1 Verbrauchsmaterial.....	14
2.2 Pflanzenmaterial	14
2.3 Kultivierung von <i>Phytophthora cactorum</i>	15
2.4 Induktion von Abwehrverbindungen in <i>P. trichocarpa</i> Wurzeln	15
3 Methoden	17
3.1 Molekularbiologische Methoden	17
3.1.1 RNA Extraktion	17
3.1.2 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung	17
3.1.3 cDNA-Synthese.....	18
3.1.4 qRT-PCR	18
3.1.5 Phusion-PCR.....	19
3.1.6 Agarosegelelektrophorese	20
3.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten	20
3.1.8 TOPO®-Klonierung	21
3.1.9 Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> – Zellen.....	21
3.1.10 Kolonie-PCR.....	22
3.1.11 Plasmidaufreinigung.....	23
3.1.12 Sequenzierung	23
3.1.13 Transkriptomdaten	24

3.2	Heterologe Expression der Terpensynthase.....	24
3.2.1	Expression und Aufreinigung von PtTPS5.....	24
3.2.2	Enzymassay	25
3.3	Analytik	26
3.3.1	<i>n</i> -Hexan-Extrakte für die Analyse apolarer Verbindungen	26
3.3.2	Gaschromatographie.....	26
3.3.3	Methanol-Extrakte für die Analyse von polaren Verbindungen	27
3.3.4	HPLC-DAD	27
3.3.5	Flüssigchromatographie.....	28
3.4	Auswertung.....	30
4	Ergebnisse	31
4.1	Analyse polarer Pathogen-induzierter Abwehrverbindungen in <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	31
4.2	Analyse apolarer Pathogen-induzierter Abwehrverbindungen in <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	34
4.2.1	Hydrokultorexperiment 1: Identifikation potentieller apolarer Abwehrverbindungen nach Pathogenbefall	34
4.2.2	Hydrokultorexperiment 2: Wiederholte Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes nach Pathogenbefall	38
4.2.3	Erdexperiment: Keine Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes bei der Kultivierung von Pappeln in Erde.....	39
4.3	Transkriptomdaten.....	41
4.4	Potentieller Zusammenhang zwischen Genexpression von <i>PtTPS5</i> , Produkt-Akkumulation und Infektion in <i>P. trichocarpa</i> Wurzeln.....	43
4.5	Heterologe Expression und Enzymassay der Sesquiterpen-Synthase <i>PtTPS5</i>	45
5	Diskussion.....	47
5.1	Potentielle Rolle von polaren Verbindungen in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion.....	47
5.2	Potentielle Rolle von apolaren Verbindungen in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion	49
5.3	Identifikation von potentiellen Abwehrsynthese-Wegen	51
5.4	Charakterisierung von <i>PtTPS5</i> und weiterführende Versuche	55
5.5	Potentieller Abwehrmechanismus der Wurzel auf eine <i>P. cactorum</i> Infektion	56
6	Zusammenfassung.....	58
7	Abstract	59
	Danksagung	X
	Literaturverzeichnis	XI
	Anhang	XXVI
	Selbstständigkeitserklärung	XXXV

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz für den ersten Teil der cDNA-Synthese.	18
Tabelle 2: Komponenten für die Ergänzung des ersten Reaktionsansatzes.....	18
Tabelle 3: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese.....	18
Tabelle 4: Reaktionsansatz einer qRT-PCR.	19
Tabelle 5: Reaktionsansatz der Phusion-PCR.....	19
Tabelle 6: Thermocycler-Programm für die Amplifikation von PtTPS5 mit Hilfe der Phusion-PCR.	20
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Ligation der PCR-Produkte.	21
Tabelle 8: Beispielhafter Reaktionsansatz einer Kolonie-PCR.	22
Tabelle 9: Thermocycler-Programm für die Amplifikation der Vektorinserts.	22
Tabelle 10: Reaktionsansatz der Sequenzierung.	23
Tabelle 11: Thermocycler-Programm der Sequenzierung.....	24
Tabelle 12: Beispielhafte Zusammensetzung eines Enzymassays mit einem finalen Reaktionsvolumen von 100 µl.	25
Tabelle 13: Elutionsprofil der HPLC-DAD für die Analyse von Salicinoiden.	27
Tabelle 14: Übersicht über die Retentionszeiten und RRF-Werte der Salicinoide.....	28
Tabelle 15: Elutionsprofil für die Analyse von Phytohormonen.	28
Tabelle 16: Elutionsprofil für die Analyse von Salicinoiden, glykosylierten Phytohormonen und phenolischen Verbindungen.	28
Tabelle 17: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) zur Untersuchung von Phytohormonen.....	29
Tabelle 18: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) zur Untersuchung von Salicinoiden, glykosylierten Phytohormonen und phenolischen Verbindungen.	29
Tabelle 19: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	XXVI
Tabelle 20: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) der internen Standards.	XXVI
Tabelle 21: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Phytohormonen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	XXVI
Tabelle 22: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Salicinoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	XXVII
Tabelle 23: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an phenolischen Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	XXVII
Tabelle 24: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Phenylpropanoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	XXVII

Tabelle 25: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Fettsäuren und ihren Vorstufen (Myristaldehyd) in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	XXVIII
Tabelle 26: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Terpenen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	XXVIII
Tabelle 27: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an unbekanntem Verbindungen (U) in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.....	XXVIII
Tabelle 28: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an apolaren Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln bei der Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes.....	XXIX
Tabelle 29: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an apolaren Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln bei der Wiederholung des Experimentes in Erde.....	XXIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die zwei-stufige pflanzlichen Immunität nach dem „ZickZack“ Modell von Jones und Dangl, 2006.	2
Abbildung 2: Beispiel für Phytohormone.....	4
Abbildung 3: Beispiel für Aromaten.	5
Abbildung 4: Beispiel für Salicinoide.....	6
Abbildung 5: Beispiel für Fettsäuren.	7
Abbildung 6: Beispiel für Mono- (1,8-Cineol) und Sesquiterpenalkohol (Elemol).	8
Abbildung 7: Vereinfachte Übersicht der Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen.	9
Abbildung 8: Phytohormongehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	31
Abbildung 9: Gehalt an glykosylierten bzw. sulfatierten Phytohormonen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	32
Abbildung 10: Gehalt an Salicinoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	33
Abbildung 11: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten nicht infizierter (Kontrolle), durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierter (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln und dem Myzel von <i>P. cactorum</i>	35
Abbildung 12: Aromatengehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln unterteilt nach dem Vorkommen der Verbindungen (A: in <i>P. trichocarpa</i> Wurzelextrakten und <i>P. cactorum</i> Myzel vorhanden, B: nur in <i>P. trichocarpa</i> Wurzelextrakten vorhanden).	36
Abbildung 13: Fettsäuregehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln unterteilt nach dem Vorkommen der Verbindungen (A: in <i>P. trichocarpa</i> Wurzelextrakten und <i>P. cactorum</i> Myzel vorhanden, B: nur in <i>P. trichocarpa</i> Wurzelextrakten vorhanden).	36
Abbildung 14: Terpenegehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	37
Abbildung 15: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten nicht infizierter (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierter (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln ermittelt in der Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes.	38
Abbildung 16: Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes zur Bestimmung des Terpenegehalts in nicht infizierten (Kontrolle) und durch <i>Phytophthora cactorum</i> infizierten (Infektion) <i>Populus trichocarpa</i> Wurzeln.	39

Abbildung 17: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten aus nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln..... 40

Abbildung 18: Kategorien (A) von signifikant hochregulierter Kandidatengen im Vergleich zwischen nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln und die relative Genexpression der identifizierten Terpensynthase *PtTPS5* (Potri.005G095500) (B). 41

Abbildung 19: Vergleich zwischen Produktakkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes, Genexpression von *PtTPS5* und Infektion der *Populus trichocarpa* Wurzeln mit *Phytophthora cactorum* in zwei verschiedenen Experimentaufbauten (Hydrokultur und Erde). 43

Abbildung 20: Vergleich repräsentativer GC-MS Chromatogramme (A) und Massenspektren (B und C) von *n*-Hexan-Extrakten aus *Phytophthora cactorum* infizierten *Populus trichocarpa* Wurzeln (Infektion) und dem *PtTPS5* Produkt. 45

Abbildung 21: Potentielle Immunantwort von *P. trichocarpa* Wurzeln auf eine Infektion mit *P. cactorum*. 57

Abbildung 22: Massenspektren der unbekanntes Verbindungen aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe. XXX

Abbildung 23: Massenspektren der unbekanntes Verbindungen aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe. XXXI

Abbildung 24: Vergleich der Massenspektren von gesättigten (A-B; D) und ungesättigten Fettsäuren (C) zwischen authentischen Standards (Standard) und der identifizierten Fettsäuren aus der Versuchsprobe (Probe). XXXII

Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren von Pentadecansäure zwischen dem authentischen Standard (Standard) und der identifizierten Fettsäure aus der Versuchsprobe (Probe). XXXIII

Abbildung 26: Vergleich der Terpen- Massenspektren von Limonen (A), 1,8-Cineol (B) und α -Terpineol (C) zwischen dem jeweiligen Standard und dem identifizierten Terpen aus der Versuchsprobe (Probe). XXXIII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2-PhenyletOH	2-Phenylethylalkohol
12-JA-Sulfat	12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat
ABA	Abscisinsäure
BALD	Benzaldehyd
BnOH	Benzylalkohol
bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
CE	Kollisionsenergie
<i>cis</i> -OPDA	<i>cis</i> -Oxophytodiensäure
cm	Zentimeter
CXP	Kollisionszellenaustrittspotential
D ₄ -SA	Vierfach deuterierte Salicylsäure
D ₆ -JA	Sechsfach deuterierte Jasmonsäure
D ₆ -ABA	Sechsfach deuterierte Abscisinsäure
D ₆ -JA-Ile	Sechsfach deuteriertes Jasmonsäure-Isoleucin-Konjugat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP	Fragmentierungspotential
EDGE	Estimated Degree of Gene Expression
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EP	Eingangspotential
ETI	<i>Effector-triggered immunity</i>
ETS	<i>Effector-triggered-susceptibility</i>
eV	Elektronvolt
FA	Fettsäuren
Fe ^{2+/3+}	Eisen
FeSO ₄	Eisen(II)-sulfat
FG	Frischgewicht
FPP	Farnesyldiphosphat
g	Erdbeschleunigung

GC-FID	Gaschromatographie mit Flammenionisationsdetektor
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
GPP	Geranyldiphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HIS	<i>Histone superfamily protein 3</i>
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HPLC-DAD	Hochdruckflüssigchromatographie mit Diodenarray-Detektor
HR	Hypersensitive response
IPP	Isopentenylidiphosphat
IS	Interner Standard
Ile	Isoleucin
JA	Jasmonsäure
kb	Kilobase
Kd	Keine Detektion
L	Liter
LC	Flüssigchromatographie
LC-MS/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
MEP	2-C-Methylerythritol-4-phosphat
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
ml	Milliliter
m	Meter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MRM	Multiple Reaktionsüberwachung
MS	Massenspektrometrie
MVA	Acetat-Mevalonat
<i>m/z</i>	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
ng	Nanogramm
NIST	National Institute of Standards and Technology Libraries
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading Frame</i>

PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Phenolische Glykoside
pH	<i>potentia hydrogenii</i> , „Stärke des Wasserstoffs“
PTI	<i>PAMP-triggered immunity</i>
psi	<i>Pound-force per square inch</i>
RPKM	reads per kilobase of exon per million fragments mapped
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RRF	<i>Relative response factore</i>
RT	Retentionszeit
Q1	Quadrupol 1
Q3	Quadrupol 3
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
s/sec	Sekunden
SA	Salicylsäure
SA-Glc	Salicylsäure-2-O-D-Glykosid
SAR	Systemisch erworbenen Resistenz
SALD	Salicylaldehyd
S.O.C.	<i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
T _m	Schmelztemperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TFs	Transkriptionsfaktoren
TIC	Total Ion Count
TPS	Terpensynthasen
V	Volt
vgl.	Vergleiche
VOC	flüchtige organische Verbindungen
v/v	Volumenprozent
Ypt1	<i>ras-related protein</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar

1 Einleitung

Die Verhinderung von Ertragsverlusten, welche durch überirdischen und unterirdischen Pathogenbefall erzeugt werden können, ist ein höchst relevantes Thema der Pflanzenforschung. Die Relevanz ergibt sich einerseits aus der Bedeutung von Kultur-, Zier- und Gehölzpflanzen für diverse Ökosysteme und ihre Verwendung in der Wirtschaft zur Herstellung zahlreicher Produkte. Andererseits existieren resistente Pathogene, deren Bekämpfung einen stetig höheren Einsatz von Fungiziden und Pestiziden verlangt und damit zu einer steigenden Umweltbelastung beiträgt (Jeffers *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2014). In diesem Themenkomplex ist insbesondere die Analyse der natürlichen Wurzelabwehr von Pflanzen bedeutsam. Die Ergebnisse einer solchen Untersuchung könnten zu einer besseren wirtschaftlichen und ökologischen Nutzbarkeit beitragen und die Entwicklung krankheitsresistenter Pflanzenkultivare erleichtern. In der vorliegenden Arbeit wird die Pflanzen-Pathogen-Interaktion mit Schwerpunkt auf die Wurzelabwehr untersucht. Am Beispiel von *Populus trichocarpa* werden die pathogen-induzierten Abwehrverbindungen in den Wurzeln nach dem Befall mit dem Oomyzeten *Phytophthora cactorum* identifiziert und analysiert.

1.1 Die pflanzliche Pathogenabwehr

Ein lebenswichtiges Grundorgan der Pflanze stellen die Wurzeln für die Aufnahme von Wasser, Mineralstoffen und der Speicherung von Reservestoffen dar. Wurzeln stehen in der Rhizosphäre im ständigen Kontakt mit Pathogenen, wie zum Beispiel Pilzen, Bakterien, Viren und Oomyzeten. Je nach Art der Interaktion mit der Wirtspflanze werden Pathogene in biotrophe, hemibiotrophe oder nekrotrophe unterschieden. Biotrophe Pathogene beziehen ihre Nährstoffe aus lebenden Zellen, wohingegen nekrotrophe Pathogene ihre Wirtszelle abtöten, um Energie aus Zellresten zu gewinnen (Oliver und Ipcho, 2004). Hemibiotrophe Pathogene, wie zum Beispiel Vertreter der Gattung *Phytophthora*, besitzen eine anfängliche biotrophe Lebensphase, welche im späteren Verlauf der Wurzelinfektion zu Nekrotrophie wechselt (Oßwald *et al.*, 2014). Bei Nutzpflanzen führen hemibiotrophe oder nekrotrophe Wurzelpathogene zu erheblichen Ertragseinbußen in der Agrarwirtschaft (Scott *et al.*, 2013). Da Pflanzen ortsgebunden sind, können sie diesen Pathogenen nicht wie andere bewegliche Organismen räumlich entkommen. Pflanzen haben hingegen andere differenzierte Verteidigungsstrategien entwickelt, um Schädlingsbefall entgegenzuwirken.

Die Pflanzenabwehr umfasst konstitutive und induzierte Abwehrreaktionen, die mehrere Schutzschichten gegen das Eindringen von Pathogenen bietet (Anderson *et al.*, 2010). Zu der konstitutiven Abwehr zählen unter anderem morphologische Komponenten wie Wachsschichten, Trichome oder eine gesteigerte Blätter- und Wurzelwiderstandsfähigkeit

(Fürstenberg-Hägg *et al.*, 2013). Im Kontrast zu Tieren besitzen Pflanzen keine mobilen Immunzellen und kein somatisches, adaptives Immunsystem. Somit muss jede Pflanzenzelle selbst auf eine Pathogeninfektion reagieren. Durch evolutionären Druck innerhalb der Pflanzen-Pathogen-Interaktion hat sich ein System mit zwei unterscheidbaren Phasen der Immunantwort entwickelt (Jones und Dangl, 2006). Diese Immunantwort innerhalb der induzierten Abwehr besteht aus der PAMP-ausgelösten Immunität (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*; PTI, *PAMP-triggered immunity*) und Effektor-ausgelösten Immunität (ETI, *Effector-triggered immunity*) (Jones und Dangl, 2006; Doughari, 2015, vgl. Abbildung 1).

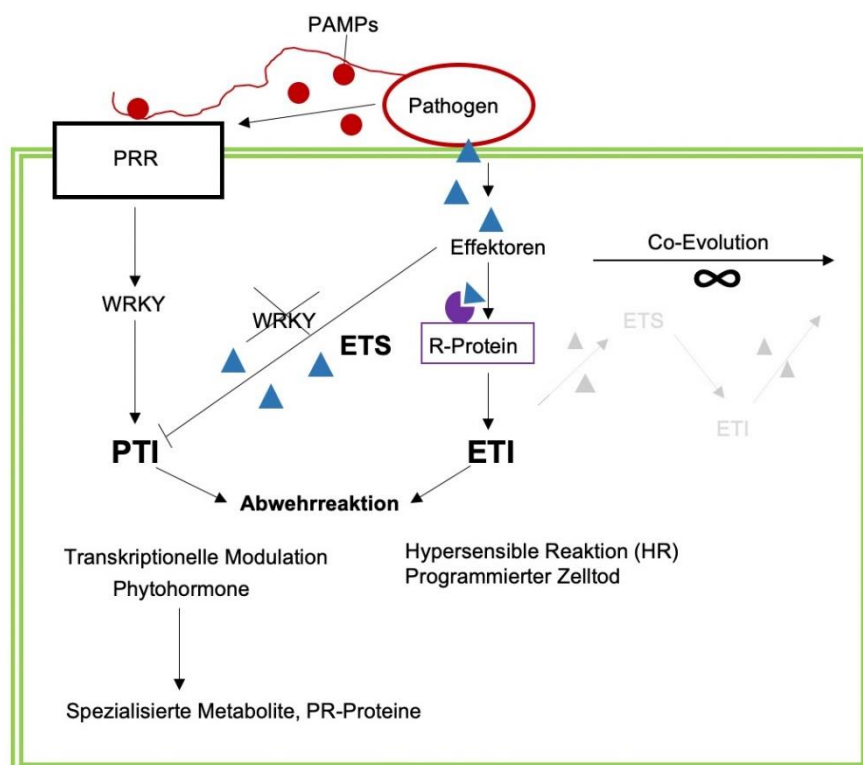


Abbildung 1: Übersicht über die zwei-stufige pflanzlichen Immunität nach dem „ZickZack“ Modell von Jones und Dangl, 2006.

Nach Pathogenbefall werden pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) von Mustererkennungsrezeptoren (PPR) erkannt und aktivieren nachgeschaltete Signalkaskaden, hauptsächlich über WRKY-Transkriptionsfaktoren, welches zu einer PAMP-ausgelöste Immunität (PTI) führt. Virulente Pathogene können über Effektoren die PTI unterdrücken, welches zu einer Effektor-ausgelösten Suszeptibilität (ETS) führt. Als Folge dessen haben Pflanzen Resistenzproteine (R-Proteine) gebildet, welche die Effektoren erkennen und eine Effektor-ausgelöste Immunität (ETI) induzieren. Unter Selektionsdruck verändern Pathogene ihre Effektoren um eine ETI zu vermeiden und erlangen eine neue ETS. Als Konsequenz daraus, können über evolutionäre Prozesse neue R-Proteine (codiert von R-Genen) entstehen und eine neue ETI etablieren (Co-Evolution). Sowohl PTI als auch ETI führen nachgeschaltet zu Abwehrreaktionen, welche je nach Pathogen moduliert werden.

Die Pflanze erkennt dabei hochkonservierte pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) über membranassoziierte Mustererkennungsrezeptoren (PPR, *Pattern Recognition Receptors*). Bekannte PAMPs sind beispielsweise bakterielles Flagellin und Lipopolysaccharide oder pilzliches Chitin (Jones und Dangl, 2006; Monaghan und Zipfel, 2012). Die Bindung von PAMPs durch PRRs führt zu einer basalen Immunität der Pflanze, die PTI. Als Folge kommt es zu einer Induktion einer Vielzahl von nachgelagerten Signalkaskaden, hauptsächlich reguliert über WRKY-Transkriptionsfaktoren (TFs). Diese TFs besitzen eine

hochkonservierte DNA-Binderegion mit der Peptidsequenz WRKYGQK und einem Zink-Finger Motiv, welche an die W-Box (*cis*-regulatorisches Element) der DNA binden (Pandey und Somssich, 2009). Die hierdurch ausgelösten Transkriptom-Remodellierungen haben nachgelagerte Effekte auf die Biosynthese von Phytohormonen, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Expression von PR (Pathogenesis-related)-Proteinen und der Akkumulation von antimikrobiellen Verbindungen (Phytoalexine) bzw. spezialisierten Metaboliten (Averyanov, 2009; Andolfo und Ercolano, 2015; Wink, 2018; Nakkeeran *et al.*, 2020). Besonders die freigesetzten spezialisierten Metabolite besitzen vielfältige Funktionen in der Pathogenabwehr und der Kommunikation zwischen Pflanzen. Sie werden meist als flüchtige organische Verbindungen (VOC) (Unsicker *et al.*, 2009) von geschädigtem Gewebe emittiert.

Im Verlauf der Evolution konnten einzelne erfolgreiche phytopathogene Arten diese basale pflanzliche Immunitätsbarriere durch den Erwerb von Virulenzfaktoren bzw. Effektorproteinen überwinden. Ein Beispiel hierfür sind Vertreter der Gattung *Phytophthora*, welche die PTI durch ihre segregierten Effektoren unterdrücken können, was zu einer Effektor-ausgelösten Suszeptibilität (ETS, (*Effector-triggered-susceptibility*) der Pflanze führt und damit die basale Immunität der Pflanze umgangen wird (Fabro *et al.*, 2011; Jiang und Tyler, 2011). Als Reaktion darauf entwickelte sich auf Pflanzenseite ein „zweites immunologisches Schutzschild“, welches diese Virulenzfaktoren bzw. Effektorproteine über R-(Resistenz)-Genkodierte NB-LRR-Proteine erkennt und damit eine ETI aktiviert (Jones und Dangl, 2006). NB-LRR-Proteine sind benannt nach ihrer in Domänen eingeteilten Struktur, welche eine zentrale Nukleotid-Binderegion (NB, „nucleotide-binding“) und C-terminale Leucin-reiche Wiederholungsdomäne (LRR- Leucine-rich repeat) enthält (Collier und Moffett, 2009). Die ETI führt hauptsächlich zu unspezifischen Reaktionen, wie dem programmierten Zelltod („programmed cell death“) oder der hypersensiblen Reaktion (HR, hypersensitive response) (Oßwald *et al.*, 2014), welche schnell die Ausbreitung des Pathogens verhindern (Jones und Dangl, 2006; Naveed und Ali, 2018). Damit kann die ETI nur bei (hemi)biotrophen Pathogenen als Resistenzmechanismus wirken, da nekrotrophe Pathogene vom Absterben des Wirtsgewebes profitieren (Glazebrook, 2005). Die ETI kann jedoch ebenfalls von Pathogenen überwunden werden. Diese Co-Evolution mit gegenseitigem Selektionsdruck auf Pathogene und Pflanzen mit Effektoren oder R-Proteinen (Anderson *et al.*, 2010) und die daraus entstehende Resistenz/Suszeptibilität lässt sich mit dem „Zick-Zack-Modell“ nach Jones und Dangl, 2006 beschreiben (vgl. Abbildung 1).

1.2 Phytohormone

Die Interaktion zwischen Pflanzen und Pathogenen führt zu einer Veränderung des Gehalts an verschiedenen Phytohormonen, welche nachgeschaltet Signaltransduktionswege aktivieren und die Transkription von Abwehrgenen induzieren und entscheidend die PTI- und ETI-Immunantwort der Pflanze modulieren (Bari und Jones, 2009; Andolfo und Ercolano, 2015). Ebenfalls spielen Phytohormone eine wichtige Rolle bei verschiedenen Wachstums- und Entwicklungsprozessen und verschiedenen abiotischen Stressreaktionen in Pflanzen (Wani *et al.*, 2016).

Es wird gemeinhin angenommen, dass die pflanzliche Abwehrreaktion gegen biotrophe und hemibiotrophe Pathogene durch Salicylsäure (SA)-Signale (vgl. Abbildung 2) vermittelt wird, die zu einer HR (Lamb und Dixon, 1997), gefolgt von der Etablierung einer systemisch erworbenen Resistenz (SAR), führt (Chen *et al.*, 1995; Grant und Lamb, 2006). Das glykosylierte Phytohormon Salicylsäure-2-O-D-Glykosid (SA-Glc) spielt als lokaler SA-Speicher an infizierten Stellen ebenfalls eine entscheidende Rolle (Chen *et al.*, 1995). Ähnlich zu anderen Verteidigungsglycosiden kann bei Beschädigung des Gewebes SA-Glc in den Extrazellularraum freigesetzt und dort hydrolysiert werden (Hennig *et al.*, 1993). Auf diese Weise werden bei einer wiederholten Infektion schnell hohe SA-Konzentrationen generiert, welche zu einer schnelleren und effektiveren Pathogenabwehr führen (Hennig *et al.*, 1993). Die über den Oktadekanoidweg synthetisierte Jasmonsäure (JA) (vgl. Abbildung 2) ist weitgehend an der Abwehr nekrotropher Krankheitserreger und Insekten beteiligt.

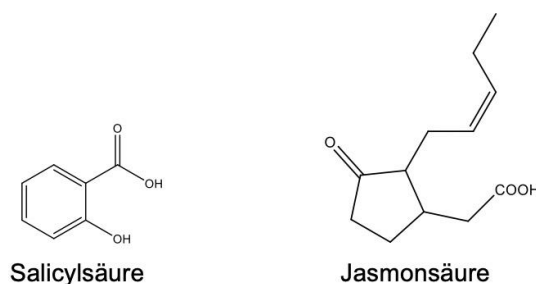


Abbildung 2: Beispiel für Phytohormone.

Nachgeschaltet führt diese Aktivierung zu einer Akkumulation von Sekundärmetaboliten (Aromaten, Terpene, Fettsäuren und Salicinoiden) und PR (*Pathogenesis-related-protein*)-Proteinen (Glazebrook, 2005). Dem JA-Grundgerüst können auch mehrere funktionelle Gruppen hinzugefügt werden, darunter Isoleucin-, Hydroxyl-, Carboxyl-, Methyl-, Glycosyl- und Sulfatesterreste, die für die Aktivierung, Deaktivierung oder den Transport von Jasmonatsignalen wichtig sein können (Wasternack und Hause, 2013). Zum Beispiel kann eine Feinregulierung des Jasmonsäuresignalweges über das sulfatierte Zwischenprodukt 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat (12-JA-Sulfat) erfolgen (Miersch *et al.*, 2008).

Diese pathogen-induzierte Veränderung des Pflanzenhormonspiegels über die PTI und ETI führt nachgeschaltet zu Veränderungen in der Expression pflanzenabwehrbezogener Gene

und zur Aktivierung von Abwehrreaktionen und zur Akkumulation von spezialisierten Metaboliten (Bari und Jones, 2009). In den weiteren Kapiteln wird auf die verschiedenen spezialisierten Metabolite eingegangen, welche bei einer Abwehrreaktion der Pflanze gegen Pathogene im pflanzlichen Gewebe potentiell akkumulieren können.

1.3 Aromaten

Eine große Gruppe an weitverbreiteten spezialisierten Abwehrstoffen in Pflanzen stellen die aromatischen Verbindungen dar. Aromaten bilden einen charakteristischen Bestandteil pflanzlicher VOC-Bouquets (Unsicker *et al.*, 2009). Auch Verbindungen mit großer pharmakologischer Bedeutung zählen in diese Klasse wie zum Beispiel das lokale Analgetikum Kokain (Bjorklund und Leete, 1992), die schmerzstillende Acetylsalicylsäure (Jack, 1997) und das entzündungshemmende Resveratrol (Ramírez-Garza *et al.*, 2018) (vgl. Abbildung 3).

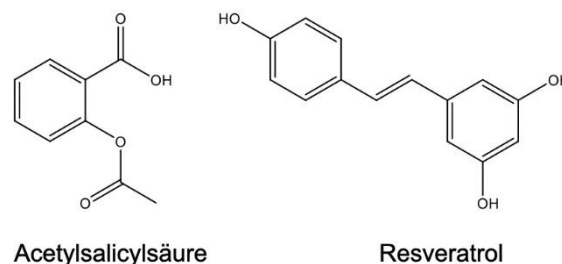


Abbildung 3: Beispiel für Aromaten.

Die gemeinsame Struktur aller Aromaten ist das Vorhandensein eines Phenolrings. Die Aromaten werden in Phenylpropanoide (C₆-C₃) (z. B. Flavonoide, Stilbene, phenolische Glykoside (PG) und Cumarine) und einfache Phenole (C₆-C₁) unterteilt (Vogt, 2010; Widhalm und Dudareva, 2015). Die Biosynthese ihres Grundgerüsts erfolgt über den Shikimisäureweg (Widhalm und Dudareva, 2015). Erhöhte Level an Aromaten in infizierten Pflanzengeweben sind häufig mit einer Resistenzentwicklung gegenüber Pathogenen bei Angiospermen verbunden (Ockels *et al.*, 2007). Zum Beispiel emittiert bei *P. trichocarpa* nach Herbivorie unter anderem 2-Phenylethanol in Folge der pflanzlichen Abwehrreaktion (Günther *et al.*, 2019). Bei Weidengewächsen sind phenolische Glykoside (PGs) die wichtigste Klasse für die Bildung von spezialisierten Abwehrverbindungen (Boeckler *et al.*, 2011; Philippe und Bohlmann, 2011). Im Pflanzentrockengewicht können Konzentrationen von bis zu 30 % an PGs erreicht werden (Donaldson *et al.*, 2006).

1.4 Salicinoide

Phenolische Glykoside (PG) spielen eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Weidengewächsen (*Salicaceae*) und Schädlingen und dienen innerhalb dieser Interaktion unter anderem als Abwehrverbindungen oder Fraßrepellenzien (Chen *et al.*, 2009; Boeckler *et al.*, 2011). Um eine bestimmte Art von PG zu beschreiben, wurde der Terminus „Salicinoide“ eingeführt (Boeckler *et al.*, 2011). Salicinoide kommen ausschließlich in Weidengewächsen (*Populus spp.* und *Salix spp.*) und einigen anderen verwandten Arten vor. Es wurden dort bisher mehr als 20 verschiedene Salicinoide beschrieben (Boeckler *et al.*, 2011). Wie andere spezialisierte Metabolite werden Salicinoide durch ihre chemische Struktur definiert (Boeckler *et al.*, 2011). Das Grundstrukturelement ist Salicin (2-Hydroxymethyl-phenyl- β -D-Glucopyranosid) (vgl. Abbildung 4), welches aus Salicylalkohol mit einer Etherbindung an das anomere C-Atom der β -D-Glucopyranose gebunden ist. Derivate dieser Kernstruktur werden als komplexe Salicinoide bezeichnet. Hierbei erfolgen Modifikationen häufig an den primären Alkoholgruppen des Salicylalkohols oder an der 2' und/oder 6' Hydroxygruppe der Glukose. Die neben Salicin häufigsten komplexeren Verbindungen sind Salicortin und Tremulacin (vgl. Abbildung 4) (Boeckler *et al.*, 2011).

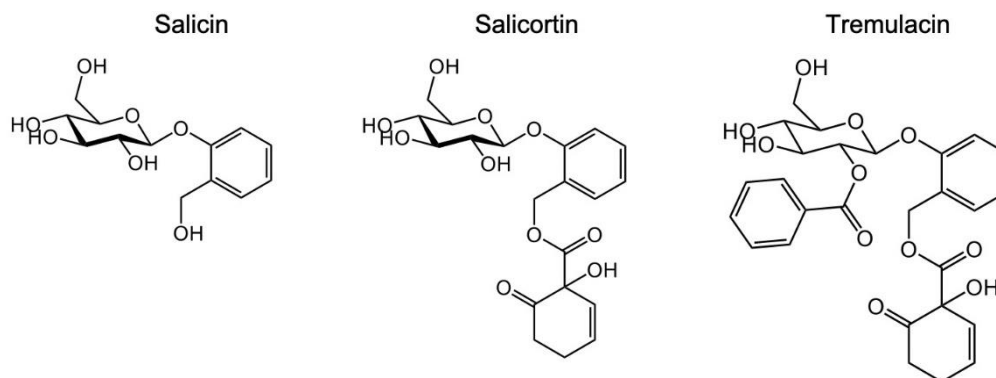


Abbildung 4: Beispiel für Salicinoide.

Der Gehalt an Salicinoiden ist in den Weidengewächsen beeinflusst durch Tages- und Jahreszeiten, den Gewebetypen (Palo, 1984; Boeckler *et al.*, 2011) und dem jeweiligen Genotyp der Pflanze (Osier und Lindroth, 2006; Boeckler *et al.*, 2011). Als Abwehrverbindungen stellen Salicinoide eine inaktive Speicherform dar, deren Bildung über den Shikimatweg postuliert ist (Zenk, 1967; Babst *et al.*, 2010) und die erst durch die Abspaltung ihrer Glucoseeinheit ihre toxische Wirkung entfalten (Boeckler *et al.*, 2016). Neben ihrer Aufgabe als Abwehrverbindungen können modifizierte Salicinoide wie zum Beispiel Salicin-7-Sulfat bzw. Salirepin-7-sulfat auch zur Speicherung von Mineralstoffen hier im speziellen als Schwefelspeicher dienen (Lackus *et al.*, 2020).

