Analyse der RNA-Akkumulierung von *Glomus intraradices* zur Untersuchung der Funktion und der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität-Marburg

vorgelegt von

Astrid Waschke

aus Bremen

Marburg/Lahn Januar 2007

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als
Dissertation am 02.05.2007 angenommen.

Erstgutachter: PD Dr. P. Franken
Zweitgutachter: Prof. Dr. E. Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2007

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**„Analyse der RNA-Akkumulierung von *Glomus intraradices*
zur Untersuchung der Funktion und der Entwicklung
der arbuskulären Mykorrhiza“**

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetztigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum	Astrid Waschke

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden:

- von September 2001 bis September 2002 am Max-Planck-Insitut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biochemie, in Marburg/Lahn unter der Anleitung von PD Dr. P. Franken,
- von Oktober 2002 bis März 2003 am CNRS in Castanet-Tolosan-Cedex, Frankreich, unter der Anleitung von Prof. Dr. Guillaume Bécard und
- von April 2003 bis Dezember 2006 am Insitut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. in der Abteilung Pflanzenernährung unter der Anleitung von PD Dr. P. Franken

durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

Waschke A, Sieh D, Tamasloukht B, Fischer K, Franken P. 2006. Identification of heavy metal induced genes encoding glutathione S-transferases in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Mycorrhiza **17**: 1-10.

Weitere Veröffentlichungen:

Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, **Kluever A**, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P. 2003. Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus Gigaspora rosea. Plant Physiology **131**: 1468-1478.

Franken P, Donges K, Grunwald U, Kost G, Rexer KH, Tamasloukht M, **Waschke A**, Zeuske D. 2007. Gene expression analysis of arbuscule development and functioning. Phytochemistry **68**: 68-74

Grosch R, Schneider JHM, Peth A, **Waschke A**, Franken P, Kofoet A and Jabaji-Hare SH. (in press). Development of a specific PCR assay for the detection of Rhizoctonia solani AG 1-IB using SCAR primers. Journal of Applied Microbiology in press.

Tamasloukht M, **Waschke A**, Franken P. Root exudate-stimulated RNA accumulation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. Soil Biology and Biochemistry (eingereicht).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 1

Abkürzungsverzeichnis 4

1 Zusammenfassung 5

2 Einleitung 6

2.1 Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bodenmikroorganismen 6

2.2 Arbuskuläre Mykorrhiza 10

2.3 Nährstoffaustausch in der arbuskulären Mykorrhiza 12

2.4 Lebenszyklus arbuskulärer Mykorrhizapilze 15

2.5 Molekularbiologische Studien arbuskuläre Mykorrhizapilze 19

2.6 Die Modelpflanze *Medicago truncatula* in der Mykorrhizaforschung und die Verwendung von Mutanten 20

3 Material und Methoden 23

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien 23

3.2 Standardpuffer und -lösungen 23

3.3 Medien und Düngelösungen 25

3.4 Organismen und deren Kultivierung 28

3.4.1 Organismen 28

3.4.2 *Escherichia coli* 29

3.4.3 *Medicago truncatula* 29

3.4.4 *Glomus intraradices* 31

3.4.5 *Pisum sativum* 32

3.4.6 *Gigaspora rosea* 33

3.5 Färbung der Wurzelproben und Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades 33

3.6 Molekularbiologische Methoden 34

3.6.1 Oligonukleotide 34

3.6.2 Extraktion von Nukleinsäuren 35

3.6.3 Gelelektrophorese 36

3.6.4 Suppressive Subtraktive Hybridisierung 39
3.6.5 Klonieren von DNA-Fragmenten 40
3.6.6 Plasmidpräparation 41
3.6.7 Analyse der Plasmid-DNA 41
3.6.8 Reverse Northern Blot Hybridisierungen 42
3.6.9 Quantitative Real-Time-PCR 43
3.7 pH Messungen während der Keimung von *Gigaspora rosea* 44
3.8 Statistische Analysen 45
3.9 Molekularphylogenetische Analysen 45
4 Ergebnisse 46
4.1 Identifizierung von Transkripten während der asymbiotischen Entwicklungsphase von *Glomus intraradices* 46
4.2 Identifizierung von Transkripten während der symbiotischen Entwicklung des arbuskulären Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices* 49
4.2.1 Extraradikuläres Myzel 49
4.2.2 Intraradikuläres Myzel 54
4.3 Differentielle Expression von ausgewählten pflanzlichen Genen 62
4.4 Phosphat-Transporter von *Glomus intraradices* 63
4.5 Stickstoff-Aufnahme in keimenden Sporen 68
4.6 Differentielle Genexpression von ausgewählten *Glomus intraradices* Genen für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus 70
4.6.1 Expression in der Wurzelkultur 71
4.6.2 Expression in der Topfkultur mit *Medicago truncatula* 74
4.6.3 Expression in der Topfkultur mit *Pisum sativum* 76
4.7 Glutathion-Transferasen von *Glomus intraradices* 79
5 Diskussion 85
5.1 Identifizierung von Transkripten während der asymbiotischen Entwicklungsphase von *Glomus intraradices* 85
5.2 Identifizierung von Transkripten während der symbiotischen Entwicklung des arbuskulären Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices* 89

5.2.1 Extraradikuläres Myzel 90
5.2.2 Intraradikuläres Myzel 94
5.3 Phosphat-Transporter von *Glomus intraradices* 98
5.4 Stickstoffaufnahme in keimenden Sporen 100
5.5 Differentielle Genexpression von ausgewählten *Glomus intraradices* Genen für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus 101
5.5.1 Expression in der Wurzelkultur 103
5.5.2 Expression in der Topfkultur mit *Medicago truncatula* und *Pisum sativum* 110
5.6 Glutathion-Transferasen von *Glomus intraradices* 111
6 Literatur 114
7 Anhang 134

Abkürzungsverzeichnis

AM	arbuskuläre Mykorrhiza
bp	Basenpaare
cDNA	komplementäre (complementary) DNA
cv.	Kultivar
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH_2O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Desoxyribunucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DMF	N,N Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Extinktion
EDTA	Estzhylendiamintetraacetat
ERM	extraradikuläres Myzel
EST	exprimierte Sequenz (*expressed sequence tag*)
gDNA	genomische DNA
IPTG	Isopropyl-ß-D-Thioglaktopyranosid
IRM	intraradikuläres Myzel
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion (*Polymerase chain reaction*)
RNA	Ribonukleinsäure (*Ribonucleic Acid*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*rounds per minute*)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	*Sodium dodecyl sulfate*
SSC	NaCl/Natriumcitrat (*saline sodium citrate*)
SSH	Suppressive Subtraktive Hybridisierung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAG	Triazylglyzeride
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galaktosid

1 Zusammenfassung

Arbuskuläre Mykorrhizapilze (AM-Pilze) sind obligat biotrophe Wurzelsymbionten aus dem Reich der Glomeromycota und gehen mutualistische Interaktionen mit den meisten Landpflanzen ein. Über die molekularen Mechanismen der Biotrophie ist bisher wenig bekannt. Durch Suppressive Subtraktive Hybridisierungen und die Erstellung von cDNA-Banken sollten Hinweise auf mögliche regulatorische Prozesse gefunden werden. Aus der intraradikulären Phase des Modellorganismus *Glomus intraradices* konnten so jedoch nur zwei Fragmente isoliert werden. Diese gehörten zu Genen für ein Hitzeschockprotein und für eine Glyoxaloxidase, die eine Rolle bei der Degradierung von Lignin spielen könnte. Parallel sollten bereits bestehende cDNA-Banken von Genen, die in keimenden Sporen und im extraradikulären Myzel exprimiert sind, um neue Sequenzen erweitert werden. Dabei wurden bereits bekannte, aber auch eine Reihe unbekannter Gene identifiziert. Diese Gene kodierten für alle Elemente des Cytoskeletts, für Transkriptions- und Translationsfaktoren und für einige Transportproteine.

Der Austausch an Nährstoffen stellt eines der wichtigsten Merkmale der arbuskulären Mykorrhiza dar. So steigert die Besiedelung der Wurzel mit einem AM-Pilz den Phosphatgehalt im Spross der Pflanze. Unter den näher untersuchten Genen kodierte eines für ein regulatorisches Protein der Phospataufnahme. Dieses zeigte ein ähnliches Expressionsmuster wie der schon bekannte pilzliche Phosphattransporter.

Als Nährstoffquelle des Pilzes dienen die von der Pflanze bereitgestellten Kohlenhydrate. Die Analysen der Expression von Genen des pilzlichen Kohlenhydratmetabolismuses im Verlauf dieser Arbeit bestätigten und ergänzten bisherige physiologische Studien. Die RNA-Akkumulierungsmuster in Wurzel- und Topfkulturen unter Verwendung transgener Pflanzen und einer natürlichen Mutante wiesen auf komplexe Regulationsmechanismen des pilzlichen Stoffwechsels hin.

AM-Pilze verbessern nicht nur die Nährstoffaufnahme, sie erhöhen auch die Toleranz z.B. gegen Schwermetalle. In älteren und den während dieser Arbeit neu erstellten cDNA-Banken ließen sich Gene für Glutathion-Transferasen isolieren. Die durchgeführten Expressionsstudien wiesen auf eine mögliche Beteiligung der Genfamilie an der Toleranzerhöhung hin.

2 Einleitung

2.1 Wechselwirkungen zwischen Pflanzen und Bodenmikroorganismen

Das verbesserte Wachstum von einigen Pflanzen unter Stressbedingungen, wie z.B. bei Trockenheit oder unter extremen Temperaturbedingungen ist zum größten Teil auf den jeweiligen Genotyp der Pflanzen zurückzuführen (Cuartero et al., 2006, Ober und Luterbach, 2002). Eine weitere Möglichkeit für ein besseres Wachstum einiger Pflanzen stellt allerdings auch die Besiedelung ihrer Wurzeln mit Mikroorganismen dar. Zu diesen Mikroorganismen zählen z.B. die in der Rhizosphäre frei lebenden Bakterien wie *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* (Lugtenberg et al., 2001) und Bakterien der Gattung *Azospirillum* (Bashan et al., 2004). Auf der Wurzeloberfläche bilden diese Bakterien Mikrokolonien (Chin-A-Woeng et al., 1997) und verbessern das Pflanzenwachstum z.B. über die Bildung von Phytohormonen (Lugtenberg et al., 2001, Lugtenberg und Dekkers, 1999). Sie werden daher als „*plant growth promoting rhizobacteria*“ bezeichnet. Sind diese Wechselwirkungen mit einem Nutzen für beide Partner verbunden spricht man von Mutualismus. Das bestuntersuchte Beispiel in der Welt der Pflanzen-Mikroorganismen Interaktion ist die Knöllchensymbiose (Schlegel, 1992, Fritsche, 1999). Hierbei handelt es sich um eine Wechselwirkung zwischen Rhizobien und Leguminosen. Unter microaerophilen Bedingungen fixieren Rhizobien Luftstickstoff der der Pflanze dadruch zur Verfügung steht (Pawlowski und Bisseling, 1996). Über die Ausbildung von spezifischen Organen, den Knöllchen, schafft die Pflanze die für diesen Prozess notwendige sauerstoffarme Umgebung. Im Gegenzug werden die Bakterien von der Pflanze mit Kohlenhydraten versorgt (Streeter, 1995, Peiter und Schubert, 2003).

Das Pflanzenwachstum kann auch durch bodenbürtige Pilze gefördert werden. Diese Interaktionen vergrößern vor allem die Absorptionsoberfläche der Wurzel, wodurch sich die Aufnahme vieler Mineralien aus dem Boden verbessert. Diese Symbiosen werden als Mykorrhiza bezeichnet, abgeleitet aus dem Griechischen von „*Mykos“* für Pilz und „*Rhiza“* für Wurzel (Frank, 1885). Heutzutage unterscheidet man sieben verschiedene Mykorrhizatypen (Peterson et al., 2004). Angiosperme und Koniferen bilden eine so genannte Ektomykorrhiza mit Basidiomyzeten und einigen Askomyzeten aus (Molina et al., 1992, Smith und Read, 1997, Peterson et al., 2004).

Typische Strukturen dieser Symbiose sind der Mantel, das Hartig'sche Netz sowie das extraradikulären Myzel (s. Abb. 2-1). Die intraradikulären Strukturen, sowie das Hartig'sche Netz dringen dabei nicht in die pflanzlichen Zellen ein. An diesen Hyphen findet der Nährstoffaustausch zwischen den interagierenden Partnern statt. Insbesondere der Transfer von Stickstoffverbindungen, aber auch anderen Mineralstoffen, vom Pilz zur Pflanze trägt zum verbesserten Wachstum der Pflanzen bei. Die Pilze erhalten im Gegenzug Kohlenhydratverbindungen von der Pflanze (Smith und Read, 1997, Duddridge et al., 1998, Bücking und Heyser, 2001). Das Hartig'sche Netz bildet sich bei den Angiospermen nur in der Exodermis aus, während es bei den Koniferen bis zur Endodermis reicht (s. Abb. 2-1) (Peterson et al., 2004).

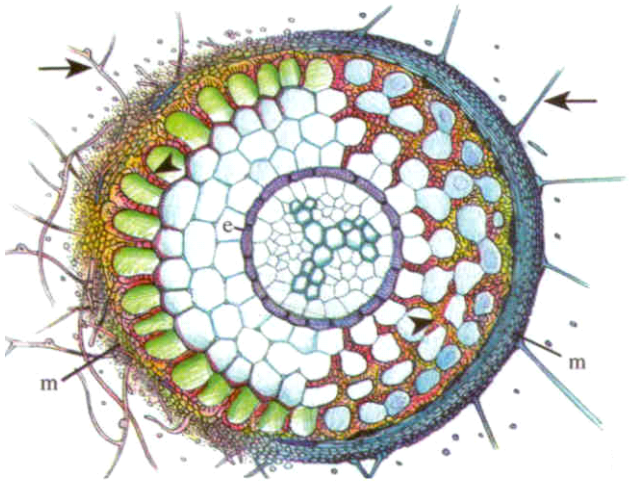


Abbildung 2-1: Darstellung der Ektomykorrhiza bei Angiospermen (links) und Koniferen (rechts). m = Mantel; e = Endodermis; Pfeilspitzen = Hartig'sche Netz; Pfeile = Extraradikuläres Myzel. Aus Peterson et al., 2004.

Ein Hartig'schen Netz findet man ebenso in der Ektendomykorrhiza, der arbutoiden und der monotropoiden Mykorrhiza. Einige Askomyzeten bilden mit den Koniferen Gattungen *Pinus* und *Larix* eine Ektendomykorrhiza aus, bei der Besiedelung anderer Arten hingegen eine Ektomykorrhiza (Scales und Peterson, 1991a, Egger, 1996, Yu et al., 2001). Neben den typischen Strukturen einer Ektomykorrhiza entwickeln sich in der Ektendomykorrhiza intrazellulären Hyphen (s. Abb. 2-2) (Scales und Peterson, 1991b). Über die möglichen Funktionen des Hartig'schen Netzes und der intraradikulären Hyphen liegen bisher keine gesicherten Ergebnisse vor (Peterson et al., 2004).

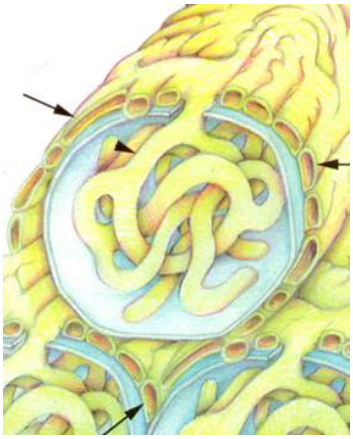


Abbildung 2-2: Darstellung der Ektendomykorrhiza. Pfeile = Hartig'sche Netz; Pfeilspitzen = intraradikuläre Hyphen. Aus Peterson et al., 2004.

Die ericoide, arbutoide und monotropoide Mykorrhiza werden nur in der Ordnung *Ericales* ausgebildet, wobei die arbutoide und monotropoide nur in wenigen Familien vorkommen (Peterson et al., 2004). Unter den beteiligten Pilzen befinden sich sowohl Askomyzeten als auch Basidiomyzeten, die mit anderen Pflanzen eine Ektomykorrhiza ausbilden können (Acsai und Largent 1983a, b und c, Bidartondo und Bruns, 2001, Young et al., 2002, Berch et al., 2002). Auch bei diesen Formen finden sich intraradikuläre Hyphenknäule und ein extraradikuläres Myzel. In der arbutoiden und monotropoiden Mykorrhiza entwickeln sich zusätzlich auch Mantel und Hartig'sches Netz (s. Abb. 2-3) (Peterson et al., 2004).

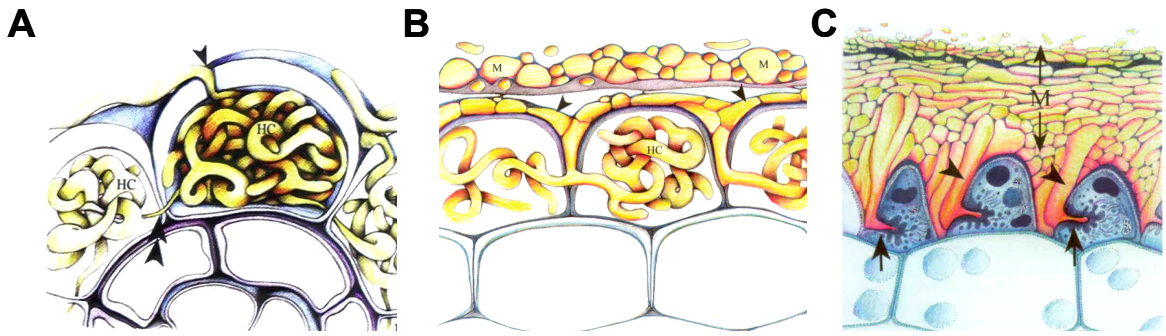


Abbildung 2-3: Darstellung der unterschiedlichen Mykorrhizaformen der *Ericales*. A: ericoide Mykorrhiza, B: arbutoide Mykorrhiza, C: monotropoide Mykorrhiza. HC = Hyphenknäule, M = Mantel, Pfeilspitzen = Hartig'sche Netz, Doppelte Pfeilspitzen = dünne Hyphen, Pfeile = pilzliche Zapfen. Aus Peterson et al., 2004.

Die arbutoide und monotropoide Mykorrhiza besiedeln nur die Exodermis und unterscheiden sich so von der Ektendomykorrhiza. Eine Besonderheit stellt die Zapfenähnliche Struktur der intrazellulären Hyphen der monotropoiden Mykorrhiza dar, worüber ebenfalls der Austausch von Nährstoffe erfolgt (Peterson et al., 2004). Die *Ericales* kommen häufig auf stickstoffarmen Böden vor, und der Transport von

Stickstoffverbindungen ist eine der Hauptfunktionen der ericoiden Mykorrhiza (Read, 1996, Smith und Read, 1997) Über das unterirdische Hyphennetzwerk der arbutoiden und monotropoiden Mykorrhiza sind in den entsprechenden Ökosystemen viele Pflanzen miteinander verbunden und der Transport von Nährstoffen zwischen den Pflanzen könnte darüber erfolgen (Bjorkman, 1960, Vreeland et al., 1981, Peterson et al., 2004). Dieses Hyphennetzwerk ist besonders für die monotropoide Mykorrhiza von Bedeutung, da es sich bei den beteiligten Pflanzen um Chlorophylllose handelt.

Eine besondere Symbiose stellt die Orchideen-Mykorrhiza dar, wobei es sich in jungen Stadien womöglich nicht um eine mutualistische sondern um eine parasitische Interaktion handeln könnte (Rasmussen, 1995, Smith und Read, 1997,Peterson et al., 1998). Erste Hinweise auf mutualistische Interaktion zwischen den photosynthetisch aktiven Orchideen und den besiedelnden Pilzen demonstrierten erstmals Cameron et al. 2006. So enthalten die Samen chlorophylloser Orchideen keine Nährstoffe und sind auf die Besiedelung mit spezifischen Pilzen der Formgattung *Rhizoctonia* angewiesen, wodurch deren Versorgung mit Kohlenhydraten erfolgt. Die Hyphen des Pilzes besiedeln das Samenkorn von Zelle zu Zelle und bilden dort Hyphenknäule aus, worüber Kohlenhydrate an die Pflanze abgegeben werden (s. Abb. 2-4). Die besiedelnden Pilze können aber sowohl saprophytisch von organischem Bodenmaterial überleben oder als pathogene Organismen oder endophytisch mit anderen Pflanzenarten interagieren (Peterson et al., 2004).

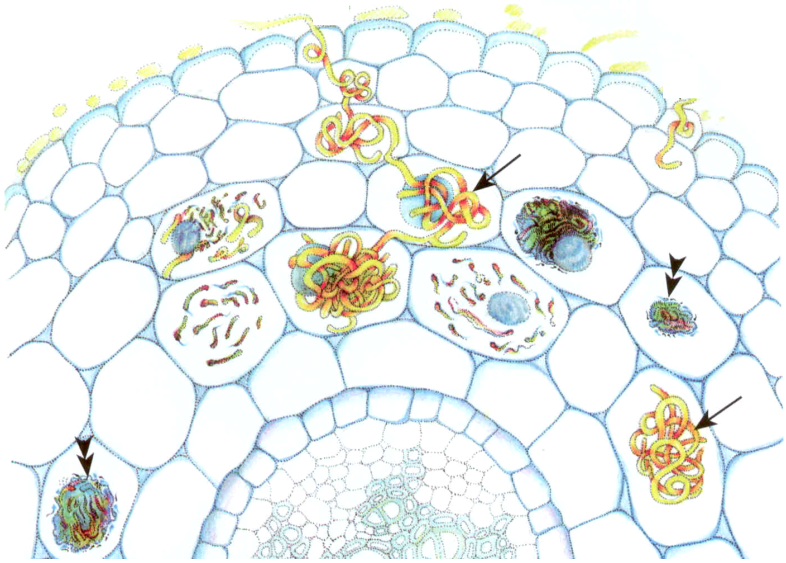


Abbildung 2-4: Darstellung der Orchideen-Mykorrhiza. Pfeile = Hyphenknäule, Doppelte Pfeilspitzen = degradierte Hyphenknäule. Aus Peterson et al., 2004.

2.2 Arbuskuläre Mykorrhiza

Eine der ältesten Wechselbeziehungen zwischen bodenbürtigen Pilzen und Pflanzenwurzeln stellt die arbuskuläre Mykorrhiza dar. Strukturen ähnlich arbuskulärer Mykorrhiza ließen sich in circa 450 bis 500 Millionen Jahre alten fossilen Funden nachweisen (Remy et al., 1994, Redecker et al., 2000, Brundrett, 2002). In etwa zur gleichen Zeit begannen die Pflanzen den Lebensraum Land zu erobern, und die Beteiligung arbuskulärer Mykorrhizapilze (AM-Pilze) an diesem Prozess wird diskutiert (Pirozynski und Malloch, 1975, Read et al., 2000).

Die arbuskuläre Mykorrhiza ist weltweit verbreitet und die am häufigsten vorkommende terrestrische Symbiose. Aus den unterschiedlichsten Lebensräumen, z.B. Wüsten (Corkidi und Rincón, 1997, Dalpé et al., 2000, Titus et al., 2002), tropischen Regenwäldern (Brundrett et al., 1999, Zhao et al., 2001, Gaur und Adholeya, 2002), aquatischen Habitaten (Khan, 1993) sowie aus extremen Lebensräumen z.B. mit hohen Salzgehalt (Carvalho et al., 2004, Landwehr et al., 2002) ließen sich AM-Pilze isolieren. Nahezu alle heutigen Landpflanzen sind in der Lage die Symbiose auszubilden, jedoch sind die Familien der Brassicaceen, Caryophyllaceen, Chenopodiaceen, Cyperaceen, Juncaceen und Urticaceen mit wenigen Sonderfällen davon ausgenommen (Harley und Harley, 1987, Fitter und Moyersoen, 1996).

Die obligat biotrophen AM-Pilze werden seit einiger Zeit nicht mehr in die Zygomyzeten, sondern in das eigenständige Phylum der Glomeromycota taxonomisch eingeordnet (Schüßler et al., 2001). In die Familien der Glomeraceen, Gigasporaceen, Acaulasporaceen, Paraglomeraceen, Geosiphonaceen, Diversisporaceen und Archaeosporaceen sind die bisher 150 bekannten AM-Pilze zusammengefasst (Schüßler et al., 2001). Diese Einteilung basiert vornehmlich auf der Analyse der rRNA-Sequenzen. Es gibt aber auch strukturelle Unterschiede zwischen den einzelnen Familien. So bilden nur die Glomeraceen Vesikel, spezifische pilzliche Speicherorgane innerhalb der Wurzel (Walker et al., 1995).

Des Weiteren unterscheidet man zwei morphologische Klassen der arbuskulären Mykorrhiza, dem Arum- und Paris-Typ (Dickson, 2004, Smith und Smith, 1990, 1997) (s. Abb. 2-7), wobei zwischen diesen beiden Typen eine Vielzahl von intermediären Stufen existiert. Welcher Typ Mykorrhiza ausgebildet wird, hängt sowohl vom besiedelnden Pilz als auch von der Pflanze ab (Smith und Smith, 1990, 1997). Interzelluläre Hyphen, von denen aus der AM-Pilz in die pflanzlichen Zellen eindringt,

um die spezifischen Bäumchenartigen Strukturen, die Arbuskeln, auszubilden, lassen sich nur im Arum-Typ nachweisen. Beim Paris-Typ besiedelt der Pilz die Wurzel von Zelle zu Zelle und bildet dort Hyphenknäule, an denen kleine Arbuskeln entstehen (Dickson, 2004, Smith und Smith, 1990, 1997).

Die Ernährung der Pflanzen verbessert sich durch die Mykorrhizierung. Insbesondere die Phosphat- und Stickstoffgehalte sind in den Pflanzen unter limitierenden Bedingungen erhöht, wobei aber auch die Versorgung mit Mirkonährstoffen wie Kalium gesteigert ist. Das verbesserte Wachstum der mykorrhizierten Pflanzen hängt aber auch mit dem Eingriff der AM-Pilze in den Phytohormonhaushalt zusammen. Die Konzentration von Auxinen, Abscisinsäure und Jasmonat erhöht sich durch die Besiedelung mit AM-Pilzen (Gogala et al., 1991, Danneberg et al., 1993, Hause et al., 2002, Fitze et al., 2005) und verändert so die Physiologie der Pflanzen. In der Bildung von Jasmonat könnte auch der Resistenz steigernden Effekt der Mykorrhiza liegen, da durch dieses Hormon die Pflanzenabwehr aktiviert werden kann (Wasternack und Hause, 2002). Dabei verhindert eine Mykorrhizierung hauptsächlich den Befall der Wurzel mit pathogenen Organismen (Pozo et al., 1999), kann aber die Anfälligkeit für Blattpathogene steigern (Dehne, 1982).

Arbuskuläre Mykorrhiza mindert ebenfalls die Auswirkungen abiotischer Stressfaktoren, wie Trockenheit, erhöhte Salzgehalte im Boden oder extreme Temperaturen (Smith und Read, 1997). Ein weiterer Stressfaktor für die Fauna, besonders in den osteuropäischen Staaten, stellt die Belastung der Böden mit Schwermetallen dar. Schwermetalle wirken oft als Enzymgifte, da sie im reaktiven Zentrum anstelle des richtigen Metallions bevorzugt eingebaut werden. Das Enzym ändert dadurch seine Struktur, was schließlich zur Inaktivierung führt. Nicht nur die klassischen Schwermetalle wie Cadmium, Blei oder Quecksilber, sondern auch essentielle Spurenelemente, wie Kupfer oder Zink wirken in hohen Konzentrationen schädlich (Schlegel, 1992). Auf mit Schwermetallen kontaminierten Böden wachsen einige Pflanzen aber auch wie unter normalen Bedingungen. Dabei kann es sich um so genannte hyperakkumulierende Pflanzen handeln, die Schwermetalle in ihren Vakuolen mit Kationen komplexieren und somit für ihren Stoffwechsel unschädlich machen (Hall, 2002, Krämer, 2005). Solche Pflanzen setzt man heutzutage für die Dekontamination von Schwermetall belasteten Böden ein (Krämer, 2005). Eine weitere Möglichkeit für eine erhöhte Toleranz gegenüber Schwermetallen stellt die Besiedelung mit AM-Pilzen dar (Leyval et al., 1997). In den Hyphen der besiedelnden

AM-Pilze ließen sich erhöhte Konzentration an Schwermetallen feststellen (Kaldorf et al., 1998, Hall, 2002). Sie lagern die Schwermetalle in gebundener Form ebenfalls in Vakuolen ein oder binden diese an Zellwand-Komponenten, wie z.B. Chitin (Galli et al., 1994). Aus kontaminierten Böden isolierte AM-Pilze verlieren nach der Kultivierung unter normalen Bedingungen nach wenigen Generationen ihre Fähigkeit des protektiven Effektes gegenüber Schwermetallen (Rydlova und Vosatka, 2003, Malcova et al., 2003). Diese Toleranz kann aber auch durch die Zugabe von Cadmium über zwei Generationen wieder gesteigert werden (Tullio et al., 2003).
Ein für die Bindung der Schwermetallionen verantwortliches Protein, das Metallothionein wurde bereits in verschiedenen AM-Pilze identifiziert (Stommel et al., 2001, Lanfranco et al., 2002). Die Toleranz gegenüber Schwermetallen erhöht sich auch durch die Aktivität von Glutathion-Transferasen (Wagner et al., 2002, Fraser et al., 2002), wovon eine Vielzahl von cDNA-Sequenzen bereits im AM-Pilz *G. intraradices* identifiziert wurden (Rhody, 2002, Waschke et al., 2006). Eine genauere Analyse der Genexpression ausgewählter Glutathion-Transferasen fand im Rahmen dieser Arbeit statt (Waschke et al., 2006).

2.3 Nährstoffaustausch in der arbuskulären Mykorrhiza

Wie auch in anderen mutualistischen Interaktionen kennzeichnet die arbuskulären Mykorrhiza der Austausch von Nährstoffen zwischen den beiden Partnern. Phosphat ist für das Pflanzenwachstum oft ein limitierender Faktor, da trotz eines hohen Phosphatgehaltes im Boden physikalische und chemische Faktoren die Aufnahme über die Wurzelhaare behindern. Im Boden wird das Phosphat in organische Moleküle wie Phytinsäure umgewandelt, präzipitiert als unlösliches Salz oder liegt an Bodenpartikeln adsorbiert vor (Holford, 1997, Richardson, 1994).
Über die Wurzelhaare erfolgt sehr schnell die Aufnahme des verfügbaren Phosphates, wodurch in der Rhizosphäre eine Verarmungszone entsteht. Aufgrund des Phosphatmangels müssen die Pflanzen für ihr weiteres Wachstum andere Mechanismen der Phosphataufnahme entwickeln. So scheiden sie über die Wurzel saure Phosphatasen, organische Säuren und Protonen aus, die im Boden festgelegtes Phosphat verfügbar machen (Duff et al., 1991, Dunlop und Gardnier, 1993, Lefebvre et al., 1990) oder die Pflanzen modifizieren ihre Wurzelmorphologie (Lynch, 1995, Mengel und Kirkby, 1982). Die Adsorptionsrate von Phosphat kann außerdem durch die Ausbildung einer Mykorrhiza gesteigert werden, was sich über

Konzentrations-Steigerungen in den oberirdischen Pflanzenteilen nachweisen ließ (Smith et al., 2003, Burleigh et al., 2002, George, 2000, Sanders und Tinker, 1971).
Während der Besiedelung der Wurzeln bilden die AM-Pilze extraradikuläre Hyphen aus, die durch ihren geringen Durchmesser (2 bis 27 µm) auch in wesentlich kleinere Bodenzwischenräume eindringen können als die Wurzelhaare (Smith und Read, 1997). Die AM-Pilze erzeugen damit ein unterirdisches Netzwerk und vergrößern erheblich die Oberfläche zur Phosphataufnahme. Über die Hyphenspitzen scheidet der Pilz vermutlich Phosphatasen aus und löst schwerverfügbares Phosphat aus dem Boden (Joner und Johansen, 2000, Koide und Kabir, 2000).
Im extraradikulären Myzel wurde der erste Phosphat-Transporter aus AM-Pilzen identifiziert (Harrison und van Buuren, 1995). Dieser *„high affinity“* Transporter aus *Glomus versiforme* wird spezifisch in extraradikulären Strukturen exprimiert. Homologe Transporter ließen sich bereits in *Glomus mosseae* und *G. intraradices* identifizieren. In *G. mosseae* unterscheidet sich das Expressionsmuster zu dem aus *G. versiforme* (Benedetto et al., 2005). In *G. intraradices* wurde die RNA-Akkumulierung bisher nur in extraradikulären Hyphen untersucht (Maldonado-Mendoza et al., 2002).
Phosphat wird durch das Hyphennetzwerk zu den Wurzeln transportiert und schließlich über die Arbuskeln an die Pflanze abgegeben (Smith und Read, 1997, Smith et al., 2001). In den pflanzlichen Zellen, die die Arbuskeln umgeben, erfolgt die Phosphataufnahme aktiv über verschiedene H^+/P_i-Symporter. Expressionsstudien zeigten, dass einiger dieser Phosphat-Transporter spezifisch in arbuskelhaltige Zellen transkribiert werden, wie z.B. *MtPT4* in *M. truncatula* (Harrison et al., 2002). Der für den Transport notwendige elektrochemische Gradient lässt sich durch protonenpumpende ATPasen erzeugen. Die entsprechende Akkumulierung von RNA kann ebenfalls spezifisch für arbuskelhaltige Zellen sein, wie z.B. des Gen *Mtha1* aus *Medicago truncatula* (Krajinksi et al., 2002).
Der Efflux des Phosphats aus den intrazellulären Arbuskeln in den periarbuskulären Raum erfolgt vermutlich über ein spezielles System (Ashford und Allaway, 2002, Ezawa et al., 2002, Smith et al., 2000, Smith, 2001, Uetake et al., 2002). Pilzliche ATPasen könnten ebenfalls an diesem Efflux-System beteiligt sein. So ließen sich in *G. mosseae* bereits zwei ATPasen identifizieren, deren Transkripte während der intraradikulären Entwicklung akkumulieren (Requena et al., 2003).

