

Biologische Bekämpfung von Kastanienrindenkrebs mittels hypovirulenter Pilzstämmen und
Untersuchung der baumphysiologischen Reaktionen

Endbericht Projekt (1.5600041.00)
BMLF Forschungsprojekt Nr. 1111 GZ 24.002/12-//A1a/98
BMWF GZ 30.689/2-III/2a/98

Ursula Kudera
Roland Schafleitner
Eva Wilhelm

Österreichisches Forschungszentrum Seibersdorf
Bereich Lebenswissenschaften
Geschäftsfeld Biotechnologie

Beschränkte Verbreitung

INHALTSVERZEICHNIS

KURZFASSUNG	5
SUMMARY	6

1 EINSATZ HYPOVIRULENTER *CRYPHONECTRIA PARASITICA* STÄMME GEGEN DEN KASTANIENRINDENKREBS

1.1	EINLEITUNG	8
1.1.1.	SCHADBILD	8
1.1.2.	ERREGER	8
1.1.3.	HYPOVIRULENZ	8
1.1.4.	BEKÄMPFUNG	9
1.1.5.	BEGLEITENDE PHYTOSANITÄRE MAßNAHMEN	9
1.2	MATERIAL UND METHODEN	10
1.2.1.	PROBENNAHME UND ISOLIERUNG	10
1.2.2.	VC-TESTUNG	10
1.2.3.	KONVERSION	10
1.2.4.	HERSTELLUNG DER INOKULATE	11
1.2.5.	INOKULATIONSMODI	11
1.2.6.	VERIFIZIERUNG DER KONVERSIONEN	11
1.3	ERGEBNISSE	12
1.3.1.	KARTIERUNG	12
1.3.1.1	Probennahme	12
1.3.1.2	Einordnung in das EU-VC-System	13
1.3.1.3	Verteilung der VC-Gruppen	14
1.3.2.	HYPOVIRULENZ	17
1.3.2.1	Natürliche einheimische Vorkommen	17
1.3.2.2	Konversion	17
1.3.2.3	Ausbreitung von künstlich ausgebrachter Hypovirulenz	18
1.3.2.4	Vergleichsinokulationen	19
1.3.3.	APPLIKATIONEN	19
1.3.3.1	Läsionsbehandlungen	19
1.3.3.2	Vorbeugende Behandlungen	20
1.4	LITERATUR	20
1.5	BILDTEIL	22

2 BAUMPHYSIOLOGISCHE REAKTIONEN

2.1	EINLEITUNG	27
2.2	MATERIAL UND METHODEN	30
2.2.1.	SOUTHERN BLOT-HYBRIDISIERUNG	30
2.2.1.1	Isolierung genomischer DNA von Edelkastanie, Schnitt mit Restriktionsenzymen und Immobilisierung der DNA Fragmente auf Nylon Membranen	30
2.2.1.2	Sondenvorbereitung	30
2.2.1.3	Southern Hybridisierung und Detektion	30
2.2.2.	ISOLIERUNG EINES GENFRAGMENTS VON PHENYLALANINE AMMONIUM LYASE	31
2.2.3.	RNA ISOLATION AUS GLASHAUS- UND IN VITRO PFLANZEN	31
2.2.3.1	RNeasy Kit	31
2.2.3.2	Phenol Methode	31
2.2.4.	KONSTRUKTION EINER cDNA-BIBLIOTHEK AUS VERLETZTEN EDELKASTANIENSTIELEN	32
2.2.5.	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES VERLETZUNGSRESPONS UND NACH <i>C. PARASITICA</i> INOKULATION	32
2.3	ERGEBNISSE	33

2.3.1.	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG DES VERLETZUNGSRESPONS UND DES FORTSCHREITENS DER CRYPHONECTRIA PARASITICA INFEKTION	33
2.3.2.	EXPRESSION VON PR-GENEN UND PAL NACH VERWUNDUNG UND C.PARASITICA INOKULATION	36
2.3.2.1	PR-Genexpression nach Verwundung und Pathogeninfektion mit heterologen Sonden	36
2.3.2.2	Isolierung und Expressionsanalyse eines Phenylalanin-Ammonium-Lyase Genfragments aus Edelkastanie	37
2.3.2.3	PAL-Genexpressionsmessung nach Verwundung und nach Inokulation mit v und hv <i>C. parasitica</i>	40
2.3.3.	ISOLIERUNG VERLETZUNGSINDUZIERTER GENE	41
2.3.3.1	Differential mRNA Display	41
2.3.3.2	Verifizierung der differentiellen Genexpression	41
2.3.3.3	Klonierung der verifiziert differentiell exprimierten Displayfragmente und Sequenzanalyse der Displayfragmente	42
2.3.3.4	Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus verletzten Stielen von Edelkastanie	42
2.3.3.5	Screening der cDNA Bank	42
2.3.3.6	Verletzungsinduzierte Gene von Edelkastanie	42
2.3.3.7	Expressionsanalyse der isolierten Gene nach Verletzung und Inokulation mit <i>Cryphonectria parasitica</i>	45
2.3.3.8	Vergleich der Genexpression nach Verletzung und Inokulation mit v <i>C. parasitica</i>	48
2.3.3.9	Expression verletzungsinduzierter Gene in der Borke von Glashaus-Edelkastanienpflanzen	49
2.3.3.10	Expression verletzungsinduzierter Gene in der Borke von <i>C. parasitica</i> suszeptiblen und resistenten Pflanzen	50
2.4	DISKUSSION	51
2.4.1.	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN DES KRANKHEITSVERLAUFS	51
2.4.2.	GENEXPRESSIONSMESSUNGEN MIT HETEROLOGEN CDNA SONDEN	51
2.4.3.	PAL-GENEXPRESSIONSMESSUNG	52
2.4.4.	VERLETZUNGSINDUZIERTER GENE IN DER BORKE VON EDELKASTANIE	53
2.4.4.1	Beeinflussung des Verwundungsrespons durch Pathogeninokulation	53
2.4.5.	WUNDINDUZIERTER GENEXPRESSION IN GLASHAUSPFLANZEN	54
2.5	SCHLÜßFOLGERUNGEN	55
2.6	LITERATUR	56

3 VORTRÄGE, BEITRÄGE FÜR TAGUNGSBÄNDE, POSTERPRÄSENTATION UND PUBLIKATIONEN **60**

3.1	VORTRÄGE	60
3.2	BEITRÄGE FÜR TAGUNGSBÄNDE	61
3.3	POSTERPRÄSENTATIONEN	63
3.4	PUBLIKATIONEN	64

4 PUBLIKATIONSMANUSKRIPTE **66**

4.1	ASSESSMENT OF STRESS GENE EXPRESSION IN CHESTNUT (<i>CASTANEA SATIVA</i> MILL.) UPON PATHOGEN INFECTION (<i>C. PARASITICA</i> (MURR.) BARR.) AND WOUNDING. PUBLICATION ACCEPTED, FOREST, SNOW AND LANDSCAPE RESEARCH.	66
4.2	ISOLATION OF WOUND INDUCIBLE GENES FROM <i>CASTANEA SATIVA</i> STEMS AND EXPRESSION ANALYSIS IN THE BARK TISSUE. PUBLICATION ACCEPTED, PLANT PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY, 10. SEPTEMBER 2001.	73
4.3	PUBLICATION IN PREPARATION, SUBMISSION PLANNED FOR DECEMBER 2001: WOUND-RESPONSIVE GENES OF THE BARK OF <i>CASTANEA SATIVA</i> AND THEIR EXPRESSION UPON WOUNDING AND CHESTNUT BLIGHT INFECTION.	91

<u>5 HANDBUCH ZUR ANWENDUNG DER BIOLOGISCHEN BEKÄMPFUNG VON KASTANIENRINDENKREBS FÜR DEN ANWENDER</u>	109
5.1.1. SCHADBILD	109
5.1.2. ERREGER	109
5.1.3. HYPOVIRULENZ	109
5.1.4. BEKÄMPFUNG	110
5.1.5. BEGLEITENDE PHYTOSANITÄRE MAßNAHMEN	110
<u>6 INFORMATIONSBLETT ZUR BESTANDSAUFNAHME VON EDELKASTANIENRINDENKREBS</u>	117

Kurzfassung

Die Edelkastanie (*Castanea sativa* Mill.) wird in Österreich durch die eingeschleppte Pilzerkrankung, den Kastanienrindenkrebs (*Cryphonectria parasitica* Murr.) in ihrem Bestand bedroht. Zielsetzung dieses Projektes war die Realisierung einer nachhaltigen biologischen Bekämpfungsmethode basierend auf dem Prinzip der Hypovirulenz. Hypovirulenz wird durch einen dsRNA-(Doppelstrang RNA)-Virus der Gattung Hypovirus verursacht und wird durch Anastomosen von Hyphen vegetativ ähnlicher Pilzstämmen übertragen. Während der Befall mit virulenten Pilzstämmen für den Baum letal endet, verlaufen Infektionen mit hypovirulenten Pilzstämmen nur oberflächlich, und es kommt zu einer Ausheilung der Nekrose. Zur praktischen Behandlung vor Ort, werden hypovirulente Pilzstämmen auf virulente Läsionen ausgebracht und durch Übertragung des Hypovirus kommt es zu einer Umwandlung des virulenten Pilzes, womit eine Ausheilung der Nekrose stattfinden kann. Eine Umwandlung ist allerdings nur dann erfolgreich, wenn die vc (vegetative Kompatibilität)-Gruppen der beiden Pilzstämmen ident bzw. ähnlich sind. Die Kenntnis der vc-Gruppen ist daher unbedingt wichtig, um erfolgreiche Behandlungen mit Hypovirulenz durchzuführen. Als wichtiger Projektbestandteil wurde daher die Kartierung der in Österreich vorkommenden vc-Gruppen durchgeführt. Für die nachhaltige Umsetzung der Hypovirulenz ist dies von Bedeutung, da bei späterer Selbstanwendung keine vc-Gruppenbestimmung mehr vorgenommen werden wird. Dann wird die vc-Gruppenkartierung als Basis für die jeweilige Präparateformulierung herangezogen, wobei in bestimmten Regionen bestimmte vc-Gruppen mit hoher Wahrscheinlichkeit vorzufinden sind.

Im Projektzeitraum wurden ca. 1500 *C. parasitica* Isolate im Freiland gesammelt und auf ihre vegetativen Kompatibilitätsgruppenzugehörigkeit getestet. Es wurden insgesamt 15 vegetative Kompatibilitätsgruppen in Österreich gefunden und 14 davon konnten in das europäische vc-System eingeordnet werden. Zwei Gruppen (EU 17 und EU 13) repräsentierten mehr als 80% aller beprobten Läsionen. Fünf der österreichischen vc-Gruppen konnten mit ungarischen, französischen und schweizer hypovirulenten Isolaten umgewandelt werden, darunter auch die zwei häufigsten Gruppen. Leider konnte kein österreichischer hypovirulenter Stamm identifiziert werden, ebensowenig konnte bisher keine selbstständige Ausbreitung hypovirulenter Stämme beobachtet werden. Im Zuge dieser Arbeiten wurde ein Informationsblatt zur Probenaufsammlung von befallenen Bäumen ausgearbeitet und verteilt. Weiters wurde gemeinsam mit der Firma Hygienium ein Handbuchentwurf für die Applikation von Hypovirulenz für Anwender erstellt.

Die Behandlung erkrankter Bäume im Freiland verlief erfolgreich, etliche Nekrosen heilten nach der Behandlung mit Hypovirulenz aus. Auch die auf Versuchsflächen durchgeführten vorbeugenden Inokulationsversuche bei Schnittmaßnahmen und Veredelungen verliefen sehr positiv. Bei keinem der vorbeugend behandelten Versuchsbäume trat nach dem Astschnitt eine Erkrankung auf. Ebenso erwies sich die Anhäufelungen von Erde als günstig für das Hochkommen von Stockausschlägen.

Im Rahmen dieses Projekts konnte die Effizienz der kurativen und vorbeugenden Behandlung von Edelkastanie zum Schutz vor Kastanienrindenkrebs gezeigt werden. Diese Behandlungen, zusammen mit phytosanitären Maßnahmen und regelmäßiger Kontrolle der Kastanienbestände, leisten einen essentiellen Beitrag zur Erhaltung der Edelkastanie in Österreich.

Ein weiterer Schwerpunkt dieses Projektes lag in der molekularen und histochemischen Aufklärung der baumphysiologischen Reaktionen von Edelkastanie nach Verletzung und Pilzinokulation. Mit heterologen Sonden von PR-Proteinen und einer aus Kastanie isolierten Sonde für Phenylalanin Ammoniumlyase konnte festgestellt werden, dass der hypovirulente Pilz die Verteidigungsmechanismen des Baumes stärker stimuliert als Verwundung oder Infektion mit virulenter *C. parasitica*. Diese Ergebnisse wurden durch histochemische

Analysen bestätigt, bei denen ein effizienterer Aufbau von mechanischen Barrieren im Borkengewebe nach Infektion mit hypovirulenter *C. parasitica* beobachtet wurde. Mittels Differential mRNA Display und cDNA-Bibliotheksscreening konnten 27 verwundungsgesteuerte Gene aus in vitro Pflanzen isoliert werden. Die Funktionen dieser Gene umfassten Signaltransduktion, Stress- und Pathogenrespons, Wachstumsregulation, Proteinmetabolismus, Energietransport, sowie 5 Gene mit bisher unbekannter Funktion. Der Einfluss von Pilzinokulation auf die Expression der verwundungsresponsiven Gene wurde untersucht. Dabei zeigte sich, dass *C. parasitica* die Genexpression nicht generell negativ beeinflusst, sondern spezifisch die Expression gewisser Gengruppen induziert und andere inhibiert. Die Expression der aus in vitro Pflanzen isolierten wundresponsiven Gene konnte anhand ausgewählter Gene im Borkengewebe von Glashauspflanzen bestätigt werden. Mit diesen grundlegenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Edelkastanie analoge Verteidigungssysteme wie krautige Pflanzen z.B. Arabidopsis aufweist.

SUMMARY

This project is aiming at the conservation and at the support of the sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) culture in Austria. The main limiting factor for chestnut cultivation in Austria is chestnut blight, caused by the fungus *Cryphonectria parasitica*. Therefore biocontrol method by the application of hypovirulent *C. parasitica* strains has been a major objective. Hypovirulence is caused by a dsRNA virus of the family Hypoviridae and is transmitted via hyphal anastomosis of vegetative compatible fungal strains. Cankers caused by virulent strains are leading to the death of the trees, whereas hypovirulent strains are causing only superficial cankers and healing of necrotic lesions. For practical purposes, virulent cankers are treated with hypovirulent strains and via viral transmission, the virulent canker will be converted into a hypovirulent canker thus causing healing of the necrosis. A conversion is only possible between identical or similar vc-(vegetative compatibility) groups. Therefore it is important to obtain knowledge on the occurrence and distribution of vc-groups in Austria. In particular this is of special importance for the later success of application with hypovirulence. The vc-group of every treated canker has been determined in the present investigations. This will not be feasible for future potential users of hypovirulence. Therefore the map on the occurrence and distribution of vc-groups will be the basis for the future formulation of fungal strains and application of hypovirulence. In the course of the project more than

1500 *Cryphonectria parasitica* isolates were collected from infected areas and assessed their vegetative-compatibility-(VC) groups in the laboratory. In total 15 VC-groups have been detected in Austria and 14 could be attributed to the European vc-System. Two groups (EU 17 and EU 13) are representing more than 80% of the sampled lesions. Five vc-groups were converted into hypovirulence with Hungarian, French and Swiss strains in the laboratory. Among these strains are also the most frequently occurring vc-groups, which will probably enable good chances for the self spreading of hypovirulence. However, no Austrian hypovirulent strain could be detected, nor any natural spreading of hypovirulence was observed. A leaflet with information on this fungal disease was produced and distributed. Furthermore, a draft of a handbook for the application of hypovirulence for owners of chestnut orchards was produced together with Hygienicum.

In the field, several chestnut-blight cankers have been treated successfully with converted hv-strains, which led to healing of several necroses. Preventive treatment on trees before pruning or grafting revealed to be an efficient measure to inhibit infections.

This project developed measures to combat chestnut blight and showed the efficiency of the treatments. Together with phytosanitary care and careful observation of chestnut stands, the measures developed in this project provide an essential contribution for the conservation of chestnut in Austria.

Molecular and histochemical investigations on the tree-physiological reactions upon wounding and pathogen infection was another goal of the project. Expression analysis using heterologous cDNA probes of tobacco PR-genes and a homologous phenylalanine ammonia lyase gene probe showed that hypovirulent *Cryphonectria parasitica* induced the defence mechanisms of the tree stronger than wounding or infection with virulent *C. parasitica*. These results were confirmed by histochemical investigations, which revealed that structural barriers against fungal infection were established more readily in response to hypovirulent than virulent *C. parasitica*. By differential mRNA display and cDNA library screening, 27 gene fragments of wound-responsive genes have been isolated from in vitro plants. These genes fulfil functions in signal transduction, stress- and pathogen response, growth regulation, protein metabolism and energy transport. For 5 genes the biochemical function is unknown. The influence of fungal inoculation on the expression of the wound-responsive genes has been assessed. It showed that *C. parasitica* does not generally suppress the gene expression in its host, specifically induces or represses certain groups of genes. The expression of a set of the wound-responsive genes isolated from in vitro plants was verified in greenhouse trees. With these basic studies it could be demonstrated that the defense reactions of sweet chestnut are similar to herbaceous plants in particular *Arabidopsis*.

1 EINSATZ HYPOVIRULENTER *CRYPHONECTRIA PARASITICA* STÄMME GEGEN DEN KASTANIENRINDENKREBS

1.1 Einleitung

1.1.1. *Schadbild*

Am augenfälligsten und schon aus einiger Entfernung zu erkennen ist die typische Welketracht. Blätter und ggf. Früchte hängen verdorrt an den Ästen und fallen auch im Winter nicht ab.

Verfolgt man die betroffenen Äste stammwärts, stößt man auf nekrotische Veränderungen der Rinde und knapp darunter auf büschelweise Neuaustriebe, sog. Wasserreiser.

Die Nekrosen beginnen mit orangebrauner Verfärbung und Einsenkung der Rinde, breiten sich elliptisch aus und die Rinde reißt auf.

In vielen Fällen versucht der Baum durch heftige Peridermbildung die Läsion zu umwallen, wodurch die Rinde stark anschwillt, was die Bezeichnung „Rindenkrebs“ erklärt.

Spätestens wenn die Nekrose den Ast oder Stamm umgürtet hat, sterben die distalen Teile ab.

Abgestorbene Bäume bilden meist massive Stockausschläge, welche aber üblicherweise schon an der Basis Befallstellen zeigen. (Bilder 1 - 4)

1.1.2. *Erreger*

Verursacher der oben beschriebenen Symptome ist ein Schlauchpilz aus der Klasse der Pyrenomyceten (BRANDENBURGER 1985), der nach mehreren Revisionen nun unter der Bezeichnung *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr 1978 bekannt ist.

Er dringt durch Wunden in Stamm und Äste ein, wo die dunkelgelben Mycelmatten das Rinden- und Kambialgewebe durchwachsen und verstopfen. (Bild 5)

Wegen des dadurch unterbundenen Wasser- und Nährstofftransportes kommt es rasch zu Welkeerscheinungen und letztendlich zum Absterben der Äste oberhalb der Befallstellen.

Diese Pilze mit letaler Wirkung werden als virulent (v) bezeichnet.

In Kultur bilden sie ein gelbes bis dunkelorange Stroma mit orangebraunen Pyknidien.

Sie werden in diverse „vegetative Kompatibilitätsgruppen“ (=VCG) unterteilt:

Pilzstämme deren Mycelien miteinander verschmelzen, d.h. zwischen deren Hyphen Anastomosen (=Brücken) gebildet werden, nennt man vegetativ kompatibel und ordnet sie derselben VCG zu. (Bild 6) (ANAGNOSTAKIS 1987).

Unverträgliche, vegetativ inkompatible Mycelien bilden an den Kontaktzonen Pyknidienreihen (=Barragen) und die Hyphenspitzen sterben ab (Bild 7) (ROANE 1986).

Da dieses VCG-System genetisch von mehreren Faktoren determiniert wird, ergibt sich eine Anzahl von zumindest 128 verschiedenen VCGs.

Die Verbreitung des Pilzes erfolgt durch Sporenverfrachtung durch Wind, Vögel, Insekten, aber auch der Transport von infiziertem Holz, Setzlingen und Edelreisern trägt wesentlich zur Ausbreitung bei.

1.1.3. *Hypovirulenz*

Neben den letalen v-Formen treten auch nonletale Formen auf, die wegen ihres oberflächlichen Wachstums lediglich Rindenwucherungen hervorrufen und demnach als hypovirulent (=hv) bezeichnet werden (Bild 8).

In Kultur wächst dieses Pilzstroma weiß bis gelblich und bildet nur wenige Pyknidien (Bild 9).

Die verminderte Pathogenität wird durch ein Doppelstrang-RNA-Virus (=ds RNA) bewirkt (NUSS 1992), welches bei entsprechender vegetativer Kompatibilität über die Hyphenanastomosen auf einen v-Stamm übertragen werden kann und diesen somit in eine hv-Form konvertiert (GRENTE 1965).

1.1.4. Bekämpfung

Die oben angeführte Konversionskapazität eröffnet die Möglichkeit der biologischen Bekämpfung des Kastanienrindenkrebse.

Umwandlungen können bei Vorhandensein geeigneter Konversionspartner gezielt im Labor durchgeführt werden.

Die konvertierten Pilze werden anschließend in ein spezielles Medium eingebettet und im Freiland in geeigneter Weise appliziert

Die Applikation eines ko-hv Pilzes um Nekrosen an befallenen Bäumen, führt nach Hyphenverschmelzung mit dem ansässigen v Pilz zu dessen Konvertierung, wodurch eine Vergrößerung der Nekrose verhindert, bzw. das Ausheilen der Wunde ermöglicht wird.

1.1.5. Begleitende phytosanitäre Maßnahmen

Um den Infektionsdruck zu vermindern, den Bäumen zu neuen Kräften zu verhelfen und das Verheilen der Läsionen zu erleichtern, sollten begleitende Schnittmaßnahmen getroffen werden:

- konsequentes, radikales Entfernen der abgestorbenen und unrettbar befallenen Äste, Ausschneiden der Nekrosen und Verbrennen möglichst vor Ort
- Arbeitsgeräte zwischen den Arbeitsgängen unbedingt desinfizieren (eintauchen, abwaschen mit 70%igem Alkohol und abflammen)
- Großflächig ausgeschnittene Nekrosen mit Baumwachs verschmieren um eine Besiedelung mit holzerstörenden Organismen zu verhindern, falls das Holz aufreißt .

Überdies gelten bereits gesetzliche Quarantänebestimmungen:

„Durch Quarantänemaßnahmen soll eine Verschleppung des Erregers in befallsfreie Gebiete verhindert werden. Das Pflanzenschutzgesetz enthält in der dzt. gültigen Fassung bereits die Pflanzenschutzrichtlinie der EU (RL 77/93/EWG), die nachstehende Regelung trifft:

- Kastanienholz darf – auch wenn es unbefallen ist – aus Befallsgebieten nur dann weggebracht werden, wenn es entrindet ist.
- Pflanzen von *Castanea* Mill. und *Quercus* L. von Baumschulen aus Befallsgebieten dürfen nur dann verkauft bzw. verbracht werden, wenn aml. festgestellt wurde, dass auf der Anbaufläche oder in deren unmittelbarer Umgebung seit Beginn der letzten abgeschlossenen Vegetationsperiode keine Anzeichen von *Cryphonectria parasitica* (Murr.) festgestellt wurden. Diese Maßnahme gilt auch für forstbetriebseigene Pflanzen, wenn Pflanzen aus den Beständen verbracht werden.“ (HALMSCHLAGER 1996)

1.2 Material und Methoden

1.2.1. Probennahme und Isolierung

Aus den Nekrosen werden Rindenstücke herausgeschnitten oder mit einem Korkbohrer entnommen und in Papiersäckchen bis zur ehebaldigsten Isolierung aufbewahrt.

Die Rindenstücke werden jeweils 30-90 sec. in 6%igem Wasserstoffperoxid und anschließend in 70%igem Alkohol desinfiziert.

Nach kurzer Trocknungszeit werden Mycelfäden und Sporen mit einem Skalpell entnommen und auf Tanninsäure-Malz-Agar (=TMA) oder Wasseragar ausgelegt.

Diese Medien eignen sich effektiv gegen bakterielle Kontamination.

Nach 3-5 Tagen im Dunkeln bei 25°C werden Hyphen auf Potato-Dextrose-Agar (=PDA) überimpft.

Ein selektives Medium zur Ausschaltung anderer Pilze gibt es nicht, was meist ein mehrmaliges Überimpfen zur Gewinnung von C.p.-Reinkulturen erfordert. Zur längerfristigen Aufbewahrung werden die Isolate auf Medium PDA in Schrägröhrchen überimpft, und nach 7-tägiger Bebrütungszeit mit 16-stündiger Fotoperiode im Kühlraum bei 3°C aufbewahrt.

1.2.2. VC-Testung

Zur Feststellung der Kompatibilität werden 3x3 mm große Agarstückchen mit Hyphenspitzen von aktiv wachsenden Mycelien gepaart, bei 25°C zuerst im Dunklen und nach 3-5 Tagen in einer 16- stündigen Photoperiode bebrütet.

Wegen der unterschiedlich starken Barragebildung einzelner Stämme erfolgten die Paarungen auf verschiedene Medien (PDA, TMA) und in verschiedenen Anordnungen.

Durch Zusatz des pH Indikators Bromkresolgrün zu PDA lassen sich bei Inkompatibilität an der Unterseite der Petrischalen dunkle Linien erkennen. Diese bilden sich, da in den Zonen absterbender Zellen kein Farbumschlag des Mediums nach Gelb erfolgt, wie dies bei Versauerung durch wachsendes Mycel der Fall ist (POWELL W.A., 1995) (Bild 10).

1.2.3. Konversion

Die Konversion im Labor vor Applikation im Freiland ist unbedingt erforderlich, da die sexuelle Reproduktionsfähigkeit zwischen verschiedenen Pilzstämmen genetisch nicht mit der vegetativen Kompatibilität korreliert. Daher würde das Ausbringen kompatibler hv-Wildstämme durch die Verbreitung genetischer Diversität zu einer Erhöhung der Anzahl der VC-Gruppen führen, was die Bekämpfung der Krankheit erheblich erschwert (LIU Y.-C. and MILGROOM M.G., 1996), wie man im Falle der USA sieht, wo man bisher mehr als 90 verschiedene VCG isoliert hat.

Die Übertragung des Hv- Faktors auf virulente Formen erfolgt über Hyphenanastomosen, die nur zwischen kompatiblen Mycelien stabil sind (NEWHOUSE J.R. and MacDONALD W.L., 1991).

Vereinzelt findet eine Übertragung auch VCG- übergreifend statt. (LIU Y.-C. and MILGROOM M.G., 1996)

Die Paarungen der v- und hv- Inokula werden in derselben Weise wie die vc-Testungen vorgenommen, aber von Anfang an eine 16- stündigen Photoperiode in weißem, fluoreszierendem Licht ausgesetzt. (ANAGNOSTAKIS S.L. and DAY P.R., 1979)

Nach 5-8 Tagen lassen sich morphologische Veränderungen am virulenten Mycel feststellen. Aus diesen Teilen werden Agarstückchen für nachfolgende Testungen überimpft (Bild 11).

Die Konversion gelingt besser, je näher die Mycelstückchen aneinander gerückt sind, vor allem bei VC-Ungleichheit (Bild 12).

1.2.4. Herstellung der Inokulate

Die Pilze für Vergleichsbeimpfungen und die konvertierten Pilze für die Läsionsbehandlungen werden auf Malzagar mit 0,5% Tanninsäure gezüchtet, um das Wachstumsmilieu an in vivo- Verhältnisse anzupassen.

Petrischalen von 9cm Durchmesser und 20ml TMA werden mit je 4 Mycelstückchen beimpft und nach 4 Tagen Inkubation im Dunklen bei 25°C mindestens 10 Tage auf der Laborbank ohne direktes Sonnenlicht wachsen gelassen.

Für die großflächige Anwendung wurde folgende Inokulatherstellung entwickelt:

250ml Erlenmeyerkolben, befüllt mit 170ml PD + 0,2% Tanninsäure, werden mit ca. 5cm² fein zerschnittenem Pilzmycel beimpft und verweilen 14 Tage am Schüttler mit 100 UpM und einer Photoperiode von 16 Stunden.

Es bilden sich massenhaft Mycelballen, die schonend mit einem Mixer zerkleinert und in die einfache Menge 0,4% igen Agar eingerührt werden. Erst nach einer Ruhephase von 1-2 Tagen kommt dieser visköse Pilzagar zur Anwendung.

1.2.5. Inokulationsmodi

Je nach Lage und Größe der Läsion und Dicke der Rinde wurden verschiedene Applikationsformen angewendet.

Ausstechen von 0,5- 1cm großen Löchern mit einem Korkbohrer in einem Abstand von 3-5cm rund um die Nekrose, welche mit einem passend großen Mycelstück von Agarplatten beimpft und mit den ausgestochenen Scheiben wieder verschlossen werden, was eine Austrocknung verhindern soll. Zusätzlich wurden in einigen Fällen die Beimpfungsstellen mit Baumwachs verschmiert (Bild 13).

Für die Herstellung von Bohrlöchern an alten Bäumen mit dicker Rinde kommt ein Akku-Bohrer zum Einsatz.

Rund um die Läsionen werden Kerben geritzt, mit Pilzagar gefüllt und mit den ausgeschnittenen Rindenstreifen verschlossen, die mit Tesakrepp befestigt werden.

Die Frage nach einer möglichst einfachen aber effizienten Applikation führte nach etlichen Versuchen zu folgendem Ausbringungsmodus: stark nekrotisches Gewebe wird entfernt, um einerseits die Applikation und andererseits die Umwallung mit Wundgewebe zu erleichtern.

Rund um die Läsion werden möglichst glatte Schnitte bzw. Kerben gesetzt, nach oben und unten hin spitz zulaufend. Die Rinde wird mit einem Spatel leicht abgehoben und mit dickflüssigem Pilzagar unterspritzt, der außerdem über die gesamte Läsion ausgebracht wird. Die anschließende Umwicklung mit Zellstoff wird mit Tesakrepp fixiert und kann nach 2-3 Wochen wieder abgenommen werden (Bild 14-17).

1.2.6. Verifizierung der Konversionen

Die Beobachtung phänotypischer Veränderungen werden 5-8 Tage nach Inkubation auf PDA bei 25°C mit einer 16- stündigen Photoperiode vorgenommen. Eine erfolgte Konversion manifestiert sich in einer veränderten Morphologie, verminderten Pigmentation und Sporulation und Verlangsamung der Wachstumsgeschwindigkeit.

Solche phänotypisch veränderten Isolate werden mit v- Stämme derselben VCG gepaart und beobachtet, ob sie an diesen ebenfalls Veränderungen bewirken, was zutreffendenfalls ihre Konversionskapazität bestätigt

Die Virulenz wird an Kastanienstecken und im Freiland durch Vergleichsinokulationen getestet:

Kastanienstecken werden mit dem v-, hv- Ausgangsstamm und dem ko- Isolat inokuliert und die Läsionsbildungen verglichen. Die Auswertung zeigt, daß die Pathogenität nicht vorrangig durch die Größe sondern durch die Tiefe der Mycelausbreitung zu bewerten ist (Bild 18 - 21).

Um den Schaden an Kastanienbäumen nicht unnötig zu vergrößern werden Vergleichsbeimpfungen mit v- und ko- Isolaten an den Astenden oder an verzichtbaren Ästen vorgenommen, die nach dem Absterben sofort entfernt werden.

Selbstverständlich werden die Isolate nur im Ursprungsgebiet ausgebracht, um nicht zur Verbreitung der VCG beizutragen.

1.3 Ergebnisse

1.3.1. Kartierung

1.3.1.1 Probennahme

Als Vorlage für die großflächige Kartierung dienen Unterlagen über die Verbreitungsgebiete der Edelkastanie aufgrund der „österreich. Waldinventur“ (ÖWI 92-96) der Forstlichen Bundesversuchsanstalt.

Die Verbreitung des C.p.-Befalls wird in die „Österr. Karte 1:25.000“ (ÖK 25V) des BA für Eich- u. Vermessungswesen eingetragen.

Bislang wurden mehr als 1.000 Proben aus annähernd 500 Nekrosen von Standorten in 22 Gebieten isoliert.

Sowohl von stark befallenen Bäumen als auch aus älteren, größeren Nekrosen wurden meist mehrere Proben genommen, da es u.U. vorkommt, dass Stämme zweier verschiedener VC-Gruppen in unmittelbarer Nachbarschaft an einem Baum und sogar in derselben Nekrose zu finden sind.

Die Benennung der Isolate erfolgt gemäß den Eintragungen der Baumstandorte in die ÖK 25V: Karten Nr./Raster Nr.-Länge-Breite/fortlaufende Nr.

Tabelle 1: Probennahmegebiete

	Gebiete	Standorte	Anzahl der beprobten Nekrosen
Nö	1. Bad Vöslau	Gainfarn Haidlhof-Merkenstein	6
	2. Gloggnitz	Ternitz Gloggnitz Buchbach Saloder Pottschach Gloggnitz	10
NÖRDL. BGLD.	3. Rosalia	Forchtenstein Wiesen Rosalia Bad Sauerbrunn	85
	4. Rohrbach	Rohrbach Marz Loipersbach	18
Mittl. Bgld	5. Sieggraben	Sieggraben Kalkgruben Lackenbach Ritzing	4
	6. Mannersdorf	Rattersdorf	22

		Mannersdorf	
		Liebing	
	7. Lockenhaus	Lockenhaus	24
	8. Rechnitz	Rechnitz	16
Südost-Stmk	9. Stubenberg	Stubenberg am See	6
		Herberstein	
		Kaindorf	
		Pöllau	
		Schielleiten	
		Buchberg	
	10. Fürstenfeld	Fürstenfeld	19
	11. Graz	Graz	22
	12. Heiligenkreuz	Allerheiligen	10
		Wildon	
		Mellach	
		Heiligenkreuz	
Südwest-Stmk	13. Stainz	Stainz	28
		Bad Gams	
		Greim	
	14. Trahütten	Trahütten	7
	15. Deutschlandsberg	Deutschlandsberg	36
	16. Riemerberg	Riemerberg	32
	17. Kitzack	Kitzack	31
		Sausal	
	18. St. Nikolai	Petzles	20
		St. Nikolai	
		Schmalegg	
Süd-Stmk	19. Spielfeld	Gamlitz	14
		Spielfeld	
	20. Leutschach	Krebskogel	16
		Leutschach	
		Langegg	
	21. Arnfels	Arnfels	36
		Pronegg	
		Remsnigg	
	22. Eibiswald	Schwabenberg	9
		Limberg	
		Eibiswald	
GESAMT:	22	57	471

1.3.1.2 Einordnung in das EU-VC-System

Die Isolate eines Standortes werden zuerst untereinander getestet, da die Wahrscheinlichkeit groß ist, dass sie derselben VCG angehören und sich dadurch die Zahl der Testungen gegen die EU-VC-Testerstämme drastisch verringert.

Diese Testerstämme EU-1 bis EU-31 sind schweizer und italienische Isolate, die von Paolo Cortesi (Universität Milano, Italy) bestimmt und im Rahmen der COST-G4-Aktion „Multidisciplinary Chestnut Research“ den Kooperationspartnern zur Verfügung gestellt wurden.

Dzt. liegt der Stand bei 15 detektierten VC-Gruppen, wobei 11 davon dem EU-VC-System 1-31 zugeordnet werden konnten und zwar:

EU-1 / 2 / 3 / 11 / 12 / 13 / 15 / 17 / 20 / 22 / 28.

4 Gruppen konnten nicht in das System eingegliedert werden, die im Folgenden mit „nd“ für „nicht determiniert“ bezeichnet werden.

Das Gesamtvorkommen ergibt folgende Verteilung der EU-VCG:

Tabelle 2: Gesamtaufkommen der EU-VC-Gruppen

EU-VC- Gruppe	Anzahl der Standorte	Anzahl der beprobten Läsionen	%
EU-17	15	208	44,1
EU-13	13	178	37,7
Sonstige gesamt	26	86	18,2
Sonstige (Detail):			
nd 1-4	8	23	4,9
EU-01	2	5	1,1
EU-02	4	15	3,2
EU-03	1	2	0,4
EU-11	2	4	0,8
EU-12	4	15	3,2
EU-15	1	7	1,5
EU-20	2	8	1,7
EU-22	1	3	0,6
EU-28	1	4	0,8

Die Testung und Einordnung in das VC-System ist nicht immer klar und eindeutig und erfordert oft mehrmalige Wiederholungen und Gegenproben.

Die Barragenbildung ist äußerst unterschiedlich stark ausgebildet. Speziell die Zuordnung zu EU-11 und EU-13 erweist sich als diffizil, da sich diese beiden Testerstämme auch gegeneinander nur schwach abgrenzen.

Paart man Isolate innerhalb einer VCG, treten mitunter Unverträglichkeiten auf, obwohl eindeutige Kompatibilität mit demselben Testerstamm vorliegt.

Andererseits lassen sich aber auch VCG-übergreifende Verträglichkeiten einzelner Isolate feststellen, die eindeutig einer über den EU-Testerstamm definierten VCG zugeordnet werden konnten.

Cortesi (CORTESI 1996) bezeichnet diese, durch „Brückenisolate“ verbundene, VCGs als „vegetative Kompatibilitäts-cluster“, führt diese Erscheinung aber auf unsensible Untersuchungsmethoden zurück, obwohl mehrfach davon berichtet wird, z.B. Bazzigher 1981, oder Kuhlmann 1984.

Trotzdem liegt die Vermutung nahe, dass die vegetative Kompatibilität kein starres System ist, sondern fließende Übergänge hat.

1.3.1.3 Verteilung der VC-Gruppen

Von den 15 identifizierten VCG dominieren EU-13 und EU-17.

Sie umfassen 80% aller Isolate und zeigen auch die weiteste Verbreitung:

EU-13 in 8 Gebieten, EU-17 in 10 Gebieten, davon treten in 6 Gebieten beide Gruppen zusammen auf.

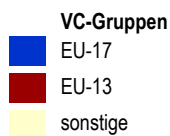
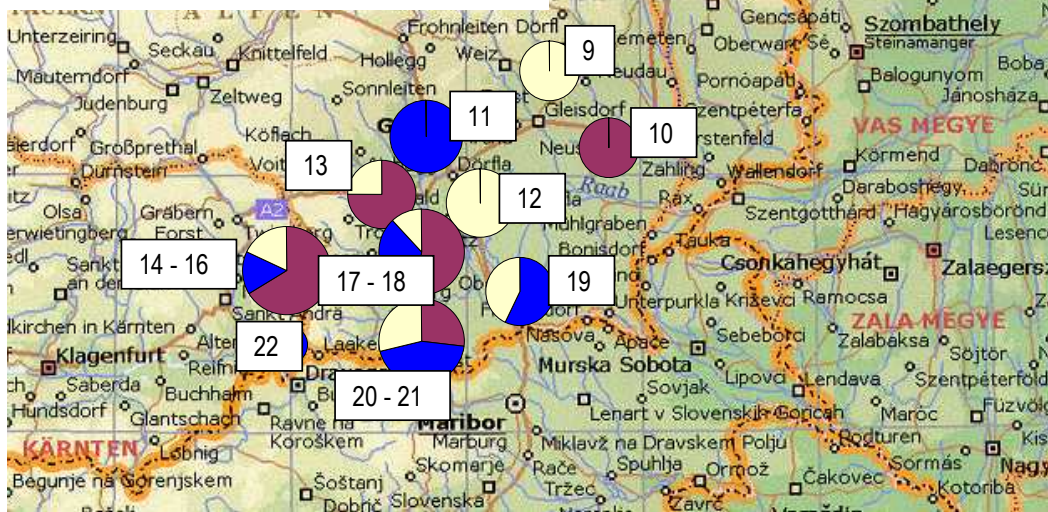
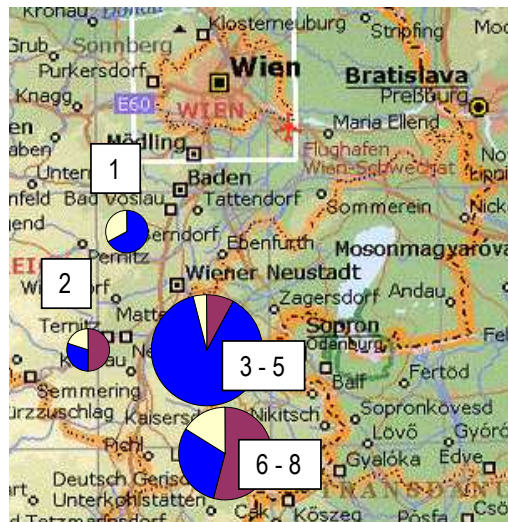
Die verbleibenden 20% verteilen sich ziemlich gleichmäßig auf 13 Gruppen, die sich zusammenhanglos über das gesamte Verbreitungsgebiet verteilen, was möglicherweise auf mehrfache Einschleppung zurückzuführen ist.

Tabelle 3: Verteilung der EU-VC-Gruppen in den Beprobungsgebieten

Gebiete	EU-VC-Gruppe	Anzahl der beprobten Läsionen		%
1. Bad Vöslau	nd	4	6	67
	EU-17	2		33
2. Gloggnitz	nd	2	10	20
	EU-13	5		50
	EU-17	3		30
3. Rosalia	EU-13	6	85	7
	EU-17	79		93
4. Rohrbach	EU-01	3	18	17
	EU-17	15		83
5. Siegggraben	EU-01	2	4	50
	EU-13	2		50
6. Mannersdorf	EU-13	10	22	46
	EU-17	8		36
	EU-28	4		18
7. Lockenhaus	nd	3	24	13
	EU-13	14		58
	EU-17	7		29
8. Rechnitz	EU-13	11	16	69
	EU-17	5		31
9. Stubenberg	nd	2	6	33
	EU-12	4		67
10. Fürstenfeld	EU-13	19	19	100
11. Graz	EU-17	22	22	100
12. Heiligenkreuz	EU-02	4	10	40
	EU-12	3		30
	EU-22	3		30
13. Stainz	EU-13	21	28	75
	EU-15	7		25
14. Trahütten	nd	3	7	43
	EU-03	2		28,5
	EU-11	2		28,5
15. Deutschlandsberg	EU-13	24	36	67
	EU-17	12		33
16. Riemerberg	EU-11	2	32	6
	EU-13	25		78
	EU-20	5		16
17. Kitzreck	nd	4	31	13
	EU-13	18		58
	EU-17	9		29
18. St. Nikolai	EU-02	2	20	10
	EU-13	9		45
	EU-17	9		45
19. Spielfeld	EU-02	6	14	43
	EU-17	8		57
20. Leutschach	nd	3	16	19
	EU-02	2		12
	EU-17	11		69
21. Arnfels	nd	2	36	6
	EU-12	5		14
	EU-13	14		39
	EU-17	12		33
	EU-20	3		8
22. Eibiswald	EU-12	3	9	33
	EU-17	6		67

Gebiet	EU-VC-Gruppe	Anzahl der beprobten Läsionen	%
1. Bad Vöslau	sonstige	4	67
	EU-17	2	33
2. Gloggnitz	sonstige	2	20
	EU-13	5	50
	EU-17	3	30
3. Rosalia, Rohrbach, Sieggraben	sonstige	5	4
	EU-13	8	8
	EU-17	94	88
6. Mannersdorf, Lockenhaus, Rechnitz	sonstige	7	11
	EU-13	35	57
9. Stubenberg	sonstige	6	100
	EU-13	19	100
11. Graz	EU-17	22	100
12. Heiligenkreuz	sonstige	10	100
13. Stainz	EU-13	21	75
14. Trahütten, Deutschlandsberg, Riemerberg	sonstige	7	25
	EU-13	49	66
17. Kitzceck, St. Nikolai	sonstige	6	12
	EU-13	27	53
19. Spielfeld	EU-17	18	35
	sonstige	6	43
20. Leutschach, Arnfels	EU-17	8	57
	sonstige	15	29
	EU-13	14	27
22. Eibiswald	EU-17	23	44
	sonstige	3	33
	EU-17	6	67

Verteilung der VC-Gruppen zusammengefasst zu Großraumgebiete.