1.5 Fettsäuren

Fettsäuren (FA) sind allgemein organische Säuren mit einer Carboxylgruppe (-COOH), einer in der Länge variierender Alkylgruppe $-(\text{CH}_2)_n$ und verschiedenen Sättigungsgraden der Kohlenstoffbindungen. Gesättigte Fettsäuren verfügen nur über Einfachbindungen innerhalb der Alkylgruppe ($\text{C}_n:0$), während ungesättigte Fettsäuren auch Doppelbindungen (X) in der Alkylkette haben ($\text{C}_n:X$). Natürlich vorkommende Fettsäureketten bestehen aus 4-28 Kohlenstoffen innerhalb der Alkylgruppe. Palmitinsäure ($\text{C}_{16}:0$), Stearinsäure ($\text{C}_{18}:0$), Ölsäure ($\text{C}_{18}:1$), Linolsäure ($\text{C}_{18}:2$) und Linolensäuren ($\text{C}_{18}:3$) sind die häufige FAs in Pflanzenlipiden (Fatiha, 2019). Sie sind involviert in der Energiespeicherung, den Membranstrukturen (Phospholipid-Doppelschicht) und verschiedenen Signalwegen. Die Fettsäurebiosynthese in Pflanzen erfolgt in den Chloroplasten und in den Plastiden von nicht-photosynthetisch aktiven Geweben. In Pflanzen findet die *de-novo*-Fettsäuresynthese hauptsächlich im Plastiden aus Acetyl-CoA unter Beteiligung der zwei Hauptenzyme Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) und Fettsäure-Synthase (FAS) statt (Thelen und Ohlogge, 2002). Freie Fettsäuren tragen durch ihre Interkalation in die Pilzmembran und einer dadurch bedingten Erhöhung deren Fluidität zu einer Reduktion des Pilzwachstums bei (Pohl *et al.*, 2011). Palmitinsäure, Stearinsäure, Linolsäure nahmen in der Pappel nach Co-Kultivierung mit Pilzen zu und könnten somit eine potentielle Abwehrverbindung darstellen (Timothy *et al.*, 2014). Besonders die FAs Myristinsäure ($\text{C}_{14}:0$) und Pentadecansäure ($\text{C}_{15}:0$) (vgl. Abbildung 5) werden in der Literatur oft wegen ihrer antibakteriellen und antimykotischen Wirkung hervorgehoben (Agoramoorthy *et al.*, 2007; Pohl *et al.*, 2011).

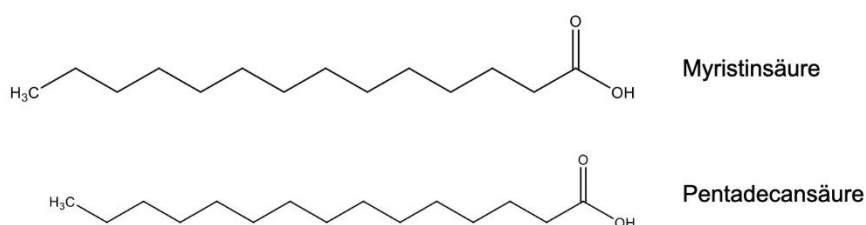


Abbildung 5: Beispiel für Fettsäuren.

1.6 Terpene

Zu der größten und vielfältigsten Gruppe an spezialisierten Pflanzeninhaltsstoffen zählen die Terpene (Gershenzon und Kreis, 2018). Terpene besitzen wichtige Funktionen im primären Metabolismus zum Beispiel als Wachstumsregulatoren wie Gibberellin und Cytokinen, sowie Abscisinsäure (ABA) (Pichersky und Raguso, 2018). Daneben spielen sie hauptsächlich eine spezialisierte Rolle in der Pflanzen-Umweltinteraktion bzw. Pflanzen-Pflanzen Interaktion (Singh und Sharma, 2015; Tholl, 2015). Terpene bilden neben Aromaten charakteristische Bestandteile pflanzlicher VOC-Bouquets (Unsicker *et al.*, 2009). Gegenwärtig sind ca. 40.000

Terpen-Verbindungen bekannt (Abbas *et al.*, 2017). Das gemeinsame Merkmal aller Terpene ist ihre Biosynthese aus Isoprenoid-Einheiten und die daraus resultierende strukturelle Zusammensetzung aus C₅-Einheiten (McGarvey und Croteau, 1995). Terpene werden basierend auf der Anzahl ihrer C₅-Einheiten in Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀) oder Polyterpene (C_{5n}) unterteilt. In mehreren Studien wurde eine Akkumulation von Terpenen als direkte oder indirekte pflanzliche Abwehrreaktion beschrieben (Portero *et al.*, 2012; Sherif *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017; Jiang *et al.*, 2018). Das Sesquiterpen (*E*)-β-Caryophyllen spielt in *Arabidopsis thaliana* als Abwehr gegen Pathogene des Blütengewebes sowie bei der Anlockung von Bestäubern eine große Rolle (Huang *et al.*, 2012). In den Wurzeln von *Zea mays* lockt (*E*)-β-Caryophyllen entomopathogenen Nematoden (*Heterorhabditis megidis*) an, welche die Larven des Wurzelschädling *Diabrotica virgifera virgifera* befallen (Rasmann *et al.*, 2005). Yadav *et al.*, 2019 konnte eine Akkumulation von Sesquiterpenen bzw. Sesquiterpenalkoholen im Wurzelgewebe von Klee (*Medicago truncatula*) nach einer Infektion mit dem Oomyzeten *Aphanomyces euteiches* zeigen. Ein Beispiel für einen Sesquiterpenalkohol ist in Abbildung 6 angeführt. Auch in Erdbeeren (*Fragaria vesca*) konnte in der Studie von Toljamo *et al.*, 2016 eine Erhöhung der Expression von an der Biosynthese von Sesquiterpen beteiligten Genen nach einer Wurzelinfektion von *Phytophthora cactorum* beobachtet werden. Ebenfalls wird in Lackus *et al.*, 2018 die Emission von Monoterpenen, unter anderem 1,8-Cineol (vgl. Abbildung 6), in Herbivorie-geschädigten Pappelwurzeln beschrieben. In dieser Studie wurde darüber hinaus in einem Bioassay-Versuch der inhibitorische Effekt auf das Myzelwachstum des Oomyzeten *P. cactorum* dargestellt.

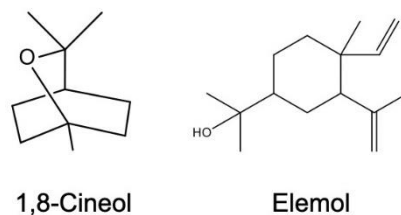


Abbildung 6: Beispiel für Mono- (1,8-Cineol) und Sesquiterpenalkohol (Elemol).

1.7 Terpen-Biosynthese

Der Grundbaustein für die Biosynthese von Terpenen sind aktivierte C₅ Einheiten IPP (Isopentenylidiphosphat) und DMAPP (Dimethylallyldiphosphat) (McGarvey und Croteau, 1995), welche über zwei verschiedene Synthesewege aus den Metaboliten des Primärstoffwechsels gebildet werden. Auf der einen Seite kann es zu einer cytosolischen Bildung von aktivierten C₅-Einheiten über den Acetat-Mevalonat-(MVA)-Weg kommen oder es erfolgt die Bildung der C₅-Einheiten über den in Plastiden lokalisierten 2-Methylethritol-4-

Phosphat (MEP)-Weg (Hsieh *et al.*, 2008; Pulido *et al.*, 2012; Vranová *et al.*, 2013, vgl. Abbildung 7).

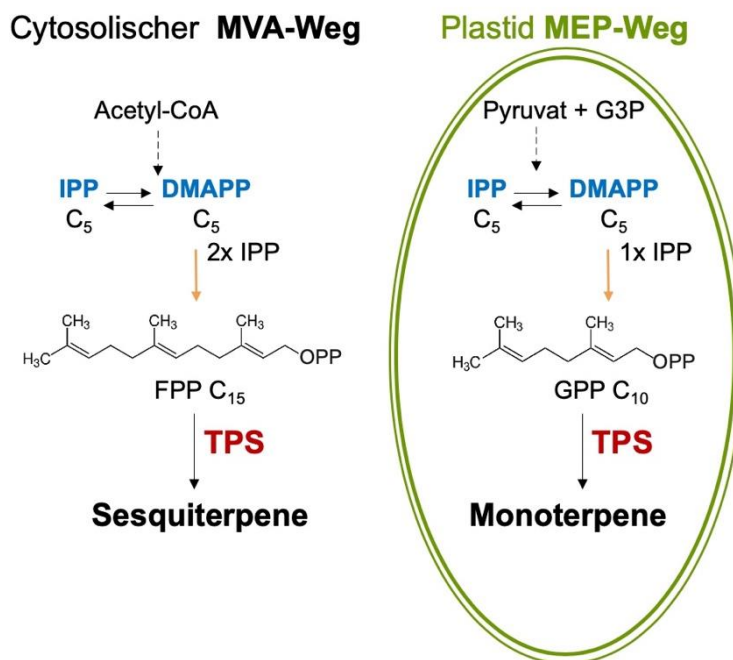


Abbildung 7: Vereinfachte Übersicht der Biosynthese von Mono- und Sesquiterpenen.

Erzeugung von aktivierten Isopreneinheiten (IPP und DMAPP, blau) aus Intermediaten des Primärstoffwechsels über den MVA oder MEP-Weg. Kondensation zu verschiedenen Prenyldiphosphaten (FPP und GPP, orange), Terpensynthasen (TPS) zur Bildung des Terpengrundgerüsts, MVA: Acetat-Mevalonat, MEP: 2-C-Methylerythritol-4-phosphat, G3P: Glycerinaldehyd-3-phosphat, IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat, FPP: Farnesylidiphosphat, GPP: Geranylidiphosphat, TPS: Terpensynthase.

Mehrere Studien weisen darauf hin, dass der metabolische Flux von primären Metaboliten in diesen beiden Stoffwechselwegen auf transkriptioneller, post-transkriptioneller und Translationsebene sowie durch Feedback-Loops reguliert wird (Vranová *et al.*, 2013). Der pflanzliche MVA-Weg führt ausgehend von dem primären Metabolit Acetyl-CoA über sechs enzymatische Schritte zur Bildung von IPP (Isopentenylidiphosphat); der MEP-Weg, ausgehend vom dem primären Metaboliten Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat, über sieben enzymatische Reaktionen zur Bildung von IPP und dessen Isomer DMAPP (Dimethylallyldiphosphat). Im letzten Schritt des MEP-Weges wandelt die 4-Hydroxy-3methylbut-2enyldiphosphat-Reduktase (HDR) HMB-PP (1-Hydroxy-2-Methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat) in IPP und dessen Isomer DMAPP in einem stöchiometrischen Verhältnis von 5:1 um (Tholl, 2015; Abbas *et al.*, 2017).

Die auf dem MVA-Weg gebildeten C₅-Einheiten bilden die Grundstruktur für die Synthese von Sesquiterpenen. C₅-Einheiten, die über den MEP-Stoffwechselweg gebildet werden, sind der Grundstein für die Synthese von Monoterpenen (Vranová *et al.*, 2013). Die Kondensation dieser aktivierten C₅-Einheiten IPP bzw. DMAPP wird durch Prenyltransferasen katalysiert. Allgemein kondensieren Prenyltransferasen jeweils ein Molekül DMAPP mit einem Molekül IPP in einer Kopf-Schwanz-Kondensation zu Prenyldiphosphaten (Muhlemann *et al.*, 2014). Die so entstehenden kondensierten Verbindungen Geranylidiphosphat (GPP, C₁₀) und

Farnesyldiphosphat (FPP, C₁₅) werden von dem Schlüssel-Enzym des Biosynthese-Weges: der Terpensynthase (TPS), in ihre eigentlichen Terpen-Grundgerüste umgesetzt (Tholl, 2015; Pazouki und Niinemets, 2016). Die beteiligten Terpensynthasen werden nach der Länge ihrer jeweiligen Reaktionsprodukte benannt (Pazouki und Niinemets, 2016).

1.8 Terpensynthase

Die Terpensynthase (TPS) ist das Schlüsselenzym der Biosynthese von Terpenen (Chen *et al.*, 2011). TPS katalysieren den ersten irreversiblen Schritt bei der Entstehung von komplexeren Terpenen und setzt die acyclischen Prenyldiphosphate mit 5-20 Kohlenstoffatome in die verschiedenen Klassen von Terpenen um. Allgemein bilden TPS-Gene eine mittelgroße Familie von 30-100 funktionellen Mitgliedern im Genom fast aller bisher sequenzierten Pflanzenarten (Dudareva *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011; Karunanithi und Zerbe, 2019).

Aus phylogenetischer Sicht lassen sich die Terpensynthasen in sieben Klassen unterteilen TPS-a-d, g, e/f, h. TPS-a, TPS-b, TPS-g und TPS-d sind hierbei Mono- und Sesquiterpensynthasen der Angiospermen (TPS-a/b/g) bzw. Gymnospermen (TPS-d) (Chen *et al.*, 2011). Die Genfamilie der TPS in *P. trichocarpa* umfasst 38 TPS, welche in sechs von sieben beschriebenen Klassen der Terpensynthasen phylogenetisch eingeordnet werden können (Irmisch *et al.*, 2014). Die modulare Struktur der TPS, die auf einem konservierten α -helikalen Faltungsmuster basiert, in dem drei gemeinsame Domänen (γ , β und α) variabel angeordnet sind, bestimmt die strukturelle Vielfalt der Terpene (Cao *et al.*, 2010). Aufgrund des Vorhandenseins von einem oder zwei aktiven Zentren und der damit verbundenen katalytischen Motive werden TPS als monofunktionelle bzw. bifunktionelle Enzyme bezeichnet und in die Klassen I, II oder I / II eingeteilt (Chen *et al.*, 2011; Tholl, 2015; Karunanithi und Zerbe, 2019).

In der Klasse-I-TPSs befinden sich alle Mono- und Sesquiterpensynthasen. Der elektrophile Reaktionsmechanismus findet hier in der C-terminalen α -Domäne statt, in der die Ionisierung des Substrates GPP bzw. FPP unter Bildung eines allylischen Carbokations als Zwischenprodukt durch ein zweiwertiges Kation (Mg^{2+}) vermittelt wird, wodurch die Neigung des enzymatischen Substrats zur Zyklisierung und zur molekularen Umstrukturierung begünstigt wird (Tholl, 2015). Die α -Domäne von Klasse-I-TPS enthält zwei charakteristische Metallbindungsmotive, das hochkonservierte "DDxxD"-Motiv und das weniger konservierte "NSE/DTE" -Motiv. Die Motive befinden sich auf gegenüberliegenden Helices nahe dem Eingang des aktiven Zentrums befindet. Diese beiden Motive helfen bei der Positionierung des Prenyldiphosphat-Substrats und der anschließenden Metallionen-abhängigen Ionisation unter Entstehung eines allylischen Carbokations (Cao *et al.*, 2010). Durch unterschiedliche Umlagerungen und Zyklisierungen des reaktiven Carbokations erfolgt die Bildung

verschiedener Terpengrundgerüste, bis die Reaktion durch Deprotonierung oder Hydratisierung beendet wird (Degenhardt *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2011; Karunanithi und Zerbe, 2019).

Durch die Entstehung eines reaktiven Carbokations, können bei der Umsetzung von einem Substrat multiple Terpenprodukte erzeugt werden (Degenhardt *et al.*, 2009). Ein Beispiel für solche Multiproduktenzyme ist die *MtTPS10* aus der Wurzel von Klee (*Medicago truncatula*) (Yadav *et al.*, 2019), welche als Produkt viele Sesquiterpene und Sesquiterpenalkohole akkumuliert.

Durch diese heterogene Aktivität ermöglichen TPS-Enzyme die Anpassung des Terpenstoffwechsels an sich verändernde Umweltbedingungen bzw. Pathogen-Pflanzen-Interaktionen. Durch geringfügige strukturelle Veränderungen können die TPS neue katalytische Eigenschaften erlangen, auf deren Basis neue Terpengrundgerüste entstehen können (Pazouki und Niinemets, 2016). Auch weiterführende Modifikationen von Terpenen, wie zum Beispiel Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung oder Hydroxylierung führen zur Bildung von hochtoxischen Terpenoiden und erhöhen ebenfalls die strukturelle Vielfalt der Terpene (Tholl, 2015). Daher ist es von großem Interesse diese Enzymklasse weiter zu untersuchen und neue Einblicke in die Entstehung des diversen Terpengrundgerüsts zu erlangen.

1.9 Die Modellorganismen

1.9.1 *Populus trichocarpa*

Im Kontext der vorliegenden Arbeit ist die Pappel (*Populus*), aus der Familie der Weidengewächse (*Salicaceae*), ein sehr geeigneter Modellorganismus. Aus funktionaler Sicht ist die Gattung *Populus*, welche in sechs Sektionen unterteilt ist (*Abaso*, *Aigeiros*, *Leucoides*, *Populus*, *Tacamahaca* und *Turanga*) und 30 Arten umfasst (Eckenwalder, 1996), geeignet, da sie eine der am schnellsten wachsenden Baumarten der borealen und gemäßigten Klimazonen darstellt (Dickmann, 2001). Durch ihre schnelle Zunahme an Biomasse werden Pappeln häufig für den Anbau in Plantagen verwendet und haben dadurch in den letzten Jahren eine große Bedeutung als nachwachsender Rohstoff erhalten (Polle *et al.*, 2013). Neben der wirtschaftlichen Verwendung von Pappelholz in der Zellstoff- und Papierindustrie, sowie der Möbel- und Sperrholzproduktion, werden Pappeln zur Wiederherstellung degradierten Landes von Waldlandschaften und zur Eindämmung des Klimawandels verwendet (Demidova *et al.*, 2016). Aus empirischer Sicht bietet sich die Westliche Balsampappel (*Populus trichocarpa*) als Modellorganismus an, da sie eine kurze Generationsdauer besitzt, genetische Transformation möglich ist und sie die erste Baumart ist, deren Genom vollständig sequenziert vorliegt (Tuskan *et al.*, 2004; Tuskan *et al.*, 2006).

1.9.2 *Phytophthora cactorum*

Oomyzeten sind neben Pilzen eine der beiden wichtigsten Gruppen von eukaryotischen Pflanzenpathogenen (Erwin und Ribeiro, 1996; Latijnhouwers *et al.*, 2003). Die bekannteste Gattung der Oomyzeten ist *Phytophthora*. Derzeit sind etwa 60 Arten der Gattung *Phytophthora* bekannt, von denen viele Arten verheerende Krankheiten an Kulturpflanzen, Zierpflanzen und Gehölzpflanzen hervorrufen (Hansen *et al.*, 2012; Martin *et al.*, 2012; Majid *et al.*, 2016; Sena *et al.*, 2018; Green *et al.*, 2020).

Die meisten *Phytophthora* Arten sind hemibiotrophe Pathogene und besitzen einen sexuellen und asexuellen Lebenszyklus (Oßwald *et al.*, 2014). Durch die sexuelle Reproduktion wird die genetische Variabilität erhöht, die Anpassungsfähigkeit an verschiedene Wirtspflanzen gesteigert und die Überwindung der Wirtsresistenz begünstigt (Haas *et al.*, 2009; Bertier *et al.*, 2013). Darüber hinaus erschweren die sexuell gebildeten Oosporen die Pathogenbekämpfung in der Landwirtschaft erheblich, da diese über Jahre im Boden überdauern können. Die hauptsächliche Infektion der Pflanze erfolgt bei bodenbürtigen Pathogenen über die biflagellaten, motilen Zoosporen, welche aus den asexuell gebildeten Sporangien entlassen werden. Über Chemotaxis finden die Zoosporen das Feinwurzelsystem der Pflanze und führen zu einer beginnenden Infektion (Hardham, 2001; Tyler, 2002). Nach der Wurzelinfektion wächst der Oomyzet inter- und intrazellulär im Pflanzengewebe des Wirts und ruft hierdurch verschiedene strukturelle Änderungen hervor, welche unter anderem die Hemmnis der Wasseraufnahme hervorrufen kann (Portz *et al.*, 2011).

Die Unterart *P. cactorum* wurde zuerst 1870 von Leber und Cohn an Kakteen identifiziert (Erwin und Ribeiro, 1996). Diese Art besitzt keinen spezifischen Wirt und kann über 200 Pflanzenspezies aus 160 Gattungen infizieren. Darin enthalten sind wichtige Kulturpflanzen, Zierpflanzen und Gehölzpflanzen, womit *P. cactorum* zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Schaderregern zählt (Nienhaus, 1960; Darmono *et al.*, 1991; Hantula *et al.*, 2000; Hansen *et al.*, 2012; Toljamo *et al.*, 2016). Die Hauptsymptome einer Infektion sind Wurzelfäulnis, begleitend von einer späteren Stiel-, Blatt- und Fruchtfäulnis (Erwin und Ribeiro, 1996). In den letzten Jahrzehnten hat *P. cactorum* allmählich eine Toleranz gegenüber vielen Fungiziden entwickelt (Jeffers *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2014). Hierdurch ist *P. cactorum* ein guter Modellorganismus, um die Pflanzen-Pathogen-Interaktion näher zu untersuchen und im Idealfall neue pathogen-induzierte Abwehrverbindungen zu charakterisieren, welche eine Eindämmung des Pathogens als wirtschaftlich relevanten Schaderreger begünstigt.

1.10 Zielsetzung

Über die multiplen unterirdischen Wechselwirkungen von Gehölzpflanzen und *Phytophthora* Spezies in der Rhizosphäre ist bislang trotz erheblicher wissenschaftlicher Fortschritte in den letzten Jahren nur wenig bekannt. Insbesondere herrscht noch Unklarheit über potentielle pflanzliche Abwehrmechanismen gegenüber dem pathogenen Befall durch *Phytophthora* Spezies (Hansen *et al.*, 2012; Oßwald *et al.*, 2014), welche eine Eindämmung dieses Schaderregers begünstigen könnten.

Ziel dieser Arbeit ist es, potentielle Abwehrverbindungen von *P. trichocarpa* gegenüber dem Wurzelpathogen *P. cactorum* zu charakterisieren. Konkret sollen die Analyse von polaren (Salicinoiden) und apolaren (Aromaten, Fettsäuren und Terpenen) Verbindungen der Wurzeln einen Aufschluss darüber geben, ob es nach Pathogenbefall zu einer Änderung im Gehalt von potentiellen Abwehrverbindungen kommt. Um darüber hinaus einen Hinweis auf die Regulationsmechanismen der Wurzelabwehr zu erhalten, soll ebenfalls eine Analyse der Phytohormone und des Transkriptoms erfolgen. Anschließend sollen mit Hilfe einer Verifizierung des Transkriptomdatensatzes durch eine qRT-PCR mögliche involvierte Gene in der Bildung abundanter, potentiell wichtiger Abwehrverbindungen identifiziert werden und über eine heterologe Expression die Aktivität der putativen Enzyme näher bestimmt werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Der Hauptanteil der verwendeten Chemikalien wurde von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland) und Sigma Aldrich® (St. Louis, USA) bezogen. Das benötigte Verbrauchsmaterial stammte von den Firmen Sarstedt AG & Co (Nümbrecht, Deutschland), Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) und VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland). Das für die Versuche eingesetzte Reinstwasser (ddH₂O) wurde durch das Milli-Q® Advantage A10 Wasseraufbereitungssystem (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bereitgestellt.

2.2 Pflanzenmaterial

Steckhölzer von Bäumen der westlichen Balsampappel (*Populus trichocarpa*, Kultivar Muhle Larsen) wurden im Gewächshaus unter Sommerbedingungen (24 °C, 60 % Luftfeuchtigkeit, Tag-/Nachtrhythmus 16 h/ 8 h) in Erde (Klasmann Deilmann GmbH, Geeste, Deutschland) bis zu einer Wuchshöhe von 50 cm bzw. in Hydrokultur (5 Liter enthalten: 7,05 g NaNO₃, 1,36 g MgSO₄, 3,05 g Ferty B1 (Planta Düngemittel GmbH, Regenstauf, Deutschland), 12,75 ml Fe-DTPA (2,78 g FeSO₄/7 H₂O + 3,93 g Titriplex gelöst in 1 Liter)) bis zu einer Wuchshöhe von 15 cm kultiviert.

Insgesamt wurden drei unabhängige Versuchsreihen zur Bestimmung von pathogen-induzierten Abwehrstoffen in *P. trichocarpa* Wurzeln durchgeführt. Bei zwei Experimenten erfolgte die Kultivierung der Pappeln in Hydrokultur. Für die Verminderung der artifiziellen Versuchsbedingung erfolgte die letzte Durchführung des Experiments mit Pappeln, welche in Erde kultiviert wurden. Je Versuchsreihe wurden für die Kontrollen sowie für die pathogen-infizierten Wurzeln zwischen sieben bis neun biologische Replikate verwendet.

Nach Beendigung der Experimente wurden die Wurzeln geerntet, gewaschen, abgetrocknet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Wurzelproben aus den Hydrokultur-Experimenten wurden per Hand mit Pistelle und Mörser unter kontinuierlicher Stickstoffkühlung zerkleinert. Die gewonnenen Wurzelproben aus dem Erdexperiment wurden mit Hilfe der Vibrations-Siebmaschine (ANALYSETTE 3 PRO, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland) unter kontinuierlicher Kühlung durch Stickstoff gemörsert. Hierbei wurde bei der Aufbereitung der Wurzelproben eine Amplitude von 1,8 mit einer Intervallzeit von 10 s über einen Zeitraum von 5 min gewählt.

2.3 Kultivierung von *Phytophthora cactorum*

Der Oomyzet *Phytophthora cactorum* (DSM No: 62643, Isoliert von: *Fragaria*, Deutschland) wurde vom Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Kultivierung von *P. cactorum* erfolgte aus einer Myzel-Inokulierung auf Tomatensaftagar (1,5 L enthalten: 300 ml BioBio Tomatensaft (Netto Marken-Discount AG & Co. KG), 4,5 g CaCO₃, 11,25 g Agar-Agar aufgefüllt mit ddH₂O) in Petrischalen. Für den jeweiligen Versuch wurde frisches Myzel vom Rand der Petrischalen in Blöcken auf 25 neue Petrischalen mit Tomatensaftagar überführt und in einem 25 °C Brutschrank über sieben Tage im Dunklen kultiviert (Lackus *et al.*, 2018). Für die Entlassung der infektiösen, motilen Zoosporen aus den gebildeten Sporangien des Oomyzetens wurden anschließend die Tomatensaftagar-Platten mit jeweils 5 ml ddH₂O gespült und mit einem Skalpell das Myzel abgeschabt. Die gewonnene Suspension aus Myzel und Sporangien wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für die Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen wurde die Sporangien-Konzentration mit Hilfe einer OD-Messung bei 595 nm bzw. der Neubauerzählkammer (L-Felder) bestimmt. Anschließend erfolgte die Entlassung der Zoosporen aus den Sporangien mit einer Kälte-Induktion von 4 °C über einen Zeitraum von 30 min. Die *P. cactorum* Suspension wurde anschließend einheitlich auf eine OD (595 nm) von 0,13 bzw. 3,78E⁰⁵ Sporangien (Neubauerzählkammer) in 50 ml Volumen mit Hydrokultur-Lösung verdünnt und für die Co-Kultivierung mit *P. trichocarpa* Wurzeln verwendet. Ebenfalls wurde die gleiche Suspension in einem Kontrollexperiment verwendet, wo alleinig *P. cactorum* in einem abgedunkelten 50 ml Gefäß in Hydrokultur kultiviert wurde. Für die Analyse der apolaren Verbindungen des Myzels erfolgte eine Zentrifugation bei 4.000 rpm, 4 °C und 5 min und das gesammelte Myzel wurde in Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

2.4 Induktion von Abwehrverbindungen in *P. trichocarpa* Wurzeln

Die Induktion von potentiellen Abwehrverbindungen der Wurzeln von *P. trichocarpa* sollte durch Co-Kultivierung mit dem Wurzelpathogen *P. cactorum* hervorgerufen werden. Vor jeder Versuchsreihe wurden die in Hydrokultur oder Erde gewachsenen Pappeln über zwei Tage an die veränderten Umweltbedingungen unter dem Laborabzug gewöhnt. Die Kultivierungsbedingungen bezüglich Temperatur und Licht verblieben analog zu denen im Gewächshaus (siehe Kapitel 2.2). Für die Hydrokulturexperimente wurden die Pappelwurzeln der Gruppe „Infektion“ in 50 ml Sporen-Suspension (siehe Kapitel 2.3) bzw. die der Kontrollen in 50 ml Hydrokultur-Lösung überführt und für fünf Tage unter dem Abzug kultiviert. Die Pappelwurzeln befanden sich hierbei in einem 50 ml Falcon-Tube, welches mittels Alufolie abgedunkelt wurde. Innerhalb des Erdexperimentes wurden die Pappeln in

9x9 Töpfen kultiviert und befanden sich unter dem Abzug auf Pflanzschalen der entsprechenden Größe. Für das Erdexperiment wurden die Pappelwurzeln der Gruppe „Infektion“ einmalig mit 50 ml Sporen-Suspension bzw. die der Kontrollen mit 50 ml Hydrokultur-Lösung von oben gewässert. Im weiteren Verlauf der Untersuchung wurden die Pappeln der Versuchsreihen täglich über fünf Tage hinweg zweimal (um 8 Uhr bzw. 16 Uhr) von oben mit Hydrokultur-Lösung nachgewässert.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 RNA Extraktion

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des „InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kits“ (STRATEC Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland) aus 65 mg Pathogen-infizierten *P. trichocarpa* Wurzelmaterial bzw. den jeweiligen Kontrollwurzeln (vgl. Kapitel 2.2, 2.4) aufgereinigt. Die Isolation der RNA erfolgte weitgehend nach den Angaben des Herstellers. Änderungen umfassten einerseits Schritt 6 des Hersteller-Manuals, sodass die Entfernung von genomischer DNA „On Column“ mit dem Kit „RNase-Free DNase“ Set (Quiagen, Hilden, Deutschland) erfolgte. Mit einem verminderten Volumen des Puffers R1 (350 µl) wurde zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Hinzugabe von 10 µl DNase I und 70 µl RDD Puffer auf die Säule, gefolgt von einer Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur. Hiernach wurde nochmal mit einem Volumen von 350 µl Puffer R1 zentrifugiert und nach den Angaben des Herstellers die RNA-Isolation fortgesetzt. Für die RNA-Extraktion wurde aus dem Kit der Puffer RP für die Aufbereitung des Wurzelpuders verwendet. Die RNA Lagerung erfolgte bei -80 °C. Analog zu der Extraktion der Gesamt-RNA aus *P. trichocarpa* Wurzelmaterial erfolgte die Extraktion der RNA aus 50 mg *P. cactorum* Myzel.

3.1.2 DNA/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten RNA (vgl. Kapitel 3.1.1) und Plasmide (vgl. Kapitel 3.1.11) erfolgte mit dem „NanoDrop 2000c UV-Vis“-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.). Hierbei wurde die Absorption von 1 µl der jeweiligen Lösung bei 230, 260 und 280 nm gemessen. Die extrahierten Nukleinsäuren haben ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm (A₂₆₀). Durch die Messung der Absorption bei 230 (A₂₃₀) und 280 (A₂₈₀) nm konnte darüber hinaus auch der Reinheitsgrad der isolierten Nukleinsäuren mit Hilfe der Ermittlung des Quotienten A₂₆₀/280 und A₂₆₀/230 ermittelt werden.

3.1.3 cDNA-Synthese

Die Synthese der einzelsträngigen cDNA aus RNA (vgl. Kapitel 3.1.1) erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase. Hierzu wurde ein in Tabelle 1 dargestellter erster Reaktionsansatz für 5 min bei 65 °C (peqSTAR 2X Gradient Thermocycler) inkubiert.

Tabelle 1: Reaktionsansatz für den ersten Teil der cDNA-Synthese.

Komponente	Volumen
RNA (aus DNase I-Verdau), 1000 ng	11 µl
dNTPs (50 mM)	1 µl
oligo(dT ₁₂₋₁₈)-Primer (50 µM)	1 µl

Anschließend wurden die in Tabelle 2 aufgeführten Komponenten zu dem ersten Reaktionsansatz hinzugefügt und es erfolgte hiernach die Synthese der einzelsträngigen cDNA (peqSTAR 2X Gradient Thermocycler, vgl. Tabelle 3).

Tabelle 2: Komponenten für die Ergänzung des ersten Reaktionsansatzes.

Komponente	Volumen
DTT (0,1 M)	1 µl
5 x first strand buffer	4 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl
Superscript® III (200 U/µl)	1 µl

Tabelle 3: Thermocycler-Programm für die cDNA-Synthese.

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur
Aktivierung der Komponenten	5 min	25 °C
cDNA-Synthese	60 min	50 °C
Inaktivierung der Komponenten	15 min	70 °C

Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert. Alle verwendeten Materialien für die Synthese wurden von Invitrogen™ (Thermo Fisher Scientific Inc.) bezogen.