Die AM-Pilze verbessern die pflanzliche Ernährung nicht nur durch den Transport von Phosphat, sondern stellen weitere Nährstoffe wie Stickstoff, Kalium, Zink, Kupfer, Magnesium und Eisen vermehrt zur Verfügung (George, 2000). Im Gegenzug für die Versorgung der Pflanzen mit Nährstoffen erhalten die AM-Pilze pflanzliche Kohlenhydrate. Durch die Mykorrhizierung ließ sich eine Steigerung der Photosyntheserate um bis zu 20% nachweisen, vermutlich durch die verbesserte Phosphat-Versorgung der Pflanzen (Douds et al., 2000, Wright et al., 1998a und b, Wang et al., 1989). Der Transport in die pilzlichen Strukturen wurde über $^{14}CO_2$-Markierungsexperimente gezeigt (Bevege et al., 1975), wobei bis zu 10% der in die Wurzeln transportierten Photoassimilate in den pilzlichen Stoffwechsel eingehen (Smith und Read, 1997, Jakobsen und Rosendahl, 1990). Die Photoassimilate werden aus den produzierenden oberirdischen Pflanzenteilen (*source* Gewebe) in Form von Saccharose über die Leitgefäße in die verbrauchenden Organe (*sink* Gewebe) transportiert (Avigad, 1982, Hawker, 1985). In der Wurzel findet der Transport der Kohlenhydrate zum Pilz jedoch wieder in Form von Hexosen statt (Smith und Read, 1997, Bago, 2000, Pfeffer et al., 1999).

Für die Spaltung der Saccharose kommen die pflanzlichen Invertasen (Morell und Copeland, 1984 und 1985) und die Saccharose-Synthase in Betracht. Invertasen führen einen irreversiblen Abbau der Saccharose durch. Es werden zwei verschiedene Invertasen je nach ihrem pH-Optimum unterschieden, die alkalischen Invertasen des Cytosols und die sauren Invertasen der Vakuole und der Zellwand.

Energetisch günstiger ist die Spaltung durch die Saccharose-Synthase da eine aktivierte Hexose entsteht (UDP-Glukose) die direkt in Glukose-1-Phosphat umgewandelt werden kann. Trotz ihres Namens spielt die Saccharose-Synthase für die Synthese von Saccharose eine untergeordnete Rolle, da sie bisher fast ausschließlich in den *sink* Geweben der Pflanzen nachgewiesen wurde (Akazawa und Okamoto, 1980, Richter 1998, Fieuw und Willenbrink, 1990). In *sink* Geweben konnte man sowohl Invertasen als auch Saccharose-Synthase nachweisen, so dass nicht immer geklärt ist, welches Enzym für den Saccharoseabbau verantwortlich ist. Bei der Etablierung der Knöllchensymbiose konnte die entscheidende Rolle der Saccharose-Synthase zugeordnet werden (Hitz et al., 1985) und auch Mykorrhizierung ließ die Expression des Saccharose-Synthase-Genes ansteigen (Hohnjec et al., 2003). In der fortgeschrittenen symbiotischen Beziehung wird die Spaltung der Saccharose zu 60% von der Saccharose-Synthase und zu 40% von

den Invertasen übernommen (Gordon et al., 1997). Saccharose-Synthase *antisense* Pflanzen weisen eine geringere Mykorrhizierung, reduzierte Phosphat-Konzentrationen in den oberirdischen Pflanzenteilen sowie eine erhöhte Saccharose-Konzentration im Phloem auf (Markus Baier, persönliche Mitteilung). Dadurch könnte der Transport der Hexosen zum AM-Pilz gestört und der pilzliche Kohlenhydratmetabolismus beeinflusst sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der mögliche Einfluss der Saccharose-Synthase auf den Kohlenhydrat-Metabolismus des arbuskulären Mykorrhizapilzes *G. intraradices* anhand der *antisense* Pflanzen näher untersucht.

2.4 Lebenszyklus arbuskulärer Mykorrhizapilze

Arbuskuläre Mykorrhizapilze können als obligat biotrophe Organismen ihren Lebenszyklus nicht ohne die Besiedelung einer Pflanzenwurzel vollenden (Spanu, 2006, Bago und Bécard, 2002). Die im Boden vorkommenden Sporen der AM-Pilze sind jedoch fähig, unabhängig von einem pflanzlichen Partner auszukeimen (Abb. 2-5). Abiotische Faktoren, wie Temperatur, Feuchtigkeit und pH-Wert beeinflussen die Keimung der Sporen (Giovannetti, 2000). Findet der Pilz in bis zu 20 Tagen keinen geeigneten Partner zieht der Pilz das Cytoplasma zurück, septiert die Keimhyphen und geht wieder in einen Ruhezustand über (Giovannetti, 2000). Der Vorgang kann bei *Gigaspora gigantea* bis zu zehnmal wiederholt werden, ohne dass dies zu einem Verlust der Keimfähigkeit führt (Koske, 1981).

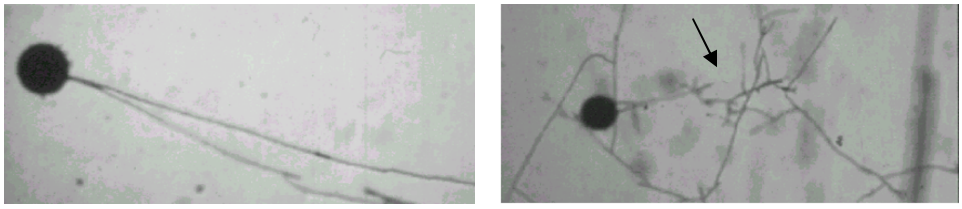


Abbildung 2-5: Keimende *Gigaspora rosea* Sporen. Die beiden Bilder zeigen keimende *G. rosea* Sporen *in vitro*. Auf dem rechten Bild wurden die Hyphenverzweigungen durch Wurzelexsudate von *Daucus carota* über 12 Stunden induziert. Bildquelle: M'Barek Tamasloukht.

Wachsen die Hyphen des keimenden AM-Pilzes in die Nähe einer Wurzel, werden Signale zwischen den beiden möglichen Partnern ausgetauscht (Giovannetti und Sbrana, 1998, Tamasloukht et al., 2003, Kosuta et al., 2003, Harrison, 2005, Paszkowski, 2006). Durch den Kontakt der Hyphen mit den Wurzelexsudaten kommt es zu sehr starken Verzweigungen und es entsteht ein regelrechtes Myzel (Abb. 2-5). Der AM-Pilz geht in die so genannte präsymbiotische Phase über, wodurch er die

Fähigkeit, wieder in den Ruhezustand zurückzukehren, verliert. Exsudate von Nichtwirtspflanzen haben keinen oder sogar einen negativen Effekt auf die Entwicklung der Sporen und deren Hyphenwachstum (Gianinazzi-Pearson et al., 1989, Bécard und Piché, 1989b, Giovannetti et al., 1994, Siqueira et al., 1991, Koide und Schreiner, 1992). Die ersten morphologischen Veränderungen der Hyphen nach Kontakt mit Wurzelexsudaten sind bereits nach sechs Stunden sichtbar (Buée et al., 2000, Tamasloukht, 2003). In molekularbiologischen Studien konnte man bereits nach einer halben Stunde Veränderungen im RNA-Akkumulierungsmuster nachweisen. Die Umstellungen in der Genexpression betrafen unter anderem Gene, deren Produkte auf eine gesteigerte mitochondrielle Aktivität hinwiesen, wie die Pyruvat-Carboxylase. Eine Induktion der Atmung konnte in weiteren Studien nachgewiesen werden (Tamasloukht et al., 2003). Lange Zeit wurde angenommen, dass es sich bei diesen Verbindungen, um Flavonoide handelt, da verschiedene Flavonoide ebenfalls die Verzweigungen auslösten (Bécard et al., 1992, Tsai und Philipps, 1991). Die Exsudate einer Mais-Mutante, die keine Flavonoide enthielten, lösten aber ebenfalls den Übergang von der Asymbiose zum präsymbiotischen Wachstumsmuster aus (Bécard et al., 1995). Erst im Jahre 2005 wurde durch Akiyama et al. (2005) der *Branching* Faktor als 5-Deoxy-Strigol, ein Sesquiterpen, in *Lotus japonicus* identifiziert. Dieser Branching-Faktor alleine reicht dazu aus die Atmung in keimenden *G. intraradices* und *Glomus claroideum* Sporen zu induzieren (Besserer et al., 2006). Über die starken Verzweigungen erhöht der Pilz die Wahrscheinlichkeit einer Begegnung mit sich in der Nähe befindlichen Wurzeln.

Erfolgt ein physikalischer Kontakt zwischen den Hyphenspitzen und der Wurzeloberfläche, beginnt der AM-Pilz ein Appressorium auszubilden (Abb. 2-6). Die Appressorien stellen die Infektionsstrukturen der AM-Pilz dar (Nagahashi, 2000). Über molekularbiologische Studien ließ sich ein deutlicher Anstieg der Expression von Genen für Proteine von calciumabhängigen Signalwegen (Breuninger und Requena, 2004) nachweisen, die auch bei der Etablierung der Knöllchensymbiose von Bedeutung sind (Downie und Walker, 1999, Wais et al., 2000).

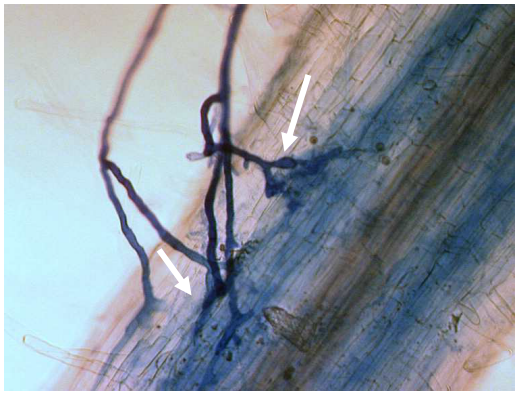


Abbildung 2-6: Appressorien von *Glomus intraradices*. Dargestellt sind Appressorien (Pfeile) von *G. intraradices* vor der Besiedelung von *Daucus carota* Wurzeln in der Wurzelkultur. 200-fache Vergrößerung (Zeiss Axiolab).

Über die Appressorien penetriert der AM-Pilz die Wurzelepidermis und beginnt intraradikuläre Strukturen auszubilden (Harrison, 1999, siehe auch 2.2). Von den Hyphen innerhalb der Wurzel dringen die Pilze auch in die Zellen ein, jedoch ohne diese zu zerstören. Dort bilden sie bäumchenartige Strukturen aus, die Arbuskeln (Abb. 2-7), worüber der Nährstoffaustausch stattfindet (Smith und Read, 1997, siehe auch 2.3).

Abbildung 2-7: Arbuskeln von *Glomus intraradices* während der Besiedelung von *Medicago truncatula*. Dargestellt sind zwei Arbuskeln von *G. intraradices* während der Besiedelung von *M. truncatula* Wurzeln (Arum-Typ) in der Wurzelkultur. 200-fache Vergrößerung (Zeiss Axiolab).

Gleichzeitig mit der Besiedelung wächst der AM-Pilz wieder aus der Wurzel heraus und bildet im umgebenden Boden das extraradikuläre Myzel (Abb. 2-8) (Franken et al., 2002). Über das Myzel erfolgen die Nährstoffaufnahme des Pilzes und der Transport zur Wurzel (siehe auch 2.3). Auch diese Hyphen verzweigen sich stark und bilden an ihren Enden unter Umständen arbuskelähnliche Strukturen, die „*Branched absorbing structures*“ (Bago et al., 1998). Die extraradikulären Hyphen besiedeln weitere Wurzeln und bilden so ein unterirdisches Netzwerk, worüber auch Nährstoffe zwischen den Pflanzen ausgetauscht werden können (Bethlenfalvay et al., 1991).

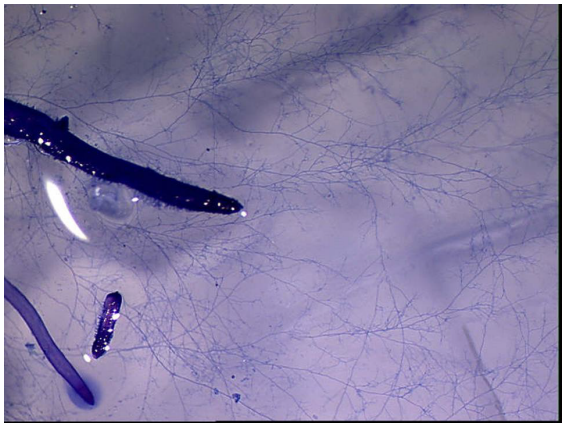


Abbildung 2-8: Extraradikuläres Myzel von *Glomus intraradices* während der Mykorrhiza mit *Daucus carota.* Auf diesem Bild ist das extraradikuläre Myzel von *G. intraradices* während der Besiedelung von *D. carota* Wurzeln in der Wurzelkultur zu sehen. Bildquelle: Elke Neumann.

Der Lebenszyklus von AM-Pilzen schließt sich mit der Bildung der Tochtersporen an den Enden der extraradikulären Hyphen (Abb. 2-9) (Bianciotto und Bonfante, 1998). Die Generationszeiten der AM-Pilze sind stark abhängig von der pilzlichen Spezies und den gegeben Bedingungen. *G. intraradices* kann in der *in vitro* Kultur bereits nach acht Wochen die ersten Sporen bilden (Chabot et al., 1992), während man bis heute bei einigen Spezies nur hyphenartige Strukturen nachweisen konnte (Dodd et al., 2000).

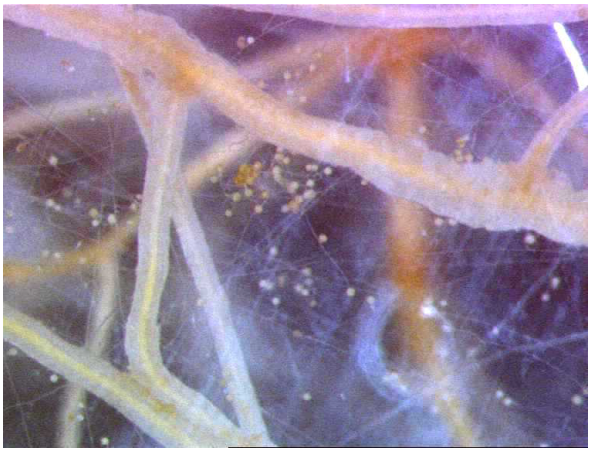


Abbildung 2-9: Extraradikuläres Myzel mit Tochtersporen von *Glomus intraradices* während der Mykorrhiza mit *Daucus carota.* Auf diesem Bild ist das extraradikuläre Myzel und die gebildeten Tochtersporen von *G. intraradices* während der Besiedelung von *D. carota* Wurzeln in der Wurzelkultur zu sehen. 50-fache Vergrößerung (Zeiss Axiolab).

Insbesondere über die molekularbiologischen Abläufe während der Entwicklung innerhalb der Wurzel ist bisher wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte über verschiedene Methoden weitere Einblick in diese Prozesse erfolgen.

2.5 Molekularbiologische Studien arbuskuläre Mykorrhizapilze

Durch die hohe Anzahl an Zellkernen in den Sporen der AM-Pilze besitzen diese auch einen hohen DNA-Gehalt (Bianciotto und Bonfante, 1993, Hosny et al., 1999). Die Sporen dienten daher als Quelle für genomische DNA für phylogenetische Studien (Simon et al., 1992), der Erstellung von genomischen Banken (Zézé et al., 1994, Franken et al., 1996, van Buuren et al., 1999) und der Identifizierung proteinkodierender Gene (Kaldorf et al., 1994, Lanfranco et al., 1999, Ferrol et al., 2000). Neben DNA enthalten ruhende Sporen aber auch RNA (Beilby und Kidby, 1982), die für PCR basierte Klonierungen (Franken et al., 1997, Franken et al., 1998), RNA-Akkumulierungsstudien (Bütehorn et al., 1999) und der Erstellung von cDNA-Banken (Stommel et al, 2001, Jun et al., 2002) verwendet wurden. Diese Experimente lieferten zum einen Aufschluss über die in der asymbiotischen Phase exprimierten Gene. Zum anderen stellten die cDNA Banken Quellen für die Analyse einzelner Gene dar (Lammers et al., 2001, Bago et al., 2003). Das erste proteinkodierende Gen eines AM-Pilzes wurde allerdings bereits 1995 in einer cDNA-Bank aus einer arbuskulären Mykorrhiza identifiziert (Harrison und van Buuren, 1995). Dieses Gen kodierte für einen Phosphat-Transporter von *G. versiforme*, der im extraradikulären Myzel exprimiert wird.

Mit der Entwicklung des differentiellen RNA Displays und später der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) konnten die ersten Genexpressionsstudien mit reinem pilzlichem Material durchgeführt werden. Dabei wurde gezeigt, wie sich RNA-Akkumulierungsmuster während des Wachstums der Keimhyphen (Franken et al., 2000), unter dem Einfluss von Mikroorganismen (Requena et al., 1999) oder nach der Zugabe von Wurzelexsudaten (Tamasloukht et al., 2003) änderte. Neben den asymbiotisch oder präsymbiotisch keimenden Hyphen wurde auch versucht, die Expression in den symbiotischen extraradikulären Hyphen zu analysieren. Durch die feine Struktur dieses Myzels ist deren Isolierung aus einer Topfkultur allerdings erschwert. Auch die Kompartimentierung mit Nylonmembranen (Redecker et al., 1995) führte nur zur Isolierung geringer Mengen an RNA, die nur wenig für weitere Untersuchungen verwendet wurde (Bütehorn et al., 1999, Requena et al., 2003).

Mit der Etablierung der arbuskulären Mykorrhiza in der Wurzelkultur (Bécard und Fortin, 1988) stand aber wesentlich mehr pilzliches Material aus der symbiotischen Phase zur Verfügung. Durch die Verwendung von geteilten Petrischalen ließen sich nun einfach exprimierte Gene auch aus extraradikulärem Myzel isolieren (Sawaki

und Saito, 2001). Des Weiteren war es nun auch möglich die Hyphen verschiedenen Bedingungen auszusetzen. Über die SSH ließen sich so spezifisch Gene anreichern und identifizieren, die z.B. für die erhöhte Toleranz von mykorrhizierten Pflanzen gegenüber Schwermetallen verantwortlich sein könnten (Rhody, 2002, Waschke et al., 2006).

Aus intraradikulären Myzel ließen sich bisher nur sehr wenige Gene identifizieren. Am erfolgreichsten verlief die Erstellung einer cDNA-Bank. Aus den 680 isolierten und untersuchten Genfragmenten konnte sechs Genen ein pilzlicher Ursprung zugewiesen werden (Brechenmacher et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte über Anreicherung der pilzlichen Strukturen während der Besiedelung versucht werden, gezielt Gene aus dem intraradikulären Myzel zu isolieren. Des Weiteren sollten die bisherigen Sequenzinformationen aus keimenden Sporen und extraradikulären Hyphen erweitert werden. Hierbei wurde ausschließlich mit dem AM-Pilz *G. intraradices* gearbeitet, da dieser als Modellorganismus für AM-Pilze in der molekularbiologischen Forschung gilt und aufgrund der kleinen Genomgröße bereits ein Projekt zur Sequenzierung des Genoms gestartet wurde (Hijri und Sanders, 2004, Lammers et al., 2006). Parallel zu diesen ungerichteten Ansätzen sollten zielgerichtet Expressionsstudien verschiedener Gene während des Lebenszyklus von *G. intraradices* durchgeführt werden.

2.6 Die Modelpflanze *Medicago truncatula* in der Mykorrhizaforschung und die Verwendung von Mutanten

Während der letzten Jahrzehnte hat sich unter den Pflanzenbiologen *Arabidopsis thaliana* aufgrund ihrer kurzen Generationszeit, des kleinen diploiden Genoms und ihrer Anspruchslosigkeit als Modellpflanze durchgesetzt (zum Review: Somerville und Kornneef, 2001). *A. thaliana* fehlt als Brassicaceae allerdings die Fähigkeit arbuskuläre Mykorrhiza oder Knöllchen auszubilden und eignet sich nicht für die molekularbiologischen Studien dieser Symbiosen. Daher musste man sich auf die Suche nach einer neuen Modellpflanze machen (Cook und Dénarié, 2000). Viele der landwirtschaftlich relevanten Pflanzen, wie *Medicago sativa* (Luzerne), *Pisum sativum* (Erbse) und *Vicia faba* (Ackerbohne) besitzen jedoch ein sehr großes und oftmals auch polyploides Genom, wodurch sie sich nicht für molekularbiologsiche Studien eignen. Mit *M. truncatula* (s. Abb. 2-10) und *Lotus japonicus* ließen sich in

den letzten Jahren zwei Modellpflanzen für symbiotischen Interaktionen identifizieren (Barker et al., 1990, Cook et al., 1997, Udvardi, 2001, Young et al., 2005).

Abbildung 2-10: Die Modellpflanze *Medicago truncatula*. Dargestellt sind die Blüten, die Hülsenfrüchte und der natürliche Habitus von *M. truncatula*. Bildquelle: M. Hahn.

M. truncatula besitzt mit etwa $5x10^8$ bp zwar ein viermal so großes Genom wie *A. thaliana*. Dieses ist aber im Vergleich zu denen anderen Leguminosen verhältnismäßig klein. Daneben sind Einjährigkeit, das diploide Genom und die fast 100%-ige Selbstbefruchtung der *M. truncatula* Pflanzen weitere Vorteile und Gründe sie als Modellpflanze für symbiotischen Interaktionen zu wählen (Cook, 1999, Harrison, 2000, Frugoli und Harris, 2001). Bis heute existiert eine Vielzahl von Datenbanken für Sequenzen von exprimierten Genen von *M. truncatula*. Darunter befinden sich viele Gene, die in symbiotischen Interaktionen exprimiert werden (Cannon et al., 2005).

In das Genom von *M. truncatula* lassen sich außerdem Gene stabil mittels Agrobakterien vermittelter Transformation integrieren (Boisson-Dernier et al., 2001, Chabaud et al., 2003). Dabei handelt es sich sowohl um die Induktion haariger Wurzeln als auch um die Regeneration transgener Pflanzen. Durch diese Techniken lassen sich interessante Gene aus den Genbanken auf ihre Funktion, ihre Induzierbarkeit und auch den Ort ihrer Expression hin genauer untersuchen (Kosuta et al., 2003, Hohnjec et al., 2005, Staehlin et al., 2005). Bei den molekularbiologischen Studien dieser Arbeit wurde daher fast ausschließlich mit *M. truncatula* in der Topfkultur als auch in der Wurzelkultur gearbeitet.

Das gleichzeitige Vorkommen aller Stadien der Mykorrhiza stellt ein Hindernis in der Zuordnung der genetischen und physiologischen Prozesse zu den unterschiedlichen Phasen der Symbiose dar. Pflanzliche Mutanten, die keine Knöllchen (nod^-) oder arbuskuläre Mykorrhiza (myk^-) mehr ausbilden können, sind ideal für die

Identifizierung von Genen (Marsh und Schultze, 2001, Frugoli und Harris, 2001). Interessante Mutanten existieren aber nicht nur von *M. truncatula* oder *L. japonicus*, sondern z.B. auch von *P. sativum*. So wurde 1991 durch Gianinazzi-Pearson et al. ein Phänotyp identifiziert, bei dem die AM-Pilze noch Appressorien ausbilden, jedoch nicht mehr in die Wurzeln penetrieren konnten (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Pflanzliche Wandverstärkungen verhinderten durch deren Moleküle zur Pathogenabwehr, wie Phenole, Kallose und PR-1 Protein (*„pathogen-related“*), eine Besiedelung der AM-Pilze (Gollotte et al., 1993). Die *P. sativum* Mutante RisNod 24 (Engvild, 1987) könnte über die Mykorrhizierung zu einem späteren Zeitpunkt näheren Aufschluss geben (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Der AM-Pilz kann ungehindert in die Wurzel eindringen, jedoch keine vollständigen Arbuskeln mehr ausbilden (s. Abb. 2-11), wodurch der Nährstofftransport zwischen den beiden Partnern gestört sein kann.

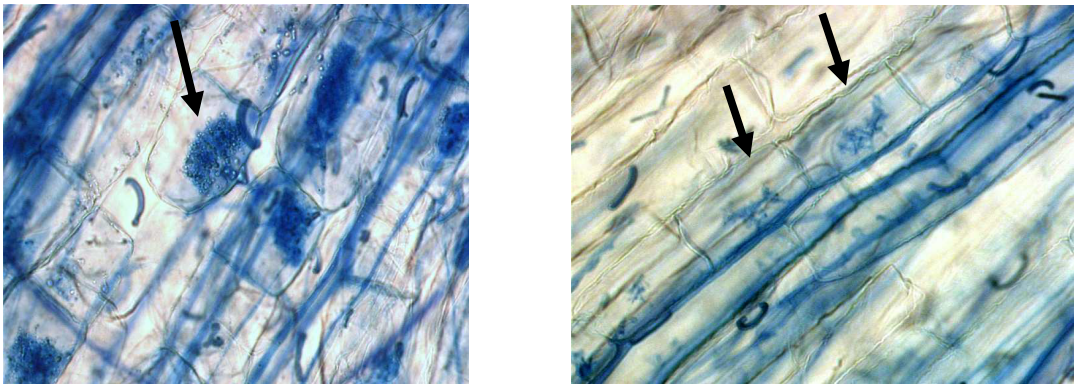


Abbildung 2-11: Arbuskelbildung in *Pisum sativum* cv. Finale Wildtyp und der Mutante RisNod24. Im linken Bild ist eine vollständige Arbuskel (Pfeil) während der Besiedelung durch *G. intraradices* dargestellt. In der Mutante RisNod24 (rechtes Bild) können die pilzlichen Hyphen in die Zellen noch penetrieren es unterbleibt aber eine vollständige Entwicklung der Arbuskeln (Pfeile). 200-fache Vergrößerung (Zeiss Axiolab).

Der Einfluss des Nährstoffaustausches auf die Genexpression des AM-Pilzes *G. intraradices* war ein wichtiger Aspekt während dieser Arbeit. Daher wurden einige Studien ebenfalls während der Mykorrhiza mit der *P. sativum* Mutante RisNod24 und dem entsprechenden Wildtyp durchgeführt.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), AppliChem (Darmstadt), Sigma (Taufkirchen), VWR (Darmstadt), Roche (Mannheim), QIAGEN (Hilden), Fluka (Buchs, Schweiz) und Serva (Heidelberg) bezogen. Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Kisker (Steinfurt), peqLab (Erlangen), Sarstedt (Nürnberg), Greiner bio-one (Frickenhausen), Biozym (Hess. Oldendorf), Roth (Karlsruhe), Eppendorf (Hamburg), VWR (Darmstadt), Biodeal (Markkleeberg) und der Einkaufsinitiative Brandenburg (Genshagen).

DNA und RNA modifizierende Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt), QIAGEN (Hilden), Roth (Karlsruhe), peqLab (Erlangen), Promega (Mannheim), Invitrogen (Karlsruhe), BD Biosciences Clontech (Heidelberg) und Bio-Rad (München) geliefert. Die Synthese von Oligonukleotiden führte die MWG Biotech AG (Ebersberg), Sequenzierungen die MWG Biotech AG oder das Julius-von-Sachs-Institut für Biowissenschaften in Würzburg durch. Der Transfer von Nukleinsäuren erfolgte auf Hybond N+ Nylonmembranen der Firma Amersham Biosciences (Freiburg). Für die Autoradiographie wurden Filme von Fuji (Tokio, Japan) verwendet.

3.2 Standardpuffer und -lösungen

Tabelle 3-1: Puffer und Lösungen. Alle Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit H_2O angesetzt und autoklaviert.

TAE	40 mM Tris-Acetat; pH 8,0 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl; pH 8 1 mM EDTA
20x SSC	0,3 M Na_3-Citrat 3 M NaCl
TNE	10 mM Tris-HCl, pH 8 10 mM NaCl 0,1 mM EDTA

DEPC-Wasser	0,1% DEPC (4 h inkubiert und anschließend autoklaviert)
Citratpuffer	8,5 ml 0,1 N Zitronensäure 41,5 ml 0,1 N Natrium-Citrat 450 ml dH_2O
Denaturierungslösung	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisierungslösung	0,5 M Tris-HCl, pH 7,5 1,5 M NaCl
Hybridisierungslösung	0,1% N-Laurylsarcosin-Natriumsalz 0,02% SDS 1% Blockierungslösung 5x SSC
2x Waschlösung	2x SSC 0,1% SDS
0,5x Waschlösung	0,5x SSC 0,1% SDS
0,1x Waschlösung	0,1x SSC 0,1% SDS
DIG-Puffer 1	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl; pH 7,5
DIG-Blockierungslösung	1% Blockierungsreagenz in DIG-Puffer 1
DIG-Waschlösung	100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl; pH 7,5 0,3% (v/v) Tween 20
DIG-Detektionslösung	100 mM Tris-HCl; pH 9,5 100 mM NaCl
Lysis-Puffer 1	25 mM Tris-HCl; pH 8,0 10 mM EDTA 5 mg/ml Lysozym
Lysis-Puffer 2	0,2 M NaOH 1% SDS
Lysis-Puffer 3	3 M Kalium-Acetat; pH 4,8

10x MOPS	200 mM MOPS (Applichem) 50 mM Natrium-Acetat 10 mM EDTA pH 7
6x DNA-Probenpuffer	30% Glycerin 0,25% Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer	100 µl Formamid 38 µl Formaldehyd 20 µl 10x MOPS (Applichem) 42 µl DEPC-behandeltes Wasser
Milchsäurelösung	100 ml Milchsäure 200 ml 87% Glyzerin 100 ml dH_2O

3.3 Medien und Düngelösungen

Tabelle 3-2: Kulturmedien. Alle Medien wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit dH_2O angesetzt und autoklaviert. (alle Angaben pro Liter)

LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
M-Medium	25 ml Makroelemente 1 ml Mikroelemente 5 ml Na-Fe-EDTA-Lösung 5 ml Calcium-Lösung 1 ml Phosphat-Lösung 10 ml Vitamin-Lösung 10 g Saccharose; pH 5,5
Makroelemente	3,2 g KNO_3 29,2 g $MgSO_4$ x 7 H_2O 2,6 g KCl
Na-Fe-EDTA-Lösung	1,6 g Na-Fe-EDTA
Calciumlösung	57,6 g $Ca(NO_3)_2$ x 4 H_2O
Phosphatlösung	4,8 g KH_2PO_4

Mikroelemente	6 g $MnCl_2$ x 4 H_2O 1,5 g H_3BO_3 2,65 g $ZnSO_4$ x 7 H_2O 750 mg KI 2,4 mg Na_2MoO_4 x 2 H_2O 130 mg $CuSO_4$ x 5 H_2O
Vitaminlösung (Steril filtriert)	0,3 g Glycin 5 g Myo-Inositol 50 mg Nikotinsäure 10 mg Pyridoxinchlorid 10 mg Thiamin
SOC	20 g Trypton 5 g Hefeextrakt 0,5 g NaCl 3,6 g Glucose 10 ml KCl (250 mM) 5 ml MgCl2 (2 M)
10x Hogness-Freeze-Medium	Lösung 1: 520 ml 87% Glyzerin 4,99 g Na_3-Citrat 9,00 g $(NH_4)_2SO_4$ 0,99 g $MgSO_4$x7H_2O ad 800 ml dH_2O Lösung 2: 17,96 g K_2HPO_4 ad 200 ml dH_2O nach dem Autoklavieren werden Lösung 1 und 2 miteinander vermischt.
1x Hogness-Freeze-Medium	100 ml 10x Hogness-Freeze-Medium 900 ml LB
Glyzerinlösung	65% (v/v) Glyzerin 0,1 M $MgSO_4$ 25 mM Tris-HCl; pH 8

Tabelle 3-3: Antibiotika und Nachweisreagenzien. Alle Zusätze zu den Medien wurden, sofern nicht anders vermerkt, in dH_2O gelöst und anschließend steril filtriert.