Anzahl der beprobten Läsionen



1.3.2. Hypovirulenz

1.3.2.1 Natürliche einheimische Vorkommen

In einigen Ländern - wie z.B. Italien, Schweiz, Frankreich, Ungarn – ist das Auftreten natürlicher hv-Pilze keine Seltenheit.

In Österreich hingegen konnte bisher kein Vorkommen festgestellt werden, wiewohl schon einige hv-erscheinende Nekrosen, mit dicker Wundkallusbildung gesichtet und beprobt wurden.

Die einschlägigen Testungen konnten eine eindeutige Hypovirulenz (HV) jedoch nicht bestätigen, höchstens eine leicht verringerte Virulenz des betreffenden C.p.-Stammes, welche für einige Zeit Abwehrreaktionen des Baumes zuläßt.

In einigen Fällen ist die scheinbare hv-Nekrose auf Eindämmung von C.p. durch antagonistische Pilze zurückzuführen.

Selbst bei bestätigter HV würde es sich primär um eine v-Infektion handeln, die erst nachfolgend konvertiert wurde.

Eine primäre hv-Infektion zeigt nämlich ein völlig anderes, unauffälliges Bild und ist daher auch schwer aufzufinden: keine Verfärbungen, keine Rindeneinsenkungen und Risse, vielmehr polsterartige Aufwölbungen meist in Rechteckform mit schuppenartigem Abblättern der Rinde (Bild 8).

Aufgrund der geringen Sporulation hinkt die Verbreitung von hv-Pilzen der gegenüber v-Pilzen stark nach.

Dennoch darf man hoffen, dass sich die HV aus ungarischen Grenzgebieten (Sopron, Agfalva, Güns, Cák) in absehbarer Zeit weiter nach Österreich ausbreitet.

Angeblieh soll die HV auch auf slowenischer Seite bereits Fuß gefasst haben.

Die wirklich vielversprechenden Isolate „Tr5aw, Truw und Tr5abw“ aus Forchtenstein stammen von einem ca. 10 jährigen, 5m hohen Stockausschlag mit einem Stammdurchmesser von 16cm in einer dichten Hecke am Rand eines Kastanienhaines. Die Krone war dicht belaubt, obwohl sich die Läsion um den halben Stamm von 40cm bis in eine Höhe von 1m erstreckte. Die Größe und das stark nekrotische Gewebe der Läsion lassen ein Alter von mindestens 4 Jahren vermuten, einer Zeit, innerhalb der die Bäume üblicherweise schon abgestorben sind. Allerdings war die Läsion von dicken Wulsten durchzogen. Von 10 entnommenen Proben bildeten die 3 o.g. weiße Kulturen. Bei den einschlägigen HV-Tests verhielten sie sich äußerst instabil, sodaß aus dieser Sicht keine eindeutige HV zuerkannt werden kann. Leider fielen der Baum und die in-vivo-Versuchsinokulationen einer Flurbereinigung zum Opfer.

1.3.2.2 Konversion

Hypovirulenz ist offensichtlich nicht nur durch das Vorhandensein einer ds-RNA determiniert. Der Übergang von v zu hv ist fließend und auch die HV ist verschieden stark ausgeprägt.

Je hypovirulenter der Stamm, desto schwächer ist er im Wachstum.

Man sollte daher zur Konversion (KO) Isolate finden, die zwar hv genug sind, ein Absterben der Bäume zu verhindern, aber nicht zu schwach, um sich gegenüber dem v-Stamm behaupten zu können.

Um die Seuche erfolgreich zu bekämpfen ist es überdies erforderlich, möglichst alle vorkommenden VCG zu konvertieren.

Allerdings existieren europaweit nicht für jede VCG passende hv-Isolate, was vielfältige VCG-übergreifende Konversionsversuche mit unsicherem Ausgang nötig macht.

Aus Ungarn, Frankreich und der Schweiz wurden einige hv-Isolate zur Verfügung gestellt, mit denen 5 österreichische VCG - EU 1/2/12/13/17 - von insgesamt 15 VCG erfolgreich konvertiert werden konnten:

konvertierte Gruppe	kompatibler Konversionspartner	VCG-übergreifender Konversionspartner
EU-1	1-117 D (Frankreich)	IHB-2 (Ungarn) R 11 (Ungarn) R 11 (Ungarn)
EU-2	1-83 A (Frankreich)	
EU-12		IHB-2 (Ungarn)
EU-13	M 773 (Schweiz) C 2 (Ungarn)	
EU-17	IHB 2 (Ungarn) B 301/90 (Schweiz)	Euro 7 (Italien) R 5 (Ungarn) R 6 (Ungarn) S 3 (Ungarn)

Erfreulicherweise sind unter den konvertierten Gruppen auch die 2 am häufigsten vorkommenden VCG: EU-13 und EU-17.

Der ungarische Stamm IHB-2 zeigt zwar nur mäßige hv, aber große Konversionskapazität, indem er auch 2 inkompatible Gruppen konvertiert.

Hingegen konvertieren stark hypovirulente Isolate selbst innerhalb der kompatiblen VCG nicht immer problemlos, was möglicherweise auf das stark eingeschränkte Wachstum zurückzuführen ist.

Nach erfolgreicher KO werden daher die ko-hv-Isolate für weitere KO-Versuche verwendet.

In einigen wenigen Fällen kommt es bei konvertierten Stämmen nach einigen Überimpfungen zu einem Verlust der HV, was durch ein verändertes morphologisches Erscheinungsbild augenfällig wird (Bild 22).

Bei einigen mißlungenen Freilandapplikationen war dies auch der Grund für die Erfolglosigkeit der Behandlung.

1.3.2.3 Ausbreitung von künstlich ausgebrachter Hypovirulenz

Eine Ausbreitung von Hypovirulenz ist nach wie vor nicht zu beobachten. Eine große Anzahl von VC-Gruppen innerhalb eines Gebietes als Behinderung für die Verbreitung kann allein nicht der Grund sein, da auch im Gebiet von Forchtenstein mit nur einer VC-Gruppe keinerlei Ausbreitung festzustellen ist. Neuinfektionen treten sogar in geringem Abstand zu äußerst erfolgreich verlaufenden Behandlungen auf.

Möglicherweise liegt es doch an der Art des Hypovirus, in welchen Gegenden er sich durchsetzen kann. Offensichtlich besteht sogar die Gefahr des Nichtverbreitens des Hypovirus innerhalb des Myceliums, wie an einer vorbeugend behandelten Schnittstelle zu bemerken war. Um die behandelte Stelle bildete sich Wundkallus, dahinter stark nekrotisches Gewebe, aus dem auch der virulente Pilz isoliert werden konnte.

Überraschend viele und kräftige Kalluswucherungen zeigen sich an den Bäumen im Versuchsgebiet Arnfels. Behandelte und auch nicht behandelte Nekrosen zeigen starke Wundverschlüsse, sodaß Hoffnung auf Selbstverbreitung der hv-Stämme aufkam.

Diese Befallstellen sind allerdings mit vielen anderen Pilzen vergesellschaftet, sodaß bisher noch keine Reinkultur von C-p. – weder hv noch v – isoliert werden konnte, und sich der Verdacht aufdrängt, daß C.p. eher durch diese anderen Pilze eingedämmt wurden.

Anders im Raum Forchtenstein: In enger Nachbarschaft von bereits behandelten Läsionen, entstanden vermeintlich hv-Nekrosen, aus welchen aber der v-Stamm isoliert werden konnte. Die starke Abwehrreaktion des Baumes, die zuerst eine eigenständige Verbreitung des applizierten Pilzes vermuten ließ, könnte hypothetisch auch wegen einer gewissen „Sensibilisierung“ durch die vorangegangene Behandlung ermöglicht worden sein.

Es ist nicht anzunehmen, dass die Verbreitung der künstlich ausgebrachten HV schneller vor sich geht als die der natürlichen.

Daher ist in den nächsten Jahren durchaus ein vermehrtes Auftreten von HV zu erwarten. Eine Beschleunigung ließe sich eventuell erreichen einerseits durch großflächiges Ausbringen, andererseits durch Auswahl von Konvertanten, die ausreichend Pyknidien bilden, um eine weitreichende Verbreitung über Sporen zu gewährleisten.

1.3.2.4 Vergleichsinokulationen

Die Bestimmung der effizientesten Konvertanten durch vergleichende Inokulationen, ist Aufgabengebiet von Kooperationspartner Hygienicum. Zur vergleichenden Testung wurden folgende Konvertanten und die zugehörigen v- und hv-Isolate zur Verfügung gestellt:

<u>EU – VCG</u>	<u>Konversionspartner</u>
EU-12	IHB 2 (H)
EU-13	M 773 (CH)
EU-13	C 2 (H)
EU-17	R 5 (H)
EU-17	R 6 (H)
EU-17	S 3 (H)
EU-17	IHB 2 (H)
EU-17	Euro 7 (I)

An den selbst durchgeführten Applikationen in vivo an den Standorten Rohrbach, Rosalia und Loipersbach bestätigte sich erneut, daß die Beurteilung von Hypovirulenz aufgrund der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Läsion nicht in jedem Fall aussagekräftig ist, da ja nicht die Größe, sondern die Tiefe der Nekrose ausschlaggebend für den Grad der Pathogenität ist.

Weiters beeinflussen viele Faktoren, wie Wetterverhältnisse, Ausbringungszeitpunkt, Alter und Zustand des Baumes, Standort, die anfängliche Ausbreitung.

Erst die Beobachtung der Art der Ausbildung der Nekrose, und letztendlich des jährlichen Blattaustriebes liefern schlüssige Beweise für die Effizienz der Konvertanten.

1.3.3. **Applikationen**

1.3.3.1 Läsionsbehandlungen

Im Laufe der gesamten Projektlaufzeit wurden 91 Nekrosebehandlungen an 14 Standorten (Bgl: Forchtenstein, Rosalia, Rohrbach, Loipersdorf, Wiesen; südl.Stmk: Riemerberg, Kitzcek, Pronegg, Arnfels und vereinzelt im Kartierungsgebiet) vorgenommen.

	Anzahl d. behandelten Nekrosen	%
Vollständig geheilt	41	45
Nekrosenbildung eingedämmt	18	20
erfolglose Behandlung	32	35

Vollständig geheilte Läsionen zeigen keinerlei Anzeichen eines v-Pilz-Wachstums mehr, gute Wundkallusbildung (bei sehr großen Läsionen u.U. noch nicht vollständig zugeheilt) und der betroffene Baum treibt kräftig aus (Bild 23 + 24).

In 18 Fällen konnte die Läsionsbildung deutlich eingedämmt werden, der Baum bzw. Ast zeigt keine Welkeerscheinungen, aber an der Nekrosenspitze ist ein Durchbrechen des v-Pilzes zu erkennen.

Durch geeignete Nachbehandlungen ist aber auch in diesen Fällen vollständige Ausheilung möglich.

Zu den 32 erfolglos eingestuften Behandlungen mussten auch diejenigen gezählt werden, welche voreiligen Rodungsmaßnahmen zum Opfer fielen auch wenn sie u.U. rettbar gewesen wären.

Erfolglos bleibt die Anwendung jedenfalls bei zu weit fortgeschrittenen Läsionen, die den Stamm/Ast um mehr als 2/3 umfassen und an Stämmen/Ästen unter ca. 5 cm Durchmesser.

Weitere Gründe für das Mißlingen sind:

- Austrocknung oder Auswaschung des Inokulums
- Neuinfektion mit einem Pilz einer anderen VCG
- Verlust der Hypovirulenz

Sorgfältige Applikation und Beimpfung mit einem Konversionsgemisch können derartige Fehlschläge hintanhalten.

Regelmäßige Kontrollen ermöglichen rechtzeitig rettende Nachbehandlungen.

1.3.3.2 Vorbeugende Behandlungen

Die vorbeugend behandelten Schnittflächen von Aufastungen, sanitären Schnittmaßnahmen und Veredelungen an 12 Versuchsbäumen zeigten durchwegs guten Wundverschluß und haben direkte Angriffe mit sporenhaltiger Suspension infektionslos überstanden (Bild 25 + 26).

An einer Veredelungsstelle ist das Edelreis zwar vertrocknet, jedoch entwickelte sich ein prächtiger gesunder Neuaustrieb (Bild 27 + 28).

An Rindenkrebs erkrankte Bäume bringen zumeist eine Vielzahl an Stockausschlägen hervor. Auch nach Rodung ist die Hochzucht einzelner Stämme fast aussichtslos, da die Basen total verseucht sind. Inokulationen an einzelnen Nekrosen an den Stammgründen sind technisch meist unmöglich, aufgrund der Menge und Schiefwüchsen und Stockausschlägen.

Die Stockausschläge wurden so tief wie möglich über dem Boden abgeschnitten und komplett mit dünnflüssigem hv-Pilz-Agar bedeckt.

Die Anzahl der Versuche wurde in diesen Fällen durch die quantitative Herstellung des Inokulums auf 5 limitiert.

Eine andere Maßnahme ist der Versuch, die Rodungsflächen gänzlich mit Erde zu bedecken. Allerdings darf nicht zu hoch angehäufelt werden, um den Stamm nicht zu schädigen.

Beide Maßnahmen verliefen aussichtsreich. Die neuauftkommenden Stockausschläge zeigten keine Infektionen an den Basen.

Auch die angehäufelten, bereits infizierten Stammgründe zeigten ein Stoppen des Pilzwachstums und guten Wundverschluß (Bild 29 + 30).

1.4 LITERATUR

ANAGNOSTAKIS, S.L. 1987. Chestnut Blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 29:23-37

ANAGNOSTAKIS, S.L. and P.R. DAY. 1979. Hypovirulence Conversion in *Endothia parasitica*. *Phytopathology* 69:1226-1229.

BAZZIGHER, G., E. KANZLER and T. KÜBLER. 1981. Irreversible Pathogenitätsverminderung bei *Endothia parasitica* durch übertragbare Hypovirulenz. *Eur J For Path* 11:358-369.

- BRANDENBURGER, W. 1985. Parasitische Pilze an Gefäßpflanzen in Europa, G.Fischer Verlag.
- CORTESI, P. et al. 1996. Distribution and diversity of vegetative compatibility types in subpopulations of *Cryphonectria parasitica* in Italy. Mycol.Res.100(9): 1087-1093
- GRENTE, J. 1965. Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du châtaignier. C.R.Hebd.Seances Acad.Agr.France 51:1033-1037
- HALMSCHLAGER, E. 1996. Der Kastanienrindenkrebs in Österreich. Österr. Forstzeitung 7: 47-49
- KUHLMAN, E.G. and H. BHATTACHARYYA. 1984. Vegetative Compatibility and Hypovirulence Conversion among naturally occurring Isolates of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology 74:659-664.
- LIU Y.-C. and MIGROOM M.G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology 86:79-86.
- NEWHOUSE J.R. and MacDONALD W.L. 1991. The ultrastructure of hyphal anastomoses between vegetatively compatible and incompatible virulent and hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. Can. J. Bot. 69:602- 614
- NUSS, D.L. 1992. Biological control of Chestnut blight: an Example of Virus-Mediated Attenuation of Fungal Pathogenesis. Microbiological Reviews 56, 561-576.
- POWELL W.A. 1995. Vegetative incompatibility and mycelial death of *Cryphonectria parasitica* detected by a ph indicator. Mycologia 87:738- 741
- ROANE, M.K., G.J. GRIFFIN and J.R. ELKINS. 1986. Chestnut blight, other *Endothia* diseases and the genus *Endothia*. APS Press
- WRONSKI R., KUDERA U., and WILHELM E. 1997. Characterization of *Cryphonectria parasitica* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) technique and conventional methods. Eur. J. For. Path. 27:95-103

1.5 Bildteil



Bild 1



Bild 2



Bild 3



Bild 4



Bild 5

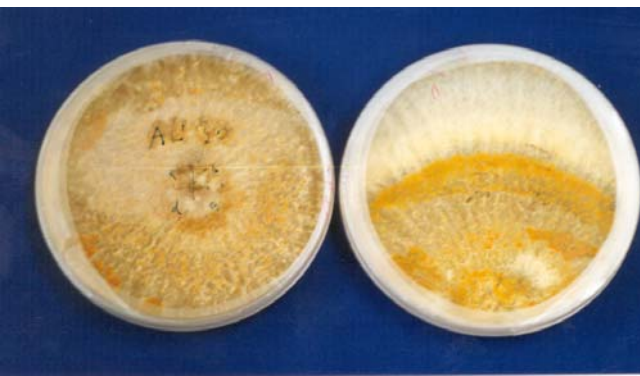


Bild 6

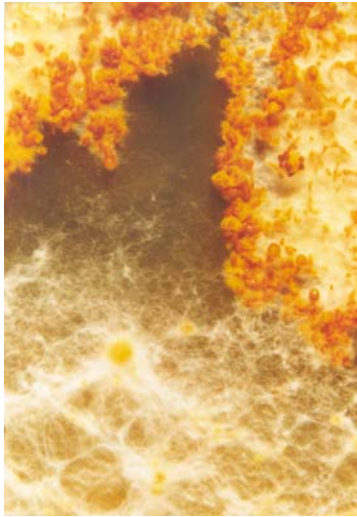


Bild 7



Bild 8



Bild 9

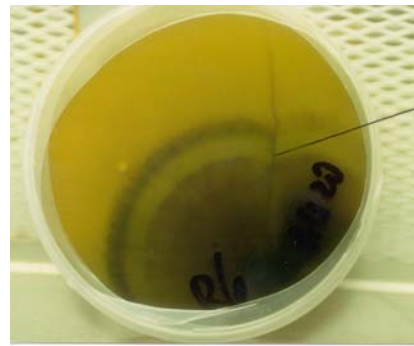


Bild 10

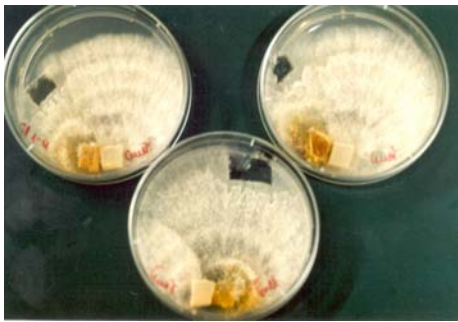


Bild 11



Bild 12



Bild 13



Bild 14



Bild 15



Bild 16



Bild 17



Bild 18



Bild 19



Bild 20



Bild 21



Bild 22



Bild 23



Bild 24



Bild 25



Bild 26



Bild 27



Bild 28



Bild 29



Bild 30

2 BAUMPHYSIOLOGISCHE REAKTIONEN

2.1 EINLEITUNG

Die Borke erfüllt essentielle Funktionen in Pflanzen: sie schützt das Kambium vor mechanischen Einflüssen von außen, verringert die Transpiration des Pflanzengewebes. Wunden in der Borke gefährden diese Funktionen, weiters können Wunden Eindringpforten für Mikroorganismen sein. Deshalb haben Pflanzen Mechanismen entwickelt, Wunden rasch und effizient wieder zu verschließen und ein mögliches Pathogenwachstum an der Verletzungsstelle zu minimieren.

Der Wundverschluß bei Bäumen erfolgt generell durch Kallusbildung und durch die Formierung eines neuen vaskulären Kambiums (Kramer und Kozlowski 1979). Daraus resultiert eine Überwallung der Wunde. Wichtige physiologische Vorgänge sind dabei die Anregung von Kambialzellen zur Teilung und Lignifizierung bzw. Suberinisierung von Zellwänden. Die Geschwindigkeit und Effizienz von Wundverschlüssen ist sowohl von der Baumart als auch vom Ernährungszustand des Baumes abhängig (Gallagher und Syndor 1983, Martin und Syndor 1987, Shigo 1990).

Die intakte Borke von Bäumen stellt eine fast unüberwindliche Barriere für Pathogene dar. Verletzungen schaffen, wie eingangs bereits erwähnt, Eindringpforten für Fäulniserreger und Wundparasiten. Der Baum wehrt sich dagegen durch Abschottung der Wunde. Das CODIT Modell (Compartmentalization of Decay of Trees, Shigo 1990) beschreibt den Aufbau von Barrierzonen, die die Ausbreitung von Fäulnisregenern im Holz limitieren. Die Barrierzonen sind dynamische Gebilde, erkennbar durch Verfärbung des Holzes, die durch Einlagerung von phenolischen Stoffen entstehen.

Histologische Untersuchungen über die Abwehrmechanismen von Edelkastanie gegen *Cryphonectria parasitica* zeigten, dass das Pathogen über Wunden der Borke eindringt und sich zuerst in der Rinde rasch seitwärts ausbreitet und erst dann nach innen vordringt, wobei letztlich das Kambium geschädigt wird und abstirbt. Der Aufbau eines Wundperiderms nach Verletzung und Pilzinokulation und das Überwinden dieser Barriere durch virulente *Cryphonectria parasitica* wurde bei histopathologischen Untersuchungen beschrieben (Hebard et al. 1984).

Über die molekularen Vorgänge, welche die histologischen und biochemischen Reaktionen in der Borke nach Verwundung steuern, ist nur wenig bekannt. Die meisten Daten stammen aus histochemischen Untersuchungen. Vance et al. 1980 beschreibt die Induktion von Enzymen zur Produktion von Polyphenolen, ebenso wurden Veränderungen des Fettsäuremetabolismus zur Produktion von Suberin und Wachsen beobachtet (Kolattukudy 1984).

Eine weitere wichtige Komponente der Pathogenabwehr von Pflanzen sind Pathogen Related Proteins (PR-Proteine) (Linthorst 1991). PR-Proteine werden definiert als Proteine, die nach Befall durch ein inkompatibles Pathogen in der Pflanze angehäuft werden. Zu dieser Gruppe gehören Chitinasen, β -1,3-Glucanasen, Peroxidasen und Proteine mit unbekannter biochemischer Aktivität (Ward et al. 1991). PR-Proteine können intrazellulär und interzellulär angehäuft werden. Die Akkumulation von PR-Proteinen in der Pflanze tritt bei biotischen als auch abiotischen Streßsituationen auf (Kärenlampi et al. 1994, Linthorst 1991).

Die Untersuchungen über Veränderungen der Protein- und Genexpression nach Verwundung und Pathogenbefall in Bäumen wurden meist an Blättern und Nadeln durchgeführt. So wurde gezeigt, dass PR-Proteine wie Chitinasen und β -1,3-Glucanasen auch von Bäumen in Blättern und in der Borke nach Verwundung und Pathogenbefall gebildet werden (Parsons et al. 1989, Clarke et al. 1994, Thamarus und Furnier 1998, Schafleitner und Wilhelm 1997, Farmer und Ryan 1992).

Offensichtlich ist der Pathogenrespons bei höheren Pflanzen hochkonserviert. Es wurde gezeigt, dass einige cDNA Sonden für PR-Proteingene isoliert aus Tabak auch mit Edelkastanien PR-Proteingenen hybridieren (Schafleitner et al. 1997). Untersuchungen der PR-Proteinexpression können daher mit heterologen Sonden durchgeführt werden.

Das Ausmaß der PR-Proteininduktion nach Inokulation mit Pathogenen ist ein Maß für die Virulenz des Pathogens, aber auch für die Resistenz des Wirtes. Vorarbeiten zur Aufklärung der PR-Proteinexpression in Kastanie nach Befall mit *Cryphonectria parasitica* wurden durchgeführt (Shain 1993, Shain und Spalding 1995, Schafleitner und Wilhelm 1997, Schafleitner et al. 1997), eine systematische Untersuchung darüber steht aber noch aus.

Der Verwundungs- und Stressrespons kann in Pflanzen über zwei verschiedene Signaltransduktionswege ausgelöst werden. Bei Verletzung binden Oligosaccheride an entsprechende Rezeptoren, welche eine Signaltransduktionskaskade aktivieren und über Ca^{2++} -Influx, und Kinase-katalysierter Proteinphosphorylierung zur Bildung von Signalstoffen führt, welche ihrerseits Transkriptionsfaktoren aktivieren. Dadurch wird die Genexpression verändert und wundresponsive Gene, wie Proteinaseinhibitoren, sowie manche Gruppen von PR-Genen werden induziert. Analog erfolgt die Signaltransduktion beim Pathogenrespons. Allerdings kann der Pathogenrespons in Pflanzen über verschiedene Transduktionswege erfolgen:

- Ein Weg verläuft, wie der Verletzungsrespons, über Jasmonat bzw. Methyljasmonat und Ethylen (Creelman und Mullet 1995, Morgan and Drew 1997) und aktiviert ein ähnliches Genset, wie es auch beim Wundrespons bekannt ist.
- Ein anderer Signaltransduktionsweg für den Pathogenrespons führt über die Akkumulation von Salizylsäure und ist für die Expression von Pathogen Related Proteins (PR-Proteine) nach Pathogenbefall und für die Induktion systemisch induzierter Resistenz verantwortlich (Raskin 1992, Delaney et al. 1994).

Untersuchungen an krautigen Modellpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* zeigen, dass diese Signalwege nicht völlig unabhängig voneinander wirken, sondern Signalkomponenten sich positiv oder negativ auf die Produktion oder die Wirkung von Signalstoffen des jeweils anderen Signalwegs auswirken können. Beispiele hierfür sind die inhibierende Wirkung von Salizylsäure auf das Verletzungshormon Jasmonat (Li et al. 1992) und mögliche synergistische Wirkungen von Ethylen und Jasmonat auf Veränderungen der Genexpression, insbesondere auf die Induktion von Verletzungsresponsgenen wie Proteinaseinhibitoren (Maleck and Dietrich 1999). Weiters ist anzunehmen, dass auch Signalwege anderer Stresszustände wie z.B. Wassermangel, bei Verwundung und eventuell auch bei Pathogenbefall aktiviert werden und den Respons beeinflussen.

Hypovirulente und virulente *Cryphonectria parasitica* stimuliert die Akkumulation von Salizylsäure (Schafleitner und Wilhelm 1997). Es stellt sich somit die Frage, ob nach Pathogenbefall gebildete Salizylsäure sich auf den Wundresponses in Kastanie auswirkt und ob daraus Konsequenzen für die Wundheilung nach Infektion mit *Cryphonectria parasitica* entstehen.

Aus diesem Informationsstand ergaben sich Fragestellungen bezüglich der baumphysiologischen Untersuchungen, die im Rahmen dieses Projekts bearbeitet wurden:

- Untersuchung des histopathologischen Krankheitsverlaufes: Das Wachstum von *Cryphonectria parasitica* im Borkengewebe und die Reaktion der Pflanze wurde histochemisch untersucht.
- Untersuchung der PR-Proteinexpression nach Infektion mit virulenter und hypovirulenter *Cryphonectria parasitica*: Durch Messung der PR-Proteinexpression mit heterologen cDNA Sonden sollte die Pathogenabwehr von Edelkastanie im Zeitverlauf verfolgt werden.

- Isolierung verletzungsinduzierter Gene aus der Borke von Edelkastanie: Es sollte festgestellt werden, welche Gene durch Verletzung in Edelkastanie induziert werden. Ihr Induktionsmuster und ihre Funktion sollte aufgeklärt werden.
- Untersuchung der Expression verletzungsresponsiver Gene nach Verletzung und Inokulation mit *Cryphonectria parasitica*: Der Einfluß von Pathogeninokulation auf verwundungsinduzierte Gene sollte ermittelt werden. Aus diesen Ergebnissen sollten Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Wundheilung durch *Cryphonectria parasitica* gewonnen werden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind nachfolgend zusammengefasst und in den beiliegenden Manuskripten detaillierter dargestellt.

2.2 MATERIAL UND METHODEN

Der Großteil der verwendeten Methodologie wird in folgenden beiliegenden Manuskripten detailliert geschildert:

- Isolation of wound inducible genes from *Castanea sativa* stems and expression analysis in the bark tissue
- Wound-responsive genes of the bark of *Castanea sativa* and their expression upon wounding and chestnut blight infection
- Assessment of stress gene expression in chestnut (*Castanea sativa* mill.) upon pathogen infection (*C. parasitica* (murr.) Barr.) and wounding

Auf eine Wiedergabe dieser Methoden, wie Anzucht von Pflanzen- und Pilzmaterial, Differential mRNA Display, cDNA-Bibliothekherstellung und Screening, Northern Blots, reverse Northern dot blot und Sequenzanalyse wird daher an dieser Stelle verzichtet. Hier sind lediglich jene Methoden angeführt, die in den beiliegenden Manuskripten nicht beschrieben sind.

2.2.1. Southern blot-Hybridisierung

2.2.1.1 Isolierung genomischer DNA von Edelkastanie, Schnitt mit Restriktionsenzymen und Immobilisierung der DNA Fragmente auf Nylon Membranen

Genomische DNA wurde mittels DNeasy plant mini kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus Knospen von Glashauspflanzen während der Winterruhe nach den Anleitungen des Kitherstellers isoliert. Jeweils 10 µg DNA wurde mit 40 units *BAM* HIII über Nacht bei 37°C inkubiert. Die DNA-Fragmente wurden Ethanol-precipitiert, in 20 µl TE-8 resuspendiert und auf einem 0.8 % Agarosegel bei 5 V pro cm 8 h lang aufgetrennt. Die DNA wurde nach Anweisung des Membranherstellers auf eine Nylonmembran (Amersham, Buckinghamshire, UK) gebロットet und mittels UV und durch Erhitzen auf 80°C für 2 h kovalent an die Membran gebunden.

2.2.1.2 Sondenvorbereitung

Plasmide mit PR-Protein-cDNA-Inserts wurden von J. Ryals, Novartis, Triangle Park, USA, Daniel Klessig, Rutgers University, NJ, USA und von W. Boerjan, Laboratorium voor Genetika, University Ghent, Belgium zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide wurden mittels Elektroporation in *E. coli* DHX α transformiert (Biorad electroporator, Hercules, USA). Die Plasmide wurden wie in Sambroock et al., 1989 beschrieben, vermehrt und gereinigt. Die PR-Protein-cDNA Sequenzen wurden mit *ECO* RI aus den Vektoren geschnitten und durch Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion aus dem Agarosegel mit QiaexII (Qiagen, Hilden, Deutschland) gereinigt. Die cDNAs wurden mit ³²P durch Random Priming (Prime it, Promega, Madison, WI, USA) markiert und durch Gelausschlußchromatographie von nicht inkorporierten Nukleotiden gereinigt. Die spezifische Aktivität der Sonden wurde auf einem Beckmann LS7000 Flüssigszintillationszähler gemessen. 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung wurden zur Hybridisierung eingesetzt.

2.2.1.3 Southern Hybridisierung und Detektion

Prehybridisierung und Hybridisierung wurden bei 55°C in 7% SDS, 0.5 M Natriumphosphatpuffer pH 7.2 und 1mM EDTA über Nacht durchgeführt. Anschließend wurden die Blots 2x in 2 x SSC, 0.1% SDS bei Raumtemperatur und 2x in 0.2 x SSC, 0.1%

SDS bei 50°C gewaschen. Die Hybridisationssignale wurden durch Autoradiografie (X-Omat, Kodak, Rochester, NY, USA) sichtbar gemacht.

2.2.2. Isolierung eines Genfragments von Phenylalanine Ammonium Lyase

Fünf Primer für ein PAL-Gen von *Prunus avium* wurden von Dr. B. Heinze, Forstliche Bundesversuchsanstalt Wien, zur Verfügung gestellt.

Die Sequenzen der Primer:

Primer P: CAA GGG GCT GCC CTT CAG AAG G

Primer P0: ATG GT(G/A/T) GCT GAG T(A/T) (C/T) AGG AA

Primer M: AC(A/G) TCT TG(A/G) TT(A/G) TG(C/T) TGC TC

Primer M2: GCC TTG TT(C/T) CT(C/T) GA(A/C) ACA TC

Primer M3: CC(A/G) AA(A/C/G/T) A(C/T) (C/T) CC(A/G) GC(A/G) TT(A/C) A(A/G)(A/G) AA(C/T) CT.

Jeweils 10 pmol einer Primerkombination wurden mit 50 ng genomischer DNA, welche nach Kobayashi et al., 1998 aus Blättern von in vitro Pflanzen isoliert worden war, zusammen mit 200 µM dNTP-mix (Amersham, Buckinghamshire, UK), 2 mM MgCl₂ und 10 units TAQ Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) unter folgenden Bedingungen zur PCR eingesetzt.

10 Zyklen 30 sek 94°C, 1 min 60°C, 1.5 min 72°C

35 Zyklen 30 sek 94°C, 1 min 55°C, 1.5 min 72°C, mit einer terminalen Elongation für 10 min bei 72°C.

Die PCR Produkte wurden auf einem 1.2% TBE Agarosegel aufgetrennt, aus dem Gel mittels QiaExII (Qiagen, Hilden, Germany) aufgereinigt, in pSTBlue-1 kloniert (Blunt Cloning Kit, Novagen, Darmstadt, Germany) und in kompetente *E. coli* XL blue nach den Anweisungen des Kitherstellers transformiert. Die PCR Produkte wurden mittels Applied Biosystems BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Foster City, USA) auf einem ABI 376 sequenziert. Sequenzvergleiche wurden mittels BLAST (Altschul et al., 1990) durchgeführt.

2.2.3. RNA Isolation aus Glashaus- und in vitro Pflanzen

Verschiedene RNA-Extraktionsmethoden wurden auf Anwendbarkeit am Edelkastanienstielen getestet. Als geeignetste Methode erwies sich die von Chang et al. (1993) beschriebene Technik, deren Einsatz an Edelkastanie in den beiliegenden Manuskripten dargestellt ist. Außer dieser Methode wurden auch unten stehende RNA-Isolationsmethoden getestet.

Für alle RNA-Arbeiten wurden Puffer, Reagentien und Gefäße, die mit RNA in Kontakt kamen, vor ihrer Verwendung durch DEPC-Behandlung nach Sambrook et al., (1989) Rnase-frei gemacht.

2.2.3.1 RNeasy Kit

Der RNeasy Plant Kit (Qiagen, Hilden, Germany) wurde nach Anleitung des Herstellers eingesetzt, um kleine Mengen reiner Total-RNA zu isolieren.

2.2.3.2 Phenol Methode

1 g gefrorenes, pulverisiertes Pflanzenmaterial wurde in 3 ml vorgewärmten 1:1 (w:w) Extraktionspuffer (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% (w/v) SDS, 100 mM LiCl, 10 mM EDTA) : geschmolzenes kristallines Phenol bei 90°C resuspendiert. Das Gemisch wurde auf Raumtemperatur gekühlt, mit 1 ml Chloroform versetzt, 15 min bei Rt geschüttelt und 30 min in einem SS34 Rotor bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde mit 3 ml Chloroform versetzt und nochmals, wie oben beschrieben, geschüttelt und zentrifugiert.

Die Nukleinsäuren wurden mit 10% (v/v) 3M NaOAc (pH 5.2) und 2 x vol Ethanol über Nacht bei –20°C gefällt. Das Präzipitat wurde bei 18.000 x g 20 min bei 4°C sedimentiert und in 1 ml eiskaltem 2 M LiCl resuspendiert. Die Suspension wurde 3 min bei 15.000 x g und bei 4°C zentrifugiert, das Pellet wurde ein zweites Mal in 2M LiCl resuspendiert und die Zentrifugation wurde wiederholt. Das erhaltene Pellet wurde in eiskaltem 80%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst.

2.2.4. Konstruktion einer cDNA-Bibliothek aus verletzten Edelkastanienstielen

RNA wurde aus Stielen von in vitro Kastanienpflanzen drei Stunden nach Verletzung nach Chang et al. 1993 isoliert. Daraus wurde eine cDNA Bank (Clontech SMART cDNA Library Construction Kit, Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) angelegt und in λ-Phagenpartikel verpackt (Gigapack Gold cDNA Library Packaging Kit, Stratagene, Austin, USA) und titriert.

2.2.5. Histologische Untersuchungen des Verletzungsrespons und nach *C. parasitica* Inokulation

In vitro Pflanzen des Klons SP125 wurden mit virulenter *C. parasitica* AW30 inokuliert, Kontrollpflanzen wurden verletzt. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen geerntet und die Infektions- bzw. Verletzungsstellen wurde ausgeschnitten und nach Muntanola-Cvetkovic et al. 1991 fixiert. Die Pflanzenteile wurden in Paraffin eingegossen. Am Mikrotom wurden Längs- und Querschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger fixiert, mit Safranin und Light Green nach Dring (1971) gefärbt und am Mikroskop analysiert.

2.3 ERGEBNISSE

Ergebnisse, die auch in den beiliegenden Manuskripten beschrieben sind, sind hier nur in zusammengefasster Form dargestellt. Alle anderen Ergebnisse werden hier ausführlicher behandelt.

2.3.1. **Histologische Untersuchung des Verletzungsrespons und des Fortschreitens der *Cryphonectria parasitica* Infektion**

Nach Inokulation mit hv *C. parasitica* trat innerhalb von 3 Tagen eine starke Suberinisierung der Epidermiszellen an der Inokulationsstelle ein. Ein Eindringen von hv *C. parasitica* in das unverletzte Gewebe wurde nicht beobachtet, genauso wenig eine Suberinisierung weiter innen liegender Zellen (Abb. 31 und 32). Nach 5 Tagen ändert sich dieses Bild nicht. Die Infektion verläuft nur oberflächlich und kann von der Pflanze eingegrenzt werden (Abb. 33, 34 und 35). Bei Inokulation mit v *C. parasitica* konnte am Tag 3 nur leichte Suberinisierung am Rand der Infektionsstelle beobachtet werden. An der Infektionsstelle selbst trat keine Reaktion auf (Abb. 36). Nach 5 Tagen trat eine Suberinisierung von Zellwänden bis ins Kambium auf (Abb. 37). Auf Längsschnitten erkennt man die Peridermbildung (sekundäres Korkgewebe) sowie die Einlagerung von Suberin unterhalb der Epidermis (Abb. 41). In der Epidermis konnte extrazelluläres Hyphenwachstum gezeigt werden, sowohl an stark verkorkten Zellen der Epidermis als auch in Bereichen, wo keine Suberinisierung auftrat (Abb. 38, 39 und 40).

Deutlich zu erkennen ist eine distal der Inokulationsstelle errichtete Barriere in Form stark suberinisierter Zellen (Abb. 38). Diese Barriere reicht bis in den Bereich des Parenchyms. Die Zellwände des inneren Bereichs des Parenchyms sind allerdings noch nicht verstärkt. Die im Parenchym in der Nähe der Eintrittspforte wachsenden Hyphen befinden sich bereits in der Nähe dieser Schwachstelle und man erkennt, dass die radiale Ausbreitung des Pilzes über die im Parenchym wachsenden Hyphen verläuft. Dort ist die Pflanze anscheinend nicht in der Lage, eine effektive Barriere gegen eine weitere Ausbreitung aufzubauen.

Dieses Ergebnis zeigt, dass einerseits die verringerte Pathogenität des hv Pilzes und andererseits die gesteigerte Abwehr der Pflanzen nach Inokulation mit hv *C. parasitica* für den abgeschwächten Krankheitsverlauf verantwortlich ist.

In mit v *C. parasitica* infizierten Pflanzen tritt zwar eine Abwehrreaktion, z.B. in Form von Zellwandverstärkung auf, jedoch zu spät, um eine Barriere für den Pilz darzustellen. Zum Zeitpunkt, an dem die Zellwände in der Nähe der Eintrittsstelle mit Suberin verstärkt sind, befinden sich die Hyphen des Pilzes bereits darunter und können sich weiter ausbreiten, sowohl nach innen in Richtung Kambium, als auch radial, die Fläche der Läsion vergrößernd.

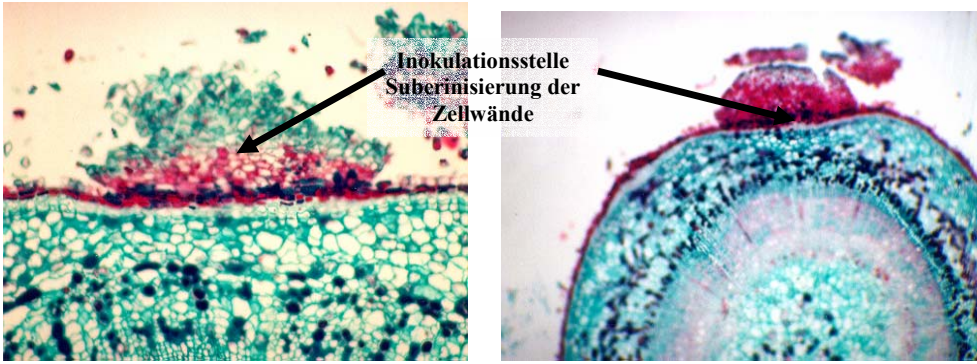


Abb. 31 und 32: In vitro Stiel 3 Tage nach hv *C. parasitica* Inokulation.

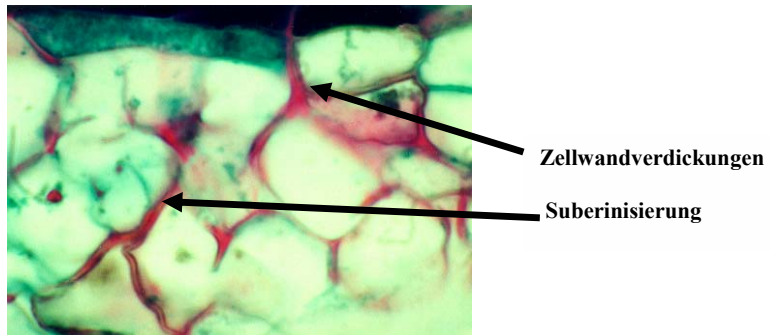


Abb. 33, 34 und 35: 5 Tage nach Inokulation mit hv *C. parasitica*. Zellwandverdickungen, Suberinisierung, kein Hyphenwachstum im Gewebe

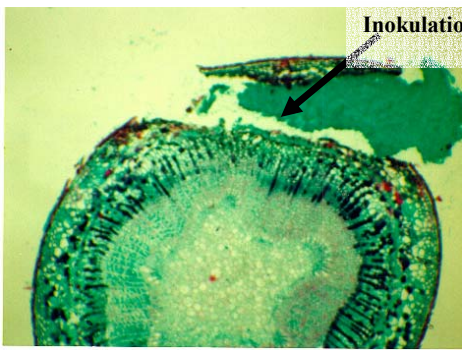


Abb. 36 Inokulation mit v *C. parasitica*. Tag 3

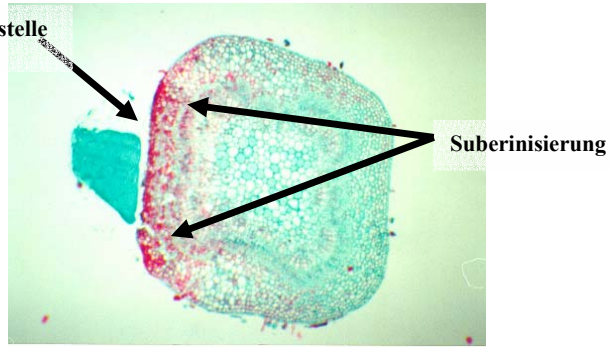


Abb. 37: Inokulation mit v *C. parasitica*. Tag 5.