3.1.4 qRT-PCR

Mit Hilfe von qRT-PCR wurde die Genexpression der Terpensynthase *PtTPS5* in den Gewebeproben von *P. trichocarpa* untersucht. Des Weiteren sollte die Wurzelinfektion von *P. cactorum* mit *Phytophthora*-genus spezifischen Primern (*Ypt1*) analysiert werden (Schena *et al.*, 2008). Dazu wurden die cDNA-Proben von Kontrollwurzeln bzw. Pathogen-induzierten Wurzeln aus dem ersten Hydrokulturexperiment und Wurzelproben aus dem Erdexperiment verwendet und im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt.

Die Amplifikation von *PtTPS5* und *Ypt1* erfolgte unter Verwendung von Brilliant III Ultra-Fast SYBR® Green QPCR-Master-Mix (Agilent, Santa Clara, CA, USA) (vgl. Tabelle 4) mit den folgenden PCR-Bedingungen: Anfängliche Inkubation bei 95 °C für 3 min, gefolgt von 40 Amplifikationszyklen (95 °C für 5 s, 60 °C für 10 s). Alle Proben wurden auf demselben Bio-Rad CFX Connect™ Echtzeit-PCR-Detektionssystem (Bio-Rad Laboratory, Hercules,

CA, USA) in einer 96-Well-Platte gemessen. Acht biologische Replikate wurden mit jeweils drei technischen Replikaten analysiert. Die Spezifität der *Phytophthora*-genus spezifischen Primer wurde durch Agarosegelelektrophorese und durch Sequenzierung von klonierten PCR-Amplikons bestätigt. *HIS* (Histone superfamily protein 3) wurde als Referenzgen (Wang *et al.*, 2014) verwendet. Als Positivkontrolle diente synthetisierte cDNA aus dem Myzel von *P. cactorum*. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 19 im Anhang aufgeführt

Tabelle 4: Reaktionsansatz einer qRT-PCR.

Komponente	Volumen
SYBR-Mastermix (Agilent)	10 µl
ddH ₂ O	7 µl
Oligonukleotid <i>forward</i> (10 µM)	1 µl
Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	1 µl
cDNA Template (1:10 verdünnt)	1 µl

3.1.5 Phusion-PCR

Mithilfe der Phusion-Polymerasekettenreaktion (PCR) erfolgte die Amplifikation des offenen Leserahmens (ORF) der Terpensynthase PtTPS5 aus der einzelsträngigen cDNA (vgl. Kapitel 3.1.3) der pathogen-infizierten Wurzelprobe. Die hierfür verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 19 im Anhang aufgeführt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Aldrich® synthetisiert und in ddH₂O resuspendiert. Die erhaltenen Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 µM wurden 1:10 verdünnt in der PCR eingesetzt.

Die verwendete „Phusion® High-Fidelity DNA“-Polymerase und der „5x Phusion HF“-Puffer wurden von Thermo Fisher Scientific Inc. bezogen. Der Reaktionsansatz wurde mit je 100 ng/µl cDNA angesetzt (vgl. Tabelle 5) und die Synthese der gewünschten DNA-Abschnitte erfolgte mit dem Thermocycler-Programm (peqSTAR 2X Gradient Thermocycler), welches in Tabelle 6 dargestellt ist.

Tabelle 5: Reaktionsansatz der Phusion-PCR.

Komponente	Volumen
5x Phusion HF Buffer	10 µl
dNTPs (je 10 mM)	1 µl
Phusion® High Fidelity DNA Polymerase	0,5 µl
ddH ₂ O	30,5 µl
cDNA Template (100 ng/µl)	3 µl
Oligonukleotid <i>forward</i> (10 µM)	2,5 µl
Oligonukleotid <i>reverse</i> (10 µM)	2,5 µl

Tabelle 6: Thermocycler-Programm für die Amplifikation von PtTPS5 mit Hilfe der Phusion-PCR.

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung der DNA	30 s	98 °C	
Denaturierung	10 s	98 °C	} 35 Zyklen
Annealing	30 s	54 °C	
Elongation	60 s	72 °C	
finale Elongation	5 min	72 °C	

3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Für die relative Größenbestimmung des DNA-Fragmente der PtTPS5 der Phusion-PCR (vgl. Kapitel 3.1.5) und zur Überprüfung der Spezifität der qRT-PCR Primer (Kapitel, 3.1.4) wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Die DNA-Lösung wurde vor dem Auftragen mit Ladebuffer (6x DNA Loading Dye, Thermo Fisher Scientific Inc.) versetzt. Als Größenstandard wurde der „1 kb Plus DNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific Inc.) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA erfolgte in einem 1,5 % Agarosegel (Broad Range Roti®agarose, BioScience-Grade, Carl Roth GmbH & Co. KG). Zur Herstellung des Geles wurden 100 ml 0,5x TAE (Tris-Acetat-EDTA) -Puffer mit 2,5 µl „Midori Green Advance DNA Stain“ (Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland) und 1,5 g Agarose „Broad Range Roti®agarose“ versetzt. Anschließend erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in der Gelelektrophoreseapparatur „Mupid® One“ (Advance, Tokio, Japan) mit 0,5x TAE - Laufpuffer (0,5 mM EDTA, 20 mM Tris, 10 mM Eisessig) über 18 min bei einer angelegten Spannung von 135 V. Im Geldokumentationssystem „Gene Genius“ (SYNGENE, Cambridge, UK) wurden das DNA-Bandenmuster sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.1.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um das gewünschte DNA-Fragment der PtTPS5 der Phusion-PCR (vgl. Kapitel 3.1.5) aus dem Gel zu isolieren, wurde das „QIAquick PCR Gel Extraction Kit“ (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Aufreinigung der qRT-PCR Produkte *Ypt1* (vgl. Kapitel 3.1.4) wurde das „QIAquick PCR Purification Kit“ (Qiagen N.V., Venlo, Niederlande) verwendet. Je Amplikon wurden zwei qRT-PCR Produkte aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Lediglich das empfohlene Elutionsvolumen von 50 µl wurde in den beiden Aufreinigung-Kits auf 25-30 µl reduziert, um die Konzentration der DNA zu erhöhen. Eine anschließende Konzentrationsbestimmung der PCR-Produkte erfolgte wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben.

3.1.8 TOPO®-Klonierung

Die Insertion des aufgereinigten PCR-Produkts *PtTPS5* (vgl. Kapitel 3.1.7) erfolgte mit Hilfe der TOPO®-Klonierung in ein Vektorsystem. Hierfür wurde vom Hersteller Thermo Scientific Inc. das „Champion™ pET100 Directional TOPO® Expression Kit“ verwendet. Die Ligation des aufgereinigten qRT-PCR-Produkts (*Ypt1*) (vgl. Kapitel 3.1.7) in den Vektor pCR®4-TOPO (Thermo Fisher Scientific) erfolgte analog dazu.

Die Ligation wurde nach den Angaben des Herstellers, jedoch mit halbiertem Reaktionsvolumen (vgl. Tabelle 7), angesetzt. Vor der Ligation wurde die DNA auf eine Konzentration von 10 ng/μl verdünnt. Der gesamte Reaktionsansatz inkubierte bei Raumtemperatur über Nacht.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Ligation der PCR-Produkte.

Komponente	Volumen
DNA (10 ng)	1 μl
Salz	0,5 μl
ddH ₂ O	1 μl
TOPO®Vektor (pET100, pCR4)	0,5 μl

3.1.9 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* – Zellen

Die Transformation chemisch kompetenter *Escherichia coli*-Zellen (NEB® 10-beta Competent *Escherichia coli*, New England BioLabs® Inc., Ipswich, USA) mit den erzeugten pCR®4 Vektorkonstrukten (vgl. Kapitel 3.1.8) bzw. mit dem synthetisch hergestellten Expressionsvektor pET100_PtTPS5 (Thermo Fisher Scientific Inc.) (vgl. Kapitel 3.1.10) erfolgte über eine Hitzeschock-Behandlung. Die verwendeten „NEB® 10-beta“-Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in je 20 μl Aliquots fraktioniert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 3 μl Ligationsansatz bzw. 1 μl pET100_PtTPS5 und eine Inkubation von 30 min auf Eis. Nachfolgend wurden die Zellen für 45 s bei 42°C (Eppendorf ThermoMixer® C) erwärmt und sofort für eine weitere Minute auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden 150 μl S.O.C.-Medium (Thermo Fisher Scientific Inc.) zu dem Zellansatz hinzugefügt. Für die Sicherstellung einer ausreichenden Menge an exprimierten Resistenzgenen (Amp^R) wurden die Zellen für 45 min bei 37 °C und 220 rpm (Eppendorf ThermoMixer® C) geschüttelt. Nachfolgend wurde das gesamte Zellvolumen auf LB-Agarplatten, versetzt mit 100 μg/ml Ampicillin, ausplattiert. Für ein ausreichendes Koloniewachstum wurden die Agarplatten über Nacht in einem 37 °C Brutschrank (Brutschrank B6120 Kendro Heraeus, Thermo Electron Cooperation, Waltham, USA) inkubiert. Für weitere Versuche wurden die *E. coli* Platten bei 4°C aufbewahrt.

Für eine spätere heterologe Expression von *PtTPS5* wurden in „One Shot® BL21 Star™ (DE3) *E. coli*“-Zellen (Thermo Fisher Scientific Inc.) mit dem pET100_PtTPS5 Vektor transformiert. Dies erfolgte fast identisch wie die Transformation der „NEB® 10-beta“-Zellen.

Das Anfangsvolumen der „One Shot® BL21 Star™“ betrug hierbei nur 12 µl und wurde mit 1 µl des Plasmides versetzt. Am Ende der Transformation erfolgte das Ausplattieren von 40 µl des gesamten Zellvolumens auf LB-Agarplatten (100 µg/ml Ampicillin).

3.1.10 Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Identifikation von positiven Klonen der transformierten „NEB® 10-beta“ Zellen (vgl. Kapitel 3.1.9). Hierbei wurden die Klone auf das Vorhandensein des ligierten PCR-Produktes (*PtTPS5*) im Vektor untersucht. Ebenfalls wurde eine Kolonie-PCR für die positiven Klone des ligierten qRT-PCR Fragmente (*Ypt1*) durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.8 und 3.1.9).

Die Amplifikation des gesuchten Inserts der *PtTPS5* erfolgte mit zwei vektorspezifischen Oligonukleotiden, welche stromaufwärts bzw. stromabwärts vom Insert auf dem Vektor binden bzw. die Amplifikation von *Ypt1* erfolgt mit einem vektorspezifischen Oligonukleotid stromaufwärts, da das PCR-Fragment nur 220 bp betrug (vgl. Tabelle 19, Anhang). Es wurden zwei Klone des qRT-PCR Amplicon bzw. 10 Klone des ligierten PCR-Produktes *PtTPS5* von der Agarplatte gepickt. Anschließend wurden die gepickten Klone mit Spitzen in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl Kolonie-PCR Reaktionsansatz (siehe Tabelle 8) versetzt.

Tabelle 8: Beispielhafter Reaktionsansatz einer Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen
ddH ₂ O	18,375 µl
GoTaq® DNA Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
Oligonukleotide <i>forward</i> (10 µM)	0,5 µl
Oligonukleotide <i>reverse</i> (10 µM)	0,5 µl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	5,0 µl

Die verwendete GoTaq® DNA Polymerase und das zugehörige Puffersystem stammte von der Firma Promega (Mannheim, Deutschland). Die Amplifikation der Insertfragmente erfolgte mit dem in Tabelle 9 angegebenen PCR-Programm im peqSTAR 2X Gradient Thermocycler. Zur Identifikation von positiven Klonen wurde eine Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 3.1.6) durchgeführt.

Tabelle 9: Thermocycler-Programm für die Amplifikation der Vektorinserts.

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung der DNA	10 min	94 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung	30 sec	94 °C	
Annealing	30 sec	55 °C	
Elongation	1,5 min	72 °C	
finale Elongation	5 min	72 °C	

Da die Ligation in den pET100-Vektor (vgl. Kapitel 3.1.8) jedoch auch nach mehrmaliger Optimierung der Ligations-Bedingungen keine positiven Klone erzielte, wurde eine synthetische Herstellung des Expressionsvektors pET100_PtTPS5 bei Thermo Fisher Scientific Inc. in Auftrag gegeben.

3.1.11 Plasmidaufreinigung

Um für das Transformations-Experiment genügend pET100_TPS5 Vektorkonstrukt zu Verfügung zu haben, wurde ein Klon der „NEB® 10-beta Competent *E. coli*“-Zellen (vgl. Kapitel 3.1.9) in 5 ml flüssigem LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Im Anschluss wurde diese Flüssigkultur bei 37 °C und 220 rpm (Certomat® BS-1 Inkubations-Schüttelschrank, B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Deutschland) über Nacht inkubiert. Die darauffolgende Plasmidaufreinigung erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® Plasmid DNA Purification Kit“ (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben. Dabei wurden alle optionalen Waschschrte durchgeführt und die Plasmide in einem Volumen von 30 µl eluiert. Die Bestimmung der Plasmidkonzentration wurde mit dem „NanoDrop 2000c UV-Vis“-Spektrophotometer (vgl. Kapitel 3.1.2) durchgeführt.

3.1.12 Sequenzierung

Zur Verifizierung der Primer-Spezifität der qRT-PCR wurde eine DNA-Sequenzierung aus der Kolonie-PCR durchgeführt (vgl. Kapitel 3.1.10).

Tabelle 10: Reaktionsansatz der Sequenzierung.

Komponente	Volumen
PCR-Produkt (Kolonie-PCR)	1 µl
BigDye® Terminator 5x Sequencing Buffer	1 µl
BD-Mix	1 µl
Primer (10 µM)	1 µl
ddH ₂ O	14 µl

Der Ansatz von linearen Sequenzier-PCR-Reaktionen erfolgte mit dem „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing“ Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.), (vgl. Tabelle 10). Die verwendeten Oligonukleotide für die Sequenzierung sind in Tabelle 19 im Anhang dargestellt. Die Vervielfältigung des linearen Produktes erfolgte mit dem peqSTAR 2X Gradient Thermocycler (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: Thermocycler-Programm der Sequenzierung.

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	
initiale Denaturierung der DNA	10 min	95 °C	
Denaturierung	10 sec	95 °C	} 35 Zyklen
Annealing	20 sec	50 °C	
Elongation	4 min	60 °C	

Das entstandene Sequenzierungsprodukt wurde mit dem „DyeEx[®] Spin Column“ Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die eigentliche Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism[®]-Gen-Analysator 3100 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.) und die anschließende computerbasierte Auswertung der Daten mit dem Programm SeqMan Pro 13 (DNASTAR[®] Lasergene, Madison, USA). Die Referenzsequenzen für die Analyse von *PtTPS5* und *Ypt1* sind dem Anhang zu entnehmen.

3.1.13 Transkriptomdaten

Aus 65 mg Wurzelpuder von vier Kontrollen bzw. vier pathogen-infizierten Proben aus dem Hydrokulturexperiment (vgl. Kapitel 2.4) wurde die Gesamt-RNA extrahiert (vgl. Kapitel 3.1.1). Die Sequenzierung des Transkriptoms wurde im Genome-Center der Max-Planck-Gesellschaft (MP-GC) in Köln durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit einem HiSeq 2500 Illumina Sequencer und wurde mit 400.000.000 Sequenzen (150 bp lang, „unpaired“) in Auftrag gegeben. Der Datensatz wurde anschließend mit der Software CLC Genomics Workbench 10.1.1 analysiert. Das Mapping wurde mit dem *Populus trichocarpa* primär Transkript (www.phytozome.net, Version 12.1) durchgeführt. Das Trimmen wurde mit folgenden Parametern vorgenommen: Limit: 0,05, Nukleotide: 2, Länge: 50. Die Normalisierung erfolgte auf 1 kb Genlänge und die Annotierung der Gene wurde ebenfalls von Phytozome v. 12.1 geladen.

3.2 Heterologe Expression der Terpensynthase

3.2.1 Expression und Aufreinigung von PtTPS5

Für die heterologe Proteinexpression von PtTPS5 aus *P. trichocarpa* wurden jeweils 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Vorkultur mit *E. coli* „OneShot[®] BL21Star“ (vgl. Kapitel 3.1.9) angeimpft. Die Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 rpm (Certomat[®] BS-1 Inkubations-Schüttelschrank) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inokulation der Hauptkultur (100 ml, 100 µg/ml Ampicillin) durch Zugabe der Vorkultur. Die Hauptkultur wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Vorkultur angezogen und bis zum Erreichen eines OD₆₀₀-Wertes zwischen 0,6 bis 0,8 inkubiert. Die Messung des OD-Wertes erfolgte durch ein Spektrophotometer (GENESYS[™] 20 Visible Spectrophotometer, Thermo Fisher

Scientific Inc.). Anschließend wurde die Genexpression durch die Hinzugabe von 1 mM IPTG induziert. Die induzierte Kultur wurde bei 18 °C und 220 rpm (Inkubationsschüttler Innova™ 4230, New Brunswick Scientific Co., Edison, USA) über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die gesamte Hauptkultur in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 5.000 g für 10 min (Avanti™ J-25 Centrifuge, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA) zentrifugiert. Das gewonnene Zellpellet wurde in 4 ml Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Dithiothreitol, 10 % (v/v) Glycerol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte über Ultraschalleinwirkung (4 x 20 s, 60 % Leistung, Sonoplus HD 2070, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland). Die Abtrennung der festen Zellbestandteile der aufgeschlossenen Proben erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 15.000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5415R). Der so erhaltene Proteinrohextrakt wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Umpufferung von 500 µl des Proteinrohextraktes erfolgte mit Hilfe von „Illustra™ NAP™-5“-Säulen (GE Healthcare Europe GmbH, Buckinghamshire, Großbritannien) nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurden die TPS-Enzymfraktionen in 1 ml Extraktionspuffer aufgenommen und für den folgenden Enzymassay verwendet.

3.2.2 Enzymassay

Für die Untersuchung der Enzymaktivität der aufgereinigten PtTPS5 (vgl. Kapitel 3.2.1) wurden 50 µl Rohextrakt in einem Assay, wie in Tabelle 12 angegeben, angesetzt. Negativkontrollen wurden analog durchgeführt, entweder ohne Substrat FPP oder mit einem bei 95 °C über 10 min hitze-denaturiertem Protein. Der Assay wurde vorsichtig mit 100 µl *n*-Hexan überschichtet und bei 30 °C für 60 min (Eppendorf ThermoMixer® C) inkubiert. Anschließend erfolgte die Proteininaktivierung über mehrfaches invertieren des Assays. Die Proben wurden schräg in flüssigen Stickstoff eingefroren, um anschließend den *n*-Hexan-Überstand abziehen zu können. Die Analyse der Aktivität erfolgte mittels GC-MS (vgl. Kapitel 3.3.2).

Tabelle 12: Beispielhafte Zusammensetzung eines Enzymassays mit einem finalen Reaktionsvolumen von 100 µl.

Der Puffer setzte sich aus 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1mM Dithiothreitol, 10 % (v/v) Glycerol) zusammen.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Rohextrakt	50 µl	/
Substrat (FPP)	2 µl	50 µM
Puffer	43 µl	/
400 mM MgCl ₂	5 µl	20 mM

3.3 Analytik

3.3.1 *n*-Hexan-Extrakte für die Analyse apolarer Verbindungen

Für die Analyse von apolaren Verbindungen wurden *n*-Hexan-Extrakte aus den gewonnenen Wurzelproben (vgl. Kapitel 2.4) hergestellt. Pro Probe wurden 100 mg Wurzelpuder im gefrorenen Zustand abgewogen und mit 400 μ l *n*-Hexan mit 10 ng/ μ l Nonylacetat (Interner Standard (IS)) überschichtet. Die Proben wurden anschließend eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt (Eppendorf ThermoMixer® C) und über Nacht inkubiert. Hiernach wurden die Proben mit 5.000 g für 10 min zentrifugiert (Heraeus™ Labofuge™ 200 Centrifuge, Thermo Scientific, Wilmington, USA) und der *n*-Hexan-Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Analog erfolgte die Gewinnung von apolaren Verbindungen aus dem Myzel von *P. cactorum*. Die Analyse der apolaren Verbindungen (Aromaten, Fettsäuren und Terpen) erfolgte mittels GC-MS (vgl. Kapitel 3.3.2).

3.3.2 Gaschromatographie

Für die qualitative und quantitative Analyse von apolaren Verbindungen der *n*-Hexan-Extrakte aus den Wurzelproben (vgl. Kapitel 3.3.1) bzw. der Terpensynthese-Assays (vgl. Kapitel 3.2.2) wurden diese mit Hilfe einer Gaschromatographie (Agilent 6890, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland) mit gekoppeltem Quadrupol-Massenspektrometer (5973 Serie, Hewlett-Packard, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland, GC-MS) analysiert, und mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (9200 Hydrogen Detektor, Packard, Agilent Technologies, Böblingen Deutschland, GC-FID) bei 300 °C quantifiziert. Die Parameter der GC-MS waren folgende: Schnittstellentemperatur: 270 °C, Quadrupoltemperatur: 150 °C, Temperatur der Ionenquelle: 230 °C, Elektronenenergie: 70 eV, Massenbereich: m/z 33-350.

Die Komponenten der Proben wurden mit Hilfe einer ZB5-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Deutschland, 0,25 mm \times 30 m \times 0,25 μ m) und Helium (MS) oder Wasserstoff (FID) als Trägergas mit einer Flussrate von 2 ml/min aufgetrennt. Die Proben wurden ohne Split mit einem Injektionsvolumen von 1 μ l bei einer initialen Ofentemperatur von 45 °C injiziert. Die Ofentemperatur wurde 2 min konstant gehalten, anschließend mit einem Gradienten von 6 °C min^{-1} auf 280 °C erhöht und weiter mit einem Gradienten von 60 °C min^{-1} auf 300 °C erwärmt und für 2 min konstant gehalten. Die Analyse dauerte somit insgesamt 43,5 min. Die apolaren Verbindungen wurden durch den Vergleich von Retentionszeiten und Massenspektren von authentischen Standards bzw. durch den Vergleich mit Referenzspektren von Wiley und NIST (National Institute of Standards and Technology Libraries) identifiziert. Als authentische Standards wurden die Terpene: α -Terpineol, 1,8-Cineol und Limonen und die Fettsäuren Myristinsäure, Pentadecansäure,

Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure in *n*-Hexan mit einer Konzentration von 5 ng/μl bzw. 10 ng/μl gelöst (vgl. Anhang Abbildung 24, 25 und 26).

3.3.3 Methanol-Extrakte für die Analyse von polaren Verbindungen

Für die Analyse von polaren Verbindungen wurden Methanol-Extrakte aus den gewonnenen Wurzelproben (vgl. Kapitel 2.4) hergestellt. Pro Probe wurden 40 mg Wurzelpuder im gefrorenen Zustand abgewogen und mit 1 ml Methanol mit internen Standards (0,8 mg/ml Phenyl-β-D-Glucopyranosid (Aldrich Chemistry, Sigma Aldrich, München, Deutschland), Phytohormonstandard (40 ng/ml D₄-SA, D₆-JA D₆-ABA, 8 ng/ml D₆-JA-Ile), 10 ng/ml Trifluoromethyl-Zimtsäure (Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) und 10 ng/ml Syringasäure (Sigma Life Science, Sigma Aldrich)) versetzt. Die Proben wurden anschließend 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt (Eppendorf ThermoMixer® C). Hiernach wurden die Proben mit 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5415R) und der Methanol-Überstand in zwei neue Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Analyse der polaren Verbindungen (Phytohormone, Salicinoide, Phenolsäuren) erfolgte anschließend mittels LC-MS/MS bzw. HPLC-DAD (vgl. Kapitel 3.3.4 und Kapitel 3.3.5).

3.3.4 HPLC-DAD

Die Analyse der Salicinoide Salicin, Salicortin, Homalosid D und Tremulacin erfolgte mit HPLC-DAD (HPLC: Agilent 110 Series, Agilent Technologies + Diodenarray-Detektor (DAD)). Vor der Analyse wurde ein äquivalentes Volumen an ddH₂O zu den Proben hinzugefügt. Für die Auftrennung der Stoffe wurde als stationäre Phase eine NUCLEODUR® Sphinx RP-Säule mit 5 μm Partikelgröße (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) und als mobile Phase Wasser (A) und 100 % Acetonitril (B) mit einer Flussrate von 1,0 ml/min verwendet. Das Elutionsprofil ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Elutionsprofil der HPLC-DAD für die Analyse von Salicinoiden.

Mobile Phase: Wasser (A) und 100 % Acetonitril (B); Flussrate 1,1 ml/min.

Zeit min	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	86	14
22	42	58
22,1	0	100
25	0	100
25,1	86	14
30	86	14

Die Absorption der Analyten wurde bei verschiedenen Wellenlängen (200 nm, 260 nm, 270 nm, 285 nm und 330 nm) gemessen und für die Quantifizierung die Peakflächen bei 200 nm ausgewertet. Die bekannten Retentionszeiten (Nathalie Lackus, pers. Mitteilung) für die Identifizierung der Stoffe, sowie die RRF-Werte (relative response factor) für die

Quantifizierung der einzelnen Verbindungen sind Tabelle 14 zu entnehmen. Die Quantifizierung der Verbindungen wurde durch die Verrechnung der Peakfläche bei 200 nm mit der Konzentration des IS (0,8 mg/ml Phenyl- β -D-Glucopyranosid) sowie der RRF-Werte durchgeführt.

Tabelle 14: Übersicht über die Retentionszeiten und RRF-Werte der Salicinoide (Nathalie Lackus, pers. Mitteilung).

Verbindung	Retentionszeit	RRF-Wert
Salicin	5,35 min	0,448501
Phenyl- β -D-Glucopyranosid (IS)	6,80 min	/
Salicortin	10,54 min	0,871069
Homalosid D	15,42 min	0,647018
Tremulacin	18,12 min	0,441760

3.3.5 Flüssigchromatographie

Die Methanol-Extrakte der Wurzeln (vgl. Kapitel 3.3.3) wurden mit Hilfe des Agilent 1260 LC Systems (Agilent Technologies, Foster City, USA) auf deren Gehalt an Phytohormonen, Salicinoiden und phenolische Verbindungen hin analysiert. Als stationäre Phase diente eine Zorbax Eclipse XDB-C18-Säule (50 x 4,6 mm, 1,8 μ m, Agilent Technologies), als Laufmittel wurden (A) ddH₂O mit 0,05 % Ameisensäure (v/v) und (B) Acetonitril verwendet. Bei einer Flussrate von 1,1 ml/min erfolgte die chromatographische Trennung der Phytohormone bzw. die Trennung der Salicinoide und phenolischen Verbindungen durch das in den Tabellen 15 und 16 dargestellte Elutionsprofil.

Tabelle 15: Elutionsprofil für die Analyse von Phytohormonen.

Mobile Phase: 0,05 % Ameisensäure in ddH₂O (A) und 100 % Acetonitril (B); Flussrate 1,1 ml/min.

Zeit min	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0,00 – 0,50	90	10
0,50 – 4,00	90 – 10	10 – 90
4,00 – 4,02	10 – 0	90 – 100
4,02 – 4,50	0	100
4,50 – 4,51	0 – 90	100 – 10
4,51 – 7,00	90	10

Tabelle 16: Elutionsprofil für die Analyse von Salicinoiden, glykosylierten Phytohormonen und phenolischen Verbindungen.

Mobile Phase: 0,05 % Ameisensäure in ddH₂O (A) und 100 % Acetonitril (B); Flussrate 1,1 ml/min.

Zeit min	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0,00 – 0,50	95	5
0,50 – 6,00	95 – 62,6	5 – 37,4
6,00 – 6,02	62,6 – 20	37,4 – 80
6,02 – 7,50	20 – 0	80 – 100
7,50 – 9,50	0	100
9,50 – 9,52	0 – 95	100 – 5
9,52 – 12,00	95	5

Das LC-System war an das QTRAP 6500 Tandem-Massenspektrometer (Applied Biosystems, MDS Sciex, Darmstadt, Deutschland) mit Turbospray-Ionisierungsquelle und Triple-Quadrupol gekoppelt. Die Ionisierungsspannung lag bei 4500 eV, die Gastemperatur bei der Analyse der Phytohormone bei 650 °C bzw. bei der Analyse der Salicinoide und phenolischen Verbindungen bei 700 °C. Die weiteren Parameter waren bei beiden Analysen die folgenden: Zerstäubergas: 60 psi, Heizgas: 60 psi, Schutzgas: 40 psi und Kollisionsgas: Medium.

Tabelle 17: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) zur Untersuchung von Phytohormonen.

Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (JA), *cis*-Oxophytodiensäure (*cis*-OPDA), JA-Konjugate (JA-Ile, OH-JA, COOH-JA-Ile), 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat (12-JA-Sulfat), Ile: Isoleucin, Q1: Quadrupol 1, Q3: Quadrupol 3, RT: Retentionszeit, DP: Fragmentierungspotential, EP: Eingangspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionszellenaustrittspotential.

Verbindungen	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	RT [min]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
12-JA-Sulfat	305	97	2,4	-20	-10	-60	-10
OH-JA	225,1	59	2,6	-20	-9	-24	-2
COOH-JA-Ile	352,1	130,1	3	-50	-4,5	-30	-4
OH-JA-Ile	338,1	130,1	3	-50	-4,5	-30	-4
SA	136,93	93	3,3	-20	-8	-24	-7
ABA	263	153,2	3,4	-20	-12	-22	-2
JA	209,07	59	3,6	-20	-9	-24	-2
JA-Ile	322,19	130,1	3,9	-50	-4,5	-30	-4
<i>cis</i> -OPDA	290,9	165,1	4,6	-20	-12	-24	-2

Die Analyse fand im negativen Ionisierungsmodus mit Multipler Reaktionsüberwachung (MRM) statt. Die Parameter der MRM für die Phytohormone sind in Tabelle 17, die Parameter der MRM für die Salicinoide bzw. phenolischen Verbindungen in Tabelle 18 dargestellt. Im Anhang sind die Parameter der MRM für die internen Standards (IS) dargestellt (vgl. Tabelle 20, Anhang). Die Quantifizierung erfolgte durch die Verrechnung der Signalstärke mit den IS bzw. durch Abgleich mit den Verdünnungsreihen externer Standards.

Tabelle 18: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) zur Untersuchung von Salicinoiden, glykosylierten Phytohormonen und phenolischen Verbindungen.

Salicylsäure-2-O-D-Glycosid (SA-Glc), Q1: Quadrupol 1, Q3: Quadrupol 3, RT: Retentionszeit, DP: Fragmentierungspotential, EP: Eingangspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionszellenaustrittspotential.

Verbindungen	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	RT [min]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
Arbutin	271	108	0,8	-30	-10	-32	-3
Salirepin-7-sulfat	381	97	0,9	-30	-5	-55	-2
Salirepin	301	139	0,9	-30	-11	-18	-2
Salicin-7-sulfat	365	97	2,7	-30	-5	-25	-2
SA-Glc	299,1	136,9	3,3	-30	-10	-18	-2
Kaffeesäure	179	134,9	4	-30	-8	-22	-5
Ferulasäure	193,1	133,9	5	-30	-8	-22	-5
<i>p</i> -Cumarsäure	163	118,9	4,7	-30	-8	-20	-21
Salireposid	405	121	5,4	-30	-8	-18	-2
Trichocarpin	405	242	5,6	-30	-8	-18	-5

3.4 Auswertung

Die Analyse der Sequenzierung wurde mit dem Programm DNASTAR Navigator (Version 13.0.0.357; DNASTAR, Madison, Wisconsin, Vereinigte Staaten) erstellt. Zur Durchführung und Auswertung der qRT-PCR wurde das Programm CFX Manager (Version 3.1; BioRad) nach Pfaffl *et al.*, 2004 genutzt. Die Analyse der LC-MS/MS Daten erfolgte mit der Software Analyst ®. Für die Auswertung der HPLC-DAD bzw. GC-FID Daten wurde das Programm Data Trans verwendet.

Die Berechnungen auf Basis der erhaltenen Datensätze wurde mit Hilfe von Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Dargestellt werden Mittelwerte \pm Standardfehler. Die statistische Auswertung fand mit dem Programm SigmaPlot 11.0 für Windows (Systat Software Inc.) statt. Als statistische Tests wurde der Student T-Test bzw. der Wilcoxon Rangsummen-Test mit SigmaPlot durchgeführt. Bei Bedarf wurden die Daten logarithmiert um die statistische Modellvoraussetzung (Normalverteilung und Varianzhomogenität) zu erfüllen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse polarer Pathogen-induzierter Abwehrverbindungen in *Populus trichocarpa* Wurzeln

Die Anzucht und Versuchskultivierung der Pappel-Stecklinge (*Populus trichocarpa*) erfolgte in Hydrokultur. Um die Bildung von potentiellen Abwehrverbindungen zu induzieren, wurden die Pappeln mit dem Oomyzeten *Phytophthora cactorum* in einem Zeitraum von 5 Tagen co-kultiviert. Die Pathogen-infizierten Wurzeln bzw. die entsprechenden Wurzeln von unbehandelten Kontrollpflanzen wurden gerntet und die enthaltenen polaren Verbindungen mit Methanol extrahiert. Die Analyse der Extrakte erfolgte mittels HPLC-DAD bzw. LC-MS/MS. Hierbei wurde der Einfluss des Pathogens auf den Phytohormon- sowie Salicinoidgehalt im Frischgewicht (FG) der Wurzeln untersucht.