Ampicillin	150 µg/Liter Medium
IPTG	0,5 mM
X-Gal	80 µg/Liter Medium (gelöst in DMF)
Antibiotikalösung für Sporen	0,2% Streptomycin 0,1% Gentamycin

Tabelle 3-4: Düngelösung. Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, mit dH_2O angesetzt und autoklaviert. (alle Angaben pro Liter)

Hoagland-Nährlösung 1 (reduziert Phosphat)	Lösung A 10 ml Lösung B 200 ml Lösung C 100 µl
Lösung A	150 g $Ca(NO_3)_2$ 70 g KNO_3 1,4 ml Eisenlösung
Lösung B (2 Liter)	140 mg KH_2PO_4 1,6 g K_2SO_4 11 g $MgSO_4$ 2,5 g $CaSO_4$
Lösung C (100 ml)	1,18 g $MnSO_4$ 160 mg $ZnSo_4$ 3,1 g H_3BO_4 170 mg $CuSO_4$ 80 mg MoO_3 28 mg NaCl
Lösung D (100 ml)	1,26 g KH_2PO_4
Hoagland-Nährlösung 2	Lösung A 10 ml Lösung B 200 ml Lösung C 100 µl Lösung D 10 ml

3.4 Organismen und deren Kultivierung

3.4.1 Organismen

Tabelle 3-5: Organismen und deren Herkunft.

Organismus	Herkunft
Escherichia coli DH5α	Invitrogen, Karlsruhe
Glomus intraradices (Schenk & Smith) BB-E	Banque Européenne des Glomales INRA/Dijon, Frankreich
Glomus intraradices (Schenk & Smith) BB-E	Biorize, Dijon, Frankreich
Glomus mosseae BEG12	Biorize, Dijon, Frankreich
Gigaspora rosea BEG9 (Nicolson & Schenk)	Banque Européenne des Glomales INRA/Dijon, Frankreich
Daucus carota L., *Ri*-transformiert	G. Bécard, UMR 5546 CNRS/Université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, Frankreich
Medicago truncatula Gaertn. Jemalong A 17	A. Perlick, Universität Bielefeld
Medicago truncatula Gaertn. Jemalong A17-S1, *Ri*-transformiert	G. Bécard, UMR 5546 CNRS/Université Paul Sabatier, Castanet-Tolosan, Frankreich
Medicago truncatula Gaertn cv. R108-1	Hoffmann, 1997
Medicago truncatula p35S-MtSucS1-antisense	Hohnjec, 2001
Pisum sativum L. cv. Finale	V. Gianninazi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich
Pisum sativum L. cv. Finale (Nod^+/Fix^-) RisNod24	V. Gianninazi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich

3.4.2 *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Medium. Je nach Bedarf wurde das entsprechende Antibiotikum und/oder 1,5% Agar-Agar hinzugefügt. Die Anzucht erfolgte aerob bei 37°C, im Falle von Flüssigkulturen im Schüttelinkubator bei ca. 200 rpm. Für die Langzeitlagerung wurde 1 ml der frischen Bakterienkultur mit 1 ml der Glyzerinlösung versetzt und bei -80°C gelagert.

3.4.3 *Medicago truncatula*

Die Arbeiten wurden mit dem Modellsystem *M. truncatula* und *G. intraradices* durchgeführt. Durch die Verwendung einer mit *Agrobacterium rhizogenes* erstellten Wurzelkultur von *M. truncatula* (zur Verfügung gestellt von G. Bécard) waren Experimente auch unter sterilen Bedingungen möglich. Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden *M. truncatula* in Töpfen mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Des Weiteren standen von *M. truncatula* gentechnisch veränderte Pflanzen zur Verfügung, die für diese Arbeit genutzt wurden (Honjec, 2001).

3.4.3.1 Wurzelkultur

Die mit *A. rhizogenes* erstellte Wurzelkultur (zur Verfügung gestellt von G. Bécard) von *M. truncatula* wurde alle vier Wochen auf quadratische Petrischalen mit M-Medium (4% Phytagel, Sigma) subkultiviert (s. Abb. 1). Die Subkultivierung erfolgte durch Abtrennen von jungen Wurzel mit einem Skalpell und vorsichtigem Umsetzten auf neues Medium.

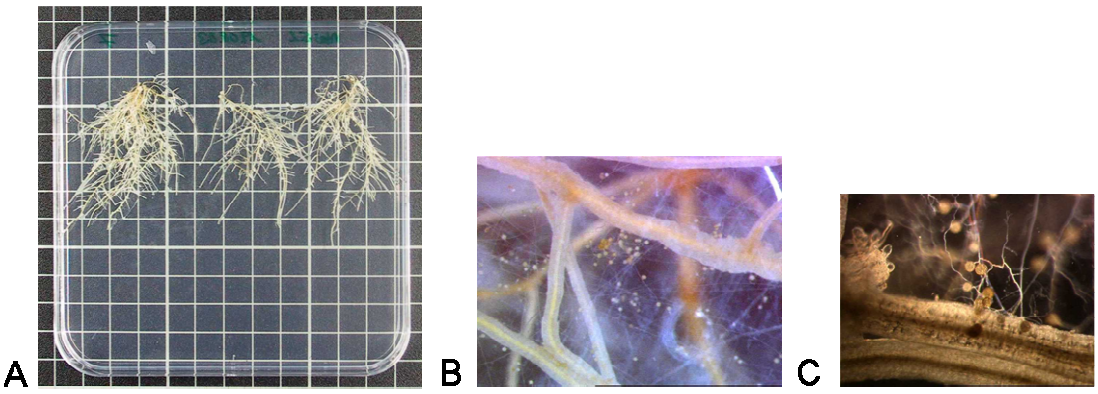


Abbildung 3-1: Wurzelkultur *Medicago truncatula* – *Glomus intraradices*. A *Ri*-transformierte *M. truncatula* Wurzeln auf M-Medium. B und C Mit *G. intraradices* mykorrhizierte *Ri*-transformierte *M. truncatula* Wurzeln auf M-Medium und Sporen und Hyphen von *G. intraradices*.

Die Mykorrhizierung der Wurzelkultur erfolgte zu Beginn durch die Zugabe von einzelnen *G. intraradices* Sporen direkt neben das Wurzelfragment. Im Laufe der Kultivierung zeigte sich, dass zur Erhaltung der Mykorrhizierung eine Zugabe von Sporen erforderlich ist, dies geschah durch Abschaben des Mediums in dem sich schon Sporen gebildet haben und deren Überführung samt des Mediums auf die frisch umgesetzten Wurzelfragmente. Die Anzucht fand senkrecht bei 24°C in Dunkelheit statt.

Zur Gewinnung von extraradikulärem Myzel wurden die mykorrhizierten Wurzeln auf einer Hälfte von zwei-geteilten Petrischalen subkultiviert (s. Abb. 2). Im Verlauf der Inkubation wurden die in das zweite Kompartiment wachsenden Wurzeln regelmäßig mit dem Skalpell entfernt, so dass nur die Hyphen von *G. intraradices* in dieser Hälfte wuchsen. Nach vier bis sechs Wochen wurde das feste M-Medium inklusive der Hyphen entfernt und nach zweimaligem Waschen mit sterilem Wasser durch flüssiges M-Medium ohne Saccharose ersetzt. Für die nächsten zwei bis vier Wochen wurden die Platten bei 24°C im Dunkeln inkubiert. Das Myzel wurde unter zu Hilfenahme einer Impfnadel aus dem Medium vorsichtig entfernt und direkt für die RNA-Extraktion verwendet.

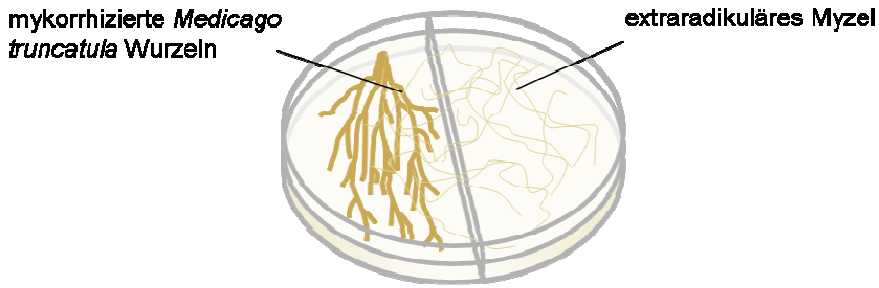


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Wurzelkultur auf geteilten Platten. Für die Gewinnung von extraradikulärem Myzel wurden mit *G. intraradices* mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln auf geteilten Petrischalen subkultiviert. Nach wenigen Wochen der Kultivierung wuchsen die Hyphen in das zweite Kompartiment und das feste Medium wurde durch Flüssiges ersetzt. Nach weiteren zwei bis vier Wochen konnte dann das extraradikuläre Myzel vorsichtig für die Isolierung der RNA geerntet werden.

Da der pilzliche Anteil in den Kulturen als relativ gering zu erwarten war, wurde bei einem Teil der Platten die Wurzeln zusätzlich mit 500 µl einer Glukoselösung (400 mg/ml) behandelt, was zu einer erhöhten Bildung von pilzlicher Biomasse führen kann (Douds, 2002).

3.4.3.2 Kultivierung im Gewächshaus

Zur Stratifizierung und Oberflächensterilisierung wurden ca. 100 *M. truncatula* Samen in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben und mit 0,5 ml 95-97% Schwefelsäure für ca. zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Säure abgenommen und dreimal volumenfüllend mit sterilem Wasser für zwei Minuten gewaschen. Eine samenbedeckende Menge einer 1,6%-igen Natriumhypochloritlösung wurde für drei Minuten hinzu gegeben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit sterilem Wasser für je 2 min wurden die Samen unter der Sterilbank auf sterile und gut durchfeuchtete Filterpapiere in Petrischalen ausgelegt. Die Petrischalen wurden mit Parafilm umschlossen und mit Alufolie lichtdicht umwickelt, die Samen bei 4°C für drei bis maximal acht Tage inkubiert. Das Auskeimen der Samen erfolgte im Anschluss durch eine Inkubation bei Raumtemperatur (RT).

Pro Topf wurden vier Keimlinge in 500 ml Substrat aus Vermikulit und Sand (1:1) pikiert, sollten die Pflanzen mykorrhiziert werden wurde dem Substrat 10% *G. intraradices* Inokulum (Biorize, Dijon, Frankreich) untergemischt. Die weitere Anzucht der Pflanzen erfolgte im Kabinengewächshaus bei 20°C am Tag und 18°C in der Nacht. Die Anzucht der gentechnisch veränderten Pflanzen erfolgte in einer begehbaren Phytokammer bei einer Lichtintensität von 450 µMol/sm², 20°C 16 h, 18°C 8 h und bei einer Luftfeuchtigkeit von 70%. Alle Pflanzen wurden täglich mit dH_2O bewässert und wöchentlich mit 10 ml Hoagland-Nährlösung 1 versorgt.

Die Ernte der Wurzeln erfolgte nach fünf, sechs, sieben und acht Wochen. Durch vorsichtiges Waschen mit Wasser wurden die Wurzeln von Substratresten und anhängenden extraradikulären Hyphen befreit. Ein Teil der Wurzeln wurde für die Extraktion der RNA in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Aus unterschiedlichen Bereichen der Wurzel wurden zusätzlich Proben zur Färbung und anschließenden Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades entnommen.

Zur Vermehrung von *M. truncatula* wurden die Pflanzen im Kabinengewächshaus angezogen. Die Pflanzen wurden täglich bewässert und wöchentlich mit Hoagland-Nährlösung 2 gedüngt. Die reifen Samenkapseln wurden abgenommen und bei RT bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.4.4 *Glomus intraradices*

Ein Vorteil der Wurzelkultur von *M. truncatula* ist, dass der positive Geotropsimus nach der Transformation erhalten blieb und im oberen Bereich der Platte nur Myzel

des Pilzes wächst. Nach ca. vier Monaten bilden sich an diesen Hyphen neue Sporen, die für weitere Experimente genutzt werden können.
Für die Gewinnung der Sporen wurde der Teil des Mediums, der Sporen enthielt, unter der Sterilbank in ein steriles Becherglas mit Rührfisch überführt und mit drei Volumen Citrat-Puffer überschichtet. Unter Rühren löst sich das Phytagel auf und die Sporen konnten unter dem Binokular mit einer Pipette isoliert werden. Anschließend wurden die Sporen mehrmals mit sterilem Wasser gewaschen. Um eventuelle Kontaminationen auszuschließen, wurde die Oberfläche der Sporen einmalig sterilisiert. Dies erfolgte durch eine Behandlung für zweimal 15 min mit 2% Chloramin T für viermal 10 min in der Antibiotikalösung für Sporen und anschließendem dreimaligem Waschen in sterilem Wasser. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Sporen in Wasser bei 4°C gelagert.

3.4.5 *Pisum sativum*

Die Erbsensamen wurden zunächst fünf Minuten in 70% Ethanol geschwenkt, mit sterilem destilliertem Wasser gewaschen und anschließend für zweimal 20 min in 7%-iger Natriumhypochloritlösung schüttelnd oberflächensterilisiert. Nach nochmaligem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen in Pflanzschalen mit Vermikulit gelegt, so dass sie nur zur Hälfte mit dem Substrat bedeckt waren. Das Auskeimen erfolgte in einer Phytokammer bei 450 µMol/sm², 20°C 16 h, 18°C 8 h und bei einer Luftfeuchtigkeit von 70%. Die Bewässerung der Keimlinge erfolgte mit destilliertem Wasser.
Nach ca. sieben Tagen wurden die Samen aus dem Vermikulit genommen und in ein Substratgemisch aus Sand und Vermikulit (1:1) gesetzt. Im Falle der Mykorrhizierung wurde dem Substrat-Gemisch 10% *G. intraradices* Inokulum (Biorize, Djion, Frankreich) untergemischt. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Kabinengewächshaus. Die Pflanzen wurden täglich mit destilliertem Wasser bewässert und zusätzlich einmal wöchentlich mit 10 ml der Hoagland-Nährlösung 1 gedüngt.
Die Ernte der Pflanzen erfolgte nach fünf und acht Wochen. Die Wurzeln wurden unter fließendem Wasser von dem Substrat und anhängigem extraradikulärem Myzel vorsichtig befreit. Für die RNA-Extraktion wurden Wurzelproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Eine

weitere Wurzelprobe wurde für die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades genommen.

3.4.6 *Gigaspora rosea*

Sporen von *G. rosea* wurden aus Bodenproben von Pflanzen, die mit *G. rosea* inokuliert waren, über einen Siebgradienten (Analysesiebe Reetsch, Haan, Deutschland) mit Leitungswasser abgefiltert. Die Porendurchmesser betrugen 1 mm, 0,5 mm, 0,355 mm und 0,063 mm. Anschließend erfolgte eine Gradienten-zentrifugation mit Radioselectan. Die Sporen wurden zusammen mit dem verbleibenden Sand in ein Zentrifugenröhrchen überführt und wurden nacheinander vorsichtig mit 10 ml 60% Radioselectan, 5 ml 40% Radioselectan, 5 ml 20% Radioselectan und 5 ml 10% Radioselectan überschichtet. Nach der Zentrifugation (10 Minuten bei 3000 rpm) konnten die Sporen mit einer Pipette aufgenommen und in ein Reagenzglas überführt werden. Für die weitere Verwendung der Sporen wurde ihre Oberfläche, wie bereits unter 3.4.4 beschrieben, sterilisiert. Die Sterilisation erfolgte jedoch zweimal und während der Inkubation in der Chloramin-T-Lösung wurden sie kurzzeitig Ultraschall ausgesetzt. Bis zur weiteren Verwendung lagerten die Sporen bei 4°C in sterilem Wasser.

3.5 Färbung der Wurzelproben und Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades

Zur Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades wurden die Wurzelproben mit Trypanblau angefärbt (Phillips & Hayman, 1970). Hierzu wurden die Wurzeln in einem Probengefäß zusammen mit 10% KOH für 5 min (*M. truncatula*) oder 10 min (*P. sativum*) im Wasserbad bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde die KOH-Lösung gegen eine 5%-ige HCl-Lösung ausgetauscht und für 3 min bei RT inkubiert. Diese HCl-Lösung wurde dann durch die 0,01% Trypanblau in dH_2O ersetzt und für 3 bis 7 min bei 95°C erhitzt. Die Entfernung von überschüssiger Farbe und eine Entlüftung des Gewebes erfolgte, nach Abnahme der Gebrauchslösung, durch die Zugabe von 96% Ethanol und der Inkubation bei 95°C für 2 min. Die gefärbten Wurzeln wurden in Milchsäurelösung bei Raumtemperatur gelagert.

Zum Auszählen der Mykorrhizierung wurden die Wurzeln in 1 cm lange Fragmente geschnitten und auf Objektträgern fixiert. Unter dem Mikroskop wurden 100 Schnittpunkte mit dem Fadenkreuz von mindestens 30 Fragmenten auf

Mykorrhizierung hin überprüft, wodurch der Grad der Mykorrhizierung in Prozent ermittelt wurde.

3.6 Molekularbiologische Methoden

3.6.1 Oligonukleotide

Tabelle 3-6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5'→ 3')	Tm [°C]	Herkunft
2-21_for	GAAGGCGACTCACTACAGC	58,8	diese Arbeit
2-21_rev	ACGTCGACAGAATTTTCGGACCAA	61	diese Arbeit
2-7_for	ACCCAATCAGCGATATTTACTCA	57,1	diese Arbeit
2-7_rev	GTCACTAGGCACGGTCAGG	61	diese Arbeit
A1D12_for	CCGAAGTTATGGTTTGTGGAG	57,9	diese Arbeit
A1D12_rev	ACGGATGTTTGTGGATTACTACC	58,9	diese Arbeit
B2A5_for	GTTGATCCTGACACGAAGAATAAA	57,6	diese Arbeit
B2A5_rev	TGCGATGAGAAAACTAACAGATGA	55,9	diese Arbeit
CDS IIA Oligo	$AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT_{(30)}N_{-1}N$ (N=A,G,C odet T; N-1=A,G oder C)		Clontech, Heidelberg
CU-ATPase for	CGAGCCGGGAAGCATAAAGTGT	59,8	diese Arbeit
CU-ATPase rev	CGAGCGCAGCGAGTCAG	60	diese Arbeit
GiAM for	GCTCTGGTGCCGAAAGCTT	58,8	Alkan et al., 2004
GiAM rev	TAACCCGTTCTAACCTATTGACCAT	59,7	Alkan et al., 2004
GiGAPDH for	GACGTCTCAGTTGTTGATTTA	54	Wulf et al., 2003
GiGAPDH rev	TTTGGCATCAAAAATACTAGA	50,1	Wulf et al., 2003
GiGST1 for	CTTCTTATTACACTCAACATTTAG	54,2	Waschke et al., 2006
GiGST1 rev	TTACAGCTTATAAAATAGAGTAT	50	Waschke et al., 2006
GiGST2 for	TTGGTTGGGCAATTAATTTTCGC	57,1	Waschke et al., 2006
GiGST2 rev	AAGCATACTATTTATCACAATG	50,9	Waschke et al., 2006
GiGST3 for	TTCCACCTCTATTTAAATTGCTTAC	56,4	Waschke et al., 2006
GiGST3 rev	TTACAAAGAATAAGCTACTTATC	51,7	Waschke et al., 2006
GiGST4 for	CTCTTATTATAGTCCACATTTAAG	54,2	Waschke et al., 2006
GiGST4 rev	GCAATTGCTTACACAGTATAATC	55,3	Waschke et al., 2006
GiGST5 for	TCTCTAATTAAACTACTTGCG	52	Waschke et al., 2006
GiGST5 rev	ACCATCCAACCGTTATTATTG	54	Waschke et al., 2006
GiGST6 for	TGGTCGCGGCCGAGGTACTTCCC	69,6	Waschke et al., 2006
GiGlySyn for	ATATGATTTCCTTTGGATGAAGAA	54,2	diese Arbeit
GiGlySyn rev	TTACCGTATAAATTCCTCCAACTT	55,9	diese Arbeit
GiICL for	TGCTACTCTTCTCACATCTAACATCGA	61,9	Lammers et al., 2001
GiICL rev	CAAGAGGGCGAAGGTTAGGA	59,4	Lammers et al., 2001
GiMAELO for	GTTCTTCGTATACTTTTGTTCTTA	54,2	diese Arbeit
GiMAELO rev	AATAGCAGCACTTTCACTTC	53,2	diese Arbeit
GiMAT2 for	ATAGGCCAGCTTCACCACC	58,8	diese Arbeit
GiMAT2 rev	ATTCAATCCCTGCTGGTGCTGC	60,3	diese Arbeit
GiMS for	TTGGTTGTGTACCAATCCATAATCTT	58,5	Lammers et al., 2001
GiMS rev	CCATTGCCATAATTGTGAACGT	56,5	Lammers et al., 2001

GiPEPCK for	GACTACGCTCTCCGCTGAT	58,8	diese Arbeit
GiPEPCK rev	ACTCGATTGGGTAGGCACAT	57,3	diese Arbeit
GiPT for	CTGCTGTTGATTATTGTTGGC	55,9	Maldonado-Mendoza et al., 2001
GiPT rev	GAACGGTTCCCATAATAGTG	55,3	Maldonado-Mendoza et al., 2001
GiPT2 for	TTCAAGTGGCTCGCAGATTAG	57,9	diese Arbeit
GiPT2 for2	GGGAAAGAATGATCTAACCGCTC	60,6	diese Arbeit
GiPT2 rev	ATGACAACTCCTATCAAGGTTTG	57,1	diese Arbeit
GiTEF for	AGTGCGGTGGTATTGACAAACG	60,3	Arlt, 2003
GiTEF rev	GCACAATCGGCCTGAGAAGTAC	62,1	Arlt, 2003
GST 8 for	ACCGAGCTGCAATTGTTCAC	57,3	diese Arbeit
GST 8 rev	CCGCAAGAAGGCTCTCAT	56	diese Arbeit
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	61	White et al., 1990
ITS4	CTCCGCTTATTGATATGCT	52,4	White et al., 1990
LR 1	GCATATCAATAAGCGGAGGA	55,3	van Tuinen et al., 1998
M13 for	GTAAAACGACGGCCAG	51,7	Invitrogen
M13 rev	CAGGAAACAGCTATGAC	50,4	Invitrogen
MtBC for	GTCATGTTATTCAAATAAGAGTTTGC	56,9	Grunwald, 2004
MtBC rev	CTAGGTAGACTTTCAATATAATAGCC	58,5	Grunwald, 2004
Mtha1 for	TGGAACGAAGAAACAAGG	51,4	Grunwald, 2004
Mtha1 rev	ATTAGCAGAACAAGGAGG	51,4	Grunwald, 2004
Mtha1for.ol	CAAGGATTTGGTTGTACTAATG	54,7	Krajinski et al, 2002
Mtha1rev.ol	CAGGTACTTCCTGTCTAGGA	57,3	Krajinski et al., 2002
Mtha2 for	TGCTGATGCCGTTGTTTTGATG	58,4	Krajinski et al., 2002
Mtha2 rev	CTTCTTGGTATGCTACAG	51,4	Krajinski et al., 2002
Mtha3 for	GAAGGATTATGTCATCCTTCTT	54,7	Krajinski et al., 2002
Mtha3 rev	CAGGTATTTCCTGTCTAGCA	55,3	Krajinski et al., 2002
MtPT4 for	AATTTGATAGGATTCTTTTGC	50,1	Harrison, 2002
MtPT4 rev	TTCACATCTTCTCAGTTCTTG	54	Harrison, 2002
MtTEF for	TGAGGATCCGAACGAGTAACAAC	60,6	diese Arbeit
MtTEF rev	CAACCTTCTTCAAGTAGGATGGA	58,9	diese Arbeit
NDL 22	TGGTCCGTGTTTCAAGACG	56,7	van Tuinen et al., 1998
NS 1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	52,4	White et al., 1990
NS 4	CTTCCGTCAATTCCTTTAAG	53,2	White et al., 1990
PeaGAPDH for	GACAGTGTTCACGGACAGTGG	61,8	Lapopin, 1999
PeaGAPDH rev	TCAACAGTCTTCTGGGTGGCG	61,8	Lapopin, 1999
RIO-Kinase for	CAAGTTACGGGAGGGTTATG	57,3	diese Arbeit
RIO-Kinase rev	TCACGCAGAAAATCAAGAGC	55,3	diese Arbeit
SMART IIA	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	60,6	Clontech

3.6.2 Extraktion von Nukleinsäuren

3.6.2.1 Isolierung von RNA

Zur Isolierung der RNA aus Wurzelproben wurden diese in einem Mörser mit einem Pistill unter der Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Gekeimte Sporen und extraradikuläres Myzel wurde direkt in sterile Reaktionsgefäße mit 40 µl RLT-Puffer

(Qiagen) mit 1% β-Mercaptoethanol überführt und mit einem Pistill aus Glas zerstoßen. Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Plant Kits von Qiagen nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die Behandlung mit der DNase (Qiagen) fand direkt auf der Säule gemäß dem Protokoll des Herstellers statt. Die RNA wurde in einem Volumen zwischen 40 und 75 µl DEPC-behandeltes H_2O von der Säule eluiert. Ein Abbau durch RNasen sollte durch die Zugabe von 1/10 Volumen RNasin 40 U/µl (Promega, Mannheim) verhindert werden.
Die Qualität der RNA konnte durch RNA 6000 LabChip® (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) ermittelt werden. Konnte der LabChip® nicht verwendet werden, wurde die Konzentration der RNA photometrisch über die Extinktion bei 260 nm bestimmt (E_{260}=1 entspricht 40 µg ssRNA/ml). Die Qualität der RNA wurde bei hohen Konzentrationen mittels Gelektrophorese überprüft (siehe 3.6.5.2).

3.6.2.2 Isolierung von genomischer DNA

Myzel von *G. intraradices* wurde von *M. truncatula* Wurzelkulturplatten gewonnen. Der Bereich der Platte mit extraradikulärem Myzel und Sporen wurde in ein steriles Becherglas überführt und zur Auflösung des Phytagels mit drei Volumen Citratpuffer überschichtet. Anschließend wurde das pilzliche Material über einen sterilen Filter (Schleicher und Schuell, 589^3, ∅ 150 mm, Porengröße 2 µm) von der Flüssigkeit getrennt. Das Myzel wurde anschließend in einem Mörser mit Pistill und durch die Zugabe flüssigem Stickstoff zerkleinert. Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit von Qiagen, nach den Angaben des Herstellers.

3.6.3 Gelelektrophorese

3.6.3.1 Auftrennung von DNA

DNA- und RNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld zur Anode. In Abhängigkeit von der zu erwartenden Größe der DNA-Fragmente erfolgte deren Auftrennung in 0,5 x TAE bei einer Spannung von 100 V (Sambrook et al., 1989) in 1 bis 2%-igen Agarosegelen bis zur gewünschten Auftrennung. Vor dem Auftrennen wurden die Proben mit 1/6 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt. Zur Längenbestimmung der Nukleinsäure-Fragmente wurden parallel DNA Größenstandards (1 kb-Leiter, 100 bp-Leiter oder 50 bp-Leiter, der Firmen Invitrogen, Karlsruhe oder peqLab, Erlangen) auf das Agarosegel aufgetragen.

Zum Anfärben der DNA wurden die Agarosegele für ca. 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gelegt und anschließend unter UV-Licht mit dem Gelbildaufnahme System von Biostep (ArgusX1®, Biostep, Jahnsdorf) und mit dem Videoprinter SEIKO Precision DVP-1200 (Seiko Precision, Hamburg) dokumentiert. Eine weitere Bearbeitung der Gelbilder erfolgte nach Bedarf mit Photoline 32 (Computerinsel GmbH, Bad Gögging) oder mit Photoshop (Microsoft, ORT, USA).

3.6.3.2 Auftrennung von RNA

Für ein denaturiendes Agarosegel zur Auftrennung von RNA wurden 0,36 g Agarose mit 21 ml dH_2O in einem 50 ml Erlenmeyerkolben aufgekocht. Nach dem Abkühlen auf 40°C wurden 6 ml Formamid und 3 ml 10x MOPS hinzugefügt und das Gel gegossen. 2 µl RNA wurden zusammen mit 2 µl RNA-Probenpuffer und 1 µl Ladepuffer (50 µl 6x DNA-Probenpuffer + 0,5 µl Ethidiumbromid) für 15 min bei 65°C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gestellt. Als Größenstandard diente die peqGOLD High Range RNA-Leiter (peqLab, Erlangen), die genauso wie die Proben behandelt wurde. Die Proben und der Größenstandard wurden vollständig auf das Gel aufgetragen und in 1x MOPS bei 50 V für eine Stunde aufgetrennt. Die Dokumentation der RNA und weitere Bearbeitung der Bilder erfolgte wie bei der Auftrennung von DNA und im vorherigen Abschnitt beschrieben ist.

3.6.3.3 cDNA-Synthese

Für weitere Untersuchungen der RNA, wie z.B. mit Hilfe der RT-PCR, wurde diese in komplementäre DNA (cDNA) mittels reverser Transkription umgeschrieben. Die Synthese erfolgte mit zwei Methoden. Zur Verwendung der cDNA in der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung und bei geringen RNA Mengen als ≤ 1 µg wurde die RNA mit dem Super SMART System von BD Clontech (Heidelberg) in cDNA umgeschrieben, da mit der Synthese des Zweitstranges gleichzeitig eine Vervielfältigung der cDNA-Moleküle stattfindet. Als Ausgangsmaterial dienten 200 bis 1000 ng RNA in einem Volumen von maximal 50 µl. Die Synthese der cDNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Bei höheren RNA Mengen (≥ 4000 ng) erfolgte die cDNA-Synthese mit Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) reversen Transkriptase (Promega, Mannheim). Hierfür wurden 4 µg Gesamt-RNA auf ein Volumen von 11 µl in einem Konzentrator (Eppendorf, Hamburg) einrotiert und zusammen mit 2 µg Oligo-dT Oligonukleotid bei 70°C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Probe sofort auf Eis abgekühlt. In

jede Reaktion wurden folgende Komponenten hinzugefügt: 5 µl 5x M-MLV-Puffer (Promega), 1,25 ml 10 mM dNTP's, 0,7 µl RNasin 40 U/µl (Promega), 2,05 µl DEPC-behandeltes dH_2O und 200 U M-MLV Reverse Transkriptase. Nach vorsichtigem Mischen wurde die Reaktion bei 42°C für eine Stunde inkubiert. Die Analyse der Synthese erfolgte über die Auftrennung auf einem 1,2%-igen Agarosegel.

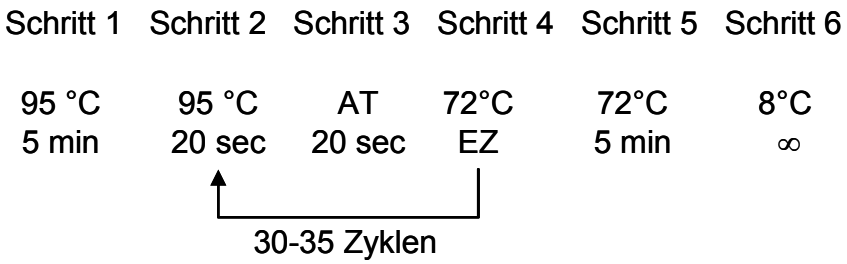
3.6.3.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktionen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, nach einem Standardprotokoll (siehe Tabelle 3-7) in einem Volumen von 20 µl.

Tabelle 3-7: Reaktionsansatz der PCR.

Komponente	**Endkonzentration**
Puffer (bereitgestellt durch den Hersteller):	
Tris-HCl (pH 8,8)	10 mM
KCl	50 mM
Tween 20	0,01 %
$MgCl_2$	1,5 mM
dNTP's	0,2 mM
Oligonukleotid forward	0,5 µM
Oligonukleotid reverse	0,5 µM
DNA-Vorlage:	
genomische DNA	30 – 300 ng
cDNA	10 – 100 ng
Plasmid-DNA	1 pg – 10 ng
Taq-Polymerase (peqLab, Erlangen)	0,5 U/20 µl

Die PCR wurde im Trioblock Biometra, im MWG Biotech Primus Thermal Cycler (MWG, Ebersberg) oder im PE Applied Systems Gene Amp® PCR System (Applied Biosystems, Weiterstadt) nach folgendem Protokoll durchgeführt:



Die Anlagerungstemperatur (AT) richtet sich nach dem Schmelzpunkt der Oligonukleotide, welche in Tabelle 6 angeben sind. In Abhängigkeit der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes wurde die Elongationszeit (EZ) mit 1 kb/min gewählt.