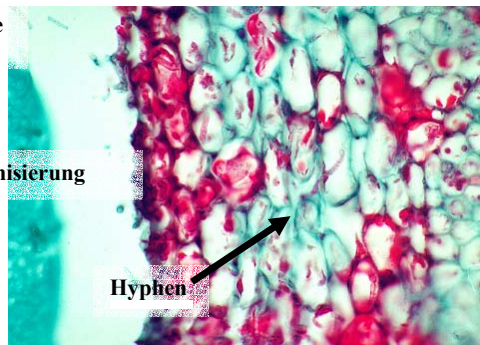
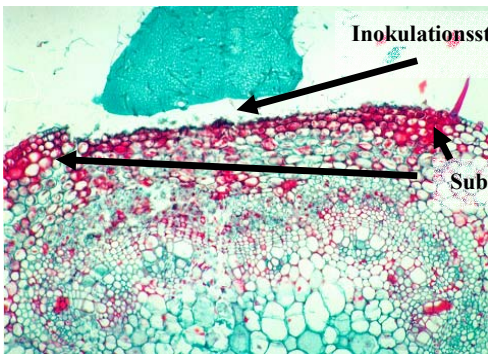


Abb. 38 und 39: 5 Tage nach Inokulation mit v *C. parasitica*. An der Inokulationsstelle und besonders am Rand der Läsion sind die Zellwände mit Suberin verstärkt. Im Parenchym unter der Inokulationsstelle liegen *C. parasitica* Hyphen extrazellulär vor.

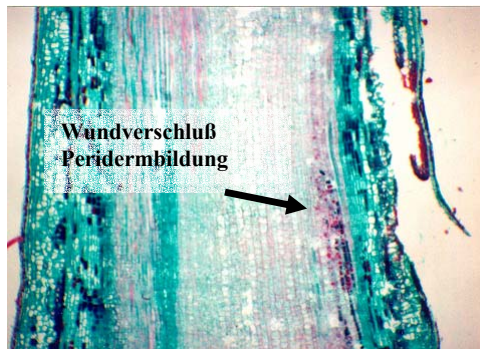
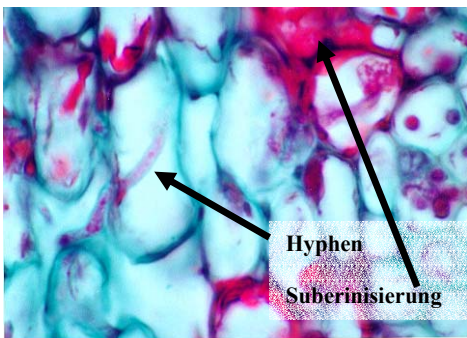


Abb. 40 und 41: 5 Tage nach Inokulation mit v *C. parasitica*. Zellwandverdickungen und interzelluläres Hyphenwachstum. Auf Bild 40 erkennt man die Bildung von Periderm.

2.3.2. Expression von PR-Genen und PAL nach Verwundung und *C.parasitica* Inokulation

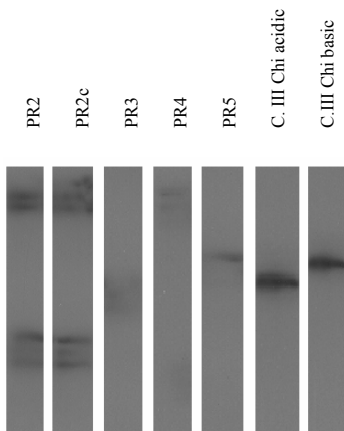


Abb. 42. 2: Southern Blot von PR cDNA Sonden Tabakspezifisch für PR2, 2c, 3, 4, 5, saurer und basischer Klasse III Chitinase ergab Hybridisationssignale mit genomischer Edelkastanien-DNA.

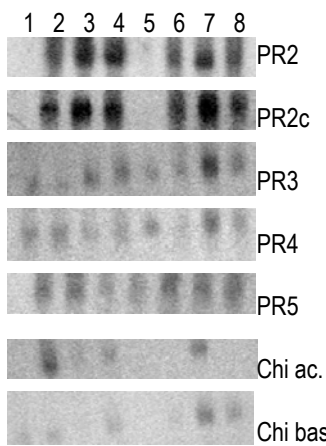


Abb. 43: PR-Genexpressionsmessung in Edelkastanie mit heterologen Sonden. 1: unbehandelt, Tag 3, 2: verwundet Tag 3, 3: hv. *C. parasitica* Tag 3, 4: v *C. parasitica* Tag 3, 5: unbehandelt Tag 7, 6: verwundet Tag 7, 7: hv. *C. parasitica* Tag 7, 8: v *C. parasitica* Tag 7.

Die Expression von PR-Genen und von Phenylalanin Ammonium Lyase (PAL) wurde als Parameter zur Messung des Verteidigungsresponses von Kastanie nach Verletzung und Pathogeninokulation ausgewählt. Dazu wurde ein Fragment eines PAL-Gens aus Kastanie mit PCR isoliert. Nachdem die Anwendbarkeit von heterologen Sonden für PR-Gene von Tabak und Pappel an Edelkastanie mittels Southern Blot getestet wurde, konnten Expressionsanalysen mit heterologen Sonden durchgeführt werden.

2.3.2.1 PR-Genexpression nach Verwundung und Pathogeninfektion mit heterologen Sonden

Auswahl der PR-Gensonden

cDNA-Klone der Tabak- PR-Genen PR1a, PR1b, PR2, PR2c, PR3, PR4, PR5, basischer und saurer Klasse III Chitinase, saurer und basischer Peroxidase und PRQ', sowie cDNA Sonden von Pappel für XP3-4 und XP1 (Peroxidasen) und CCoAOMT-2a (Conyferylalkohol Methyltransferase) wurden mittels Southern Blot auf Verwendbarkeit bei Edelkastanie getestet. Für die Tabaksonden PR2, PR3, PR4, PR5, saurer und basischer Klasse III Chitinase wurden Hybridisationssignale detektiert (Abb. 42). Es wurde geschlossen, dass Kastanie homologe Sequenzen zu solchen cDNA Sonden enthält, welche bei Southern Hybridisierungen Signale ergaben. Diese Sonden (PR2, PR2c, PR3, PR4, PR5, basischer und saurer Klasse III Chitinase) wurden in der Folge zu Genexpressionsmessungen bei Northern Blot Experimente eingesetzt.

Northern Blot Experimente mit heterologen PR-Gensonden

Die Expression der PR-Gene PR2, PR2c, PR3, PR4, PR5, basischer und saurer Klasse III Chitinase (Chi bas. and Chi ac.) wurde in verwundetem sowie hv und v *C. parasitica*-inokuliertem Stielgewebe von in vitro Pflanzen mit heterologen Sonden 3 und 7 Tage nach Behandlung getestet. Unbehandelte Pflanzen wurden als Kontrolle verwendet.

Die Ergebnisse sind im beiliegendem Manuskript „Assessment of stress gene expression in chestnut (*Castanea sativa* mill.) upon pathogen infection (*C. parasitica* (murr.) barr.) and wounding“ dargestellt. Zusammenfassend soll erwähnt werden, dass hv *C. parasitica* die Verteidigungsmechanismen von Kastanie generell stärker stimuliert als v *C. parasitica*.

Auch Verwundung ist in der Lage, PR-Proteinexpression in Stielen zu verursachen, allerdings generell in geringerem Maß als hv *C. parasitica*.

2.3.2.2 Isolierung und Expressionsanalyse eines Phenylalanin-Ammonium-Lyase Genfragments aus Edelkastanie

Genomische DNA-Fragmente eines PAL-Gens von Kastanie wurden mittels degenerierter Primer aus Kastanie isoliert. Lediglich eine der sechs getesteten Primerkombination ergab PCR-Produkte zwischen 0.3 to 2.2 kb (Abb. 44). Die PCR-Produkte wurden in *E. coli* kloniert. Es stellte sich heraus, dass das längste Fragments toxisch für *E. coli* war und daher nicht in diesen Bakterien vermehrt werden konnte. Das Fragment Nummer 4, 5, 6 und 7 wurden schließlich erfolgreich kloniert. Durch Sequenzierung wurde gezeigt, dass die Fragmente 5, (442 bp), 6 (346 bp) und 7 (286 bp) Teile des 717 bp PCR-Fragments 4 darstellen (Abb. 45). Aus den Sequenzen der Fragmente kann abgeleitet werden, dass die degenerierten Primer an verschiedenen Stellen im Intron des PAL-Gens gebunden haben und daher verschiedene Fragmente amplifiziert worden sind. Die Nuklein- und Aminosäuresequenz des CsPAL-Fragments 4 sind in Abb 46 dargestellt.

Der Exonteil des CsPAL-Fragments zeigt hohe Sequenzähnlichkeit zu PAL-Genen von Pappel, Wein, Karotte und zu PAL-Genen anderer Pflanzen. Daher kann angenommen werden, dass die klonierten CsPAL-Fragmente tatsächlich Teile eines PAL-Gens von Edelkastanie sind. (Abb. 47 und 48).

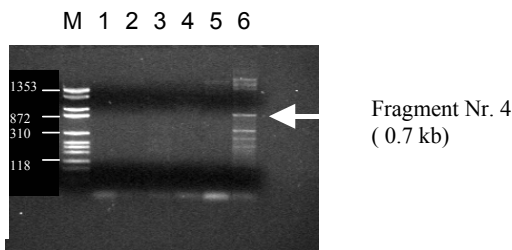


Abb. 44: Klonierung eines genomische PAL-Fragments mittels PCR. M: Marker, 1: Primer P und M, 2: Primer P und M2, 3: Primer P und M3, 4: Primer P0 und M, 5: Primer P0 und M2, 6: Primer P0 und M3.

	1 0	2 0	3 0	4 0	5 0
fragment 4	ATGCTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCGTGCTGG	AATCTTGCCG	GTCAGAGCCT
fragment 5	ATGCTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCGTGCTGG	AATCTTGCCG	GTCAGAGCCT
fragment 6	ATGCTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCGTGCTGG	AATCTTGCCG	GTCAGAGCCT
fragment 7	ATGCTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCGTGCTGG	AATCTTGCCG	GTCAGAGCCT
	6 0	7 0	8 0	9 0	1 0 0
fragment 4	GCTTATAGCG	CAAGTTGCAT	CGATTGCTGG	GCAGAATAGT	GTGAATGTCTG
fragment 5	GCTTATAGCG	CAAGTTGCAT	CGATTGCTGG	GCAGAATAGT	GTGAATGTCTG
fragment 6	GCTTATAGCG	CAAGTTGCAT	CGATTGCTGG	GCAGAATAGT	GTGAATGTCTG
fragment 7	GCTTATAGCG	CAAGTTGCAT	CGATTGCTGG	GCAGAATAGT	GTGAATGTCTG
	1 1 0	1 2 0	1 3 0	1 4 0	1 5 0
fragment 4	AGCTATCAGA	GACTGCCACG	TCAGCTAGTG	CAGCTATGCT	TGTGAGAATC
fragment 5	AGCTATCAGA	GACTGCCACG	TCAGCTAGTG	CAGCTATGCT	TGTGAGAATC
fragment 6	AGCTATCAGA	GACTGCCACG	TCAGCTAGTG	CAGCTATGCT	TGTGAGAATC
fragment 7	AGCTATCAGA	GACTGCCACG	TCAGCTAGTG	CAGCTATGCT	TGTGAGAATC
	1 6 0	1 7 0	1 8 0	1 9 0	2 0 0
fragment 4	AACACTCTCG	TCCAAGGCAC	TGATAGTTAT	GGTGTCACTA	CAGGTTTTGG
fragment 5	AACACTCTCG	TCCAAGGCAC	TGATAGTTAT	GGTGTCACTA	CAGGTTTTGG
fragment 6	AACACTCTCG	TCCAAGGCAC	TGATAGTTAT	GGTGTCACTA	CAGGTTTTGG
fragment 7	AACACTCTCG	TCCAAGGCAC	TGATAGTTAT	GGTGTCACTA	CAGGTTTTGG
	2 1 0	2 2 0	2 3 0	2 4 0	2 5 0
fragment 4	TGCAACATCC	CAAAGCAGAA	CGAATCAAGG	AGCGGCTCTT	CAGAAGGAAC
fragment 5	TGCAACATCC	CAAAGCAGAA	CGAATCAAGG	AGCGGCTCTT	CAGAAGGAAC
fragment 6	TGCAACATCC	CAAAGCAGAA	CGAATCAAGG	AGCGGCTCTT	CAGAAGGAAC
fragment 7	TGCAACATCC	CAAAGCAGAA	CGAATCAAGG	AGCGGCTCTT	CAGAAGGAAC
	2 6 0	2 7 0	2 8 0	2 9 0	3 0 0
fragment 4	TCATCAGGTG	AGGTTCTTTA	ACGCTGGAAT	TTTTGGCATG	TGCTAATCCG
fragment 5	TCATCAGGTG	AGGTTCTTTA	ACGCTGGAAT	TTTTGGCATG	TGCTAATCCG
fragment 6	TCATCAGGTG	AGGTTCTTTA	ACGCTGGAAT	TTTTGGCATG	TGCTAATCCG
fragment 7	TCATCAGGTG	AGGTTCTTTA	ACGCTGGAAT	TTTTGG	-----
	3 1 0	3 2 0	3 3 0	3 4 0	3 5 0
fragment 4	CCTAACGTGT	TTGGTGGGAA	AGGTTCCGGA	ACGCTGGAAT	ATTTCGATAG
fragment 5	CCTAACGTGT	TTGGTGGGAA	AGGTTCCGGA	ACGCTGGAAT	ATTTCGATAG
fragment 6	CCTAACGTGT	TTGGTGGGAA	AGGTTCCGGA	ACGCTGGAAT	ATTTCG

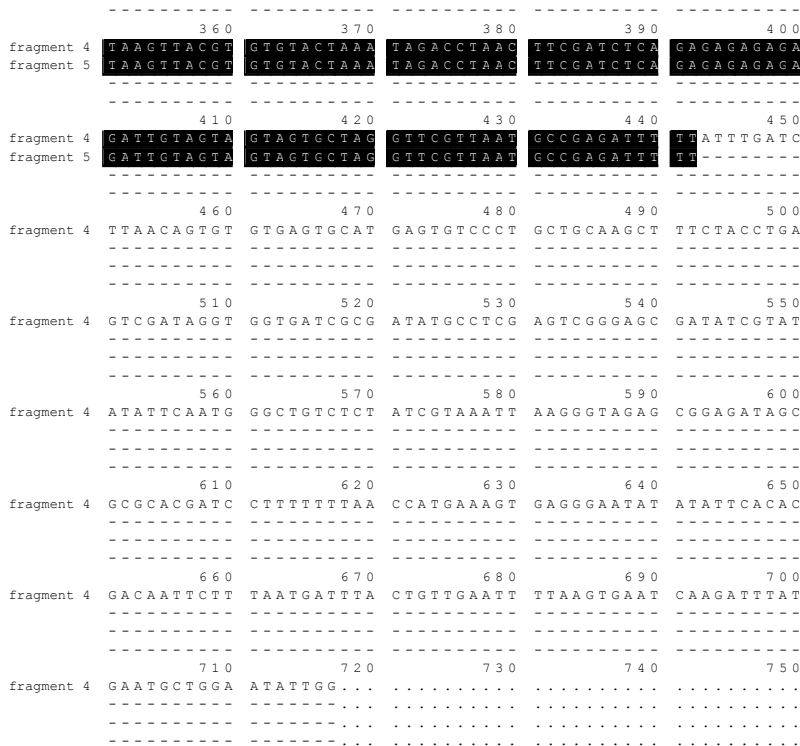


Abb. 45 Sequenzvergleich zwischen den einzelnen isolierten Kastanien-PAL-Fragmenten 4, 5, 6 und 7. Die kürzeren Fragmente 5, 6 und 7 sind Teile von Fragment 4.

M V A E Y R K P V V N L A G Q S L L I A Q V A S I 25
Atgggtggctgagtataggaagccctgtcgttaactcttgcggtcagagcctgcttatagcgcaagttgcatcgatt 75
A G Q N S V N V E L S E T A T S A S A A M L V R I 50
gctgggcagaatagtgtgaatgtcagagctatcagagactgccacgtcagctagtgcagctatgcttgtgagaatc 150
N T L L Q G T D S Y G V T T G F G A T S Q S R T N 75
aacactctoctccaaggcactgatagttatgggtgcactacagggttttgggtcaacatcccaaagcagaacgaat 225
Q G G A L Q K E L I **INTRON**→ 85
caaggaggogctcttcagaaggaactcatcaggtg**aggttctttaacgctggaatttttgg**catgtgctaatccg 300
cctaactgttttgggtggaa**aggttccggaaacgctggaatatttcg**atagtaagttacgtgtgtactaaatagac 375
ctaacttcgatctcagagagagagattt**gtagtagtgctaggttcgttaatccgagattttt**atgtgatc 450
ttaacagtggtgtgagtgcatgagtgctcctgctgcaagccttctacctgagtcgataggtggtgatcgcgatag 525
cctcgagtcgggagcgatatactatataatcaatgggctgtctctatcgtaaattaaggttagagcggagatagc 600
gcgcacgatccttttttaacatgaaagtgaggaatataatcacaacgacaattctttaatgattactgtt 675
gaattttaagtgaatca**agatttatgaa**tgctggaatattgg 717

Fig. 46: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von PAL-Genfragment 4 (CsPAL). Die Aminosäuresequenz de abgeleiteten Proteins ist im Einbuchstabencode fettgedruckt über der Nukleinsäuresequenz dargestellt. Die Primerbindungsstellen sind fett markiert, das Intron ist *kursiv* dargestellt.

CsPAL	ATGGTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCTGTGGT	AATCTGCG	GTCAGAGCCT
Populus	ATGGTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCTGTGGT	AATCTGCG	GTCAGAGCCT
Vitis	ATGGTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCTGTGGT	AATCTGCG	GTCAGAGCCT
Daucus	ATGGTGGCTG	AGTATAGGAA	GCCTGTGGT	AATCTGCG	GTCAGAGCCT
CsPAL	GCTTATAGCG	CAGGTGGCAT	CTATTGCTGG	GCAAT---	AGTGTGA
Populus	GCTTATAGCG	CAGGTGGCAT	CTATTGCTGG	GCAAT---	AGTGTGA
Vitis	TACCAATATCG	CAGGTGGCGG	CTATTGCTGG	GCGGAGG---	GGGATGTTG
Daucus	CACCGTCTCT	CAGGTGGCAT	CTATTGCTGG	---	AGTGTGA
CsPAL	AGGTCGAGCT	ATCAGAGACT	GCCACCGCAG	CTAGTGCAG-	CTTTGCTTGT
Populus	AGGTCGAGCT	ATCAGAGACT	GCCACCGCAG	CTAGTGCAG-	CTTTGCTTGT
Vitis	GTTGTGAGTCT	GTCAGAGACT	GCCACCGCAG	GC-CTAGTGCAG-	CTTTGCTTGT


```

Populus  A A G T G A A T C A A G A T T - - - - - A T G A A T T G T T A T A C A A G C T - G C C A A A
Vitis    T G G G G A A C A A A C C T T A T G A A T - - C T A C T C C T T T C T G G T T A C T
Daucus   G A G G C C A T C A C C A R G T T C C T C A A C C A A A C A T T A C C C C T T G C T G C C A C T

CsPAL    - - - - - G A T A T C A G - - - - -
Populus  C T T T T A A C A A G A G T A G G A A A T C T T T T C T T
Vitis    T T C T - - - - - A T T A T C T A A A A C A G T T G T T
Daucus   C - - - - - - C G T G G A A C G A T C A C T G C - -

```

Abb. 47: Sequenzvergleich von CsPAL mit PAL Sequenzen von Pappel (*Populus kitakamiensis*, GenBank accession n° [D30656.1](#)), Wein, (*Vitis vinifera*, GenBank accession n° [AB015870.1](#)) und Karotte (*Daucus carota*, GenBank accession n° [AB015870.1](#)). Die Sequenzidentität zwischen den Exonsequenzen von CsPAL PAL-Sequenzen von Pappel beträgt 78.1%, von Wein 71.7% und von Karotte 70%. Die Intronsequenzen sind stark unterschiedlich. Identische Basen inwenigstens drei der verglichenen Sequenzen sind schwarz unterlegt.

```

                10      20      30      40      50
CsPAL  1  MVAEYRKPVV NLAGQSLIA QVASIAGQNS --VNVELSET ATTSASAAMLV 50
Poplar 1  MVAEYRKPVV NLAGQNLIIA QVASIAGHDA SNVKKVELSES ARPRVKASSD 50
Vitis  1  MVAEYRKPVV RLGGETLTIS QVAAIAGRE -GDVGVLESET ARAGVNASSE 50
Daucus 1  MVAEYRKPVV RLGGETLTIS QVAAIA--A GSVKVELAES ARAGVKASSD 50
                60      70      80      90     100
CsPAL  51  RI-N TLLQGT DSYGVTTGFG ATSRRTKQG GALQKELIR. .... 100
Poplar  51  WVMDSMDKGT DSYGVTTGFG ATSHRRTKQG GALQKELIR. .... 100
Vitis   51  WVMESMSKGT DSYGVTTGFG ATSHRRTKQG GALQKELIR. .... 100
Daucus  51  WVMESMKNKGT DSYGVTTGFG ATSHRRTKQG GALQKELIR. .... 100

```

Fig. 48: Sequenzvergleich der abgeleiteten CsPAL Aminosäuresequenz mit PAL Proteinsequenzen von Pappel (*Populus kitakamiensis*, GenBank accession n° [D30656.1](#)), Wein, (*Vitis vinifera*, GenBank accession n° [AB015870.1](#)) und Karotte (*Daucus carota* GenBank accession n° [AB015870.1](#)). Identische Aminosäurereste sind dunkelgrau, funktionsähnliche Reste in hellgrau dargestellt. Die Sequenzidentität auf Aminosäureebene zwischen CsPAL und PAL von Pappel beträgt 68.9% (Ähnlichkeit 84.5%), von Wein 67.8% (81.2% Ähnlichkeit) und zum *Daucus carota* PAL Protein 59.9% (74.5% Ähnlichkeit).

2.3.2.3 PAL-Genexpressionsmessung nach Verwundung und nach Inokulation mit v und hv *C. parasitica*

Mittels Northern Blots wurde die PAL Expression in unbehandelten, verletzten und mit v bzw. hv *C. parasitica* inokulierten Edelkastanie in vitro Stielen untersucht. Die niedrige konstitutive PAL-Expression wurde durch Verletzung am Tag 3 und 5 stimuliert. Ebenso verursachte v *C. parasitica* eine Erhöhung der PAL Transkription. Die höchste PAL-Induktion wurde nach Infektion mit hv *C. parasitica* erreicht. Auch bei diesem Versuch wurde gezeigt, dass hv *C. parasitica* die Expression von Genen, die am Verteidigungsrespons teilhaben, höher stimuliert, als der virulente Pilz (Abb. 49).

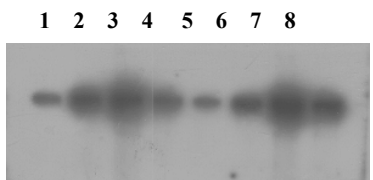


Abb. 49: PAL Expressionsmessung in verwundeten und Pathogeninokulierten in vitro Sprossen mittels Northern Blot.
1: unbehandelt
2: verwundet Tag 3
3 hv *C. parasitica* Tag 3
4: v *C. parasitica* Tag 3
5: unbehandelt
6: verwundet Tag 5
7: hv *C. parasitica* Tag 5
8: v *C. parasitica* Tag 5

2.3.3. Isolierung verletzungsinduzierter Gene

Mittels Differential mRNA-Display wurden Fragmente verletzungsinduzierter Gene aus Kastanie isoliert. Diese Fragmente wurden als Sonden zum Screening einer cDNA Bibliothek aus verletzten Kastanienstielen eingesetzt, um möglichst lange cDNA Sequenzen verletzungsinduzierter Gene zu isolieren. Durch Identifikation homologer Sequenzen in Datenbanken ist es gelungen, die biochemische Funktion der meisten isolierten Gene zu definieren.

2.3.3.1 Differential mRNA Display

Die Genexpression in verwundeten und unbehandelten *in vitro* Kastanienstämmen wurden 3 und 24 h nach Behandlung mittels Differential mRNA Display verglichen. Dazu wurden 24 verschiedene 13-mer „Arbitrary“-Primer und drei verschiedene Poly-T Primer mit jeweils einer spezifischen Base (A, G oder C) eingesetzt. Alle Displayreaktionen wurden zweifach parallel durchgeführt, um cDNA-Synthese- und PCR-Artefakte leichter detektieren zu können.

Jede Primerkombination ergab annähernd 120 Banden mit 150 bis 600 bp Länge. Bei statistischen Genomanalysemethoden wie differential Display, ergibt sich der Anteil des Transkriptoms (P), welches durch Verwendung einer bestimmten Anzahl an Primerkombinationen (N) abgedeckt wird, aus $N = \ln(1-P) / \ln(1-B/E)$, worin B die Anzahl der Banden pro Reaktion, und E die Menge an verschiedenen Transkripten im untersuchten Gewebe darstellt (Ito and Sakaki 1997). Angenommen, 10.000 verschiedene mRNA Spezies sind in Kastanienstielgewebe vorhanden - eine Zahl, die einem Durchschnittswert für eukaryotische Gewebe entspricht (Alberts 1994) - dann ergeben die 72 verwendeten Primerkombinationen und die 120 Banden per Reaktion, dass bei diesem Experiment 58% des Transkriptoms abgedeckt worden sind.

Insgesamt wurden 58 differentiell erscheinende Banden beim Differential Display isoliert.

2.3.3.2 Verifizierung der differentiellen Genexpression

Differential mRNA Display kann aufgrund von PCR-Artefakten und Ungleichheiten während der cDNA-Synthese falsch positive Ergebnisse liefern (Liang and Pardee 1997). Um die verletzungsabhängige differenzielle Expression der beim Display isolierten Gene zu testen, wurde ein Reverse Northern Dot Blot Experiment durchgeführt. Dazu wurden die DD-cDNA-Fragmente als Sonden auf einer Nylonmembran fixiert und mit radioaktiv markierter cDNA aus unbeschädigten oder verletzten Kontrollpflanzen hybridisiert. Unterschiedliche Intensität der Hybridisierungssignale wurde als Verifizierung der differentiellen Expression der betreffenden Gene bewertet.

Bei 27 der 58 isolierten Display Fragmente konnte dadurch die differentielle Expression bestätigt werden. (Abb. 50).

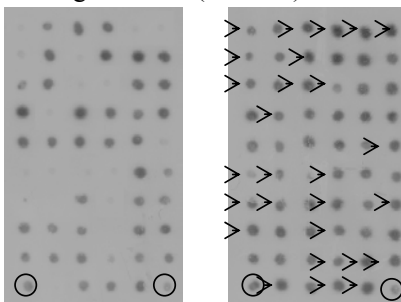


Abb. 50: Reverse northern dot blot. a) unbeschädigte Kontrollpflanzen, b) verwundete Pflanzen, 3 h nach Behandlung.

Jeder Dot repräsentiert ein im Differential Display isoliertes cDNA Fragment. Jene Dots, die bei Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA aus unbeschädigten oder verwundeten Pflanzen liefern, stellen Fragmente von Genen dar, die tatsächlich differentiell exprimiert werden und sind mit Pfeilen markiert. Kontrolldots (genomische DNA) sind mit Ringen gekennzeichnet.

2.3.3.3 Klonierung der verifiziert differentiell exprimierten Displayfragmente und Sequenzanalyse der Displayfragmente

Diese 27 verifizierten cDNA-Fragmente wurden in pSTBlue-1 Vektoren kloniert und in *E. coli* amplifiziert. Die restlichen 31 Displayfragmente wurden als falsch positiv angesehen, und, bis auf 2 Fragmente, die als Sonden für konstitutive Gene als Kontrolle bei Expressionsanalysen dienen sollten, nicht weiter analysiert.

Die Sequenzanalyse der Displayfragmente ergab in den meisten Fällen nur geringe Sequenzähnlichkeit zu bekannten Genen. Dies war darauf zurückzuführen, dass beim differential mRNA Display Genfragmente vom 3'Ende isoliert werden. Diese Teile der Gene werden in der Regel nicht zu Protein umgeschrieben und sind daher nur in geringem Ausmaß zwischen verschiedenen Spezies konserviert. Dies macht die Suche nach Homologen in Datenbanken sehr schwierig und unsicher. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, mit ausreichender Sicherheit homologe Gene zu den isolierten cDNA-Fragmenten aufzufinden, wurde eine cDNA-Bibliothek hergestellt und durch Screening dieser Bibliothek mit den Displayfragmenten längere cDNA Fragmente isoliert.

2.3.3.4 Herstellung einer cDNA-Bibliothek aus verletzen Stielen von Edelkastanie

Ausgehend von RNA aus Stielen 3h nach Verletzung wurde eine cDNA-Bibliothek in TriplExII Vektoren angelegt und in λ -Phagenpartikel verpackt. In der cDNA Bank waren $1 \cdot 10^6$ unabhängige Klone mit Insertlängen zwischen 1 und 4 kb (Abb. 51) vertreten. Die cDNA Bank wurde durch Amplifikation auf einen Titer von 10^{10} plaque forming units/ml gebracht und bei -80°C gelagert.

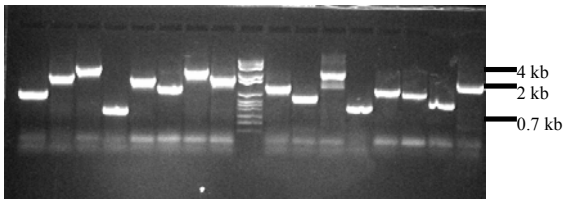


Abb. 51: Test der Insertgröße der cDNA Bank. 16 individuelle Plaques wurden nach Ausubel et al. 1987 isoliert und die cDNA Inserts wurden mittels PCR amplifiziert. Die erhaltenen DNA Stücke wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Insertgröße betrug zwischen 1 und 4 kb.

2.3.3.5 Screening der cDNA Bank

Zum Screening der cDNA Bank wurden die im Differential mRNA Display isolierten cDNA Fragmente verwendet. Je 5 positive Plaques pro Platte des 2. oder 3. Screens wurden nach Überprüfung der Insertlänge isoliert, die Phagen daraus eluiert und ihre DNA nach den Anweisungen des Kit-Herstellers (Clontech) zu Plasmiden konvertiert. Die Plasmide wurden isoliert und sequenziert.

2.3.3.6 Verletzungsinduzierte Gene von Edelkastanie

Aus der cDNA-Bibliothek wurde durch Screening mit den Displayfragmenten 19 partielle und 10 Gesamt-cDNA-Klone von 27 verletzungsresponsiven und zwei Kontrollgenen isoliert. Nach Sequenzierung der isolierten cDNA Moleküle wurden die offenen Leserahmen bestimmt und die Sequenz der jeweiligen hypothetischen Proteine abgeleitet. Sequenzvergleiche auf Nukleinsäure- und Proteinebene der isolierten cDNAs mit in der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) gespeicherten DNA- und Proteinsequenzen wurden nach Altschul et al. 1990 durchgeführt um daraus die wahrscheinlichste Funktion der entsprechenden Gene zu identifizieren.

Die verletzungsinduzierten Gene konnten in fünf Gruppen eingeteilt werden:

- Gene der Signaltransduktion
- Gene des Streßresponses und der Pathogenabwehr
- Gene der Wachstumsregulation
- Gene des Proteinmetabolismus
- Gene der Lichtperzeption und des Energietransports
- Gene mit unbekannter Funktion

Eine Liste der isolierten Gene ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: Verwundungsinduzierte Gene von Edelkastanie. *: nicht wundinduzierbar, als Kontroll-cDNA isoliert. †: nur partiell sequenziert.

cDNA	bp	Offener Leserahmen/Aminosäuren/kDa	Gesamt-cDNA	partielle cDNA	GenBank Nr.	Funktion	Ähnlich zu Orthologen von :
SIGNALGENE							
CsStk1	758	663/221/n.a.		✓	AF334831	Serin-Threonin-Kinase	<i>A. thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Glycine max.</i>
CsCam1	586	321/107/n.a.		✓	AF334832	Calmodulin	<i>Fagus silvatica</i> , <i>Vitis radiata</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
CsCam2	668	444/148/16.6	✓		AF334833	Calmodulin	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>
STRESS- UND PATHOGEN- RESPONS GENE							
CsPrp	653	354/118/12.9	✓		AF334835	Prolin-reiches Protein	grip 15 (<i>Vitis vinifera</i>)
Cs13.9	703	393/131/13.9	✓		AF334834	Chaperon	BSD2 (<i>Zea mais</i>), F1P2.200 (<i>A. thaliana</i>), DnaJ (bacteria)
CsPg	796	363/121/n.a	✓		AF417294	Polygalacturonase β -Untereinheit	<i>Lycopersicon esculentum</i>
CsPe	308	132/44/n.a	✓		AF417295	Pektinesterase	PE (<i>A. thaliana</i>)
CsAd	737	327/109/n.a	✓		AF417296	Arginindecarboxylase	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Pisum sativum</i>
CsγT	780	234/78/8.8	✓		AF417297	γ -Thionin-ähnlicher Proteinase Inhibitor	<i>Petunia inflata</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Glycine max.</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Helianthus annuus</i>
CsGluc	638	387/129/n.a	✓		AF417298	β -1,3-Glucanase	<i>Prunus persica</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Vitis vinifera</i>
CsG	518	492/164/n.a	✓		AF417299	Germin	<i>A. thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i>
GENE DER WACHSTUMSREGULATION							
CsScmt	880	399/133/n.a.	✓		AF417292	Sterol-C-Methyltransferase	<i>A. thaliana</i>
CsSr	536	201/51/n.a	✓		AF417293	Δ -7-Sterol Reductase	<i>A. thaliana</i>

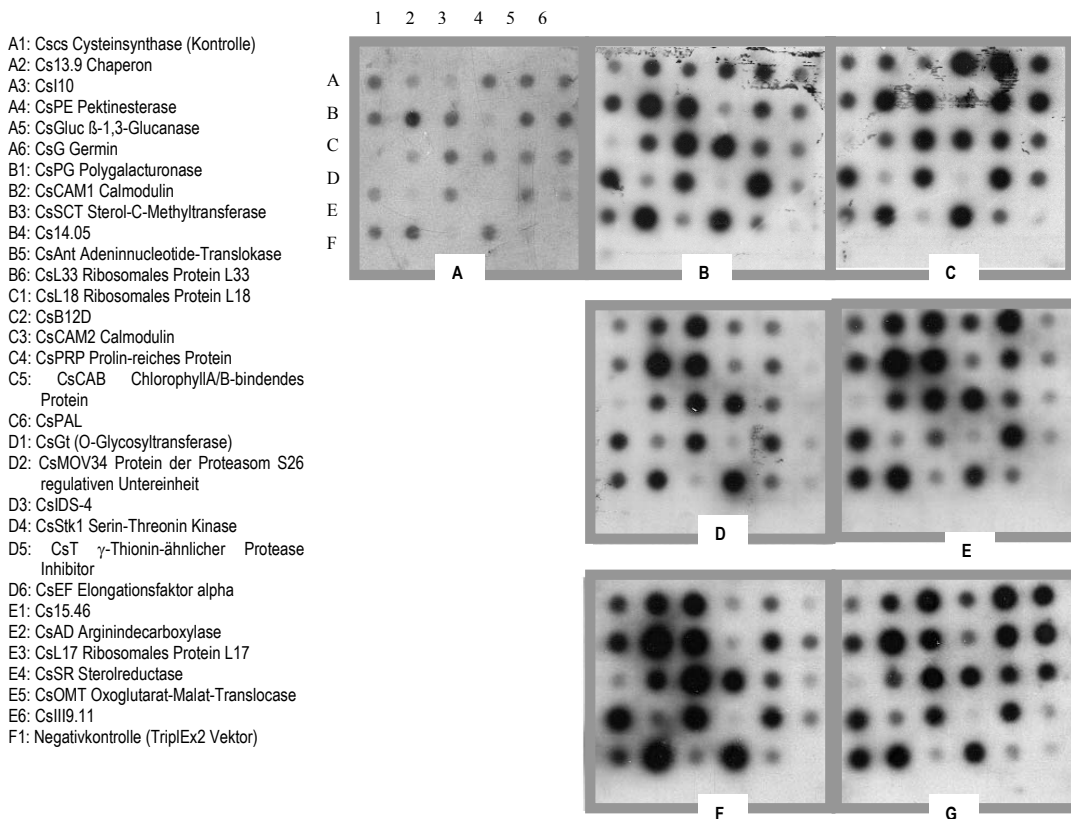
AMINOSÄURE UND PROTEINMETABOLISMUS						
CsCs*	683	339/113/n.a.		✓	AF417300	Cysteinsynthase <i>Solanum tuberosum, A. thaliana, O. sativa</i>
CsEf	472	111/39/n.a.		✓	AF417301	Translationaler Elongationsfaktor <i>Glycine max., Oryza sativa, Lilium ssp., Malus domestica</i>
CsMov-34	740	591/197/n.a.		✓	AF417302	MOV34 26S proteasomal regulatory subunit, eIF1 (<i>A. thaliana</i>)
CsL17	668	420/140/ 14.99		✓	AF334838	Ribosomales Protein L17 <i>A. thaliana, N. tabacum, S. cerevisiae, H. sapiens</i>
CsL18	713	525/175/21.4		✓	AF334839	Ribosomales Protein L18 <i>A. thaliana, S. cerevisiae, H. sapiens</i>
CsL33	573	336/112/ 12.78		✓	AF334840	Ribosomales Protein L33 <i>A. thaliana, Zea mays, Saccharomyces cerevisiae</i>
CsGt	729	396/132/n.a.		✓	AF417303	O-GlcNAc-Transferase <i>A. thaliana</i>
LICHT UND ENERGIETRANSPORT						
CsCab	496	360/120/n.a.		✓ †	AF417304	Chlorophyll A/B – bindendes Protein <i>Prunus persica, Petunia ssp.m Solanum tuberosum, N. tabacum, Gossypium hirsutum etc.</i>
CsOmt	244	144/48/n.a.		✓	AF417305	Oxoglutarat-Malate-Translokase <i>A. thaliana, Zea mays, Spinacia oleracea</i>
CsAnt	653	375/125/n.a.		✓	AF417306	Adinnucleotid-translocase <i>A. thaliana, Lupinus albus, Solanum tuberosum, Lycopersicon esculentum, Zea mays</i>
GENE MIT UNBEKANNTER FUNKTION						
Cs15.46	115 4	417/139/ 15.46		✓	AY055745	Unbekannt Enoyl-CoA-hydratase (<i>A. thaliana, O. sativa, Prunus persica</i>)
IDS4-like	814	672/224/		✓	AY055748	Unbekannt <i>A. thaliana, Hordeum vulgare</i>
Cs10.1	108 2	417/139/n.a.		✓	AY055743	Unbekannt n.s.
Cs14.05	766	378/126/ 14.05		✓	AY055744	Unbekannt n.s.
CsB12D		402/134/		✓	AY055747	Unbekannt <i>Ipomoea batatas, A. thaliana, Oryza sativa, Hordeum vulgare</i>
Cs9.11*	586	378/126/ 14.17		✓	AY055746	Unbekannt n.s.

2.3.3.7 Expressionsanalyse der isolierten Gene nach Verletzung und Inokulation mit *Cryphonectria parasitica*

Veränderungen der Genexpression der isolierten verletzungsresponsiven Gene wurden nach Verletzung und Inokulation mit v *C. parasitica* mittels reverse Northern Dot Blot und anschließender Flüssigszintillationsmessung über die Menge an immobilisierter Radioaktivität gemessen. Dazu wurde mRNA von verletzten bzw. mit v *C. parasitica* behandelten Stielen 3, 24 und 72h nach Behandlung und von unbehandelten Kontrollpflanzen revers transkribiert, radioaktiv markiert und zur Hybridisierung mit an Nylonmembranen immobilisierten cDNA Sonden der isolierten verletzungsresponsiven Genen eingesetzt.

Zwei cDNA-Sonden, CsCs (Cysteinsynthase) und Cs9.11 (unbekannte Funktion), ursprünglich als falsch Positive im Zuge des Displayexperiments isoliert, wurden als Sonden für konstitutiv exprimierte Gene verwendet. Zwei unabhängige Hybridisierungsversuche wurden durchgeführt. Autoradiogramme dieses Experiments sind in Abb. 52 dargestellt.

Abb. 52: Revers Northern Dot Blot: A: unbehandelt, B: verletzt, 3h, C: *C. parasitica* 3h, D: verletzt 24h, E: *C. parasitica* 24h, F: verletzt 72h, *C. parasitica* 72h.



Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurden die Spots ausgeschnitten und die Radioaktivität der jeweiligen Spots mittels Szintillationszählung bestimmt. Die cpm Werte jedes Spots wurden durch den cpm-Wert von CsCs derselben Membran dividiert, um unterschiedliche Hintergrundmessungen auszugleichen. Diese Werte wurden "normalisierte" Werte genannt. Mittelwerte der "normalisierten Werte" von zwei unabhängigen Experimenten

wurden für jeden Spot berechnet und durch die normalisierten Mittelwerte, die bei Hybridisierung mit cDNA von unbehandelten Pflanzen erhalten worden sind, dividiert. Der dabei erhaltene Wert wurde als Maß der Induktion durch Verletzung bzw. v *C. parasitica* Inokulation verwendet.

Die Messungen der immobilisierten Radioaktivität erwiesen sich als gut reproduzierbar und die Zunahme der gemessenen Radioaktivität war lt. Vorversuchen proportional zur eingesetzten Transkriptmenge. Die in Wiederholungen festgestellten Abweichungen betragen weniger als 10%, daher konnten durch dieses Verfahren bereits kleine Änderungen der Transkriptmenge festgestellt werden.