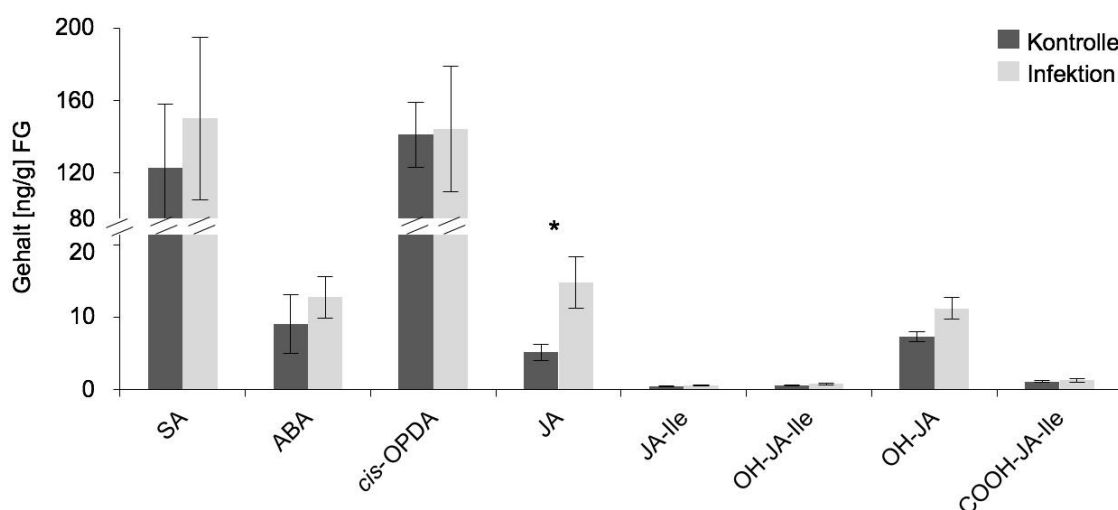


Abbildung 8: Phytohormongehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Phytohormone Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (JA), *cis*-Oxophytodiensäure (*cis*-OPDA) und JA-Konjugaten erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [ng/g] FG \pm Standardfehler. Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; n = 7-8; Ile: Isoleucin.

Im Detail wurde der Gehalt von Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (JA), verschiedenen Jasmonsäure-Konjugaten und der biosynthetischen Vorstufe von JA, *cis*-Oxophytodiensäure (*cis*-OPDA) (vgl. Abbildung 8), sowie der glykosylierten und sulfatierten Phytohormone Salicylsäure-2-O-D Glykosid (SA-Glc) bzw. 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat (vgl. Abbildung 9) mittels LC-MS/MS bestimmt. Die Analyse der Phytohormone ergab, dass JA und SA-Glc nach Pathogenbefall eine signifikant erhöhte Akkumulation im Vergleich zu den Kontrollwurzeln aufwiesen (vgl. Abbildung 8 und 9). Für JA konnte dabei mit einer 3-fachen Erhöhung des Gehaltes die stärkste Induktion beobachtet werden.

Die SA-Konzentration sowie die Konzentration der verschiedenen JA-Konjugate und des 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfats (12-JA-Sulfat) blieben dagegen unverändert. Sowohl für die Kontrollwurzeln als auch für die Pathogen-infizierten Wurzeln wiesen die Phytohormone SA-Glc, 12-JA-Sulfat und SA (10,99 µg/g FG; 2,12 µg/g FG bzw. 150,29 ng/g FG nach Infektion) die höchste Abundanz auf. Der genaue Gehalt und die statistischen Parameter der Analyse sind dem Anhang Tabelle 21 zu entnehmen.

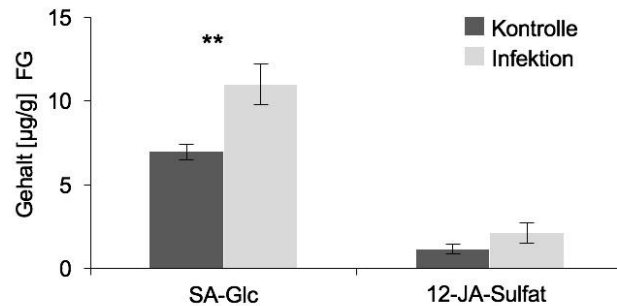


Abbildung 9: Gehalt an glykosylierten bzw. sulfatierten Phytohormonen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Phytohormone Salicylsäure-2-O-D-Glycosid (SA-Glc) und 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat (12-JA-Sulfat) erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [µg/g] FG ± Standardfehler. Student T-Test: * = p < 0,05 %; ** = p < 0,01 %; n = 7-8.

Im Weiteren wurde untersucht, ob der Pathogenbefall zu signifikanten Änderungen im Salicinoidgehalt der Pappelwurzeln führte. Es wurde dabei der Gehalt von Salicin, Salicortin, Homalosid D und Tremulacin mithilfe von HPLC-DAD analysiert. Die Quantifizierung der verschiedenen Salicinoide erfolgte auf Basis der resultierenden Peakfläche bei einer Absorption von 200 nm. Die weiteren Salicinoide, Salicin-7-Sulfat, Salirepin, Salirepin-7-Sulfat und Salireposid, wurden mithilfe von LC-MS/MS analysiert.

Sowohl für die Kontrolle als auch für die Pathogen-infizierten Pappelwurzeln waren erhebliche Schwankungen zwischen den biologischen Replikaten messbar. Ausnahmen waren die Verbindungen Salirepin, Salirepin-7-Sulfat und Salicin-7-Sulfat (vgl. Abbildung 10). Nur Salicin-7-Sulfat wies eine signifikante, um 30 % erhöhte Akkumulation im Vergleich zu den Kontrollwurzeln auf. Die Konzentration der anderen Salicinoide wurde dagegen nicht durch den Pathogenbefall beeinflusst und blieb konstant. Der genaue Gehalt der einzelnen Salicinoide sowie die dazu gehörigen statistischen Parameter sind dem Anhang in Tabelle 22 zu entnehmen.

Zusätzlich wurden auch andere phenolische Verbindungen untersucht. Hierzu zählten u. a. Phenolsäuren, Arbutin und Trichocarpin (vgl. Tabelle 23, Anhang). Nur Ferulasäure zeigte eine Reduktion der Akkumulation um 25 % im Vergleich zu den Kontrollwurzeln. Die Konzentration der anderen phenolischen Verbindungen blieb auch bei Pathogenbefall konstant.

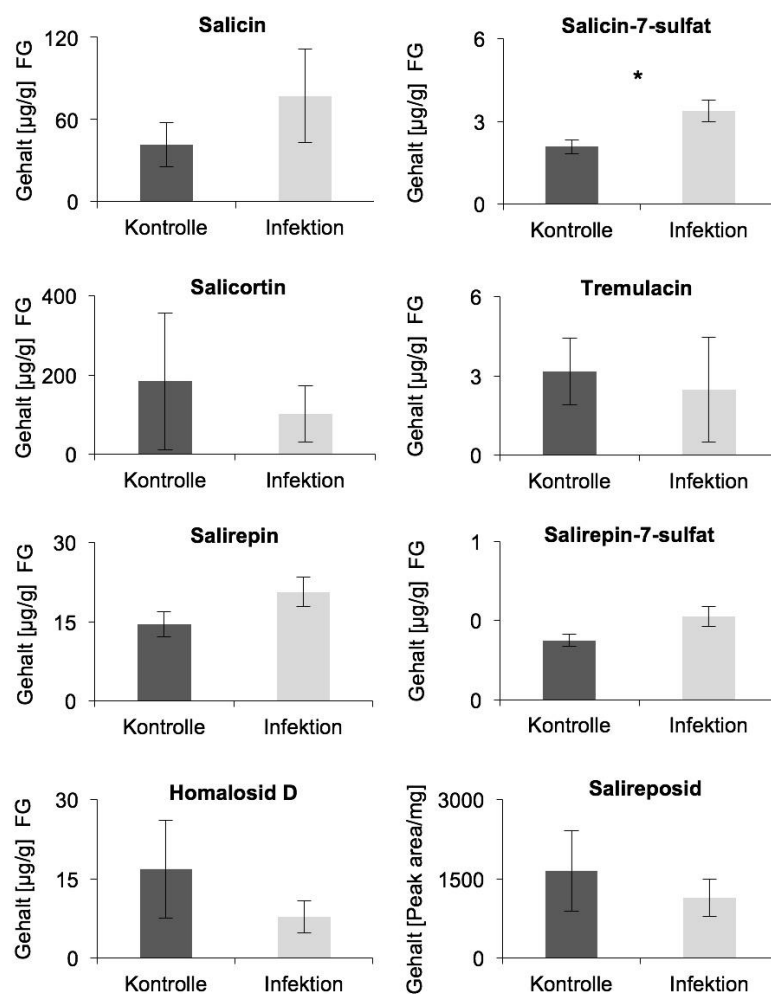


Abbildung 10: Gehalt an Salicinoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Salicinoide erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler bzw. der relative Gehalt [Peakfläche/mg] FG. Student T-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; $n = 7-8$.

4.2 Analyse apolarer Pathogen-induzierter Abwehrverbindungen in *Populus trichocarpa* Wurzeln

Die *n*-Hexan-Extrakte von Kontrollwurzeln bzw. Pathogen-infizierten Pappelwurzeln bildeten die Grundlage für die Analyse von apolaren Abwehrverbindungen mittels GC-MS bzw. der anschließenden Quantifizierung mittels GC-FID. Für die eindeutige Zuordnung pappelspezifischer Verbindungen wurden auch *n*-Hexan-Extrakte aus dem Myzel von *P. cactorum* erstellt, welche unter den gleichen Versuchsbedingungen über 5 Tage in Hydrokulturlösung co-kultiviert wurden. Als „pappelspezifisch“ werden im weiteren Verlauf somit Verbindungen bezeichnet, welche in den *n*-Hexan-Extrakten der Pappelwurzeln detektierbar waren, nicht aber in dem Myzel von *P. cactorum*. Die Analyse des Effekts des Pathogens auf den Aromaten-, Fettsäure- und Terpenegehalt bildete den Fokus der nachfolgenden Untersuchung, welche drei getrennte Versuchsdurchläufe umfasste.

4.2.1 Hydrokulturexperiment 1: Identifikation potentieller apolarer Abwehrverbindungen nach Pathogenbefall

Neben den Methanol-Extrakten wurden aus dem gleichen geernteten Wurzelmaterial (vgl. Kapitel 4.1) *n*-Hexan-Extrakte für die Analyse von apolaren Verbindungen hergestellt. Die detektierten Verbindungen wurden in drei große Stoffgruppen zusammengefasst und farblich im Totalionenstrom-Chromatogramm (TIC) hervorgehoben (vgl. Abbildung 11). In Grün wurden als erste Gruppe die Aromaten mit Benzaldehyd, Benzylalkohol, Salicylaldehyd, 2-Phenylethylalkohol und Benzylsalicylat hervorgehoben. In Lila wurden als zweite Gruppe die Fettsäuren Myristinsäure, Pentadecansäure, Palmitinsäure, Ölsäure, Stearinsäure und Fettsäure-Vorstufen Myristaldehyd markiert. In Orange wurden als letzte Gruppe die Terpene mit Limonen, 1,8-Cineol, α -Terpineol, Elemol und einem unbekanntem Sesquiterpen gekennzeichnet. Neben diesen drei großen Verbindungsgruppen wurden nicht genauer identifizierbare, unbekannte Verbindungen (U1 bis U10) detektiert und aufgrund charakteristischer Fragmente im Massenspektrum (vgl. Abbildung 22 und 23, Anhang) einheitlich allen Wurzelproben in den drei Versuchsreihen zugeordnet. Die statistische Analyse der unbekanntem Verbindungen U1 bis U10 sind dem Anhang in Tabelle 27 zu entnehmen und werden innerhalb dieser Arbeit nicht weiter behandelt.

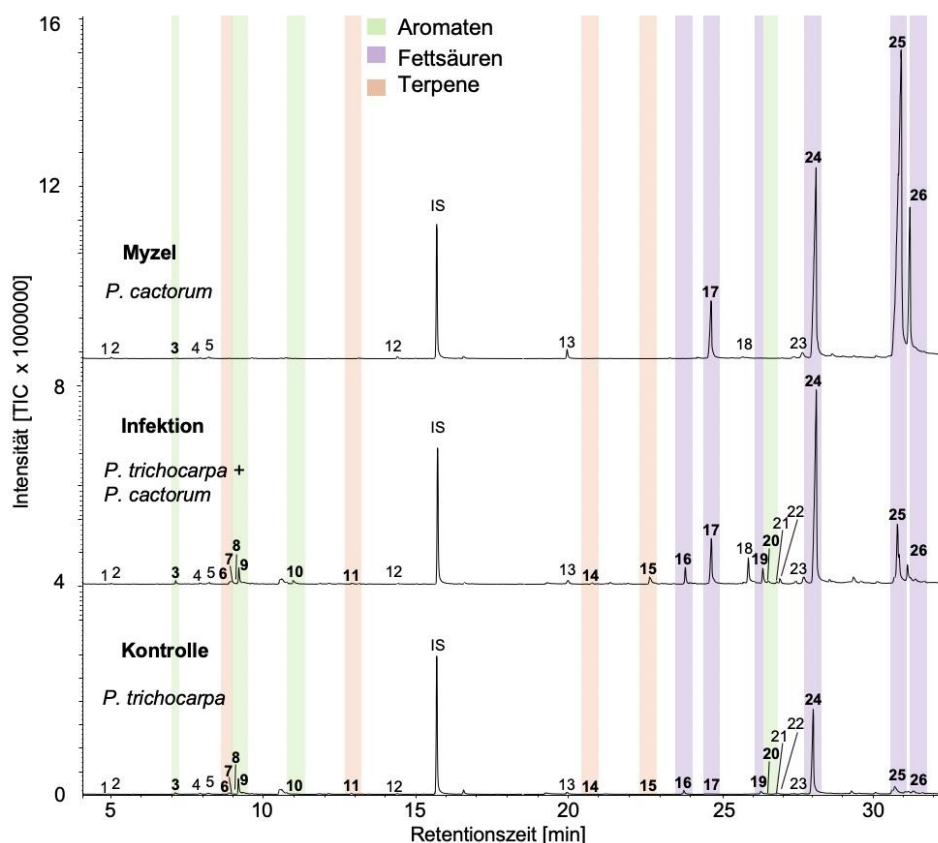


Abbildung 11: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten nicht infizierter (Kontrolle), durch *Phytophthora cactorum* infizierter (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln und dem Myzel von *P. cactorum*.

Die Extraktion der apolaren Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG) und die Extrakte wurden mit einer ZB 5-Kapillarsäule aufgetrennt und mithilfe eines Quadrupol-Massenspektrometers analysiert. Gekennzeichnet wurden im Chromatogramm der Peak des internen Standards Nonylacetat (IS) bzw. farblich hervorgehoben die drei Hauptklassen an apolaren Verbindungen: Aromaten (grün), Fettsäuren (lila) und Terpene (orange). 1: U1; 2: U2; 3: Benzaldehyd; 4: U3; 5: U4; 6: Limonen; 7: 1,8-Cineol; 8: Benzylalkohol; 9: Salicylaldehyd; 10: 2-Phenylethylalkohol; 11: α -Terpineol; 12: U5; 13: U6; 14: Elemol; 15: unbekanntes Sesquiterpen; 16: Myristaldehyd; 17: Myristinsäure; 18: U7; 19: Pentadecansäure; 20: Benzylsalicylat; 21: U8; 22: U9; 23: U10; 24: Palmitinsäure; 25: Ölsäure; 26: Stearinsäure. Es sind die TIC-Chromatogramme vergleichend dargestellt; TIC: Total Ion Count, U: unbekannte Verbindung.

In der Stoffgruppe der Aromaten konnten als pappelspezifische Verbindungen Benzylalkohol, Salicylaldehyd und 2-Phenylethylalkohol identifiziert werden (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12B). Benzaldehyd hingegen war auch in den *n*-Hexan-Extrakten des Myzels von *P. cactorum* detektierbar (vgl. Abbildung 11, Abbildung 12A). Der Gehalt an Benzaldehyd war im Vergleich von Kontrollen und Pathogen-induzierten Wurzelproben aber nicht signifikant erhöht.

Benzylalkohol und 2-Phenylethylalkohol wiesen eine signifikant erhöhte Akkumulation nach Pathogenbefall im Vergleich zu den Kontrollwurzeln auf. Mit einer 7-fachen Erhöhung des Gehaltes konnte für 2-Phenylethylalkohol die stärkste Induktion beobachtet werden. Salicylaldehyd zeigte innerhalb der Stoffklasse der Aromaten die höchste Konzentration, wobei diese nach Pathogenbefall unverändert blieb ($4,93 \mu\text{g/g} \pm 1,79$ FG nach Infektion).

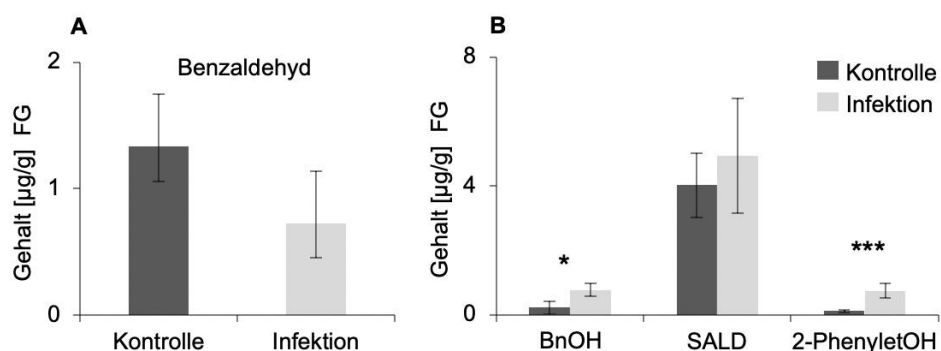


Abbildung 12: Aromatengehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln unterteilt nach dem Vorkommen der Verbindungen (A: in *P. trichocarpa* Wurzelextrakten und *P. cactorum* Myzel vorhanden, B: nur in *P. trichocarpa* Wurzelextrakten vorhanden).

Die Extraktion der Aromaten erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID. Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [µg/g] FG ± Standardfehler. Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$ %; $n = 7-8$; BnOH: Benzylalkohol; SALD: Salicylaldehyd; 2-PhenyletOH: 2-Phenylethylalkohol.

Eine Quantifizierung von Benzylsalicylat war mit den vorhandenen Wurzelproben nicht möglich, da es bei der Retentionszeit von 26 min zu einer erhöhten Akkumulation von multiplen Verbindungs-Peaks innerhalb der GC-FID Analyse kam. Der genaue Gehalt der einzelnen Aromaten, sowie die dazu gehörigen statistischen Parameter, sind dem Anhang in Tabelle 24 zu entnehmen.

Innerhalb der Stoffgruppe der Fettsäuren und ihrer Vorstufe waren die einzigen pappelspezifischen Verbindungen Pentadecansäure und Myristaldehyd (vgl. Abbildung 11, Abbildung 13 B). Die Fettsäuren Myristinsäure, Palmitinsäure, Ölsäure und Stearinsäure (vgl. Abbildung 11, Abbildung 13 A) konnten sowohl in Kontroll-Wurzeln, den Pathogen-induzierten Wurzelproben und dem Myzel von *P. cactorum* nachgewiesen werden.

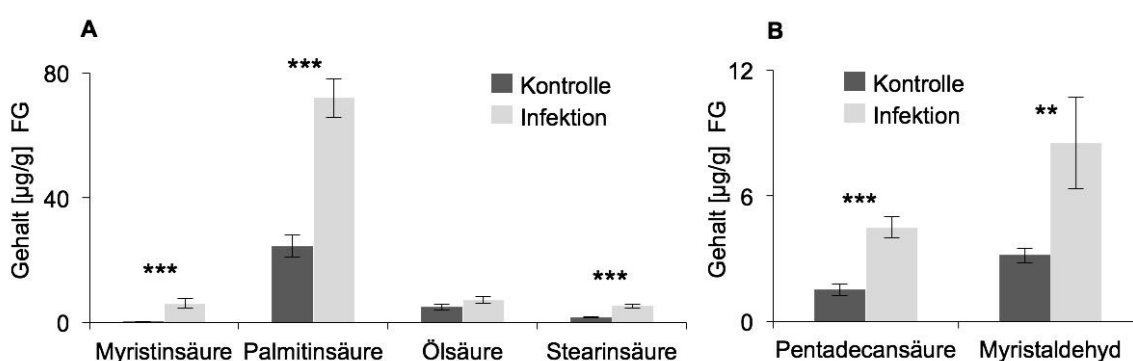


Abbildung 13: Fettsäuregehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln unterteilt nach dem Vorkommen der Verbindungen (A: in *P. trichocarpa* Wurzelextrakten und *P. cactorum* Myzel vorhanden, B: nur in *P. trichocarpa* Wurzelextrakten vorhanden).

Die Extraktion der Fettsäuren und Fettsäure-Vorstufen (Myristaldehyd) erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID. Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [µg/g] FG ± Standardfehler. Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$ %; $n = 7-8$.

Um eine eindeutige Identifikation der gefundenen Fettsäuren gewährleisten zu können, wurden die Massenspektren der Fettsäuren aus der Versuchsprobe mit authentischen Standards verglichen (vgl. Abbildung 24 und 25, Anhang). Für die Fettsäuren Myristinsäure,

Palmitinsäure und Stearinsäure wurde eine erhöhte Akkumulation in den Wurzelproben nach Pathogenbefall im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Hierbei kam es zu einer 15-fach erhöhten Akkumulation von Myristinsäure und zu einer fast 3-fach erhöhten Akkumulation von Palmitinsäure und Stearinsäure. Die höchste Akkumulation wies hierbei die Palmitinsäure nach der Pathogen-Infektion auf (Gehalt von $72 \mu\text{g/g} \pm 6,13 \text{ FG}$ nach Infektion).

Bei der pappelspezifischen Fettsäure Pentadecansäure bzw. der Vorstufe Myristaldehyd wurde eine signifikant erhöhte Akkumulation nach Pathogenbefall festgestellt. Der Gehalt von Pentadecansäure erhöhte sich hierbei um das 3-fache, der von der Fettsäure-Vorstufe Myristaldehyd um das 2,7-fache. Den genauen Gehalt der einzelnen Fettsäuren und alle statistischen Parameter sind dem Anhang in Tabelle 25 zu entnehmen.

Als einzige der drei Stoffklassen konnten die Terpene nur in Wurzelproben von *P. trichocarpa* detektiert bzw. quantifiziert werden, nicht aber in den Myzel-Proben von *P. cactorum*. Insgesamt konnten drei Monoterpene (Limonen, 1,8-Cineol und α -Terpineol) und zwei Sesquiterpene (Elemol und ein unbekanntes Sesquiterpen) eindeutig nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 11, Abbildung 14).

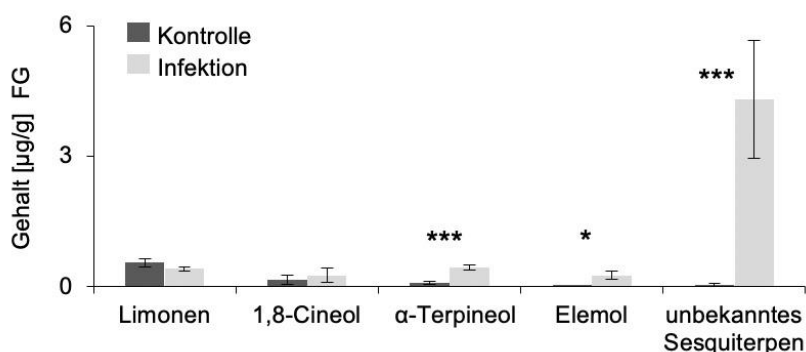


Abbildung 14: Terpengehalt in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Monoterpene (Limonen, 1,8-Cineol, α -Terpineol) und Sesquiterpene (Elemol und unbekanntes Sesquiterpen) erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Quantifizierung erfolgte mittels GC-FID. Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler. Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$ %; $n = 7-8$.

Die drei Monoterpene wurden mithilfe von authentischen Standards eindeutig verifiziert (vgl. Abbildung 26, Anhang). Die genaue Quantifizierung ergab, dass α -Terpineol, Elemol und das unbekannte Sesquiterpen eine signifikant erhöhte Akkumulation nach Pathogenbefall im Vergleich zur Kontrollwurzel aufwiesen (α -Terpineol 4,4-fach; Elemol 27-fach und das unbekannte Sesquiterpen 108-fach). Der Gehalt von Limonen und 1,8-Cineol wurde dagegen nicht durch den Pathogenbefall beeinflusst und blieb konstant. Den genauen Gehalt der einzelnen Terpene und die statistischen Parameter sind dem Anhang in Tabelle 26 zu entnehmen.

Das Massenspektrum des unbekanntes Sesquiterpenes stimmt mit einem Produkt der Terpensynthese PtTPS5 (Potri.005G095500) aus Irmisch *et al.*, 2014 überein. Mit einer Konzentration von $4,31 \mu\text{g/g}$ FG nach Infektion liegt im Vergleich zu anderen Sesquiterpenen

eine sehr hohe Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes in den Pathogen-induzierten Wurzelproben vor. Auch konnte innerhalb der biologischen Replikate nur in einer Kontrollwurzel eine geringe Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes nachgewiesen werden.

4.2.2 Hydrokulturexperiment 2: Wiederholte Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes nach Pathogenbefall

Um die spezifische Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes genauer bestimmen zu können, wurde das Hydrokultur-Experiment wiederholt. Auch bei der Versuchswiederholung wurden die Pappel-Stecklinge (*P. trichocarpa*) in Hydrokultur mit einer anschließenden Infektion der Wurzeln mit dem Oomyzeten *P. cactorum* über 5 Tage co-kultiviert. Die gefundenen Verbindungen wurden erneut den drei Hauptklassen Aromaten, Fettsäuren und Terpene zugeordnet (vgl. Abbildung 15).

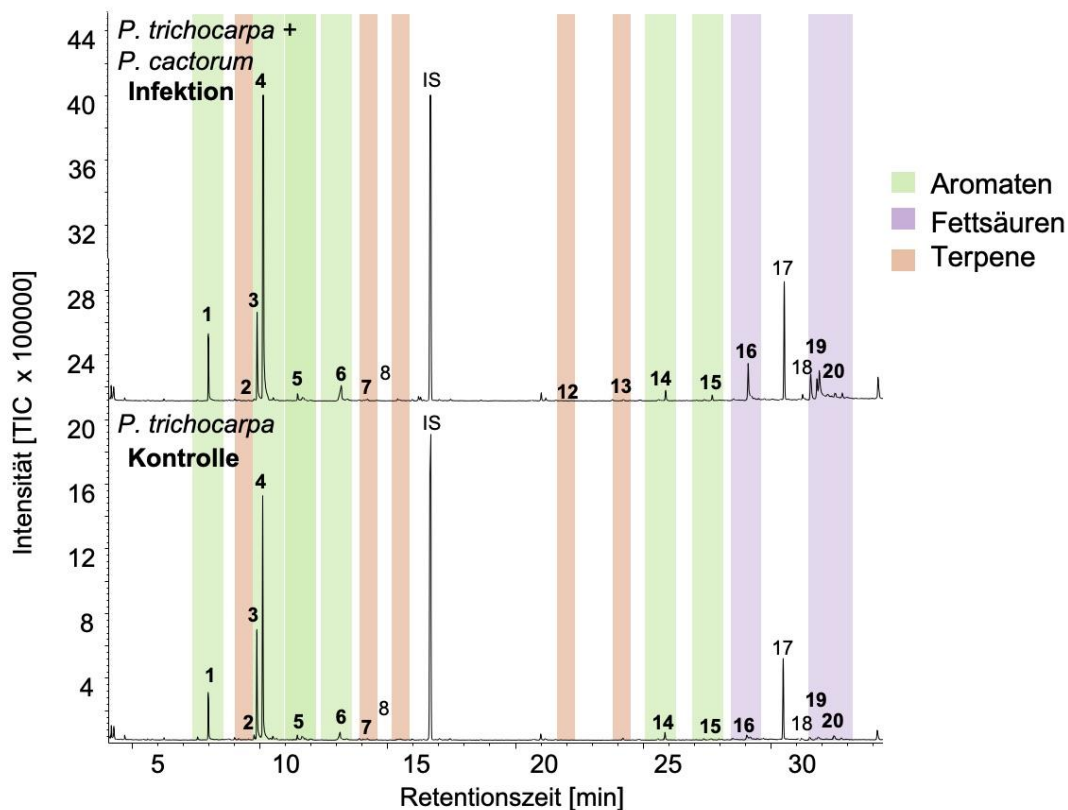


Abbildung 15: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten nicht infizierter (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierter (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln ermittelt in der Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes.

Die Extraktion der apolaren Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Extrakte wurden mit einer ZB 5- Kapillarsäule aufgetrennt und mithilfe eines Quadrupol-Massenspektrometers analysiert. Gekennzeichnet wurden im Chromatogramm der Peak des internen Standards Nonylacetat (IS) bzw. farblich hervorgehoben die drei Hauptklassen an apolaren Verbindungen: Aromaten (grün), Fettsäuren (lila) und Terpene (orange). 1: Benzaldehyd; 2: Limonen; 3: Benzylalkohol; 4: Salicylaldehyd; 5: Methylbenzoat; 6: Benzoesäure; 7: α -Terpineol; 8: U5; 12: Elemol; 13: unbekanntes Sesquiterpen; 14: Benzylbenzoat; 15: Benzylsalicylat; 16: Palmitinsäure; 17: unbekannte aromatische Verbindung; 18: Phytol; 19: Linolensäure; 20: Stearinsäure. Es sind die TIC-Chromatogramme vergleichend dargestellt; TIC: Total Ion Count, U: unbekannte Verbindung.

Die statistische Auswertung und die Konzentrationen der Aromaten und Fettsäuren sind dem Anhang in Tabelle 28 zu entnehmen. Auch bei diesem Versuchsaufbau war eine signifikante Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes nach Pathogenbefall in der Pappelwurzel messbar (vgl. Abbildung 16). Innerhalb dieses Experimentes konnte in den neun biologischen Replikaten der Kontrollgruppe keine Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes ermittelt werden.

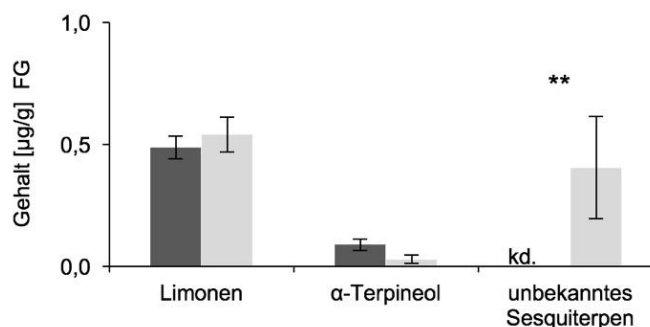


Abbildung 16: Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes zur Bestimmung des Terpenegehalts in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Terpene erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Quantifizierung erfolgte mithilfe von GC-FID. Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [µg/g] FG ± Standardfehler; Statistik: Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$ %; $n = 9$, kd: keine Detektion.

Die Akkumulation der Monoterpene Limonen und α-Terpineol blieb auch bei Pathogenbefall konstant. Die Höhe des Gehaltes an Terpenen im Wurzelmaterial war vergleichend zum ersten Hydrokulturexperiment jedoch deutlich reduziert, wodurch eine eindeutige Quantifizierung des Sesquiterpenes Elemol nicht möglich war.

Durch die Versuchswiederholung konnte validiert werden, dass die Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes nach Pathogenbefall kein Zufallsbefund innerhalb des ersten Hydrokulturexperimentes war. Eine Analyse der polaren Verbindungen war innerhalb dieser Versuchsreihe durch die geringe Menge an Wurzelmaterial nicht möglich.

4.2.3 Erdexperiment: Keine Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes bei der Kultivierung von Pappeln in Erde

Aufgrund der artifiziellen Versuchsbedingungen, welche sich aus der Kultivierung von Pappel-Stecklingen (*P. trichocarpa*) in Hydrokultur ergaben, wurde das Experiment in Erde als Wachstumsmedium wiederholt. Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Induktion des unbekanntes Sesquiterpenes nach Pathogenbefall auch unter natürlichen Bedingungen zu beobachten und zudem die Induktionen der anderen apolaren Verbindungen zu replizieren (vgl. Kapitel 4.2.1). Innerhalb dieses Experimentes konnten jedoch nur apolare Verbindungen aus der Klasse der Aromaten und Fettsäuren identifiziert werden (vgl. Abbildung 17).