3.6.4 Suppressive Subtraktive Hybridisierung

Die Methode der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) ermöglicht es, differentiell exprimierte Gene aus einer RNA-Population, nach der Hybridisierung mit einer anderen RNA-Population, anzureichern (siehe Abb. 3-3).

Die SSH wurde nach dem Protokoll des Clontech PCR-Select™ cDNA Substraction Kit (Clontech) mit folgenden Änderungen erstellt. Durch die geringen Ausbeuten an RNA wurde die Synthese der cDNA mit dem Super SMART System von BD Clontech durchgeführt (siehe auch 3.6.4). Für alle Reinigungsschritte wurde der PCR Purification Kit von Qiagen verwendet. Um die Konzentration an mit *Rsa*I geschnittener cDNA zu erhöhen, wurden mehrere Ansätze parallel durchgeführt und diese nach der Fällung zusammengeführt.

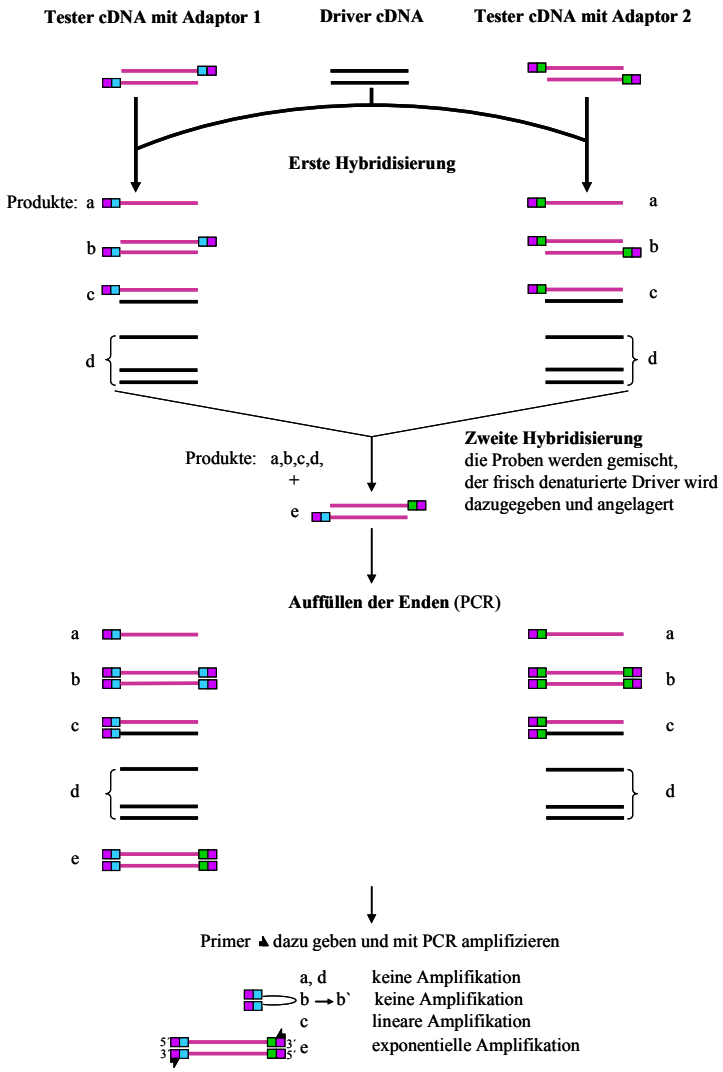


Abbildung 3-3: Schematische Darstellung der SSH (nach dem Clontech PCR-Select ™ cDNA Substraction Kit User Manual, BD Clontech, Heidelberg). Dargestellt sind die subtraktiven Schritte SSH und deren möglichen Produkte.

Im Anschluß an die zweite Amplifizierung wurde der gesamte Ansatz in den pGEM®-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) kloniert (siehe auch 3.6.8). Die resultierende cDNA Bank wurde als Glyzerin-Stock in der Glyzerinlösung oder im Hogness-Freeze-Medium konserviert und die enthaltenden Genfragmente hinsichtlich ihrer differentiellen Expression weiter untersucht (siehe Abschnitt 3.6.10).

3.6.5 Klonieren von DNA-Fragmenten

PCR-Fragmente wurden für weitere Analysen nach der letzen Elongationszeit von 5 min in den pGEM®-T Easy Vektor (Promega, Mannheim) nach den Angaben des Herstellers kloniert, wobei die Ligation bei 4°C üN erfolgte. Bei spezifischen PCR-Produkten konnte der Reaktionsansatz direkt für die Klonierung verwendet werden. Bei einem Nachweis von mehreren PCR-Produkten wurde das Fragment der zu

erwartenden Größe aus dem Agarosegel mit dem Skalpell ausgeschnitten. Die DNA wurde aus der Agarose mit dem QIAGEN Gel Extraktion Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert und in die Ligation eingesetzt.

Für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* DH5α-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe) wurden 5 µl des Ligations-Ansatzes mit 50 µl Zellen für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgten ein Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden, Abkühlen auf Eis für 2 min, die Zugabe von 450 µl SOC und eine einstündige schüttelnde Inkubation bei 37°C. Von diesen Zellen wurden 50 bis 250 µl auf LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten ausplattiert und üN bei 37°C inkubiert. Die Selektion der positiven Klone erfolgte über das Blau/Weiß Screening des Systems.

3.6.6 Plasmidpräparation

Die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook et al., 1989). Die Zellen wurden in 3 ml LB mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht schüttelnd bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 8000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl Lysis Puffer 1 und 4 µl RNase A (10 mg/ml) resuspendiert und für 5 min bei RT inkubiert. Nach der aufeinander folgenden Zugabe von 200 µl Lysis-Puffer 2 und 3 wurde der Überstand für je 5 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 13000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von 800 µl 96% Ethanol absolut und 40 µl 3 M Natrium-Acetat (pH 5) für 30 min bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 min und Waschen mit 80% Ethanol absolut wurde die Plasmid-DNA an der Luft getrocknet und in 40 bis 80 µl dH_2O gelöst und bei -20°C gelagert.

Sollte die Plasmid-DNA zur Sequenzierung am Julius-von-Sachs-Institut in Würzburg verwendet werden, wurden diese mit dem E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit von peqLab (Erlangen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

3.6.7 Analyse der Plasmid-DNA

Die weiteren Analysen der DNA-Fragmente erfolgten nach der photometrischen Konzentrationsbestimmung im Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Hamburg), wobei eine Extinktion bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 50 mg/ml entspricht. Die Messungen wurden in 2 mM Na_2HPO_4-Puffer durchgeführt. Mittels einer PCR mit

den M13-Oligonukleotiden wurde die Größe des klonierten PCR-Fragmentes überprüft. Für weitere Analysen wurden 3 bis 10 µg Plasmid-DNA mit einem Restriktionsenzym und dem entsprechenden Puffer nach den Angaben des Herstellers in einem Volumen von 25 µl bei der entsprechenden Temperatur für ca. ein bis zwei Stunden oder über Nacht verdaut.

Das klonierte DNA-Fragment wurde von der MWG-Biotech AG (Ebersberg) oder am Julius-von-Sachs-Insitut (Würzburg) sequenziert, anschließend die Sequenz in Edit-Sequenz (GATC, Konstanz) bearbeitet und eine Homologiesuche über BlastX, BlastN (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) (Altschul et al., 1997) und parallel ein Vergleich mit dem TIGR „*Medicago* Gene Index“ (MtGI) (http://tigrblast.tigr.org/tgi/) durchgeführt.

3.6.8 Reverse Northern Blot Hybridisierungen

Zur Überprüfung der SSH-Banken wurden im Anschluss reverse Northern Blot Hybridisierungen durchgeführt, um Klone von differentiell exprimierten Genen zu ermitteln.

Der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim) in die cDNA-Sonden erfolgte wie bei der Synthese der dscDNA (siehe Abschnitt 3.6.6) ausgehend von 1 bis 4 µl sscDNA (abhängig von der Menge der eingesetzten RNA nach dem Protokoll des Herstellers). Anstelle der 10 mM dNTP Lösung wurde folgende Lösung verwendet: 2 mM dATP, 2 mM dGTP, 2 mM dCTP, 1,9 mM dTTP und 0,1 mM DIG-11-dUTP. Die Zyklenanzahl betrug zwischen 18 und 24. Nach der Synthese wurde die Sonde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) von nicht eingebauten dNTP’s und Oligonukleotiden gereinigt. Die Konzentrationen der mit DIG-11-dUTP markierten cDNA’s wurden photometrisch bestimmt und 1 µg in 25 ml Hybridisierungs-Lösung aufgenommen.

Die Synthese von spezifischen Sonden erfolgte nach dem Standard-Protokoll für die PCR. Anstelle der 2 mM dNTP Lösung wurde die oben beschriebene dNTP-Lösung verwendet. Die Analyse der Synthese erfolgte über Gelektrophorese, wobei das Fragment durch das Digoxigenin größer ist. Das markierte PCR-Produkt wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereingt. Für die Hybridisierung wurden 15 µl des Produkts in 25 ml Hybridisierungs-Lösung aufgenommen.

Die Gen-Fragmente der Klone wurden mit den M13 Oligonukleotiden in einem Volumen von 50 µl amplifiziert und auf 1,5%-ige Agarosegelen aufgetrennt. Die Gele

wurden nach Färben und Dokumentation 2x 15 min in Denaturierungs-Lösung und 2x 15 min in Neutralisierungs-Lösung inkubiert. Die Übertragung der DNA auf die Membran erfolgte durch einen Kappilartransfer (Sambrook et al., 1989).
Erfolgte der Transfer auf die Membran über Slot-Blot wurden 10 µl der PCR-Produkte, nach der Kontrolle über ein Agarosegel, in 200 µl 20 SSC aufgenommen und mit Hilfe des Bio-Dot®-SF auf die Membran aufgebracht.
Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker, Hoefer, San Fransisco, USA) kovalent an die Membran gebunden. Die Membranen konnten bei 4°C gelagert werden oder direkt für eine Stunde in Hybridisierungs-Lösung bei 65 bis 69°C prähybridisiert werden.
Die Hybridisierung der Membranen mit den cDNA-Sonden erfolgte über Nacht bei 65 bis 69°C im Hybridisierungsofen (Bio-Rad, München). Die weitere Behandlung der Membranen richtete sich nach dem DIG Application Manual von Roche (Mannheim), wobei der zweite Waschschritt mit 0,5x oder 0,1x Waschlösung durchgeführt wurde. Die chemilumineszenten Signale wurden auf Autoradiographiefilmen sichtbar gemacht.

3.6.9 Quantitative Real-Time-PCR

Die Quantifizierung der Genexpression der *G. intraradices* und *M. truncatula* Genen erfolgte mit dem QuantiTect™ SYBR® Green PCR Kit (Qiagen, Hilden) oder dem iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München). In einem Reaktionsvolumen von 25 ml wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 3-8: Zusammensetzung der quantitativen Real-Time-PCR.

Komponente	**Volumen**
iQ SYBR Green SuperMix (Bio-Rad) oder 2x QuantiTect™ SYBR® Green Master Mix (Qiagen)	12,5 µl
Oligonukleotid forward	1,5 µl (10 mM)
Oligonukleotid reverse	1,5 µl (10 mM)
dH_2O	7,5 µl
cDNA Vorlage	2 µl

Parallel zu der zu untersuchenden cDNA wird bei jeder quantitativen Real-Time-PCR ein Standard von 10^8 bis 10^1 Molekülen/µl des jeweiligen Genfragmentes eingesetzt,

worauf die Berechnungen für die Kopienzahl beruhen. Hierfür wurden die Genfragmente zuvor in einem PCR-Ansatz von 100 µl amplifiziert, mit dem Qiagen PCR-Purification Kit, nach den Angaben des Herstellers, aufgereinigt und die Konzentration photometrisch ermittelt. Im Anschluss wurde die Kopienzahl durch die Umrechnung von µg/ml in pmol/µl mit dem Ambion RNA and DNA Concentration Converter (http://www.ambion.com/techlib/append/concentration_calculator.html) und mit Hilfe der Avogadro-Zahl errechnet und die entsprechenden Verdünnungen für die PCR erstellt.

Für die Bestimmung der Kopienzahl in den jeweiligen cDNA's wurden parallel 3 verschiedene Verdünnungen, mit mindestens 2 Wiederholungen, untersucht. Die Detektion der amplifizierten Fragmente und die Aufnahme einer Schmelzkurve erfolgte mit dem iCycler iQ-System Vers. 2.1.A von Bio-Rad (München) nach folgendem Protokoll:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6	Schritt 7
95°C	95°C	AT	72°C	72°C	55-97°C	4°C
15'	30''	30''	30''-45''	10'	10''	∞
	↑		↓		+0,5°C/Zyklus	
	35-45x				85x	

Die Daten wurden als PCR Base Line Substracted CF RFU (relative flourescence units) pro Zyklus für die Amplifizierung und in -d(RFU)/dT für die Schmelzkurve ausgegeben. Durch das Programm iCycler iQ-System Vers. 2.1.A von Bio-Rad (München) wurden die Kopienzahlen automatisch berechnet.

3.7 pH Messungen während der Keimung von *Gigaspora rosea*

Für Ermittlung der Änderung des pH-Wertes durch die Keimung von arbuskulären Mykorrhiza Pilzen wurde dem verwendeten M-Medium 0,005% oder 0,001% Bromkresolgrün oder Bromkresolpurpur als pH-Indikator zugesetzt. Bromkresolgrün schlägt von gelb bei einem pH von 3,8 nach blau bei einem pH von 5,4 um, während Bromkresolpurpur von 5,2 bis 6,8 von gelb nach blauviolett seine Farbe verändert. In das 100 µl Medium wurden jeweils zehn *G. rosea* Sporen unter der Sterilbank pipettiert und bei 28°C und 2% CO_2 inkubiert. Zusätzlich zu den Indikatoren wurde

der pH mit einer Mikro pH-Elektrode (Orion 98-03, Thermo Electron Corporation, Witchford, Cambridgehire, England) ermittelt.

3.8 Statistische Analysen

Die weiteren statistischen Analysen der quantitativen Real-Time-PCR erfolgten mit dem Programm MS Excel XP (Microsoft, Redmond, USA) und mit Statistica 6.0 (StatSoft, Inc. [2004]. Statistica für Windows [Software-System für Datenanalyse] Version 6, Tulsa, OK, USA). Zur Normalisierung der absoluten Kopienzahlen der zu untersuchenden Gene wurde der Mittelwert des entsprechenden Translation Elongationsfaktors EF1 α verwendet. Die statistische Berechnung erfolgte mit dem nicht parametrischen Verfahren für zwei unabhängige Stichproben (Gruppen), dem Mann-Whitney-U-Test.

3.9 Molekularphylogenetische Analysen

Die zu untersuchenden Sequenzen (eigene und aus der Literatur), wurden wenn nötig zunächst mit EditSequenz 5.07 (DNA-Star, Madison, WI, USA) bearbeitet. Der anschließende Sequenzvergleich wurde mit ClustalW vom European Bioinformatics Insitute (www.ebi.ac.uk) durchgeführt. Nach Überarbeitung der Ergebnisse mit dem Programm Genedoc (Verstion 2.6; Nicholas et al., 1997) wurden sie einer phylogenetischen Analyse mit dem Programm PUZZLE (Version 5.2; Strimmer und von Haeseler, 1996) unterzogen. Die Resultate dienten zur Konstruktion eines Stammbaumes mit Hilfe des Programms TREEVIEW (Version 1.1.6; Page, 2001).

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung von Transkripten während der asymbiotischen Entwicklungsphase von *Glomus intraradices*

Der Lebenszyklus eines arbuskulären Mykorrhizapilzes beginnt mit der asymbiotischen Keimung der Sporen, die auf der Basis des genetischen Programms durch abiotische Faktoren, wie z.B. Temperatur oder pH-Wert, gesteuert wird (Giovannetti, 2000, Franken et al. 2002). In dieser Phase exprimierte Gene werden somit unabhängig von der Pflanze reguliert. Über die Erstellung von cDNA-Banken konnten unter anderem Gene, die für Proteine des Cytoskeletts kodieren, aus keimenden Sporen identifiziert werden (Lammers et al., 2001, Jun et al., 2002). Zur weiteren Vervollständigung sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere *„expressed sequence tags“* (EST's) aus dem Modellmykorrhizapilz *Glomus intraradices* identifiziert werden.

Für die Erstellung einer cDNA-Bank aus keimenden *G. intraradices* Sporen wurde der Ansatz der Suppressiven Subtraktiven Hybridisierung (SSH) gewählt. Hierbei dienten 18S und 28S rDNA-Fragmente der Subtraktion, um die cDNA-Bank mit Genen, die für Proteine kodieren, anzureichern.

Aus Wurzelkulturplatten von *Medicago truncatula* wurden 8814 Sporen von *G. intraradices* isoliert und in Petrischalen mit sterilem Wasser überführt. Nach vier Tagen setzte die Keimung der Sporen ein, und nach weiteren vier Tagen wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Für die Subtraktion wurde das 18S rDNA-Fragment mit den NS1 und NS4 (White et al., 1990) Oligonukleotiden, sowie das 28S rDNA-Fragment mit den NDL22 und LR1 (Van Tuinen et al., 1998) aus cDNA von extraradikulärem Myzel (s. 4.2.1) amplifiziert. Für die Hybridisierung dienten 66 ng der cDNA von den gekeimten *G. intraradices* Sporen und jeweils 65 ng der beiden amplifizierten rDNA-Fragmente. Im Anschluss an die Amplifikation und Klonierung der PCR-Produkte wurden insgesamt 1920 Klone zur weiteren Analyse in Mikrotiterplatten gesammelt. Eine Kontrolle der Subtraktion erfolgte durch eine Southern Blot Hybridisierung von 24 klonierten Genfragmenten mit spezifischen Sonden für die rDNA-Fragmente. Die Detektion ergab, dass die Sonden an keines der untersuchten Genfragmente binden konnten und somit die cDNA-Bank weitgehend frei von Klonen mit rDNA-Fragmenten war. Die Sequenzierung erfolgte

daraufhin in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Genetik an der Universität Bielefeld im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms SPP 1084 (s. Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1 (diese und nächste Seite): Ergebnisse der Sequenzierung von klonierten Genfragmenten aus der asymbiotischen Phase von *Glomus intraradices*. RNA wurde nach acht Tagen aus keimenden *G. intraradices* Sporen isoliert, in cDNA umgeschrieben und SSH mit 18S und 28S rDNA-Fragmenten unterzogen. Die erhaltenden Genfragmente wurden kloniert und 1920 Klone im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms MolMyk sequenziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Annotierung mit dem BlastX-Algorithmus, die in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt wurden. In Klammern ist die Anzahl an Klonen mit identischen Genfragmenten angegeben.

Cytoskelett:

- Aktin I
- Aktin II
- Aktinähnliches Protein
- β-Aktin
- α-Tubulin (43x)
- β-Tubulin (2x)
- Kinesin
- Dynein

Zellkern:

- Histon 4.5
- Zellkerntransportfaktor Nft2p
- Rad23
- Ran-Protein
- Wos2
- Pirin

Transkription:

- ATP-abhängige-RNA-Helikase
- *Capping*-Protein
- Poly(A)-Polymerase
- Transkriptionsrepressor
- Cruciformes-DNA-bindendes-Protein
- DEAD-Box-Protein
- Exosom Komponente 10 (Isoform)
- Spleiß-Faktor 3B UE5-ähnliches Protein
- Spleiß-Faktor U2
- rRNA-kodierte-Endonuklease (2x)

Chaperone

- Hsp20
- Hsp70 (4x)
- Hsp83
- Hsp90 (2x)
- T-Komplex-1 eta-UE

Biosynthese der Aminosäuren:

- Glutamin-Synthetase
- Keto-Acid-Reduktoisomerase (2x)
- L-Ornithin-Aminotransferase

Proteinbiosynthese:

- 60 S ribosomales Protein (2x)
- ribosomales Protein P2
- 20 S ribosomales Protein
- S-Phase spezifisches ribosomales Protein
- L5 ribosomale UE
- 40 S ribosomales Protein
- ribosomales Protein S 12
- ribosomal ähnliches Protein
- Poly(A)-Bindendes-Protein (Pab1)
- Translations-Initiaionsfaktor eIF4A
- Translations-Initiationsregulator (Gcn20)
- Translations-Elongationsfaktor 1 delta

Proteinmodifikation

- β-1,4-Mannosyl-Transferase
- N-Acetyl-Transferase
- prozessierende Peptidase (mitochondrielle)
- N-Myrositol-Transferase
- Tyranosyl-t-RNA-Synthetase

Proteinabbau

- 20S Proteasom-UE (2x)
- 26S Protease Regulatorische UE
- Alkalische Serinprotease PenC2
- Endodpeptidase (9x)
- Ubiquitin-konjugierendes-Enzym (5x)
- Ubiquitin-C-Terminus-Esterase L3
- Ubiquitin-C-Terminus-Hydrolase L3
- Ubiquitin-Vorläufer
- Carboxypeptidase
- RING-Box-Protein

Signaltransduktion:

- Casein-Kinase I
- Casein-Kinase II
- Calmodulin
- MAP-Kinase-Phosphatase
- Proteinkinase C1
- Proteinphosphatase Typ2A

Lipid-Metabolismus:

- Acetyl-CoA-Acyltransferase
- Delta-9-Fettsäure-Desaturase
- Fettsäure-Oxygenase PpoC (2x)
- FOX2 (β-Oxidataion)
- Linoleatdiol-Synthase
- Malonyl-CoA-Decarboxylase

Membran-Proteine:

- Membran-Protein (2x)
- Plasmamembran-Protein
- Adhesion-regulierendes-Protein
- Transmembran-Protein
- Lamininbindendes Protein
- Polyposis-Locus-Protein 1 (2x)
- Orm1 Protein
- Golgi-Membran-Protein (Rer1)
- Rab11-1b Protein (12x)
- Prohibitin
- Vakuolen-Protein-Einsortierendes-Protein
- NADH-Dehydrogenase
- Phosphat-Transporter
- Transporter

Stressantwort:

- Glutathion-Transferase (4x)
- Glutathion-Transferase 22 (11x)
- Glutathion-Transferase II Homolog
- Glutathion-Transferase verwandtes Protein
- Cu-abhängige Dismutase
- Superoxid-Dismutase 2 (Mitochondrien)
- Alkylhydroxid-Reduktase

Kohlenstoff-Metabolismus:

- Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (7x)
- Glyzerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
- Glykogen-Phosphorylase
- Fructosebisphosphat-Aldolase
- L-Malat-Dehydrogenase
- Transaldolase
- UDP-Glukose-Phosphorylase
- Alkohol-Dehydrogenase (4x)

Andere:

- Transposase
- Transposase für Tn10
- Transposase Resolvase (TnpX)
- Cytochrom P450 (3x)
- SAM-abhängige Methyltransferase
- Aldo/Keto Reduktase
- Oxidoreduktase (6x)
- FAD-abhängige-Oxidoreduktase
- Patatin
- Armadillo-Protein
- ATP-Synthase F1-β-UE
- 14-3-3 Protein
- Prophenoloxidase
- Thioredoxin (15x)
- Thioredoxin 2
- Glyoxaloxidase
- unbekannte Funktion (248x)
- keine Sequenzähnlichkeiten (487x)

Neben den schon bekannten Genen für Elemente des Cytoskeletts war bisher nur das für eine Glyoxaloxidase bereits in keimenden Sporen identifiziert (Lammers et al., 2001, Jun et al., 2002). Allerdings konnten einige Gene, wie z.B. für die Fettsäure-Desaturase und der 26S Protease, bereits im extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* (Sawaki und Saito, 2001) identifiziert werden. Des Weiteren war in *Glomus mosseae* bereits das Gen für FOX2 identifiziert und näher charakterisiert (Requena et al., 1999). Die Mehrzahl der cDNA-Fragmente gehörte jedoch zu Genen, die bisher noch nicht in AM-Pilzen identifiziert werden konnten.

4.2 Identifizierung von Transkripten während der symbiotischen Entwicklung des arbuskulären Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices*

Für ein besseres Verständnis der symbiotischen Lebensweise der arbuskulären Mykorrhizapilze ist es wichtig, mehr Informationen über die Genexpression im extraradikulären Myzel und insbesondere während der Besiedlung der Wurzel zu erhalten. Die Identifizierung von Genen, die während der symbiotischen Entwicklung von *G. intraradices* exprimiert werden, erfolgte ebenfalls über die Methode der SSH.

4.2.1 Extraradikuläres Myzel

Während der symbiotischen Entwicklung bilden die arbuskulären Mykorrhizapilze das extraradikuläre Myzel (ERM), worüber sie Nährstoffe aus dem Boden aufnehmen und zur Wurzel transportieren (Bago, 2000). Bereits im Jahre 1995 konnte ein *low affinity* Phosphat-Transporter aus *Glomus versiforme* identifiziert werden, der nur im ERM exprimiert wird (Harrison und van Buuren, 1995). Zur Identifizierung weiterer Gene, die im ERM stärker transkribiert werden, wurde von dieser cDNA-Population die cDNA-Population aus gekeimten Sporen subtrahiert. *Ri*-transformierte *M. truncatula* Wurzeln, mykorrhiziert mit *G. intraradices*, wurden auf einer Hälfte von geteilten Platten mit M-Medium kultiviert. Nach zwei Wochen erreichte das ERM das zweite Kompartiment und das feste M-Medium wurde durch flüssiges ohne Saccharose ersetzt. Nach weiteren fünf Wochen konnte das ERM von den Platten isoliert und die RNA extrahiert werden. Sterile *G. intraradices* Sporen wurden zur Keimung in flüssiges M-Medium ohne Saccharose überführt. Nach sieben Tagen hatten ca. 85% der Sporen gekeimt und die RNA wurde isoliert. Für die SSH wurde ein µg der jeweiligen RNA in cDNA umgeschrieben. Im Anschluss an die letzte PCR konnten 576 Klone erzeugt werden, wovon 298 weiter untersucht wurden. Von den klonierten Genfragmenten, an welche die Sonden bei den Reverse Northern Blot Experimenten hybridisierten, deuteten 35% auf eine differentielle Expression hin. Von diesen wurden zunächst 29 sequenziert und auf ihre wahrscheinliche Kodierung hin überprüft (s. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Ergebnisse der Sequenzierung, der im extraradikuläre Myzel von *Glomus intraradices* differentiell exprimierten Genfragmenten. RNA wurde nach sieben Wochen aus extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* isoliert, in cDNA umgeschrieben und einer SSH mit cDNA, die aus der RNA von einer Woche lang gekeimten Sporen synthetisiert wurde, unterzogen. Die erhaltenden Genfragmente wurden kloniert und Reverse Northern Hybridisierungen durchgeführt. Es wurden zunächst 29 der differentiell exprimierten Genfragmente sequenziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Annotierung mit dem BlastN-Algorithmus.

Genfragment GintSSH_eH-gs_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Signifikanz
PlatteA4_A4; PlatteA4_C1; PlatteA4_D6; PlatteA4_F1 PlatteA4_H11; PlatteN1_C7; PlatteN1_H12; PlatteN2_D5	382 342 440 354 310 337 356 310	large subunit ribosomal RNA gene (AY842575)	*Glomus intraradices* LSU1	$7e^{-169}$ $1e^{-169}$ $7e^{-172}$ $2e^{-162}$ $3e^{-173}$ $1e^{-176}$ 0 $1e^{-173}$
PlatteA4_B5; PlatteA4_E2; PlatteA4_F10; PlatteA4_G1; PlatteA4_H4; PlatteN1_C3; PlatteN2_G6	300 354 356 311 323 525 283	25S ribosomal RNA gene (AY970833)	*Glomus intraradices* Gint02	$4e^{-157}$ $6e^{-175}$ $1e^{-163}$ $1e^{-163}$ $5e^{-166}$ $8e^{-166}$ $6e^{-147}$
PlatteA4_B7; PlatteA4_C11; PlatteA4_E5; PlatteA4_G6; PlatteN2_C10	286 279 313 395 311	25S ribosomal RNA gene (AY970835)	*Glomus intraradices* Gint04	$7e^{-159}$ $6e^{-153}$ $6e^{-175}$ $9e^{-174}$ $1e^{-166}$
PlatteA4_C5; PlatteA4_H2; PlatteA4_H12; PlatteN1_A1; PlatteN2_E8	341 339 531 492 351	28S ribosomal RNA gene (AY373433)	*Glomus intraradices* LPA8	$2e^{-177}$ $6e^{-172}$ 0 0 0
PlatteA4_G3; PlatteA4_G12; PlatteA4_H1	409 211 336	large subunit ribosomal RNA gene (AY842577)	*Glomus intraradices* LSU3	$1e^{-173}$ $7e^{-112}$ $9e^{-174}$
PlatteA4_F6	526	18S ribosomal RNA gene (AF394778)	*Glomus intraradices* JJ29	0

Bei der Sequenzanalyse stellte sich heraus, dass alle 29 Genfragmente für rRNAs der großen und der kleinen Untereinheit kodierten. Um weitere rDNA-Fragmente auszuschließen, wurden die verbleibenden 76 isolierten Genfragmente mit spezifischen Sonden für die 18S und 25S rDNA hybridisiert. Die Auswertung ergab, dass nur sieben der Genfragmente nicht für rRNA kodierten. Diese wurden sequenziert und annotiert (s. Tabelle 4-3). Drei der Genfragmente wiesen Ähnlichkeiten mit pflanzlichen Genen auf und vier Genfragmenten konnte keine mögliche Funktion zugeordnet werden.

Tabelle 4-3: Ergebnisse der Sequenzierung der im extraradikulären Myzel von *Glomus intraradices* differentiell exprimierten Genfragmenten, nach deren Überprüfung auf rDNA-Kodierung. RNA wurde nach sieben Wochen aus extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* isoliert, in cDNA umgeschrieben und einer SSH mit cDNA, die aus der RNA von einer Woche lang gekeimten Sporen synthetisiert wurde, unterzogen. Die erhaltenden Genfragmente wurden kloniert und wurden nach Reverse Northern Hybridisierungen noch zusätzlich mit spezifischen rDNA Sonden hybridisiert. Nicht-rDNA-Fragmente wurden sequenziert und mit Hilfe des BlastN und BlastX Algorithmuses annotiert.

Genfragment GintSSH_eH-gs_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Signifikanz
PlatteA4_E12	372	Blast X: keine Sequenzähnlichkeiten		
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten		
PlatteA4_G4	494	BlastX: Histon H3 (AAB36495)	*Medicago sativa*	$3e^{-22}$
		BlastN: mth2-142a16 genomische DNA (AAC147000)	*Medicago truncatula*	0
PlatteA4_G5	484	BlastX: Histon H3 (AAB36495)	*Medicago sativa*	$2e^{-16}$
		BlastN: mth2-142a16 genomische DNA (AAC147000)	*Medicago truncatula*	0
PlatteA4_G11	138	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten		
		Blast N: genomische DNA (AP004917)	*Lotus japonicus*	$2e^{-6}$
PlatteN1_A5	193	Blast X: keine Sequenzähnlichkeiten		
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten		
PlatteN1_G7	197	Blast X: keine Sequenzähnlichkeiten		
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten		
PlatteN2_B9	441	Blast X: keine Sequenzähnlichkeiten		
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten		

Aus der vorangehend beschriebenen cDNA-Bank konnten nur 2,4% der Gene als Nicht-rDNA identifiziert werden. Um dieses in einem weiteren Ansatz zur Erstellung einer cDNA-Bank aus extraradikulärem Myzel zu vermeiden, wurde die gleiche Strategie der Subtraktion wie bei den gekeimten Sporen verfolgt. Hierfür wurden mit *G. intraradices* mykorrhizierte *M. truncatula* Wurzelkulturen auf geteilten Petrischalen inkubiert. Nach fünf Wochen wurde das Medium in dem anderen Kompartiment durch flüssiges M-Medium ohne Saccharose ausgetauscht und nach weiteren drei Wochen konnte das ERM isoliert und die RNA extrahiert werden. Für die Erstellung der SSH wurde ein µg RNA in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation des 18S und 26S rDNA-Fragmentes erfolgte mit den NS1 und NS4 (White et al., 1990) bzw. mit den NDL22 und LR1 (Van Tuinen et al., 1998) Oligonukleotiden. In der Subtraktion wurden 75 ng cDNA und jeweils 75 ng der rDNA-Fragmente eingesetzt. Nach der Amplifikation und Klonierung wurden zunächst wenige Genfragmente über die Hybridisierung mit spezifischen Sonden auf rDNA hin überprüft. Dabei stellt sich heraus, dass noch 80% der klonierten Genfragmente für rDNA zu kodieren scheinen. Daraufhin erfolgten zwei weitere Subtraktionen mit verschiedenen Konzentrationen

an rDNA-Fragmenten. Erst mit 400 ng je rDNA-Fragment konnte die Anzahl an klonierten Genfragmenten, die für rRNA kodieren auf ca. 10% gesenkt werden. Diese SSH wurde genutzt, um 1920 Klone zur weiteren Analyse in Mikrotiterplatten zu sammeln. Die Sequenzierung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Genetik and der Universität Bielefeld im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms SPP1084 (s. Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4 (dies und nächste Seite): Ergebnisse der Sequenzierung von klonierten Genfragmenten aus dem extraradikulärem Myzel von *Glomus intraradices*. RNA wurde nach acht Wochen aus extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* isoliert, in cDNA umgeschrieben und einer suppressiven subtraktiven Hybridisierung mit 18S und 28S rDNA-Fragmenten unterzogen. Die erhaltenden Genfragmente wurden kloniert und 1920 Klone im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms MolMyk sequenziert. Dargestellt sind die Ergebnisse der Annotierung mit dem BlastX-Algorithmus, die in verschiedene funktionelle Gruppen eingeteilt wurden. In Klammern ist die Anzahl an Klonen mit identischen Genfragmenten angegeben.