Die Induktionsdaten der einzelnen Gene sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Die Rohdaten der diesen Ergebnissen zugrunde liegenden Messungen sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 5: Induktion der isolierten wundresponsiven Gene 3-72h nach Verwundung a (w) oder Infektion mit *C. parasitica* (Cp) (Mittelwerte von 2 Experimenten, ausgedrückt als n-fache expression in Relation zur basalen (=in unbehandelten Pflanzen) Expression. Alle Werte wurden in Bezug auf CsCs normalisiert.

	w 3h	w 24h	w 72h	Cp 3h	Cp 24h	Cp 72h
Signalgene						
CsStk1 Serin-Threonin-Kinase	2.1	1.2	1.4	3.5	3.8	2.9
CsCam1 Calmodulin 1	5.7	5.8	6.5	3	5.7	5.9
CaCam2 Calmodulin 2	6.2	5.9	8.2	4.9	4.3	5.3
Stress- & Pathogenrespons						
CsPrp Prolin-reiche Proteingene	5.9	6	4.5	3.6	4.7	4
Cs13.9 Chaperon 13.9	4.5	4.1	6	3.2	7.7	5.2
CsPg Polygalacturonase	2.2	1	1.2	1.1	1.6	1.6
CsPe Pektinesterase	2.4	1.4	0.3	11.4	2.5	1.3
CsAd Arginindecaboxylase	4.8	5.8	7.2	2.8	4	4.2
CsT γ -Thionin	10.2	5.6	4.6	6.7	6.6	5.1
CsGluc β -1.3-Glucanase	2.6	1.2	0.8	11.3	8.2	8.8
CsG Germin	1.2	0.7	0.4	2.2	0.8	3.6
CsPAL Phenylalanin Ammoniumlyase	1.1	0.9	0.6	1.6	0.8	2.8
Sterolmetabolismus (Wachstumsregulation)						
CsScmt Sterol-C-Methyltransferase	6.8	7.3	7.5	6.3	5.5	4.9
CsSr Sterolreductase	5.9	7	6.7	4.7	3.5	3.6
Proteinmetabolismus						
CsEf Elongationsfaktor	2.4	2.3	1.4	3	2.4	1.8
CsMov34 Protease Untereinheit	2.1	2.1	1.7	2.3	2	2
CsL17 ribosomales Protein I17	2.5	2.3	1	1	1.4	2.2
CsL18 ribosomales Protein I18	2.5	2.7	2.5	2.7	2.4	2.5
CsL33 ribosomales Protein I33	1	0.7	0.7	2.2	0.8	2.9
CsGt O-Glycosyltransferase	3.6	3.4	7.2	3.1	3.3	3.8
Licht und Energie						
CsCab Chlorophyll A/B bindendes Protein	1.7	1.6	1.2	1.6	1.4	2.6
CsAnt Adenine-Nucleotid-Transferase	2.4	1.7	1.9	3.2	2.1	7.1
CsOmt Oxoglutarate-Malat-Translocase	3.1	3.8	3.4	3.1	2.7	2.3
Gene mit unbekannter Funktion						
Cs15.46	1.6	2.2	1.7	1.8	2.4	3
IDS-4	3.4	3	7	3.5	1.7	3.7
CsI10	5.5	17	14.6	3.3	12.8	15.9
B12D	3.9	3.4	3.7	2.5	3.4	3.2
Cs14.05	2.1	3.3	1	2.5	2.6	2.5
Cs9.11 Kontrollgen 2	1	1	0.8	1	1	1.3

Tabelle 6: Quantifizierung der Hybridisationssignale mittels Scintillationszählung. Die cpm-Werte jedes Dot-Kontrollgens Cysteinsynthase der entsprechenden Membran dividiert ("normalisierte Werte"). Die Ergebnisse v

GENE	Unbeh. 1	Unbeh. 2	Mittelwert Unbeh.	w 3h (1)	w 3h (2)	Mittelwert w 3h	w 24 h (1)	w 24h (2)	Mittelwert w 24h	w 72h (1)	w 72h (2)	Mittelwert w 72h	Cp 3h (1)	Cp 3h (2)	Mittelwert Cp 3h	Cp 24h
CsStk1	0.173	0.194	0.184	0.341	0.434	0.388	0.215	0.24	0.227	0.24	0.263	0.251	0.6	0.683	0.641	0.4
CsCam1	1.701	1.736	1.719	9.35	10.264	9.807	10	9.952	9.976	11.22	11.136	11.178	5.104	5.293	5.199	9.4
CsCam2	0.992	1.008	1	5.545	6.775	6.16	5.645	6.208	5.926	7.821	8.513	8.167	4.557	5.171	4.864	3.4
CsPrp	0.827	0.853	0.84	4.61	5.31	4.96	5.017	5.112	5.064	3.752	3.792	3.772	2.904	3.073	2.989	3.4
Cs13.9	0.512	0.55	0.531	2.171	2.581	2.376	2.157	2.24	2.199	3.163	3.233	3.198	1.583	1.813	1.698	3.4
CsPG	0.898	0.977	0.937	1.951	2.248	2.1	0.992	0.92	0.956	1.118	1.119	1.118	0.93	1.13	1.03	1.4
CsPg	0.913	0.992	0.953	2.033	2.543	2.288	1.264	1.32	1.292	0.317	0.288	0.303	10.191	11.488	10.84	2.4
CsAd	0.819	0.884	0.851	3.919	4.279	4.099	4.884	5.032	4.958	5.911	6.275	6.093	2.217	2.463	2.34	3.4
CsgT	0.591	0.628	0.609	5.772	6.643	6.208	3.322	3.472	3.397	2.72	2.877	2.798	3.835	4.35	4.092	3.4
CsGluc	0.858	0.899	0.879	2.098	2.504	2.301	1.14	1.056	1.098	0.703	0.682	0.693	9.548	10.26	9.904	6.4
CsG	0.85	0.891	0.871	0.894	1.202	1.048	0.595	0.584	0.59	0.321	0.301	0.311	1.87	2.049	1.959	0.4
PAL	0.78	0.798	0.789	0.789	0.891	0.84	0.785	0.664	0.725	0.508	0.458	0.483	1.174	1.358	1.266	0.4
CsScmt	0.709	0.806	0.757	4.447	5.798	5.123	5.182	5.8	5.491	5.411	5.979	5.695	4.33	5.268	4.799	3.4
CsSr	0.717	0.822	0.769	4.163	4.969	4.566	5.248	5.712	5.48	4.837	5.394	5.116	3.304	3.927	3.616	2.4
CsEf	0.299	0.504	0.402	0.65	1.248	0.949	0.694	1.128	0.911	0.423	0.695	0.559	0.826	1.577	1.202	0.4
CsMov34	0.299	0.403	0.351	0.61	0.876	0.743	0.645	0.848	0.746	0.52	0.665	0.593	0.67	0.911	0.79	0.4
CsL17	0.307	0.333	0.32	0.764	0.837	0.801	0.736	0.752	0.744	0.329	0.331	0.33	0.304	0.341	0.323	0.4
CsL18	0.26	0.287	0.273	0.577	0.775	0.676	0.719	0.76	0.74	0.65	0.695	0.673	0.678	0.813	0.746	0.4
CsL33	0.953	0.969	0.961	0.911	1.147	1.029	0.653	0.632	0.642	0.74	0.699	0.719	2.017	2.195	2.106	0.4
CsGt	0.669	0.69	0.68	2.268	2.574	2.421	2.355	2.28	2.318	5.024	4.771	4.898	2.009	2.195	2.102	2.4
CsCab	0.701	0.899	0.8	1.016	1.628	1.322	1.322	1.256	1.289	0.911	1.042	0.976	1.017	1.488	1.253	0.4
CsAnt	0.654	0.69	0.672	1.423	1.791	1.607	1.165	1.072	1.119	13.65	1.292	7.471	1.948	2.35	2.149	2.4
CsOmt	0.26	0.302	0.281	0.74	0.992	0.866	1.033	1.104	1.069	0.915	1.021	0.968	0.809	0.959	0.884	0.4
Cs15.46	0.701	0.736	0.719	0.984	1.326	1.155	1.719	1.472	1.596	1.232	1.242	1.237	1.2	1.382	1.291	1.4
Cslds-4	0.598	0.798	0.698	1.886	2.829	2.358	1.917	2.288	2.103	4.211	5.568	4.89	2.043	2.854	2.449	0.4
Cs110	0.299	0.357	0.328	1.593	2.008	1.801	5.157	6.048	5.603	4.378	5.182	4.78	0.965	1.179	1.072	3.4
CsB12D	0.299	0.504	0.402	1.154	1.977	1.566	1.083	1.688	1.385	1.126	1.869	1.497	0.687	1.35	1.018	0.4
Cs14.05	0.331	0.349	0.34	0.659	0.775	0.717	1.165	1.048	1.107	0.346	0.339	0.342	0.783	0.902	0.843	0.4
Cs9.11	0.268	0.287	0.277	0.268	0.271	0.27	0.298	0.288	0.293	0.15	0.161	0.156	0.296	0.301	0.298	0.4

Je nach untersuchtem Gen wurde eine 1.7 bis 10-fache Induktion 3 h nach Verletzung festgestellt. Nach 24h erreichten manche Gene bereits wieder basale Expressionswerte (CsStk, CsPg and CsG), während bei anderen die Induktion weiter anstieg (CsI10). 72h nach Verletzung war bei vielen der untersuchten Gene die Expression noch immer erhöht (siehe Tab. 5).

2.3.3.8 Vergleich der Genexpression nach Verletzung und Inokulation mit v *C. parasitica*

Drei verschiedene Fälle der Interaktion zwischen Verwundungs- und Pathogenrespons wurden anhand der Expression verletzungsresponsiver Gene identifiziert:

- 1) Von *C. parasitica* Inokulation nicht beeinflusste wundinduzierbare Transkripte
- 2) Von *C. parasitica*-Inokulation weiter stimulierte wundinduzierte Transkripte (synergistischer Effekt)
- 3) Wundinduzierte Transkripte die durch *C. parasitica*-Inokulation geringer stimuliert werden (inhibitorischer Effekt).

In den Abb. 53-55 sind die einzelnen Gruppen verwundungsresponsiver Gene 3 bis 72h nach Verletzung und *C. parasitica* Inokulation dargestellt. Verwundungsinduzierte Gene des Proteinmetabolismus wurden, mit Ausnahme der Glycosyltransferase CsGt, von *C. parasitica*-Inokulation nicht beeinflusst. Dagegen wurde bei einer Kinase, einigen Genen der Pathogenabwehr und der Zellwandmodifikation eine stärkere Induktion beobachtet, wenn die Verwundungsstelle mit *C. parasitica* infiziert worden ist. Überwiegend war allerdings eine leichte bis moderate negative Beeinflussung der verletzungsinduzierten Expression festzustellen. Hierbei waren besonders Gene der Wachstumsregulation (Sterolmetabolismus), Calmodulin, und Prolin-reiche Proteingene betroffen.

Eine detailliertere Darstellung der Genexpression nach Verletzung und Inokulation mit v*C. parasitica* wird in beiliegenden Manuskript „Wound-responsive genes of the bark of *Castanea sativa* and their expression upon wounding and chestnut blight infection“ gegeben.

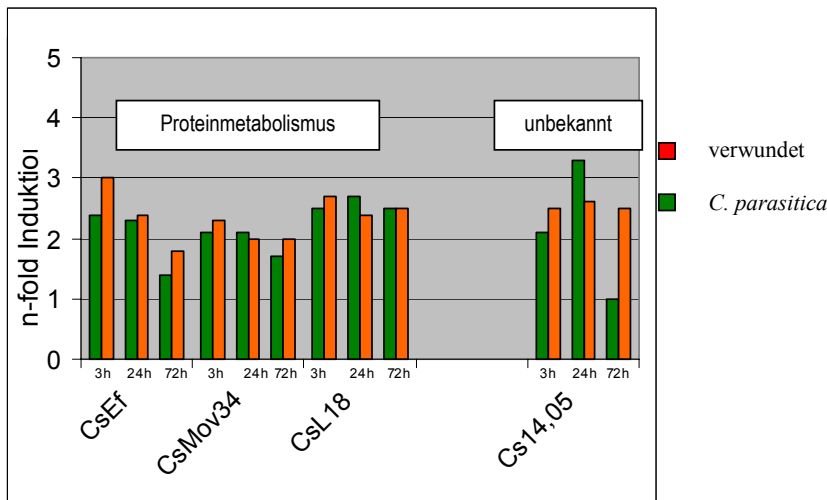


Abb. 53: Expression der von *C. parasitica* Inokulation nicht beeinflusste wundinduzierbare Transkripte.

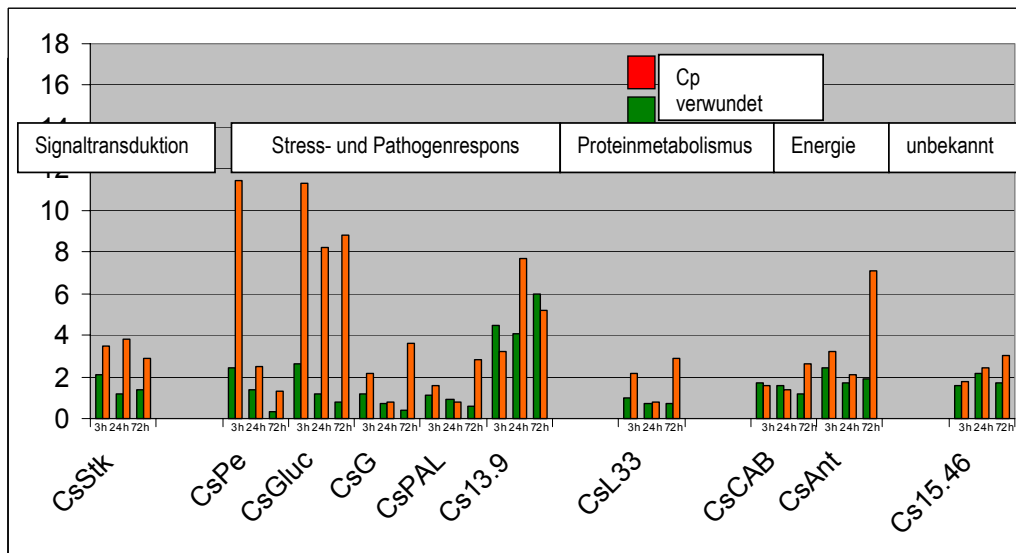


Abb. 54: Expression der von *C. parasitica*-Inokulation weiter stimulierten wundinduzierten Transkripte (synergistischer Effekt).

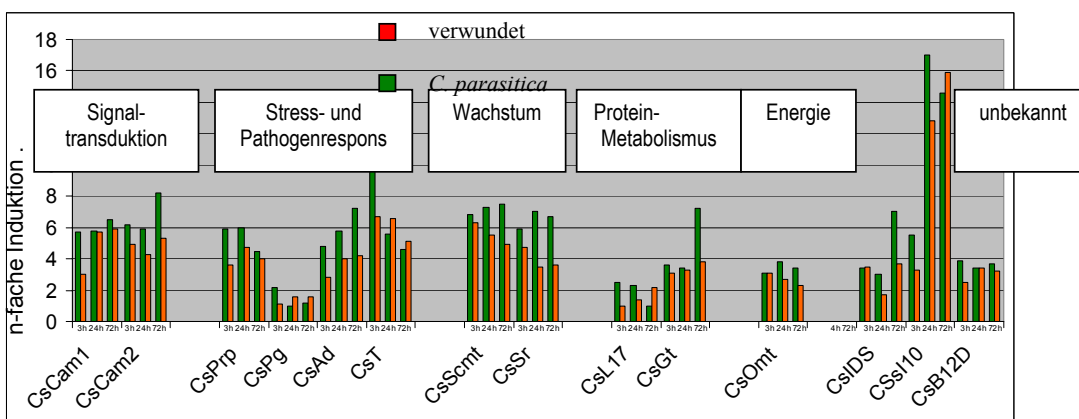


Abb. 55. Wundinduzierte Transkripte die durch *C. parasitica*-Inokulation geringer stimuliert werden (inhibitorischer Effekt).

2.3.3.9 Expression verletzungsimpulzierter Gene in der Borke von Glashaus-Edekastanienpflanzen

Im beiliegendem Manuskript "Isolation of wound inducible genes from *Castanea sativa* stems and expression analysis in the bark tissue" sind die Ergebnisse der Expressionsmessungen von Csstk1, Cscam1, CsCam2, Cs13.9 und Csprp dargestellt. Zusammengefaßt kann festgestellt werden, dass alle diese Gene, welche ursprünglich aus in vitro Sprossen isoliert worden sind, auch in der Borke von Glashauspflanzen nach Verletzung induziert werden. Das

Expressionsmuster in beiden Systemen ist ähnlich. Dieses Ergebnis bestätigt, dass in vitro Pflanzen ein geeignetes System zur Untersuchung baumphysiologischer Reaktionen sind.

2.3.3.10 Expression verletzungsinduzierter Gene in der Borke von *C. parasitica* suszeptiblen und resistenten Pflanzen

Die Expression von β -1,3-Glucanase und γ -Thionin wurde mittels Northern Blot unter Verwendung von aus Edelkastanie isolierten cDNA Sonden in der Borke von *C. parasitica*-suszeptiblen *C. sativa*, und *C.p.* resistenten *C. molissima* Glashauspflanzen 24 und 72h nach Verletzung und Pathogeninokulation gemessen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind im beiliegenden Manuskript „Assessment of stress gene expression in chestnut (*Castanea sativa* mill.) upon pathogen infection (*C. parasitica* (murr.) barr.) and wounding“ dargestellt.

Diese Versuche zeigten, dass beide Gene sowohl in *C. sativa* als auch *C. molissima* exprimiert werden. In *C. parasitica*-sensitiver Kastanie werden beide Gene nach Verletzung und Pathogeninokulation höher exprimiert als in *C. parasitica* resistenter Kastanie. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Gene nicht für Resistenz von Kastanie gegen *C. parasitica* verantwortlich sind.

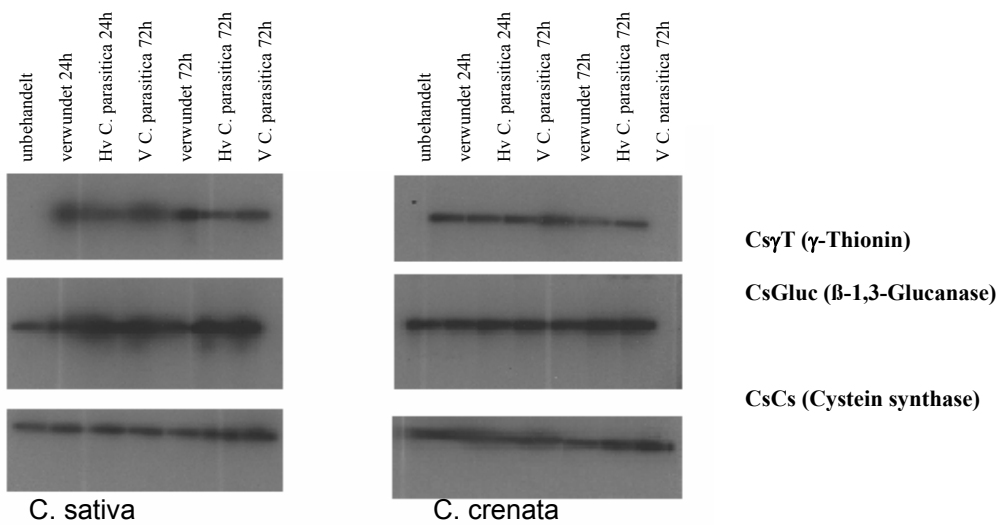


Abb.56. Genexpressionsmessung von β -1,3-glucanase CsGluc und γ -Thionin in der Borke von *C. sativa* und *C. crenata* Glashauspflanzen 24 und 72 h nach Verletzung oder Inokulation mit v oder hv *C. parasitica*. Als Kontrolle für gleichmäßige Ladung wurde parallel eine hybridisierung mit der Sonde CsCs (Cysteinsynthase) durchgeführt.

2.4 Diskussion

2.4.1. Histologische Untersuchungen des Krankheitsverlaufs

Die Untersuchungen zeigten, dass der Aufbau struktureller Barrieren nach Infektion mit hv *C. parasitica* rascher und effizienter verläuft als bei Infektion mit v. *C. parasitica*. Dieser Effekt tritt auch bei biochemischen Abwehrreaktionen (siehe unten) in gleicher Weise auf und ist ein Hinweis darauf, dass v *C. parasitica* von der Pflanze entweder schwerer als Pathogen erkannt wird als hv *C. parasitica* oder den Aufbau von Verteidigungsstrukturen verhindern kann.

2.4.2. Genexpressionsmessungen mit heterologen cDNA Sonden

Heterologe cDNA Sonden spezifisch für die Tabakgene PR2, PR2c, PR3, PR4, PR5, basischer und saurer Klasse III Chitinase wurden ausgewählt, um die PR-Genexpression in Stielen von Edelkastanie in vitro Pflanzen zu messen. Die Experimente zeigen, dass in Kastanie homologe Sequenzen zu diesen Tabakgenen vorkommen und nach Verwundung und Pathogeninokulation auch exprimiert werden.

Eine erhöhte PR-Protein-Aktivität nach Verwundung und Pathogeninokulation wurde bei Proteinanalysen bereits festgestellt (Schafleitner and Wilhelm 1997). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass die beobachtete erhöhte PR-Aktivität auf verstärkte Transkription der entsprechenden Gene zurückzuführen ist. Auch bei anderen Pflanzen wurde gezeigt, dass die Expression von PR-Genen in erster Linie einer transkriptionellen Kontrolle unterliegt (Ward et al., 1991).

In Tabak werden jene Gene, deren Expression im Rahmen dieser Arbeiten an Edelkastanie untersucht wurden, nach Infektion mit Tabakmosaikvirus und einsetzender systemisch induzierter Resistenz verstärkt transkribiert (Ward et al., 1991). Ein wichtiges Signalmolekül hierfür ist Salizylsäure (Hunt et al., 1996). Auch in Edelkastanie wurde eine Akkumulation von Salizylsäure nach Pathogeninfektion und parallel zur Induktion von PR-Genen gefunden (Schafleitner and Wilhelm 1999).

Verstärkte PR-Gentranskription in Folge von Infektion mit inkompatiblen Pathogenen, Elicitorbehandlung oder durch Applikation systemisch induzierte Resistenz verursachender Chemikalien tritt bei vielen Pflanzen auf, wie z.B. in *A. thaliana* (Maleck et al., 2000), Bohne (De Mayer et al., 1999), Mais (Morris et al., 1998), Kartoffel (Abad et al., 1997), Tomate (Oldroyd and Staskawicz 1998), Wein (Busam et al., 1997), Weizen (Molina et al., 1999) und Tabak (Ward et al., 1991). Aber auch kompatible Pathogene oder Verwundung können zur Induktion von PR-Genen oder bestimmten PR-Genklassen führen (Morris et al., 1998, Molina et al., 1999, Cote et al., 1991, Reymond et al., 2000).

Einige PR-Gentranskripte akkumulieren auch in unbehandelten Pflanzen. Dies könnte auf Kreuzhybridisierung der eingesetzten Gensonden mit konstitutiv exprimierten oder entwicklungs gesteuerten PR-Genisoformen zurückzuführen sein (Cote et al., 1991). Es ist aber auch denkbar, dass Stressfaktoren wie Ethylen, denen in vitro Pflanzen in den geschlossenen Kulturgefäßen ausgesetzt sind, eine Akkumulation von PR-Gentranskripten in geringem Ausmaß verursachen.

Die höhere Induktion von PR-Genen durch hv *C. parasitica* als durch v *C. parasitica* weist darauf hin, dass hv *C. parasitica* effizienter von der Pflanze als Pathogen erkannt wird als die virulente Form. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Mais nach Infektion mit Mehltau gemacht (Morris et al., 1998). Der virulente Pilz könnte aber auch die Erkennungsprozesse oder den Pathogenrespons der Pflanze inhibieren. Dabei könnten Gewebenekrosen, wie sie

durch Oxalat oder andere Toxine verursacht werden, Prozesse in der Pflanze, die zur Erkennung des Pathogens oder zur Induktion der Pathogenabwehr dienen, unterbrechen. Diese Experimente bestätigten, dass nicht nur die verringerte Virulenz des Pilzes, sondern auch die verstärkte Pathogenabwehr der Pflanze über den Ausgang der Infektion mit hv und v *C. parasitica* bestimmt.

2.4.3. PAL-Genexpressionsmessung

PAL katalysiert den ersten Schritt der Phenylpropanoidsynthese in Pflanzen. Phenylpropanoide sind eine komplexe Klasse von Sekundärmetaboliten, welche viele wichtige Funktionen in Pflanzen während des „normalen“ Wachstums sowie nach Stresseinwirkung ausführen. PAL wird generell von einer Multigenfamilie kodiert (Kawamata et al., 1997, Wanner et al., 1995) und hat eine besonders wichtige Funktion bei Pathogenresistenz (Mauch-Mani and Slusarenko 1996). PAL ist beispielsweise an der Produktion von meist antimikrobiell wirkenden Phytoalexinen (Fritig et al., 1970, Ahl-Goy et al., 1993) und von Vorläufersubstanzen der Ligninbiosynthese beteiligt. PAL ist auch ein Schlüsselenzym der Salizylsäuresynthese (Mauch-Mani and Slusarenko 1996). Die Auswirkungen verringerter PAL-Aktivität wurde an Tabak untersucht. So ist transgener Tabak mit verringerter PAL Aktivität stärker anfällig gegen *Cercospora nicotianae* (Maher et al., 1994).

Ein genomisches PAL Fragment wurde aus Edelkastanie mittels PCR isoliert. Durch Verwendung degenerierter Primer, welche an verschiedenen Sequenzen des Intronteils des PAL-Gens gebunden haben, wurden mehrere Genfragmente mit unterschiedlicher Länge isoliert. Alle diese Genfragmente dürften laut der durchgeführten Sequenzvergleiche vom selben PAL-Gen stammen.

Die PAL-Expression in Stielen von in vitro Pflanzen wurde mit dem längsten isolierten Fragment mittels Northern Blot gemessen. Diese Experimente zeigten, dass PAL auch in unbehandelten Stielen exprimiert wird. Die Expression steigt nach Verwundung, und noch stärker nach Inokulation mit hv *C. parasitica* an, vergleichbar mit der Expression von PR-Genen. Die höchste PAL-Expression wurde in hv *C. parasitica*-inokulierten Pflanzen festgestellt.

Auch von anderen Pflanzen wurde induzierte PAL-Expression nach Pathogeninfektion (Meier et al., 1993), nach Inokulation mit Mycorrhizapilzen (Biliou et al., 2000), nach Elicitorbehandlung (Dorey et al., 1999), Verwundung (Kato et al., 2000) und durch Applikation von anderen Stressfaktoren, wie z. B. DNA-Crosslinker (Choi et al., 2001) berichtet. Neben transkriptioneller Regulation tritt bei PAL auch posttranskriptionelle Aktivierung auf. Dies dürfte besonders zur SA-Biosynthese nach Pathogeninfektion wichtig sein (Mauch-Mani and Slusarenko 1996). In diesem Fall steigt die PAL-Aktivität innerhalb weniger Minuten bis zu wenigen Stunden nach Behandlung an (Dorey et al., 1999). Die transkriptionelle Induktion von PAL ist langsamer und benötigt einige Stunden bis einige Tage (Kawamata et al 1997, Kang et al., 1998).

Bei Bohne erfolgt die PAL-Transkriptakkumulation rascher und höher nach Infektion mit inkompatiblen als bei kompatiblen Pathogenen (Meier et al., 1993). Vergleichbare Daten wurden auch bei Edelkastanie erhalten, wo der hv Pilz die PAL-Expression stärker stimulierte als die v Isoform. Ähnliche Ergebnisse wurden bei PAL Promotor Aktivitätsstudien an Erbse erhalten, wo Verwundung die PAL-Promotoraktivität lokal verstärkt, die Inokulation mit avirulenten Pathogenen zu einem starken und kompatible Pathogene zu einem schwächeren Anstieg der Promotoraktivität führen (Kawamata et al., 1997).

In Stielen von in vitro Edelkastanie wurde nach Infektion mit hv und v *C. parasitica* ähnliche PAL-Expressionsmuster wie in anderen Pflanzen unter ähnlichen Bedingungen gefunden.

2.4.4. Verletzungsinduzierte Gene in der Borke von Edelkastanie

Die Perzeption von Verwundung und die Weiterleitung des Verwundungssignals ist eine Schlüsselreaktion des Wundresponses. Signalstoffe wie Jasmonat, Methyljasmonat, Ethylen, Kalzium, sowie kalziumbindende Proteine, Systemin und Kinasen sind daran beteiligt (Ryan 2000, McConn et al. 1997).

Verletzung löst verschiedene Stressreaktionen in der Pflanze aus. Dabei wird in der Regel die Verdunstung erhöht; Wassermangel und damit Trockenstress tritt auf. Verletzungen sind auch Eintrittspforten für Pathogene, deshalb werden bei Pflanzen oft Pathogeninhibitoren an der Verwundungsstelle exprimiert (Biggs 1987).

Der Verschluss der Wunde setzt eine Umprogrammierung des umgebenden Gewebes voraus. Zellen müssen dedifferenzieren und zur Teilung angeregt werden. Diese Vorgänge sind durch verstärkte Proteinsynthese gekennzeichnet (Biggs und Stobbs 1986). In verletzter Edelkastanie wurden für alle oben genannten Vorgänge Gene gefunden, die Funktionen innerhalb dieser Prozesse ausführen.

CsStk1, welches für eine Proteinkinase kodiert, und zwei Calmodulingene sind mögliche Signaltransduktionskomponenten. Proteinkinasen werden in der Regel nicht durch erhöhte Transkription, sondern posttranslational, z.B. durch Phosphorylierung durch andere Kinasen aktiviert. Es wurden allerdings bereits auf Transkriptionsebene induzierte, pflanzliche Kinasen beschrieben, die essentiell für den Wundresponse sind (Bögre et al. 1997, Seo et al. 1999). Die selektive transkriptionelle Induktion von Calmodulinisoformen nach Verletzung von Pflanzen wurde von Bergey und Ryan 1999 bei Tomate beschrieben. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass auch in der Borke von Edelkastanie Calmodulinisoformen nach Verwundung erhöht transkribiert werden.

Gene der Pathogenabwehr, wie β -1,3-Glucanase, Germin und γ -Thionin-ähnlicher Proteaseinhibitor wurden ebenso isoliert wie zellwandmodifizierende Enzyme (Polygalacturonase, Pektinesterase, prolinreiche Proteine). Diese Gene sind wahrscheinlich an Umbauprozessen von Zellwänden nach Verwundung beteiligt.

Die erhöhte Expression von ribosomalen Proteinen und von einem Translationsfaktor deckt sich mit bei Verwundung beobachteter verstärkter Translationsaktivität und erhöhter Ribosomenanzahl von Pflanzen (Biggs and Stobbs 1986). Stress beantworteten Zellen meist mit einer Veränderung der Proteinzusammensetzung. Die erhöhte Expression von Komponenten des Proteinabbaus, wie CsMOV34, könnte dabei eine Rolle spielen.

Anderen verletzungsinduzierten Genen werden Funktionen im Steroidmetabolismus (CsScmt, CsSr) zugeschrieben. Phytosterole sind Regulatoren des Zellwachstums. Eine verstärkte Transkription von Genen des Steroidmetabolismus nach Verwundung wurde hier erstmals gezeigt.

Letzlich wurden auch Gene des Energietransports zwischen Mitochondrien und dem Cytosol (CsAnt, CsOmt) durch Verwundung stimuliert. Dies spiegelt einen erhöhten Energiebedarf der Zellen nach Stresseinwirkung wider.

In Edelkastanienstielen werden weitgehend ähnliche Sets von Genen induziert, wie sie bei Verwundung in krautigen Pflanzen bekannt sind und welche auch dort verstärkt exprimiert werden (Reymond et al. 2000, Schenk et al. 2000). Lediglich Gene des Sterolmetabolismus wurden in anderen Pflanzen noch nicht als verletzungsresponsiv beschrieben.

2.4.4.1 Beeinflussung des Verwundungsresponses durch Pathogeninokulation

Pathogeninfektion kann die Expression verwundungsinduzierter Gene in Edelkastanien sprossen in zweierlei Richtung beeinflussen: Bestimmte Gene wurden durch *C. parasitica* gehemmt, andere wurden induziert. Die erhobenen Daten weisen deutlich auf einen Crosstalk zwischen Verwundungs- und Pathogen-induzierten Signaltransduktionswege hin. Durch diese Experimente wurde gezeigt, dass vor allem Gene, die generell von SA induziert

werden, wie z.B. β -1,3-Glucanase, durch *C. parasitica* stärker stimuliert werden als durch Verwundung alleine. Interessanterweise wurde auch ein Kinasegen (Csstk1) durch Pathogeninfektion stärker und anhaltender stimuliert.

Die überwiegende Zahl verwundungsresponsiver Gene wurde durch *C. parasitica*-Infektion mehr oder weniger leicht gehemmt. Dies kann durch von *C. parasitica* verursachte Nekrosen, welche vermutlich auch durch Toxinproduktion verursacht werden, nicht ausreichend erklärt werden. Da die Genexpression in den vorliegenden Versuchen anhand von Kontrollgenen standardisiert worden ist, dürften die gemessenen Unterschiede der Genexpression nicht auf eine generelle Schädigung der Zellen und damit verbundenen verringerten Transkription zurückzuführen sein, sondern vielmehr auf einen spezifischen Einfluss von *C. parasitica* oder mit der Pathogeninfektion in Zusammenhang stehenden Signalstoffen. An dieser Stelle ist SA hervorzuheben, welche die Transkription von JA-abhängigen Gene unterdrückt (Maleck und Dietrich 1999). Ein derartiger Effekt dürfte auch in Edelkastanie auftreten. γ -Thionin dürfte ein Beispiel für ein von JA induziertes und von SA leicht reprimiertes Gen sein. Verwundungsinduzierte Gene, und somit auch der Wundverschluss und die Produktion von antimikrobiellen und zellwandverstärkenden Proteinen wird von *C. parasitica* auf Transkriptionsebene beeinflusst.

2.4.5. Wundinduzierte Genexpression in Glashauspflanzen

Die Expressionsmuster der Signalgene CsStk1, CsCam1 und CsCam2, sowie der Stressresponsogene CsPrp und CsP13.9 in Glashaus- und in vitro Pflanzen waren sehr ähnlich. Dies bestätigt, dass in vitro Pflanzen geeignete Systeme zur Untersuchung baumphysiologischer Reaktionen auf Genexpressionsebene sind.

Der Vergleich der γ -Thionin- und β -1,3-Glucanaseexpression in Kastanienrindenkrebs resistenter und suszeptibler Kastanie zeigte, dass beide Faktoren in beiden Pflanzenspezies nach Verletzung und Pathogenbefall exprimiert werden, allerdings stärker in der Kastanienrindenkrebs-anfälligen Kastanienart. Dies weist darauf hin, dass keiner der beiden Faktoren an der Resistenz beteiligt ist, sondern vielmehr der erhöhte Stress nach Pathogenbefall in suszeptibler Kastanie für die erhöhte Expression verantwortlich sein dürfte. Diese Ergebnisse scheinen denen von Shain und Spalding (1995) zu widersprechen, die eine stärkere Chitinase- und β -1,3-Glucanaseexpression in Kastanienkrebs-resistenter Kastanie festgestellt haben. Allerdings dürfte dieser Gegensatz durch Unterschiede in der Versuchsdurchführung erklärbar sein. Shain and Spalding haben andere Kastanienspezies, nämlich *C. dentata* und *C. crenata*, und nicht wie in den vorliegenden Arbeiten, *C. sativa* und *C. molissima* verwendet. Zweitens haben Shain und Spalding nicht die Expression einer bestimmten β -1,3-Glucanaseisoform gemessen, wie es hier gemacht wurde, sondern die Gesamtaktivität aller β -1,3-Glucanasen bestimmt. Letztlich wurden bei Shain und Spalding die Pflanzen nicht direkt mit Pathogenen, sondern mit Ethylen behandelt. Diese Unterschiede in der Versuchsdurchführung sollten die unterschiedlichen Ergebnisse ausreichend erklären.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann nicht geschlossen werden, dass β -1,3-Glucanase durch *C. parasitica* in resistenter Kastanie generell nicht induziert wird. Die hier widergegebenen Ergebnisse betreffen eine spezifische β -1,3-Glucanaseisoform. Andere β -1,3-Glucanasegene könnten in resistenter Kastanie vorhanden sein, die durch Pathogeninokulation stimuliert werden. Doch wurde durch dieses Experiment klar, dass Kastanienrindenkrebs resistente und suszeptible Kastanie unterschiedlich auf *C. parasitica* Inokulation reagieren.

2.5 Schlußfolgerungen

PR-Proteingene ähnlich derer von Tabak sind in Edelkastanie vorhanden und werden nach Verwundung und Pathogeninfektion exprimiert.

Inokulation mit hv *C. parasitica* stimuliert die PR-Genexpression generell stärker als Verwundung oder Infektion mit v *C. parasitica*. Gleiches gilt für die Expression von PAL.

Aus Edelkastanien in vitro Pflanzen konnten mittels Differential mRNA-Display und anschließendem Screening einer cDNA Bibliothek wundresponsive Gene isoliert werden. Die isolierten Gene zeigen ähnliche Expressionsmuster an in vitro- und Glashauspflanzen. Dies bestätigt, dass in vitro Pflanzen ein geeignetes System zur Untersuchung von baumphysiologischen Reaktionen sind.

Die isolierten wundresponsiven Gene der Borke von Edelkastanie stimmen großteils mit *Arabidopsis*-Genen überein (Reymond et al., 2000, Schenk et al. 2000). Ausnahme: Gene des Sterolmetabolismus wurden hier erstmals als verletzungsresponsiv charakterisiert.

Das Expressionsmuster der isolierten Gene ist ähnlich zu wundinduzierten Genen bei anderen Pflanzen. Das Ausmaß der Transkriptionsstimulation durch Verwundung Induktion liegt zwischen 2- und 10-facher Induktion (Reymond et al., 2000).

Der Einfluss von *C. parasitica* auf die Expression wundresponsiver Gene ist komplex und zeigt an, dass *C. parasitica* nicht generell die Genexpression inhibiert, sondern mit spezifischen Signaltransduktionskaskaden interagiert und auf diese Weise die Genexpression beeinflusst.

C. parasitica hat auf die meisten untersuchten verletzungsresponsiven Gene einen hemmenden Einfluss. Einige Gene werden durch *C. parasitica* stärker stimuliert und nur bei vier Genen bleibt die Expression von der Pilzinfektion unbeeinflusst. Dies weist darauf hin, dass *C. parasitica* einen eher hemmenden Effekt auf die Wundheilung ausübt.

2.6 Literatur

- Abad MS, Hakimi SM, Kaniewski WK, Rommens CM, Shulaev V, Lam E, Shah DM. 1997. Characterization of acquired resistance in lesion-mimic transgenic potato expressing bacterio-opsin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10:635-645.
- Ahl-Goy P, Signer H, Reist R, Aichholz R, Blum W, Schmidt E, Kessmann H. 1993. Accumulation of scopoletin is associated with the high disease resistance of the hybrid *Nicotiana glutinosa* × *Nicotiana debneyi*. *Planta* 191: 200-206.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the cell*. Robertson (ed.), Garland, NY, USA, p. 369.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Bergey DR, Ryan CA. 1999. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* 40:815-823.
- Biggs, A.R. 1987. Occurrence and location of suberin in wound reaction zones in xylem of 17 tree species. *Phytopathology* 77:718-725.
- Biggs AR, Stobbs LW. 1986. Fine structure of the suberized cell walls in the boundary zone and necrophylactic periderm in wounded peach bark. *Can. J. Bot.* 64: 1606-1610.
- Blilou I, Ocampo JA, Garcia-Garrido JM. 2000. Induction of Ltp (lipid transfer protein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J. Exp. Bot.* 51:1969-77.
- Bögre L, Ligterink W, Meskiene I, Barker PJ, Heberle-Bors E, Huskisson NS, Hirt H. 1997. Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9, 75-83.
- Busam G, Kassemeyer HH, Matern U. 1997. Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. *Plant Physiol.* 115:1029-1038.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11:113-116.
- Choi JJ, Klosterman SJ, Hadwiger LA. 2001. A comparison of the effects of DNA-damaging agents and biotic elicitors on the induction of plant defense genes, nuclear distortion, and cell death. *Plant Physiol.* 125:752-62.
- Clarke HR, Davis JM, Wilbert SM, Bradshaw HD Jr, Gordon MP. 1994. Wound-induced and developmental activation of a poplar tree chitinase gene promoter in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 25:799-815.
- Cote F, Cutt JR, Asselin A, Klessig DF. 1991. Pathogenesis-related acidic beta-1,3-glucanase genes of tobacco are regulated by both stress and developmental signals. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4:173-181.
- Creelman RA, Mullet JE 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: Regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 92: 4114-4119.
- De Meyer G, Capieau K, Audenaert K, Buchala A, Metraux JP, Hofte M. 1999. Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:450-458.
- Delaney TP, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Reila M, Kessmann H, Ward E, Ryals J 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266:1247-1250.
- Dorey S, Kopp M, Geoffroy P, Fritig B, Kauffmann S. 1999. Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction,

- phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol.* 121:163-172.
- Farmer E, Ryan CA. 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *Cell* 4:129-134.
- Fritig B, Hirth L, Ourisson G. 1970. Biosynthesis of the coumarins: scopoletin formation in tobacco tissue cultures. *Phytochemistry* 9: 1963-1975.
- Gallagher PW, Syndor TD 1983. Variation in wound response among cultivars of red maple. *J. Am. Soc. Horticult. Sci.* 108: 744-746.
- Dring D. 1971. Techniques for microscopic preparation. In: C. Booth (ed), *Methods in microbiology* 4. Academic press, London.
- Hebard FV, Griffin GJ, Elkins JR 1984. Developmental histopathology of cankers incited by hypovirulent and virulent isolates of *Endothia parasitica* on susceptible and resistant chestnut trees. *Phytopathology* 74: 140-149.
- Hunt MD, Neuenschwander UH, Delaney TP, Weymann KB, Friedrich LB, Lawton KA, Steiner HY, Ryals JA. 1996. Recent advances in systemic acquired resistance research - a review. *Gene* 179:89-95.
- Ito T, Sakaki Y. 1997. Fluorescent differential display. In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 85: *Differential Display Methods and Protocols*. Liang P. and Pardee AB, (eds.). Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA.
- Kang MK, Park KS, Choi D. 1998. Coordinated expression of defense-related genes by TMV infection or salicylic acid treatment in tobacco. *Mol. Cells* 8:388-392.
- Kärenlampi SO, Airaksinen K, Miettinen ATE, Kokko HI, Holopainen J, Kärenlampi LV, Karjalainen RO 1994. Pathogenesis-related proteins in ozone-exposed Norway spruce (*Picea abies*(Karst)L). *New. Phytol.* 126: 81-89.
- Kato M, Hayakawa Y, Hyodo H, Ikoma Y, Yano M. 2000. Wound-induced ethylene synthesis and expression and formation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase, ACC oxidase, phenylalanine ammonia-lyase, and peroxidase in wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima*. *Plant Cell Physiol.* 41:440-447.
- Kawamata S, Shimoharai K, Imura Y, Ozaki M, Ichinose Y, Shiraishi T, Kunoh H, Yamada T. 1997. Temporal and spatial pattern of expression of the pea phenylalanine ammonia-lyase gene1 promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell Physiol.* 38:792-803.
- Kobayashi N, Horikoshi T, Katsuyama H, Handa T, Takayanagi K. 1998. A simple and efficient DNA extraction method for plants, especially woody plants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology* 4:76-80.
- Kolattukudy PE 1984. Biochemistry and function of cutin and suberin. *Can.J.Bot.*62: 2918-2933.
- Kramer JP, Kozlowski TT 1979. *Physiology of Woody Plants*. Academic Press, London.
- Li N, Parsons BL, Liu DR, Mattoo AK 1992. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology* 18: (3) 477-87.
- Liang P, Pardee AB. 1997. Differential Display: A general protocol. In: *Differential Display Methods and Protocols*. P. Liang and AB. Pardee (eds.), Humana Press, totowa, NJ, USA, pp. 3-13.
- Linhorts HJM, Melchers LS, Mayer A, van Roekel JSC, Cornelissen BJC, Bol JF. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8756-8760.
- Maher EA, Bate NJ, Ni W, Elkind Y, Dixon RA, Lamb CJ (1994) Increased disease susceptibility of transgenic tobacco plants with suppressed levels of preformed phenylpropanoid products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 7802-7806.
- Maleck K, Dietrich RA. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4:215-219.