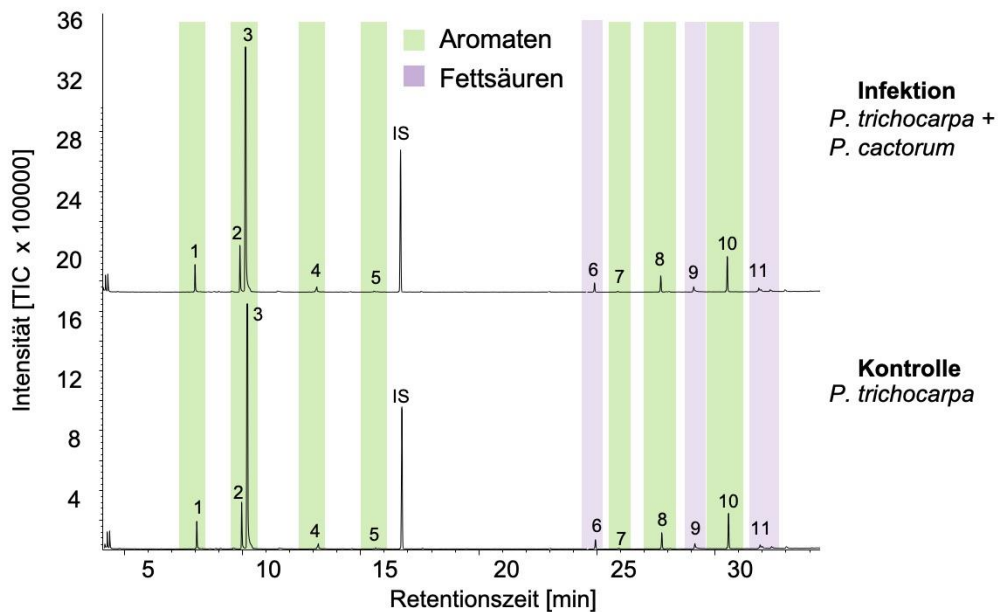


Abbildung 17: GC-MS-Chromatogramme von Extrakten aus nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der apolaren Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Die Extrakte wurden mit einer ZB5-Kapillarsäule aufgetrennt und mithilfe eines Quadrupol-Massenspektrometers analysiert. Gekennzeichnet wurde im Chromatogramm der Peak des internen Standards Nonylacetat (IS) bzw. farblich hervorgehoben die zwei Hauptklassen an apolaren Verbindungen: Aromaten (grün) und Fettsäuren (lila). 1: Benzaldehyd; 2: Benzylalkohol; 3: Salicylaldehyd; 4: Benzoesäure; 5: Salicylalkohol; 6: Myristaldehyd; 7: Benzylbenzoat; 8: Benzylsalicylat; 9: Palmitinsäure; 10: unbekannte aromatische Verbindung; 11: Linolensäure. Es sind die TIC-Chromatogramme vergleichend dargestellt; TIC: Total Ion Count.

Terpene konnten nicht detektiert werden. Die genauen statistischen Parameter und der Gehalt der einzelnen Verbindungen sind dem Anhang in Tabelle 29 zu entnehmen.

Anders als bei den zwei Experimenten in Hydrokultur war kein Unterschied zwischen den Kontrollwurzeln und Pappelwurzeln nach Pathogenbefall hinsichtlich ihres Gehaltes an potenziell gebildeten Abwehrverbindungen quantifizierbar. Dies kann ein Hinweis auf eine erschwerte bzw. fehlgeschlagene Infektion der Wurzeln mit *P. cactorum* im Erdreich sein. Durch die fehlende Induktion von apolaren Abwehrverbindungen wurde von einer Methanol-Extraktion und der Analyse von polaren Verbindungen abgesehen.

4.3 Transkriptomdaten

Zur Bestimmung der biologischen Grundlagen der beobachteten metabolischen Veränderungen der Pappelwurzel wurden Transkriptome von vier Kontrollen bzw. vier Pathogen-infizierten Pappelwurzeln aus dem ersten Hydrokultorexperiment (Kapitel 4.2.1) analysiert und verglichen. Im Zuge einer allgemeinen Pathogen-induzierten Abwehrreaktion gegenüber Oomyzeten kann es zu einer Veränderungen im pflanzlichen Transkriptom kommen; dieses haben verschiedene Studien zum Beispiel bereits am Fall von Erdbeeren (Toljamo *et al.*, 2016), 2016), Klee (Yadav *et al.*, 2019) und Mais (Allardyce *et al.*, 2013) beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Fokus auf die signifikant hochregulierten Kandidatengene gelegt. Die Sortierung erfolgte hierbei nach EDGE-test fold change >5 und einer false discovery rate <0,01 % und ergab 201 Kandidatengene. Diese Kandidatengene wurden in folgende Kategorien sortiert: Enzyme, Proteaseinhibitoren, Speicherproteine, Transkriptionsregulatoren, Transporter, sekretorische Proteine und Gene mit einer unbekanntem Funktion (vgl. Abbildung 18A).

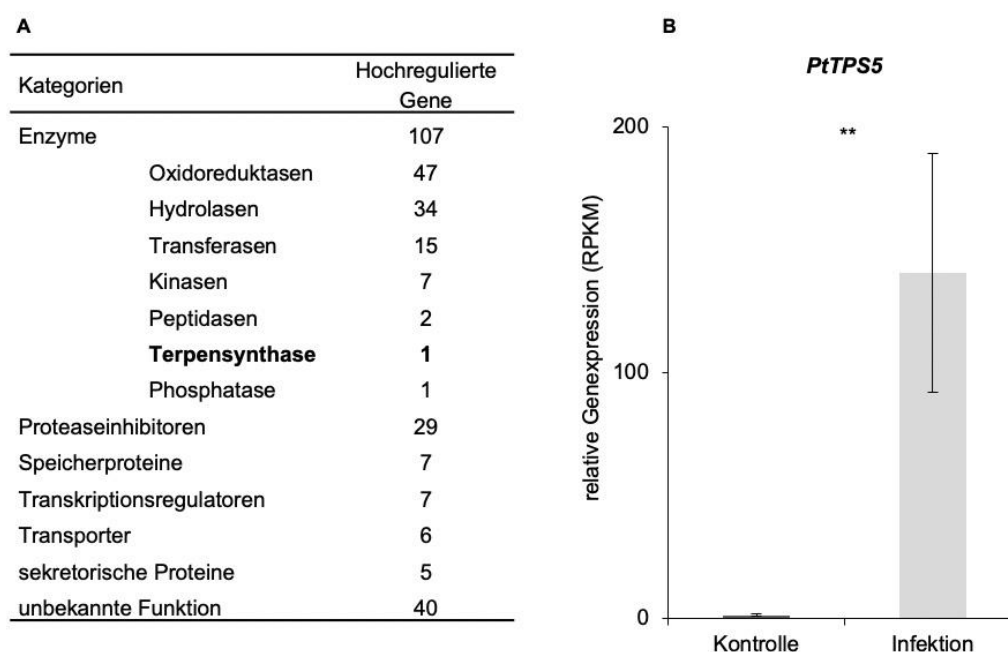


Abbildung 18: Kategorien (A) von signifikant hochregulierter Kandidatengenen im Vergleich zwischen nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln und die relative Genexpression der identifizierten Terpensynthase *PtTPS5* (Potri.005G095500) (B).

RPKM: reads per kilobase of exon per million fragments mapped, EDGE (Estimated Degree of Gene Expression) -test fold change > 5, false discovery rate < 0,01 %; Student T-Test (t = 5,57; p = 0,0014), Kontrolle n = 4; Infektion n = 4.

Hervorgehoben wurden die Kategorien, welche laut Literatur im Zusammenhang mit einer potentiellen Abwehrreaktion stehen können. Innerhalb des Datensatzes wurden 29 Proteaseinhibitoren gefunden, welche in den Pathogen-infizierten Pappelwurzeln eine signifikant erhöhte Genexpression aufwiesen. Ebenfalls war die Genexpression von sieben Transkriptionsregulatoren, z. B. dem „WRKY-DNA binding Protein“ induziert.

In die Kategorie der Gene mit noch unbekannter Funktion wurde Osmotin und das „Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein“ (TLP) einsortiert. Auch die Genexpression dieser beiden Proteine war in der Pathogen-infizierten Pappelwurzel signifikant hochreguliert.

In der Kategorie der Enzyme konnten einigen Kandidatengene potenzielle Funktionen bei der pflanzlichen Abwehr gegenüber Oomyzeten zugeordnet werden. Innerhalb der Hydrolasen kam es zum Beispiel zu einer signifikanten Hochregulation der Phospholipase 2A (PLA) und dreier Chitinasen. Ebenfalls waren fünf Rezeptorkinasen (RLK, *receptor-like-protein kinase*) aus der Kategorie hochreguliert. In der Kategorie der Oxidoreduktasen waren sechs verschiedene CYP P450 signifikant hochreguliert. Auch waren zwei Glutathione-S-Transferasen (GST) in den Pathogen-induzierten Pappelwurzeln signifikant hochreguliert. Die Terpensynthase (*Potri.005G095500*) *PtTPS5* zeigte die annähernd höchste signifikante Steigerung an relativer Genexpression innerhalb des gesamten Transkriptom-Datensatzes (vgl. Abbildung 18 B). Diese Terpensynthase wurde auch schon bei Irmisch *et al.*, 2014 mit der möglichen Produktbildung des unbekanntes Sesquiterpenes (vgl., Kapitel 4.2.1, 4.2.2) in Zusammenhang gebracht. Ein potentieller Zusammenhang zwischen der Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes, der Expression von *PtTPS5* und der Infektion mit *P. cactorum* in der Pappelwurzel sollte in den weiteren Experimenten näher untersucht werden.

4.4 Potentieller Zusammenhang zwischen Genexpression von *PtTPS5*, Produkt-Akkumulation und Infektion in *P. trichocarpa* Wurzeln

Zur Verifizierung der Transkriptomdaten wurde die Transkripthäufigkeit von *PtTPS5* unter Verwendung von qRT-PCR analysiert. Des Weiteren sollte die Wurzelinfektion von *P. cactorum* mit Hilfe PCR-basierter Diagnostik nachgewiesen werden. Hierfür wurde ein gattungsspezifisches Gen, das „ras-related protein *Ypt1*“ Gen, ausgewählt und die relative Genexpression von *Ypt1* in den Pappelwurzeln unter Verwendung von *Phytophthora*-genus spezifischen Primern (Yph1F-Yph2R) quantifiziert (Schena *et al.*, 2008).

Es wurden Kontrollwurzeln bzw. Pathogen-infizierte Wurzeln aus dem ersten Hydrokulturexperiment Kapitel 4.2.1 und Wurzelproben aus dem Erdexperiment Kapitel 4.2.3 verwendet (vgl. Abbildung 19).

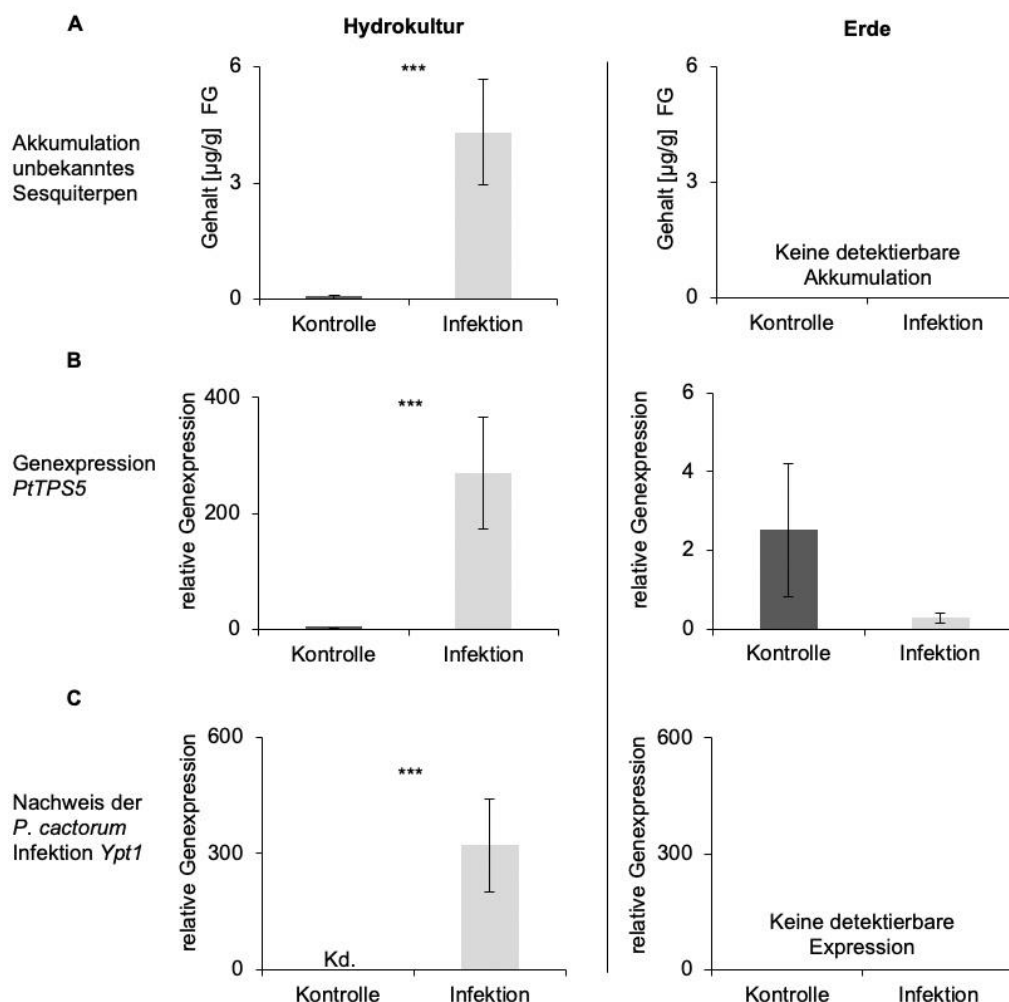


Abbildung 19: Vergleich zwischen Produktakkumulation des unbekannten Sesquiterpenes, Genexpression von *PtTPS5* und Infektion der *Populus trichocarpa* Wurzeln mit *Phytophthora cactorum* in zwei verschiedenen Experimentaufbauten (Hydrokultur und Erde).

A: Terpengehalt; Extraktion des unbekannten Sesquiterpenes erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG), Hydrokultur $n = 7-8$, Erde $n = 10$. B: Relative Genexpression von *PtTPS5*, Messung mittels quantitativer qRT-PCR ($n = 8$). C: Nachweis der Wurzelinfektion von *P. cactorum*, relative Genexpression von *Ypt1* (ras-related protein) als einem *Phytophthora* gattungsspezifischem Transkript nach Schena *et al.*, 2008 ($n = 8$). Dargestellt ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler (A) bzw. die relative Genexpression \pm Standardfehler (B und C); Statistik: Student T-Test bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test: * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$ %; kd: keine Detektion.

Abbildung 19 zeigt, dass eine signifikant erhöhte relative Genexpression von *PtTPS5* in den Pathogen-infizierte Wurzeln des Hydrokulturexperimentes bestimmt werden konnte (qRT-PCR Auswertung nach (Pfaffl, 2004)). Im Gegensatz dazu blieb die relative Genexpression von *PtTPS5* in den Pappelwurzeln aus dem Erdexperiment unverändert (vgl. Abbildung 19 B). Analog zu der Veränderung der Genexpression von *PtTPS5* verhielt sich die Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes (vgl. Abbildung 19 A). Wie schon in Kapitel 4.2.1 bzw. 4.2.3 beschrieben, kam es zu einer signifikant erhöhten Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes in Pathogen-induzierten Wurzeln innerhalb des Hydrokulturexperimentes, wohingegen keine Detektion innerhalb des Erdexperimentes vorlag (vgl. Abbildung 19 C).

Unter Verwendung von PCR-basierter Diagnostik konnte eine *P. cactorum* Infektion in den Pathogen-infizierte Wurzeln des Hydrokulturexperimentes bestätigt werden. Im Gegensatz dazu konnte in den Kontrollwurzeln des Hydrokulturexperimentes bzw. Kontrollen und Infektion des Erdexperimentes kein gattungsspezifisches Transkript von *Ypt1* detektiert werden (vgl. Abbildung 19 C). Mithilfe der Sequenzierungen der in *Escherichia coli* transformierten qRT-PCR-Produkte konnte durch Vergleich mit den Originalsequenzen der Gene bestätigt werden, dass es sich bei den amplifizierten Transkripten um jene der zu untersuchenden *PtTPS5* bzw. *Ypt1* handelte. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es nur bei einer erfolgreichen Wurzelinfektion zu einer erhöhten relativen Genexpression von *PtTPS5* bzw. Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes kam. Ohne eine verifizierte Wurzelinfektion durch den Oomyzeten *P. cactorum* kam es zu keiner Detektion des unbekanntes Sesquiterpenes bzw. blieb die relative Genexpression von *PtTPS5* konstant.

4.5 Heterologe Expression und Enzymassay der Sesquiterpen-Synthase PtTPS5

Um die Produktbildung des unbekanntes Sesquiterpenes durch PtTPS5 zu verifizieren, erfolgte eine heterologe Expression von PtTPS5 in *E. coli*. Ausgehend von der Transkriptomdatenanalyse (Kapitel 4.3) diente die Pathogen-infizierte Wurzel-cDNA aus dem ersten Hydrokulturexperiment der Amplifikation von *PtTPS5*. Eine Amplifikation der *PtTPS5* aus der Wurzel-cDNA war erfolgreich. Die anschließende Ligation in den pET100-Vektor blieb jedoch auch nach mehrmaliger Optimierung der Ligations-Bedingungen erfolglos, sodass eine synthetische Herstellung des Expressionsvektors pET100_PtTPS5 bei Thermo Fisher Scientific Inc. in Auftrag gegeben wurde.

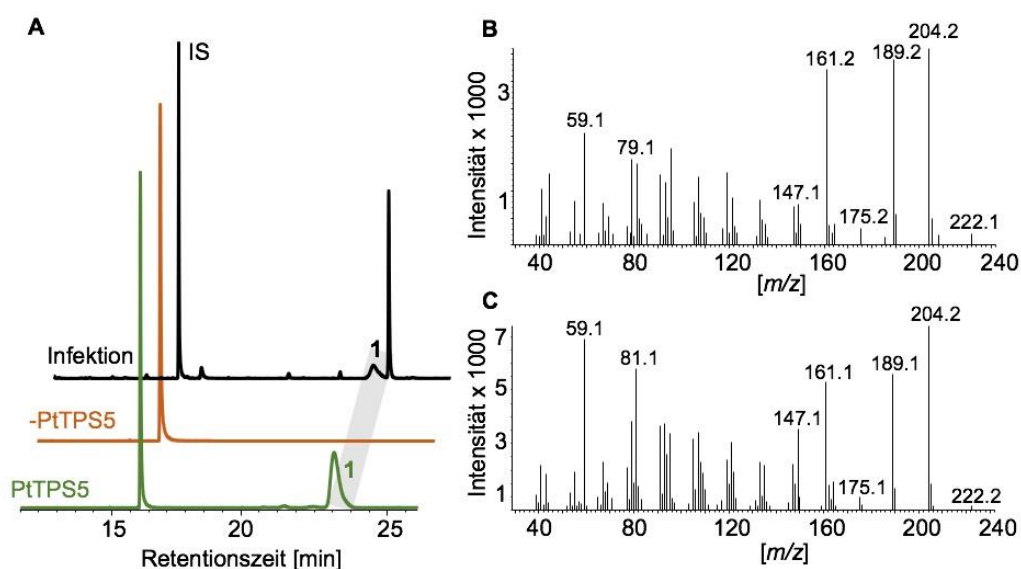


Abbildung 20: Vergleich repräsentativer GC-MS Chromatogramme (A) und Massenspektren (B und C) von *n*-Hexan-Extrakten aus *Phytophthora cactorum* infizierten *Populus trichocarpa* Wurzeln (Infektion) und dem PtTPS5 Produkt.

A: Chromatogramme von *n*-Hexan-Extrakten der infizierten *P. trichocarpa* Wurzel mit *P. cactorum* (Infektion, schwarz), sowie das gebildete Produkt von PtTPS5 (grün). Die heterologe Expression von PtTPS5 erfolgte in *E. coli* und der erhaltene Rohextrakt wurde mit FPP (Farnesyldiphosphat) inkubiert. Als Negativkontrolle (-PtTPS5, orange) erfolgte eine Proteininaktivierung bei 95 °C für 10 min. B und C: Massenspektren aus der Infektion (B) und dem PtTPS5 Enzymassay (C) bei einer Retentionszeit von 24 min. IS: interner Standard Nonylacetat; 1: Peak unbekanntes Sesquiterpen.

Mit diesem synthetisch hergestellten Expressionsvektor erfolgte die heterologe Expression von PtTPS5 in *E. coli*. Mit dem gewonnenen Rohextrakt aus der anschließenden Proteinaufreinigung wurden die weiteren Enzymassays durchgeführt. Im Enzymassay mit dem Substrat Farnesyldiphosphat (FPP) sollte die enzymatische Aktivität des rekombinanten Proteins bestimmt werden. Die Analyse der potentiellen Enzymprodukte erfolgte mittels GC-MS. Potentiell sollte die isolierte PtTPS5 das Substrat FPP zu dem unbekanntes Sesquiterpen umsetzen. Die Identifikation des unbekanntes Sesquiterpenes erfolgt hierbei durch den Vergleich der Massenspektren und Retentionszeiten aus der Pathogen-infizierten Versuchsprobe (vgl. Kapitel 4.2) und dem Enzymassay. Der Overlay der entsprechenden Chromatogramme aus dem Enzymassay von PtTPS5 und der Versuchsprobe zeigte die

Übereinstimmung der Retentionszeiten und Massenspektren des unbekanntes Sesquiterpenes in *P. cactorum* infizierten Pappelwurzeln und dem Enzymassay von PtTPS5 (vgl. Abbildung 20 A, B). In der Probe mit dem durch Hitze denaturiertem Protein (-PtTPS5) kam es erwartungsgemäß zu keiner Produktakkumulation.

5 Diskussion

Die gegenwärtige Forschung zu hemibiotrophen Wurzelpathogenen der Art *Phytophthora* zeigt auf, dass diese neben einem großen Wirtsspektrum auch die charakteristische Fähigkeit besitzen, sich schnell an pflanzliche Abwehrverbindungen und Fungizide zu adaptieren (Jeffers *et al.*, 2004; Mei *et al.*, 2014). *Phytophthora* Arten können leicht das basale Immunsystem der Pflanze umgehen (Yang *et al.*, 2018), das Wurzelsystem der Pflanze schädigen (Oßwald *et al.*, 2014) und somit erhebliche Ertragsverluste in der Landwirtschaft und Schäden in diversen Ökosystemen verursachen. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der natürlichen Wurzelabwehr von Pflanzen bei Befall durch *Phytophthora* Arten höchst bedeutsam. In dieser Arbeit wurden am Beispiel von *Populus trichocarpa* Pathogen-induzierte Abwehrverbindungen in den Wurzeln nach Befall mit dem Oomyzeten *Phytophthora cactorum* identifiziert und analysiert. Es sollten die potentiellen Rollen von polaren bzw. apolaren Verbindungen auf die Pflanzen-Pathogen-Interaktion näher untersucht werden. Unter Einbezug von transkriptionellen Änderungen, qRT-PCR sowie heterologer Genexpression sollten neue potentielle Abwehrverbindungen und ihre Biosynthese-Wege identifiziert werden.

5.1 Potentielle Rolle von polaren Verbindungen in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion

In der Klasse der polaren Verbindungen wurde die Veränderung des Gehalts an Phytohormonen und Salicinoiden in *P. trichocarpa* Wurzeln durch *P. cactorum* Befall untersucht (vgl. Kapitel 4.1). Innerhalb der Phytohormone konnte nach Pathogenbefall eine signifikant erhöhte Akkumulation von Jasmonsäure (JA), sowie dem glykosylierten Phytohormon Salicylsäure-2-O-D-Glykosid (SA-Glc) nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 8 und 9). Sowohl Salicylsäure (SA), die Vorstufe von JA *cis*-Oxophytodiensäure (*cis*-OPDA), sowie andere JA-Konjugate zeigten hingegen keine induzierte Akkumulation nach Pathogenbefall (vgl. Abbildung 8). Der bestehenden Literatur zufolge spielen Phytohormone eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der pflanzlichen Immunität (Saubeau *et al.*, 2016; Wani *et al.*, 2016; Ding und Ding, 2020). Insbesondere regulieren sie entscheidend die nachgeschalteten Abwehrreaktionen, wie die Induktion von spezialisierten Metaboliten und PR (*Pathogenesis-related*)-Proteinen (Bari und Jones, 2009). Von JA ist bekannt, dass sie hauptsächlich in der Pflanzenabwehr von nekrotrophen Pathogenen und Herbivoren eine Rolle spielt, wohingegen SA primär nach einer Pathogeninfektion mit biotrophen und hemibiotrophen Erregern akkumuliert (Glazebrook, 2005; Howe und Jander, 2008; Antico *et al.*, 2012). Allerdings haben schon frühere Studien auf eine mögliche Rolle von JA bei der Abwehr hemibiotropher Pathogene hingewiesen. So konnte gezeigt werden, dass es nach einem Befall mit *Phytophthora cinnamomi* in Avocado (*Persea americana*) zu einer Induktion

von JA kam (Mahomed und Berg, 2011). Unterstützt wird dieser Befund von Guerreiro *et al.*, 2016, Saubeau *et al.*, 2016 und Toljamo *et al.*, 2016, welche in Studien ebenfalls den Zusammenhang zwischen einer erhöhten Akkumulation von JA und der Resistenzentwicklung von Pflanzen gegenüber Oomyzeten nachgewiesen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die genannten Befunde und zeigen, dass JA auch im Rahmen der Abwehr hemibiotropher Pathogene in Pappeln akkumuliert wird. Obwohl eine Akkumulation von SA nach Pathogeninfektion in mehreren Studien beschrieben worden ist, könnte der gleichbleibende Gehalt an SA möglicherweise durch segregierte Phytotoxine von *P. cactorum* erklärt werden. In einer Studie von Brooks *et al.*, 2005 wird der Einfluss von Phytotoxinen auf eine gehemmte SA-vermittelte Abwehrreaktion beschrieben. Warum es zu einer induzierten Akkumulation nach Pathogenbefall von SA-Glc gekommen ist, müsste weiterführend untersucht werden. Als ein lokaler SA-Speicher im Wurzelgewebe (Hennig *et al.*, 1993) könnte SA-Glc potentiell nicht von dem hemmenden Effekt des Phytotoxines betroffen sein.

Es ist bekannt, dass Salicinoide in Weidengewächsen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr von Herbivoren spielen (Hwang und Lindroth, 1997; Boeckler *et al.*, 2011; Rubert-Nason *et al.*, 2015), welche sich zudem mit zunehmender struktureller Komplexität des Salicinoiden (z. B. Salicortin oder Tremulacin) verstärkt (Philippe und Bohlmann, 2011). So wurde in der Studie von Hwang und Lindroth, 1997, gezeigt, dass die Überlebensrate von Larven von *Lymantria dispar* direkt vom Gehalt an phenolischen Glykosiden beeinflusst wird. Ebenfalls zeigte Rubert-Nason *et al.*, 2015, dass es vergleichend zur Kontrolle nach Fraß von *Lymantria dispar* zu einer 22 % erhöhten Akkumulation an Salicinoiden in den Blättern von herbivorie-geschädigten Pappeln kam. Innerhalb der vorliegenden Arbeit konnte in der Klasse der Salicinoide jedoch nur eine signifikante Akkumulation von Salicin-7-Sulfat nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 10). Alle anderen untersuchten Salicinoide (Salicin, Salicortin, Tremulacin, Salirepin, Salirepin-7-sulfat, Homalosid D und Salireposid) zeigten keine induzierte Akkumulation nach dem Pathogenbefall durch *P. cactorum* (vgl. Abbildung 10). Dies würde mit den oben beschriebenen Studien korrespondieren, da Salicinoide in der Literatur im Schwerpunkt als eine induzierte Abwehr gegenüber Herbivoren und nicht Pathogenen beschrieben werden. Die Akkumulation von Salicin-7-sulfat ist wahrscheinlich auf eine Mineralstoffspeicherung in der Pappel zurückzuführen. In einer kürzlich erschienenen Arbeit diskutieren Lackus *et al.*, 2020, diese potentielle Funktion von Salicin-7-Sulfat und Salirepin-7-Sulfat als Schwefelspeicherung in Pappeln. Obwohl sulfatierte Verbindungen auch eine nachgelagerte Rolle in der Abwehr spielen können (De Vrieze *et al.*, 2015), ist davon aufgrund der fehlenden Akkumulation der komplexeren Salicinoide im Wurzelgewebe nicht auszugehen. Diese Annahme müsste jedoch noch mit einem Bioassay (*in vitro*), in dem der Effekt von Salicin-7-sulfat auf das Myzelwachstum oder auf die Germination der Zoosporen von *P. cactorum* untersucht wird, abschließend geklärt werden.

5.2 Potentielle Rolle von apolaren Verbindungen in der Pflanzen-Pathogen-Interaktion

Bei der Analyse von apolaren Verbindungen wurden die *P. trichocarpa* Wurzeln nach Befall durch *P. cactorum* auf eine Veränderung des Gehalts an Aromaten, Fettsäuren und Terpenen hin untersucht (vgl. Kapitel 4.2). Neben der Analyse der Pappelwurzeln wurden auch die apolaren Verbindungen des Myzels von *P. cactorum* analysiert, sodass im Folgenden als „pappelspezifische“ Verbindungen diejenigen beschrieben werden, welche nur im *n*-Hexan-Extrakt der Pappelwurzel detektierbar waren.

Unter den Aromaten konnten Benzylalkohol, Salicylaldehyd, 2-Phenylethylalkohol und Benzylsalicylat als „pappelspezifische“ Verbindungen detektiert werden. Benzaldehyd war jedoch auch im Myzel von *P. cactorum* vorhanden (vgl. Abbildung 12 A). Nach Pathogenbefall konnte zudem in der Wurzel von *P. trichocarpa* die signifikante Akkumulation von Benzylalkohol und 2-Phenylethylalkohol nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 12 B). Diese Befunde unterstützen die bestehende Literatur, in der flüchtigen Aromaten in Pflanzen eine putative Funktion in der Wurzel-Umwelt-Interaktion zugeschrieben wird (Perry *et al.*, 2007; Wenke *et al.*, 2010; Rasmann *et al.*, 2012). Ebenfalls wurde die Akkumulation von Aromaten in infizierten Wurzelgeweben bereits als Zeichen der Resistenzentwicklung gegenüber Pathogenen in Angiospermen angesehen (Cahill *et al.*, 1993; Ockels *et al.*, 2007). Die potentielle Rolle von 2-Phenylethylalkohol und Benzylalkohol innerhalb der Abwehrreaktion von Pappeln diskutierte schon Reichardt *et al.*, 1990, und Günther *et al.*, 2019. Hingegen ist die Akkumulation von Benzaldehyd im Myzel von *P. cactorum* in der Literatur noch nicht beschrieben worden. In zwei Studien wurden die Applikation von hohen Konzentrationen von Benzaldehyd als hemmend auf das Myzelwachstum von *P. cactorum* beschrieben (Lee *et al.*, 2009; Lingbeck *et al.*, 2015). Warum es zu einer Akkumulation von Benzaldehyd direkt im Myzel von *P. cactorum* kam, muss jedoch noch untersucht werden.

In der Klasse der Fettsäuren (FA) konnten Myristinsäure, die Fettsäure-Vorstufe Myristaldehyd, Palmitinsäure, Pentadecansäure, Ölsäure und Stearinsäure detektiert werden (vgl. Abbildung 13). Nach Pathogenbefall in der Wurzel von *P. trichocarpa* kam es bei allen FAs bis auf Ölsäure zu einer signifikanten, induzierten Akkumulation. Als „pappelspezifische“ Verbindungen konnten allerdings nur Pentadecansäure und Myristaldehyd identifiziert werden (vgl. Abbildung 13 B). In Fatiha, 2019, wurden Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolensäure als häufige FA in Pflanzen beschrieben. Freie Fettsäuren tragen durch ihre Interkalation in die Pilzmembran und einer dadurch bedingten Erhöhung der Fluidität zu einer Reduktion des Pilzwachstums bei (Pohl *et al.*, 2011). Besonders die Fettsäuren Pentadecansäure und Myristinsäure werden in der Literatur oft wegen ihrer antimykotischen Wirkung hervorgehoben (Agoramoorthy *et al.*, 2007). Myristaldehyd stellt die reduzierte Verbindung der Myristinsäure dar und wurde unter anderem in Pino und Regalado, 2010 und Judzentiene *et al.*, 2019 als isolierte Verbindung aus pflanzlichem Gewebe beschrieben. Als

Vorstufe der antimykotisch wirkenden Myristinsäure kann Myristaldehyd in der Pappel potentiell eine Rolle in der Abwehrreaktion einnehmen. Allerdings spielen FAs wie Palmitinsäure, Stearinsäure und Ölsäure auch im Metabolismus des Oomyzeten eine zentrale Rolle (Spring und Haas, 2002). Unterschiedliche Konzentrationen und Zusammensetzungen dieser Fettsäuren entscheiden zwischen sexuellem oder asexuellem Entwicklungsstadium von Oomyzeten (Yousef *et al.*, 2012). In der Wiederholung des Hydrokultur-Experiments konnte ebenfalls Linolensäure mit einer signifikanten Akkumulation im Wurzelgewebe nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 28, Anhang). Linolensäure ist einerseits essentiell für die Synthese von JA und könnte deshalb eine Rolle in der Abwehrreaktion der Pflanze einnehmen (León und Sánchez-Serrano, 1999). Andererseits ist Linolensäure aber auch verantwortlich für die Induktion der Bildung von Zoosporen in Oomyzeten (Spring und Haas, 2002). Somit bleibt es mit Ausnahme von Pentadecansäure und der Fettsäurevorstufe Myristaldehyd unklar, ob es sich bei der Akkumulation von FAs um einen potentiellen Abwehrmechanismus der Pflanze oder um segregierte Fettsäuren aus dem Myzel von *P. cactorum* handelte. Weiterführende Experimente mit einem Bioassay sollten den Einfluss von FAs im Allgemeinen und von Pentadecansäure und Myristaldehyd im Besonderen auf das Myzelwachstum sowie die Germination der Zoosporen weiter aufklären.