Cytoskelett:

- Aktin I
- Aktin II
- Aktin depolymersierender Faktor / Cofilin
- Aktin ähnliches Protein
- α-Tubulin
- β-Tubulin (2x)
- EB1-ähnliches Protein
- Profilin II

Zellkern:

- Histon 4.5
- Histon 2b (2x)
- Histon 4 (2x)
- *DNA-Alkylation repair enzyme*
- SNF-Helikase

Transkription:

- DEAD-Box-Protein
- Spleiß-Faktor 3B UE5-ähnliches Protein
- Spließsom assembly protein
- *leader binding protein 32*
- *K homology binding protein*
- N-Metabolismus regulierendes Protein

Biosynthese der Aminosäuren:

- Glutamin-Synthetase (22x)
- Keto-Acid-Reduktoisomerase (3x)
- Ornithin-Aminotransferase (2x)
- Methionin-Synthase II (2x)
- Aspartat/Tyrosin Aminotransferase
- Homocitrat-Synthase
- *Ornithine-oxo-acid-transaminase*
- Phenylalanin Hydroxylase

Zellzyklus

- Septin 3
- Cyctokinesis related protein – SepA
- Septin-Ring-Protein

Proteinbiosynthese:

- 60 S ribosomales Protein (17x)
- ribosomales Protein S2
- 30 S ribosomales Protein
- L18ae ribosomale UE
- 40 S ribosomales Protein (10x)
- ribosomales Protein L18E
- ribosomales Protein P0
- vermutetes ribosomales Protein
- Ribosomen-assoziiertes Protein
- Translations-Initiaionsfaktor
- Translations-Initiationsregulator (Gcn20)
- Translations-Elongationsfaktor 1 delta
- Translations-Elongationsfaktor 1 gamma

Proteinmodifikation

- prozessierende Peptidase (mitochondrielle)
- alkalische Serin Protease
- Endopeptidase (4x)
- hypothetische Peptidase (3x)
- Leucine Aminopeptidase (3x)
- Farnesyltransferase

Proteinabbau

- 26S Proteasome (3x)
- Polyubiquitin
- Ubiquitin-konjugierendes Enzym (5x)
- Ubiquitin (5x)
- Ubiquitin aktivierendes Enzym

Chaperone

Hsp70 (7x)
Hsp83
Hsp 82
Hsp90 (7x)
Hsp (2x)
T-Komplex-1 Epsilon-UE (2x)
Cyclophilin A (6x)
Cyclophilin B (2x)
Peptidy-Prolyl-cis/trans Isomerase

Stressantwort:

Glutathion-Transferase (8x)
66kD stress protein
Glyoxaloxidase (22x)
CuZn-Superoxid-Dismutase
Alkylhydroxid-Reduktase
ATP-abhängige Protease
Protein-Methionine-R-Oxid-Redukatase

Signaltransduktion:

MAP-Kinase
Mitogen activated protein (3x)
Protein-Kinase
Calcineurin A
Calcineurin B
COP9-Signalosom
Diacylglyzerin Kinase
Rab-dissoziations-Inhibitor
Ran GTPase Aktivator
Ran bindendes Protein
Rho GTP Dissoziations-Inhibitor
Rab11-1b Protein (4x)
GTPase; Rab-Familie
Ras-GTPase

Membran-Proteine I:

Polyposis-Locus-Protein 1 (2x)
Ammonium-Transporter
Aquaporin (11x)
water channel TMP-C (2x)
large conductance mechanosensitive channel
Membran-Protein (5x)
K^+/H^+ Antiporter
Kation/Protein Antiporter
Phosphat-Transporter (*Gi*PT1)
P-Typ Kation Transportin
ADP/ATP Carrier Protein
water channel
ATP bindende Kassette – ABC Transporter
P-Glykoprotein
Clathrin coated vesicle protein
Vakuolen-Protein-einsortierendes Protein
Transfer-Protein (2x)
YOP1 (4x)

Membran-Proteine II:

SEY1 (2x)
SLY41p
vH^+-ATPase (4x)
vacuolar transporter chaperon
vacuolar protein sorting protein (VspA)

Mitochondrielle Proteine

ATP-Synthase (6x)
genome maintaince protein mgm101
ribosomales Protein
mitochondriell kodiertes Protein
Phosphat-Transporter
Cyctochrom c oxidase
NADH-ubiquinon-Oxidoreduktase (2x)
NADPH oxidase isoform 2
voltage dependent ion selective channel

Kohlenstoff-Metabolismus:

Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (4x)
Glykogen-Phosphorylase (2x)
Fructosebisphosphat-Aldolase
L-Malat-Dehydrogenase
Transaldolase (8x)
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
neutrale Trehalase (4x)
Chitin-Synthase
Isocitrat-Lyase
Malat-Dehydrogenase
α-Ketogluterat-Dehydrogenase
Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
Xylanase
Carbonsäureanhydrase
Glutamin-Fru-6-P-Transaminase

Lipid-Metabolismus:

Acetyl-CoA-Acyltransferase
Delta-9-Fettsäure-Desaturase
Fettsäure-Oxygenase PpoC (2x)
FOX2 (β-Oxidataion) (4x)
long chain acyl-CoA Synthase
oxysterol bindendes Protein
Acyl-CoA Oxidase
short chain Dehydrogenase
short chain 3-hydroxyacyl CoA Dehydrogenase

Andere I:

Metalloproteinase - extrazellulär
Aldo/Keto Reduktase
Oxidoreduktase (3x)
Ring-Box-Protein
ATP-Synthase (5x)
3-oxo-5-alpha-steorid-4-Dehydrogenase
5-Aminolevulinat Synthase
Allergen (2x)
ATP-abhängige RNA-Helikase
Arylester Hydrolase
autophagy related protein
Cinnamate-4-Hydroxylase
Disulfidisomerase
Kynurenine-3-Monooxygenase
Ornithin-Transcarbamylase

Andere II:

PAS1
Phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (7x)
Phospholipase D
Prolin reiches Protein
Protein-bindendes Protein
Thioredoxin-ähnliches Protein
Quinoprotein
Serin Carboxypeptidase
Sterol-Metabolism related protein
Thioredoxin Peroxidase (2x)
YcaC related p-amidohydrolase (2x)
Zn-abhängige Metalloprotease (extrazellulär)
hypothetisches Protein (20x)
unbekannte Funktion (149x)
keine Sequenzähnlichkeiten (1005x)

Die Sequenzanalyse ergab, dass noch 20% der isolierten Genfragmente für rDNA kodierten. Weitere acht Fragmente konnten bereits in extraradikulärem Myzel identifiziert werden, z.B. für das DEAD-Box Protein, die Fettsäure-Desaturase, den Phosphat-Transporter (*Gi*PT1), der Ammonium-Transporter oder für ribosomale Proteine (Maldonado-Mendoza et al., 2001, López-Pedrosa et al., 2006, Sawaki, 2001). Aus *G. intraradices* wurde außerdem bereits die cDNA für eine Glutamin-Synthetase isoliert und deren Expressionsmuster identifiziert (Breuninger et al., 2004). In der asymbiotischen Entwicklung von *G. intraradices* konnten bereits vier der isolierten Genfragmente identifiziert werden, das für die Glutamin-6-Fru-P-Transaminase, der neutralen Trehalase, der Glyoxaloxidase und des Tubulins (Lammers et al., 2001, Jun et al., 2002). Die Mehrzahl der EST's wurde jedoch noch nicht in *G. intraradices* oder anderen AM-Pilzen identifiziert.

4.2.2 Intraradikuläres Myzel

Um gezielter Gene von *G. intraradices*, die im intraradikulären Myzel (IRM) exprimiert werden, zu identifizieren, wurde eine weitere cDNA-Bank erstellt. Mit den heutigen Methoden ist es jedoch nicht möglich, rein pilzliche RNA direkt aus intraradikulären Hyphen zu isolieren. Eine Anreicherung des IRM in den Wurzeln sollte durch die Zugabe von 400 mg Glukose (Douds, 2002) auf sieben Wochen alten Wurzelkulturen erreicht werden. Nach weiteren vier Wochen wurde die RNA aus verschiedenen mit *G. intraradices* mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln isoliert und jeweils ein µg RNA in cDNA umgeschrieben. Für die Identifizierung von Genen, die

von *G. intraradices* kodiert werden, sollte deren Anteil in der verwendeten cDNA hoch sein. Daher schloss sich eine quantitative Analyse der verschiedenen cDNA's über PCR an. Die cDNA wurde in verschiedenen Konzentrationen in eine spezifische PCR für den Translationsfaktor EF 1 alpha von *G. intraradices* eingesetzt (s. Abb. 4-1).

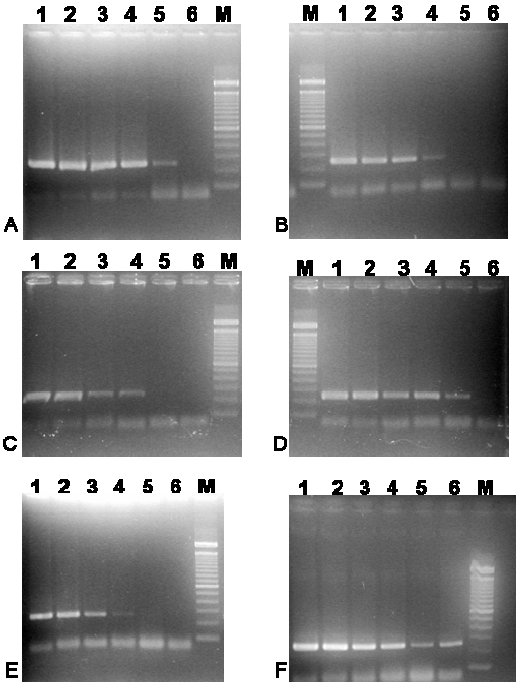


Abbildung 4-1: *GiTEF*-PCR zur Quantifizierung der mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Ri*-transformierten *Medicago truncatula* Wurzeln. RNA wurde nach sieben Wochen aus extraradikulärem Myzel und nach elf Wochen aus verschiedenen mit *G. intraradices* mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln isoliert und in cDNA umgeschrieben (A bis E). Für die Durchführung der SSH sollte der pilzlicher Anteil in der verwendeten cDNA relativ hoch sein, um die Wahrscheinlichkeit derer Isolierung zu erhöhen. Daher wurde die Konzentration aller cDNAs photometrisch ermittelt, eine Verdünnungsreihe von 300 ng/µl bis 0,3ng/µl erstellt, das *GiTEF*-Gen amplifiziert und die Signalstärke des Produktes auf Agarosegelen analysiert. Als Kontrolle diente eine Verdünnungsreihe der cDNA von extraradikulärem Myzel (F). 1: 300 ng/µl; 2: 150 ng/µl; 3:30 ng/µl; 4: 15 ng/µl; 5: 3 ng/µl; 6: 0,3 ng/µl; M: 100 bp Leiter (peqLab, Erlangen). Die unterste Bande entspricht vermutlich Oligonukleotid-Dimeren, die in einer PCR entstehen können.

Für die Erstellung der SSH wurde daraufhin die cDNA D aus der Abbildung 4-1 ausgewählt, bei der mit 3 ng cDNA/µl noch ein PCR-Produkt nachweisbar war. Von dieser cDNA Population wurde cDNA aus elf Wochen alten nicht mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln, die genauso wie die mykorrhizierten behandelt wurden, und aus extraradikulärem Myzel subtrahiert. Nach der letzten PCR konnten 480 Klone in Mikrotiterplatten gesammelt werden. Bei 52 der klonierten Genfragmente deuteten die Reverse Northern Blot Hybridisierungen auf eine differentielle Expression hin. Diese wurden sequenziert und einer Ähnlichkeitsanalyse unterzogen (s. Tabelle 4-5).

Aus der Analyse der Sequenzen ergab sich, dass 36 der klonierten Genfragmente sehr hohe Ähnlichkeiten zu Genen von *M. truncatula* oder verwandten Pflanzen aufweisen und drei der Genfragmente zu anderen Pilzen. Die restlichen 13 Genfragmente wiesen keine Ähnlichkeiten mit bisher bekannten Genen auf.

Um den Organismus zu identifizieren, auf dessen Genom einige der Genfragmente kodiert sind, wurden spezifische Oligonukleotide auf Basis der Sequenzen entwickelt und RT-PCR's mit verschiedenen Vorlagen durchgeführt. Neben den schon verwendeten cDNA's, wurde zusätzlich cDNA aus fünf Wochen alten *M. truncatula* Topfkulturen, die mit *G. intraradices* mykorrhiziert waren oder nicht, sowie aus einer mykorrhizierten Wurzelkultur, welche nicht mit Glukose induziert wurde, für die Erstellung der Expressionsmuster genutzt (s. Abb. 4-2).

Für zwei Genfragmente, bei denen ein pflanzlicher Ursprung vermutet wurde, konnte dieser bestätigt werden (s. Ab 4-2 E und F). Ebenso wurde bei den zwei ausgewählten Genfragmenten von *G. intraradices* der pilzliche Ursprung bestätigt (s. Abb. 4-2 B und C). Bei der Bestimmung der Herkunft von zwei Genfragmenten, die keine Sequenzähnlichkeiten aufwiesen, konnte eines als ein pflanzlichen Gen identifiziert werden (s. Abb. 4-2 A), während bei dem zweiten keine eindeutige Zuordnung möglich war (s. Abb. 4-2 D).

Tabelle 4-5 (folgende Seiten): Ergebnisse der Sequenzierung von differentiell exprimierten Genfragmenten aus mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln. RNA wurde nach sieben Wochen aus extraradikulärem Myzel und nach elf Wochen aus mit *G. intraradices* mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln isoliert. Nach der cDNA-Synthese wurde eine suppressive subtraktive Hybridisierung durchgeführt. Klonierte Genfragmente, die in Reverse Northern Hybridisierungen auf eine differentielle Expression hinwiesen, wurden sequenziert und die wahrscheinliche Kodierung über einen Vergleich mit den Datenbanken über BlastX und BlastN, sowie mit dem sowie mit dem TIGR Medicago Gene Index ermittelt.

Genfragment GintSSH-AM-eh-CR_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Referenz / TC-Nummer	Signifikanz
PlatteA1_A3	658	BlastX: Agmantin Deaminase	*Arabidopsis thaliana*	NP_196434	$6e^{-21}$
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: Agmantin Iminohydrolase	*Arabidopsis thaliana*	TC107836	$4{,}1\ e^{-39}$
PlatteA1_B7	662	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Klon mth2-35h1, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC137701	$2e^{-28}$
		TIGR: cDNA Klon MtBC36E12 T7	*Medicago truncatula*	TC110645	$6e^{-32}$
PlatteA1_D12	533	BlastX: hypothetisches Protein	*Magnaporthe grisea*	XP_369599	$3e^{-30}$
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: Glyoxaloxidase 2	*Ustilago maydis*	AL382796	$6{,}7e^{-8}$
PlatteA1_H11	611	BlastX: NADH Dehydrogenase / Disulfide Oxidoreduktase	*Arabidopsis thaliana*	NP_567801	$4e^{-76}$
		BlastN: *external rotenone-insensitive* NADPH Dehydrogenase	*Solanum tuberosum*	AJ245862	$4e^{-26}$
		TIGR: NADH Dehydrogenase	*Arabidopsis thaliana*	TC105894	$4e^{-133}$
PlatteA2_A3	558	BlastX: *Pto-like serine/threonine kinase*	*Capsicum chinense*	AAQ82660	$3e^{-95}$
		BlastN: Klon mth2-12c21, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC144343	$9e^{-129}$
		TIGR: Rezeptorprotein Kinase ähnliches Protein	*Arabidopsis thaliana*	TC 97210	$3{,}3e^{-121}$
PlatteA2_A4	523	BlastX: Glyzerinphosphodiester Phosphodiesterase	*Arabidopsis thaliana*	NP_200359	$2e^{-36}$
		BlastN: Klon mth2 genomische DNA	*Medicago truncatula*	CR936323	$8e^{-163}$
		TIGR: Glyzerinphosphoryldiester Phosphodiesterase 2	*Oryza sativa*	TC 106361	$5{,}1e^{-111}$
PlatteA2_A7	896	BlastX: putatives Protein	*Arabidopsis thaliana*	AAN15502	$2e^{-38}$
		BlastN: Klon LjT23P21, TM0261, genomische DNA	*Lotus corniculatus*	AP006144	$6e^{-23}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteA2_B2	525	BlastX: Peroxidase	*Medicago sativa*	AAB41811	$3e^{-55}$
		BlastN: Peroxidase	*Medicago sativa*	L36157	$8e^{-49}$
		TIGR: Peroxidase Vorläufer	*Medicago sativa*	TC106547	$3e^{-111}$
PlatteA2_B7	186	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteA2_B8	464	BlastX: RXO1 Krankheitsresistenz Protein	*Zea maize*	AAX31149	$5e^{-14}$
		BlastN: Klon mth2-1112, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC135103	0
		TIGR: PXO1-117	*Bacillus anthracis*	TC111420	$6{,}3e^{-59}$
PlatteA2_B11	548	BlastX: *subtilisin-type* Protease Vorläufer	*Glycine max*	AAK53065	
		BlastN: *subtilisin-type* Protease Vorläufer	*Glycine max*	AY033772	
		TIGR: *subtilisin-type* Protease	*Glycine max*	TC95036	

Genfragment GintSSH-AM-eh-CR_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Referenz/TC-Nummer	Signifikanz
PlatteA2_C6	459	BlastX: Ran GTPase bindendes Protein	*Arabidopsis thaliana*	NP_566512	$1e^{-38}$
		BlastN: Klon mth2-12a18, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC125389	$4e^{-53}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteA2_C12	655	BlastX: putatives Protein	*Arabidopsis thaliana*	CAB87746	$6e^{-47}$
		BlastN: Klon nsc164 16S rRNA gene	*uncultured alpha proteobacterium*	DQ211514	$3e^{-21}$
		TIGR: hypothetisches Protein T20O10_110	*Arabidopsis thaliana*	TC95892	$3{,}1e^{-99}$
PlatteA2_D3	373	BlastX: Photosystem II M Protein	*Oryza sativa*	AAS46110	$3e^{-07}$
		BlastN: Chloroplast Genom	*Medicago truncatula*	AC093544	0
		TIGR: Photosystem II M Protein	*Oryza sativa*	TC94072	$8{,}4e^{-70}$
PlatteA2_D9	397	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Klon mth2-7f19, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC141923	$3e^{-152}$
		TIGR: cDNA Klon MtBC42E01 T3	*Medicago truncatula*	TC100867	$3{,}8e^{-71}$
PlatteA2_E2	389	BlastX: PR10-1 Protein	*Medicago truncatula*	CAA69931	$6e^{-38}$
		BlastN: PR10-1 Protein	*Medicago truncatula*	Y08641	0
		TIGR: PR10-1 Protein	*Medicago truncatula*	TC 106613	$3{,}3e^{-82}$
PlatteA2_F12	391	BlastX: ROC7	*Arabidopsis thaliana*	NP_200679	$6e^{-43}$
		BlastN: ACC Synthase mRNA	*Citrus sinensis*	AJ011095	$6e^{-58}$
		TIGR: Cyclophilin	*Arabidopsis thaliana*	TC106674	$1{,}2e^{-82}$
PlatteA2_G11	414	BlastX: unbekanntes Protein	*Arabidopsis thaliana*	NP_176892	$2e^{-32}$
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten		BAA20407	
		TIGR: *nuclear matrix constituent protein* 1	*Daucus carota*	TC98789	$4{,}4e^{-31}$
PlatteA2_H2	389	BlastX: Formyltetrahydrofolat Deformylase	*Arabidopsis thaliana*	NP_851145	$3e^{-51}$
		BlastN: Klon mth2-14c17, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC137823	$2e^{-92}$
		TIGR: Formyltetrahydrofolat Deformylase	*Arabidopsis thaliana*	TC108839	$9{,}2e^{-82}$
PlatteA3_C5	484	BlastX: GST8	*Glycine max*	AAG34798	$2e^{-28}$
		BlastN: genomische DNA TM0240	*Lotus corniculatus*	AP006138	$3e^{-20}$
		TIGR: GST8	*Glycine max*	TC94362	$2{,}8e^{-93}$
PlatteB1_B3	163	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: BAT1 homologe mRNA	*Crassostrea gigas*	AF075691	$7e^{-37}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteB1_B5	563	BlastX: Zellteilungsprotein	*Arabidopsis thaliana*	CAB81312	$3e^{-68}$
		BlastN: ATP bindende Metallopeptidase	*Arabidopsis thaliana*	NM_118526	$4e^{-32}$
		TIGR: Zellteilungsprotein	*Arabidopsis thaliana*	TC97192	$7{,}6e^{-100}$

Genfragment GintSSH-AM-eh-CR_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Referenz/TC-Nummer	Signifikanz
PlatteB1_B7	638	BlastX: RIO Kinase	*Nicotiana tabacum*	BAD12556	$3e^{-81}$
		BlastN: Chromosomaler BAC Klon mth2-73, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC158502	$3e^{-61}$
		TIGR: RIO Kinase	*Nicotiana tabacum*	TC103787	$8,6e^{-51}$
PlatteB1_B10	420	BlastX: TA8 protein	*Oryza sativa*	CAE00870	$1e^{-34}$
		BlastN: Klon mth2-12m15, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC126781	$1e^{-96}$
		TIGR: RNA bindendes Protein ähnliches Protein	*Arabidopsis thaliana*	TC107723	$2,5e^{-76}$
PlatteB1_B11	661	BlastX: Peroxidase	*Glycine max*	AAD37376	$1e^{-81}$
		BlastN: Peroxidase	*Glycine max*	AF145350	$1e^{-11}$
		TIGR: Peroxidase	*Glycine max*	TC94347	$4,5e^{-145}$
PlatteB1_D3	883	BlastX: putatives Retroelement Pol Polyprotein	*Arabidopsis thaliana*	AAB87099	$3e^{-45}$
		BlastN: Klon mth2-8m7, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC137510	0
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteB1_E7	426	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Extensin	*Pisum sativum*	AF155232	$1e^{-13}$
		TIGR: Hydroxyprolin-reiches Glykoprotein Vorläufer	*Phaseolus vulgaris*	TC106435	$2,5e^{-84}$
PlatteB1_E8	834	BlastX: S-Ribonuclease bindendes Protein SBP1	*Petuniax hybrida*	AAF28357	$6e^{-71}$
		BlastN: Klon mth2-56d23, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC148486	$2e^{-177}$
		TIGR: S-Ribonuclease bindendes Protein SBP1	*Petunia hybrida*	TC94021	$1,1e^{-157}$
PlatteB1_E11	345	BlastX: ATPase	*Arabidopsis thaliana*	NP_176533	$2e^{-51}$
		BlastN: Klon mht2-7m14, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC135229	$6e^{-101}$
		TIGR: putative Kupfer transportierende ATPase 3	*Arabidopsis thaliana*	TC110233	$1,1e^{-73}$
PlatteB2_A1	184	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteB2_A3	168	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
PlatteB2_A4	638	BlastX: ATP bindende Kinase	*Arabidopsis thaliana*	NP_567568	$1e^{-61}$
		BlastN: ATP bindende Kinase	*Arabidopsis thaliana*	NM_118012	$2e^{-09}$
		TIGR: Protein Kinase ähnliches Protein	*Arabidopsis thaliana*	TC107497	$1,1e^{-134}$
PlatteB2_A5	553	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			

Genfragment GintSSH-AM-eh-CR_	bp	wahrscheinlich kodierend für	Organismus	Referenz/TC-Nummer	Signifikanz
PlatteB2_C8	618	BlastX: β-Tubulin 1	*Pisum sativum*	CAA38613	$4e^{-108}$
		BlastN: gTUB2 mRNA	*Pisum sativum*	X54845	0
		TBB1 β-Tubulin	*Pisum sativum*	TC106333	$1,8e^{-135}$
PlatteB2_E2	131	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-1	267	BlastX: Dihydrofolat Reduktase Thymidylat Synthase	*Pisum sativum*	CAD38046	$9e^{-37}$
		BlastN: bifunktionael Dihydrofolate Reductase Thymidylat Synthase	*Pisum sativum*	AJ491794	$4e^{-92}$
		TIGR: Dihydrofolat Reductase thymidylat Synthase	*Pisum sativum*	TC107086	$6,8e^{-46}$
SSHMR_SSH2-3	489	BlastX: DNA-bindendes Protein	*Daucus carota*	BAA21017	$1e^{-49}$
		BlastN: Homeodomain-Leucin-Zipper Protein 56	*Glycine max*	AC145165	$3e^{-46}$
		TIGR: Homeodomain-Leucin-Zipper Protein 56	*Glycine max*	TC106806	$3,4e^{-82}$
SSHMR_SSH2-6	332	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Klon mth2-28d22, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC148395	0
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten		TC95004	$1e^{-70}$
SSHMR_SSH2-7	573	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Klon mth2-7l7, genomische DNA	*Medicago truncatula*	CR956399	$3e^{-05}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-11	796	BlastX: *syringolide-induced protein B13-1-1*	*Glycine max*	BAB86897	$3e^{-43}$
		BlastN: *syringolide-induced protein B13-1-1*	*Glycine max*	AB083032	$8e^{-59}$
		TIGR: *syringolide-induced protein B13-1-1*	*Glycine max*	TC95680	$4,7e^{-125}$
SSHMR_SSH2-28	511	BlastX: putatives p40	*Oryza sativa*	BAB60943	$6e^{-13}$
		BlastN: Klon mth2-53p19, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC146745	$9e^{-24}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-32	358	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: SNF ähnliche Protein Kinase	*Arabidopsis thaliana*	TC107107	$3,8e^{-60}$
SSHMR_SSH2-33a	319	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: *pherophorin-S precursor*	*Volvox carteri*	TC96031	$7,7e^{-67}$
SSHMR_SSH2-21	646	BlastX: hsp70	*Aspergillus fumigatus*	EAL90851	$4e^{-16}$
		BlastN: hypothetical protein	*Magnaporthe grisea*	XP_366963	$4e^{-16}$
		TIGR: hypothetical protein	*Aspergillus nidulans*	AL385344	$1,3e^{-21}$

Genfragment GintSSH-AM-eh-CR_	**bp**	**wahrscheinlich kodierend für**	**Organismus**	**Referenz/TC-Nummer**	**Signifikanz**
SSHMR_SSH2-B7	122	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-C5	758	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: Klon mth2-85d, genomische DNA	*Medicago truncatula*	AC157894	$6e^{-180}$
		TIGR: *low temperature and salt responsive protein L*TI6B	*Arabidopsis thaliana*	TC108162	$3,5e^{-13}$
SSHMR_SSH2-C7	795	BlastX: hypothetisches Protein	*Neurospora crassa*	CAF06052	$1e^{-13}$
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: hypothetisches Protein	*Aspergillus nidulans*	AL385344	$2,3e^{-21}$
SSHMR_SSH2-D5	372	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: Olfactory receptor Olfr741	*Mus musculus*	AL381776	$6,8e^{-38}$
SSHMR_SSH2-D6	645	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-D8	685	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-F7	165	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: BAT1 homologe mRNA	*Crassostrea gigas*	AF075691	$6e^{-25}$
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			
SSHMR_SSH2-F9	468	BlastX: keine Sequenzähnlichkeiten			
		BlastN: keine Sequenzähnlichkeiten			
		TIGR: keine Sequenzähnlichkeiten			

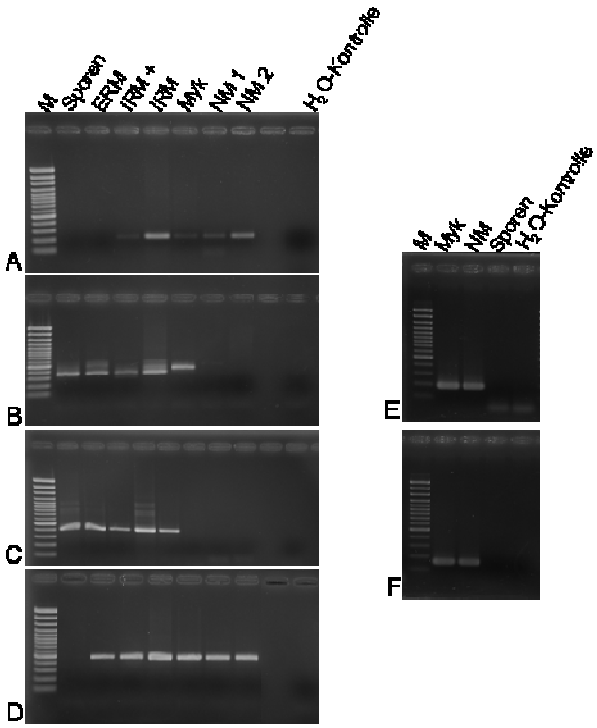


Abbildung 4-2. RT-PCR's zur Ermittlung des Ursprungs einiger ausgewählter cDNA-Fragmente aus mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln. Von einigen klonierten cDNA-Fragmenten (s. Tab 4-5) wurden Oligonukleotide auf Grundlage der Sequenzen entwickelt. Als Vorlage in der RT-PCR dienten cDNA's, die bereits in der SSH verwendet wurden (Sporen, ERM, IRM+); cDNA aus *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln mykorrhiziert mit *G. intraradices* ohne Glukose-Induktion (IRM); cDNA aus der fünf Wochen alten Topfkultur von *M. truncatula* mit *G. intraradices* mykorrhiziert (Myk) oder nicht mykorrhizierten Pflanzen (NM). **A**: SSHMR_SSH2-7; **B**: SSHMR_SSH2-21; **C**: PlatteA1_D12; **D**: PlatteB2_A5; **E**: PlatteB1_B7; **F**: PlatteA3_C5. M: 100 bp Leiter (peqLab)

4.3 Differentielle Expression von ausgewählten pflanzlichen Genen

Die differentielle Genexpression, der 36 vermutlich von *M. truncatula* kodierten Genfragmente (s. 4.2.3), sollte durch ein unabhängiges Experiment bestätigt werden. Hierfür wurde die RNA aus fünf Wochen alten mit *G. mosseae* in Topfkulturen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten *M. truncatula* Pflanzen in cDNA umgeschrieben. Bei den reverse Northern Hybridisierung konnten jedoch keine eindeutigen Aussagen getroffen werden, da interne Kontrollen nicht funktionierten. Daher wurden für zwei der pflanzlichen Genfragmente, die für eine Rio-Kinase bzw. für eine Glutathion-Transferase kodieren, die relativen Expressionsstärken über quantitative Real-Time-PCR ermittelt (s. Abb. 4-3). Hierfür wurde RNA nach fünf Wochen aus Topfkulturen nicht mykorrhizierter und mit *G. intraradices* mykorrhizierter *M. truncatula* Wurzeln isoliert und in cDNA umgeschrieben. Des Weiteren wurde in den cDNA's von den elf Wochen alten *Ri*-transformierten, mit *G. intraradices* mykorrhizierten bzw. nicht mykorrhizierten und mit Glukose behandelten

M. truncatula Wurzeln, mit der die SSH (s. 4.2.3) durchgeführt wurde, das Expressionsniveau ermittelt.

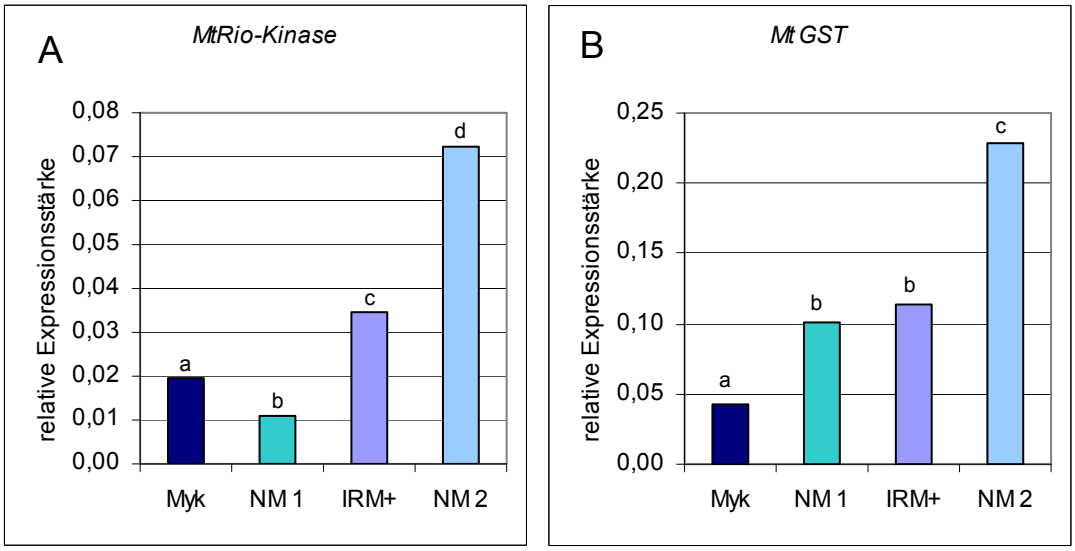


Abbildung 4-3. Quantitative Real-Time-PCR für Gene, die für eine Rio-Kinase (A) und einer Glutathion-Transferase (B) von *Medicago truncatula* kodieren. RNA wurde aus fünf Wochen alten Topfkulturen von *M. truncatula* Wurzeln, die mit *G. intraradices* mykorrhiziert (Myk) oder nicht mykorrhiziert waren (NM1), isoliert und in cDNA umgeschrieben. Des Weiterten wurde die RNA aus 11 Wochen alten *Ri*-transformierten, mit *G. intraradices* mykorrhizierten und mit Glukose behandelten *M. truncatula* Wurzeln (IRM+) und aus nicht mykorrhizierten Wurzeln (NM2) isoliert und in cDNA umgeschrieben. Über Real-Time-PCR wurden die Konzentrationen des Referenzgens *MTTEF*-1α und der zu untersuchenden Gene in den einzelnen cDNA's ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede hin ($p \leq 0{,}05$).