- Maleck K, Levine A, Eulgem T, Morgan A, Schmid J, Lawton KA, Dangl JL, Dietrich RA. 2000. The transcriptome of *Arabidopsis thaliana* during systemic acquired resistance. *Nat. Genet.* 26:403-410.
- Martin JM, Syndor TD 1987. Differences in wound closure rates in 12 tree species. *Hort.Sci.* 22: 442-444.
- Mauch-Mani B, Slusarenko AJ. 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8: 203-212.
- McConn M, Creelman RA, Bell E, Mullet JE, Browse J. 1997. Jasmonate is essential for insect defense in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:5473-5477.
- Meier BM, Shaw N, Slusarenko AJ. 1993. Spatial and temporal accumulation of defense gene transcripts in bean (*Phaseolus vulgaris*) leaves in relation to bacteria-induced hypersensitive cell death. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6:453-466.
- Molina A, Gorlach J, Volrath S, Ryals J. 1999. Wheat genes encoding two types of PR-1 proteins are pathogen inducible, but do not respond to activators of systemic acquired resistance. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12:53-58.
- Morgan PW, Drew MC 1997. Ethylene and plant responses to stress. *Pysiol.Plant.* 100:620-630.
- Morris SW, Vernooij B, Titatarn S, Starrett M, Thomas S, Wiltse CC, Frederiksen RA, Bhandhufalck A, Hulbert S, Uknes S. 1998. Induced resistance responses in maize. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11:643-658.
- Muntanola-Cvetkovic M, Vukojevic J, Mihaljcevic M. 1991. The systemic nature of the sunflower disease caused by *Diaprothe helianthi*. *Canadian Journal of Botany* 69:1552-1556.
- Oldroyd GED, Staskawicz BJ. 1998. Genetically engineered broad-spectrum disease resistance in tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:10300-10305.
- Parsons TJ, Bradshaw HD Jr, Gordon MP 1989. Systemic accumulation of specific mRNAs in response to wounding in poplar trees. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 86:7895-7899.
- Raskin I 1992. Role of salicylic acid in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.*43:439-463.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE.2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707-720.
- Ryan CA. 2000. The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1477:112-121.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press Vol. 1-3.
- Schafleitner R, Buchala A, Wilhelm E 1997. Class III chitinase expression and salicylic acid accumulation in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) after challenge with hypovirulent and virulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. *Phyton* 39:191-196.
- Schafleitner R, Wilhelm E. 1997. Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. on the intercellular PR-proteins and protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:323-332.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11655-11660.
- Seo S., Sano H, Ohashi Y. 1999. Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11:289-298.
- Shain L 1993. The induction of antifungal hydrolases in forest trees. Abstracts of the 6th International Congress on Plant Pathology, Joint Annual Meeting of the American Phytopathological Society and the Mycological Society of America. 126.

- Shain L, Spalding RJ. 1995 Quantitation of chitinase and β -1,3-glucanase in bark of American and Chinese chestnut. *Phytopathology* 85:1142.
- Shigo AL. 1986. A new tree biology. Shigo and Trees Associates. Durham, NH, USA.
- Thamarus KA, Furnier GR. 1998. Temporal and genotypic variation of wound-induced gene expression in bark of *Populus tremuloides* and *P. grandidentata*. *Can. J. For. Res.* 28: 1611-1620.
- Vance CP, Kirk TK, Sherwood RT 1980. Lignification as a mechanism of disease resistance. *Annu.Rev.Phytopathol.*18:259-288.
- Wanner LA, Li G, Ware D, Somssich IE, Davis KR. 1995. The phenylalanine ammonia-lyase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 27:327-338.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux J-P, Ryals JA. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094.

3 VORTRÄGE, BEITRÄGE FÜR TAGUNGSBÄNDE, POSTERPRÄSENTATION UND PUBLIKATIONEN

3.1 Vorträge

Wilhelm Eva: Aspekte der in vitro Vermehrung von Forstgehölzen. Haberlandt Symposium, IAM, Univ. f. Bodenkultur, Wien. 8-9. Oktober 1998

Wilhelm Eva. Bekämpfung des Edelkastanienkrebses (*Cryphonectria parasitica*) mittels hypovirulenter Pilzstämmen und antagonistischer Bakterien 1. Symposium Phytopathologie im Gartenbau, Univ. f. Bodenkultur, Wien, 19.-20. November 1998

Mayerhofer T., Vortrag: AFLP in der Stammidentifizierung von *Cryphonectria parasitica*. Genetic Analyzer - User Meeting, Perkin Elmer, Wien, 17. 11. 1998

Mayerhofer T. Molecular methods for description of *Cryphonectria parasitica*. Workshop on Tree physiology and pathogens and Pests, COST G4, Sopron, 5.-9. Mai 1999

Schafleitner R, Hohl K, Wilhelm E. Isolation of wound-inducible genes from *Castanea sativa* by the Differential mRNA Display method. Workshop on Tree physiology and pathogens and Pests, COST G4, Sopron, 5.-9. Mai 1999

Wilhelm Eva: Chestnut Culture in Austria and investigations to control chestnut blight. EUFORGEN-Tagung (IPGRI) Gmunden, 6. September 1999

Schafleitner, R., K. Hohl Und E. Wilhelm, 1999: Isolierung wundinduzierter Gene aus Edelkastanie (*Castanea sativa*). 2. Symposium: Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, Univ. für Bodenkultur, Wien, Institut für Obst- und Gartenbau, 27.-30. September 1999.

Wilhelm Eva. Tissue culture of broadleaved forest trees with special emphasis on plant-microbe interactions. Vortrag am Botanischen Institut der Univ. Wien, 17. Dezember 1999

Wilhelm Eva: Chestnut Culture in Austria, COST G4, Sopron, Ungarn. 6. Mai 1999

Sauer Ursula, Wilhelm Eva: Induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa*, COST G4, Sopron, Ungarn. 6. Mai 1999

Mayerhofer Thomas, Wilhelm Eva: Molecular methods for identification of *Cryphonectria parasitica*, COST G4, Sopron, Ungarn. 6. Mai 1999

Wilhelm Eva: Chestnut Culture in Austria and investigations to control chestnut blight. EUFORGEN-"Noble Hardwood-Network" Tagung (IPGRI) Gmunden, Österreich. 6. September 1999

Sauer Ursula, Wilhelm Eva: Induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa*, COST G4, Thessaloniki, Griechenland, 4-6. Mai 2000

Schafleitner Roland and Wilhelm Eva: Isolation of wound-responsive genes of chestnut, COST G4, Thessaloniki, Griechenland, 4-6. Mai 2000

Wilhelm Eva: Tissue culture of broadleaved forest tree species with special emphasis on plant-microbe interactions. Habilitationsvortrag am Institut für Ökologie und Naturschutz der Univ. Wien, 26. Juni 2000.

Wilhelm Eva: Macro- and Micropropagation of forest tree species: International training course on: Conservation and management of forest genetic resources in eastern Europe. Organized by the International Plant Genetic Resources Institute and Austria's Federal Ministry of Agriculture and Forestry, Environment and Water Management in technical collaboration with FAO Forestry Department, in Gmunden, 29 April – 12 May 2001

Wilhelm Eva: "Major Achievements after 5 years of COST G4 „Multidisciplinary Chestnut Research“ COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Meeting of all four WGs, Final Management Committee Meeting in Ascona, Switzerland, May 2001

Schafleitner Roland and Wilhelm Eva: Wound- and pathogen-induced genes in chestnut in vitro stems and in the bark of chestnut greenhouse trees COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Meeting of all four WGs, Final Management Committee Meeting in Ascona, Switzerland, May 2001

Sauer Ursula and Wilhelm Eva: Improving maturation and germination conditions for SE of European chestnut. COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Meeting of all four WGs, Final Management Committee Meeting in Ascona, Switzerland, May 2001

Sauer Ursula and Wilhelm Eva: Somatic embryogenesis in European chestnut COST 843, WG2 "Advanced propagation techniques" 2nd-Meeting in Thessaloniki, 23th September 2000.

Wilhelm Eva and Roland Schafleitner: Wound and pathogen-induced genes in chestnut in vitro stems and in the bark of chestnut greenhouse trees. Life Sciences 2001. Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT, EMBnet Foundation, 25.9.01. Wien, Book of Abstracts, p. 31.

Schafleitner Roland und Eva Wilhelm: Isolierung und Charakterisierung von verwundungs- und pathogeninduzierter Gene aus in vitro Edelkastaniensprossen sowie deren Expression in der Borke von Glashauspflanzen. 3. Symposium für Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, 17-20. September 2001 Wien

Wilhelm Eva, Kudera Ursula, Rühmer Thomas und Michael Stelzl: Formulierung und Anwendung von hypovirulenten Kastanienrindenkrebstämmen (*Cryphonectria parasitica*) in Österreich. 3. Symposium für Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, 17-20. September 2001 Wien.

3.2 Beiträge für Tagungsbände

Schafleitner, R., K. Hohl and E. Wilhelm, 1999: Isolation of wound-inducible genes from *Castanea sativa* by the differential mRNA-display method. COST G4 „Multidisciplinary Chestnut Research“, Workshop of WG 1 „Tree Physiology“ and WG 3 „Pests and Pathogens“ 6.-10. Mai 1999, in Sopron, Ungarn. Book of Abstracts: pp. 27-29.

Sauer, U. and E. Wilhelm, 1999: Induction of somatic embryogenesis in *Castanea sativa*. COST G4 „Multidisciplinary Chestnut Research“, Workshop of WG 1 „Tree Physiology“ and WG 3 „Pests and Pathogens“ 6.-10. Mai 1999, in Sopron, Ungarn. Book of Abstracts: pp. 23-24.

Mayerhofer, T. and E. Wilhelm, 1999: Molecular methods for identification of *Cryphonectria parasitica*. COST G4 „Multidisciplinary Chestnut Research“, Workshop of WG 1 „Tree Physiology“ and WG 3 „Pests and Pathogens“ 6.-10. Mai 1999, in Sopron, Ungarn. Book of Abstracts: pp. 36-38.

Schafleitner, R., K. Hohl Und E. Wilhelm, 1999: Isolierung wundinduzierter Gene aus Edelkastanie (*Castanea sativa*). 2. Symposium: Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, Univ. für Bodenkultur, Wien, Institut für Obst- und Gartenbau, 27.-30. September 1999, Beitragsband: 163-165.

Wilhelm Eva: Macro- and Micropropagation of forest tree species: beim International training course on: Conservation and management of forest genetic resources in eastern Europe Organized by the International Plant Genetic Resources Institute and Austria's Federal Ministry of Agriculture and Forestry, Environment and Water Management in technical collaboration with FAO Forestry Department, in Gmunden, 29 April – 12 May 2001

Schafleitner Roland und Eva Wilhelm: Wound- and pathogen-induced genes in chestnut in vitro stems and in the bark of chestnut greenhouse trees, COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Book of Abstracts in Ascona, Switzerland, May 2001

Sauer Ursula and Eva Wilhelm: Improving maturation and germination conditions for SE of European chestnut. COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Book of Abstracts in Ascona, Switzerland, May 2001

Kudera Ursula and Eva Wilhelm: Occurrence and diversity of VC-groups of *Cryphonectria parasitica* in Austria, COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, Book of Abstracts in Ascona, Switzerland, May 2001

Schafleitner Roland und Eva Wilhelm: Isolation of wound- inducible genes from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and differential expression upon pathogen attack (*Cryphonectria parasitica*) IUFRO-Meeting on Molecular Biology of Forest Trees / Stevenson, Washington, USA, 22-27 July 2001, Book of Abstracts and on Line

Schafleitner Roland und Eva Wilhelm: Isolierung und Charakterisierung von verwundungs- und pathogeninduzierter Gene aus in vitro Edelkastaniensprossen sowie deren Expression in der Borke von Glashauspflanzen. 3. Symposium für Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, 17-20. September 2001 Wien, Tagungsband, p. 19.

Wilhelm Eva, Kudera Ursula, Rührer Thomas und Michael Stelzl: Formulierung und Anwendung von hypovirulenten Kastanienrindenkrebstämmen (*Cryphonectria parasitica*) in Österreich. 3. Symposium für Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, 17-20. September 2001 Wien, Tagungsband, pp. 19-20.

Sauer Ursula and Eva Wilhelm: Improving maturation and germination conditions for somatic embryos from European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Life Sciences 2001. Joint Annual

Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT, EMBnet Foundation, 25.9.01. Wien, Book of Abstracts, p. 68.

Wilhelm Eva, Ursula Kudera, Thomas Mayerhofer and Roland Schafleitner: Biocontrol of chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*) and molecular investigations on the host (*Castanea sativa* mill.) specific interactions. Life Sciences 2001. Joint Annual Meeting of the ÖGBM, ÖGGGT, ÖGBT, EMBnet Foundation, 25.9.01. Wien, Book of Abstracts, p. 69

3.3 Posterpräsentationen

Schafleitner und Wilhelm: Chestnut Blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes; 2nd International Chestnut Congress, Bordeaux, Frankreich, 19-24. September 1998

Schafleitner und Wilhelm: Chestnut Blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes; ICPP 1998, Edinburgh, Schottland, 9.-16. August 1998

Schafleitner und Wilhelm: Chestnut Blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes; Eurosilva Tagung, Obergurgl, Österreich, 10.-14. September 1998

Schafleitner R. u. Wilhelm E., Chestnut blight: monitoring the host response with heterologous cDNA probes. 1. Symposium Phytopathologie im Gartenbau, Univ. f. Bodenkultur, Wien, 19.-20. November 1998 und Haberlandt Symposium, IAM, Univ. f. Bodenkultur, Wien. 8-9. Oktober 1998

Mayerhofer T., Wilhelm E., Molecularbiological identification of *Cryphonectria parasitica*., 1. Symposium Phytopathologie im Gartenbau, Univ. f. Bodenkultur, Wien, 19.-20. November 1998

Kudera U. und Wilhelm E. Anwendung biotechnologischer Methoden gegen den Kastanienrindenkrebs. 1. Symposium Phytopathologie im Gartenbau, Univ. f. Bodenkultur, Wien, 19.-20. November 1998

Schafleitner, R. and E. Wilhelm, 1998: Chestnut Blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes; ICPP (Intern. Congress of Plant Pathology) 1998, Edinburgh, Schottland, 9.-16. August 1998. Book of Abstracts: 1.3.2

Schafleitner Roland, Wilhelm Eva: Isolation of wound-inducible genes from *Castanea sativa* by the differential mRNA display method. Forest Biotechnology 1999 UIFRO 2.04-06, Oxford, GB.11.-16. Juli 1999

Schafleitner Roland, Wilhelm Eva: Isolation of wound-inducible genes from *Castanea sativa* by the differential mRNA display method.2. Symposium Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, Universität für Bodenkultur, Wien, 27. – 30. September 1999

Schafleitner Roland, Wilhelm Eva: Differentially expressed genes in wounded stem tissue of chestnut in vitro shoots. World Congress on in Vitro Biology, San Diego, Kalifornien, 10-15. Juni 2000

Schafleitner Roland, Wilhelm Eva: Differentially expressed genes in wounded stem tissue of chestnut in vitro shoots. 3. Symposium Phytomedizin und Pflanzenschutz im Gartenbau, Universität für Bodenkultur, Wien, 27. – 30. September 2000

Kudera Ursula and Eva Wilhelm: Occurrence and diversity of VC-groups of *Cryphonectria parasitica* in Austria, COST G4: Multidisciplinary Chestnut Research, Final Conference, in Ascona, Switzerland, May 2001

Schafleitner Roland and Eva Wilhelm: Isolation of wound- inducible genes from chestnut (*Castanea sativa* Mill.) and differential expression upon pathogen attack (*Cryphonectria parasitica*) IUFRO-Meeting on Molecular Biology of Forest Trees / Stevenson, Washington, USA, 22-27 July 2001

3.4 Publikationen

Wilhelm, E., U. Kudera, T. Mayerhofer Und R. Schafleitner, 1998: Bekämpfung von Edelkastanienrindenkrebs (*Cryphonectria parasitica*) mittels hypo-virulenter Pilzstämme und antagonistischen Bakterien. 1. Symposium Phytopathologie im Gartenbau, Universität für Bodenkultur Wien, 19.-20. November 1998: Beitragsband: 40-41.

Wilhelm, E., Arthofer W., Schafleitner, R., And B. Krebs, 1998: *Bacillus subtilis* an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*) as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 105-108.

Wilhelm, E. 1999: Tissue culture of forest trees. Haberlandt Symposium, Vienna 8-9 Oct. 1998 Abstr., In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:163-164

Schafleitner, R. And E. Wilhelm, 1999: Chestnut blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes. Haberlandt Symposium, Vienna, 8-9 Oct. 1998 Abstr., In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:177.

Schafleitner, R. and E. Wilhelm, 1999: Chestnut blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes. Haberlandt Symposium, Vienna, 8-9 Oct. 1998 Abstr., In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 35:177.

Schafleitner, R. and E. Wilhelm, 1999: Chestnut blight: Monitoring the host response with heterologous cDNA probes. Acta Horticulture 494: 481-486.

Schafleitner, R., A. Buchala and E. Wilhelm, 1999: Class III chitinase expression and salicylic acid accumulation in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) after challenge with hypovirulent and virulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. Phyton 39: 191-196.

Wilhelm, E. 2000. Tissue culture of forest tree species with special emphasis on plant-microbe interactions. Habilitationsschrift an der Formal- und Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Wien.

Schafleitner R. 2001 Modulation of Gene Expression in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Stem Tissue in Response to Wounding and Elicitation with Virulent and Hypovirulent Chestnut Blight (*Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr) Dissertation TU Wien

Schafleitner R. and E. Wilhelm. Isolation of wound-inducible genes (serine-threonine kinase, two calmodulin isoforms and two novel genes) from *Castanea sativa* stems and expression analysis in the bark tissue. Plant Physiol Biochem (accepted)

Ballester, A., L. Bourrain, E. Corredoira, J.C. Gonçalves, C-L Le, M.E. Miranda-Fontaiña, M.C. San-José, U. Sauer, A. M. Vieitez and E. Wilhelm: Micropropagation of chestnut. Forest, Snow and Landscape Research accepted

Roland Schafleitner and Eva Wilhelm: Assessment of stress gene expression in chestnut (*Castanea sativa* mill.) upon pathogen infection (*C. parasitica* (murr.) barr.) and wounding. Forest Snow and Landscape Research accepted.

4 PUBLIKATIONSMANUSKRIPTE

4.1 Assessment of stress gene expression in chestnut (*Castanea sativa* mill.) upon pathogen infection (*C. parasitica* (murr.) barr.) and wounding. Publication accepted, Forest, Snow and Landscape Research.

Roland Schafleitner and Eva Wilhelm, Austrian Research Center Seibersdorf, A-2444 Seibersdorf, Austria.

E-mail: roland.schafleitner@arcs.ac.at, eva.wilhelm@arcs.ac.at

Abstract

The expression of pathogen-related (PR-) proteins was measured by northern blot analysis in wounded and pathogen-challenged chestnut *in vitro* stems using heterologous probes. It showed that hypovirulent *C. parasitica* triggered PR-protein gene transcription strongly, but also virulent *C. parasitica* and wounding caused an accumulation of PR-transcripts, although to a lesser extent.

Further investigations focussed on the wound response of chestnut and on the influence of pathogen infection on the expression of wound-responsive genes. Wound-responsive genes have been isolated from chestnut stems by differential mRNA display and comprised genes involved in signalling, pathogen and stress response, growth regulation, protein metabolism, light and energy related genes and genes of unknown function. Comparison of the expression pattern of the isolated genes revealed that *C. parasitica* inoculation altered the expression of wound responsive genes: Some groups, predominantly pathogen defence genes, e.g. β -1,3-glucanase, were strongly induced, when *C. parasitica* was applied into the wounds, whereas others, such as growth regulating genes were highly expressed, when the plants were only wounded and no fungal inoculum was present in the wound.

Introduction

The blight fungus *Cryphonectria parasitica* (murr.) barr., originating from China and Japan, was accidentally imported to the United States and further introduced to Europe, where it caused massive losses of *Castanea sativa* (mill.). Chestnut blight destroys the bark and the cambium and causes wilting and death of distal tree parts by interrupting the transport of water and nutrients (For reviews see Anagnostakis 1987, Heiniger and Rigling 1994). Besides virulent (v) *C. parasitica* strains, hypovirulent (hv) strains of this fungus have been identified that harbour a double stranded RNA (dsRNA) virus causing the hypovirulent phenotype.

Previous analysis of the chestnut-*C. parasitica* interaction indicated that host factors, such as pathogen-related (PR)-proteins might influence the resistance of chestnut to *C. parasitica* (Shain and Spalding 1995, Vannini et al. 1992, Schafleitner and Wilhelm 1997).

Pathogen infection generally triggers a defence response of the host through activation of signalling pathways upon elicitor binding to plant receptors (Nürnberg 1999), leading to the expression of PR-proteins, including β -1,3-glucanases, chitinases and other proteins which might have antimicrobial function (Hunt et al. 1996).

In order to investigate the plant response of chestnut to virulent and hypovirulent *C. parasitica* infection, we have measured the expression of PR-proteins of chestnut using heterologous probes. Furthermore we examined how the wound response of chestnut is altered by pathogen infection. *C. parasitica* is a wound parasite, so the wound response of the tree could have an impact on the outcome of the host pathogen interaction.

Formatiert

Material and methods

Plant and fungal material

In vitro chestnut shoots of the clone GG10 were micropropagated as described by Schafleitner and Wilhelm (1997), greenhouse plants were grown from seeds on a peat-perlite mixture in containers in the greenhouse under ambient light and temperature conditions. 14 months old seedlings were used for inoculation experiments. The virulent *Cryphonectria parasitica* strain AW 30, isolated from a virulent canker in Forchtenstein, Austria, and the isogenic hypovirulent strain Ko8, resultant by conversion of AW30 with the hypovirulent strain IHB2, provided by L. Radósz, University of Agricultural Sciences, Debrecen, Hungary, were cultured as described by Schafleitner and Wilhelm (1997).

Wounds were applied by cutting the bark with a scalpel under sterile conditions, one wound per nodal segment was administered. Virulent or hypovirulent *Cryphonectria parasitica* was inoculated by application of 1 mm³ of fungal mycelium into wounds, which were formed as described above.

RNA isolation

Defoliated stems of *in vitro* shoots or bark tissue from branches of greenhouse plants were rapidly frozen in liquid nitrogen and ground to a fine powder in pre-cooled steel containers in a Retsch Mill (Haan, Germany). Total RNA was isolated either with the RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany), or according to Chang et al. (1993). Poly-A-RNA was purified using poly-T coated Dynabeds (Dyna, Heidelberg, Germany).

Differential Display, cDNA library construction and screening, sequencing and sequence analysis

Differential mRNA Display was performed using three different 3' one-base anchored oligo dT primers and 24 different 13-mer arbitrary primers essentially as described by Liang and Pardee (1997). cDNA fragments of interest were isolated and confirmed for differential expression by reverse northern dot blot according to Wan and Erlander (1997). cDNAs of differentially expressed genes were blunt-end cloned (Novagen, Darmstadt, Germany) and used to screen a cDNA library of wounded chestnut stems.

A cDNA library of wounded chestnut stems was constructed using the SMART PCR cDNA library construction kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA), the cDNA was packed in phage particles with the Gigapack III Gold packaging extract (Stratagene, La Jolla, Ca, USA). Library screening was performed as suggested by the manufacturer of the cDNA library kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Isolated cDNA clones were sequenced (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and further characterized by comparison with database annotated sequences, using the BLAST standard tool for nucleic acid and protein analysis (Altschul et al. 1990).

Northern Blots

3 or 10 µg of total RNA per lane, purified from the bark tissue of *in vitro* or greenhouse plants, was separated by denaturing agarose gel electrophoresis and immobilised on nylon membranes (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, UK), as described by Lessard et al. (1997). PR-gene probes were obtained by amplifying cDNA inserts of pBluescript plasmids corresponding to PR2, 2c, 3, 4, 5, class III basic and acidic chitinase of tobacco, which were obtained from J. Ryals (Syngenta, Triangle Park, NC, USA) and from D. Klessig (Rutgers University, NJ, USA). cDNA probes specific for chestnut wound-inducible genes isolated in the course of this study were excised from TripEx2 plasmids. The probes were ³²P labelled by random priming (Prime it, Promega, Madison, WI, USA) and used for hybridisation.

Reverse Northern Dot Blot

cDNA probes for wound responsive genes were excised from TripEx2 plasmids by restriction with *ECO* RI and *HIN* DIII, and spotted onto 14 nylon membranes (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire UK), as described by Wan and Erlander (1997). mRNA of wounded or

Cryphonectria parasitica, inoculated chestnut *in vitro* shoots harvested 3h, 24h and 3 days after treatment was reverse-transcribed to cDNA (Superscript II, Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA), in the presence of 50 μ Ci 32 P-cytosine triphosphate. 2×10^6 counts per minute (cpm) of each cDNA batch were used for hybridization. After autoradiography, the spots were excised from the membrane, and the radioactivity emitted from each spot was determined with a Beckmann LS 7000 liquid scintillation counter.

Cluster analysis of expression patterns

The cpm data were processed as described by Reymond et al. (2000) and subjected to cluster analysis according to Eisen et al. (1998), applying the software provided under <http://rana.stanford.edu/clustering> (cluster.exe and treeview.exe).

Results and discussion

The assessment of PR 2, 2c, 3, 4 and 5 transcription in chestnut *in vitro* stems 3 and 7 days after challenge by virulent and hv *C. parasitica* using heterologous probes showed that PR genes were induced slightly by wounding, but generally more strongly by *C. parasitica* inoculation. For some genes hv *C. parasitica* had a stronger stimulatory effect than the v strain (Fig. 1). Wounding caused accumulation of PR2, PR2c, PR5 and acid class III chitinase transcripts on day three. The wound-responsive induction persisted at least till day seven, except for acidic class III chitinase. Infection with hv *C. parasitica* caused an up-regulation of PR2, PR2c, PR3 and PR5 on day three. On day seven these transcripts were found still highly expressed, additionally an induction of PR4, acid and basic class III chitinase, and a stronger stimulation of PR3 was detected at this time point. V *C. parasitica* caused an increase of transcription of PR2, PR2c, PR3, PR5 and basic class III chitinase on day three and five. The induction caused by hv *C. parasitica* was stronger than by v *C. parasitica* for PR2, PR2c on both harvesting days, for PR5 on day three and for PR3, PR4, acid and basic class III chitinase on day seven. These results show that defence responses to chestnut blight are differentially induced by hv and v forms of the fungus, where the hv fungus had a stronger and more persistent stimulatory effect than the v strain for most of the tested genes.

To assess the influence of *C. parasitica* on the stress gene expression of chestnut in more detail, a collection of wound-inducible genes of chestnut stems has been established by isolating wound-responsive genes from chestnut stems by differential mRNA display and subsequent cDNA library screening. The functions of the wound-inducible genes as deduced by sequence comparison to known genes are listed in table 1. The isolated wound-inducible genes could be attributed to six different groups: (1) signalling genes, (2) pathogen and stress response genes, (3) genes of growth regulation, (4) protein metabolism, (5) light and energy related genes and (6) unknown genes.

By reverse northern dot blot, the expression patterns of these genes upon wounding and *C. parasitica* infection was assessed and quantified by liquid scintillation counting. These experiments revealed that a wound-inducible isoform of a β -1,3-glucanase gene was more strongly and more persistently expressed in *C. parasitica*-inoculated than in wounded plants. Also germin and pectin esterase was strongly stimulated by pathogen inoculation than by wounding alone. In contrast, the expression of some wound-inducible genes seemed to be delayed or inhibited by pathogen inoculation. This is the case for a γ -thionin like gene, calmodulin, a proline-rich protein gene and putative growth regulator genes, such as sterol metabolism genes. Cluster analysis of the expression patterns of the wound-inducible genes upon wounding or pathogen infection revealed different expression patterns: early or late induction, persistent or transient induction of the isolated genes upon wound or pathogen treatment (not shown).

In the bark of greenhouse plants, serine-threonine kinase and calmodulin genes were stimulated by wounding, similarly to *in vitro* plants (Fig. 2a), except the serine-threonine kinase seemed to be much stronger induced in the greenhouse than in *in vitro* plants. Also, pathogen defence genes were found to be expressed in bark tissue of greenhouse plants (Fig.

2b): γ -thionin was strongly induced by wounding and pathogen infection, whereas β -1,3-glucanase was also expressed in untreated bark, slightly stimulated through wounding and strongly by *C. parasitica* infection.

From these results we can draw the following conclusions:

Hv *C. parasitica* stimulated PR-gene expression more strongly than the virulent strain. This indicated that chestnut more readily recognised the hv pathogen and more efficiently induced defence mechanisms against this pathogen.

Wounding of the bark induced an array of genes, involved in different metabolic processes, similar to wounding of herbaceous plants (Reymond et al. 2000). Some of these genes, particularly those putatively involved in pathogen defence, were further stimulated by pathogen infection. In contrast, genes involved in growth regulation, were slightly repressed by *C. parasitica* inoculation. It can be concluded that *C. parasitica* had both a stimulating or a repressing effect on wound-responsive genes of chestnut, dependent on the genes and on the time-point after infection.

References:

- Altschul S.F.; Gish W.; Miller W.; Myers E.W.; Lipman D.J., 1990: Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anagnostakis S.L., 1987: Chestnut Blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 29: 23-37.
- Chang S.; Puryear J.; Cairney J., 1993: A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11: 113-116.
- Eisen M.B.; Spellman P.T.; Brown P.O.; Botstein D., 1998: Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 95: 14863-8.
- Heiniger U.; Rigling D., 1994: Biological control of chestnut blight in Europe. *Ann. Rev. Phytopath.* 32: 581-599.
- Hunt M.D.; Neuenschwander U.H.; Delaney T.P.; Weymann K.B.; Friedrich L.B.; Lawton K.A.; Steiner H.Y.; Ryals J.A., 1996: Recent advances in systemic acquired resistance research - a review. *Gene* 179: 89-95.
- Lessard P.; Decroocq V.; Thomas M., 1997: Isolation and analysis of messenger RNA from plant cells: cloning of cDNAs. *In Plant molecular biology – a laboratory manual*. Ed. Clark M.S., Springer Verlag, Berlin, pp 154-198.
- Liang P.; Pardee A.B., 1997: Differential display, a general protocol. *In Methods in Molecular Biology*, Vol 85. *Differential Display Methods and Protocols*. Eds. P. Liang and A.B. Pardee. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 3-12.
- Nürnberg T., 1999: Signal perception in plant pathogen defense. *Cell.Mol.Life Sci.* 55: 167-182.
- Reymond P.; Weber H.; Damond M.; Farmer E.E., 2000: Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 707-20.
- Schafleitner R.; Wilhelm E., 1997: Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (murr.) barr on the intercellular pathogen related proteins and on total protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* mill.). *Phys. Mol. Plant Pathol.* 51: 323-332.
- Shain L.; Spalding R.J., 1995: Quantitation of chitinase and β -1,3-glucanase in bark of American and Chinese chestnut. *Phytopathology* 85: 1142.
- Vannini A.; Magro P.; Beritognolo I., 1992: Host polyphenoloxidase activity and fungal oxalate production in the host-parasite Interaction *Castanea sativa* - *Cryphonectria parasitica*. In: *Proceedings of the International Chestnut Conference*. Eds. Double M.L.; MacDonald W.L., West Virginia University, Morgantown, USA.
- Wan J.S.; Erlander M.G., 1997: Cloning differentially expressed genes by using differential display and subtractive hybridisation. *In Methods in Molecular Biology*, Vol 85: *Differential*

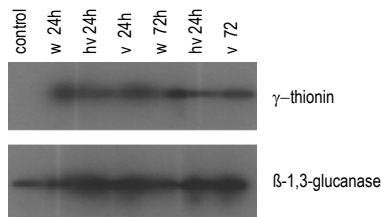
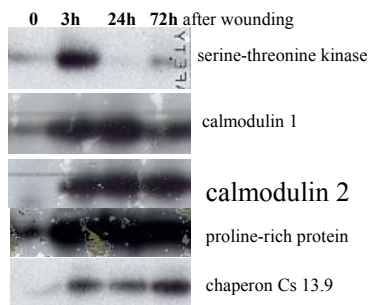
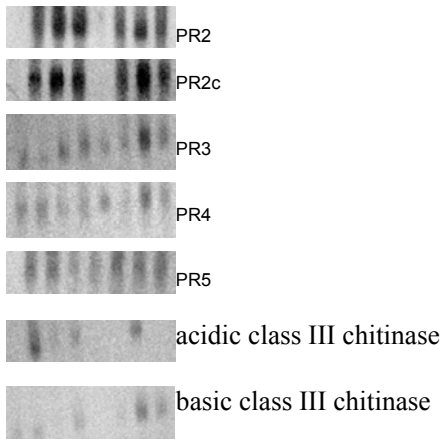
Display Methods and Protocols. Eds. P. Liang and A.B. Pardee. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge Mag. Ursula Kudera, Austrian Research Centre for providing us with the fungal strains. This work was financially supported by the Austrian Federal Ministry of Agriculture, Forestry and Environment and by the Austrian Federal Ministry of Education, Science and Culture.

control day 3
w day 3
hv day 3
v day 3
control day 7
w day 7
hv day 7
v day 7

Fig. 1: PR-gene expression assessment using heterologous probes: control: untreated plants, w: wounded, hv: hv. *C. parasitica*-infected plants, v: v *C. parasitica*- infected plants.



A

B

Fig.2: Expression assessment of wound-responsive genes in the bark of *C. sativa* greenhouse plants. A) assessment of the expression of signalling and stress response genes 3 to 72h after wounding. B) assessment of wound-response and pathogen defence genes upon wounding or infection with hv and v *C. parasitica* 24 to 72h post wounding.

Table 1. Expression levels of wound-responsive genes in *in vitro* plants expressed as n-fold induction compared to basal expression in untreated plants. W: wounded plants, Cp: v *C. parasitica*-inoculated plants.

	w 3h	w 24h	w 72h	Cp 3h	Cp 24h	Cp 72h
(1) Signalling genes						
serine-threonine-kinase	2.1	1.2	1.4	3.5	3.8	2.9
calmodulin 1	5.7	5.8	6.5	3	5.7	5.9
calmodulin 2	6.2	5.9	8.2	4.9	4.3	5.3
(2) Pathogen and stress response						
proline-rich protein	5.9	6	4.5	3.6	4.7	4
chaperon Cs13.9	4.5	4.1	6	3.2	7.7	5.2
Polygalacturonase	2.2	1	1.2	1.1	1.6	1.6
pectin esterase	2.4	1.4	0.3	11.4	2.5	1.3
arginine decarboxylase	4.8	5.8	7.2	2.8	4	4.2
γ -thionin	10.2	5.6	4.6	6.7	6.6	5.1
β -1,3-glucanase	2.6	1.2	0.8	11.3	8.2	8.8
Germin	1.2	0.7	0.4	2.2	0.8	3.6
PAL	1.1	0.9	0.6	1.6	0.8	2.8
(3) Growth regulation (sterol metabolism)						
sterol-C-transferase	6.8	7.3	7.5	6.3	5.5	4.9
sterol reductase	5.9	7	6.7	4.7	3.5	3.6
(4) Protein metabolism						
elongation factor	2.4	2.3	1.4	3	2.4	1.8
CsMov34	2.1	2.1	1.7	2.3	2	2
ribosomal protein L17	2.5	2.3	1	1	1.4	2.2
ribosomal protein L18	2.5	2.7	2.5	2.7	2.4	2.5
ribosomal protein L33	1	0.7	0.7	2.2	0.8	2.9
O-glycosyltransferase	3.6	3.4	7.2	3.1	3.3	3.8
(5) Light and energy						
chlorophyll A/B binding protein	1.7	1.6	1.2	1.6	1.4	2.6
adenine-nucleotid-transferase	2.4	1.7	1.9	3.2	2.1	7.1
oxoglutarate-malate-translocase	3.1	3.8	3.4	3.1	2.7	2.3
(6) Genes with unknown function						
Cs15.46 unknown	1.6	2.2	1.7	1.8	2.4	3
IDS-4-like	3.4	3	7	3.5	1.7	3.7
Cs110 unknown	5.5	17	14.6	3.3	12.8	15.9
B12D	3.9	3.4	3.7	2.5	3.4	3.2
Cs14.05 unknown	2.1	3.3	1	2.5	2.6	2.5
Cs9.11 (control gene 2)	1	1	0.8	1	1	1.3

4.2 Isolation of wound inducible genes from *Castanea sativa* stems and expression analysis in the bark tissue. Publication accepted, Plant Physiology and Biochemistry, 10. September 2001.

Roland Schafleitner, Eva Wilhelm

Environmental and Life Sciences Division, ARC Seibersdorf research G.m.b.H., A-2444 Seibersdorf, Austria

Fax number: 0043 50550 3653

E-mail: roland.schafleitner@arcs.ac.at

Abstract - In vitro shoot cultures of chestnut (*Castanea sativa* Mill.) were used to identify wound-responsive genes. cDNA fragments of genes induced 3 and 24 h after wounding were isolated from stem tissue by the differential mRNA display method. Corresponding partial and full length clones were isolated from a cDNA library of wounded stems. Putative wound responsive signalling genes (serine-threonine protein kinase, two calmodulin genes), a novel wound responsive putative chaperon gene (Csp13.9), and a new family of proline-rich proteins were identified. Northern analysis of bark tissue from 14 month old seedlings revealed strong induction of these genes upon wounding in a temporal manner. Therefore we conclude that these early wound inducible genes are involved in the wound response of bark tissue.

Keywords: bark/calmodulin/chaperon/chestnut/kinase/proline-rich proteins/wound response

Abbreviations:

cv	cultivar
MAP kinase	mitogen-activated protein kinase
PRP	proline-rich protein

1. Introduction

Sweet Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) was chosen as a model tree to study the wound response due to its sensitivity toward the wound parasitic fungus *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr, which causes a devastating disease, chestnut blight, in European and American chestnut (*Castanea sativa* and *Castanea dentata* (Marshal) Borkh. [15]. Closing of wounds is a crucial mechanism to preserve the integrity of the plant tissue and to inhibit the ingress of microorganisms and insects. Structural changes such as necrosis, polyphenol deposition, thickening of cell walls, suberin accumulation and lignification have been observed and the “Compartmentalization of Decay of Tree“ model has been proposed [40], which describes the establishment of barrier zones in the bark and the sap wood of trees upon wounding and/or pathogen ingress.

However, our knowledge of the molecular response of the stem tissue, especially of woody plants, upon wounding is very small. The molecular response of plants upon wounding has been intensively investigated in annual plants and in leaves of trees. There, signalling factors such as jasmonic acid, ethylene, abscisic acid and systemin were shown to transmit the wound response [23]. Furthermore the role of mitogen-activated protein (MAP) kinases in the establishment of the wound reaction has been documented [18] and the subsequent systemic induction of several wound responsive genes, so-called swrps (systemic wound response proteins) comprising proteinase inhibitors, leucine aminopeptidase, polyphenol oxidase and others have been reported over a time span of several hours to several days after wounding [9, 32, 34].

The time constraints of the physiological processes leading to the wound response of herbaceous plants can be emphasised as such: minutes after wounding, calcium influx and MAP kinase catalysed protein phosphorylation takes place, leading to the production of 12-oxophytodienoic acid and jasmonic acid from membrane phospholipids [21, 23, 39]. This signalling cascade initiates the production of wound-inducible enzymes.

We assume that a wide array of molecular events is necessary to initiate the wound response in the bark, such as suberisation and protection of the wounded site from invading pathogens. In order to investigate the changes of gene transcription in the stem tissue of woody plants, we performed a differential mRNA display comparing the mRNA populations in wounded and unwounded stems of in vitro chestnut plants 3 and 24 h after wounding and characterised the differentially expressed genes. This time frame was chosen to target factors which are expressed in an early stage of the wound response and which might also be involved in signalling. The expression of the isolated genes was investigated in the bark of greenhouse seedlings 0 to 3 days after wounding.

2. Results

A differential mRNA display experiment comparing the gene expression in chestnut in vitro plant stem tissue after wounding with control plants yielded 58 apparently differentially expressed cDNA fragments between 150 and 600 bp long. Twenty seven cDNA fragments gave signals of different strength after hybridising with ³²P-dCTP labelled cDNA from wounded or untreated shoots, indicating that these 27 fragments were indeed derived from differentially expressed genes. The remaining 31 cDNA fragments were considered to be false positives and not further investigated, except one fragment, termed Cscs (GenBank accession n° AF417300). This cDNA showed around 81 % sequence identity and 88 % similarity to cysteine synthases of *Solanum tuberosum* (GenBank accession n° BAB18760) and of *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession n° T47936) and therefore was considered to represent a partial cDNA clone of a chestnut cysteine synthase. It was processed as the differentially expressed cDNA fragments and used as a control probe for northern blot experiments monitoring the differential expression of wound induced genes.

Sequence analysis of the display fragments in most cases revealed no significant sequence similarities to known genes. Therefore a cDNA library of wounded chestnut in vitro stems was constructed in λ -TriplEx2 vectors, and 1.1×10^6 plaque forming units were screened with the confirmed differentially expressed cDNA fragments in order to isolate partial or full length cDNAs for further analysis. A minimum of 10 positive clones per hybridisation round were randomly picked, converted to plasmids, sequenced and further analysed.

Sequence comparisons on the nucleic acid and on protein levels gave significant similarities to known genes. Three cDNA clones were shown to be orthologs of genes involved in signalling. Furthermore, a group of proline-rich protein genes and a gene with similarities to chaperons were isolated. These genes are subsequently described in more detail.

2.1 Serine-threonine kinase

A 285 bp display fragment hybridised with cDNA inserts of the library with high sequence similarity to serine-threonine kinases. The longest cDNA clone isolated comprised 758 bp and was designated as Csstk1 (GenBank accession n° AF334831).