Innerhalb der Klasse der Terpene konnten Limonen, α -Terpineol, 1,8-Cineol, Elemol und ein unbekanntes Sesquiterpen im Wurzelgewebe von *P. trichocarpa* detektiert werden. Terpene waren nur im Wurzelgewebe der Pappel und nicht im Myzel von *P. cactorum* nachweisbar. Zu einer erhöhten Induktion nach Pathogenbefall kam es bei α -Terpineol, Elemol und dem unbekanntem Sesquiterpen. Die Akkumulation von Terpenen spielen oft bei der direkten oder indirekten pflanzlichen Abwehr eine Rolle (Portero *et al.*, 2012; Sherif *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017). Auch wurde schon Relevanz von Terpenen in der Wurzelabwehr gegenüber Oomyzeten hervorgehoben (Yadav *et al.*, 2019). Dies korrespondiert mit Befunden von Lackus *et al.*, 2018, die ebenfalls einen hemmenden Effekt der Monoterpene 1,8-Cineol und β -Pinen auf das Myzelwachstum von *P. cactorum in vitro* beschrieben haben. Ein ähnlich hemmender Effekt wird auch im Zusammenhang mit einem flüchtigem Sesquiterpen aus einem Sauergrasgewächs (*Cyperus iria*) nach einem Pathogenbefall mit dem Pilz *Fusarium graminearum* beschrieben (Jiang *et al.*, 2018).

Die stärkste Akkumulation innerhalb der Klasse an apolaren Metaboliten wies nach Pathogenbefall das unbekanntes Sesquiterpen mit einer 108-fachen Zunahme seines Gehaltes auf (vgl. Abbildung 14). Das Massenspektrum dieses Sesquiterpens stimmte mit dem eines Produkts der schon beschriebenen Terpensynthese PtTPS5 (Potri.005G095500) aus Irmisch *et al.*, 2014, überein. Auf die Rolle des unbekanntes Sesquiterpenes in der Abwehrreaktion der Wurzel weist die hohe Konzentration, die nahezu ausschließliche Akkumulation in den infizierten Wurzelproben und ihre potentielle Prozessierung zu hoch toxischen Sesquiterpenoiden hin (Portero *et al.*, 2012; Sherif *et al.*, 2016; Ding *et al.*, 2017; Mafu *et al.*,

2018). Ob das unbekannte Sesquiterpen eine spezifische Abwehrreaktion der Wurzel gegenüber dem Befall von *P. cactorum* ist, sollte durch eine Wiederholung der Versuchsbedingungen in Hydrokultur und Erde untersucht werden (vgl. Kapitel 4.2.2). Bei dieser Wiederholung des Versuches in Hydrokultur kam es erneut zu einer signifikanten Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes in pathogen-befallenen Wurzeln (vgl. Abbildung 16). Bei der Kultivierung der Pappeln in Erde konnte hingegen keine signifikante Induktion von apolaren Verbindungen nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 29, Anhang). Eine anschließende Überprüfung der Infektion von *P. cactorum* in der Wurzel mittels *Phytophthora*-genus spezifischen Primern zeigte auf, dass es zu keiner erfolgreichen Infektion in der Wurzel kam (vgl. Abbildung 19). Im Gegensatz zum Infektionsgeschehen durch motile Zoosporen in der Hydrokulturlösung könnte das Erdreich eine Infektion durch Zoosporen deutlich erschwert haben. Eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit des Infektionsgeschehens in Erde könnte durch eine höhere Sporendichte oder durch mehrmalige Applikation der Suspension über die fünf Tage der Co-Kultivierung erzielt werden. Ebenfalls hatten die Pappelwurzeln im Erdversuch ein höheres Alter als diejenigen in den Hydrokulturversuchen. Gemäß Arbeiten von Zipfel und Oldry, 2017, sowie Yadav *et al.*, 2019, reagieren junge Wurzeln im Vergleich zu älteren Wurzeln stärker auf Oomyzeten-Befall und erweisen sich anfälliger für eine Infektion. Somit kann auch das höhere Alter der Wurzeln die Infektion durch *P. cactorum* erschwert haben. Um darüber hinaus die Wurzelinfektion im Gewebe der Pappel besser zu lokalisieren und die Infektion von verschiedenen Wurzelentwicklungsstadien histologisch besser vergleichen zu können, wäre eine Fluoreszenzfärbung von *P. cactorum* nach Diez-Navajas *et al.*, 2007, denkbar. In weiteren Versuchen könnte auch analysiert werden, ob es zu einer Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes nach einer mechanischen Verwundung, nach einer Infektion mit Pilzen sowie bei einer Veränderung der Dauer der Co-Kultivierung kommt. Dies könnte dazu beitragen die potentielle Spezifität dieser Abwehrreaktion gegenüber *P. cactorum* näher zu verifizieren.

5.3 Identifikation von potentiellen Abwehrsynthese-Wegen

Um weitere Einsichten in mögliche Biosynthesewege von Abwehrmetaboliten und die biologischen Grundlagen für die metabolischen Veränderungen nachverfolgen zu können, erfolgte eine Transkriptomdaten-Analyse von Kontroll-Wurzeln bzw. Pathogen-infizierten *P. trichocarpa* Wurzeln aus dem Hydrokultur-Experiment (vgl. Kapitel 4.3). Dies ist relevant, da schon in anderen Studien eine transkriptionelle Veränderung als Folge eines Befalls mit Pathogenen der Gattung *Phytophthora* beschrieben wurde (Henriquez *et al.*, 2012; Allardyce *et al.*, 2013; Toljamo *et al.*, 2016; Yadav *et al.*, 2019). Die transkriptionelle Remodellierung ist eine Folge der basalen Immunität, welche spezifisch über induzierte Transkriptionsfaktoren (TFs) reguliert wird (Li *et al.*, 2016).

Der Fokus der Analyse lag auf signifikant hochregulierten Kandidatengen, welche sich in die Kategorien Enzyme, Proteaseinhibitoren, Speicherproteine, Transkriptionsregulatoren, Transporter, sekretorische Proteine und Gene mit unbekannter Funktion gruppieren ließen (vgl. Abbildung 18). Wie das Modell von Jones und Dangl, 2006, beschrieb, erfolgt die Erkennung von spezifischen pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP, *pathogen-associated molecular pattern*) über membranassoziierte Mustererkennungsrezeptoren (PRR, *Pattern Recognition Receptors*), welche nachfolgend eine PAMP-ausgelöste Immunität (PTI, *PAMP-triggered immunity*) induzieren. Innerhalb des Transkriptomdatensatzes kam es nach Pathogenbefall zu einer erhöhten Genexpression einer Rezeptorkinase (RLK, *receptor-like-protein kinase*), welche als PRR bei der Erkennung von PAMPs eine wesentliche Rolle spielt (Goff und Ramonell, 2007). In der Literatur wurde schon die RLK FLS2 (Flagellin sensitive 2) beschrieben, welche die PAMP Flagellin von Bakterien erkennt (Gómez-Gómez und Boller, 2002). Eine weitere RLK erkennt spezifisch die PAMP elf18; ein hochkonserviertes Protein auf der Bakterien-Membranoberfläche (Zipfel *et al.*, 2006). Eine mögliche PAMP des Oomyzeten *P. cactorum* könnte Capsicein, ein extrazelluläres Protein sein, welches schon vorher in der Literatur als Erkennungs-PAMP für RLK bei der Pflanze-Pathogen-Interaktion zwischen *Phytophthora capsici* und *Nicotiana glutinosa* beschrieben worden ist (Kim *et al.*, 2009b). Weiterhin induzieren diese aktivierten RLKs den nachgeschalteten JA-Signalweg (Le *et al.*, 2014). Somit könnte die Induktion der RLK einen ersten Schritt in der Vermittlung der basalen Immunität im Wurzelgewebe von *P. trichocarpa* darstellen. Darüber hinaus könnte es potentiell auf eine induzierte Abwehrreaktion gegenüber dem Oomyzeten *P. cactorum* hinweisen, welche sich weiterführend auf den Phytohormon-Gehalt und die Akkumulation von spezialisierten Metaboliten auswirkt.

Nach der Bindung von PAMP an PRR kommt es zu einer häufig über WRKY-TFs regulierten Induktion von Signalkaskaden (Pandey und Somssich, 2009; Ishihama und Yoshioka, 2012) welche folgend eine PTI induzieren (Oßwald *et al.*, 2014). Pflanzliche WRKY-TFs sind Schlüsselregulatoren bei der Pflanzen-Pathogen-Interaktion und regulieren abwehrinduzierte Gene und Phytohormone (Zheng *et al.*, 2006; Pandey *et al.*, 2010). Innerhalb dieser Arbeit wurde im Transkriptomdatensatz der TF WRKY75 nach Pathogenbefall hochreguliert. Dies stimmt mit dem Befund von Toljamo *et al.*, 2016, überein, welcher nach einem Befall von *P. cactorum* in Erdbeeren (*Fragaria vesca*) 21 codierende Gene für die hochregulierte WRKY identifiziert hat. Ebenfalls wurde auch schon am Beispiel von Pappeln gezeigt, dass WRKY-TFs als Folge einer pflanzlichen Abwehrreaktion gegen Herbivore im Pflanzengewebe akkumulieren (Ralph *et al.*, 2006). Die Befunde der Arbeit sprechen somit auch für eine potentielle Induktion der PTI in *P. trichocarpa* Wurzeln nach einer Infektion mit *P. cactorum*. Ebenfalls zeigte sich eine erhöhte Genexpression von Pathogen-assoziierten Genen (PR). Diese Klasse an Genen sind für ihre Rolle in der Pathogenabwehr im Rahmen der PTI bekannt. Im Transkriptomdatensatz zeigte sich nach Pathogenbefall der Wurzel eine Erhöhung der

Genexpression der PR-Proteine Thaumatin (TLP) und Osmotin, sowie verschiedenen Protease-Inhibitoren. Dies könnte ebenfalls auf eine spezifische Abwehrreaktion des Wurzelgewebes gegenüber *P. cactorum* hinweisen. Dies korrespondiert mit anderen Studien. Am Beispiel der Infektion von Tabak durch *Phytophthora parasitica* konnte eine erhöhte Expression von PR-1 und eine nachweislich gesteigerte Resistenz der Pflanzen gegenüber dem Pathogen nachgewiesen werden (Alexander *et al.*, 1993; Rivière *et al.*, 2008). Ebenso konnte in einem Experiment mit durch *P. infestans* infizierte Tomaten eine Akkumulation von Osmotin und gleichzeitig eine Hemmung der Keimung und des Wachstums des Oomyzeten gemessen werden (Woloshuk *et al.*, 1991). Letztere Beobachtung legt auch im Falle von Pappelwurzeln eine mögliche Rolle von Osmotin bei der induzierten Resistenz gegenüber *P. cactorum* nahe. TLPs hingegen zeigen enzymatische Aktivitäten, wie u. a. die β -1,3-Glucanase-Aktivität, welche spezifisch auf die Zellwände pathogener Organismen, wie zum Beispiel denen von Oomyzeten einwirkt (Liu *et al.*, 2010). In Allardyce *et al.*, 2013, wurde postuliert, dass eine frühe Hochregulierung von TLPs in *Zea mays* Wurzeln ein wesentlicher Bestandteil für die Begrenzung der Invasion von *Phytophthora cinnamomi* in das Wurzelgewebe ist. Ebenfalls wurden innerhalb des Datensatzes 29 verschiedene Proteaseinhibitoren gefunden, welche in den Pathogen-induzierten Pappelwurzeln eine signifikant erhöhte Genexpression aufwiesen. Auch in anderen Studien werden Proteaseinhibitoren oftmals mit der Resistenz der Pflanzen gegenüber Oomyzeten assoziiert (Kim *et al.*, 2009a). Peng und Black, 1976, haben darüber hinaus gezeigt, dass der Proteaseinhibitor-Spiegel in Blättern von Tomatensorten, die gegen *Phytophthora infestans* resistenter waren, stärker anstieg als bei suszeptiblen Sorten. Dieser Befund weist speziell auf eine Abwehrrolle von Proteaseinhibitor gegenüber Oomyzeten hin.

Neben den PR-Genen waren innerhalb des Transkriptomdatensatzes ebenfalls verschiedene Enzyme in ihrer Genexpression nach Pathogenbefall erhöht. Darunter befand sich potentiell eine annotierte GST (Glutathion-S-Transferase) aus der enzymatischen Klasse der Transferasen. GST sind allgemein an exogenen und endogenen Stressreaktion beteiligt, welche die Reaktion auf Pathogenbefall einschließt (Marrs, 1996). Während der Abwehr neutralisiert GST toxische Komponenten, indem es die Konjugation des Toxins mit Glutathion katalysiert. Die GST-Genexpression wird durch Stressbedingungen, einschließlich der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies wie H_2O_2 während eines Pathogenbefalls, transkriptionell hochreguliert (Sappl *et al.*, 2009) und bildet hierdurch einen wichtigen Teil der pflanzlichen Abwehrreaktion. Ebenfalls waren innerhalb des Transkriptomdatensatzes die Genexpression von mehreren potentiellen Cytochrom P450 Monooxygenasen erhöht. Auch Monooxygenasen sind an vielen Stoffwechselwegen mit unterschiedlichen Funktionen beteiligt und nehmen eine Schlüsselrolle bei der pflanzlichen Entwicklung und Verteidigung ein (Schuler, 1996). In Bezug auf die Pflanzenabwehr können Cytochrom P450 Monooxygenasen zur Biosynthese oder weiteren Prozessierung spezialisierter

Sekundärmetabolite beitragen, wie zum Beispiel zu einer Modifikation von Terpenen (Mau und Croteau, 2006).

Innerhalb der Enzym-Kategorie Hydrolasen waren im Transkriptomdatensatz potentielle Chitinasen und eine Phospholipase 2A (PLA) in ihrer Genexpression erhöht. Allgemein gelten Chitinasen als antimykotische Verbindungen, da sie Chitin in den Pilzzellwänden abbauen (Boller, 1986). Sie haben sich in vergangenen Studien auch als wirksam gegen Oomyceten erwiesen (Osorio-Hernández *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2018). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass transgene Pappeln, die eine Pilzendochitinase exprimieren, eine erhöhte Resistenz gegen Blattrostpathogene besitzen (Noël *et al.*, 2005). PLA und verwandte Moleküle wie Lysophospholipide, freie Fettsäuren, Phospholipase C spielen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der pflanzlichen Abwehrreaktion im Kontext eindringender Pathogene (Canonne *et al.*, 2011). Sie sind entscheidend für die Akkumulation von Phosphatidsäure, welcher ein entscheidender sekundärer Botenstoff für die Aktivierung von Kinasen, Phosphatasen, Ca²⁺-Signalwegen ist und den oxidativen Burst vermittelt (Canonne *et al.*, 2011).

Innerhalb des gesamten Transkriptomdatensatzes zeigte die *PtTPS5* (Potri.005G095500) fast die höchste induzierte Genexpression nach Pathogenbefall mit *P. cactorum* (vgl. Abbildung 18 B). Das Massenspektrum des unbekanntes Sesquiterpenes stimmt mit dem Hauptprodukt der schon beschriebenen Terpensynthase *PtTPS5* aus Irmisch *et al.*, 2014, überein. Innerhalb der Studie von Irmisch *et al.*, 2014, wurde diese Terpensynthase als ein Multienzym beschrieben, welches nach der Substrat-Umsetzung von FPP als Produkte 27 verschiedene Sesquiterpene mit der abundanten Verbindung eines Sesquiterpenalkohol umsetzt. Weiterführende Experimente konnten anschließend aber aufzeigen, dass die *PtTPS5* ein Beispiel für eine sehr spezifische Terpensynthase darstellt und ein abundantes Sesquiterpen als Produkt hat (persönliche Mitteilung Tobias Köllner). Dies korrespondiert auch mit den Befunden der Heterologe Expression und Enzymassay der Sesquiterpen-Synthase *PtTPS5* innerhalb dieser Arbeit (vgl. Abbildung 20). Ebenfalls konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass es zu keiner Veränderung der *PtTPS5* Genexpression in Pappelblättern nach Herbivorie kam. Somit könnte die in dieser Arbeit gezeigte Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes in den Wurzeln auf eine spezifische Abwehrreaktion gegenüber Oomyceten hindeuten. In Klee wurde ebenfalls eine Sesquiterpensynthase identifiziert (*MtTPS10*), welche eine spezifische signifikante Transkriptakkumulation nach dem Befall mit dem Oomyceten *Aphanomyces euteiches* zeigte (Yadav *et al.*, 2019). Diese *MtTPS10* gehört ebenfalls wie *PtTPS5* zu der Subfamilie A in der phylogenetischen Einordnung der TPS (Irmisch *et al.*, 2014; Parker *et al.*, 2014). Auch in Erdbeeren führte die Infektion mit *P. cactorum* zu einer spezifischen Induktion von Genen, welche der Biosynthese von Terpenen zugeschrieben werden können (Toljamo *et al.*, 2016). Allgemein können weiterführende Modifikationen von Terpenen, wie zum Beispiel Methylierung, Acetylierung, Glykosylierung oder Hydroxylierung zur Bildung von hochtoxischen Terpenoiden führen und gleichzeitig die strukturelle Vielfalt der

Terpene und ihren toxischen Effekt auf Schädlinge erhöhen (Tholl, 2015). Potenziell können die in ihrer Genexpression hochregulierten Cytochrom P450 Monooxygenasen zu einer Weiterprozessierung des unbekanntes Sesquiterpenes zu hochtoxischen Sesquiterpenoiden beitragen.

5.4 Charakterisierung von *PtTPS5* und weiterführende Versuche

Terpensynthasen (TPS) sind Schlüsselenzyme bei der Biosynthese von Terpenen (Chen *et al.*, 2011). Durch die Entstehung eines reaktiven Carbokations während des Reaktionsmechanismus, können bei der Umsetzung von einem Substrat multiple Terpenprodukte erzeugt werden (Degenhardt *et al.*, 2009). Hierdurch ermöglichen TPS-Enzyme die Anpassung des Terpenstoffwechsels an verändernde Pflanzen-Pathogen-Interaktionen und sind Schlüsselenzyme bei der Bildung von potenten Abwehrverbindungen. Für eine weitere Verifizierung der Transkriptomdaten wurde die Transkripthäufigkeit von *PtTPS5* bzw. die erfolgreiche Wurzelinfektion von *P. cactorum* mit *Phytophthora*-genus spezifischen Primern mittels qRT-PCR analysiert (vgl. Kapitel 4.4). Hierdurch sollte der potentielle Zusammenhang zwischen der Infektion mit *P. cactorum* in der Pappelwurzel, der Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes und der Expression von *PtTPS5* aufgeklärt werden. Die Analyse der qRT-PCR Daten zeigte, dass es nur bei einer erfolgreichen Wurzelinfektion durch den Oomyzeten *P. cactorum* zu einer erhöhten relativen Genexpression von *PtTPS5* bzw. zur Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes kam (vgl. Abbildung 19). Im Erdexperiment blieb die relative Genexpression von *PtTPS5* konstant und es kam zu keiner Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes (vgl. Abbildung 19). Ebenfalls konnte keine Infektion der Wurzeln mit *P. cactorum* im Erdexperiment in den Pathogen-induzierten Wurzeln detektiert werden. Durch die heterologe Expression der *PtTPS5* in *E. coli* konnte die Substratumsetzung von FPP zu dem unbekanntes Sesquiterpen *in vitro* nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 20). Weitere Sesquiterpen-Produkte, wie sie in Irmisch *et al.*, 2014, für die *PtTPS5* identifiziert worden sind, waren mit den durchgeführten Assay-Bedingungen jedoch nicht detektierbar. Aufgrund des Zusammenhangs zwischen der 140-fach erhöhten Genexpression von *PtTPS5* und der hohen induzierten Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes in Pathogen-infizierten Wurzeln, kann potentiell auf eine induzierte Abwehrreaktion der Pappeln gegenüber *P. cactorum* geschlossen werden. Ähnliche Beziehungen zwischen der Transkripthäufigkeit von TPS-Genen und Terpen-Akkumulationen wurden auch für andere Holzpflanzenarten wie Hybridpappeln (Arimura *et al.*, 2004; Vickers *et al.*, 2010), sowie Mais (Schnee *et al.*, 2006; Köllner *et al.*, 2008), Klee (Yadav *et al.*, 2019) und Erdbeeren (Toljamo *et al.*, 2016) beschrieben.

Für eine weitere Charakterisierung der *PtTPS5* in Bezug auf ihre Rolle bei der PTI-vermittelten Immunantwort gegenüber dem Oomyzeten *P. cactorum*, könnte die Funktion der *PtTPS5* in

vivo durch RNAi-vermittelte knock-out Versuche weiter charakterisiert werden. Es könnte dabei auch untersucht werden, ob ein Verlust der Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes zu einer erhöhten Suszeptibilität der Wurzeln gegenüber *P. cactorum* führt. Angelehnt an den Experimentaufbau von Lackus *et al.*, 2018, könnte ein Bioassay mit der direkten Applikation des unbekanntes Sesquiterpenes den Effekt auf das Myzelwachstum sowie die Sporangien-Germination von *P. cactorum* näher zeigen. Somit könnte weiterführend untersucht werden ob das Produkt von *PtTPS5* als antimikrobielles Phytoalexin wirkt.

Um einen genaueren Einblick in die unmittelbare Abwehrreaktion der Pappelwurzel zu erhalten, kann ebenfalls der Zeitpunkt der Induktion dieser PTI innerhalb der Pappelwurzel näher untersucht werden. Beispielsweise zeigen Allardyce *et al.*, 2013, im Fall von *Zea mays* Wurzeln, dass sich in Abhängigkeit der Co-Kultivierung der Pflanze mit *P. cinnamomi* über 6 bzw. 24 Stunden unterschiedliche transkriptionelle Veränderungen zeigen. Auch in Toljamo *et al.*, 2016, und Yadav *et al.*, 2019, konnte nachgewiesen werden, dass es nach Oomyzeten-Befall zu einer schnellen und spezifischen Genexpression von Sesquiterpensynthesen innerhalb von 30 min bis 120 min der Co-Kultivierung kommt.

5.5 Potentieller Abwehrmechanismus der Wurzel auf eine *P. cactorum* Infektion

Aus mehreren Studien geht hervor, dass Terpene eine zentrale Rolle bei der Abwehrreaktion von Pflanzen einnehmen und dass diese Metabolite Alternativen für Pflanzenzüchtungsprogramme und transgene Ansätze der Entwicklung krankheitsresistenter Pflanzenlinien bieten können (Huffaker *et al.*, 2011; Schmelz *et al.*, 2011). Daher ist die Aufklärung potentieller Synthesewege, welche zu einer Akkumulation von antimikrobiellen Terpenoiden beitragen, essentiell. Anhand der Befunde aus der Analyse der Pflanzen-Pathogen-Interaktion am Beispiel des Oomyzeten *P. cactorum* und der Pappel *P. trichocarpa* lässt sich ein potentieller Abwehrmechanismus in der Wurzel postulieren. In einer Studie von Allardyce *et al.*, 2013, wurde ein ähnlicher Abwehrmechanismus nach einer Infektion von *P. cinnamomi* in *Zea mays* Wurzeln beschrieben. Die transkriptionelle Remodellierung der Wurzeln zeigte die Rolle von Jasmonsäure und Terpenoiden bei der Resistenzentwicklung gegenüber dem Pathogen auf. Von besonderem Interesse war die Identifizierung der beiden am stärksten hochregulierten Gene *Terpensynthase11* und *Kaurensynthase2*, die beide beteiligt sind an der Synthese von Terpenoiden. Innerhalb des Transkriptomdatensatzes dieser Arbeit konnten mehrere potentiell an der PTI involvierte hochregulierte Gene identifiziert werden (RLK, WRKY, PR-Gene), woraus sich eine mögliche Signalkaskade von *P. trichocarpa* als Reaktion auf den Befall durch *P. cactorum* modulieren lässt (vgl. Abbildung 21).

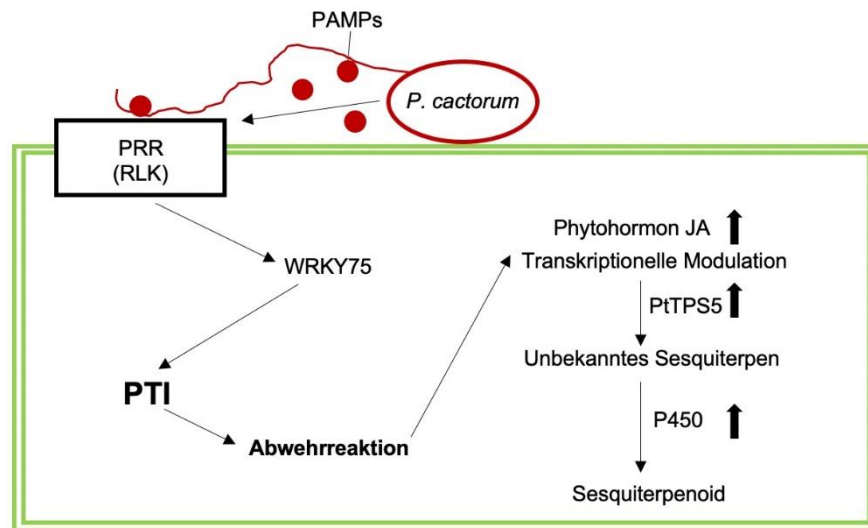


Abbildung 21: Potentielle Immunantwort von *P. trichocarpa* Wurzeln auf eine Infektion mit *P. cactorum*. Durch die Erkennung von pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) wird nachgelagert die PAMP-ausgelöste Immunität (PTI) ausgelöst, beschrieben nach Jones und Dangl, 2006. Berücksichtigt wurden in diesem Modell alle hochregulierten Gene, welche innerhalb der PTI eine Rolle spielen könnten. JA: Jasmonsäure, PtTPS5: Terpensynthase, P450: Cytochrom P450 Monooxygenase, PRR: Mustererkennungsrezeptoren, RLK: Rezeptorkinase.

Potentiell könnte es durch die Erkennung von Oomyzeten-spezifischen PAMPs durch RLKs zu einer Aktivierung WRKY-TF kommen, welcher nachgeschaltet die PTI induziert. Die daraus resultierende Abwehrreaktion führt zu einer Induktion des Phytohormon JA und zu transkriptionellen Veränderungen. Schon McCormick *et al.*, 2014, beschreibt die Abhängigkeit der Emission von aromatischen Verbindungen und Mono- und Sesquiterpenen durch das Phytohormon JA. Dies führt zu einer Induktion von abwehrspezifischen Genen, unter anderem der *PtTPS5* im Wurzelgewebe. Das potentielle Produkt der *PtTPS5*, das unbekannte Sesquiterpen, kann potentiell durch Cytochrom P450 Monooxygenasen weiter modifiziert werden, zu toxischeren Sesquiterpenoiden. Dieses mögliche Stoffwechselprodukt könnte mit einer untargeted-Analyse identifiziert werden. Eine strukturelle Aufklärung des unbekannten Sesquiterpenes mit Hilfe von Kernspinresonanzspektroskopie und der Identifikation von funktionellen Gruppen könnte darüber hinaus einen weiteren Aufschluss über mögliche biochemische Prozesse liefern, welche zu einer antimikrobiellen Abwehrreaktion beitragen. Das unbekannte Sesquiterpen könnte ähnlich wie die antifungalen Fettsäuren aus Pohl *et al.*, 2011, wirken und durch ihre Interkalation in der Oomyzeten-Membran zunächst zu einer erhöhten Fluidität und schlussendlich zur Auflösung der Membran des Pathogen führen.

6 Zusammenfassung

Um Ertragsverluste in der Landwirtschaft durch Wurzelpathogene zu minimieren, ist eine Analyse der natürlichen Wurzelabwehr von Pflanzen bedeutsam. Bei der Wurzelabwehr spielt die Immunantwort der Pflanze bestehend aus der PAMP-ausgelösten Immunität (PTI, *PAMP-triggered immunity*) und Effektor-ausgelösten Immunität (ETI, *Effector-triggered immunity*) eine entscheidende Rolle. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, potentielle Abwehrverbindungen von *Populus trichocarpa* Wurzeln nach dem Befall mit dem bodenbürtigen Oomyzeten *Phytophthora cactorum* zu identifizieren. Hierbei wurde bei der Analyse von polaren Verbindungen eine induzierte Akkumulation von Jasmonsäure entdeckt. Darüber hinaus konnte mit der Analyse von apolaren Verbindungen die Akkumulation von spezialisierten Metaboliten aus den Klassen der Aromaten, Fettsäuren und Terpenen nachgewiesen werden. Die stärkste Induktion nach Pathogenbefall zeigte hierbei ein unbekanntes Sesquiterpen, welches laut Massenspektrum mit dem Produkt der kürzlich beschriebenen *PtTPS5* aus Irmisch *et al.*, 2014 übereinstimmt. Um einen besseren Einblick in die möglichen Biosynthesewege dieses akkumulierten Metaboliten zu erhalten, erfolgte eine Analyse des Transkriptoms von Kontroll-Wurzeln und Pathogen-infizierten Wurzeln. Hierbei zeigte die *PtTPS5* eine der höchsten induzierten relativen Genexpressionen.

Ebenfalls wurde innerhalb der Arbeit gezeigt, dass es nur bei einer erfolgreichen Infektion des Wurzelgewebes mit *P. cactorum* zu einer Induktion der relativen Genexpression von *PtTPS5* und einer Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes kommt. Anschließend konnte die Produktbildung des unbekanntes Sesquiterpenes durch *PtTPS5 in vitro* nachgewiesen werden. Die durch den Oomyzeten induzierte Expression von *PtTPS5* in der Wurzel lässt die Vermutung zu, dass *PtTPS5* zur Akkumulation des unbekanntes Sesquiterpenes beiträgt und eine essentielle Rolle bei der Pathogenabwehr spielt. Weiterführende RNAi-vermittelte knock-down Experimente, die Strukturaufklärung des unbekanntes Sesquiterpenes und *in vivo* Bioassays könnten weiteren Aufschluss über die Bedeutung von *PtTPS5* und des unbekanntes Sesquiterpenes in der Wurzelabwehr geben.

7 Abstract

To minimize yield losses in agriculture caused by root pathogens, the analysis of the natural root defense of plants is a highly relevant research topic. In the context of the root defense against pathogens, the immune response consisting of PAMP-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) have a decisive role. The objective of this master thesis was the identification of pathogen-induced defense compounds in *Populus trichocarpa* roots after infection with the soil-borne oomycete *Phytophthora cactorum*. The results of the investigation of polar compounds showed an induced accumulation of jasmonic acid. The results of apolar compounds in turn demonstrated an elevated accumulation of specialized metabolites from the classes of aromatics, fatty acids, and terpenes. An unknown sesquiterpene, however, showed the highest accumulation after pathogen infection. According to the mass spectrum, this sesquiterpene corresponds with the product of the recently described *PtTPS5* (Terpenesynthase) from Irmisch *et al.*, 2014. The comparison of the transcriptome of control roots and pathogen-infected roots uncovered the possible biosynthetic pathways of this accumulated metabolite. The analysis revealed increased levels of defense related transcripts and a highly induced *PtTPS5* expression in infected roots.

Furthermore, the master thesis also showed that only a successful infection of the root tissue with *P. cactorum* leads to an induction of the relative gene expression of *PtTPS5* and an accumulation of the unknown sesquiterpene. Further analyses verified the product formation of the unknown sesquiterpene by *PtTPS5 in vitro*. The expression of *PtTPS5* in the root induced by the oomycetes suggests that *PtTPS5* might be responsible for the accumulation of the unknown sesquiterpene and could have an essential role in the root defense against soil-borne pathogens. Further RNAi-mediated knock-down experiments, the structure elucidation of the unknown sesquiterpene and *in vivo* bioassays could provide further information about the importance of *PtTPS5* and the unknown sesquiterpenes in the root defense.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Gershenzon und Dr. Tobias Köllner für die Möglichkeit bedanken, meine Arbeit in seiner Abteilung Biochemie bzw. in der Arbeitsgruppe „Volatile Biosynthesis“ durchzuführen und für die Bereitstellung des Themas. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Ralf Oelmüller bedanken, der sich bereiterklärt hat, meine Arbeit zu begutachten.

Mein besonderer Dank gilt darüber Frau Nathalie Lackus, bald Dr. Lackus ☺, für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Danke, dass du immer mit einem Rat, Ideen, Schokolade oder Glitzer zur Stelle warst. Daneben möchte ich der gesamten Abteilung Biochemie und dem Gewächshaus-Team am Max-Planck-Institut danken. Besonders möchte ich mich bei Diana, Liz, Paul und Niklas für die vielen motivierenden Gespräche und die Unterstützung im Labor bedanken und bei Bettina für die vielen durchgeführten Sequenzierungen. Mit euch war es immer eine große Freude und viel Spaß zu arbeiten. Ebenfalls gilt mein Dank den vielen lieben Menschen, die sich die Zeit genommen haben, meine Arbeit Korrektur zu lesen. Dabei möchte ich besonders Anke, Jan und Prof. Dr. Henke von Herzen danken.

Danach möchte ich meinen Freunden, der Uni-Schreibegruppe, meiner Familie und meinem Partner danken, die mich während der gesamten Zeit unterstützt, aufgebaut, motiviert und mit viel Eis und Keksen versorgt haben – ohne euch wäre ich immer noch beim Deckblatt.