Für das Transkript, welches für eine Rio-Kinase kodieren könnte, wurden signifikante Unterschiede im Expressionsniveau in den vier verwendeten cDNA's nachgewiesen. Die Expressionsstärke der mykorrhizierten Variante aus der Topfkultur war 1,78-mal so hoch, wie die nicht mykorrhizierte. In der Wurzelkultur hingegen war die Expression des Gens in der Kontrolle 2,1-fach höher als im Vergleich zu den mykorrhizierten Wurzeln.

Bei dem Transkript für eine Glutathion-Transferase konnten ebenfalls signifikant unterschiedliche Expressionsstärken zwischen den mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Varianten ermittelt werden. Die Expression schien jeweils in den nicht mykorrhizierten Varianten um den Faktor zwei erhöht zu sein.

4.4 Phosphat-Transporter von *Glomus intraradices*

In *G. versiforme*, *G. mosseae* und *G. intraradices* konnte bereits ein Phosphat-Transporter isoliert und näher charakterisiert werden (Harrison & van Buuren, 1995, Benedetto et al., 2005, Maldonado-Mendoza et al., 2001). Alle diese Transporter

zeigen Sequenzähnlichkeiten zu dem Pho84p Phosphat-Transporter aus *Saccharomyces cerevisiae*. Während der asymbiotischen Entwicklung von *G. intraradices* konnte ein weiterer Phosphat-Transporter identifiziert werden (s. Tab. 4-1). Über eine PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden und dem CDS Oligonukleotid in 3'-Richtung bzw. den SMART IIA Oligonukleotid in 5'-Richtung sollte die komplette cDNA Sequenz für weitere Analysen ermittelt werden. Des Weiteren wurde die genomische Organisation des Gens mit genspezifischen Oligonukleotiden bestimmt (s. Abb. 4-4).

```
GCGGGGAGTTTTATTTACGCTTATTCTTATTTCCCTTCGAAATCAAATCTGAAAATAAAT  60
TATGAATCCTCAGGTATCAAATTTGTTACTAGTCCTTGGAATAGTTCAAGTGGCTCGCAG 120
  M  N  P  Q  V  S  N  L  L  L  V  L  G  I  V  Q  V  A  R  R

ATTAGATTTAGATAATCCGGAAGTATTAATATACGTTCGTATTGGTTATCTTGTTTCTCA 180
  L  D  L  D  N  P  E  V  L  I  Y  V  R  I  G  Y  L  V  S  Q

AACTATCATACTATCGGCCTGTTATTTTGCAGCAATTAAGATAAAGGGAAAGAATGGCAA 240
  T  I  I  L  S  A  C  Y  F  A  A  I  K  I  K  G  K  N

GTTTTTTTTTTTATTTATAATGATTTTCATGTTTGATCTCACATTTTAACTTATATACTT 300
                          Intron

ATCGTTTATTAGATCTAACCGCTCTCAAATATGTTGAACCAGCAAAACCGTTTACTAATG 360
           D  L  T  A  L  K  Y  V  E  P  A  K  P  F  T  N

AGCAACCAAAGCTTGTAGAAACAAGTAACAGAGACTATGATCTTTCAAAAGTTCAAGAAT 420
E  Q  P  K  L  V  E  T  S  N  R  D  Y  D  L  S  K  V  Q  E

TACTTAAACAAACCTTGATAGGAGTTGTCATTATGTTGGTTTTGCATTTTTATTGGAATT 480
L  L  K  Q  T  L  I  G  V  V  I  M  L  V  L  H  F  Y  W  N

TTACACAACCTTTGTTTATTCAAAGTATTATTCCATTAAAGAATTTGTATTATAATAAAA 540
F  T  Q  P  L  F  I  Q  S  I  I  P  L  K  N  L  Y  Y  N  K

TCGTACAAATTCATTTGCTTGGTAAACCAGCTGAGGGCGATTTGAAAAGACCATTCAAGG 600
I  V  Q  I  H  L  L  G  K  P  A  E  G  D  L  K  R  P  F  K

AAGCTTCTCCTTTTGGTCAATTATCTGATTCTCAGCAACCACAAACTGATAAGGCAGCTA 660
E  A  S  P  F  G  Q  L  S  D  S  Q  Q  P  Q  T  D  K  A  A

TTAAGAAAGCTGCTAAAGCTTCAAAATCTGGTGAAAAGGATGATTAATTTAATAAAGGGA 720
I  K  K  A  A  K  A  S  K  S  G  E  K  D  D  .

GGGGGCTTATCTGTAACTTTCAGATATTTCTTGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 780
AAAAAAGTACTCTGCGTTGTTACCACTGCTTA                              812
```

Abbildung 4-4: Gen-Struktur des für einen Phosphat Transporter kodierenden Gens von *Glomus intraradices*. Durch die SSH der cDNA von acht Tage lang gekeimten *G. intraradices* Sporen und 18S und 28S rDNA konnte ein Gen für einen weiteren Phosphat-Transporter identifiziert werden. Mittels PCR wurde die Sequenz in 5' und in 3' Richtung verlängert und die genomische Struktur des Gens identifiziert. Dargestellt ist der sequenzierte Bereich des Gens, sowie die abgeleitete Aminosäuresequenz des Leserasters. Das Start- und das Stoppcodon sind unterstrichen, die Exon/Intron Grenzen hervorgehoben.

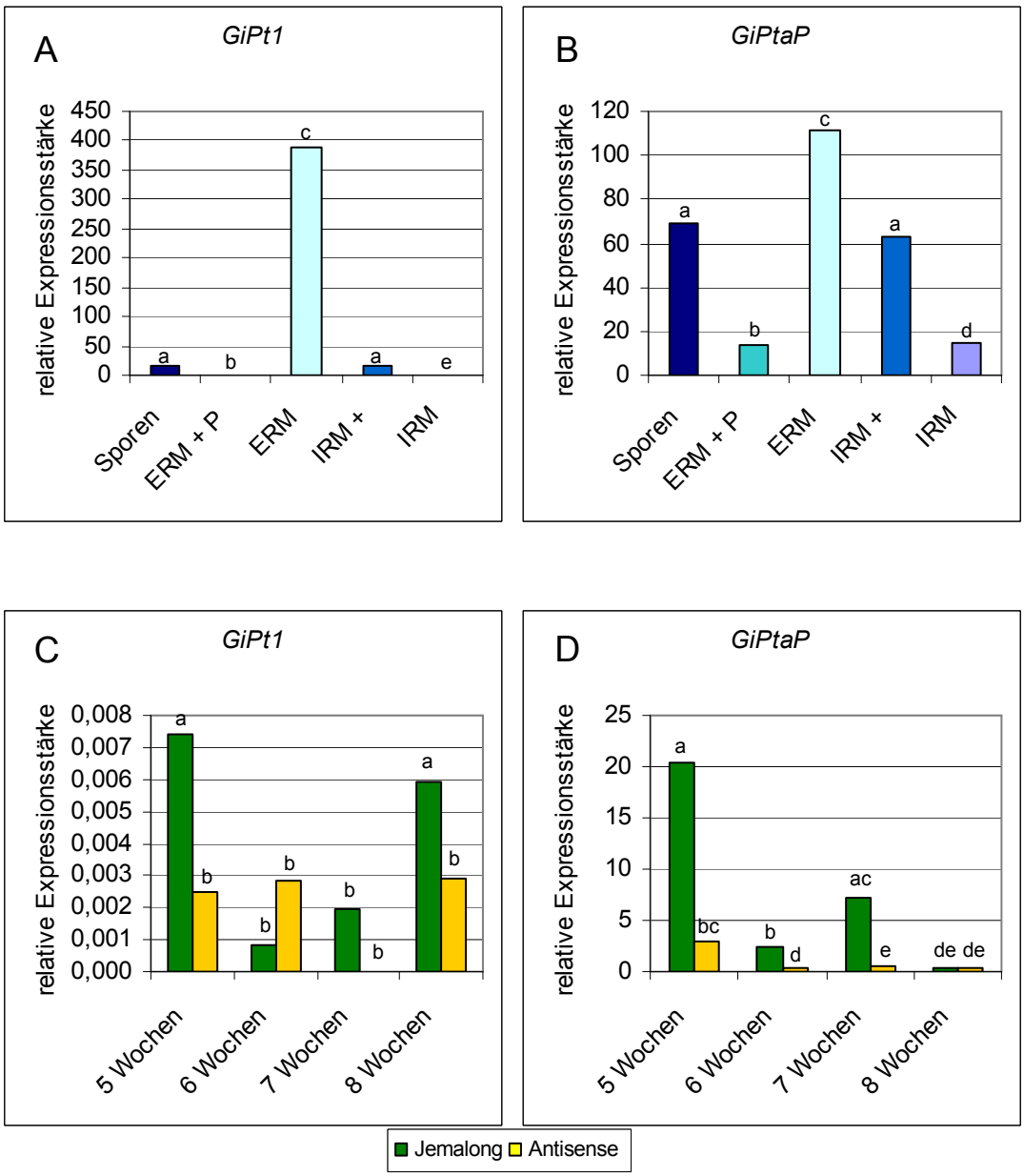
Die Struktur des Gens enthält ein ungewöhnliches GC-AG Intron; diese

Spleißsequenz kommt nur bei 0,6% der Introns im humanen Genom vor (Burset et al., 2000). Die Aminosäuresequenz weist sehr hohe Ähnlichkeiten zu einem möglichen anorganischen Phosphat-Transporter von *Paxillus involutus* auf (Le Quéré et al., 2006). Durch eine nähere Untersuchung stellte sich jedoch heraus, dass sich die Ähnlichkeit auf das Pho88p aus *S. cerevisiae* bezieht, welches selbst keinen Transporter darstellt, aber mit dem Transport von Phosphat assoziiert ist. Dabei übernimmt das Protein regulatorische Funktionen (Yompakdee et al., 1996b).

Expressionsanalysen des Phosphat-Transporter-Gens aus *G. versiforme* zeigten, dass dieser nur im extraradikulärem Myzel exprimiert wird (Harrison & van Buuren, 1995), während in *G. mosseae* das Transkript auch im intraradikulärem Myzel nachweisbar ist (Benedetto et al., 2005). Für das Transportergen in *G. intraradices* wurden bisher nur Expressionsstudien an extraradikulärem Myzel durchgeführt (Maldonado-Mendoza et al., 2001). Daher wurde die Expression des Phosphat-Transporter-Gens (*GiPt1*) und des Phosphat-Transporter assoziierten Proteins kodierenden Gens (*GiPtaP*) unter verschiedenen Bedingungen untersucht.

Zur Untersuchung des Einflusses von Phosphat auf die Expression der beiden Gene diente cDNA von extraradikulärem Myzel, welches in einem Medium mit erhöhtem Phosphat-Gehalt (ERM+P) wuchs (Rhody, 2002), sowie eine entsprechende Kontrolle (ERM). Ein weiterer Aspekt war der Einfluss der Verfügbarkeit von Kohlenhydraten auf die Genexpression. Hierfür wurden cDNAs von mykorrhizierte *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln, die nach sieben Wochen mit 400 mg Glukose behandelt wurden, und entsprechende Kontrollen verwendet (siehe auch 4.2.3). Inwieweit die zu untersuchenden Gene auch unter Topfbedingungen und der Verfügbarkeit von Kohlenhydraten differentiell exprimiert sind, wurde in einem weiteren Experiment überprüft. Hierfür wurden in Töpfen *M. truncatula* und p53-MtSucS1-*antisense* Keimlinge mit *G. intraradices* inokuliert und nach fünf, sechs, sieben und acht Wochen die Wurzeln geerntet. Bei der *antisense* Pflanze ist die Expression der Saccharose Synthase herunterreguliert (Hohnjec, 2001), wodurch der Transport von Saccharose in die Wurzel gestört sein könnte. In einem weiteren Ansatz wurden *P. sativum* L. cv. Finale und eine dem Wildtyp entsprechende Mutante, RisNod24 (Engvild, 1987), Keimlinge mykorrhiziert und nach fünf und acht Wochen geerntet. In den RisNod24 Pflanzen ist der AM-Pilz nicht mehr in der Lage Arbuskeln auszubilden (Gianinazzi-Pearson et al., 1991), wodurch der Nährstoffaustausch zwischen der Pflanze und dem AM-Pilz gestört ist. Über

quantitative Real-Time-PCR wurden die Anzahl der Moleküle in den verschiedenen cDNA's ermittelt und zum konstitutiv exprimierten Gen *GintTEF1α* ins Verhältnis gesetzt (s. Abb. 4-5).



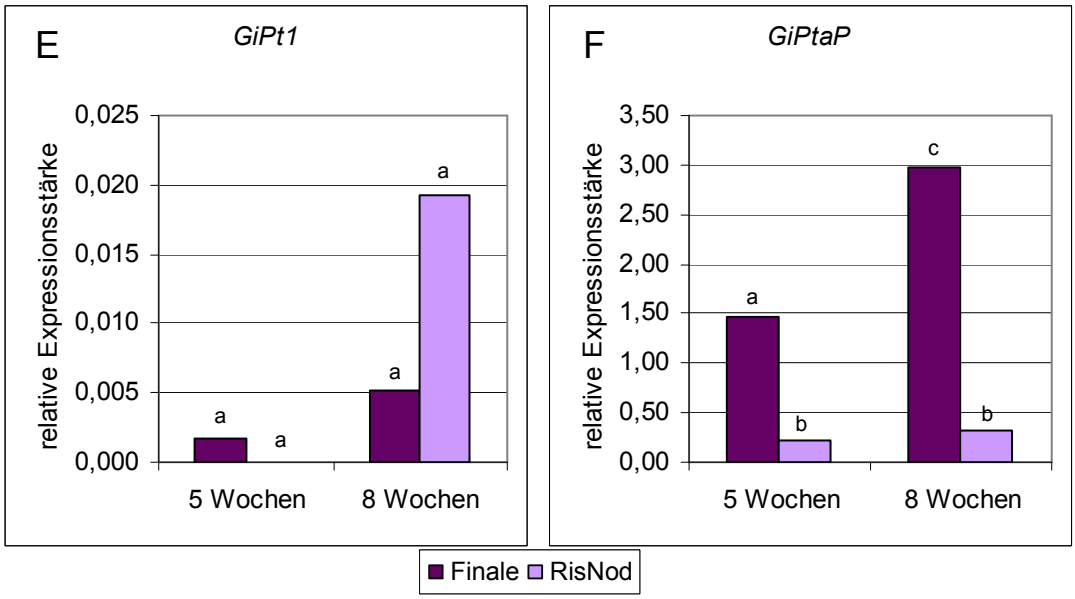


Abbildung 4-5 (vorherige und diese Seite): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der Gene für den Phosphat-Transporter (*GiPt1*) und dessen assoziierten Proteins (*GiPtaP*) von *Glomus intraradices*.
RNA wurde aus einer Woche in M-Medium keimenden *G. intraradices* Sporen, sieben Wochen alten extraradikulären Hyphen (ERM) und elf Wochen alten mit *G. intraradices* mykorrhizierten *Ri*-transformierten *M. truncatula* Wurzeln, die mit (IRM+) oder ohne (IRM) Glukose behandelt waren, isoliert und in cDNA umgeschrieben. Des Weiteren stand cDNA von extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* aus Medium mit erhöhtem Phosphatgehalt zur Verfügung (Rhody, 2002). *M. truncatula* (Jemalong) und p53-MtSucS1-antisense (Antisense) Keimlinge wurden in Topfkultur mit *G. intraradices* mykorrhiziert und dienten nach fünf, sechs, sieben und acht Wochen der RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese. *P. sativum* L. cv. Finale und eine dem Wildtyp entsprechende Mutante (RisNod24) wurden mit *G. intraradices* inokuliert. Nach fünf und acht Wochen wurde die RNA aus den Wurzeln isoliert und in cDNA umgeschrieben. Über Real-Time-PCR wurden die Konzentrationen des Referenzgens *GintTEF-1*α, *GiPt1* (A, C und E) und von *GiPtaP* (B, D und F) in den einzelnen cDNAs ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Die relative Expression der Gene für den Phosphat-Transporter (*GiPt1*) und dessen assoziierten Proteins (*GiPtaP*) waren je nach der Art der Kultur bzw. der Pflanze unterschiedlich. Das Gen für Phosphat-Transporter ist im extraradikulären Myzel (ERM) um einen Faktor von 3800 stärker transkribiert als im Vergleich zum ERM mit der erhöhten Phosphat-Konzentration im Medium (ERM+P). Eine 52-fache Induktion der Expression von *GiPt1* konnte im intraradiculären Myzel (IRM) durch die Gabe von 400 mg Glukose erreicht werden. In den mykorrhizierten *M. truncatula* oder *P. sativum* Wurzeln aus der Kultur in Töpfen war eine Expression des Phosphat-Transportergens kaum nachweisbar. Es konnten jedoch Unterschiede bei *M. truncatula* nach fünf und acht Wochen zwischen den Wildtyp und *antisense* Pflanzen festgestellt werden.

Die Expression von *GiPtaP* ist anscheinend nicht so starken Regulationen unterworfen, so ist das Transkript im ERM nur 8-mal mehr nachzuweisen als im

ERM+P. Es konnte auch ein signifikanter Unterschied zwischen dem IRM und IRM+ nachgewiesen werden. Die Expressionsstärken zwischen den Wildtyp (Jemalong) und *antisense* Pflanzen sind, mit Ausnahme nach acht Wochen, unterschiedlich. Des Weiteren ist ein deutlicher Trend zu einem geringen Expressionsniveau zu erkennen. Bei der Expression in den Wurzeln von *P. sativum* (Finale) und der Mutante (RisNod) ist das Niveau in der Mutante ebenfalls signifikant geringer. Es konnte aber eine Verdoppelung der Expression zwischen fünf und acht Wochen bei *P. sativum* (Finale) festgestellt werden.

4.5 Stickstoff-Aufnahme in keimenden Sporen

Neben der verbesserten Phosphat-Versorgung der Pflanze durch die Mykorrhiza kann über das extraradikuläre Myzel auch Stickstoff aufgenommen und zur Pflanze transportiert werden (Ames et al., 1983, Johansen et al., 1996, Toussaint et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde im extraradikulären Myzel auch ein Ammonium-Transporter isoliert (s. 4.2.1), der bereits durch López-Pedrosa et al. (2006) charakterisiert und die Expressionsmuster im extraradikulärem Myzel aufgenommen wurden. Ob Stickstoff auch während der asymbiotischen Phase aufgenommen werden kann, wie es auch bei Phosphat schon gezeigt werden konnte (Thomson et. al, 1990), sollte anhand der Keimung von *Gigaspora rosea* Sporen in unterschiedlichen Medien gezeigt werden.

Die Nitrat-Aufnahme durch das extraradikuläre Myzel von *G. intraradices* konnte über Änderungen des pH-Wertes im Medium gezeigt werden (Bago et. al, 1996). Daher wurden M-Medium mit Nitrat, M-Medium mit Ammonium und M-Medium ohne eine Stickstoffquelle mit 0,001% Bromkresolpurpur (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) oder Bromkresolgrün (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) versetzt. Jeweils 10 *G. rosea* Sporen wurden in 100 µl der verschiedenen Medien in Mikrotiterplatten überführt und inkubiert (s. Abb. 4-6). Um eine Inhibition der Keimung durch die Farbstoffe auszuschließen, wurde parallel auch Medium ohne Indikatoren eingesetzt und die Keimung unter dem Binokular verfolgt. Des Weiteren wurde das Medium auch ohne Sporen inkubiert, damit ein Einfluss der Inkubation auf den pH-Wert des Mediums einbezogen werden konnte.

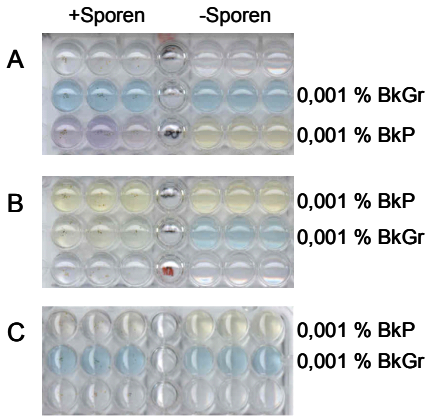
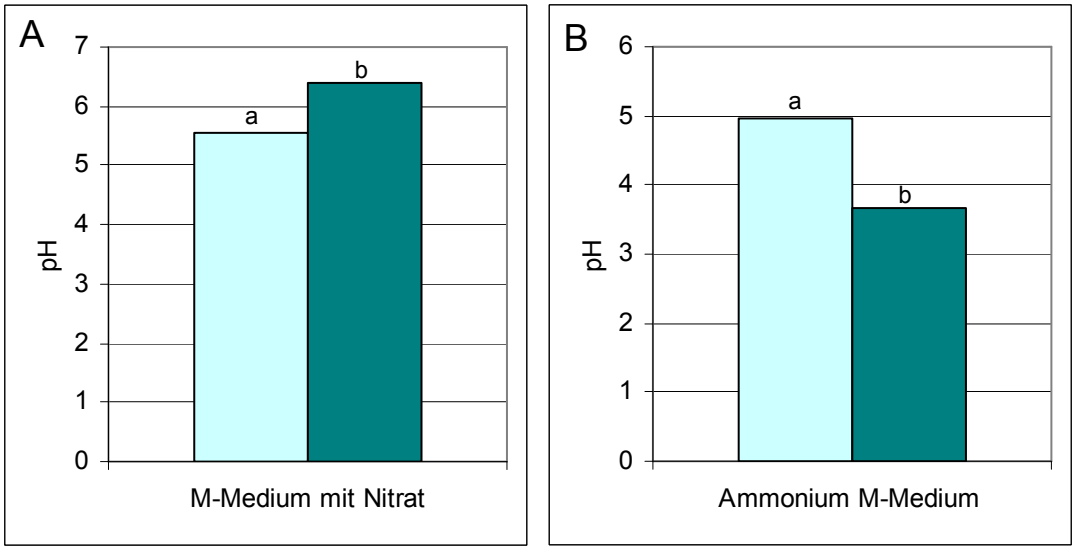


Abbildung 4-6. Änderung des pH-Wertes durch die Keimung von *Gigaspora rosea* in unterschiedlichen Medien.
Jeweils 10 *G. rosea* Sporen wurden in 100 µl M-Medium mit Nitrat (A), M-Medium mit Ammonium (B) und M-Medium ohne Stickstoff (C) und 0,001% des entsprechenden Farbstoffes bei 28°C und 2% CO_2 für 6 Tage inkubiert. Bromkresolpurpur (BkP) schlägt von gelb nach blauviolett um in dem Bereich von pH 5,2 bis pH 6,8. Bromkresolgrün (BkGr) dient als Indikator in einem pH Bereich von 3,8 bis 5,4 und verändert seine Farbe von gelb nach blau.

Bereits nach einem Tag konnte eine optische Veränderung des pH-Wertes durch die Sporen wahrgenommen werden. Im M-Medium mit Nitrat erfolgte eine Alkalisierung des Mediums durch die Keimung der Sporen, während es im M-Medium mit Ammonium zu einer Ansäuerung, sichtbar durch einen Farbumschlag von Bromkresolgrün von blau nach gelb, kam. Die Keimung der Sporen im Medium ohne eine Stickstoffquelle scheint optisch keine Auswirkungen auf den pH-Wert zu haben.
Um dies zu quantifizieren wurde pH-Wert mit einer Mikroelektrode (Orion 98-03, Thermo Electron Corporation, Witchford, Cambridgehire, England) ermittelt (s. Abb. 4-7).



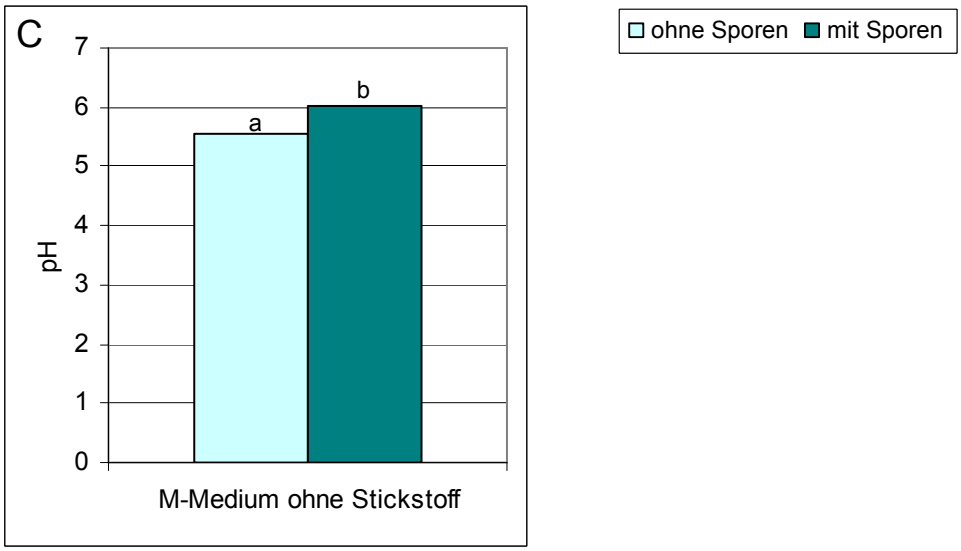


Abbildung 4-7 (vorherige und diese Seite). Änderung des pH-Wertes durch die Keimung von *Gigaspora rosea* in verschiedenen Medien. In die Vertiefungen einer 96er Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 µl von M-Medium mit Nitrat (A), M-Medium mit Ammonium (B) bzw. M-Medium ohne Stickstoff (C) pipettiert. In die Hälfte der befüllten Vertiefungen wurden jeweils zehn *G. ros*ea Sporen transferiert, das gleiche Volumen an Wasser wurde den Kontrollen ohne Sporen zugeführt. Nach sechs Tagen wurde der pH-Wert mittels einer Mikroelektrode in den einzelnen Vertiefungen gemessen. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede hin ($p \leq 0{,}05$).

Die Messungen mit der pH Elektrode zeigen, dass durch die Keimung der Sporen der pH im M-Medium mit Nitrat um 0,8 steigt und im Medium mit Ammonium um 1,3 sinkt. Im M-Medium ohne eine Stickstoffquelle stieg der pH-Wert um 0,5.

4.6 Differentielle Genexpression von ausgewählten *Glomus intraradices* Genen für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus

Die obligat biotrophe Lebensweise der arbuskulären Mykorrhizapilze (AM-Pilze) könnte in ihrer Pflanzenabhängigen Ernährungsweise, in spezifischen physikalischen Gegebenheiten innerhalb der Wurzel oder in metabolischen Prozessen, die erst durch pflanzliche Signale aktiviert werden, begründet sein (Hepper, 1987, Bago und Bécard, 2002, Trépanier et al., 2005). Ein entscheidender Aspekt ist der Metabolismus der Kohlenhydrate, da den AM-Pilzen die Photoassimilate der Pflanze als Nährstoffquelle dienen (Shachar-Hill et al., 1995, Pfeffer et al., 1999, Douds et al., 2000), die über die Arbuskeln oder das intraradikuläre Myzel aufgenommen werden (Bago, 2000a). Über die differentielle Expression von Genen, die für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus kodieren, ist bisher wenig bekannt (Lammers et al., 2001, Bago et al., 2003).

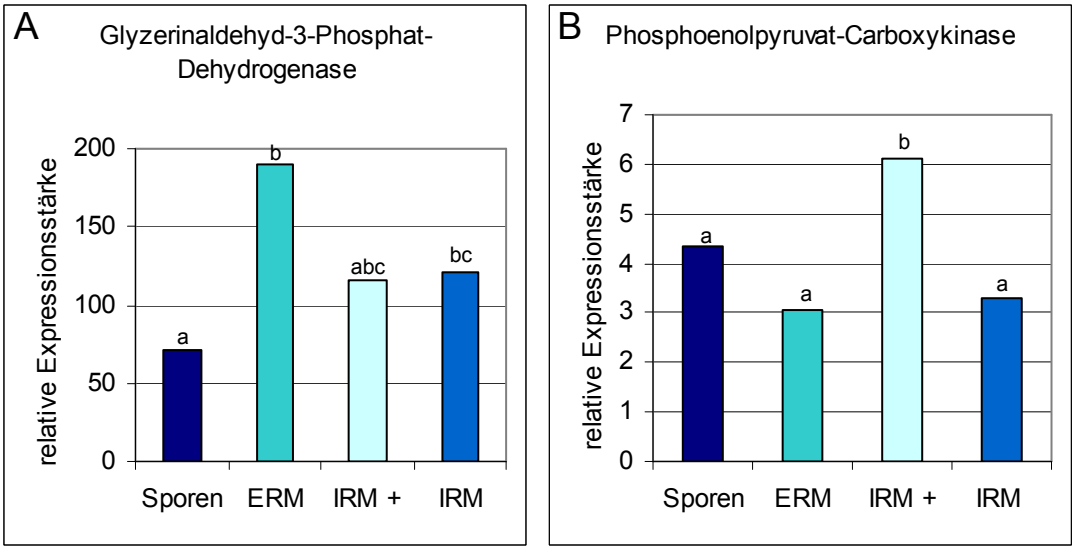
Daher wurden für die weiteren Untersuchungen aus cDNA-Banken von *G. intraradices* Sequenzen von Genen, die für folgende Proteine kodieren, ausgewählt:

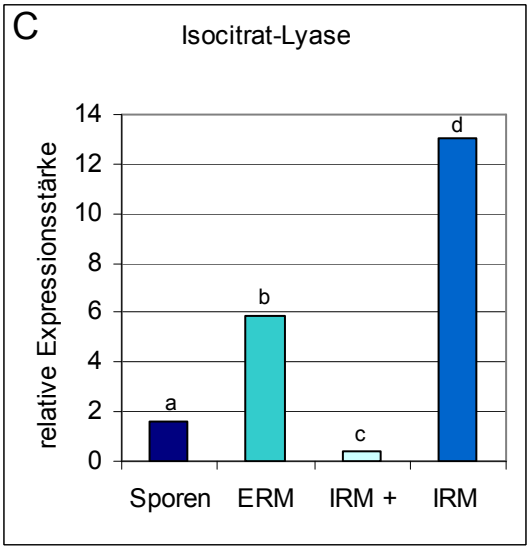
- die Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als ein Enzym der Glykolyse und der Gluconeogenese (Accesion number BI452322);
- die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) als ein weiteres Enzym der Gluconeogenese (Rhody 2002);
- die Glykogen-Synthase für die Synthese eines wichtigen Speicherstoffes in AM- Pilzen (Bago et al., 2003);
- die Isocitrat-Lyase und die Malat-Synthase, zwei Schlüsselenzyme des Glyoxylatzykluses (Lammers et al., 2001);
- ein Fettsäure elongierendes Enzym (GiELO) (Accesion number BI452334) und
- das FOX2 ein multifunktionelles Enzym der peroxisomalen ß-Oxidation (s. 4.2.2).