The open reading frame of the Csstk1 cDNA encoded a 221 amino acid putative protein (fig. 1). Significant sequence similarity to the consensus sequence of serine-threonine kinase domains was detected from position 1 to 163. The deduced amino acid sequence of CsSTK1 was compared with serine-threonine kinase protein sequences of other plants. The closest resemblance was found to the serine-threonine kinases ASK1 of *A. thaliana* and BSK2 of *Brassica napus* (cv Naehan), with 81.3 % amino acid sequence identity and 85 % similarity. 79.4 % identity and 83.9 % similarity was found between CsSTK1 and the serine-threonine kinase SPK3 of *Glycine max* (L.) Merril (fig. 2). From these sequence similarities we concluded that Csstk1 indeed encodes a serine-threonine kinase. However, the alignment with ASK1, BSK2 and SPK3 as well as the lack of a 5' untranslated spacer on the CsSTK1 cDNA strongly indicated that CsSTK1 is only a partial clone representing only the 3'-terminal part of a serine-threonine kinase gene of chestnut.

2.2. Calmodulin

cDNA library screening with a 272 bp and a 223 bp display fragment led to the isolation of two different cDNA clones, exhibiting high sequence homology to calmodulin genes of other plants. One cDNA, termed Cscam1 (GenBank accession n° AF334832), 586 bp long, contained a 321 bp open reading frame encoding a 107 amino acid putative protein (fig. 3). The second cDNA with a length of 668 bp cDNA, designated Cscam2 (GenBank accession n° AF334833), exhibited a 444 bp open reading frame encoding a 148 amino acid putative peptide (fig. 4).

Comparison of the predicted amino acid sequences of CsCAM-1 and CsCAM-2 revealed 89.7 % sequence identity between the two putative peptides (fig. 5). Alignment of the CsCAM amino acid sequences with calmodulin protein sequences of other plants yielded similarities

of 97 % and higher between CsCAM1 and *Fagus sylvatica* L. CAMFs-1, *Vigna radiata* cv. Berken, VirCALM-1, *Phaseolus vulgaris* L. PvCAM-1, *G. max* SCAM-3 and the *A. thaliana* calmodulin genes AthCAM 3 and ACAM 6.

CsCAM2 resembled more the calmodulin proteins of *S. tuberosum* cv Russet Burbank PCM1 and *Lycopersicon esculentum* Mill. TomCALM-1, with more than 91.9 % sequence identity (fig. 5). Based on the sequence similarities we conclude that the CsCAM1 and CsCAM2 cDNAs encode calmodulin genes, however members of two different isoforms. As can be deduced from the alignments, the Cscam1 cDNA represents only a partial calmodulin cDNA.

The full length calmodulin protein CsCAM2 has a calculated molecular mass of 16.9 kDa and a pI of 4.15. The domain organisation of CsCAM2 is similar to calmodulin genes of other organisms. Conserved Ca²⁺ binding EF-domains, indicated in fig. 4, from amino acid position 84 to 112 and from 120 to 145, as well as two EPS15 homology domains, which recognise proteins exhibiting an asn-pro-phe pattern [38], from amino acid position 4 to 68 and 81 to 145, were detected and are shown in fig. 4. Also in CsCAM1, a pair of putative EF-hands and one EPS15 homology domain was detected (fig. 3).

2.3. Proline-rich proteins

Sequencing of 20 cDNA clones, which were isolated from the cDNA library by screening with a display probe, revealed a gene family of proline-rich protein genes, termed Csprp. These genes contained two repeated sequences, each 51 and 52 bp long, which showed 84 to 88 % sequence identity to a repeat sequence appearing five times in a *Vitis vinifera* L. grip15 proline-rich cell wall protein gene [10] (GenBank accession n° AJ237984).

Three different subgroups of the Csprp family were identified: The untruncated prp gene was termed Csprp1 (GenBank accession n° AF334835). In Csprp2 (GenBank accession n° AF334836), at position 127 to 135, a 9 bp deletion and in Csprp 3 (GenBank accession n° AF334837) a 12 bp deletion is located at position 127 to 138. Furthermore the polyadenylation site was found to be variable and appeared at the positions 630, 634 or 640 (fig. 6).

The putative open reading frame of the Csprp 1 gene is 354 long and encodes a 118 amino acid hypothetical protein. The open reading frames of the isoforms Csprp 2 and Csprp 3 are 348 and 345 bp long, putatively encoding 116 and 115 amino acid peptides respectively. CsPRP 3 lacks one pro-pro-his-lys repeat and in CsPRP2 one pro-pro-his-lys -repeat was found replaced by a gln residue (fig. 6).

The proline content of the CsPRP1 protein reaches 23.7 %, 22.4 % in CsPRP2 and 22.8 % in the CsPRP3 isoform. The molecular mass of the untruncated protein is 12.9 kDa and the pI was calculated to be 9.63.

By comparing the CsPRP protein sequences with sequences annotated in the SMART database [38], a signal peptide cleavage site near the N-terminus between amino acids 22 and 23 was found. The presence of the signal peptide cleavage site suggests that the CsPRP proteins are located in the extracellular space. The putative cleavage site is followed by four proline rich domains. The domain organisation of CsPRP1 is depicted in fig. 6.

2.4. Putative chaperon CsP13.9

To a 703 bp cDNA fragment (GenBank accession n° AF334834) isolated by library screening with a 426 bp display fragment, no significant sequence similarity on nucleic acid level to other genes was found. In silico translation of the largest open reading frame, comprising 393 base pairs, gave a 131 amino acid hypothetical protein (fig. 7), exhibiting 46 % amino acid sequence identity and 58 % similarity to a 129 amino acid heat shock protein classified as bundle sheath defective protein of *Zea mays* L. [6], GenBank accession n° Q9XF14. Furthermore it showed 56 % sequence identity and 70 % similarity to the *A. thaliana* F1P2.200 hypothetical protein (GenBank accession n° Q9SN73). Around 20 % identity and 23 % similarity with DnaJ proteins of bacteria such as *Coxiella burnetii* (GenBank accession n° P42381), *Brucella melitensis* biovar Ovis (GenBank accession n° Q05980) and DnaJ-

proteins of other bacteria were found (fig. 8). Three DnaJ- motifs with the sequence CxxCxGxG and an additional CxxCxG motif were detected in the CsP13.9 protein, as in the F1P2.200 protein of *A. thaliana*, in the *Z. mays* BSD2 and in the bacterial DnaJ proteins (fig. 8). However, the predicted CsP13.9 protein lacks, like BSD2, the N-terminal J domain that defines the DnaJ class of chaperons, a cysteine and phenylalanine rich internal domain, as well as a large C-terminus shared in most DnaJ proteins [20], and seems to belong to a new class of stress responsive chaperons. The molecular mass of the CsP13.9 was calculated to be 13.9 kDa and the pI 8.72. The glycine content was found to be relatively high (12.2 %).

2.5. Expression analysis in the bark tissue of greenhouse plants

All tested genes were found to be induced 3 h after wounding. Northern hybridisation with cDNA probes specific for chestnut Csstk1, Csprp and Csp13.9 yielded a single band for each probe. In order to also obtain single band signals for the two calmodulin isoforms, the display fragments, comprising the untranslated 3'ends of the genes and not the cDNAs were used, because the high sequence similarity of the coding sequences of the two calmodulin cDNAs would have yielded excessive cross-hybridisation between the two genes. A stimulation of all these genes 3 h after wounding was observed, however, the expression patterns of the signalling and stress response genes investigated in the course of this work over a time span of 72 h were particular for each gene (fig. 9), and no concerted up-regulation was observed.

Csstk1 transcripts were present at low levels in untreated plants. Three h after wounding, strong Csstk1 mRNA accumulation was assessed. After 24 h, the Csstk1 mRNA level declined sharply, virtually no Csstk1 mRNA could be detected. 72 h post treatment, again a basal level of Csstk1 transcripts, as observed in control plants, was present.

Cscam1 was expressed in untreated plants at a low extent. Its expression was induced 3 h, and even stronger 24 h after wounding. Three d after, the Cscam1 mRNA amount decreased slightly. Cscam2 was not detectable in unwounded plants. The expression of this isoform was found to be induced 3 h post treatment, increased further and was highest 72 h after wounding.

Csprp mRNA was present also in untreated plants, but wounding stimulated the transcript accumulation distinctly and the mRNA remained elevated 72 h after wounding. Csp13.9 mRNA was hardly detectable in untreated plants. Three h post wounding, the transcription of this gene was found to be induced and the transcript levels remained elevated at least for 3 days.

3. Discussion

Genes putatively involved in signalling and stress responses were induced upon wounding in stem tissue from in vitro cultured chestnut plants as well as in the bark tissue from seedlings grown in the greenhouse. The wound-inducible genes from bark tissue revealed similarity to a variety of known genes. The functional analysis may give some insight into the early wound response of woody plants.

3.1. Wound inducible chestnut orthologs of signalling genes

The wound-inducible serine-threonine kinase of chestnut CsSTK1 was found to be highly similar to two protein kinases, ASK1 and ASK2 of *A. thaliana*, whose specific functions are unknown. The ASK 1 and 2 transcripts were described to be most abundant in leaf tissue but were also expressed in other organs and their expression was highly affected by the light regime [28].

Protein phosphorylation is one of the major mechanisms for controlling cellular functions in response to external signals. Also after wounding, activation of protein kinases was commonly observed and it was assumed that these enzymes participate in transducing wound signals [4]. Serine-threonine kinases in plants also are also involved in the oxidative burst after pathogen attack and therefore play an important role in the control of various stress responses in plants [29].

Kinases generally are activated by post-translational mechanisms, inhibition of transcription or translation normally has no effect on kinase activation [4]. The transcriptional induction of kinase genes was less often observed, however, Seo et al. [39] reported the rapid accumulation of transcripts of a kinase termed WIPK over a time span between 1 and 30 min after wounding in tobacco plants and showed that this kinase is essential for triggering the jasmonate production in wounded tobacco. Likewise in leaves of *Medicago sativa* a MAP kinase termed MMK4 was transcriptionally activated upon wounding [4]. The transcript accumulation was observed over a time span of about 2 h after wounding, then the transcript level declined to basal levels. In chestnut stems, the Csstk1 serine-threonine kinase transcript was found to be up-regulated 3 h post wounding and subsequently declined to basal levels. The observed time span of transcriptional up-regulation of this kinase was a little longer than that of WIPK and MMK4. However, higher kinase expression is not necessarily linked with higher activation. Recently it was shown that the inactivation mechanism of kinases may be degradation and a subsequent transcriptional up-regulation compensates for the loss of the kinase protein [16]. This hypothesis could explain the enhanced expression of a serine-threonine kinase in chestnut bark.

The two isolated putative calmodulin genes showing striking sequence similarity to calmodulin genes of other plants, belonged to two different calmodulin groups. Cscam1 had more similarity to a *F. sylvatica* calmodulin than to CsCam2, the second calmodulin isolated from *C. sativa*, which was closer related to a potato calmodulin. Whereas in animals the calmodulin multigene family produces only a single form of calmodulin [11, 26], in plants divergent calmodulin isoforms with up to 22% divergent amino acid residues have been described. They seem to play different roles and might have different target enzymes [22].

A typical structural feature of calmodulin is the presence of so called EF hands, which act as Ca²⁺ binding domains that occur at least in pairs. Each motif consists of a 12 residue loop flanked on either side by a 12 residue alpha-helix. EF-hands undergo a conformational change upon calcium ion binding [30]. Cscam2 contains two domains showing sequence similarity to EF-hand pairs and the partial calmodulin cDNA Cscam1 still has a pair of EF-hands. Together with the sequence data, this strongly indicates that these genes indeed encode calmodulin genes.

Calmodulin is a key factor in Ca²⁺ sensing and transport. Specifically, the calmodulin-dependent regulation of protein kinases illustrates the potential mechanisms by which calmodulin can recognise and generate affinity and specificity for effectors in a Ca²⁺-

dependent manner [21]. The transcriptional up-regulation of calmodulin genes through a wound stimulus or in response to treatment with systemin, methyl jasmonate, or linolenic acid was already described for tomato leaves [3]. Calmodulin mRNA accumulation was found 30 min to about 2 h after wounding. The similarities in timing between the synthesis of calmodulin mRNA and the mRNAs for signal pathway components led to the hypothesis that calmodulin gene expression may be associated with the signalling cascade that activates defence genes in response to wounding [3]. However experiments dissecting the jasmonate signalling pathway in *Arabidopsis* led to the assumption that Ca^{2+} and calmodulin seem to act downstream of jasmonate in the jasmonate-dependent pathway, and downstream of reversible phosphorylation events that differentially regulate jasmonate-dependent and jasmonate-independent wound signal transduction pathways [23]. In our experiment, calmodulin expression was stimulated over a time span longer than 72 h post wounding, in contrast to the findings of Bergey and Ryan [3]. This difference in calmodulin accumulation could be due to the fact that we investigated stems in contrast to Bergey and Ryan [3], who did their study on leaves. Calmodulin was found to function in expanding cells and tissues under mechanical strain [5] and the wound response in stems include cell division and growth in order to close the wound, which might explain the longer lasting calmodulin transcript accumulation that was observed in our study. Moreover, the up-regulation of calmodulin was monitored both in green stems of in vitro plants and in the bark tissue of greenhouse grown seedlings, indicating that similar wound response mediating components are acting in bark and green stem tissue of chestnut.

3.2. Wound-inducible chestnut orthologs to stress response genes

Proline-rich proteins have been described for a variety of plants and their presence has been shown in different organs and different developmental stages [e.g. 12, 35, 44]. The PRPs detected in wounded chestnut stems showed sequence similarity to the grip 15 PRP gene of *V. vinifera* [10]. The proline residues in CsPRP were associated with histidine and lysine in the form of (his) lys-pro-pro repeats. Similar repeats appear, in addition to the PRP of *V. vinifera*, in cell wall prps of *Glycine max* [17], in nodulins [19], in PRPs of young tomato fruits [35] and in extensins of carrot [8] and snapdragon [2]. The presence of a putative signal peptide suggests a targeting of the chestnut PRP to the cell wall, as also described for many other prps, e.g. of *Sorghum vulgare* [31].

Sequence heterogeneity as observed in the chestnut PRPs, for example the lack of a lys-pro-pro repeat and different poly A- addition sites, has not been described previously, but PRP families of other plants show differences in pI, amino acid composition and in the size of the mature protein [17].

Up-regulation of PRP gene transcription upon wounding was shown previously for extensin-like PRPs of tobacco [13] and for PRPs of *Z. mays* [42]. Secretion a PRP was monitored by Ryser et al. [33] in different cell types of soybean and bean during lignification.

PRPs in the cell wall interact with peroxidases, which control the crosslinking level of cell-wall proteins and thus determinate the rigidity of the cell wall and influence the growth of the cells [27]. Their general function seems to be modification of the cell wall properties. CsPRPs, as putative extracellular PRPs could have an analogous function in chestnut bark.

CsP13.9 showed the highest sequence similarities to BSD2 of maize [6] and to a hypothetical protein of *Arabidopsis*, F1P2.200 and shares with these proteins the similarity to DnaJ chaperons of bacteria, which however is restricted to C-rich repeats in the carboxy-terminal part of the plant proteins. The sequence similarity between BSD2 and the DnaJ proteins provides some insight into the function of BSD2, as described in [6]. The DnaK (heat shock proteins Hsp70) system of chaperones, including the DnaJ (Hsp 40) and GrpE proteins, is an essential component of the protein metabolism both in the cytosol and in organelles [14]. They play an active role in regulating cellular events such as protein degradation,

morphogenesis and cell cycle progression. These proteins interact sequentially to prevent premature folding of nascent polypeptides and to transfer unfolded proteins to other chaperon systems [41]. The C residues in the particular arrangement CxxCxGxG were shown to be sufficient for the chaperone activity [41]. In CsP13.9 the C-rich domain was present three times, and a fourth repeat, missing one G residue, was also present. This leads to the speculation that CsP13.9 could have chaperone function, similar to BSD2. However, in contrast to BSD2, no chloroplast targeting sequence could be detected in CsP13.9. The upregulation of a DnaJ-like protein in response to wounding indicates that chaperone-like proteins are involved in the reaction of the plant after wounding.

In summary, the genes described here were found to be distinctly up-regulated after wounding in a temporal manner, both in tissue culture plants and in the bark of trees grown in the greenhouse. This indicates that these genes indeed are involved in the temporal wound response of the bark.

Serine-threonine kinase, calmodulin and proline-rich protein genes have been described already for herbaceous plants [3, 13, 32, 39, 42]. This shows that factors participating in the wound response of herbaceous plants also play a role in woody tissue. To elucidate the role of these wound-inducible genes in detail, more data on the spatial and temporal expression of these genes, as well as on cellular components interacting with these proteins will be necessary.

4 Methods

4.1. Plant material

4.1.1. *C. sativa* in vitro shoots (clone GG10) were cultivated as described in [37]. Shoots, at least 17 cm high and with 3 mm minimal stem diameter at the basis, were used for the differential mRNA display experiments and for the cDNA library construction. Wounds were applied by cutting the bark of the shoots with a scalpel under sterile conditions, opening a wound of about 10 mm² surface. One wound per nodal segment was administered. The plant material was harvested at the same day time (2 pm) to avoid biases through day time specific differentially expressed genes.

4.1.2. *C. sativa* greenhouse seedlings were germinated on a peat-perlite mixture in containers and grown in a greenhouse under ambient light conditions were used for expression studies. During summer, 14-month-old leafy plants were treated by cutting vertical lesions into the bark of the current year shoots with a sterile scalpel. The wounded branches were harvested 3, 24 and 72 h after the treatment. Unwounded plants were used as a control. Again harvesting of bark tissue was performed at the same day time (2 pm) for each treatment, immediately frozen in liquid nitrogen and further processed for RNA isolation. For each treatment, bark samples of two different trees were pooled. The experiment was repeated twice yielding identical results.

4.2. RNA isolation

Stem tissue (2 g) from in vitro cultures and 3 g of bark from the seedlings were frozen in liquid nitrogen and grounded to a fine powder in pre-cooled steel containers in a Retsch mill (Haan, Germany). Total RNA was extracted as described in [7], RNA was quantified spectrophotometrically according to [36].

4.3. Differential mRNA display and reverse northern dot blot

The differential mRNA display was performed according to [25] with slight modifications using three different one-base anchored oligo dT primers, T₁₁-A, T₁₁-C, T₁₁-G and 24 13-mer arbitrary primers (GeneHunter, Nashville, TN, USA). All reactions were set up in duplicates. Twenty five ng of DNase I treated total RNA was reverse transcribed with 200 units Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA), PCR amplified, size fractionated, excised from the display gel and reamplified as described in [25]. The amplified cDNA fragments of apparently wound-induced genes were visualised by agarose gel electrophoresis and purified from the agarose gel (QiaexII Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Differential expression of the genes corresponding to isolated cDNAs was verified by reverse northern dot blot, performed as described [43]. Confirmed differentially expressed cDNAs were blunt ligated into pSTBlue-1 (Novagen Darmstadt, Germany) and amplified in *Escherichia coli* according to the supplier of the kit.

4.4. cDNA library construction

Total RNA was extracted from stem tissue of wounded in vitro plants 3 h post treatment as described in [7]. Two µg of total RNA was used to construct a cDNA library with the SMART PCR cDNA library construction kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) and packed into λ-phage particles (Gigapack III Gold packaging extract, Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the instructions of the supplier. The recombination efficiency was tested on 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside – isopropyl β-D-thiogalactopyranoside plates and the insert size of the phages was determined by colony PCR using λ-Tripl-Ex amplification primer according to the instruction of the kit supplier. The library was titrated and amplified as described by the manufacturer of the kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA).

4.5. Screening of the cDNA library, sequencing and sequence analysis

The screening of the library with differentially expressed cDNA fragments obtained by the differential mRNA display was performed as suggested by the manufacturer of the cDNA

library kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Phages giving a positive hybridisation reaction were isolated, converted to pTriplEx2 plasmids according to the instructions of the kit supplier and sequenced on an ABI 376 sequencer using the Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, USA). The sequences obtained were analysed using the Dnasis software (Hitachi Software Engineering Co. Ltd). For comparisons with the GenBank annotated sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) the BLAST standard tool for nucleic acid and protein analysis was applied [1]. Data mining was performed using the following tools: PredicProtein (<http://cubic.bioc.columbia.edu/>), ProSite (<http://www.expasy.ch/prosite/>) ProDom (<http://protein.toulouse.inra.fr/prodom.html>), MaxHom (<http://mathbio.nimr.mrc.ac.uk/~nbrown/mview/>) and SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

4.6. Northern blot

Total RNA (10 µg per lane), purified from the bark tissue of greenhouse plants according to [7], was separated by denaturing agarose gel electrophoresis and immobilised on a nylon membrane (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire, UK), essentially as described in [24]. Probes were obtained by amplifying cDNA inserts corresponding to wound-inducible genes from the TriplEx2 plasmids using TriplEx 2 amplification primers (final concentration 0.2 µM) in a 2-step PCR reaction (1 min 95 °C, 6 min 68 °C) for 35 cycles. The PCR fragments were purified by gel-electrophoresis, subsequently isolated from the agarose gel with the QiaexII Kit (Qiagen, Hilden, Germany), ³²P labelled by random priming (Prime it, Promega, Madison, WI, USA) and used for hybridisation. Prehybridisation and hybridisation were performed at 65 °C in 7 % sodium dodecylsulfate, 0.5 M sodium phosphate buffer (pH 7.2) and 1 mM ethylenediaminetetraacetate over night. Washing was performed twice in 2 x sodium citrate sodium chloride buffer (pH 7.2), 0.1 % sodium dodecylsulfate at room temperature and twice in 0.2 x sodium citrate sodium chloride buffer, 0.1 % sodium dodecylsulfate at 60 °C. After overnight exposure to x-ray films (X-Omat, Kodak, Rochester, NY, USA), the filter was stripped as described in [24] and hybridised with the next probe. To control equal loading of the lanes, the blot finally was hybridised with a probe for the constitutively expressed gene for a cysteine synthase, which was isolated as a false positive in the course of the differential mRNA display.

Acknowledgements. We are grateful to Dr. Maria Berenyi for helping with the cDNA library construction. This work was supported by the Austrian Ministry of Agriculture and Environment and by the Austrian Ministry for Education, Science and Culture.

References

- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J., Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (1990) 403-410.
- Baldwin T.C., Coen E.S., Dickinson H.G., The *pt11* gene expressed in the transmitting tissue of *Antirrhinum* encodes an extensin-like protein, *Plant J.* 2 (1992) 733-739.
- Bergey D.R., Ryan C.A., Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves, *Plant Mol. Biol.* 40 (1999) 815-823.
- Bögre L., Ligterink W., Meskiene I., Barker P., Heberle-Bors E., Huskisson N., Hirt H., Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway, *Plant Cell* 9 (1997) 75-83.
- Braam J., Sistrunk M.L., Polisensky D.H., Xu W., Purugganan M.M., Antosiewicz D.M., Campbell P., Johnson K.A., Plant responses to environmental stress: regulation and functions of the *Arabidopsis* TCH genes, *Planta* 203 (1997) Suppl:35-41.
- Brutnell T.P., Sawers R.J.H., Mant A., Langdale J.A., Bundle sheath defective2, a novel protein required for post-translational regulation of the *rbcL* gene of maize, *Plant Cell* 11 (1999) 849-864.
- Chang S., Puryear J., Cairney J., A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees, *Plant Mol. Biol. Reporter* 11 (1993) 113-116.
- Chen J., Varner J.E., Isolation and characterization of cDNA clones for carrot extensin and a proline-rich 33-kDa protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985) 4399-4403.
- Constabel C.P., Yip L., Patton J.J., Christopher M.E., Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory, *Plant Physiol.* 124 (2000) 285-296.
- Davis C., Robinson S.P., Differential screening indicates a dramatic change in mRNA profiles during grape berry ripening. Cloning and characterization of cDNAs encoding putative cell wall and stress response genes, *Plant Physiol.* 122 (2000) 803-812.
- Fischer R., Koller M., Flura M., Mathews S., Strehler-Page M.A., Krebs J., Penniston J.T., Carafoli E., Strehler E.E, Multiple divergent mRNAs code for a single human calmodulin, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 17055-17062.
- Fowler T.J., Bernhardt C., Tierney M.L., Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins, *Plant Physiol.* 121 (1999) 1081-1092.
- Hara K., Yagi M., Koizumi N., Kusano T., Sano H., Screening of wound-responsive genes identifies an immediate-early expressed gene encoding a highly charged protein in mechanically wounded tobacco plants, *Plant Cell Physiol.* 41 (2000) 684-691.
- Hartl F.U., Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381 (1996) 571-580.
- Heiniger U., Rigling D., Biological control of chestnut blight in Europe, *Annu. Rev. Phytopathol.* 32 (1994) 581-599.
- Hirt H., Transcriptional upregulation of signaling pathways: more complex than anticipated? *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 7-8.
- Hong J.C., Nagao R.T., Key J.L., Characterization of a proline-rich cell wall protein gene family of soybean. A comparative analysis, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 2470-2475.
- Jonak C., Ligterink W., Hirt H., MAP kinases in plant signal transduction, *Cell Mol. Life Sci.* 55 (1999) 204-213.
- Karłowski W.M., Strozycki P.M., Legocki A.B., The LIPRP2 gene from yellow lupine (Accession No. U47661) encoding nodule-specific, proline-rich protein (PGR97-049), *Plant Physiol.* 113 (1997) 1004.
- Kelley W.L., The J-domain family and the recruitment of chaperone power, *Trends Biol. Chem.* 6 (1998) 222-227.
- Knight H., Calcium signaling during abiotic stress in plants. *Int. Rev. Cytol.* 195 (2000) 269-324.

Lee S.H., Kim J.C., Lee M.S., Heo W.D., Seo H.Y., Yoon H.W., Hong J.C., Lee S.Y., Bahk J.D., Hwang I., Cho M.J., Identification of a novel divergent calmodulin isoform from soybean which has differential ability to activate calmodulin-dependent enzymes, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 21806-12.

Leon J., Rojo E., Sanchez-Serrano J.J., Wound signalling in plants, *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1-9.

Lessard P., Decroocq V., Thomas M., Isolation and analysis of messenger RNA from plant cells: cloning of cDNAs, in: Clark M.S. (Ed.), *Plant molecular biology – a laboratory manual*, Springer Verlag, Berlin, 1997, pp. 154-198.

Liang P., Pardee A.B., Differential display, a general protocol, in: Liang P., Pardee A.B. (Eds), *Methods in Molecular Biology*, vol 85, *Differential Display Methods and Protocols*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1997, pp 3-12.

Nojima H., Structural organization of multiple rat calmodulin genes, *J Mol. Biol.* 208 (1989) 269-82.

Otte O., Barz W. Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls, *Phytochemistry* 53 (2000) 1-5.

Park Y.S., Hong S.W., Oh S.A., Kwak J.M., Lee H.-H. Nam H.G., Two putative protein kinases from *Arabidopsis thaliana* contain highly acidic domains, *Plant Mol. Biol.* 22 (1993) 615-624.

Rajasekhar V.K., Lamb C., Dixon R.A., Early events in the signal pathway for the oxidative burst in soybean cells exposed to avirulent *Pseudomonas syringae* pv *glycinea*, *Plant Physiol.* 120 (1999) 1137-1146.

Rashidi H.H., Bauer M., Patterson J., Smith D.W., Sequence motifs determine structure and Ca⁺⁺-binding by EF-hand proteins, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1 (1999) 175-182.

Raz R., Cretin C., Puigdomenech P., Martinez-Izquierdo J.A., The sequence of a hydroxyproline-rich glycoprotein gene from *Sorghum vulgare*, *Plant Mol. Biol.* 16 (1991) 365-367.

Reymond P., Weber H., Damond M., Farmer E.E., Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 12 (2000) 707-720.

Ryser U., Schorderet M., Zhao G.F., Studer D., Ruel K., Hauf G., Keller B., Structural cell-wall proteins in protoxylem development: evidence for a repair process mediated by a glycine-rich protein, *Plant J.* 12 (1997) 97-111

Saarikoski P., Clapham D., Arnold S., A wound-inducible gene from *Salix viminalis* coding for a trypsin inhibitor, *Plant Mol. Biol.* 31 (1996) 465-478.

Salts Y., Wachs R., Gruissem W., Barg, R., Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruit, *Plant Mol. Biol.* 17 (1991) 149-150.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular Cloning*, Second Edition, vol 1-3, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

Schafleitner R., Wilhelm E., Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (murr.) barr on the intercellular pathogen related proteins and on total protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* mill.), *Phys. Mol. Plant Pathol.*, 51 (1997) 323-332.

Schultz J., Copley R.R., Doerks T., Ponting C.P., Bork P., SMART: A Web-based tool for the study of genetically mobile domains, *Nucleic Acids Res.* 28 (2000) 231-234.

Seo S., Sano H., Ohashi, Y., Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase, *Plant Cell* 11 (1999) 289-98.

Shigo A.L., *A new tree biology*. Shigo and Trees Associates, Durham, NH, USA, 1986.

Szabo A., Korszun R., Hartl F.U., Flanagan, J., A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates, *EMBO J.* 15 (1996) 408-417.

Vignols F., Jose-Estanyol M., Caparros-Ruiz D., Rigau J., Puigdomenech, P., Involvement of a maize proline-rich protein in secondary cell wall formation as deduced from its specific mRNA localization, *Plant Mol. Biol.* 39 (1999) 945-952.

Wan J.S., Erlander M.G., Cloning differentially expressed genes by using differential display and subtractive hybridisation, in: Liang P., Pardee A.B., (Eds.), *Methods in Molecular Biology*, vol 85, Differential Display Methods and Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ, 1997, pp. 45-68.

Wyatt R.E., Nagao R.T., Key J.L., Patterns of soybean proline-rich protein gene expression, *Plant Cell* 4 (1992) 99-110.

Figure 1. Nucleotide sequence of the *C. sativa* serine-threonine kinase Csstk1 partial cDNA. The deduced amino acid sequence is shown above the nucleotide sequence and numbered in bold to the right. Amino acid residues identical with the serine-threonine kinase catalytic domain consensus sequence, as annotated in the GenBank, are underlined and printed in bold, similar residues are underlined.

Figure 2. Alignment of the deduced amino acid sequence of CsSTK1 with amino acid sequences of serine-threonine kinases of *A. thaliana* ASK1 (GenBank accession number M91548.1), *B. napus* BSK2 (GenBank accession number L12394.1), and soybean SPK3 (GenBank accession number L19361.1). Amino acid residues identical in at least three of the serine-threonine proteins are marked in dark gray. Similar residues are marked in light gray.

Figure 3. Sequences of the Cscam1 partial cDNA of chestnut. The amino acid sequence of the deduced protein is given in the one letter code above the nucleic acid sequence and is numbered in bold. The open reading frame extends from position 2 to 322 and encodes for 107 amino acid residues. A pair of putative Ca²⁺ binding EF-hand motives (in bold) and a putative Eps15 homology domain (underlined) are indicated.

Figure 4. Sequence of the Cscam2 full length cDNA of chestnut. The open reading frame extends from position 71 to 514 and encodes for 148 amino acid residues. A pair of putative Ca²⁺ binding EF-hand motives (in bold) and two putative Eps15 homology domains (underlined) are indicated.

Figure 5. Alignment of the deduced amino acid sequence of CsCAM1 and CsCAM2 with calmodulin proteins of *F. silvestris* (CaMFS-1, GenBank accession n° X97612), *V. radiata*, (VirCAMLM, GenBank accession n° L20507), *P. vulgaris*, (PvCAM-1, GenBank accession n° AF030032), *S. tuberosum* (PCM1, GenBank accession n° J04559), *L. esculentum* (TomCALM1, GenBank accession n° M67472.1), Soybean (SCAM3, GenBank accession n° L01432.1) and *Arabidopsis thaliana* (AthCAM3, Genbank accession n° AF171873.1 and ACAM6, GenBank accession n° Z120024). Conserved amino acid residues are indicated as follows: identical amino acid residues in dark gray, similar amino acid residues in light gray.

Figure 6. Sequence of the Csprp1 full length clone of chestnut. The open reading frame extends from position 34 to 388. Sequence heterogeneity between members of the chestnut Csprp family causes alterations also in the amino acid sequence of the proteins: ¹: Csprp2 encodes L, ²: Csprps encodes I, ³: these residues are missing in Csprp2 and Csprp3. ⁴: Csprp2 has instead a Q, in Csprp3 this residue is missing. Proline-rich sequence repeats, also appearing in the *V. vinifera* proline rich protein gene, are underlined. The putative signal peptide (amino acid residues 1-22) is marked in italics, the proline- rich domains 1 to 4 are underlined in gray.

Figure 7. Sequence of the DnaJ-like cDNA Csp13.9. The putative open reading frame extends from position 122 to 515 and encodes a 131 amino acid putative peptide.

Figure 8: Alignment of CsP13.9 with the *Z. mays* BSD2 protein (GenBank accession n° AAD28599), the *A. thaliana* hypothetical protein F1P2.200 (GenBank accession n° T45725), and DnaJ-proteins of *C. burnetii* (GenBank accession n° P42381) and *B. melitensis* biovar ovis (GenBank accession n° Q05980). Amino acid residues identical to the Csp13.9 putative protein are marked in dark gray, similar amino acid residues in light gray. The CxxCxGxG motifs are highlighted in black.

Figure 9. Expression assessment of the wound-inducible genes Csstk1, Cscam1, Cscam2, Csprp and Cs13.9 by northern blot. As a control to show equal loading in each lane, the blot was finally hybridized with the constitutively expressed cDNA of a chestnut cysteine synthase.

```

D E A R Y F F Q Q L I S G V C Y C H S M O I C H R N L K L E N 31
GATGAGCCAGATATTTTCCACGACCTTATCAGGAGTTGCTACTGCTACTTATGCAAATATGCCACAGAATTTGAGCTGGAGA 93
T L L D G S P A P R L K I C D F G Y S K S S L L H S R P K P T 62
ACCTTACTGGATGGAAGCCCTGCTCAGCTGTGAGATTTGTGATTTGGTTATCAAAGTCATCTCTGCTGCATTACAGACCCAAGCACT 186
V G T P A Y I A P E V L S R R E Y D G K M A D V W S C G V T L 93
GTCGGAATCCAGCATATTCGACCTGAGGTTCTTTCTCGGAGAGATGATGGCAAGATGGCAGATGTATGGTCATGTGGAGTACTCTG 279
Y V M L V G A Y P F E D P A D P K N E R K T I N R I M A V Q Y 124
TACGTTATGCTGGTGGGAGCATACCCATTTGAGGATCCAGCAGACCTAAGAATTCAGGAAAACCATTAATCGAATATGGCTTCAATAC 372
K I P D Y V H I S Q E C R H L L S R I F V A S S L K E G I T I 155
AAGATCCAGACTATGTCACATATCTCAAGAATGTAGACATCTCCTTTCAGCGATTTTGTGCAAGTCCCTTAAGGAGGGGATCACTATT 465
K E I K S H P W F L K T L P R E L T E P A Q Q C T T R K E N P 186
AAAGAAATCAAGGCCCCCGTGGTTCTGAGACTTTGCCAAGGAACTAACAGAACCCAGCTCAGCAATGTACTACCAGGAAGGAAATCCA 558
S F S L Q E S F R I Y K N G E E A K F L P T S K R G G F G W G G 217
AGCTTTCCCTCAAGGATTCAGGATATACAAAAATGTTGAAGAGGCCAAATTCCTCCCACTTCCAAACGGGGGGCTTGGTTGGGGAGGA 651
K K K G * 221
AAAAAAAAGTTGagctaggaaaaaacccgcctagaaaaaaccccccggcccgaggaataaaaaagaattttaaaaagaagtctgggaa 744
aaaaaaaaaaaaa 3' 758

```

Fig.1.

```

CsSTK1 1 ----- 10 ----- 20 ----- 30 ----- 40 ----- 50 ----- 50
ASK1 1 MDKYELVKDI GAGNFGVARL MKVKNSKELV AMKYIERGPK IDENVAREII 50
BSK2 1 MEKYELVKDI GAGNFGVARL MKVKNSKELV AMKYIERGPK IDENVAREII 50
SPK3 1 MDKYEAVKDL GAGNFGVARL MRNKETKELV AMKYIERGPK IDENVAREII 50
----- 60 ----- 70 ----- 80 ----- 90 ----- 100
CsSTK1 51 HRSRPHSHTL HREVEVLTFL HLLVAMEYA AGGELPERIC SGRSPDEEA 100
ASK1 51 HRSRPHSHTL HREVEVLTFL HLLVAMEYA AGGELPERIC SGRSPDEEA 100
BSK2 51 HRSRPHSHTL HREVEVLTFL HLLVAMEYA AGGELPERIC SGRSPDEEA 100
SPK3 51 HRSRPHSHTL HREVEVLTFL HLLVAMEYA AGGELPERIC SGRSPDEEA 100
----- 110 ----- 120 ----- 130 ----- 140 ----- 150
CsSTK1 101 RYFFQQLISG WYCHAMOTC HRDLKLENTL LDGSPAPRLK HCFEYSSSS 150
ASK1 101 RYFFQQLISG WYCHAMOTC HRDLKLENTL LDGSPAPRLK HCFEYSSSS 150
BSK2 101 RYFFQQLISG WYCHAMOTC HRDLKLENTL LDGSPAPRLK HCFEYSSSS 150
SPK3 101 RYFFQQLISG WYCHAMOTC HRDLKLENTL LDGSPAPRLK HCFEYSSSS 150
----- 160 ----- 170 ----- 180 ----- 190 ----- 200
CsSTK1 151 LHSRPPKSTV FTBAYTAPEV LSREYDGMK ADVRSCVTL YVNLVGAYPE 200
ASK1 151 LHSRPPKSTV FTBAYTAPEV LSREYDGMK ADVRSCVTL YVNLVGAYPE 200
BSK2 151 LHSRPPKSTV FTBAYTAPEV LSREYDGMK ADVRSCVTL YVNLVGAYPE 200
SPK3 151 LHSRPPKSTV FTBAYTAPEV LSREYDGMK ADVRSCVTL YVNLVGAYPE 200
----- 210 ----- 220 ----- 230 ----- 240 ----- 250
CsSTK1 201 PDPKNERR KTNRMMAVO YKIPYVHIS QDCKNLLSRI FVANSIKR-T 250
ASK1 201 EDQDPKNERR KTIQKIMAVO YKIPYVHIS QDCKNLLSRI FVANSIKR-T 250
BSK2 201 EDQDPKNERR KTIQKIMAVO YKIPYVHIS QDCKNLLSRI FVANSIKR-T 250
SPK3 201 EDQDPKNERR KTIQKIMAVO YKIPYVHIS QDCKNLLSRI FVANSIKR-T 250
----- 260 ----- 270 ----- 280 ----- 290 ----- 300
CsSTK1 251 HKEIKKSSHW ELKNLPRDIT ETRACAAV-KK ENPTFSLOTV EEIMKIVADA 300
ASK1 251 HKEIKKSSHW ELKNLPRDIT ETRACAAV-KK ENPTFSLOTV EEIMKIVADA 300
BSK2 251 HKEIKKSSHW ELKNLPRDIT ETRACAAV-KK ENPTFSLOTV EEIMKIVADA 300
SPK3 251 HKEIKKSSHW ELKNLPRDIT ETRACAAV-KK ENPTFSLOTV EEIMKIVADA 300
----- 310 ----- 320 ----- 330 ----- 340 ----- 350
CsSTK1 301 KFIPTSKR-- GEGWGGKKK G*-* VEEEEEEVEE EEDDEDEYDK 350
ASK1 301 KTFEVSRSI GEGWGGNGD ADGKEEDAED VEEEEEEVEE EEDDEDEYDK 350
BSK2 301 KTFEVSRSI GEGWGGKGD -----EEEE VDEEEV-VEE EEDDEDEYDK 350
SPK3 301 RDEFEVSPV KEGWGG-----E EDEEELVEE EEDDEDEYDK 350
----- 360 ----- 370 ----- 380 ----- 390 ----- 400
CsSTK1 351 * TVKEVHRSGE VRIS* 400
ASK1 351 TVKEVHRSGE VRIS* 400
BSK2 351 TVKEVHRSGE V* 400
SPK3 351 RVKEVHRSGE PQIS* 400

```

Fig.2.

N P T E A E L R D M I N E V D A D G N G T I G F 24
 5'gAACCACTGAGGACAGGCTCCGGGACATGATCAATGAAGTGGATGCTGATGGTAAATGGAACATTTGGATTC 73
 P E F L N L M A R K M K D T D S E E E L K E A F R 49
 CTCGAGTTTCTAAATCTCATGGCTAGGAAGATGAAGACACTGACTCAGAGGAGAACTTAAAGAAGCCTCCGA 148
 V F D K D Q N G F I S A A E L R H V M T N L G E K 74
 GTTTTGGACAAGGATCAAAATGGGTTTCATCTCTGCTGCTGAGTTGCCCATGTGATGACCAACCTTGGGGAGAG 223
 L T D E E V D E M I R E A D V D G D G Q I N Y E E 99
 CTCACCGATGAAGAAGTTGATGAGATGATTCGGGAGGCTGATGTTGATGGTATGGCCAGATAAATACGAGGAG 298
 F V K V M M A K * * 107
 TTTGTCAGGTGATGATGGCCAAGTGAATatctgcctcattactaaaaccttaataaaaaatctttattataa 373
 aaaaaaaaaagggagaaacaggtagtagtagtctctgctggtggtggttggctgaaagaattagaatctctatgttc 448
 atccttagtgtcttggacaagtgtctggcagttttatttttttaattttgttggctcatgtgaa 523
 tgaactacctgggaagtctgatgtctatgttggatggatgactcattttatggcaaaaaa 3' 586

Fig. 3.

5' gggagcacaaccc 70
 M A G Q L T G Q I A E F K G I F S L F D K D G D G 25
 ATGGCAGGACAACCTTACAGGACAATCGCAGAGTTTAAAGGGATCTTTTCTTGTGTTGACAAGACGGGGATGGC 145
 C I T T K E L G T V M R S L G Q N P T E A E L Q D 50
 TGCATCACTACCAAGAGTTGGGACAGTCATGAGATCTTTGGGACAGAACTCCCACTGAAGCTGAACACAGGAC 220
 M I N E V D A D Q N G T I D F S E F L N L M A R K 75
 ATGATCAATGAAGTTGATGCTGATCAAAATGGCACTATTGATTTTTCTGAGTTTCTGAATTTGATGGCAGGAAA 295
 M K D T D S E E E L K E A F K V F D K D Q N G F I 100
 ATGAAGGATACGATTCGAGGAGGAACTCAAAGAAGCTTCAAGGTGTTGATAAGGACCAGAATGGCTTTATT 375
 S A A E L R H V M T N L G E K L T D E E V D E M I 125
 TCTGCTGACAGCTTCGACATGTAATGACAAATCTGGGAAAAGCTGACAGATGAAGAAGTCGATGAGATGATA 445
 Q K A D L D G D G Q V N Y Q E F V R M M L A K * 148
 CAGAAGACAGATTTGATGCTGATGGTCAGCTGAATATCAGGACTTTGTAAGATGATGCTTCCCAAGTAAatc 520
 taaactgtgtttcttggtaaacatgagtggggataataagctacaattattggcaaatagagcttatatctcat 595
 gtaaaaaagactgcagattatccaggatgattcattgttttcatagtgttttggatttgtaaaaaaaaaaaaaa 3'670

Fig. 4.