Schlussendlich gilt mein Dank darüber hinaus allen, die in irgendeiner Weise an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren. Vielen Dank euch allen!

Literaturverzeichnis

- Abbas F, Ke Y, Yu R, Yue Y, Amanullah S, Jahangir MM, und Fan Y** (2017) Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. *Planta* **246**: 803-816.
- Agoramoorthy G, Chandrasekaran M, Venkatesalu V, und Hsu MJ** (2007) Antibacterial and antifungal activities of fatty acid methyl esters of the blind-your-eye mangrove from India. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**: 739-742.
- Alexander D, Goodman RM, Gut-Rella M, Glascock C, Weymann K, Friedrich L, Maddox D, Ahi-Goy P, Luntz T, Ward E, und et al.** (1993) Increased tolerance to two oomycete pathogens in transgenic tobacco expressing pathogenesis-related protein 1a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**: 7327-7331.
- Allardyce JA, Rookes JE, Hussain HI, und Cahill DM** (2013) Transcriptional profiling of *Zea mays* roots reveals roles for jasmonic acid and terpenoids in resistance against *Phytophthora cinnamomi*. *Functional & Integrative Genomics* **13**: 217-228.
- Anderson JP, Gleason CA, Foley RC, Thrall PH, Burdon JB, und Singh KB** (2010) Plants versus pathogens: an evolutionary arms race. *Functional Plant Biology* **37**: 499-512.
- Andolfo G, und Ercolano MR** (2015) Plant Innate Immunity Multicomponent Model. *Frontiers in Plant Science* **6**: 1-6.
- Antico CJ, Colon C, Banks T, und Ramonell KM** (2012) Insights into the role of jasmonic acid-mediated defenses against necrotrophic and biotrophic fungal pathogens. *Frontiers in Biology* **7**: 48-56.
- Arimura G, Huber DP, und Bohlmann J** (2004) Forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*) induce local and systemic diurnal emissions of terpenoid volatiles in hybrid poplar (*Populus trichocarpa x deltoides*): cDNA cloning, functional characterization, and patterns of gene expression of (-)-germacrene D synthase, PtdTPS1. *The Plant Journal* **37**: 603-616.
- Averyanov A** (2009) Oxidative burst and plant disease resistance. *Frontiers in Bioscience* **1**: 142-152.
- Babst BA, Harding SA, und Tsai CJ** (2010) Biosynthesis of phenolic glycosides from phenylpropanoid and benzenoid precursors in *populus*. *Journal of chemical ecology* **36**: 286-297.

- Bari R, und Jones JDG** (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Molecular Biology* **69**: 473-488.
- Bertier L, Leus L, D'hondt L, de Cock AWAM, und Höfte M** (2013) Host Adaptation and Speciation through Hybridization and Polyploidy in *Phytophthora*. *PLOS ONE* **8**: e85385.
- Bjorklund JA, und Leete E** (1992) Biosynthesis of the benzoyl moiety of cocaine from cinnamic acid via (R)-(+)-3-hydroxy-3-phenylpropanoic acid. *Phytochemistry* **31**: 3883-3887.
- Boeckler GA, Gershenzon J, und Unsicker SB** (2011) Phenolic glycosides of the Salicaceae and their role as anti-herbivore defenses. *Phytochemistry* **72**: 1497-1509.
- Boeckler GA, Paetz C, Feibicke P, Gershenzon J, und Unsicker SB** (2016) Metabolism of poplar salicinoids by the generalist herbivore *Lymantria dispar* (Lepidoptera). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **78**: 39-49.
- Boller T.** (1986). Chitinase: A Defense of Higher Plants Against Pathogens. In *Chitin in Nature and Technology*, R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, und G.W. Gooday, eds (Boston, MA: Springer US), pp. 223-230.
- Brooks DM, Bender CL, und Kunkel BN** (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant Pathology* **6**: 629-639.
- Cahill DM, Bennett IJ, und McComb JA** (1993) Mechanisms of resistance to *Phytophthora cinnamomi* in clonal, micropropagated *Eucalyptus marginata*. *Plant Pathology* **42**: 865-872.
- Canonne J, Froidure-Nicolas S, und Rivas S** (2011) Phospholipases in action during plant defense signaling. *Plant signaling and behavior* **6**: 13-18.
- Cao R, Zhang Y, Mann FM, Huang C, Mukkamala D, Hudock MP, Mead ME, Prisic S, Wang K, Lin F-Y, Chang T-K, Peters RJ, und Oldfield E** (2010) Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins* **78**: 2417-2432.
- Chen F, Liu C-J, Tschaplinski TJ, und Zhao N** (2009) Genomics of Secondary Metabolism in *Populus*: Interactions with Biotic and Abiotic Environments. *Critical Reviews in Plant Sciences* **28**: 375-392.

- Chen F, Tholl D, Bohlmann J, und Pichersky E** (2011) The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal* **66**: 212-229.
- Chen Z, Malamy J, Henning J, Conrath U, Sánchez-Casas P, Silva H, Ricigliano J, und Klessig DK** (1995) Induction, modification, and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 4134-4137.
- Collier SM, und Moffett P** (2009) NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends in Plant Science* **14**: 521-529.
- Darmono T, Owen M, und Parke J** (1991) Isolation and pathogenicity of *Phytophthora cactorum* from forest and ginseng garden soils in Wisconsin. *Plant Disease* **75**: 610.
- De Vrieze M, Pandey P, Bucheli TD, Varadarajan AR, Ahrens CH, Weisskopf L, und Bailly A** (2015) Volatile Organic Compounds from Native Potato-associated *Pseudomonas* as Potential Anti-oomycete Agents. *Front Microbiol* **6**: 1295-1295.
- Degenhardt J, Köllner TG, und Gershenzon J** (2009) Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **70**: 1621-1637.
- Demidova N, S.V Y, T.M D, I.V F, und A.S li** (2016) The Growth Course of Neva Poplar (*Populus x newesis* Bogd.) and Californian Poplar (*Populus trichocarpa* Torr. et Gray) in the European North of Russia. *Bulletin of Higher Educational Institutions. Lesnoi Zhurnal (Forestry journal)*: 77-86.
- Dickmann DL.** (2001). *An Overview of the genus Populus in Poplar Culture in North America, Part A.* (NRC Research Press).
- Díez-Navajas AM, Greif C, Poutaraud A, und Merdinoglu D** (2007) Two simplified fluorescent staining techniques to observe infection structures of the oomycete *Plasmopara viticola* in grapevine leaf tissues. *Micron* **38**: 680-683.
- Ding P, und Ding Y** (2020) Stories of Salicylic Acid: A Plant Defense Hormone. *Trends in Plant Science* **25**: 549-565.
- Ding Y, Huffaker A, Köllner TG, Weckwerth P, Robert CAM, Spencer JL, Lipka AE, und Schmelz EA** (2017) Selenene Volatiles Are Essential Precursors for Maize Defense Promoting Fungal Pathogen Resistance. *Plant Physiology* **175**: 1455.

- Donaldson JR, Stevens MT, Barnhill HR, und Lindroth RL** (2006) Age-Related Shifts in Leaf Chemistry of Clonal Aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of chemical ecology* **32**: 1415-1429.
- Doughari J** (2015) An Overview of Plant Immunity. *Journal of Plant Pathology & Microbiology* **6**: 10-4172.
- Dudareva N, Pichersky E, und Gershenzon J** (2004) Biochemistry of Plant Volatiles. *Plant Physiology* **135**: 1893-1902.
- Eckenwalder JE** (1996) Systematics and evolution of "*Populus*". NRC Research Press: 7-32.
- Erwin DC, und Ribeiro OK** (1996) *Phytophthora* diseases worldwide. *American Phytopathological Society* **47**: 224-225.
- Fabro G, Steinbrenner J, Coates M, Ishaque N, Baxter L, Studholme DJ, Körner E, Allen RL, Piquerez SJM, Rougon-Cardoso A, Greenshields D, Lei R, Badel JL, Caillaud M-C, Sohn K-H, Van den Ackerveken G, Parker JE, Beynon J, und Jones JDG** (2011) Multiple Candidate Effectors from the Oomycete Pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis* Suppress Host Plant Immunity. *PLOS Pathogens* **7**: e1002348.
- Fatiha A.** (2019). Plant lipid metabolism (*IntechOpen*), doi:10.5772/intechopen.81355.
- Fürstenberg-Hägg J, Zagrobelny M, und Bak S** (2013) Plant defense against insect herbivores. *International Journal of Molecular Sciences* **14**: 10242-10297.
- Gershenzon J, und Kreis W.** (2018). Biochemistry of Terpenoids: Monoterpenes, Sesquiterpenes, Diterpenes, Sterols, Cardiac Glycosides and Steroid Saponins. In *Annual Plant Reviews online*, pp. 218-294.
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annual Review of Phytopathology* **43**: 205-227.
- Goff KE, und Ramonell KM** (2007) The role and regulation of receptor-like kinases in plant defense. *Gene Regul Syst Bio* **1**: 167-175.
- Gómez-Gómez L, und Boller T** (2002) Flagellin perception: a paradigm for innate immunity. *Trends in Plant Science* **7**: 251-256.
- Grant M, und Lamb C** (2006) Systemic immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **9**: 414-420.

- Green S, Riddell CE, Frederickson-Matika D, Armstrong A, Elliot M, Forster J, Hedley PE, Morris J, Thorpe P, Cook DEL, Sharp P, und Pritchard L** (2020) Diversity of woody-host infecting *Phytophthora* species in public parks and botanic gardens as revealed by metabarcoding, and opportunities for mitigation through best practice. *Sibbaldia* **18**: 67-88.
- Guerreiro A, Figueiredo J, Sousa Silva M, und Figueiredo A** (2016) Linking Jasmonic Acid to Grapevine Resistance against the Biotrophic Oomycete *Plasmopara viticola*. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Günther J, Lackus ND, Schmidt A, Huber M, Stöttler H-J, Reichelt M, Gershenzon J, und Köllner TG** (2019) Separate Pathways Contribute to the Herbivore-Induced Formation of 2-Phenylethanol in Poplar. *Plant Physiology* **180**: 767.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AMV, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JIB, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grünwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu C-H, Huitema E, Jeong D-H, Jones AME, Jones JDG, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, MacLean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJG, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJI, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PRJ, Whisson SC, Judelson HS, und Nusbaum C** (2009) Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**: 393-398.
- Hansen EM, Reeser PW, und Sutton W** (2012) *Phytophthora* Beyond Agriculture. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 359-378.
- Hantula J, Lilja A, Nuorteva H, Parikka P, und Werres S** (2000) Pathogenicity, morphology and genetic variation of *Phytophthora cactorum* from strawberry, apple, rhododendron, and silver birch. *Mycological Research* **104**: 1062-1068.
- Hardham AR** (2001) The cell biology behind *Phytophthora* pathogenicity. *Australasian Plant Pathology* **30**: 91-98.

- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J, und Klessig DF** (1993) Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *The Plant Journal* **4**: 593-600.
- Henriquez MA, Adam LR, und Daayf F** (2012) Alteration of secondary metabolites' profiles in potato leaves in response to weakly and highly aggressive isolates of *Phytophthora infestans*. *Plant Physiology and Biochemistry* **57**: 8-14.
- Howe GA, und Jander G** (2008) Plant immunity to insect herbivores. *Annual review of plant biology* **59**: 41-66.
- Hsieh MH, Chang CY, Hsu SJ, und Chen JJ** (2008) Chloroplast localization of methylerythritol 4-phosphate pathway enzymes and regulation of mitochondrial genes in *ispD* and *ispE* albino mutants in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **66**: 663-673.
- Huang M, Sanchez-Moreiras AM, Abel C, Sohrabi R, Lee S, Gershenzon J, und Tholl D** (2012) The major volatile organic compound emitted from *Arabidopsis thaliana* flowers, the sesquiterpene (*E*)- β -caryophyllene, is a defense against a bacterial pathogen. *New Phytologist* **193**: 997-1008.
- Huffaker A, Kaplan F, Vaughan MM, Dafoe NJ, Ni X, Rocca JR, Alborn HT, Teal PEA, und Schmelz EA** (2011) Novel Acidic Sesquiterpenoids Constitute a Dominant Class of Pathogen-Induced Phytoalexins in Maize. *Plant Physiology* **156**: 2082.
- Hwang SY, und Lindroth RL** (1997) Clonal variation in foliar chemistry of aspen: effects on gypsy moths and forest tent caterpillars. *Oecologia* **111**: 99-108.
- Irmisch S, Jiang Y, Chen F, Gershenzon J, und Köllner TG** (2014) Terpene synthases and their contribution to herbivore-induced volatile emission in western balsam poplar (*Populus trichocarpa*). *BMC Plant Biol* **14**: 270-270.
- Ishihama N, und Yoshioka H** (2012) Post-translational regulation of WRKY transcription factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 431-437.
- Jack DB** (1997) One hundred years of aspirin. *The Lancet* **350**: 437-439.
- Jeffers SN, Schnabel G, und Smith JP** (2004) First Report of Resistance to Mefenoxam in *Phytophthora cactorum* in the United States and Elsewhere. *Plant Disease* **88**: 576.
- Jiang RHY, und Tyler BM** (2011) Mechanisms and Evolution of Virulence in Oomycetes. *Annual Review of Phytopathology* **50**: 295-318.

- Jiang Y, Ownley BH, und Chen F** (2018) Terpenoids from Weedy Ricefield Flatsedge (*Cyperus iria* L.) Are Developmentally Regulated and Stress-Induced, and have Antifungal Properties. *Molecules* **23**: 3149.
- Jones JDG, und Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323-329.
- Judžentienė A, Charkova T, und Misiūnas A** (2019) Chemical composition of the essential oils from *Helichrysum arenarium* (L.) plants growing in Lithuanian forests. *Journal of Essential Oil Research* **31**: 305-311.
- Karunanithi PS, und Zerbe P** (2019) Terpene Synthases as Metabolic Gatekeepers in the Evolution of Plant Terpenoid Chemical Diversity. *Frontiers in Plant Science* **10**.
- Kim J-Y, Park S-C, Hwang I, Cheong H, Nah J-W, Hahm K-S, und Park Y** (2009a) Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity. *Int J Mol Sci* **10**: 2860-2872.
- Kim Y-T, Oh J, Kim K-H, Uhm J-Y, und Lee B-M** (2009b) Isolation and characterization of NgRLK1, a receptor-like kinase of *Nicotiana glutinosa* that interacts with the elicitor of *Phytophthora capsici*. *Molecular Biology Reports* **37**: 717.
- Köllner TG, Held M, Lenk C, Hiltbold I, Turlings TCJ, Gershenzon J, und Degenhardt J** (2008) A maize (*E*)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *The Plant cell* **20**: 482-494.
- Lackus ND, Lackner S, Gershenzon J, Unsicker SB, und Köllner TG** (2018) The occurrence and formation of monoterpenes in herbivore-damaged poplar roots. *Scientific Reports* **8**.
- Lackus ND, Müller A, Kröber TDU, Reichelt M, Schmidt A, Nakamura Y, Paetz C, Luck K, Lindroth RL, Constabel CP, Unsicker SB, Gershenzon J, und Köllner TG** (2020) The Occurrence of Sulfated Salicinoids in Poplar and Their Formation by Sulfotransferase1. *Plant Physiology* **183**: 137.
- Lamb C, und Dixon RA** (1997) The oxidative Burst in Plant Disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **48**: 251-275.
- Latijnhouwers M, de Wit PJGM, und Govers F** (2003) Oomycetes and fungi: similar weaponry to attack plants. *Trends in Microbiology* **11**: 462-469.
- Le MH, Cao Y, Zhang X-C, und Stacey G** (2014) LIK1, A CERK1-Interacting Kinase, Regulates Plant Immune Responses in Arabidopsis. *PLOS ONE* **9**: e102245.

- Lee Y-S, Kim J, Lee S-G, Oh E, Shin S-C, und Park I-K** (2009) Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **93**: 138-143.
- León J, und Sánchez-Serrano JJ** (1999) Molecular biology of jasmonic acid biosynthesis in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 373-380.
- Li B, Meng X, Shan L, und He P** (2016) Transcriptional Regulation of Pattern-Triggered Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* **19**: 641-650.
- Lingbeck JM, O'Bryan CA, Martin EM, Adams JP, und Crandall PG** (2015) Sweetgum: An ancient source of beneficial compounds with modern benefits. *Pharmacogn Rev* **9**: 1-11.
- Liu F, Li BH, Lian S, Dong XL, Wang CX, Zhang ZF, und Liang WX** (2018) Effects of Temperature and Moisture on the Infection and Development of Apple Fruit Rot Caused by *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease* **102**: 1811-1819.
- Liu J-J, Sturrock R, und Ekramoddoullah AKM** (2010) The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. *Plant Cell Reports* **29**: 419-436.
- Mafu S, Ding Y, Murphy KM, Yaacoobi O, Addison JB, Wang Q, Shen Z, Briggs SP, Bohlmann J, Castro-Falcon G, Hughes CC, Betsiashvili M, Huffaker A, Schmelz EA, und Zerbe P** (2018) Discovery, Biosynthesis and Stress-Related Accumulation of Dolabradiene-Derived Defenses in Maize. *Plant Physiology* **176**: 2677.
- Mahomed W, und Berg Nvd** (2011) EST sequencing and gene expression profiling of defence-related genes from *Persea americana* infected with *Phytophthora cinnamomi*. *BMC Plant Biol* **11**: 167-167.
- Majid MU, Awan MF, Fatima K, Tahir MS, Ali Q, Rashid B, Rao AQ, Nasir IA, und Husnain T** (2016) *Phytophthora capsici* on chilli pepper (*Capsicum annuum L.*) and its management through genetic and bio-control: a review. *Zemdirbyste-Agriculture* **103**: 419-430.
- Marrs KA** (1996) The functions and regulation of glutathione transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 127-158.

- Martin FN, Abad ZG, Balci Y, und Ivors K** (2012) Identification and Detection of *Phytophthora*: Reviewing Our Progress, Identifying Our Needs. *Plant Disease* **96**: 1080-1103.
- Mau CJD, und Croteau R** (2006) Cytochrome P450 oxygenases of monoterpene metabolism. *Phytochemistry Reviews* **5**: 373.
- McGarvey DJ, und Croteau R** (1995) Terpenoid metabolism. *The Plant cell* **7**: 1015-1026.
- Mei X, Yang M, Ding X, Bi Y, Chen L, Deng W, Dong Y, Su Y, He X, Zhu S, und Liu X** (2014) Proteomic analysis of zoxamide-induced changes in *Phytophthora cactorum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **113**: 31-39.
- Miersch O, Neumerkel J, Dippe M, Stenzel I, und Wasternack C** (2008) Hydroxylated jasmonates are commonly occurring metabolites of jasmonic acid and contribute to a partial switch-off in jasmonate signaling. *New Phytologist* **177**: 114-127.
- Monaghan J, und Zipfel C** (2012) Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 349-357.
- Muhlemann JK, Klempien A, und Dudareva N** (2014) Floral volatiles: from biosynthesis to function. *Plant, Cell and Environment* **37**: 1936-1949.
- Nakkeeran S, Surya T, und Vinodkumar S** (2020) Antifungal Potential of Plant Growth Promoting *Bacillus* Species Against Blossom Blight of Rose. *Journal of Plant Growth Regulation* **39**: 99-111.
- Naveed ZA, und Ali GS** (2018) Comparative Transcriptome Analysis between a Resistant and a Susceptible Wild Tomato Accession in Response to *Phytophthora parasitica*. *Int J Mol Sci* **19**: 3735.
- Nienhaus F** (1960) Das Wirtsspektrum von *Phytophthora cactorum* (Leb. et Cohn) Schroet. *Journal of Phytopathology* **38**: 33-68.
- Noël A, Levasseur C, Le VQ, und Séguin A** (2005) Enhanced resistance to fungal pathogens in forest trees by genetic transformation of black spruce and hybrid poplar with a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **67**: 92-99.
- Ockels FS, Eyles A, McPherson BA, Wood DL, und Bonello P** (2007) Phenolic Chemistry of Coast Live Oak Response to *Phytophthora ramorum* Infection. *Journal of chemical ecology* **33**: 1721-1732.

- Oliver RP, und Ipcho SV** (2004) Arabidopsis pathology breathes new life into the necrotrophs-vs.-biotrophs classification of fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology* **5**: 347-352.
- Osier T, und Lindroth R** (2006) Genotype and environment determine allocation to and costs of resistance in quaking aspen. *Oecologia* **148**: 293-303.
- Osorio-Hernández E, J H, V C, A C, Lopez-Santillan J, und Torres Castillo JA** (2016) *In vitro* activities of *Trichoderma* species against *Phytophthora parasitica* and *Fusarium oxysporum*. *African Journal of Microbiology Research* **10**: 521-527.
- Oßwald W, Fleischmann F, Rigling D, Coelho AC, Cravador A, Diez J, Dalio RJ, Horta Jung M, Pfanzen H, Robin C, Sipos G, Solla A, Cech T, Chambery A, Diamandis S, Hansen E, Jung T, Orlikowski LB, Parke J, Prospero S, Werres S, und Vannini A** (2014) Strategies of attack and defence in woody plant-*Phytophthora* interactions. *Forest Pathology* **44**: 169-190.
- Palo R** (1984) Distribution of birch (*Betula* SPP.), willow (*Salix* SPP.), and poplar (*Populus* SPP.) secondary metabolites and their potential role as chemical defense against herbivores. *Journal of chemical ecology* **10**: 499-520.
- Pandey SP, und Somssich IE** (2009) The role of WRKY transcription factors in plant immunity. *Plant physiology* **150**: 1648-1655.
- Pandey SP, Roccaro M, Schön M, Logemann E, und Somssich IE** (2010) Transcriptional reprogramming regulated by WRKY18 and WRKY40 facilitates powdery mildew infection of Arabidopsis. *The Plant Journal* **64**: 912-923.
- Parker MT, Zhong Y, Dai X, Wang S, und Zhao P** (2014) Comparative genomic and transcriptomic analysis of terpene synthases in *Arabidopsis* and *Medicago*. *IET Systems Biology* **8**: 146-153.
- Pazouki L, und Niinemets Ü** (2016) Multi-Substrate Terpene Synthases: Their Occurrence and Physiological Significance. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1-6.
- Perry L, Alford E, Horiuchi J, Paschke M, und Vivanco J.** (2007). Chemical Signals in the Rhizosphere: Root-Root and Root-Microbe Communication, pp. 297-330.
- Pfaffl M** (2004) Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum Special* **1**: 92-95.
- Philippe R, und Bohlmann J** (2011) Poplar defense against herbivores. *Canadian Journal of Botany* **85**: 1111-1126.

- Pichersky E, und Raguso RA** (2018) Why do plants produce so many terpenoid compounds? *New Phytologist* **220**: 692-702.
- Pino JA, und Regalado EL** (2010) Volatile constituents of *Thalassia testudinum* Banks ex König Leaves. *Journal of Essential Oil Research* **22**: 421-423.
- Pohl C, Kock J, und Thibane V** (2011) Antifungal free fatty acids: A Review. *Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* **1**: 61-71.
- Polle A, Janz D, Teichmann T, und Lipka V** (2013) Poplar genetic engineering: promoting desirable wood characteristics and pest resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 5669-5679.
- Portero AG, González-Coloma A, Reina M, und Díaz CE** (2012) Plant-defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. *Phytochemistry Reviews* **11**: 391-403.
- Portz RL, Fleischmann F, Koehl J, Fromm J, Ernst D, Pascholati SF, und Osswald WF** (2011) Histological, physiological and molecular investigations of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola*. *Forest Pathology* **41**: 202-211.
- Pulido P, Perello C, und Rodriguez-Concepcion M** (2012) New insights into plant isoprenoid metabolism. *Molecular Plant* **5**: 964-967.
- Ralph S, Oddy C, Cooper D, Yueh H, Jancsik S, Kolosova N, Philippe RN, Aeschliman D, White R, Huber D, Ritland CE, Benoit F, Rigby T, Nantel A, Butterfield YSN, Kirkpatrick R, Chun E, Liu J, Palmquist D, Wynhoven B, Stott J, Yang G, Barber S, Holt RA, Siddiqui A, Jones SJM, Marra MA, Ellis BE, Douglas CJ, Ritland K, und Bohlmann J** (2006) Genomics of hybrid poplar (*Populus trichocarpa* × *deltoides*) interacting with forest tent caterpillars (*Malacosoma disstria*): normalized and full-length cDNA libraries, expressed sequence tags, and a cDNA microarray for the study of insect-induced defences in poplar. *Molecular Ecology* **15**: 1275-1297.
- Ramírez-Garza SL, Laveriano-Santos EP, Marhuenda-Muñoz M, Storniolo CE, Tresserra-Rimbau A, Vallverdú-Queralt A, und Lamuela-Raventós RM** (2018) Health Effects of Resveratrol: Results from Human Intervention Trials. *Nutrients* **10**: 1892.
- Rasmann S, Hiltbold I, und Ali J.** (2012). The Role of Root-Produced Volatile Secondary Metabolites in Mediating Soil Interactions (Advances in Selected Plant Physiology Aspects), pp. Kapitel 12.

- Rasmann S, Köllner TG, Degenhardt J, Hiltbold I, Toepfer S, Kuhlmann U, Gershenzon J, und Turlings TCJ** (2005) Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **434**: 732-737.
- Reichardt PB, Bryant JP, Mattes BR, Clausen TP, Chapin FS, und Meyer M** (1990) Winter chemical defense of Alaskan *balsam poplar* against snowshoe hares. *Journal of chemical ecology* **16**: 1941-1959.
- Rivière MP, Marais A, Ponchet M, Willats W, und Galiana E** (2008) Silencing of acidic pathogenesis-related PR-1 genes increases extracellular beta-(1->3)-glucanase activity at the onset of tobacco defence reactions. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1225-1239.
- Rubert-Nason KF, Couture JJ, Major IT, Constabel CP, und Lindroth RL** (2015) Influence of Genotype, Environment, and Gypsy Moth Herbivory on Local and Systemic Chemical Defenses in Trembling Aspen (*Populus tremuloides*). *Journal of chemical ecology* **41**: 651-661.
- Sappl PG, Carroll AJ, Clifton R, Lister R, Whelan J, Harvey Millar A, und Singh KB** (2009) The Arabidopsis glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant Journal* **58**: 53-68.
- Saubeau G, Perrin F, Marnet N, Andrivon D, und Val F** (2016) Hormone signalling pathways are differentially involved in quantitative resistance of potato to *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology* **65**: 342-352.
- Schena L, Duncan JM, und Cooke DEL** (2008) Development and application of a PCR-based 'molecular tool box' for the identification of *Phytophthora* species damaging forests and natural ecosystems. *Plant Pathology* **57**: 64-75.
- Schmelz EA, Kaplan F, Huffaker A, Dafoe NJ, Vaughan MM, Ni X, Rocca JR, Alborn HT, und Teal PE** (2011) Identity, regulation, and activity of inducible diterpenoid phytoalexins in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 5455.
- Schnee C, Köllner T, Held M, Turlings T, Gershenzon J, und Degenhardt J** (2006) The product of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 1129-1134.
- Schuler MA** (1996) Plant Cytochrome P450 Monooxygenases. *Critical Reviews in Plant Sciences* **15**: 235-284.

- Scott P, Burgess T, und Hardy G** (2013) Globalisation and *Phytophthora*. In Lamour, K (ed) *Phytophthora: a global perspective*. CABI Plant Protection Series **2**: 37-47.
- Sena K, Crocker E, Vincelli P, und Barton C** (2018) *Phytophthora cinnamomi* as a driver of forest change: Implications for conservation and management. *Forest Ecology and Management* **409**: 799-807.
- Sherif M, Becker E-M, Herrfurth C, Feussner I, Karlovsky P, und Splivallo R** (2016) Volatiles Emitted from Maize Ears Simultaneously Infected with Two *Fusarium* Species Mirror the Most Competitive Fungal Pathogen. *Frontiers in Plant Science* **7**: 1-11.
- Singh B, und Sharma RA** (2015) Plant terpenes: defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech* **5**: 129-151.
- Spring O, und Haas K** (2002) The Fatty Acid Composition of *Plasmopara halstedii* and Its Taxonomic Significance. *European Journal of Plant Pathology* **108**: 263-267.
- Thelen JJ, und Ohlrogge JB** (2002) Metabolic Engineering of Fatty Acid Biosynthesis in Plants. *Metabolic Engineering* **4**: 12-21.
- Tholl D.** (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In *Biotechnology of Isoprenoids*, J. Schrader und J. Bohlmann, eds (Cham: Springer International Publishing), pp. 63-106.
- Timothy T, J., Plett JM, Engle NL, Deveau A, Cushman KC, Martin MZ, Doktycz MJ, Tuskan GA, Brun A, Kohler A, und Martin F** (2014) *Populus trichocarpa* and *Populus deltoides* Exhibit Different Metabolomic Responses to Colonization by the Symbiotic Fungus *Laccaria bicolor*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 546-556.
- Toljamo A, Blande D, Karenlampi S, und Kokko H** (2016) Reprogramming of Strawberry (*Fragaria vesca*) Root Transcriptome in Response to *Phytophthora cactorum*. *PLoS One* **11**: e0161078.
- Tuskan GA, DiFazio SP, und Teichmann T** (2004) Poplar Genomics is Getting Popular: The Impact of the Poplar Genome Project on Tree Research. *Plant Biol (Stuttg)* **7**: 2-4.
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, dePamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehling J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D,**

Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, und Rokhsar D (2006) The Genome of Black Cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596.

Tyler BM (2002) Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annual Review of Phytopathology* **40**: 137-167.

Unsicker SB, Kunert G, und Gershenzon J (2009) Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 479-485.

Vickers CE, Possell M, Nicholas Hewitt C, und Mullineaux PM (2010) Genetic structure and regulation of isoprene synthase in Poplar (*Populus spp.*). *Plant Molecular Biology* **73**: 547-558.

Vogt T (2010) Phenylpropanoid Biosynthesis. *Molecular Plant* **3**: 2-20.

Vranová E, Coman D, und Gruissem W (2013) Network Analysis of the MVA and MEP Pathways for Isoprenoid Synthesis. *Annual review of plant biology* **64**: 665-700.

Wang H-L, Chen J, Tian Q, Wang S, Xia X, und Yin W (2014) Identification and validation of reference genes for *Populus euphratica* gene expression analysis during abiotic stresses by quantitative real-time PCR. *Physiologia Plantarum* **152**: 529-545.

Wani SH, Kumar V, Shriram V, und Sah SK (2016) Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *The Crop Journal* **4**: 162-176.

Wasternack C, und Hause B (2013) Jasmonates: Biosynthesis, Perception, Signal Transduction and Action in Plant Stress Response, Growth and Development. An Update to the 2007 Review in *Annals of Botany*. *Annals of botany* **111**.

Wenke K, Kai M, und Piechulla B (2010) Belowground volatiles facilitate interactions between plant roots and soil organisms. *Planta* **231**: 499-506.

- Widhalm Joshua R, und Dudareva N** (2015) A Familiar Ring to It: Biosynthesis of Plant Benzoic Acids. *Molecular Plant* **8**: 83-97.
- Wink M** (2018) Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction? *Frontiers in Physiology* **9**: 364.
- Woloshuk CP, Meulenhoff JS, Sela-Buurlage M, van den Elzen PJ, und Cornelissen BJ** (1991) Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*. *The Plant cell* **3**: 619-628.
- Yadav H, Dreher D, Athmer B, Porzel A, Gavrin A, Baldermann S, Tissier A, und Hause B** (2019) Medicago TERPENE SYNTHASE 10 Is Involved in Defense Against an Oomycete Root Pathogen. *Plant Physiology* **180**: 1598-1613.
- Yang M, Duan S, Mei X, Huang H, Chen W, Liu Y, Guo C, Yang T, Wei W, Liu X, He X, Dong Y, und Zhu S** (2018) The *Phytophthora cactorum* genome provides insights into the adaptation to host defense compounds and fungicides. *Scientific Reports* **8**: 6534.
- Yousef LF, Wojno M, Dick WA, und Dick RP** (2012) Lipid profiling of the soybean pathogen *Phytophthora sojae* using Fatty Acid Methyl Esters (FAMES). *Fungal Biology* **116**: 613-619.
- Zenk MH** (1967) Pathways of salicyl alcohol and salicin formation in *Salix purpurea* L. *Phytochemistry* **6**: 245-252.
- Zheng Z, Qamar SA, Chen Z, und Mengiste T** (2006) Arabidopsis WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* **48**: 592-605.
- Zipfel C, und Oldroyd G** (2017) Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* **543**: 328-336.
- Zipfel C, Kunze G, Chinchilla D, Caniard A, Jones JD, Boller T, und Felix G** (2006) Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts *Agrobacterium*-mediated transformation. *Cell* **125**: 749-760.

Anhang

Tabelle 19: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.

Quelle für die Primer qPCR-His fwd/rev Wang *et al.*, 2014.