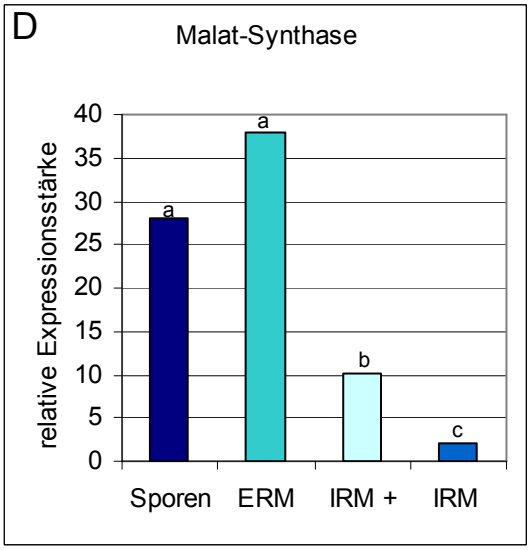
Die Expression der Gene wurde über quantitative Real-Time-PCR unter verschiedenen Bedingungen näher untersucht.

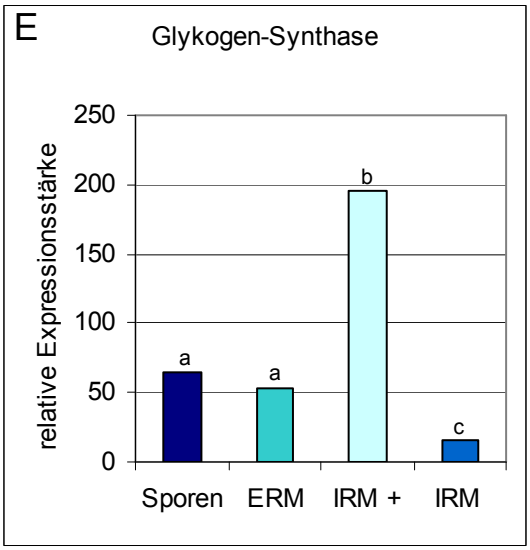
4.6.1 Expression in der Wurzelkultur

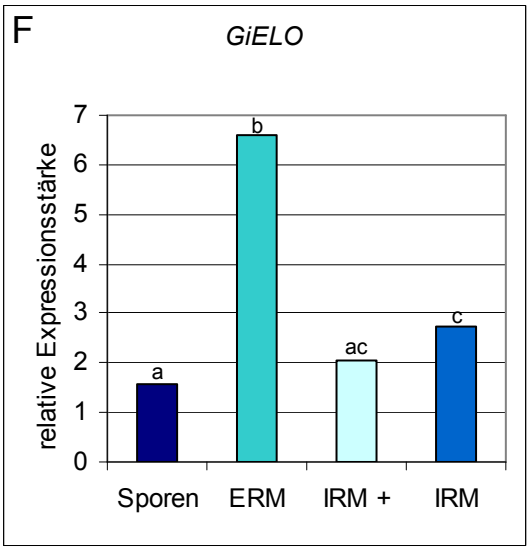
Die Transkription wurde zunächst während der einzelnen Entwicklungsstadien von *G. intraradices* in der Wurzelkultur untersucht (s. Abb. 4-9). In einer Variante der mykorrhizierten Wurzeln wurde die Verfügbarkeit von Kohlenhydrat durch die Gabe von 400 mg Glukose erhöht.




C
Isocitrat-Lyase
relative Expressionsstärke
14
12
10
8
6
4
2
0
a
b
c
d
Sporen
ERM
IRM +
IRM


D
Malat-Synthase
relative Expressionsstärke
40
35
30
25
20
15
10
5
0
a
a
b
c
Sporen
ERM
IRM +
IRM


E
Glykogen-Synthase
relative Expressionsstärke
250
200
150
100
50
0
a
a
b
c
Sporen
ERM
IRM +
IRM


F
GiELO
relative Expressionsstärke
7
6
5
4
3
2
1
0
a
b
ac
c
Sporen
ERM
IRM +
IRM

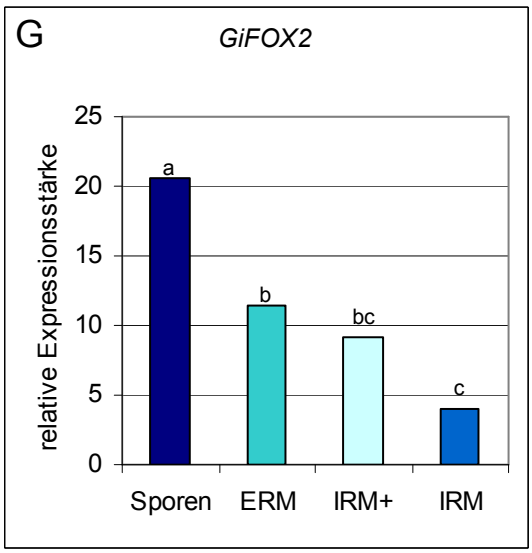

G
GiFOX2
relative Expressionsstärke
25
20
15
10
5
0
a
b
bc
c
Sporen
ERM
IRM+
IRM

Abbildung 4-9 (vorherige Seiten): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der verschiedenen Gene aus dem Kohlenhydrat-Metabolismus von *Glomus intraradices*. Sporen von *G. intraradices* keimten eine Woche in M-Medium, bevor daraus RNA für die cDNA-Synthese extrahiert wurde. Aus geteilten Platten wurde extraradikuläres Myzel (ERM) nach sieben Wochen entfernt, sowie nach elf Wochen mit *G. intraradices* mykorrhizierte *Ri*-transformierte *M. truncatula* Wurzeln, die mit (IRM+) oder ohne (IRM) Glukose behandelt waren, woraus die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde. Über Real-Time-PCR wurden die Anzahl der Transkripte des Referenzgens *GintTEF-1*α und die der Gene für die GAPDH (A), die PEPCK (C), die Isocitrat-Lyase (C), die Malat-Synthase (D), die Glykogen-Synthase (E), der MaELO (F) und des *GintFOX2* (G) in den einzelnen cDNAs ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Während der einzelnen Entwicklungsphasen von *G. intraradices* werden die Gene der untersuchten Stoffwechselwege unterschiedlich stark transkribiert. Eine sehr hohe Expressionsstärke des Gens für die Glyzerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase konnte im extraradikulären Myzel (ERM) nachgewiesen werden, wobei dies unabhängig von der Glukosezufuhr sich nicht signifikant von der im intraradikulären Myzel (IRM und IRM+) unterschied. In den keimenden Sporen war die Expression 2,7-fach niedriger als im ERM.

Deutlich kleinere Werte für die relative RNA-Akkumulierung wurden für das Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Gen ermittelt. Dabei zeigten sich geringere, aber signifikante Unterschiede.

Die Transkription der beiden Gene für die Schlüsselenzyme des Glyoxylatzykluses zeigten im IRM unterschiedliche Expressionen durch die Zugabe von Glukose. So ließ sich die Isocitrat-Lyase induzieren, während die Expression der Malat-Synthase reprimiert wurde. Für das Isocitrat-Lyase-Gen zeigte sich außerdem eine deutlich reduzierte Expression in den Sporen gegenüber den anderen Stadien.

Die Expression des Glykogen-Synthase-Gens ist in den Sporen und im ERM gegenüber dem IRM signifikant erhöht, konnte dort jedoch durch die Zugabe von Glukose induziert werden.

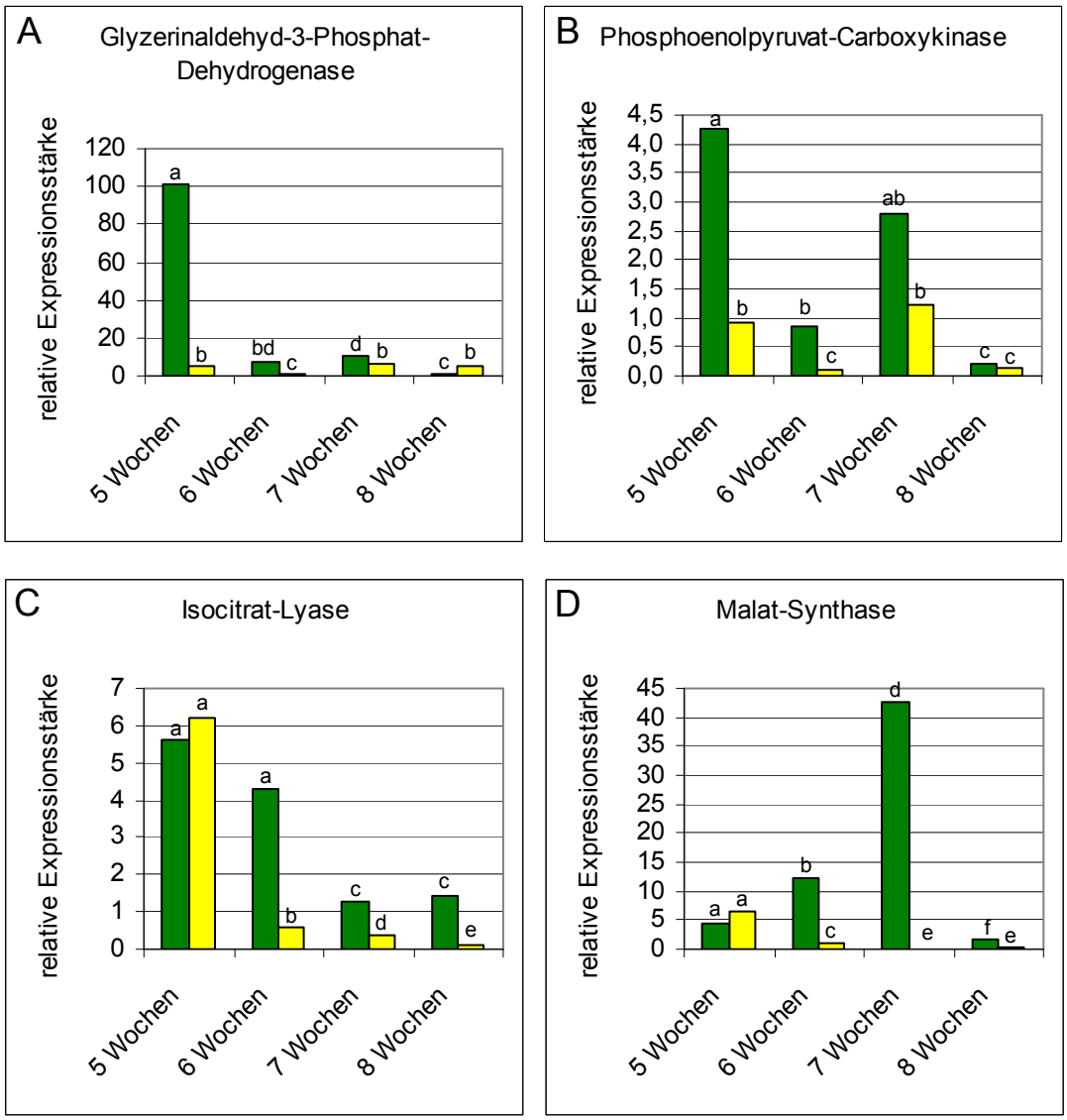
Die relative RNA-Akkumulierung des Gens für das Fettsäure elongierende Enzym ist im ERM am höchsten, im IRM deutlich reduziert und am geringsten in den Sporen. Durch die Zugabe von Glukose zeigte sich keine signifikante Änderung.

Die Expressionsstärke von *GiFOX2* ist dagegen in den keimenden Sporen am höchsten und in den anderen Stadien reduziert. Auch hier hatte Glukose keinen Einfluß auf die Expression.

4.6.2 Expression in der Topfkultur mit *Medicago truncatula*

Um die Regulation durch die Kohlenhydrate näher zu untersuchen, wurde die Expression der Gene des C-Stoffwechsels von *G. intraradices* während der Besiedlung von *M.truncatula* Pflanzen in Töpfen über einen Zeitraum von vier Wochen untersucht.

Hierzu wurden *M. truncatula* (Jemalong) Wildtyp-Pflanzen mit der transgenen Linie p53-MtSucS1-*antisense* verglichen, in der die Expression der Saccharose-Synthase herunterreguliert ist (Hohnjec, 2001). Dadurch ist die Verfügbarkeit von Hexosen in der Wurzel für die AM-Pilze reduziert (Hohnjec et al., 2003).



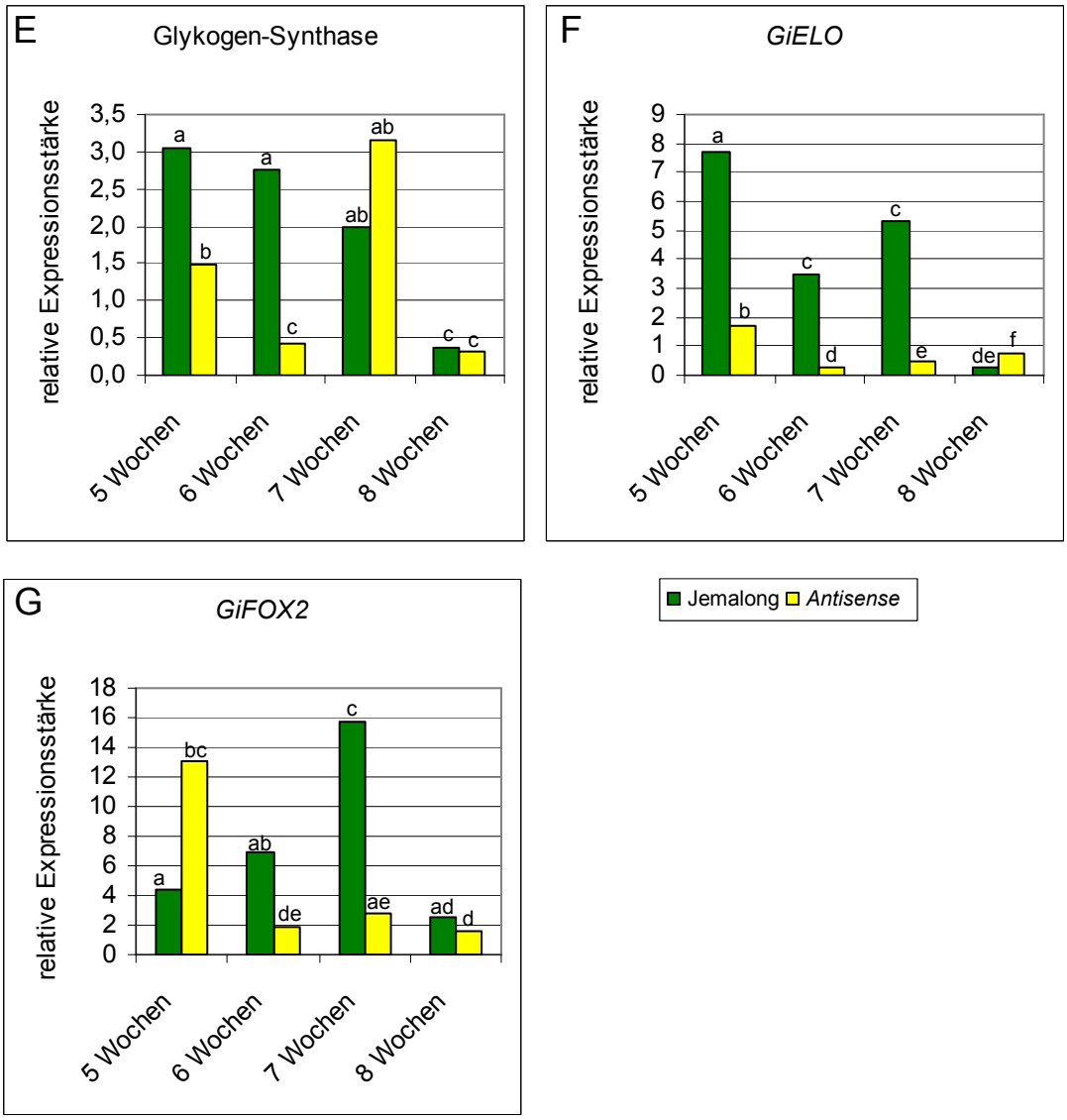


Abbildung 4-10 (vorherige und diese Seite): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der verschiedenen Gene aus dem Kohlenhydrat-Metabolismus von *Glomus intraradices*. *M. truncatula* (Jemalong) und p53-MtSucS1-antisense (*Antisense*) Keimlinge wurden in Topfkultur mit *G. intraradices* mykorrhiziert und dienten nach fünf, sechs, sieben und acht Wochen der RNA-Extraktion und der cDNA-Synthese. Über Real-Time-PCR wurden die Anzahl der Transkripte des Referenzgens *GintTEF-1*α und die der Gene für die GAPDH (A), die PEPCK (C), die Isocitrat-Lyase (C), die Malat-Synthase (D), die Glykogen-Synthase (E), der MaELO (F) und des *GintFOX2* (G) in den einzelnen cDNAs ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Die relativen Expressionsstärken unterscheiden sich zwischen den untersuchten Genen, zwischen der Besiedlung des Wildtyps und den transgenen Pflanzen und über den Zeitverlauf. So ist die Expressionsstärke bei der Besiedlung der *M. truncatula* Kontrollen nach fünf Wochen am höchsten, fällt nach sechs und sieben Wochen rapide ab und ist nach acht Wochen am geringsten. Währenddessen bleibt die Expression im intraradikulären Myzel bei den transgenen Pflanzen auf gleichem Niveau. Als Ausnahme ist die Expression nach sechs Wochen etwa 7-fach niedriger.

Die Expressionsstärken des PEPCK-Gens sind in beiden Varianten zyklisch mit einer erhöhten RNA Akkumulierung nach nach fünf und sieben bzw. erniedrigten nach sechs und acht Wochen. Die Expression ist in den transgenen Pflanzen gegenüber dem Wildtyp reprimiert.

Bei der Expression der Isocitrat-Lyase konnte nach fünf Wochen bei beiden Varianten kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Im weiteren Verlauf nimmt die Stärke der Expression in beiden Varianten ab, der Abfall scheint im Wildtyp allerdings geringer.

Im Gegensatz dazu steigt die Genexpression der Malat-Synthase, ein weiteres Enzym des Glyoxylatzykluses, im IRM der Wildtyp Pflanzen bis zu seiner höchsten Expression nach sieben Wochen an, wonach die Expression wieder deutlich abfällt. Die Expressionsstärken bei der transgenen Variante nehmen bis sieben ab, wobei die Unterschiede bis zu 40-fach sind, und bleiben dann auf einem niedrigen Niveau.

In der Expression des Gens für die Glykogen-Synthase ändert sich nach fünf, sechs und sieben Wochen nichts im IRM während der Mykorrhiza mit dem Wildtyp und fällt nach acht Wochen um das 8,5-fache ab. Die Expression bei der transgenen Variante ist dagegen zyklisch, wobei sie nach fünf und sieben Wochen gleich hoch und nach sechs und acht Wochen auf einem niedrigen Niveau ist.

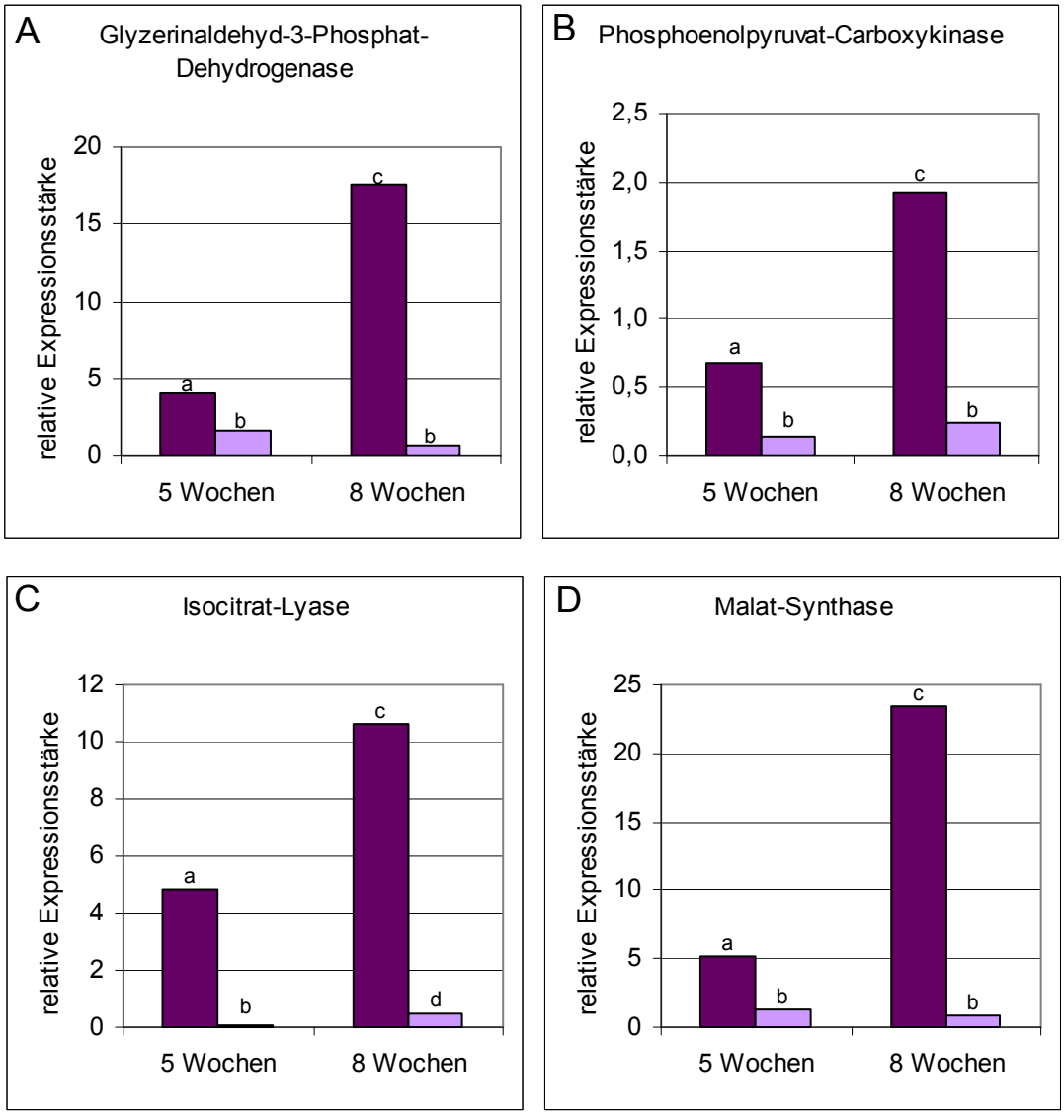
Die Expressionsstärken des Gens für ein Fettsäure elongierendes Enzyms *GiELO* ist in der Wildtyp-Mykorrhiza nach fünf Wochen am höchsten, bleibt nach sechs und sieben Wochen auf einem signifikant niedrigerem Niveau und ist nach acht Wochen am geringsten. Während der Mykorrhiza in der transgenen Variante unterscheiden sich die Expressionsstärken zu jedem Zeitpunkt, wobei sie nach fünf Wochen am stärksten ist, dann fällt und bis zur achten Woche wieder ansteigt.

Im IRM bei der Mykorrhiza mit dem Wildtyp unterscheidet sich die Expression von *GiFOX2* nach sieben Wochen signifikant von den anderen Zeitpunkten. In den transgenen Pflanzen ist die Expression im IRM von *GiFOX2* nach fünf Wochen am stärksten und pendelt sich anschließend auf einem signifikant niedrigen Niveau ein.

4.6.3 Expression in der Topfkultur mit *Pisum sativum*

Die Expression von *G. intraradices* Genen, die für die verschiedenen Gene des Kohlenstoffwechsels kodieren, wurde außerdem während der Entwicklung in *P. sativum* L. cv. Finale und eine dem Wildtyp entsprechende Mutante, RisNod24 (Engvild, 1987) untersucht. Bei dieser Mutation kann der Pilz während der

Besiedlung der Wurzel keine Arbuskeln ausbilden (Gianninazzi-Pearson et al., 1991), die den Ort des Nährstoffaustausches zwischen den beiden Partnern darstellen (Bago, 2000, Harrison, 1999). Allerdings wird diskutiert, dass auch über das intraradikuläre Myzel pflanzliche Kohlenhydrate vom Pilz aufgenommen werden können (Bago, 2000). In wie weit die Ausbildung der Arbuskeln einen Einfluss auf die Expression der zu untersuchenden Gene hat, sollte untersucht werden. Hierfür wurden die Keimling des Wildtyps (Finale) und der Mutante mit *G. intraradices* mykorrhiziert und die Wurzeln nach fünf und acht Wochen geerntet. Die daraus isolierte RNA wurde in cDNA umgeschrieben und über quantitativen Real-Time-PCR die relativen Expressionsstärken gegenüber dem Referenzgen *GintTEF-1*α ermittelt (s. Abb.4-11).



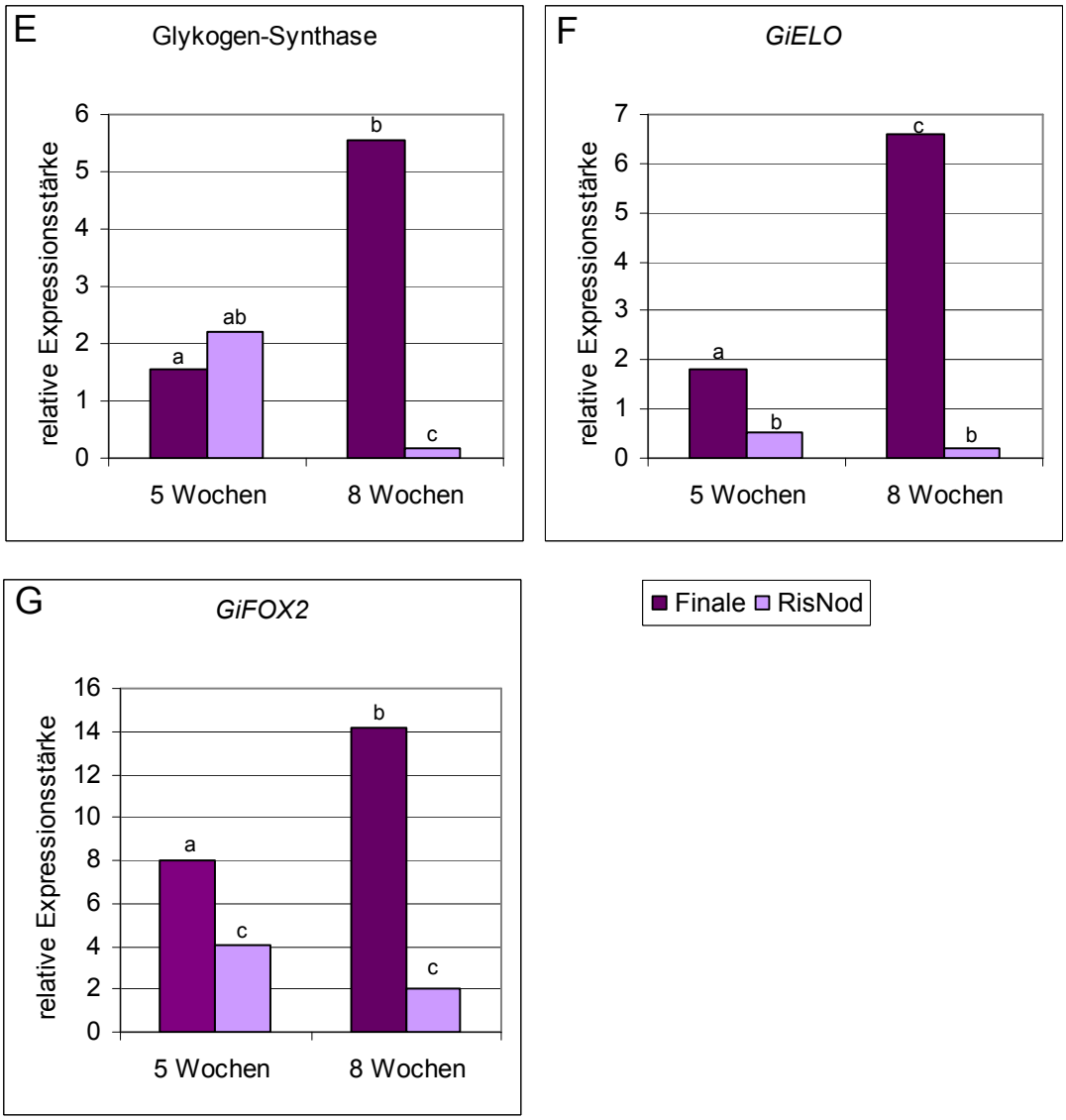


Abbildung 4-11 (vorherige und diese Seite): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der verschiedenen Gene aus dem Kohlenshydrat-Metabolismus von *Glomus intraradices*. *P. sativum* L. cv. Finale und eine dem Wildtyp entsprechende Mutante (RisNod24) wurden mit *G. intraradices* inokuliert. Nach fünf und acht Wochen wurde die RNA aus den Wurzeln isoliert und in cDNA umgeschrieben. Über Real-Time-PCR wurden die Anzahl der Transkripte des Referenzgens *GintTEF-1*α und die der Gene für die GAPDH (A), die PEPCK (C), die Isocitrat-Lyase (C), die Malat-Synthase (D), die Glykogen-Synthase (E), der MaELO (F) und des *GintFOX2* (G) in den einzelnen cDNAs ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Die Expressionsstärken während der Mykorrhiza zwischen *G. intraradices* und *P. sativum* L. cv. Finale waren auf einem ähnlich hohen Niveau wie bei der zwischen *G. intraradices* und *M. truncatula* (Jemalong). Mit Ausnahme des Gens, das für die Glykogen-Synthase kodiert, zeigte sich die Expression während der Besiedlung des Wildtyps (Finale) signifikant höher als in der Mutante (RisNod24). Zwischen den beiden Zeitpunkten war in Finale ein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Expression erschien nach fünf Wochen stets niedriger als nach acht Wochen. Dieses

Muster in der Expression findet sich bei der RisNod24 Variante nur bei dem Gen für die Isocitrat-Lyase wieder. Im IRM in der RisNod24 Variante unterscheidet sich die Expression von *GiELO* und *GiFOX2,* sowie der Gene für die GAPDH, die PEPCK und die Malat-Synthase während den beiden Zeitpunkten nicht signifikant. Die Expressionsstärke der Glykogen-Synthase ist nach fünf Wochen in der RisNod24 Variante signifikant höher als nach acht Wochen.

4.7 Glutathion-Transferasen von *Glomus intraradices*

In verschiedenen cDNA-Banken konnten bereits Transkripte für unterschiedliche Glutathion-Transferasen (früher Glutathion S-Transferasen; GST) aus *G. intraradices* in keimenden Sporen und im extraradikulärem Myzel identifiziert werden (Sawaki und Saito 2001, Rhody, 2002). Die Analyse der Sequenzen aus den erstellten SSH-Banken von gekeimten Sporen und extraradikulärem Myzel ergab, dass noch weitere Glutathion Transferase Gene in *G. intraradices* existieren. Um die Sequenzen in die verschiedenen bekannten Klassen der GST (McGoldrick et al., 2005) einzuteilen, wurden sie miteinander verglichen und dann einer phylogenetischen Analyse unterzogen (s. Abbildung 4-12).