		10	20	30	40	50	
CsCAM1	1	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
CsCAM2	1	MACQITG	AEFCISLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
CAMFs-1	1	MAQCLTDDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
VirCAMLM	1	MAQCLTDDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
PvCAM-1	1	MAQCLTDDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
PCM1	1	MAQCLTDDQI	AEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
TomCALM1	1	MAQCLTDDQI	AEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
SCAM3	1	MAQCLTDDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
AthCAM3	1	-----DDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
ACAM6	1	MAQCLTDDQI	SEKKAFFSLF	DKDGGCITTT	KELGTVNRSL	GNPTEASLQ	
		60	70	80	90	100	
CsCAM1	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
CsCAM2	51	DMINEVDADQ	NGTIDFSEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
CAMFs-1	51	DMINEVBRDG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
VirCAMLM	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
PvCAM-1	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
PCM1	51	DMISEADADQ	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
TomCALM1	51	DMISEVDADQ	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
SCAM3	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
AthCAM3	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
ACAM6	51	DMINEVDADG	NGTIDFPEFL	NLMARKMKDT	DSSEELKEAF	KVFDKQNGE	
		110	120	130	140	150	
CsCAM1	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
CsCAM2	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIQKAD	LDGGQVNYE	EEVRMMLAK*	
CAMFs-1	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	-EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
VirCAMLM	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
PvCAM-1	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
PCM1	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	LDGGQVNYE	EEVRMMLAK*	
TomCALM1	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	LDGGQVNYE	EEVRMMLAK*	
SCAM3	51	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
AthCAM3	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	
ACAM6	101	ISAAELRHVM	TNIGERLTSE	EVDEMIREAD	VDGGQVNYE	EEVKVMMAK*	

Fig. 5.

M A T K H L L L L L 9

gatacctaattcatagctcttcaaggagcccaaaATGGCTACCAAACTGTTATTGTTG 61

putative signal peptide cleavage site ↓

L L A V⁽¹⁾ V L L T⁽²⁾ T H S L A D H H K K P P H K K 30
 CTTCTCGAGTGGTCTTCCACCACTCACTCTTGTGACCACCATAAACCCACCAAG 124

P³⁾ P³⁾ H³⁾ K⁴⁾ P P S T E E T T L E S N L D G **K P** 51
 CCACCACAAAGCCTCCTCAACGGAGGAGACCCTGGAATCAAATTTGGATGGCAAACT 187

P K G Y K P P P K H K P P T S L D G F N E 72
 CCCAAGGGATACAAGCCACCACCAAAACCAAGCCACCAACTCATTGGATGGGTTAATGAG 250

E K P P H K E Q P V G P I K P P H K P P A 93
 GAAAAACCACCACAAAGAACAACACAGTAGGCCCTATAAAACCACCACACAAGCCTCCAGCA 313

Q E A S L D G K P P K G Y K P P P K H K P 114
 CAGGAGGCCCATTTGGATGGCAAACTCCCAAGGGTTACAAGCCACCACCAAGCACAAGCCT 376

P T S N * 118
 CCAACTCCAACAGTgagcctagctagttaggtctcatgtagtattagatataatagctg 439
 acgtgggtaataataaagagctgcaattgataatcctctcttcttccacaactgttt 502
 atgctgaccactagctctgctacttctaataagctactgtgggatattgctacgttaa 565
 tgtactattgtagctccgtggttctctgctcttctgctatgaacattgacatgcaacttggctc 628
 ttgataaaaaaaaaaaaaaaaaa 653

Fig. 6.

gaccttaaatccgcacacagagagacagacacttcagttgggtcctaaaactctaaaagctcaactct 68
 M A N S L 5
 ttccagttcaactctgctaaaaatcagagttataggaattggaacctctggaATGGCTAACTCTTA 137
 C F T S V C S F K S P N K P G I V I G K S V T 28
 TGTTTACATCTGTTTGTTCCTTAAGTCCCTTAACAAACCCAGGATAGTAATTGGCAAGTCACTGACT 206
 R K V L R V N E L F Q K S E T A K F Q S L E V 51
 CGGAAGGTTCTCGGGTAAATGAACCTTTTCAAGTCTGAGACTGTAAGTTTCAATCTTTGGAGGTT 275
 K A T E S N K G T K P N S I V C A D C D G N G 74
 AAGCTACAGAAGCAATAAGGGAACCAACCAAAATAGCATAGTCTGTGCTGATTGTGATGGAAATGGT 344
 A K L C T Q C E G S G V N T V D H F N G Q F K 97
 GCCAAATTTGTACACAATGCGAGGGTTCTGGAGTTAATACAGTAGACCACTTCAATGGACATTTAA 413
 A G G L C W L C R G K R E I L C G S C N G A G 120
 GCTGGTGGATTATTTGGCTATGACAGGTAAGGAAATTTTGTGCGGAGTGTGAATGGAGCTGGC 482
 F L G G F M S T F D E * 131
 TTTCTTGGTGGATTATGACACATTTGATGAAtagaaaagtttgcataattggatcttcagtgattgt 551
 accaaaaatttgaatcatgatacactgccaaaaatttgcagtaaatgaaactggaattgtagctgtgt 620
 tgtccagcttggattctgaaacttgaactctaaacagattttgcgaatttaaaagaaaaaaaaaaaaa 689
 aaaaaaaaaaaaaa 703

Fig. 7.

	10	20	30	40	50
Csp13.9	1-----	-----	-----	-----	-----
ZmBsd2	1-----	-----	-----	-----	-----
F1P2.200	1-----	-----	-----	-----	-----
CoxDnaJ	1MAKRDYEVLV	GVNLNATEAE	VKKAFRRLAM	KYHPDRNPGD	KDAEVKFKEA
BruDnaJ	1M-KIDYYEAL	GVTRTADDKT	LKAAFRKLAM	QYHPDRNPD	PEAERFKFEI
	60	70	80	90	100
Csp13.9	51-----	-----	MANSL	CFTS	---VCS
ZmBsd2	51-----	-----	MAATA	SI	TTAPSP
F1P2.200	51-----	-----	MANSL	CF	SSPPTFC
CoxDnaJ	51REAYEVLCD	SKRASVDQFG	HAGVEQTFGG	AGAG-GPFGF	DLGDFIFDIF
BruDnaJ	51GEAYETLKD	PQKRAAYDRFG	HAAFEN--GG	MGGGFGNGFA	GAGG-FADIF
	110	120	130	140	150
Csp13.9	101PGIVIGKSV	SRVLRVNEF	SRKSEIAKFGS	LEVKATESH-	KGTFRN
ZmBsd2	101ISFRP---	V-----	SRHCKNLC	IKTRATEND-	QSAKHKVKV
F1P2.200	101SHFFSTNDN	SSIVQKRELL	SRSSCS	FEVRAANNP	CGTRFN
CoxDnaJ	101GDFIFGARG	QAR---EORG	ADLAYELVLS	LEAVHGLSR	TIRVET
BruDnaJ	101EDIFGEMMG	RRRRNGAERG	ADLRYNMEVT	LEAYAGKTA	QIRVET
	160	170	180	190	200
Csp13.9	151SITCAICCN	GAK-----I	CHCEGECUN	TVIHENGCFR	AGGICNLCSG
ZmBsd2	151SITCAICCN	GAI-----V	CHCEGECUN	SVIYEFERFR	AGSICNLCSG
F1P2.200	151SITCAICCN	GCV-----A	CHCEGECUN	LTIHENGCFR	AGGICNLCSG
CoxDnaJ	151WIKCKTCKG	SK-GSSPAT	QPCCKGQGM	RMCH--EFLQ	VQCCSVCSG
BruDnaJ	151SITCDECKG	SKPGSQPTT	CHCSGSS--	RCRAACHFS	VERICPCNG
	210	220	230	240	250
Csp13.9	201KREIIG---	SCNGCFICG	FMSTFEDE*		
ZmBsd2	201KREIIG---	SCNGCFICG	FLSTFEDETAQ*		
F1P2.200	201KREIIG---	SCNGCFICG	FMSTFEDE*		
CoxDnaJ	201KREIIG---	SCNGCFICG	FMSTFEDE*		
BruDnaJ	201KREIIG---	SCNGCFICG	FMSTFEDE*		
	260	270	280	290	300
Csp13.9	251				
ZmBsd2	251				
F1P2.200	251				
CoxDnaJ	251APPGDLYVQ	VVKPPLFHR	EGNDLHSEVP	IDFTTAAALGG	EMEIPTLDGS
BruDnaJ	251GPAGDLYILL	SVKPHFFQR	DGADLYCKVP	ISMTTAALGG	QFEVSTLDGT
	310	320	330	340	350
Csp13.9	301				
ZmBsd2	301				
F1P2.200	301				
CoxDnaJ	301VRLTIPPET	QGGKQFRLRG	KGVKALRSGA	VGDLICHIVV	ETPVKLSPEQ
BruDnaJ	301QTRVKVPEGT	QNGKQFRLKG	KGMPGLRQSV	TGDLYIQIDI	ETPQNLKSRQ
	360	370	380	390	400
Csp13.9	351				
ZmBsd2	351				
F1P2.200	351				
CoxDnaJ	351KDYLKQFAEL	LKKDEKNHSP	----RTRNWF	GTV*	
BruDnaJ	351RELLEEFKEL	SWQENSPKSA	GLFSRMKEFF	EGIGE*	

Fig. 8.

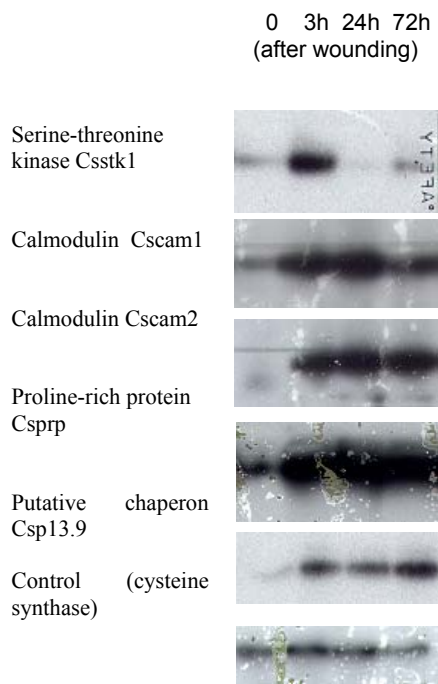


Fig. 9.

4.3 Publication in preparation, submission planned for december 2001: Wound-responsive genes of the bark of *Castanea sativa* and their expression upon wounding and chestnut blight infection.

Schafleitner R. and Wilhelm E.

Introduction

The bark protects cambial tissues from external influences. Wounding of bark tissue may disrupt this function and seriously threaten the survival of the individual plant. Plants have acquired mechanisms to reconstruct wounded parts of the vascular system, protect the wounded sites against pathogen ingress and finally to close the wound. These responses have been characterized on an anatomical level (Shigo et al. 1977, Biggs 1986), however, only a few reports describe molecular events of the wound-response of the woody tissue of trees (Tamarus and Furnier 1998).

Local and systemic mRNA accumulation in leafy tissue upon wounding has been reported for many plant species. Microarray-based gene expression studies on model plants, such as *Arabidopsis thaliana*, revealed about 100 up- or down-regulated genes in response to wounding, providing insight into the time course of wound-related transcription changes and elucidating influences on groups of genes by common signaling events (Reymond et al. 2000, Schenk et al. 2000). Interestingly the plant defence against wounding and against pathogens shows, in spite of many differences, striking overlaps, suggesting the presence of common signal molecules. JA as well as ethylene are involved in wound and in pathogen defense reactions and both pathways, pathogen- and wound responses, are not completely independent and the induction of one might influence the other (Maleck and Dietrich 1999). This reciprocal influence may cause both amplification or weakening of the responses, dependent of the signaling factors involved. Hence, salicylic acid (SA), a signaling compound accumulating in plant tissues upon pathogen infection and a well characterized inducing agent of systemic acquired resistance inhibits jasmonate (JA) dependent signaling pathways, consequently suppresses the expression of JA regulated genes and therefore weakens the wound response of the plant. In contrast, co-induction of several *Arabidopsis* genes by SA and Methyl-JA has been demonstrated (Schenk et al. 2000). This indicates that both stimulation and inhibition of wound-responsive genes through pathogen derived signals is possible.

The crosstalk between wound- and pathogen-derived signaling is of particular importance, when the wound is colonized by pathogens. In trees, the defense mechanisms against wound pathogens elucidated so far are the compartmentalization of the pathogen infested site, the production of antimicrobial compounds and the overwalling of the infected site with newly formed tissue. Our knowledge on these processes on gene expression level is limited on data of a few enzymes, such as chitinases and phenylalanine ammonia lyase (Tamarus and Furnier 1998).

Here we report genes induced in the bark of a tree species upon wounding and the influence of pathogen inoculation on the expression of wound-responsive genes. We choose chestnut (*Castanea sativa*) as experimental plant and *Cryphonectria parasitica*, the causal agent of chestnut blight as wound pathogen. The ascomycete fungus *C. parasitica* cannot infect chestnut through intact bark (Anagnostakis 1987). Wounds provide suitable entrance paths for the pathogen, which successively destroys the bark and the vascular system, hampering the transport of nutrients and water. Finally the fungus attacks and kills the cambium, thereby impeding the formation of new tissue which might overgrow the lesion and eventually could lead to wound healing (Shigo 1986).

For these initial studies we used clonal chestnut shoots grown in vitro under strictly controlled conditions. This test system provided us with uniform material, virtually eliminating environmental factors we would have encountered with greenhouse- or field-grown trees. These investigations should give us a first information on modulation of gene expression in bark tissue of a woody plant upon wound- and pathogen stress and should give insight into functions of wound-induced genes in the bark tissue.

Materials and methods

Plant and fungal material

C. sativa in vitro shoots (clone GG10), at least 17 cm high and with 3 mm minimal stem diameter at the basis, were cultivated as described by Schafleitner and Wilhelm 1997. Wounds were applied by cutting the bark of the shoots with a scalpel under sterile conditions, opening a wound of about 10 mm² surface. One wound per nodal segment was administered. Virulent *Cryphonectria parasitica* strain AW30, isolated from a virulent chestnut blight canker in Forschtenstein, Austria, was inoculated by application of 1 mm³ of fungal mycelium into wounds, which were formed as described above.

The plant material was harvested at the same day time (2 pm) to avoid biases through day time specific differentially expressed genes.

For each treatment, stems of seven different stems were pooled.

RNA isolation

Stem tissue (2 g) from in vitro cultures was frozen in liquid nitrogen and grounded to a fine powder in pre-cooled steel containers in a Retsch mill (Haan, Germany). Total RNA was extracted as described in Cheng et al. (1993) and quantified spectrophotometrically according to Sambrook et al. 1989.

Differential mRNA display

The differential mRNA display was performed according to (Liang and Pardee 1997) with slight modifications using three different one-base anchored oligo dT primers, T₁₁-A, T₁₁-C, T₁₁-G and 24 13-mer arbitrary primers (GeneHunter, Nashville, TN, USA). All reactions were set up in duplicates. Twenty five ng of DNase I treated total RNA was reverse transcribed with 200 units Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA), PCR amplified, size fractionated, excised from the display gel and reamplified as described by Liang and Pardee 1997. The amplified cDNA fragments of apparently wound-induced genes were visualised by agarose gel electrophoresis and purified from the agarose gel (QiaexII Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Differential expression of the genes corresponding to isolated cDNAs was verified by reverse northern dot blot, performed as described by Wan and Erlander 1997. Confirmed differentially expressed cDNAs were blunt ligated into pSTBlue-1 (Novagen Darmstadt, Germany) and amplified in *Escherichia coli* according to the supplier of the kit.

cDNA library construction, screening and isolation of positive clones

Total RNA was extracted from stem tissue of wounded in vitro plants 3 h post treatment as described by Chang et al. 1993. Two µg of total RNA was used to construct a cDNA library with the SMART PCR cDNA library construction kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA) and packed into λ-phage particles (Gigapack III Gold packaging extract, Stratagene, La Jolla, CA, USA) according to the instructions of the supplier. The screening of the library with differentially expressed cDNA fragments obtained by the differential mRNA display was performed as suggested by the manufacturer of the cDNA library kit (Clontech Inc., Palo Alto, CA, USA). Phages giving a positive hybridisation reaction were isolated, converted to pTriplEx2 plasmids according to the instructions of the kit supplier and sequenced on an ABI

376 sequencer using the Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Foster City, USA). The sequences obtained were analysed using the Dnasis software (Hitachi Software Engineering Co. Ltd). For comparisons with the GenBank annotated sequences (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) the BLAST standard tool for nucleic acid and protein analysis was applied (Altschul et al. 1990).

Reverse Northern Dot Blot

cDNA probes for wound responsive genes were excised from TripEx2 plasmids by restriction with *ECO* RI and *HIN* DIII, ethanol-precipitated and redissolved in 30µl, 5µl of 2N NaOH was added, the mixture was boiled for 5 min, neutralized with 5µl 3M sodium acetate, pH 5.0, brought to a volume of 160µl with ddH₂O. 10 µl of each probe were spotted on 14 nylon membranes (Hybond N+, Amersham, Buckinghamshire UK), which were subsequently UV-crosslinked and baked as described in Sambrook et al. 1989

Stems of chestnut in vitro shoots of the chestnut blight sensitive clone GG10 were wounded or inoculated with *Cryphonectria parasitica*. 3h, 24h and 3 days after the treatment, the plants were harvested and mRNA was purified from the wounded or pathogen-inoculated sites. Each mRNA batch was reverse transcribed to cDNA in the presence of ³²P-cytosine triphosphate. 2x10⁶ cpm of each cDNA batch were used for hybridization with the membranes carrying the wound-responsive genes.

Prehybridization, hybridization and autoradiography was performed as outlined in Sambrook et al. 1989.

Single spots representing a hybridization event of the labeled cDNA with one probe were cut out of the membrane, transferred in scintillation counter vials and the cpm emitted from each spot was determined by liquid scintillation counting in a Beckmann LS 7000 apparatus. The measurement settings were 2 min measurement time and a default value of maximal 5%.

The cpm measured were proportional with the amount of ³²P-labeled cDNA hybridizing with the immobilized probe, giving a relative measure of the amount of the corresponding mRNA present in the sample.

The hybridization experiment and the evaluation of the cpm per spot were performed in duplicates.

Results

Differential mRNA display

The gene expression in wounded and untreated in vitro chestnut stems 3 and 24 h post treatment was compared using the differential mRNA display method. Combinations of 24 different arbitrary 5' and 3 different one-base anchored oligo-dT-primer were used to display mRNAs present in wounded and untreated stems. Each primer combination gave approximately 120 bands in a size range between 150 and 600 bp. The portion of the transcriptome (*P*) covered by a random approach such as differential mRNA display can be calculated as $N = \ln(1-P) / \ln(1-B/E)$, where *N* is the number of primer combinations used, *B* is the number of resultant bands per reaction and *E* is the amount of expressed transcript species (Ito and Sakaki 1997). Assuming that approximately 10.000 different mRNA species are present in chestnut stem tissue, a number which is generally assumed to be expressed in eucaryotic cells (Alberts 1994), the 72 primer combinations used and the obtained 120 bands per reaction result in 58% coverage of the transcriptome in this experiment.

Totally 58 apparently differentially expressed bands were isolated from the display gels and 26 of them were finally confirmed to be indeed differentially expressed by reverse northern blots. The remaining 32 cDNA fragments were considered to be false positives and not further investigated, except two fragments, which served to isolate cDNAs of constitutively expressed genes from the library in order to obtain probes for control genes in expression studies.

The cDNA fragments derived from differentially expressed genes, were blunt end ligated into pSTBlue-1 vectors and amplified in *E. coli*. Sequence analysis of the display fragments did not give significant sequence similarities to known genes for most cDNA fragments. Therefore a cDNA library of wounded chestnut stems was constructed and screened with the display fragments in order to obtain full length or partial cDNA clones comprising enough sequence information to confidently identify orthologous genes in databases and thus elucidate the biochemical functions of the respective genes.

For 23 out of the 26 isolated cDNAs significant sequence similarities to known genes annotated in the GenBank database was detected. The significance of the sequence similarities was assessed based on the “Expect”-values (E-values) of the alignments, where low E-values indicate a high significance of a match.

The wound responsive genes detected in the course of these experiments were attributed to seven groups:

1. Signaling genes
2. Stress and pathogen response genes
3. Cell-wall modification genes
4. Genes involved in sterol metabolism (growth regulation)
5. Genes involved in amino acid and protein metabolism
6. Genes involved in light harvesting and energy transport (mitochondrial transporters)
7. Genes with unknown function

A tabular overview over the isolated wound-inducible genes is given in table 1.

Tab 1: Wound-responsive genes of chestnut.. *: not woundinducible, isolated to serve as control-cDNA. †: only partially sequenced.

cDNA	bp	Open reading frame/amino acids/kDa	Total-cDNA	partial cDNA	GenBank Nr.	Function	Similar to orthologs of :
SIGNALLING GENES							
CsStk1	758	663/221/n.a.		✓	AF334831	Serine-threonine-kinase	<i>A. thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Glycine max.</i>
CsCam1	586	321/107/n.a.		✓	AF334832	Calmodulin	<i>Fagus silvatica</i> , <i>Vitis radiata</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
CsCam2	668	444/148/16.6	✓		AF334833	Calmodulin	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i>
STRESS- AND PATHOGEN RESPONSEGENES							
CsPrp	653	354/118/12.9	✓		AF334835	Proline-rich protein	grip 15 (<i>Vitis vinifera</i>)
Cs13.9	703	393/131/13.9	✓		AF334834	Chaperon	BSD2 (<i>Zea mais</i>), F1P2.200 (<i>A. thaliana</i>), DnaJ (bacteria)
CsPg	796	363/121/n.a.		✓	AF417294	Polygalacturonase β -subunit	<i>Lycopersicon esculentum</i>
CsPe	308	132/44/n.a.		✓	AF417295	Pectin esterase	PE (<i>A. thaliana</i>)
CsAd	737	327/109/n.a.		✓	AF417296	Arginine decarboxylase	<i>Vitis vinifera</i> , <i>Pisum sativum</i>
CsγT	780	234/78/8.8	✓		AF417297	γ -thionin-like proteinase inhibitor	<i>Petunia inflata</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Glycine max.</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Helianthus annuus</i>
CsGluc	638	387/129/n.a.		✓	AF417298	β -1,3-Glucanase	<i>Prunus persica</i> , <i>Castanea sativa</i> , <i>Vitis vinifera</i>
CsG	518	492/164/n.a.		✓	AF417299	Germin	<i>A. thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i>
GENES OF GROWTH REGULATION							
CsScmt	880	399/133/n.a.		✓	AF417292	Sterol-C-methyl transferase	<i>A. thaliana</i>
CsSr	536	201/51/n.a.		✓	AF417293	Δ -7-Sterol reductase	<i>A. thaliana</i>

AMINO ACID AND PROTEIN METABOLISM GENES						
CsCs*	683	339/113/n.a.	✓	AF417300	Cysteine synthase	<i>Solanum tuberosum</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i>
CsEf	472	111/39/n.a.	✓	AF417301	Translational elongation factor	<i>Glycine max.</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Lilium ssp.</i> , <i>Malus domestica</i>
CsMov-34	740	591/197/n.a.	✓	AF417302	MOV34	26S proteasomal regulatory subunit, eIF1 (<i>A. thaliana</i>)
CsL17	668	420/140/14.99	✓	AF334838	Ribosomal protein L17	<i>A. thaliana</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i>
CsL18	713	525/175/21.4	✓	AF334839	Ribosomal protein L18	<i>A. thaliana</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>H. sapiens</i>
CsL33	573	336/112/12.78	✓	AF334840	Ribosomal protein L33	<i>A. thaliana</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CsGt	729	396/132/n.a.	✓	AF417303	O-GlcNAc-transferase	<i>A. thaliana</i>
LIGHT HARVESTING, ENERGY GENERATION AND –TRANSPORT GENES						
CsCab	496	360/120/n.a.	✓ †	AF417304	Chlorophyll A/B – binding protein	<i>Prunus persica</i> , <i>Petunia ssp.m</i> <i>Solanum tuberosum</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Gossypium hirsutum</i> etc.
CsOmt	244	144/48/n.a.	✓	AF417305	Oxoglutarate-malate-translocase	<i>A. thaliana</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Spinacia oleracea</i>
CsAnt	653	375/125/n.a.	✓	AF417306	Adnine nucleotid-translocase	<i>A. thaliana</i> , <i>Lupinus albus</i> , <i>Solanum tuberosum</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Zea mays</i>
GENES WITH UNKNOWN FUNCTION						
Cs15.46	115 4	417/139/ 15.46	✓	AY055745	Unknown	Enoyl-CoA-hydratase (<i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Prunus persica</i>)
IDS4-like	814	672/224/	✓	AY055748	Unknown	<i>A. thaliana</i> , <i>Hordeum vulgare</i>
Cs10.1	108 2	417/139/n.a.	✓	AY055743	Unknown	n.s.
Cs14.05	766	378/126/ 14.05	✓	AY055744	Unknown	n.s.
CsB12D		402/134/	✓	AY055747	Unknown	<i>Ipomoea batatas</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Hordeum vulgare</i>
Cs9.11*	586	378/126/ 14.17	✓	AY055746	Unknown	n.s.

Temporal expression changes of the wound-responsive genes have been monitored in chestnut stems. Additionally to the genes isolated in the course of this study, a PAL gene fragment prior isolated by a PCR-based approach has been included into this experiment.

Wounded stem tissue of in vitro shoots was harvested 3, 24 and 72h post treatment, mRNA was purified and the cDNA produced from each sample was labelled with ³²P-dCTP and

hybridized with dot blot membranes spotted with cDNA probes of wound-responsive genes of chestnut isolated in the course of this study (table 1). After hybridization, the signal intensity of each spot was measured by liquid scintillation counting. These measured counts per minute (cpm) of each spot were used to determine the abundance of the respective transcript. Two cDNA molecules, CsCs and Cs9.11 that were isolated as false positives in the display experiment, were included as control genes to calibrate the cpm measurements and to correct for cpm differences between different membranes. This was accomplished by division of the cpm values of each spot through the cpm value of CsCs of the same membrane. These values were called “normalized” values. The mean of the normalized values of two independent experiments each spot were divided through the mean value of the corresponding spot obtained by hybridization with cDNA from untreated plants, to relate the induction of the genes with basal expression levels in untreated plants.

The mean default of the obtained cpm values by liquid scintillation counting was below 5%, allowing the accurate assessment also of small signal differences. The high reproducibility of the measurements (less than 10% deviation) was confirmed by repeating the hybridization experiments. This allowed the assessment of even small expression differences. Though a 1.5-fold induction could be assessed correctly and accurately. However, the amount of incorporated radioactivity was different for each cDNA species, dependent on its length and C-content. Therefore the cpm values could only be compared between hybridizations of a particular cDNA and not between different cDNA species.

The induction of wound-responsive genes in chestnut stems ranged between 1.7 and 10-fold 3 h post wounding compared to untreated plants. After 24h some of the wound-responsive genes, such as CsStk, CsPg and CsG reached already basal expression, whereas others, such as CsI10 attained their expression peak at this time point. 72h post wounding many of the genes tested still exhibit elevated expression levels. Detailed expression data are shown in table 2.

Table 2: Induction of wound-responsive genes 3-72h after wounding (w) or infection with *C. parasitica* (Cp). This table shows the mean values of two independent expression measurements as n-fold expression compared to basal expression in untreated plants. The cysteine synthase gene has been used to normalize the cpm values of all genes tested

	w 3h	w 24h	w 72h	Cp 3h	Cp 24h	Cp 72h
Signaling genes						
serine-threonine-kinase	2.1	1.2	1.4	3.5	3.8	2.9
calmodulin 1	5.7	5.8	6.5	3	5.7	5.9
calmodulin 2	6.2	5.9	8.2	4.9	4.3	5.3
Stress & pathogen response						
proline-rich protein	5.9	6	4.5	3.6	4.7	4
chaperon cs13.9	4.5	4.1	6	3.2	7.7	5.2
Polygalacturonase	2.2	1	1.2	1.1	1.6	1.6
pectin esterase	2.4	1.4	0.3	11.4	2.5	1.3
arginine decarboxylase	4.8	5.8	7.2	2.8	4	4.2
γ -thionin	10.2	5.6	4.6	6.7	6.6	5.1
β -1.3-glucanase	2.6	1.2	0.8	11.3	8.2	8.8
Germin	1.2	0.7	0.4	2.2	0.8	3.6
PAL	1.1	0.9	0.6	1.6	0.8	2.8
Sterol metabolism (growth regulation)						
sterol-c-transferase	6.8	7.3	7.5	6.3	5.5	4.9
sterol reductase	5.9	7	6.7	4.7	3.5	3.6
Protein metabolism						
elongation factor	2.4	2.3	1.4	3	2.4	1.8
CsMov34	2.1	2.1	1.7	2.3	2	2
ribosomal protein 117	2.5	2.3	1	1	1.4	2.2
ribosomal protein 118	2.5	2.7	2.5	2.7	2.4	2.5
ribosomal protein 133	1	0.7	0.7	2.2	0.8	2.9

O-glycosyltransferase	3.6	3.4	7.2	3.1	3.3	3.8
Light and energy						
Chlorophyll A/B binding protein	1.7	1.6	1.2	1.6	1.4	2.6
adenine-nucleotid-transferase	2.4	1.7	1.9	3.2	2.1	7.1
oxoglutarate-malat-translocase	3.1	3.8	3.4	3.1	2.7	2.3
Genes with unknown function						
Cs15.46 unknown	1.6	2.2	1.7	1.8	2.4	3
IDS-4-like	3.4	3	7	3.5	1.7	3.7
CsI10 unknown	5.5	17	14.6	3.3	12.8	15.9
B12D	3.9	3.4	3.7	2.5	3.4	3.2
Cs14.05 unknown	2.1	3.3	1	2.5	2.6	2.5
Cs9.11 (control gene 2)	1	1	0.8	1	1	1.3

Wound-versus pathogen induction

The isolated wound-responsive genes can be grouped in 3 clusters according to their expression upon wounding or pathogen inoculation:

1. wound-inducible transcripts, *C. parasitica* inoculation does not substantially interfere with their expression: The expression patterns of CsEfla, CsMov34, CsL18 were very much alike in wounded and *C. parasitica*-inoculated plants. These genes were found induced two to three-fold as well upon wounding as upon pathogen infection (fig.1).
2. wound-inducible transcripts, stronger induced, when a *C. parasitica* is absent. *C. parasitica* has an inhibiting effect
3. wound-inducible transcripts, stronger induced, when a *C. parasitica* is present in the wound. *C. parasitica* has a synergistic effect.

For most genes investigated, a slight to moderate inhibitory effect on the wound-induction through *C. parasitica* has been detected. CsCam2, CsAd and CsSr expression levels were between 20 and 40% lower in *C. parasitica*-treated plants compared to wounded plants 3, 24 and 72h post treatment. With other genes, either early or late inhibition by *C. parasitica* was discerned. Genes lower expressed after *C. parasitica* inoculation than after wounding within 3 to 24h after treatment, here called early repressed genes, were CsCam1, CsPg, CsT, CsL17, CsI10, CsB12D and CsPrp. The inhibition ranged between 34 and 60%. Later in the time course of the infection, the inhibition declined to 10 – 13%, or, for certain genes, such as CsPg, CsT, CsL17 and CsI10, the expression in *C. parasitica*-infected plants was even higher than in wounded plants 3 days after treatment. In these cases the onset of induction obviously was delayed by *C. parasitica*.

In contrast, CsScmt, CsGt, CsOmt and CsIDS exhibited late inhibition by *C. parasitica*. Whereas 3h after treatment the expression of these genes was similar in wounded and *C. parasitica*-infected plants, 72h post treatment the expression in *C. parasitica*-inoculated plants was between 32 and 50% lower than in wounded plants (fig. 2).

Several wound-responsive genes were additionally induced by *C. parasitica* inoculation. The additional stimulation took place at different time points, dependent of the gene concerned. Most frequently, the highest induction by *C. parasitica* was observed 72h post wounding. The inducing effect of *C. parasitica* ranged between 2 and 10-fold. Especially β -1,3-glucanase, germin and CsCAB were particularly highly induced by fungal inoculation (8 to 10-fold on day 3). Other wound-responsive genes up-regulated by *C. parasitica* were CsAnt, CsPAL and Cs15.46 (fig. 3).

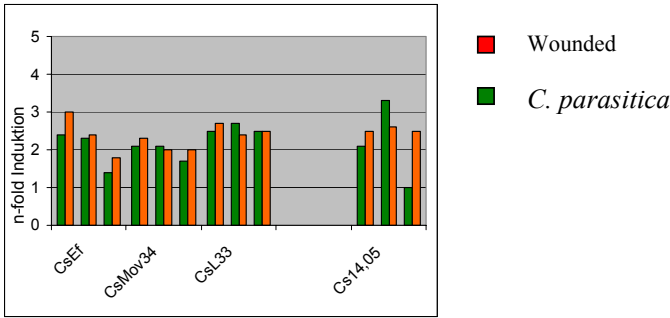


Fig. 1: Induction of wound-responsive genes not substantially influenced by pathogen infection.

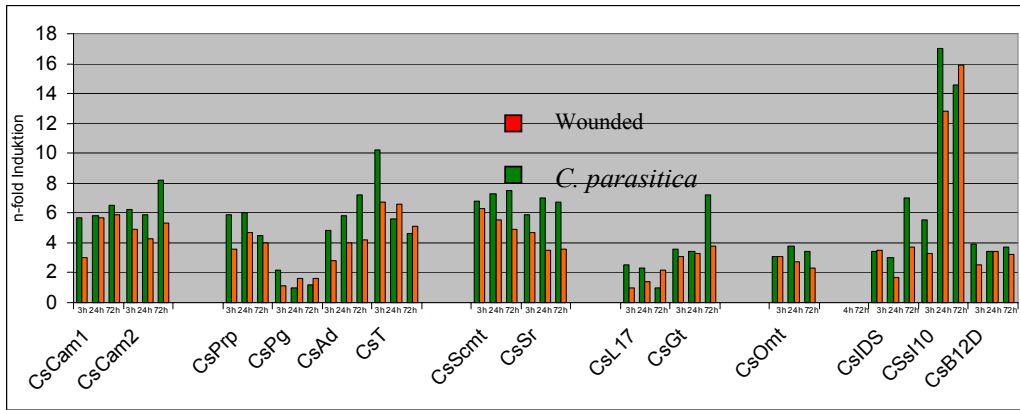


Fig. 2: Induction of wound-induced genes suppressed by *C. parasitica*

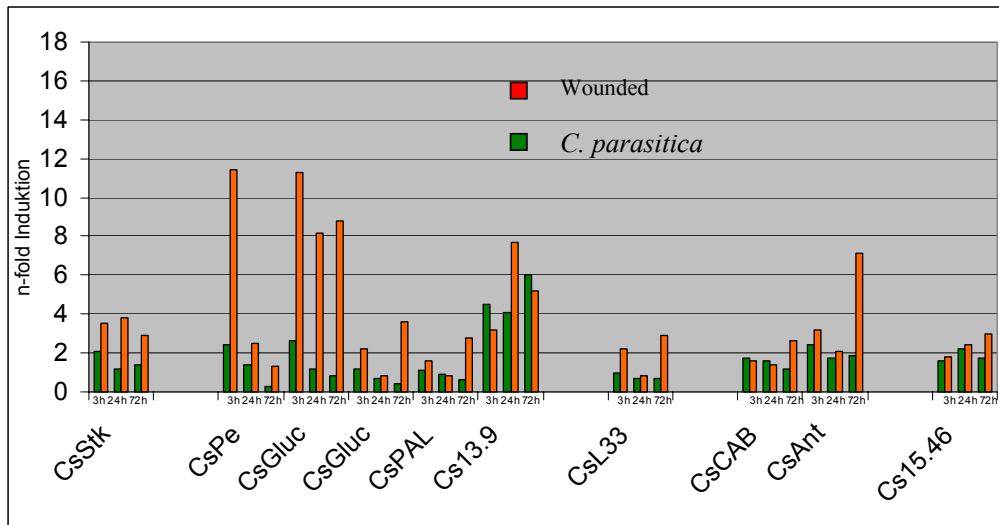


Fig. 3: Induction of genes stronger induced by *C. parasitica* than by wounding alone.

Discussion

Many of the wound-inducible genes isolated from chestnut were similar to genes, which are also wound-responsive in herbal plants and in leaves of trees (Reymond et al. 2000, Schenk et al. 2000, Thamarus et al. 1998).

The induction of wound-responsive kinase as well as calmodulin isoforms has been described previously for *Arabidopsis*, *Medicago* and soybean (Reymond et al. 2000, Bögre et al. 1997, Lee et al. 1995, Bergey and Ryan 1999,). Also the induced expression of genes involved in pathogen defense such as γ -thionin-like proteinase inhibitor, β -1,3-glucanase, germin-like protein and chaperones has been reported (Reymond et al. 2000, Bergey and Ryan 1996, Bergey et al. 1999, Schafleitner and Wilhelm 2001).

Germins belong to a multigene family of glycosylated proteins and are expressed in embryos and vegetative tissues of many different plant species, particularly under stress conditions such as salt and heavy metal stress, exogenous application of polyamines and pathogen infection (Lane et al., 1986, Neutelings et al., 1998, Delseny et al., 1994, Hurkman et al., 1991, Berna and Bernier 1999, Hurkman et al., 1996). The biochemical function of germins is oxalate oxidase activity and they might be important enzymes for cell wall strengthening or in H_2O_2 production in response to pathogen infection (Schweizer et al., 1999, Lane 2000, Zhou et al., 1998). In chestnut, a germin like gene is slightly up-regulated by wounding and stronger stimulated upon pathogen infection in stems. The specific function of the chestnut germins in chestnut can not be deduced from these experiments, but its induction by *C. parasitica* suggests that it has a role in pathogen defense.

Thionins are low-molecular-weight proteins occurring in various plant tissues and species (Florack and Stiekema 1994) and are toxic to bacteria, fungi, yeasts and various naked cells in vitro. The superfamily of γ -thionin-like proteins of plants comprises thionins (Bruix et al., 1993), proteinase inhibitors (Choi et al., 1993, Bloch and Richardson 1991, Stiekema et al., 1988), and unclassified proteins (Domon et al., 1990, Ishibashi et al., 1990, Gu et al., 1992). The wound-inducible chestnut thionin contains the γ -thionin homology domain which characterizes this gene as a member of the γ -thionin superfamily. The structure of Cs γ T is identical with thionins and thionin-like proteinase inhibitors, having a signal domain at the N-terminus followed by a highly basic core sequence with eight cysteine residues, which enable the formation of four disulfide bridges (Moreno et al., 1994, Karunanandaa et al., 1994, Lin et al., 1999). Its closest relative is a soybean proteinase inhibitor gene (Cushman and Maitra 2000) and it shares high sequence and structure homology to other γ -thionins and proteinase inhibitors of pepper (Meyer et al., 1996), *Petunia* (Karunanandaa et al., 1994), sunflower (Urdangarin and de la Canal 2000) and also to a γ -thionin of *Picea abies* root (Sharma and Linneborg 1996). The induction of thionins as well as proteinase inhibitors in response to wounding and pathogen infection has been reported (Vignutelli et al., 1998, McGurl et al., 1994, An et al., 1989, Bradshaw et al., 1990, Tamayo et al., 2000, Choi et al., 2000). The lower induction of CsT when *C. parasitica* is present in the wound could be due to an inhibiting effect of SA on Ja-dependent signal pathways (Li et al. 1992).

β -1,3-glucanases are considered as pathogen-related proteins. They are regarded as antifungal proteins, acting synergistically with chitinases (Mauch et al., 1988), to lyse chitin and glucan components of fungal cell walls. They accumulate in response to incompatible pathogens, particularly during SAR establishment (Ward et al., 1991). In chestnut β -1,3-glucanase activity has been detected in leaves and stems upon wounding and pathogen infection, and at a low extent, also in untreated plants (Schafleitner and Wilhelm 1997). The CsGluc partial cDNA isolated from wounded plants shows very high sequence homology to a β -1,3-glucanase previously isolated from chestnut (Fonseca et al., 2000a and b) and to β -1,3-glucanases of other tree species. Its low induction upon wounding but high stimulation by *C. parasitica* indicated its function in the pathogen response.

Genes of cell wall modification previously have implications with the wound response of plants. E.g. proline-rich protein genes have been described for a variety of plant species (Wyatt et al., 1992, Hong et al., 1989, Chen et al., 1993, Fowler et al., 1999, Cheung et al., 1993, Salts et al., 1991, Subramaniam 1994, Ye and Varner 1993, Roberts et al., 1993, Jose-Estanyol et al., 1992, Perlick and Puhler 1993). They determinate the rigidity of the cell wall and influence the growth of the cells (Brownleader et a. 2000, Otte and Barz 2000). CsPrps, as putative extracellular prps, could have an analogous function in chestnut bark.

Polygalacturonases degrade plant cell walls during fruit ripening, abscission and in growing and expanding tissues (Gray et al., 1992, Hadfield and Bennett 1998). An other implication of polygalacturonase in plants is suggested by Bergey et al., 1999, who have reported a wound-inducible polygalacturonase in tomato leaves and Orozco-Cardenas and Ryan (1999) have demonstrated that polygalacturonase induction correlates with H₂O₂ production upon wounding in many plant families. Through production of cell wall derived oligosaccharides these enzymes are considered to stimulate the oxidative burst (Bergey et al., 1999). In chestnut stems, a stimulation of polygalacturonase is observed upon wounding. The exact function of this polygalacturonase subunit in chestnut is unclear. Pectin esterases are involved in deconstructing cell walls and changing their rigidness. Modulation of pectin esterase expression in plants has been investigated mainly in connection with developmental processes in cell walls (McQueen-Mason 1997), roots, (Wen et al., 1999) and in the cambium (Guglielmino et al., 1997). According to Reymond et al., (2000) pectin esterase genes are wound-inducible in *A. thaliana*, but their exact role in the wound response is not documented. In chestnut stems, the up-regulation of pectin esterase could be due to growth processes at the wounded site.

Given the central role of protein synthesis in cellular function, it is likely that induced gene expression goes in parallel to an increase of ribosome number, which implicates synthesis of ribosomal proteins. For the ribosomal protein L34 a strong increase of promotor activity upon mechanical wounding has been demonstrated (Dai et al., 1996). Similarly to the chestnut ribosomal proteins, which are up-regulated upon wounding.

A MOV-34 related cDNA is induced in chestnut stems upon wounding. This cDNA shows similarities to the 26S proteasome. The 26S proteasome is the major non-lysosomal protease in eukaryotic cells. It is hypothesized that the regulatory subunit of the proteasome may be regulated in higher plants to cope with the frequently encountered environmental stresses (Peng et al., 2001). Because the change of the physiological status of a cell generally is accompanied with the alteration of the cellular protein composition, increased protein synthesis goes hand in hand with increased protein degradation in stressed cells, in order to adapt the cellular protein constitution to the actual requirements or stress condition (Becker et al., 2000). The higher expression of a proteasomal regulatory subunit could be a consequence of this requirement.

The family of chlorophyll A/B binding proteins comprises many different polypeptides with conserved structure. Some of these proteins are expressed in high amounts in the plant tissue, others accumulate only at lesser extent. Generally they are considered to be regulated by light (Piechulla et al., 1991), but due to an interlink between red light and SA signal transduction, CAB is also induced by stress (Schenk et al. 2000).