Name	Sequenz (5'-3')	Verwendung
PtTPS5-fwd	CACCATGGCCCTTCAAGAATCAACCC	Isolation
PtTPS5-rev	TCATGCTACAACCTGGAAGGGGA	Isolation
PtTPS5-QRTfwd	GCACTGGAGCTGTTCTAAAG	qRT-PCR
PtTPS5-QRTrev	GGGTAGCTTTGTAGCAAAGTC	qRT-PCR
PhspF-qPCR	CGACCATTGGTGTGGACTTT	qRT-PCR
PhspR-qPCR	ACGTTCTCACAGGCGTATCT	qRT-PCR
qPCR-His-fwd	ACTGCTCGTAAGTCTACTGGAGG	qRT-PCR
qPCRHis-rev	GCGGTAACGGTGAGGCTTCTTC	qRT-PCR
M13fwd	GTA AACGACGGCCAG	Sequenzierung
pET100 fwd	TCCGGCGTAGAGGATCGAGATCT	Sequenzierung
pET100 rev	AATGCGCTCATCGTCATCCTCG	Sequenzierung

Tabelle 20: Parameter der Multiplen Reaktionsüberwachung (MRM) der internen Standards.

Salicylsäure (SA), Jasmonsäure (JA), JA-Konjugate (JA-Ile), Ile: Isoleucin, Trifluormethyl-Zimtsäure (TFMCA), D_x: Deuteriumlabeling^{Anzahl}, Q1: Quadrupol 1, Q3: Quadrupol 3, RT: Retentionszeit, DP: Fragmentierungspotential, EP: Eingangspotential, CE: Kollisionsenergie, CXP: Kollisionszellenaustrittspotential.

Verbindung	Q1 [m/z]	Q3 [m/z]	RT [min]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
Syringasäure	197	121,085	4,01	-30	-9	-24	-2
D ₄ -SA	140,934	97	5,7	-30	-8	-22	0
D ₆ -JA	215	59	7,2	-30	-9	-24	0
D ₆ -JA-Ile	328,186	130,1	7,3	-30	-4,5	-30	-4
TFMCA	215,064	171,056	7,3	-30	-8	-18	-4

Tabelle 21: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Phytohormonen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Phytohormone Salicylsäure (SA), Abscisinsäure (ABA), Jasmonsäure (JA), *cis*-Oxophytodiensäure (*cis*-OPDA), JA-Konjugate (JA-Ile, OH-JA, COOH-JA-Ile), 12-Hydroxyjasmonsäure-Sulfat (12-JA-Sulfat) und Salicylsäure-2-O-D-Glycosid (SA-Glc) erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [ng/g] FG ± Standardfehler (n = 7-8). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = p < 0,05 %; ** = p < 0,01 %.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
SA	122,81 ± 35,45	150,29 ± 44,85	WR	50,00	0,536
ABA	9,08 ± 4,03	12,84 ± 2,86	ST	0,72	0,484
<i>cis</i> -OPDA	141,28 ± 18,14	144,37 ± 34,79	ST	0,07	0,945
JA	5,21 ± 1,10	14,84 ± 3,57	ST	2,74	0,017*
JA-Ile	0,45 ± 0,06	0,62 ± 0,09	ST	1,56	0,143
OH-JA-Ile	0,59 ± 0,06	0,81 ± 0,14	ST	1,34	0,203
OH-JA	7,35 ± 0,73	11,27 ± 1,48	ST	2,12	0,054
COOH-JA-Ile	1,16 ± 0,12	1,34 ± 0,25	ST	0,59	0,567
12-JA-Sulfat	1172,04 ± 311,29	2115,02 ± 612,67	ST	1,70	0,113
SA-Glc	6957,95 ± 483,34	10986,77 ± 1211,85	ST	2,88	0,010**

Tabelle 22: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Salicinoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Salicinoide erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler bzw. der relative Gehalt (#) [Peak area/mg] FG, (n = 7-8). Statistik: Student T-Test: * = p < 0,05 %; ** = p < 0,01 %; S: Sulfat.

Verbindung	Kontrolle		Infektion		Statistik	T/t-Wert	p-Wert
Salicin	41,87	\pm 16,03	77,22	\pm 34,06	WR	19,00	0,336
Salicin-7-S	2,08	\pm 0,26	3,39	\pm 0,39	ST	2,52	0,026*
Salirepin	14,50	\pm 2,39	20,62	\pm 2,79	ST	1,53	0,151
Salirepin-7-S	0,30	\pm 0,03	0,42	\pm 0,05	ST	1,77	0,100
Salicortin	368,31	\pm 172,48	204,06	\pm 70,32	ST	2,25	0,056
Tremulacin	3,16	\pm 1,27	2,49	\pm 1,98	ST	0,28	0,785
Homalosid D	16,77	\pm 9,28	7,78	\pm 3,04	WR	33,00	0,596
Salireposid	1646,66	\pm 764,36 [#]	1140,19	\pm 354,54 [#]	ST	0,38	0,710

Tabelle 23: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an phenolischen Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Phenolsäuren Ferulasäure (FerulicA), *p*-Cumarsäure (*p*-CouA) und Kaffeesäure (CaffA), sowie der anderen phenolischen Verbindungen erfolgte in Methanol aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [ng/g] FG \pm Standardfehler bzw. der relative Gehalt (#) [Peak area/mg] FG, (n = 7-8). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = p < 0,05 %.

Verbindung	Kontrolle		Infektion		Statistik	T/t-Wert	p-Wert
<i>p</i> -CouA	146,39	\pm 23,66	130,30	\pm 18,83	ST	0,44	0,665
FerulicA	155,93	\pm 11,22	116,26	\pm 11,62	ST	2,73	0,017*
CaffA	264,55	\pm 35,30	198,82	\pm 29,41	ST	1,97	0,071
Arbutin	2,00	\pm 0,38	1,46	\pm 0,13	ST	0,38	0,71
Trichocarpin	15529,85	\pm 6643,97 [#]	12391,38	\pm 3872,33 [#]	WR	59,00	0,78

Tabelle 24: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Phenylpropanoiden in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Phenylpropanoide erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler (n = 7-8). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = p < 0,05 %; ** = p < 0,01 %; *** = p < 0,001; BALD: Benzaldehyd; BnOH: Benzylalkohol; SALD: Salicylaldehyd; 2-PhenyletOH: 2- Phenylethylalkohol.

Verbindung	Kontrolle		Infektion		Statistik	t/T-Wert	p-Wert
BALD	1,33	\pm 0,42	0,72	\pm 0,27	ST	1,65	0,121
BnOH	0,22	\pm 0,20	0,77	\pm 0,20	WR	48,00	0,038*
SALD	4,02	\pm 1,00	4,93	\pm 1,79	ST	0,02	0,988
2-PhenyletOH	0,11	\pm 0,04	0,74	\pm 0,23	WR	39,00	<0,001***
Benzylsalicylat	Keine Quantifizierung						

Tabelle 25: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Fettsäuren und ihren Vorstufen (Myristaldehyd) in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Fettsäuren erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler ($n = 7-8$). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$; S: Säure.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
Myristaldehyd	3,16 \pm 0,34	8,53 \pm 2,17	ST	3,13	0,007**
Myristinsäure	0,40 \pm 0,08	6,13 \pm 1,59	ST	8,19	<0,001***
PentadecanS	1,51 \pm 0,30	4,49 \pm 0,51	WR	38,00	<0,001***
Palmitinsäure	24,53 \pm 3,57	72,04 \pm 6,13	WR	36,00	<0,001***
Ölsäure	5,04 \pm 0,92	7,34 \pm 1,09	ST	1,51	0,154
Stearinsäure	1,65 \pm 0,19	5,29 \pm 0,71	ST	6,39	<0,001***

Tabelle 26: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an Terpenen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Monoterpene (Limonen, 1,8-Cineol; α -Terpineol) und Sesquiterpene (Elemol, unbekanntes Sesquiterpen) erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler ($n = 7-8$). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$; unb. SesqT: unbekanntes/ nicht identifiziertes Sesquiterpen.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
Limonen	0,55 \pm 0,09	0,42 \pm 0,05	ST	1,02	0,326
1,8-Cineol	0,16 \pm 0,11	0,26 \pm 0,16	WR	65,00	0,798
α -Terpineol	0,10 \pm 0,03	0,44 \pm 0,05	ST	5,26	<0,001***
Elemol	0,01 \pm 0,01	0,27 \pm 0,09	WR	40,50	0,002**
Unb. SesqT	0,04 \pm 0,04	4,31 \pm 1,35	WR	36,00	<0,001***

Tabelle 27: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an unbekanntem Verbindungen (U) in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln.

Die Extraktion der Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler ($n = 7-8$). Fett hervorgehoben sind die pappelspezifischen Verbindungen, welche nicht im Myzel von *P.cactorum* detektierbar waren. Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
U1	0,14 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	WR	12,00	0,038*
U2	0,14 \pm 0,01	0,58 \pm 0,06	ST	9,19	<0,001***
U3	0,39 \pm 0,06	0,41 \pm 0,03	ST	0,68	0,508
U4	0,26 \pm 0,02	0,28 \pm 0,04	WR	68,00	1,000
U5	0,21 \pm 0,04	0,17 \pm 0,03	ST	0,78	0,449
U6	0,49 \pm 0,06	0,55 \pm 0,19	ST	3,17	0,007**
U7	Keine Detektion	1,64 \pm 0,88	WR	40,00	0,002**
U8	0,29 \pm 0,06	0,85 \pm 0,21	ST	2,99	0,010**
U9	0,43 \pm 0,07	1,45 \pm 0,31	ST	4,20	<0,001***
U10	0,27 \pm 0,02	0,47 \pm 0,06	ST	3,10	0,008**

Tabelle 28: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an apolaren Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln bei der Wiederholung des Hydrokultur-Experimentes.

Die Extraktion der Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler ($n = 9$). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$; unb. SesqT: unbekanntes/ nicht identifiziertes Sesquiterpen; unbekannteA: unbekannte aromatische Verbindung.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
Benzaldehyd	6,43 \pm 1,28	12,23 \pm 2,74	ST	2,09	0,053
Limonen	0,49 \pm 0,01	0,54 \pm 0,07	ST	0,56	0,582
Benzylalkohol	12,69 \pm 1,57	13,05 \pm 1,57	ST	0,14	0,888
Salicylaldehyd	19,91 \pm 2,22	54,05 \pm 14,74	ST	3,20	0,006**
Methylbenzoat	0,44 \pm 0,01	0,52 \pm 0,04	ST	1,39	0,184
Benzoessäure	0,41 \pm 0,14	1,66 \pm 0,52	ST	1,78	0,094
α -Terpineol	0,09 \pm 0,01	0,03 \pm 0,02	ST	1,88	0,079
U5	0,15 \pm 0,01	0,20 \pm 0,01	ST	2,90	0,010**
Unb. SesqT	Keine Detektion	0,40 \pm 0,21	WR	54,00	0,002**
Elemol	Keine Detektion	Keine Quantifizierung			
Benzylbenzoat	0,73 \pm 0,10	1,04 \pm 0,11	ST	1,90	0,075
Benzylsalicylat	0,39 \pm 0,10	0,84 \pm 0,12	ST	3,17	0,006**
Palmitinsäure	9,00 \pm 1,90	16,90 \pm 1,52	ST	2,90	0,010**
unbekannteA		Keine Quantifizierung			
Phytol	2,53 \pm 0,30	10,68 \pm 2,05	ST	5,22	0,998
Linolensäure	3,22 \pm 0,70	9,81 \pm 1,21	ST	4,26	<0,001***
Stearinsäure		Keine Quantifizierung			

Tabelle 29: Übersicht des Gehalts und der statistischen Parameter an apolaren Verbindungen in nicht infizierten (Kontrolle) und durch *Phytophthora cactorum* infizierten (Infektion) *Populus trichocarpa* Wurzeln bei der Wiederholung des Experimentes in Erde.

Die Extraktion der Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht (FG). Angegeben ist der durchschnittliche Gehalt [$\mu\text{g/g}$] FG \pm Standardfehler ($n = 9$). Statistik: Student T-Test (ST) bzw. Wilcoxon Rangsummen-Test (WR): * = $p < 0,05$ %; ** = $p < 0,01$ %; *** = $p < 0,001$; unbekannteA: unbekannte aromatische Verbindung.

Verbindung	Kontrolle	Infektion	Statistik	t/T-Wert	p-Wert
Benzaldehyd	9,62 \pm 2,39	6,08 \pm 1,13	ST	1,31	0,205
Benzylalkohol	11,79 \pm 1,08	11,54 \pm 0,74	ST	0,18	0,862
Salicylaldehyd	125,63 \pm 32,00	65,44 \pm 26,38	ST	2,11	0,049*
Benzoessäure		Keine Quantifizierung			
Salicylalkohol	0,14 \pm 0,04	0,27 \pm 0,04	ST	2,46	0,430
Myristaldehyd	2,83 \pm 0,53	2,58 \pm 0,37	ST	0,34	0,738
Benzylbenzoat	0,64 \pm 0,26	0,18 \pm 0,06	WR	82,00	0,087
Benzylsalicylat	3,96 \pm 0,66	3,63 \pm 0,79	ST	0,70	0,492
Palmitinsäure	12,27 \pm 2,97	12,42 \pm 2,65	ST	0,14	0,889
unbekannteA		Keine Quantifizierung			
Linolensäure		Keine Quantifizierung			

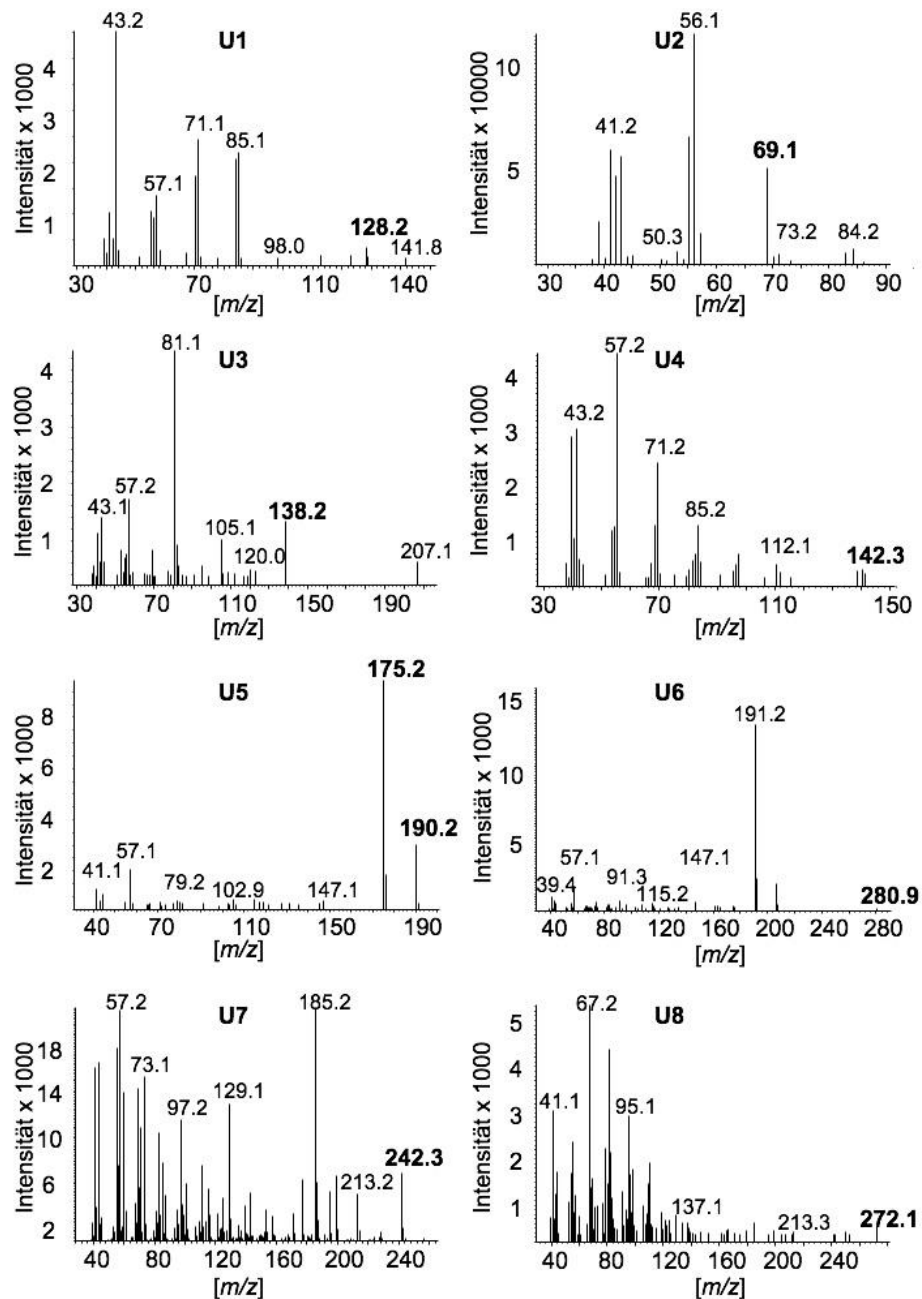


Abbildung 22: Massenspektren der unbekannt Verbindungen aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe.

Die Extraktion der Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht. Hervorgehoben ist der potentielle Molpeak der jeweiligen unbekannt Verbindung bzw. der wichtige Peak für eine eindeutige Zuordnung. m/z : Masse/Ladungsverhältnis.

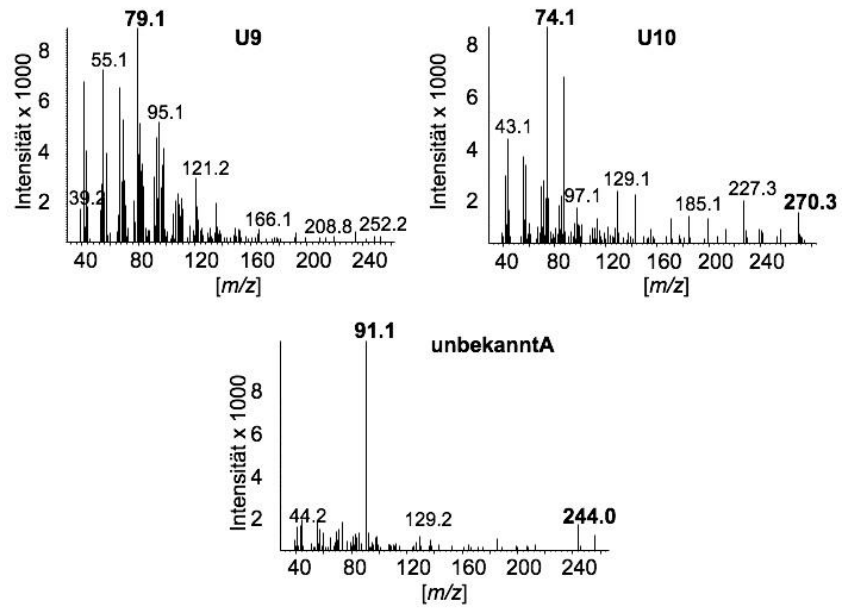


Abbildung 23: Massenspektren der unbekannt Verbindungen aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe.

Die Extraktion der Verbindungen erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht. Hervorgehoben ist der potentielle Molpeak der jeweiligen unbekannt Verbindung bzw. der wichtige Peak für eine eindeutige Zuordnung. *m/z*: Masse/Ladungsverhältnis.

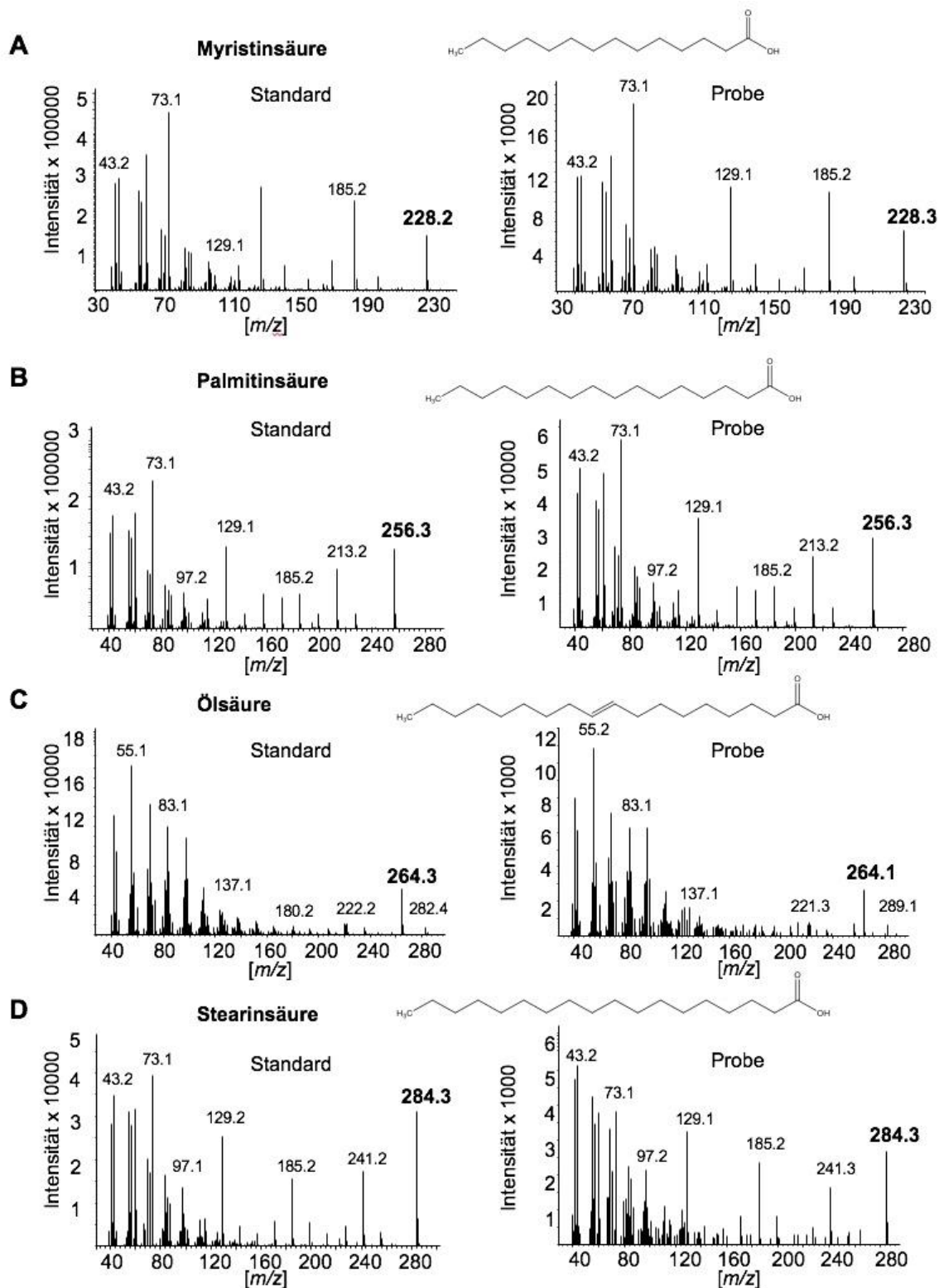


Abbildung 24: Vergleich der Massenspektren von gesättigten (A-B; D) und ungesättigten Fettsäuren (C) zwischen authentischen Standards (Standard) und der identifizierten Fettsäuren aus der Versuchsprobe (Probe).

Die Extraktion der Fettsäuren aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht. Die Fettsäure-Standards wurden in *n*-Hexan gelöst mit einer Zielkonzentration von 10 ng/μl. Die analysierten Fettsäuren wurden im Myzel sowie in den Wurzelproben von *Populus trichocarpa* identifiziert. Hervorgehoben ist der Molpeak der jeweiligen Verbindung. *m/z*: Masse/Ladungsverhältnis.

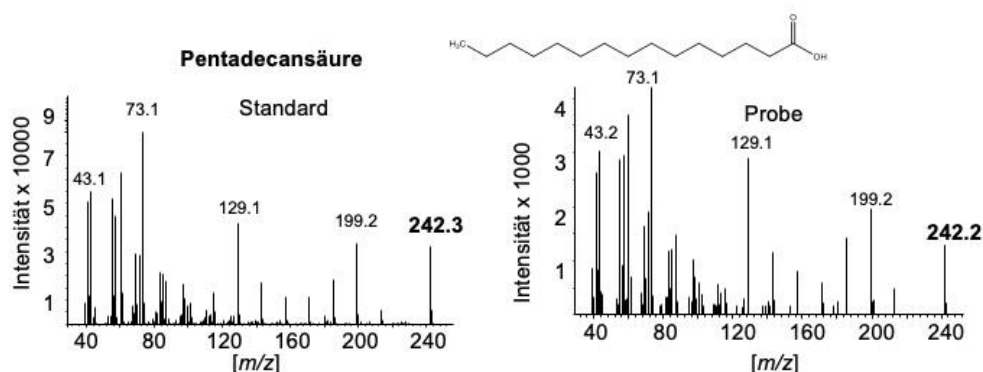


Abbildung 25: Vergleich der Massenspektren von Pentadecansäure zwischen dem authentischen Standard (Standard) und der identifizierten Fettsäure aus der Versuchsprobe (Probe).

Die Extraktion der Fettsäure aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe erfolgte in *n*-Hexan aus Frischgewicht. Der Fettsäure-Standard wurde in *n*-Hexan gelöst mit einer Zielkonzentration von 10 ng/μl. Die analysierte Fettsäure wurde nur in der Wurzelprobe von *Populus trichocarpa* identifiziert. Hervorgehoben ist der Molpeak der Pentadecansäure. *m/z*: Masse/Ladungsverhältnis.

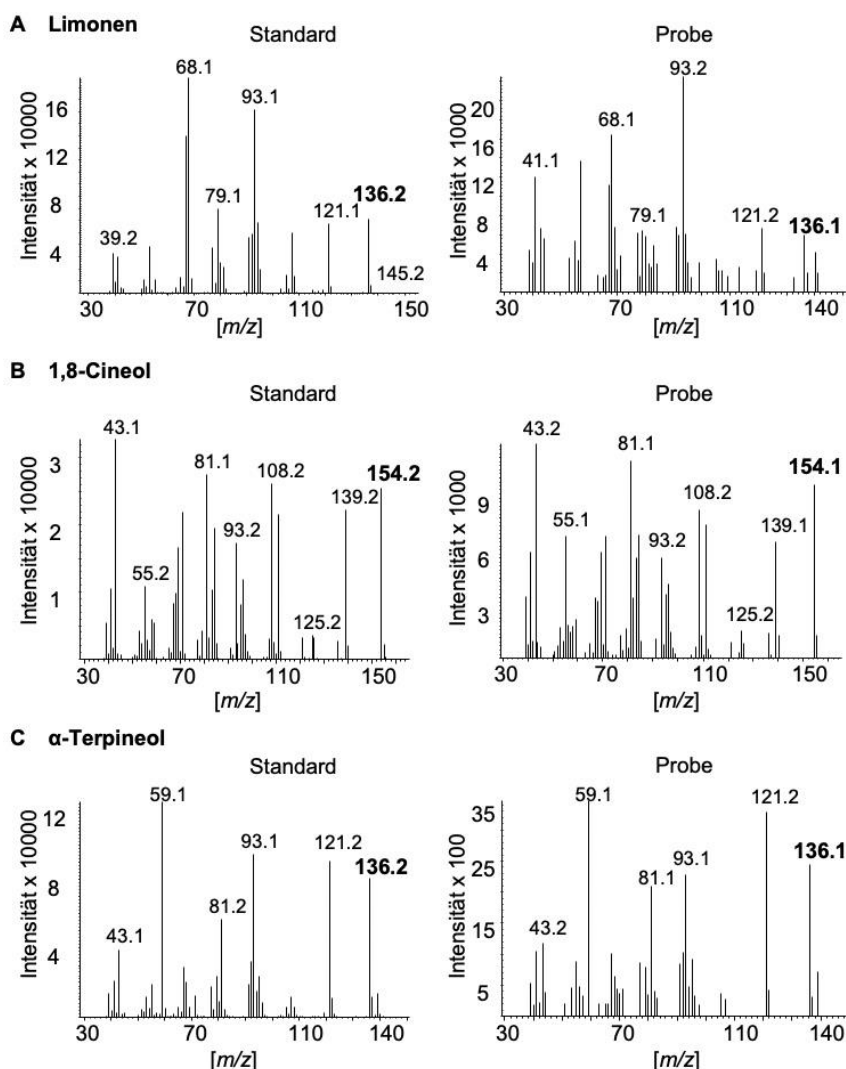


Abbildung 26: Vergleich der Terpen- Massenspektren von Limonen (A), 1,8-Cineol (B) und α-Terpineol (C) zwischen dem jeweiligen Standard und dem identifizierten Terpen aus der Versuchsprobe (Probe).

Die Extraktion der Terpene erfolgte aus der mit *Phytophthora cactorum* infizierten Wurzelprobe in *n*-Hexan aus Frischgewicht. Die Terpen-Standards wurden in *n*-Hexan gelöst mit einer Zielkonzentration von 5 ng/μl (1,8-Cineol und α-Terpineol) bzw. 10 ng/μl (Limonen). Hervorgehoben ist der Molpeak der jeweiligen Verbindung. *m/z*: Masse/Ladungsverhältnis.

Potri.005G095500 (*PtTPS5*)

ATGGCCCTTCAAGAATCAACCCCAAAGCTCAATTTCCGCCAACAGCAGAGTTTCATCCTTCTGTATGGGGTGAT
TACTTCATCAACAAGCCTCCTTGTGATGAGATGCTATTCAGCGCTTGGATTAAGGAAGTTGAGGTGCTGAAAGAA
GAAGTGAGGACCATGCTTACAAGCGCCACTCTAAAACCATCAGAAAAGCTGAAGTTGATGGACATTGTCCTTCGG
CTAGGCATTGGTTACCATTTTGAAGGAGAATTTAATGACATAATAGAGCACGCATACAATACTTATCATGGCAAC
AACTTCGACGATGACCTCTTTACAGTTGCTCTTCGATTTTCGATTACTTAGACAGTATGGATAACAATGTTTTCAAGT
GATATATTCAACGAGTTCAAGGACGGAAAAGGCAACTTCAAGGACAATCTTATTGATGATGTGGAAGGCTTGCTA
AGTTTATATGAAGCTTCTTTCCCTCGGTGGTCATGGAGAAGATACGCTAGATAAAGCTCTTTCCCTTTTGCAAACT
CACCTCGAGTCCGCGGTTGCTCATCTGGTCTCTCCTCTTGCTGACAAAGTAAGTCATGCTTTGAAGCGGCCTCTC
CTCAAAGGCGTACCAAAGCATGAGCAATGGCACCACATCCTTATCTACCAGCAAGACGAAGCTTGCACTGGAGCT
GTTCTAAAGCTAGCAAAGTTGGATTTCAATGTAGTGCAAAAGTGCTACCAGGACGAGCTGAGGATTATCTCTAGG
TGGTGGATAGACTTGGACTTTGCTACAAAGCTACCCTTTGCTCGAGACAGGGTGATTGAGTGCTTTTTTTGGGGA
CTGGGAGCATTCTTGAGCCACAATTTGTACTTGCAAGGAGGTTCAACAAAAGTACTTATATTTTTGTCCATA
TTGGATGACATATATGATGTGCACGGAACGATTGAAGAAGTTGAGCTTTTACCAGAAAAGATTGAAAGGTGGAT
ACTAGCATGGAAGATCTGCCAGATTACATGAAATTGTTTTTTGAGGCATTAATTGGTTTCTTCGATGAAATTGAG
CAAGAGACAGGGAAGGAAGGAAGACCATACTGCGTGCCTACTCTAGAGAAATGTTGAAGAATCAAGCAAGGGCC
TACCTTATTGAAGCCAGATGGTTCAACCAAGACTGTGTTCCACAAGTGGAGGAATACAGGCGTGGTGGTGTGTAT
ACTTCTTGTATCCTATGGCCGAGTGGCATGGTTATGTGGGATGGCAGAAACAGGTTCAAAGGAGGTATTTGAG
TGGATGTTAAAAATCCTAAAATCGTGGTTGCCTCATCTGATATCGGTAGGCTCATGGATGACATTACATCCCAT
GAGTTTGAGCAAGAAAGAGGACATGTTGCGTCAGCTGTTGAGTGCTGCATGAAGCAATATGGTGTTTCAAAGAAA
GAAGCATATGACATGTTGAACAAGATGGTTGAAAGTGATTGGAAGACATAAATGAGGAGCTTCTCAAGCCATCT
ACTGTTCCTAGGCAAGTCTTGATACTTATGCTTAATCTAGCTCGTATCATAGACGTTGTATAACAAGGATTATGAT
GGCTATACAGAGCCAAGAACGCGACGAAGGAAATGCTGACTGCTTTCCCTCGTAGATCCCCTTCCAGTTGTAGCA
TAA

DQ163960 (*Ras-like Protein-Ypt1*)

GACTTTGTGAGTGCCATACAAAATTCGCGCTAGGCGACCTTTGCGAGCTCCAGATTTCCACCAGAATTGCTGAC
ATGCTTTTTTTCGGTTGTGCCAGAAAATCCGTACGATCGAGCTGGACGGAAAGACCATCAAGCTCCAGATTGTA
CGTCTCCAGCAGACGTGGCGTGTTCCTATTTAACTAACGGTCCACTTGTGTGTCTGTAGTGGGACACGGCCGG
CCAGGAGCGTTTCCGCACGATCACTAGCAGCTACTACCGCGGTGCCATGGCATTATCGTGGTGTACGACGTGAC
GGACCAGGAGTCGTTCAACAACGTGAAACAGTGGCTGCACGAGATCGATAGGTGCGTCCAACGTGTGTACTGAAA
GAACCGACGGAAAAGAGCTGACTGGTGTCCCGCTCTGATTTGTAGATACGCCTG

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Jena, den 30.09.2020

(Jennifer Morawetz)