However, some of the isolated genes have not yet been associated with the wound response. Whereas steroid reductase has been implicated in the wound- and pathogen response (Schenk et al. 2000), this has not been the case with Sterol-C-methyltransferase. Both genes are clearly induced by wounding in chestnut stems. Sterol-C-methyltransferase is involved in plant sterol biosynthesis, particularly in the formation of 24-alkyl sterols (mainly 24-ethyl sterols) which play major roles in plant growth and development (Bouvier-Nave et al., 1997). Sterols are known to play at least two critical roles in plants: as bulk components of membranes regulating the stability and permeability (Bach and Beneviste 1997) and as precursors of

growth promoting steroids (Fujioka and Sakurai 1997). In plants, sterols are subject to a series of modifications, involving hydroxylation, methylation and reduction (Fujioka et al., 1995, Sasse 1997). Δ -7 sterol-reductases catalyze crucial steps in steroid-biosynthesis in plants. *A. thaliana* mutants defective for one of these enzymes exhibit characteristic dwarf phenotypes (Choe et al., 2000). The exact function of CsSR and CsSCMT in chestnut, particularly upon wounding remains unclear, but a role of these genes in growth regulation and morphogenesis is suggested based on the function of homologous proteins in other plants (Choe et al., 2000). An other example of a wound-responsive gene of chestnut stems, which previously has not been considered to be involved in the wound response of plants is arginine decarboxylase, a key enzyme of the polyamine biosynthesis (Soyka and Heyer 1999). Polyamins are involved in many developmental processes of plants as well as in the response to stresses, particularly osmotic stress (Nam et al., 1997, Walden et al., 1997). In tobacco cell cultures arginine decarboxylase expression is not influenced by Methyl-JA (Imanishi et al., 1998) and thus this enzyme it is generally not considered to be wound-inducible. However, in chestnut CsAd is upregulated upon wounding. It has not been tested whether this induction is a direct consequence of wounding, or is due to osmotic stress due to water loss of the wounded tissue. No example of a stress-induced O-glycosyltransferase in plants has been reported previously. The strong upregulation, particularly 72 h post wounding of a putative N-acetyl-glucosamine-O-glycosylase therefore is the first report of the wound-induced transcription of a glycosylation gene in plants. The participation of O-glycosylases in gibberellin-dependent signaling has been mentioned (Thornton et al., 1999), but the regulation of the glycosylase itself has not been investigated.

Adenine nucleotide translocators and oxoglutarate-malate translocases belong to the family of mitochondrial carrier proteins. They are encoded by nuclear genes and confer the exchange of molecules between mitochondria and cytoplasm (Laloi 1999).

Adenine nucleotide translocator catalyses the exchange of ATP and ADP between the mitochondria and the cytosol. It consists of two identical 30 kDa subunits and is a relative abundant protein of the mitochondrial membrane (Stryer 1990). A connection between adenine nucleotide translocator activity and stress response has been suggested for cold-stressed maize leaves, where a mitochondrial peroxidase is induced together with a ATP/ADP translocase (De Santis et al., 1999). Damage of mitochondrial proteins by reactive oxygen species produced in response to wounding also could require an increased transcription of the adenine nucleotide translocator gene (Moller 2001). Oxoglutarate-malate translocase transports oxoglutarate across the inner membranes of mitochondria in exchange for malate (Palmieri et al., 1993). Oxoglutarate has multiple functions in cells, such as oxidation substrate and starting point for the synthesis of various amino acids. Oxoglutarate-malate translocase proteins are located in the mitochondrial membrane, like the adenine nucleotide translocator (Laloi 1999). No reports on upregulation of oxoglutarate-malate translocase genes in response to stresses are present until now. The induction of this gene in wounded chestnut stems has been clearly demonstrated, however the cause and function of this upregulation remains to be elucidated. It can be speculated that also in the case of oxoglutarate-malate translocase, damage to mitochondrial proteins perhaps by reactive oxygen species could require augmented synthesis of these enzymes.

Nothing is known about the function of IDS-4 proteins of plants. They accumulate e.g. in response to iron deficiency in Arabidopsis (Mori et al., 2000), and upon wounding in chestnut stems. IDS-4 are relative small proteins with a slightly acidic pI of around 5.5, located probably in the cytoplasm. Also about the biochemical function of B12D proteins nothing is known. A B12D ortholog is expressed in barley aleurone layers, in embryos of developing seeds and in maternal tissues (Aalen 1994). A wound-inducible cDNA termed Cs15.46 shows similarity to enoyl-CoA reductases, but essential domains of this enzyme are missing in this putative full length cDNA clone, leading to the assumption that this clone does not represent a

enoyl-CoA reductase cDNA. In *A. thaliana* recently a enoyl-CoA like protein has been detected, which also lacks the Enoyl-CoA hydratase consensus domain and is highly similar to Cs 15.46. However, no function is ascribed to this gene. CsI10, which is highly expressed upon wounding and pathogen infection in chestnut stems, represents a partial cDNA clone of an unknown gene. Neither the nucleotide sequence, nor the amino acid sequence or amino acid repeat motives present in the deduced protein reveal any significant similarity to known genes. The same is true for Cs14.05, where also no sequence similarity to genes of known function have been detected.

The influence of *C. parasitica* on the expression of wound-inducible genes is different, dependent of the gene investigated and dependent of the time point after infection. A general downregulation of transcription has not been observed. The influence of *C. parasitica* seems to be specific and might be due to interferences between signal transduction cascades initiated by pathogens or by abiotic stress. Parallel investigations of the influence of wounding and pathogen inoculation on the accumulation of different stress signal hormone accumulation on one hand and on gene expression on the other hand with model plants gave insight in some aspects of crosstalk between signal transduction pathways upon stress application in plants (Reymond et al. 2000, Schenk et al. 2000). Similar investigations on bark tissues would be required to investigate the cross talk between different signal pathways in the bark.

References:

- Aalen RB, Opsahl-Ferstad HG, Linnestad C, Olsen OA. 1994. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. *Plant J.* 5:385-396.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1994. *Molecular Biology of the cell*. Robertson (ed.), Garland, NY, USA, p. 369.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- An G, Mitra A, Choi HK, Costa MA, An K, Thornburg R, Ryan CA. 1989. Functional analysis of the 3' control region of the potato wound-inducible proteinase inhibitor II gene. *Plant Cell* 1:115-122.
- Anagnostakis SL. 1987. Chestnut Blight: The classical problem of an introduced pathogen. *Mycologia* 29:23-37.
- Bach TJ, Beneviste P. 1997. Cloning of cDNAs or genes encoding enzymes of sterol biosynthesis from plants and other eukaryotes: Heterologous expression and complementation analysis of mutations for functional characterization. *Prog. Lipid Res.* 36:197-226.
- Becker J, Kempf R, Jeblick W, Kauss H. 2000. Induction of competence for elicitation of defense responses in cucumber hypocotyls requires proteasome activity. *Plant J.* 21:311-316.
- Bergey DR, Howe GA, Ryan CA. 1996. Polypeptide signaling for plant defensive genes exhibits analogies to defense signaling in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93:12053-12058.
- Bergey DR, Ryan CA. 1999. Wound- and systemin-inducible calmodulin gene expression in tomato leaves. *Plant Mol. Biol.* 40:815-823.
- Bergey DR, Orozco-Cardenas M, Moura D, Ryan CA. 1999. A wound- and systemin-inducible polygalacturonase in tomato leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:1756-1760.
- Berna A, Bernier F. 1999. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂ producing enzyme. *Plant Mol. Biol.* 39:539-549.
- Biggs AR. 1986. Phellogen regeneration in injured peach tree bark. *Ann.Bot.* 57: 463-470.

- Bloch C. Jr., Richardson. 1991. A new family of small (5 kDa) protein inhibitors of insect alpha-amylases from seeds of sorghum (*Sorghum bicolor* (L) Moench) have sequence homologies with wheat gamma-purothionins. *FEBS Lett.* 279:101-104.
- Bögge L, Ligterink W, Meskiene I, Barker PJ, Heberle-Bors E, Huskisson NS, Hirt H. 1997. Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9, 75-83.
- Bouvier-Nave P, Husselstein T, Desprez T, Benveniste P. 1997. Identification of cDNAs encoding sterol methyl-transferases involved in the second methylation step of plant sterol biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 246:518-529.
- Bradshaw HD jr., Hollick JB, Parsons TJ, Clarke HR, Gordon MP. 1990. Systemically wound-responsive genes in poplar trees encode proteins similar to sweet potato sporamins and legume Kunitz trypsin inhibitors. *Plant Mol. Biol.* 14:51-59.
- Brownleader MD, Hopkins J, Mobasheri A, Dey PM, Jackson P, Trevan M. 2000. Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta*. 210:668-676.
- Bruix M, Jimenez MA, Santoro J, Gonzalez C, Colilla FJ, Mendez E, Rico M. 1993. Solution structure of gamma 1-H and gamma 1-P thionins from barley and wheat endosperm determined by 1H-NMR: a structural motif common to toxic arthropod proteins. *Biochemistry* 32:715-724.
- Chen CG, Mau SL, Clarke AE. 1993. Nucleotide sequence and style-specific expression of a novel proline-rich protein gene from *Nicotiana glauca*. *Plant Mol. Biol.* 21:391-395.
- Chang S, Puryear J, Cairney J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Reporter* 11:113-116
- Cheung AY, May B, Kawata EE, Gu Q, Wu HM. 1993. Characterization of cDNAs for stelar transmitting tissue-specific proline-rich proteins in tobacco. *Plant J.* 3:151-160.
- Choe S, Tanaka A, Noguchi T, Fujioka S, Takatsuto S, Ross AS, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA. 2000. Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *Plant J.* 21:431-443.
- Choi D, Park J, Seo YS, Chun YJ, Kim WT. 2000. Structure and stress-related expression of two cDNAs encoding proteinase inhibitor II of *Nicotiana glutinosa* L. *Biochim. Biophys. Acta* 1492:211-215.
- Choi Y, Choi YD, Lee JS. 1993. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a low molecular weight sulfur-rich protein in soybean seeds. *Plant Physiol.* 101:699-700.
- Cushman JC, Maitra N. 2000. Proteinase inhibitor – soybean. Unpublished. GenBank accession n°T06381
- Dai Z, Gao J, An K, Lee JM, Edwards GE, An G. 1996. Promoter elements controlling developmental and environmental regulation of a tobacco ribosomal protein gene L34. *Plant Mol. Biol.* 32:1055-65.
- De Santis A, Landi P, Genchi G. 1999. Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome c oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. *Plant Physiol.* 119:743-754.
- Delseny M, Gaubier P, Hull G, Saez-Vasquez J, Gallois P, Raynal M, Cooke R, Grellet F. 1994. Nuclear genes expressed during seed desiccation: relationship with responses to stress. In: *Stress Induced Gene Expression*. Basra AS (ed) Harwood Academic Publishers, Reading, UK, pp 25-59.

- Domon C, Evrard JL, Herdenberger F, Pillay DT, Steinmetz A. 1990 Nucleotide sequence of two anther-specific cDNAs from sunflower (*Helianthus annuus* L.) Plant Mol. Biol. 15:643-646.
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C. 2000. Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. Trends Biochem. Sci. 25:83-88.
- Florack DE, Stiekema WJ. 1994. Thionins: properties, possible biological roles and mechanisms of action. Plant Mol. Biol. 26:25-37.
- Fonseca S, Serrazina SM, Seabra RC, Pais MS. 2000a. Isolation of European chestnut putative β -1,3-glucanase genes. Abstracts of the COST G4 Workshop „Genetic Resources“ and „Silviculture“, Vila Real, Portugal, Oct. 18-22, 2000, p.35.
- Fonseca SC, Serrazina SM, Seabra RM, Pais MS. 2000b. *Castanea sativa* β -1,3-glucanase, partial cDNA, GenBank accession n°AF268890.
- Fowler TJ, Bernhardt C, Tierney ML. 1999. Characterization and expression of four proline-rich cell wall protein genes in *Arabidopsis* encoding two distinct subsets of multiple domain proteins. Plant Physiol. 121:1081-1092.
- Fujioka S, Inoue T, Takatsuto S, Yanagisawa T, Yokota T, Sakurai A. 1995. Biological activities of biosynthetically-related congeners of brassinolide. Biosci. Biotechnol. Biochem. 59:1973-1975.
- Fujioka S, Sakurai A. 1997. Brassinosteroids. Nat. Prod. Rep.14:1-10.
- Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D. 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. Plant Mol. Biol. 19:69-87.
- Gu Q, Kawata EE, Morse MJ, Wu HM, Cheung AY. 1992. A flower-specific cDNA encoding a novel thionin in tobacco. Mol. Gen. Genet. 234:89-96.
- Guglielmino N, Liberman M, Catesson AM, Mareck A, Prat R, Mutaftschiev S, Goldberg R. 1997. Pectin methylesterases from poplar cambium and inner bark: localization, properties and seasonal changes. Planta 202:70-75.
- Hadfield KA, Bennett AB. 1998. Polygalacturonases: many genes in search of a function. Plant Physiol. 117:337-343.
- Hong JC, Nagao RT, Key JL. 1989. Developmentally regulated expression of soybean proline-rich cell wall protein genes. Plant Cell 1:937-943.
- Hurkman WJ, Tanaka CK. 1996. Germin gene expression is induced in wheat leaves by powdery mildew infection. Plant Physiol. 111:735-739.
- Hurkman WJ, Tao HP, Tanaka CK. 1991. Germin-like polypeptides increase in barley roots during salt stress. Plant Physiol. 97:366-374.
- Imanishi S, Hashizume K, Nakakita M, Kojima H, Matsubayashi Y, Hashimoto T, Sakagami Y, Yamada Y, Nakamura K. 1998. Differential induction by methyl jasmonate of genes encoding ornithine decarboxylase and other enzymes involved in nicotine biosynthesis in tobacco cell cultures. Plant Mol. Biol. 38:1101-1111.
- Ishibashi N, Yamauchi D, Minamikawa T. 1990. Stored mRNA in cotyledons of *Vigna unguiculata* seeds: nucleotide sequence of cloned cDNA for a stored mRNA and induction of its synthesis by precocious germination. Plant Mol. Biol. 15:59-64.
- Ito T, Sakaki Y. 1997. Fluorescent differential display. In: Methods in Molecular Biology, Vol. 85: Differential Display Methods and Potocols. Liang P. and Pardee AB, (eds.). Humana Press Inc. Totowa, NJ, USA
- Jose-Estanyol M, Ruiz-Avila L, Puigdomenech P. 1992. A maize embryo-specific gene encodes a proline-rich and hydrophobic protein. Plant Cell 4:413-423.

- Karunanandaa B, Singh A, Kao TH. 1994. Characterization of a predominantly pistil-expressed gene encoding a gamma-thionin-like protein of *Petunia inflata*. *Plant Mol. Biol.* 26:459-464.
- Laloi M. 1999. Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell. Mol. Life. Sci.* 56: 918-944.
- Lane BG, Grzelczak ZF, Kennedy TD, Kajiora R, Orr J, D'Agostino S, Jaikaran ASI. 1986. Germin: compartmentation of two forms of the protein by washing growing wheat embryos. *Biochem. Cell Biol.* 64:1025-1037.
- Lane BG. 2000. Oxalate oxidase and differentiating surface structure in wheat:germins. *Biochem. J.* 349:309-321.
- Lee JH, Choi SK, Roll-Mecak A, Burley SK, Dever TE. 1999. Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:4342-4347.
- Li N, Parsons BL, Liu DR, Mattoo AK 1992. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines. *Plant Molecular Biology* 18: (3) 477-87.
- Liang P, Pardee AB. 1997. Differential Display: A general protocol. In: *Differential Display Methods and Protocols*. P. Liang and AB. Pardee (eds.), Humana Press, totowa, NJ, USA, pp. 3-13.
- Lin X, Kaul S, Rounsley S, Shea TP, Benito MI, Town CD, Fujii CY, Mason T, Bowman CL, Barnstead M, Feldblyum TV, Buell CR, Ketchum KA, Lee J, Ronning CM, Koo HL, Moffat KS, Cronin LA, Shen M, Pai G, Van Aken S, Umayam L, Tallon LJ, Gill JE, Venter JC, et al. 1999. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402:761-8.
- Linthorts HJM, Melchers LS, Mayer A, van Roekel JSC, Cornelissen BJC, Bol JF. 1990. Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:8756-8760.
- Maleck K, Dietrich RA. 1999. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4:215-219.
- Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. 1988. Antifungal hydrolases: Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase. *Plant Physiol.* 88:936-942
- McGurl B, Orozco-Cardenas M, Pearce G, Ryan CA. 1994. Overexpression of the prosystemin gene in transgenic tomato plants generates a systemic signal that constitutively induces proteinase inhibitor synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:9799-9802.
- McQueen-Mason S. 1997. Plant cell walls and the control of growth. *Biochem Soc. Trans.* 25:204-214.
- Meyer B, Houlne G, Pozueta-Romero J, Schantz ML, Schantz R. 1996. Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Upregulation during ripening and upon wounding. *Plant Physiol.* 112:615-622.
- Moller IM. 2001. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:561-591.
- Moreno M, Segura A, Garcia-Olmedo F. 1994. Pseudothionin-St1, a potato peptide active against potato pathogens. *Eur. J. Biochem.* 223:135-139.
- Mori S, Nakanishi H, Okumura N, Umehara Y, von Wiren N, Nishizawa N, Chino M. 2000. Ids-4 protein of barley. Unpublished. GenBank accession n° T05905 and BAA03206.

- Nam KH, Lee SH, Lee J. 1997. Differential expression of ADC mRNA during development and upon acid stress in soybean (*Glycine max*) hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 38:1156-1166.
- Neutelings G, Domon JM, Membre N, Bernier F, Meyer Y, David A, David H. 1998. Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet). *Plant Mol. Biol.* 38:1179-1190.
- Orozco-Cardenas M, Ryan CA. 1999. Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octodecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:6553-6557.
- Otte O, Barz W. 2000. Characterization and oxidative in vitro cross-linking of an extensin-like protein and a proline-rich protein purified from chickpea cell walls. *Phytochemistry* 53:1-5.
- Palmieri F, Bisaccia F, Capobianco L, Dolce V, Fiermonte G, Iacobazzi V, Zara V. 1993. Transmembrane topology, genes, and biogenesis of the mitochondrial phosphate and oxoglutarate carriers. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25:493-501.
- Peng Z, Staub JM, Serino G, Kwok SF, Kurepa J, Bruce BD, Vierstra RD, Wei N, Deng X. 2001. The cellular level of pr500, a protein complex related to the 19s regulatory particle of the proteasome, is regulated in response to stresses in plants. *Mol Biol Cell* 12:383-392.
- Perlick AM, Puhler A. 1993. A survey of transcripts expressed specifically in root nodules of broadbean (*Vicia faba* L.). *Plant Mol. Biol.* 22:957-970.
- Piechulla B, Kellmann JW, Pichersky E, Schwartz E, Forster HH. 1991. Determination of steady-state mRNA levels of individual chlorophyll a/b binding protein genes of the tomato cab gene family. *Mol. Gen. Genet.* 230:413-422.
- Reymond P, Weber H, Damond M, Farmer EE. 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12:707-720.
- Roberts MR, Foster GD, Blundell RP, Robinson SW, Kumar A, Draper J, Scott R. 1993. Gametophytic and sporophytic expression of an anther-specific *Arabidopsis thaliana* gene. *Plant J.* 3:111-120.
- Salts Y, Wachs R, Gruissem W, Barg R. 1991. Sequence coding for a novel proline-rich protein preferentially expressed in young tomato fruit. *Plant Mol. Biol.* 17:149-150.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press Vol. 1-3
- Sasse JM. 1997. Recent progress in brassinosteroid research. *Plant Physiol.* 100:696-701.
- Schafleitner R, Wilhelm E. 1997. Effect of virulent and hypovirulent *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr. on the intercellular PR-proteins and protein pattern of chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 51:323-332.
- Schenk PM, Kazan K, Wilson I, Anderson JP, Richmond T, Somerville SC, Manners JM. 2000. Coordinated plant defense responses in *Arabidopsis* revealed by microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:11655-11660.
- Schweizer P, Christoffel A, Dudler R. 1999. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *Plant J.* 20:541-552.
- Sharma P, Linneborg A. 1996. Isolation and characterization of a cDNA encoding a gamma-thionin-like protein from roots of Norway spruce. Unpublished, GenBank accession n° CAA62761.
- Shigo AL. 1986. *A new tree biology*. Shigo and Trees Associates. Durham, NH, USA.
- Soyka S, Heyer AG. 1999. *Arabidopsis* knockout mutation of ADC2 gene reveals inducibility by osmotic stress. *FEBS Lett.* 458:219-223.

- Stiekema WJ, Heidekamp F, Dirkse WG, van Beckum J, de Haan P, ten Bosch C. Louwerse JD. 1988. Molecular cloning and analysis of four potato tuber mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 11:255-269.
- Stryer L. 1990. *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaft Verlags-GmbH, Heidelberg.
- Subramaniam K, Ranie J, Srinivasa BR, Sinha AM, Mahadevan S. 1994. Cloning and sequence of cDNA encoding a novel hybrid proline-rich protein associated with cytokinin-induced haustoria formation in *Cuscuta reflexa*. *Gene* 141: 207-210.
- Tamarus KA, Furnier GR. 1998. Temporal and genotypic variation of wound-induced gene expression in bark of *Populus tremuloides* and *P. grandidentata*. *Can. J. For. Res.* 28:1611-1620.
- Tamayo MC, Rufat M, Bravo JM, San Segundo B. 2000. Accumulation of a maize proteinase inhibitor on response to wounding and insect feeding, and characterization of its activity toward digestive proteinases of *Sporodoptera littoralis* larvae. *Planta* 211:62-71.
- Thornton TM, Swain SM, Olszewski NE. 1999. Gibberellin signal transduction presents ellipsis the SPY who O-GlcNAc'd me. *Trends Plant Sci.* 4:424-428.
- Urdangarin MC, de la Canal L. 2000. Cloning of defensin cDNA expressed in sunflower (*Helianthus annuus*) inflorescence. Unpublished. GenBank accession n° AF141131_1.
- Vignutelli A, Wasternack C, Apel K, Bohlmann H. 1998. Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant J.* 14:285-295.
- Walden R, Cordeiro A, Tiburcio AF. 1997. Polyamines: small molecules triggering pathways in plant growth and development. *Plant Physiol.* 113:1009-13
- Wan JS, Erlander MG. 1997. Cloning differentially expressed genes by using differential display and subtractive hybridisation. *In* *Methods in Molecular Biology*, Vol 85: Differential Display Methods and Protocols. Eds. P. Liang and A.B. Pardee. Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp 45-68.
- Ward ER, Uknes SJ, Williams SC, Dincher SS, Wiederhold DL, Alexander DC, Ahl-Goy P, Métraux J-P, Ryals JA. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell* 3:1085-1094
- Wen F, Zhu Y, Hawes MC. 1999. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell* 11:1129-1140.
- Wyatt, R.E., Nagao, R.T. and Key J.L. 1992. Patterns of soybean proline-rich protein gene expression. *Plant Cell* 4:99-110.
- Ye ZH, Varner JE. 1993. Gene expression patterns associated with in vitro tracheary element formation in isolated single mesophyll cells of *Zinnia elegans*. *Plant Physiol.* 103:805-813.
- Zhou F, Zhang Z, Gregersen PL, Mikkelsen JD, de Neergaard E, Collinge DB, Thordal-Christensen H. 1998. Molecular characterization of the oxalate oxidase involved in the response of barley to the powdery mildew fungus. *Plant Physiol.* 117:33-41.

5 HANDBUCH ZUR ANWENDUNG DER BIOLOGISCHEN BEKÄMPFUNG VON KASTANIENRINDENKREBS FÜR DEN ANWENDER

5.1.1. *Schadbild*

Am augenfälligsten und schon aus einiger Entfernung zu erkennen ist die typische Welketracht. Blätter und ggf. Früchte hängen verdorrt an den Ästen und fallen auch im Winter nicht ab.

Verfolgt man die betroffenen Äste stammwärts, stößt man auf nekrotische Veränderungen der Rinde und knapp darunter auf büschelweise Neuaustriebe, sog. Wasserreiser.

Die Nekrosen beginnen mit orangebrauner Verfärbung und Einsenkung der Rinde, breiten sich elliptisch aus und die Rinde reißt auf.

Der Baum versucht durch heftige Peridermbildung die Läsion zu umwallen, wodurch die Rinde stark anschwillt, was die Bezeichnung „Rindenkrebs“ erklärt.

Spätestens wenn die Nekrose den Ast oder Stamm umgürtet hat, sterben die distalen Teile ab.

Abgestorbene Bäume bilden meist massive Stockausschläge, welche aber üblicherweise schon an der Basis Befallstellen zeigen. (Bilder 1 - 5)

5.1.2. *Erreger*

Verursacher der oben beschriebenen Symptome ist ein Schlauchpilz aus der Klasse der Pyrenomyceten (BRANDENBURGER 1985), der nach mehreren Revisionen nun unter der Bezeichnung *Cryphonectria parasitica* (Murr.) Barr 1978 bekannt ist.

Er dringt durch Wunden in Stamm und Äste ein, wo die dunkelgelben Mycelmatten das Rinden- und Kambialgewebe durchwachsen und verstopfen. (Bild 6+7)

Wegen des dadurch unterbundenen Wasser- und Nährstofftransportes kommt es rasch zu Welkeerscheinungen und letztendlich zum Absterben der Äste oberhalb der Befallstellen.

Diese Pilze mit letaler Wirkung werden als virulent (v) bezeichnet.

In Kultur bilden sie ein gelbes bis dunkelorange Stroma mit orangebraunen Pyknidien. (Bild 8)

Sie werden in diverse „vegetative Kompatibilitätsgruppen“ (=VCG) unterteilt:

Pilzstämmen deren Mycelien miteinander verschmelzen, d.h. zwischen deren Hyphen Anastomosen (=Brücken) gebildet werden, nennt man vegetativ kompatibel und ordnet sie derselben VCG zu. (Bild 9) (ANAGNOSTAKIS 1987).

Unverträgliche, vegetativ inkompatible Mycelien bilden an den Kontaktzonen Pyknidienreihen (=Barragen) und die Hyphenspitzen sterben ab (Bild 10) (ROANE 1986).

Da dieses VCG-System genetisch von mehreren Faktoren determiniert wird, ergibt sich eine Anzahl von zumindest 128 verschiedenen VCGs.

Die Verbreitung des Pilzes erfolgt durch Sporenverfrachtung durch Wind, Vögel, Insekten, aber auch der Transport von infiziertem Holz, Setzlingen und Edelreisern trägt wesentlich zur Ausbreitung bei.

5.1.3. *Hypovirulenz*

Neben den letalen v-Formen treten auch nonletale Formen auf, die wegen ihres oberflächlichen Wachstums lediglich Rindenwucherungen hervorrufen und demnach als hypovirulent (=hv) bezeichnet werden (Bild 11).

In Kultur wächst dieses Pilzstroma weiß bis gelblich und bildet nur wenige Pyknidien (Bild 12).

Die verminderte Pathogenität wird durch ein Doppelstrang-RNA-Virus (=ds RNA) bewirkt (NUSS 1992), welches bei entsprechender vegetativer Kompatibilität über die

Hyphenanastomosen auf einen v-Stamm übertragen werden kann und diesen somit in eine hv-Form konvertiert (GRENTE 1965).

5.1.4. Bekämpfung

Die oben angeführte Konversionskapazität eröffnet die Möglichkeit der biologischen Bekämpfung des Kastanienrindenkrebses.

Umwandlungen können bei Vorhandensein geeigneter Konversionspartner gezielt im Labor durchgeführt werden.

Die konvertierten Pilze werden anschließend in ein spezielles Medium eingebettet und im Freiland in geeigneter Weise appliziert

Die Applikation eines ko-hv Pilzes um Nekrosen an befallenen Bäumen, führt nach Hyphenverschmelzung mit dem ansässigen v Pilz zu dessen Konvertierung, wodurch eine Vergrößerung der Nekrose verhindert, bzw. das Ausheilen der Wunde ermöglicht wird.

5.1.5. Begleitende phytosanitäre Maßnahmen

Um den Infektionsdruck zu vermindern, den Bäumen zu neuen Kräften zu verhelfen und das Verheilen der Läsionen zu erleichtern, sollten begleitende Schnittmaßnahmen getroffen werden:

- konsequentes, radikales Entfernen der abgestorbenen und unrettbar befallenen Äste, Ausschneiden der Nekrosen und Verbrennen möglichst vor Ort
- Arbeitsgeräte zwischen den Arbeitsgängen unbedingt desinfizieren (eintauchen, abwaschen mit 70%igem Alkohol und abflammen)
- Großflächig ausgeschnittene Nekrosen mit Baumwachs verschmieren um eine Besiedelung mit holzerstörenden Organismen zu verhindern, falls das Holz aufreißt (Bild 19)

Überdies gelten bereits gesetzliche Quarantänebestimmungen:

„Durch Quarantänemaßnahmen soll eine Verschleppung des Erregers in befallsfreie Gebiete verhindert werden. Das Pflanzenschutzgesetz enthält in der dzt. gültigen Fassung bereits die Pflanzenschutzrichtlinie der EU (RL 77/93/EWG), die nachstehende Regelung trifft:

- Kastanienholz darf – auch wenn es unbefallen ist – aus Befallsgebieten nur dann weggebracht werden, wenn es entrindet ist.
- Pflanzen von *Castanea* Mill. und *Quercus* L. von Baumschulen aus Befallsgebieten dürfen nur dann verkauft bzw. verbracht werden, wenn aml. festgestellt wurde, dass auf der Anbaufläche oder in deren unmittelbarer Umgebung seit Beginn der letzten abgeschlossenen Vegetationsperiode keine Anzeichen von *Cryphonectria parasitica* (Murr.) festgestellt wurden. Diese Maßnahme gilt auch für forstbetriebseigene Pflanzen, wenn Pflanzen aus den Beständen verbracht werden.“ (HALMSCHLAGER 1996)



Bild 1



Bild 2



Bild 3



Bild 4



Bild 5

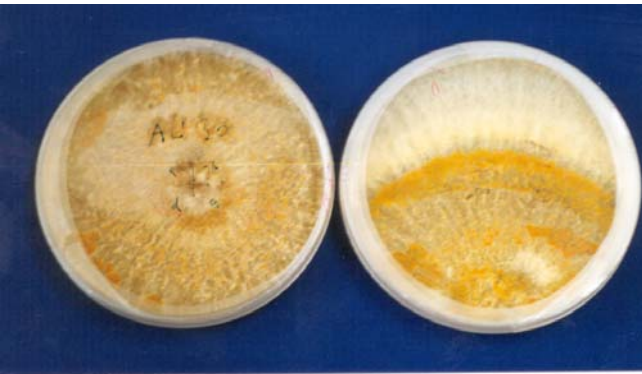


Bild 6

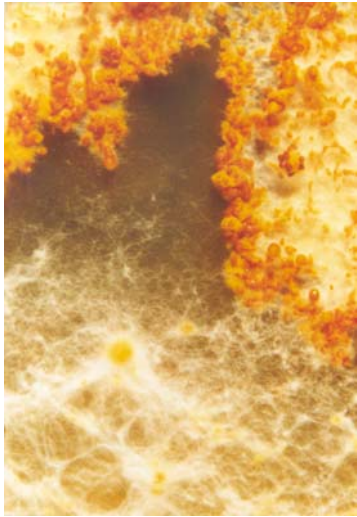


Bild 7



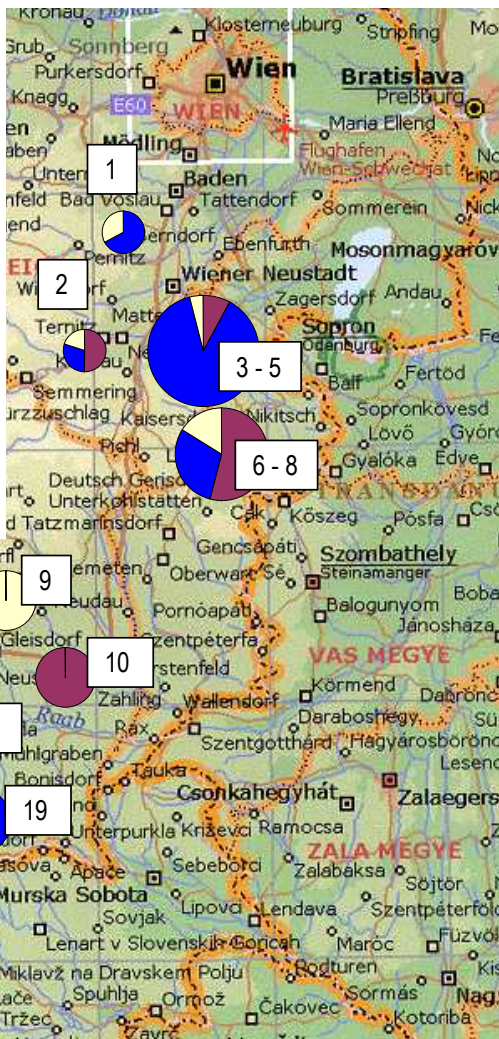
Bild 8



Bild 9

Gebiet	EU-VC-Gruppe	Anzahl der beprobten Läsionen	%
1. Bad Vöslau	sonstige	4	67
	EU-17	2	33
2. Gloggnitz	sonstige	2	20
	EU-13	5	50
	EU-17	3	30
3. Rosalia, 4. Rohrbach, 5. Siegggraben	sonstige	5	4
	EU-13	8	8
6. Mannersdorf, 7. Lockenhaus, 8. Rechnitz	sonstige	7	11
	EU-13	35	57
9. Stubenberg	sonstige	6	100
	EU-13	19	100
10. Fürstenfeld	EU-13	19	100
11. Graz	EU-17	22	100
12. Heiligenkreuz	sonstige	10	100
13. Stainz	EU-13	21	75
14. Trahütten, 15. Deutschlandsberg, 16. Riemerberg	sonstige	7	25
	EU-13	14	18
17. Kitzreck, 18. St. Nikolai	EU-13	49	66
	EU-17	12	16
19. Spielfeld	sonstige	6	12
	EU-13	27	53
20. Leutschach, 21. Arnfels	EU-17	18	35
	sonstige	6	43
22. Eibiswald	EU-13	8	57
	sonstige	15	29
	EU-13	14	27
	EU-17	23	44
	sonstige	3	33
	EU-17	6	67

Verteilung der VC-Gruppen zusammengefasst zu Großraumgebiete.



VC-Gruppen

- EU-17
- EU-13
- sonstige

Anzahl der beprobten Läsionen



Hinweise zur Anwendung des hypovirulenten Pilzkleisters

Ausbringungszeitpunkt:

Der Pilzkleister sollte im Frühjahr direkt auf befallene Stellen oder zur Sensibilisierung auf die Jungpflanzen aufgebracht werden. Der optimale Zeitpunkt ist ab einem merklichen Anstieg der Temperaturen, möglichst ohne Frostgefahr. Das Mycel kann sich bei solchen Bedingungen am besten entwickeln und ins Rindengewebe gut einwachsen.

Der Pilzkleister sollte kurz vor der Anwendung im Frühjahr gekauft werden, damit er möglichst noch lange lagerfähig ist. So ist er durchaus zwei Vegetationsperioden lang verwendbar.

Der Behandlungszeitraum erstreckt sich im allgemeinen vom Frühjahr bis zum Spätsommer, im Herbst sollte keine Behandlung mehr durchgeführt werden, weil das Pilzmycel nicht ins Rindengewebe einwachsen kann, und so nur Material und Zeit vergeudet wäre. Stark befallene Stellen können im Winter ausgeschnitten werden und sobald im Frühjahr keine Frostgefahr mehr besteht mit dem Pilzkleister behandelt werden.

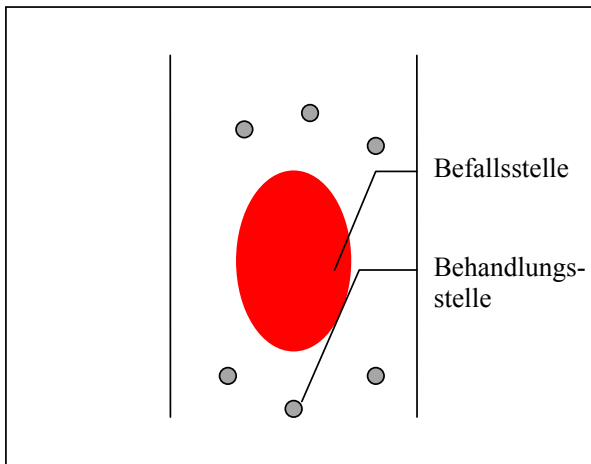
Die Erstbehandlung sollte unbedingt von fachkundigem Personal durchgeführt werden.

Ausbringungstechnik:

Behandlung von Nekrosen:

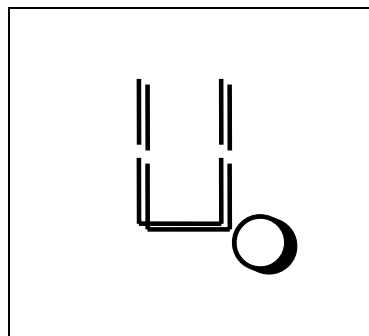
Die Behandlungen werden ober- und unterhalb der Nekrose durchgeführt. Die Behandlungsstellen sollten die Nekrose möglichst gut umgrenzen. Der Abstand zwischen den Behandlungen sollte etwa 10 cm betragen. Es gibt zwei Möglichkeiten der Behandlung:

1. *Lochbohrmethode:* Sie machen mit einem Bohrer je nach Nekrosenfläche ein bis mehrere Löcher ober- und unterhalb der zu behandelnden Nekrose. Die Löcher sollten in gesundem Gewebe liegen. Danach füllen Sie die Löcher mit 1 bis 2 ml des Pilzkleisters und verschliessen die Behandlungsstellen mit einem Abdeckband. Sie können das Abdeckband nach 14 Tagen wieder abnehmen.



Diese Methode ist vor allem für die Behandlung älterer Triebe bzw. Stämme von Edelkastanien sehr gut geeignet.

2. *Rindenlappenmethode*: Mit einem Stemmeisen machen Sie ober- und unterhalb der zu behandelnden Nekrose Einschnitte ins gesunde Rindengewebe in folgender Form:



Oben bleibt der Rindenlappen am Baum, unten klappen Sie das Rindengewebe vorsichtig nach oben, um ein Abreißen des Lappens zu vermeiden. Unter den Rindelappen füllen Sie nun ca. 2,5 ml des Pilzkleisters und drücken den Lappen wieder an.

Der Nachteil bei dieser Methode ist die wesentlich aufwändigere Handhabung, allerdings wird durch den Rindenlappen ein Auswaschen bei z.B. sehr starkem Regen verhindert.

Diese Methode eignet sich einerseits sehr gut für die direkte Behandlung von Befallsstellen auf jüngeren Trieben mit noch relativ glatter Rinde, andererseits auch für das Einbringen des Pilzkleisters im Zuge der Sensibilisierung von Jungkastanien.

Sensibilisierung von Jungbäumen:

Sowohl in die Unterlage als auch ins Edelreis wird mit der oben beschriebenen Rindenlappenmethode Pilzkleister auf die Jungpflanze aufgebracht. Dabei ist darauf zu achten, dass die Behandlungsstelle nicht zu große Ausmaße annimmt, damit der Baum in seinem Wachstum nicht beeinträchtigt wird. Ausserdem sollte die Behandlungsstelle zusätzlich mit Okulett abgedeckt werden, um Sekundärinfektionen der Jungpflanze zu vermeiden.

Aufbewahrung des Pilzkleisters:

Der Pilzkleister kann bis zu einem Jahr bedenkenlos gelagert werden. Die optimale Lagerungstemperatur liegt bei +4°C, d.h. der Kleister kann im Kühlschrank, aber auch in einem kühlen Lagerraum (z.B. Keller) aufbewahrt werden.

Die Kleisterspritzen sollten möglichst gut verpackt werden, damit Mäuse und Asseln nicht zum Mittel gelangen können. Ausserdem besteht bei einer schlechten Verpackung die Gefahr der Schimmelbildung beim Pilzkleister.

Kontaktadresse:

Mag. Thomas Rühmer
St. Peter Hauptstraße 29c
8042 Graz
0676/56 64 088
t.ruehmer@gmx.at

6 INFORMATIONSBLATT ZUR BESTANDSAUFNAHME VON EDELKASTANIENRINDENKREBS

Das Österreichische Forschungszentrum Seibersdorf arbeitet an Maßnahmen zur Erhaltung der Edelkastanien, die durch den Kastanienrindenkrebs von der Ausrottung bedroht sind.

Der Verursacher dieser Krankheit, der Pilz *Cryphonectria parasitica* (C.p.), bildet verschiedene, vegetativ unverträgliche Stämme aus, sogenannte VC-Gruppen. Derzeit sind in Österreich 13 unterscheidbare VC-Gruppen nachgewiesen.

Neben der virulenten (v) Form, die zum Absterben des Baumes führt, tritt auch eine hypovirulente (hv) Form auf, die wegen ihres oberflächlichen Wachstums nur Rindenwucherungen hervorruft. Diese verminderte Virulenz wird durch den Befall des Pilzes mit einem Virus ausgelöst, der im Labor auf die virulente Form übertragen werden kann. Die umgewandelten Pilzstämme können zur Behandlung von erkrankten Bäumen mit übereinstimmender VC-Gruppe eingesetzt werden.

SCHADBILDER verursacht durch v-Stämme: Nekrosenbildung an Befallstelle infolge Zerstörung der Leitungsgewebe (Bild 1-5). Bild 6: Hypovirulentes, nicht letales Schadbild



GRAD der Durchseuchung: kein Befall
 0 - 25% 26 - 50%
 51 - 75% 76 - 100%

ABSENDER:
.....
.....

Bitte faxen Sie den Fragebogen an: Mag. Ursula Kudera - ÖFZS/BT - FAX: 02254-780 3653

PROBENNAHME:

- Um die Vermischung von Stämmen verschiedener VC-Gruppen zu vermeiden, unbedingt die Probennahmegeräte (Messer) nach jeder Verwendung sterilisieren (abflammen)!
- Einige Rindenstücke (ca.3 x 5 cm) vom Rand der Nekrose ausschneiden
- Für jede Nekrose ein eigenes Papiersäckchen (z.B. DIN A5 Kuvert) verwenden. Kein Plastiksackerl, weil Verschimmelungsgefahr!
- bei starker Durchseuchung oder bei großer Bestandsausdehnung: Probennahmen von Bäumen an den Rändern und aus der Mitte
- eindeutige Markierung (Nummerierung) des beprobten Baumes
- Markierungsnummer auf dem Probesäckchen angeben
- möglichst genaue Koordinatenangaben des beprobten Baumes auf Probesäckchen angeben (oder auf Kopie der ÖK 25 einzeichnen)

Senden Sie die Proben (und Fragebogen) an Ihre Bezirksforstabteilung oder direkt, unfrei an:

Mag.Ursula KUDERA

Österr. Forschungszentrum Seibersdorf

2444 Seibersdorf

Eva.Wilhelm@arcs.ac.at

VIELEN DANK FÜR IHRE MITHILFE !