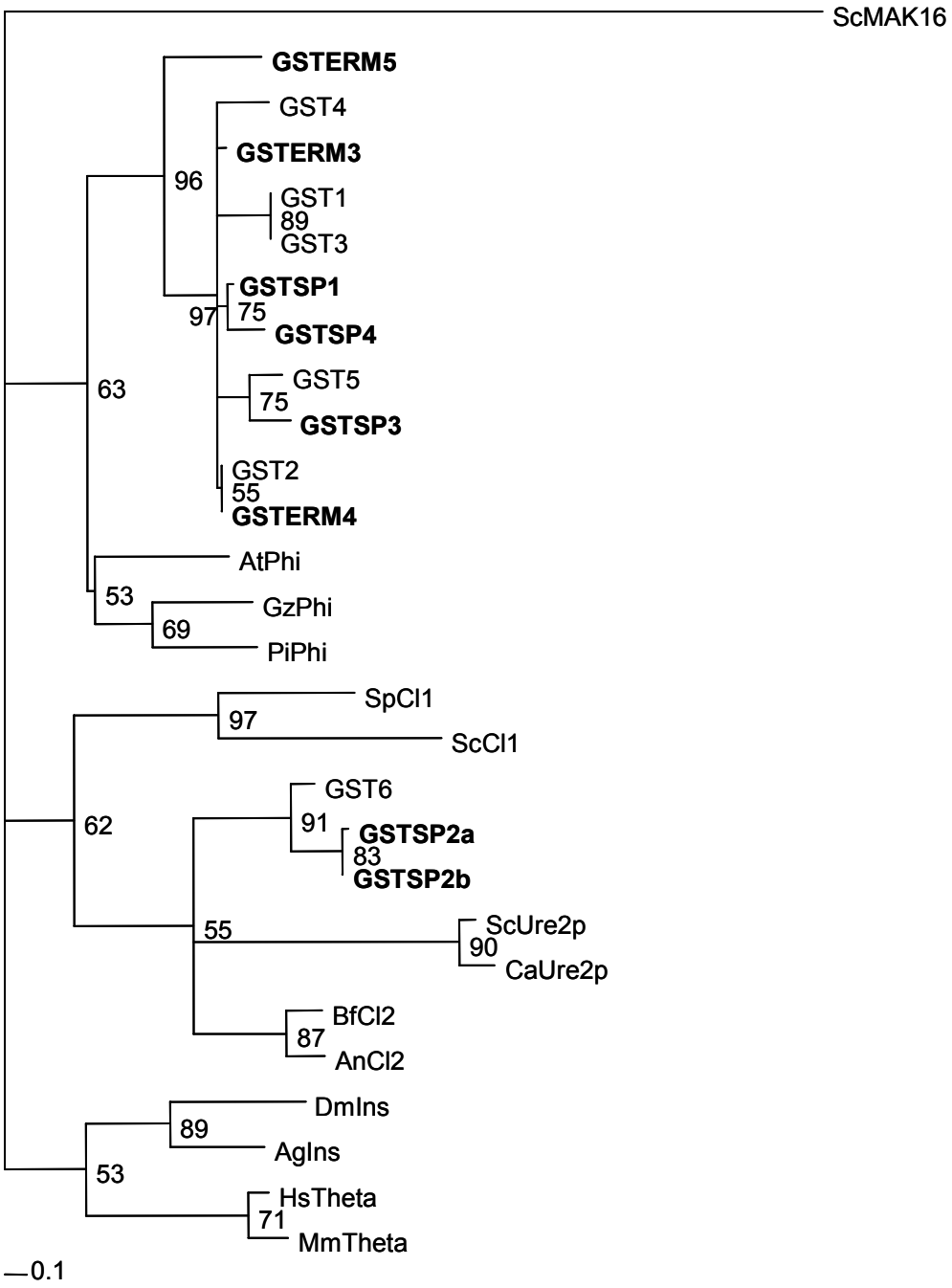


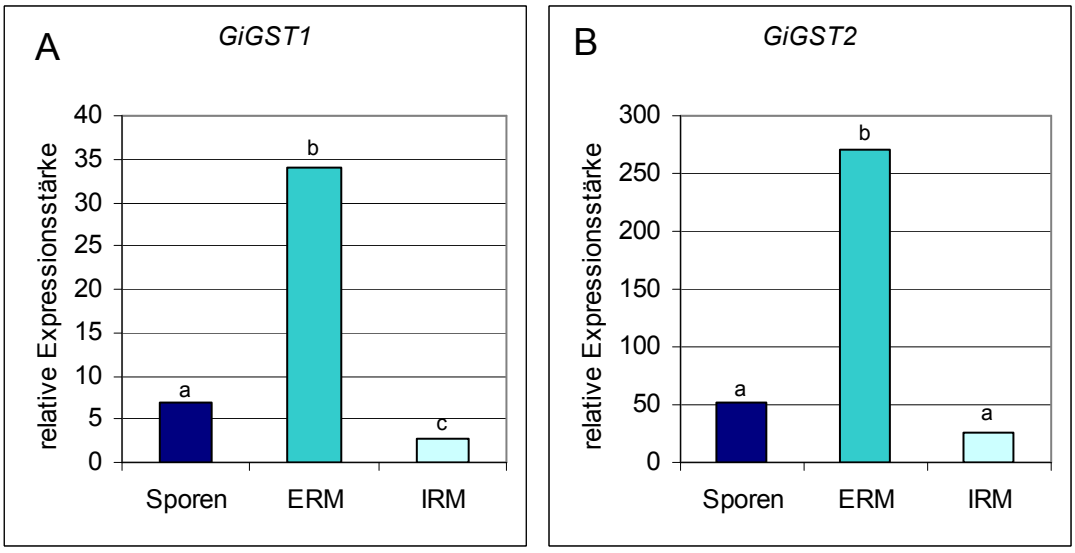
Abbildung 4-12: Phylogenetischer Stammbaum der Glutathion-Transferasen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen GST1 (Sawaki, 2002), GST2, GST4, GST5 (Rhody, 2002), GST3 und GST6 (BM439293 und BM027594, unveröffentlicht), sowie der in dieser Arbeit identifizierten GSTSP1 bis GSTSP4 und GSTERM3 bis GSTERM5 von *G. intraradices* wurden unter der Verwendung von ClustalW mit folgenenden Sequenzen aus verschiedenen GST-Klassen verglichen: Ure2 Proteine von *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014170) und *Candida albicans* (Q8NJR5); Cluster 1 Proteine von *Schizosaccharomyces pombe* (Q9P6M1) und *S. cerevisiae* (NP_012304); Proteine aus der Phi-Klasse von *Gibberella zeae* (XP_391216); *Paxillus involutus* (AAT91250) und von *Arabidopsis thaliana* (Q96266); Theta-Klassen Proteine von *Homo sapiens* (AAC13317) und *Mus musculus* (AAB03534); Proteine aus der Insekten Klassen von *Drosophila mauritiana* (P30105) und *Anopheles gambiae* (IPN9A) und Cluster 2 Proteine von *Botryotinia fuckeliana* (AAG43132) und *Aspergillus nidulans* (AAM48104). Als *Outgroup* diente das MAK16 Protein von *S. cerevisiae* (NP_009377). Der Sequenzvergleich wurde phylogenetisch mit dem Programm PUZZLE unter 1000 Wiederholungen analysiert und der Stammbaum mit dem Programm TREEVIEW erstellt.

Anhand dieser Analyse lässt sich die Mehrzahl der Glutathion-Transferasen von *G. intraradices* der Phi-Klasse zuordnen, während GST6, GSTSP2a und GSTSP2b die höchste Ähnlichkeit mit dem pilzlichen Cluster2 aufweisen.

Die Gene *GiGST2*, *GiGST4* und *GiGST5* wurden erstmals in einer SSH-Bank identifiziert, die mit Sequenzen von Schwermetall induzierten Genen angereichert war (Rhody, 2002), konnten aber auch in den verschiedenen Entwicklungsstadien von *G. intraradices* isoliert werden (diese Arbeit). In keimenden Sporen wurden bereits die Gene für GST3 und GST6 identifiziert (Podila et al., unveröffentlicht) und im extraradikulärem Myzel das *GiGST1*-Gen (Sawaki und Saito, 2001).

Die Expression von pflanzlichen Glutathion-Transferasen kann unter verschiedenen Stressbedingungen, wie die Behandlung mit Chemikalien, veränderten Umweltbedingungen oder durch pathogene Organismen induziert werden (Marrs, 1996, Marrs und Walbot, 1997). Strittmatter et al. (1996) konnten die Induktion eines Promotors des *gst1*-Gens der Kartoffel durch pathogene Organismen und durch AM-Pilze nachweisen. In *M. truncatula* wurde die Expression einer Glutathion-Transferase spezifisch durch die Kolonisierung mit *G. intraradices* erhöht (Wulf et al., 2003).

Während der Besiedlung könnte auch auf der pilzlichen Seite die GST reguliert werden. Daher wurde die Expression dieser Gene in keimenden Sporen, extraradikulärem und intraradikulärem Myzel, sowie in mit Schwermetall behandeltem extraradikulärem Myzel und eine entsprechende Kontrolle (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von D. Sieh) näher untersucht (s. Abb. 4-13).



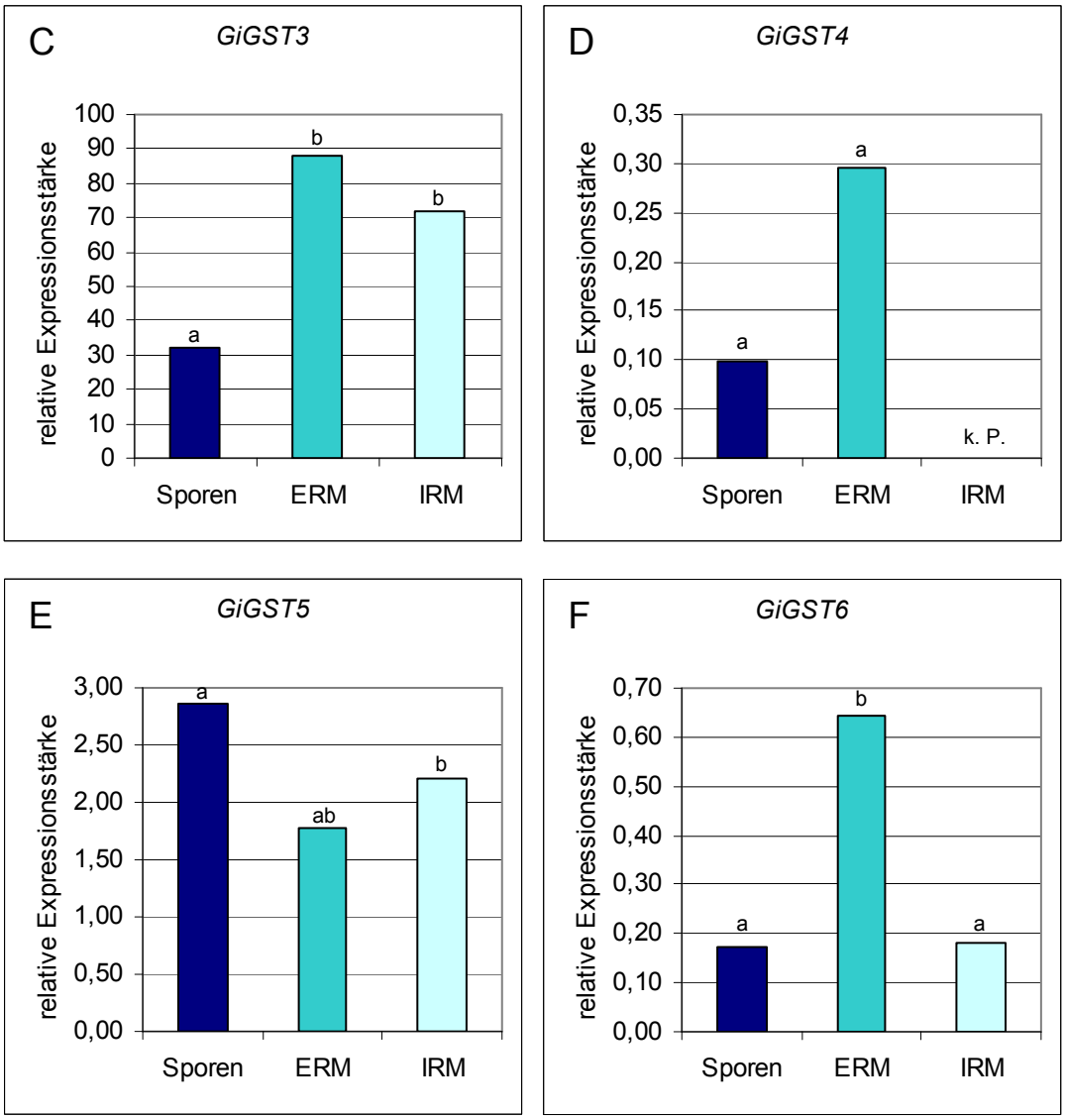


Abbildung 4-13 (diese und vorherige Seite): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der in *Glomus intraradices* identifizierten Gene für Glutathion-Transferasen. Sporen von *G. intraradices* keimten eine Woche in M-Medium, bevor daraus RNA für die cDNA-Synthese extrahiert wurde. Aus geteilten Platten wurde extraradikuläres Myzel (ERM) nach sieben Wochen entfernt, sowie nach elf Wochen mit *G. intraradices* mykorrhizierte *Ri*-transformierte *M. truncatula* Wurzeln (IRM), woraus die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben wurde. Über Real-Time-PCR wurden die Anzahl der Transkripte des Referenzgens *GintTEF-1*α und die der Gene für *GiGST1* bis *GiGST6* (A bis F) in den einzelnen cDNAs ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Im extraradikulärem Myzel von *G. intraradices* ist die Expression der Glutathion-Transferasen *GiGST1*, *GiGST2*, *GiGST4* und *GiGST6* bis zu 12-fach erhöht. In keimenden Sporen und im IRM sind die Gene, mit Ausnahme von GiGST1, gleich stark exprimiert. Die Expression von *GiGST3* ist in keimenden Sporen reprimiert, während die von *GiGST5* erhöht ist.

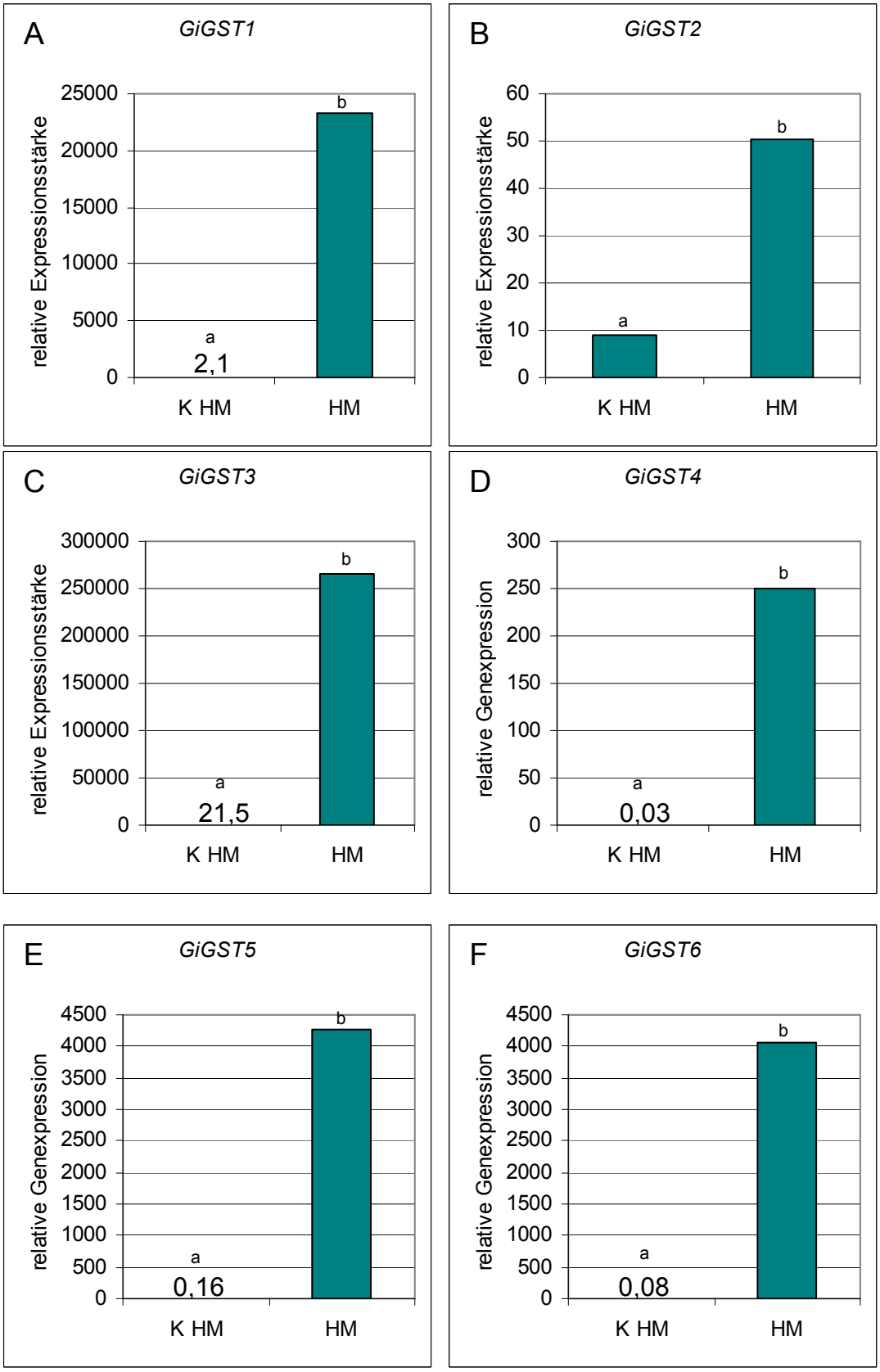

A
GiGST1
relative Expressionsstärke
25000
20000
15000
10000
5000
0
a
2,1
b
K HM
HM
B
GiGST2
relative Expressionsstärke
60
50
40
30
20
10
0
a
b
K HM
HM
C
GiGST3
relative Expressionsstärke
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
a
21,5
b
K HM
HM
D
GiGST4
relative Genexpression
300
250
200
150
100
50
0
a
0,03
b
K HM
HM
E
GiGST5
relative Genexpression
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
a
0,16
b
K HM
HM
F
GiGST6
relative Genexpression
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
a
0,08
b
K HM
HM

Abbildung 4-14 (vorherige Seite): Graphische Darstellung der relativen Expressionsstärken der in *Glomus intraradices* identifizierten Gene für Glutathion-Transferasen. In cDNA aus extraradikulärem Myzel, das in M-Medium mit Schwermetallen (4,5 µM $CdCl_2$, 75 µM $ZnCl_2$ und 50 µM $CuCl_2$) inkubiert wurden (HM) und in der entsprechenden Kontrolle (K HM) (Rhody, 2002), wurde über Real-Time-PCR die Anzahl der Transkripte der Gene für die verschiedenen Glutathion-Transferasen (*GiGST1* bis *GiGST6*; A bis F), sowie die des Referenzgens *GintTEF-1*α ermittelt und die relativen Expressionsstärken berechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. Unterschiedliche Buchstaben über den Säulen deuten auf signifikante Unterschiede in den Expressionsstärken hin ($p \leq 0{,}05$).

Durch die Behandlung mit Schwermetallen konnte die Expression sämtlicher untersuchter Gene für Glutathion-Transferase induziert werden, wobei die Induktion Werte von bis zu 53562-fach erreicht.

5 Diskussion

Arbuskuläre Mykorrhizapilze (AM-Pilze) können als obligat biotrophe Organismen ihren Lebenszyklus nur in Anwesenheit einer Wirtspflanze beenden. Deshalb steht für ihre Untersuchung relativ wenig biologisches Material zur Verfügung. Eine Möglichkeit trotz dieser Limitierung etwas über die Regulation z.B. ihrer Substrataufnahme und deren Umsetzung kennenzulernen ist die nicht zielgerichtete Klonierung von cDNA-Fragmenten, den so genannten „*expressed sequence tags*“ (EST), sowie die anschließende Expressionsanalyse der entsprechenden Gene. Wie im Folgenden diskutiert bestätigen Expressionsmuster auf der einen Seite Vermutungen, die durch frühere Beobachtungen getroffen wurden, auf der anderen Seite dienen sie der Erstellung neuer Arbeitshypothesen, die durch weitere Experimente wiederum überprüft werden müssen.

5.1 Identifizierung von Transkripten während der asymbiotischen Entwicklungsphase von *Glomus intraradices*

Im Lebenszyklus der AM-Pilze ist die Keimung der Sporen die einzige Phase, in der der Pilz vollkommen unabhängig von einer Wirtspflanze ist. Dabei spielen bei der Regulation dieses Prozesses unter anderem abiotische Faktoren, wie der pH-Wert, die Feuchtigkeit und die Temperatur eine Rolle (zum Review, Giovannetti, 2000). Aus elf Tage lang gekeimten Sporen von *Glomus intraradices* wurde bereits eine Anzahl von 1083 EST’s isoliert und untersucht (Jun et al., 2002, Lammers et al., 2001). Des Weiteren sind aus *G. intraradices* 329 exprimierte Gene des extraradikulären Myzels (Sawaki und Saito, 2001) und 308 schwermetallinduzierte Genfragmente (Waschke et al., 2006) bekannt. Auch von exprimierten Genen anderer arbuskulären Mykorrhizapilze existieren verschiedene cDNA-Banken, wie z.B. aus aktivierten *Gigaspora rosea* Sporen (Franken et al., 1997, Stommel et al., 2001) und während der präsymbiotischen Entwicklung (Tamasloukht et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese verfügbaren EST’s aus der asymbiotischen Phase von *G. intraradices*, mit 1920 Sequenzen von exprimierten Genen aus acht Tage lang gekeimten Sporen erweitert (s. 4.1 und Tab. 4-1).

Bei der Keimung verbrauchen die Sporen zunächst die leicht verfügbaren Speicherstoffe, wie Trehalose und Glykogen (Bécard et al., 1991, Bago et al., 1999), die Konzentration der Speicherlipide bleibt in den ersten Tagen hingegen konstant

(Bécard et al., 1991, Gaspar et al., 1994). So wurden bei der Keimung von *Glomus mosseae* und *Gigaspora margarita* Enzyme der Glykolyse, wie die Phosphofruktokinase und des Citratzykluses, wie z.B. die Malat-Dehydrogenase nachgewiesen (MacDonald und Lewis, 1978, Saito, 1995). Die Sequenzen der EST's aus der während dieser Arbeit erstellten cDNA-Bank wiesen unter anderem Ähnlichkeiten zu einer Fruktosebisphosphat-Aldolase und einer Malat-Dehydrogenase auf, die ebenfalls auf den Abbau von Hexosen über die Glykolyse und den Citratzyklus hindeutet.

Nach ca. fünf Tagen beginnt die Konzentration an Speicherlipiden in den keimenden AM-Pilzsporen abzunehmen (Bécard et al., 1991, Gaspar et al., 1994) und die Fettsäuren werden zur Energiegewinnung über die β-Oxidation genutzt (Bago et al., 1999). Ein Indiz für diese Hypothese ist unter anderem die Identifizierung eines Transkriptes mit einer sehr hohen Sequenzähnlichkeit zu einem multifunktionellem Enzym der β-Oxidation, das FOX2 aus *G. mosseae* (Requena et al., 1999, Fossa et al., 1995).

Der Transport der Lipidtröpfchen zu den Glyoxysomen, einem möglichen Ort der β-Oxidation, erfolgt möglicherweise durch die Cytoplasmaströmung oder die Elemente des Cytoskeletts (Bago et al., 2002a und b, Lammers et al., 2001). Gene, die für die verschiedenen Komponenten des Cytoskeletts, wie das β-Tubulin und Aktin, sowie der molekularen Motoren Kinesin und Dynein kodieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit isoliert. Insbesondere die Expression der Tubuline scheint gleichzeitig stark erhöht zu sein, da diese insgesamt 45-mal in dieser cDNA-Bank identifiziert werden konnten. In keimenden Sporen von *G. mosseae* ließen sich die Ausbildung der Mikrotubuli bereits über deren Färbung visualisieren (Åstrom et al., 1994).

Neben Transportprozessen sind die Elemente des Cytoskeletts auch an anderen Vorgängen innerhalb der Zelle beteiligt. So stellt das β-Tubulin eine wichtige Komponente während der Teilung der Zellkerne dar. Dies ließ sich über reduziertes Hyphenwachstum unter dem Einfluss von Benomyl (Chiocchio et al., 2000), sowie durch die Visualisierung des β-Tubulins an den Spindelapparaten bei *G. mosseae* (Requena et al., 2000) nachweisen. Die Teilung von Zellkernen während der Keimung wurde bereits 1993 bei *G. margarita* (Bianciotto und Bonfante, 1993, Bécard und Pfeffer, 1993) sowie 1995 bei *Glomus versiforme* (Bianciotto et al., 1995) gezeigt.

Die Replikation scheint Einfluss auf das Wachstum der Keimhyphen der AM-Sporen

zu nehmen (Chiocchio et al., 2000). Daneben kämen aber auch andere Faktoren in Frage. So wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Transkript identifiziert, welches für Pirin kodieren könnte. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches mit Transkriptionsfaktoren interagiert und an der Regulation der Samenkeimung bei *Arabidopsis thaliana* beteiligt ist (Lapik und Kaufmann, 2003). Insertionen in diesem Gen reduzierten die Keimungsrate der Samen, die aber wieder auf das Niveau des Wildtyps anstieg, sobald man die Samen zuvor bei 4°C für 48 Stunden stratifizierte. Eine ähnliche Funktion könnte bei *G. intraradices* vorliegen, da sich nach einer Kälteperiode die Keimungsrate steigern lässt (Juge et al., 2002). Ob die Akkumulierung des Transkriptes durch eine Lagerung bei 4°C reduzierbar ist, müsste mittels Expressionsstudien untersucht werden.

Während der Keimung von AM-Sporen akkumuliert mRNA in den Hyphen und wurde bereits im Jahre 1982 durch Beilby und Kidby in *Glomus caledonium* Sporen und bei *G. rosea* aus aktivierten Sporen (Beilby und Kidby, 1982, Franken et al., 1997, Stommel et al., 2001) gezeigt. In ruhenden *G. rosea* Sporen ließ sich dagegen keine mRNA detektieren (Franken et al., 1997). Parallel zur RNA-Akkumulierung wurde die *de novo* Synthese von Proteinen belegt (Beilby und Kidby, 1982), für dessen Proteine sich ebenfalls Gene in der cDNA-Bank befanden, wie z.B. für ribosomale Proteine.

Im Anschluss an die Proteinbiosynthese unterstützen Chaperone, besonders unter Stressbedingungen, die Proteine bei ihrer korrekten Faltung (zum Review u.a.: Craig et al., 1993, Young et al., 2001). Chaperone übernehmen in der Zelle weitere Aufgaben, wie z.B. beim Proteinabbau und bei regulatorischen Funktionen während der Replikation und Transkription (Helmbrecht et al., 2000, Jolly und Morimoto, 2000). In keimenden Sporen von *G. intraradices* konnten unterschiedliche Transkripte, die für Chaperone kodieren, isoliert werden. Gleichzeitig ließen sich Gene für eine Endopeptidase sowie für eine Untereinheit des Proteasoms in der cDNA-Bank identifizieren, wodurch eine mögliche Funktion der Chaperone im Abbau von Proteinen liegen könnte.

Die aus dem Proteinabbau gewonnenen Aminosäuren dienen unter anderem für die Bildung anderer Proteine für deren Synthese ebenfalls EST's identifiziert wurden. Bei der Bildung von Glutamin aus Glutamat durch die Glutamin-Synthetase erfolgt gleichzeitig auch eine Fixierung von Stickstoff in Form von Ammonium (s. Abb. 5-1). Expressionsstudien des während der asymbiotischen Phase isolierten Gens für die

Glutamin-Synthetase wurde bereits in *G. mosseae* und *G. intraradices* durchgeführt (Breuniger et al., 2004) (siehe 5.2.1 und 5.4).

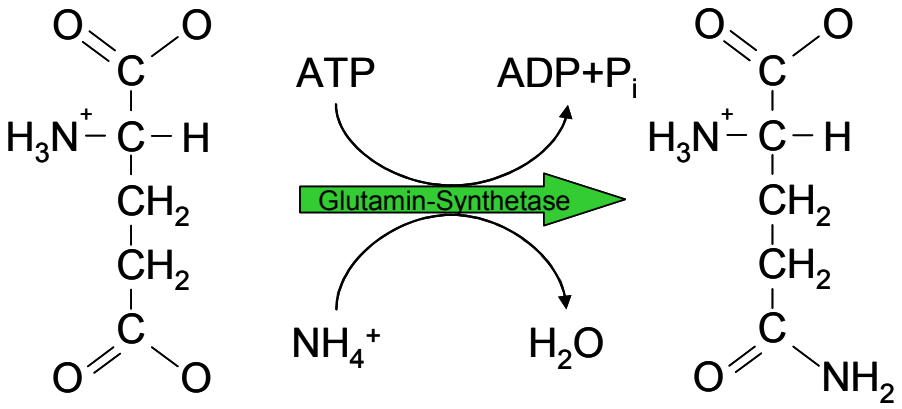


Abbildung 5-1: Darstellung der Glutamin-Synthetase Reaktion.

Chaperone, insbesondere die Hitzeschockproteine, übernehmen in der Zelle auch wichtige Funktionen bei der Signaltransduktion (Richter und Buchner, 2001, Nollen und Morimoto, 2002, Pratt und Troft, 2003). Diese Prozesse verlaufen über Interaktionen mit Hormonrezeptoren, Kinasen oder Zellzyklusregulatoren. Weitere Komponenten der Signaltransduktion, deren Gene im Rahmen dieser Arbeit isoliert wurden, sind die für die Casein Kinasen 1 und 2. Ihre Aufgaben sind ebenfalls sehr vielseitig und liegen z.B. in der Zellzyklusregulation, der Zellteilung oder der Apoptose (Litchfield, 2003, Wang et al., 1992, Hoekstra et al., 1994). Über die Funktion von Proteinen aus den Signalübertragungsprozessen innerhalb der AM-Pilze lassen sich nur Vermutungen anstellen, da bisher weder ein Transformationssystem entwickelt noch Mutanten bekannt sind. Sie könnten aber eine Rolle bei der Wahrnehmung ihrer Umweltbedingungen spielen, z.B. für die Aktivierung der Keimung durch einen Temperaturreiz nach einer Kälteperiode (Juge et al., 2002). Des Weiteren könnten solche Proteine bei der Signaltransduktion beim Übergang von der asymbiotischen in die präsymbiotische Phase, nach der Erkennung von Signalen in den Wurzelexsudaten, beteiligt sein (Tamasloukht et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden während der asymbiotischen Entwicklung auch eine Vielzahl von Transkripten für Proteine der Stressantwort, wie z.B. einer Superoxid-Dismutase oder verschiedener Glutathion-Transferase identifiziert. In keimenden Sporen von *G. mosseae* und *G. margarita* Sporen sowie während der

Symbiose zwischen *Lotus japonicus* und *G. margarita* wurde die Expression einer CuZn-Superoxid-Dismutase nachgewiesen (Palma et al., 1993, Lanfranco et al., 2005). Über den Abbau der Speicherstoffe und dessen Verstoffwechslung entstehen, insbesondere bei der Atmung, Sauerstoffradikale die auch über die identifizierten Enzyme wieder unschädlich gemacht werden (McCord und Fridovich, 1969, Fridovich, 1995, Natvig et al., 1996).

Ein weiteres Gen, welches in der Stressantwort eine Rolle spielen könnte, ist die Glyoxaloxidase, dessen Expression in extraradikulärem Myzel durch Schwermetalle erhöht war (Waschke et al., 2006). Jun et al. konnten 2002 bereits das Transkript einer Glyoxaloxidase aus keimenden Sporen isolieren, deren Sequenz aber weder mit der in dieser Arbeit isolierten noch mit der durch Schwermetalle induziertem Transkript identisch ist (s. im Anhang Abb. A-1). Das Substrat der Glyoxaloxidasen ist unter anderem Glyoxal, dass durch den Abbau der Linolensäure über die Lipid Peroxidation entstehen kann (Watanabe et al., 2001), die eine mögliche zelluläre Antwort auf Schwermetalle darstellt (Schutzendübel und Polle, 2002). Bei der Reaktion der Glyoxaloxidase werden Aldehyde zu Carbonsäuren reduziert, wobei Wasserstoffperoxid entsteht (s. Abb. 5-2). Daher könnte dieses Enzym ein Schlüsselfaktor zwischen des auslösenden Stressors und des weiteren Signals der reaktiven Sauerstoffverbindungen darstellen (Waschke et al., 2006).

$$RCHO + O_2 + H_2O \longrightarrow RCOOH + H_2O_2$$

Abbildung 5-2: Schematische Darstellung der Glyoxaloxidase Reaktion.

Die Glyoxaloxidase könnte aber noch weitere Funktionen während der Besiedlung pflanzlicher Wurzeln übernehmen (s. 5.2.2).

5.2 Identifizierung von Transkripten während der symbiotischen Entwicklung des arbuskulären Mykorrhizapilzes *Glomus intraradices*

Die Mehrzahl der exprimierten Gene während der symbiotischen Entwicklung arbuskulärer Mykorrhizapilze wurde aus extraradikulärem Myzel identifiziert. Durch die Verwendung von geteilten Platten (s. Abb. 3-2) ist die Gewinnung dieser Hyphen unter sterilen Bedingungen leicht möglich. Das Cytoplasma zieht sich jedoch nach wenigen Tagen wieder zurück, und die einzelnen Hyphen sind metabolisch inaktiv.

Daher ist das Alter des Myzels für die RNA-Isolierung zu berücksichtigen (Sylvia, 1988). Die erste cDNA-Bank wurde im Jahre 2001 aus extraradikulären Hyphen erstellt (Sawaki und Saito, 2001). Von den 150 isolierten Genfragmenten wiesen 31 Sequenzähnlichkeiten zu Genen mit *housekeeping* Funktionen, wie z.B. der Proteinbiosynthese, auf. Eine mögliche Ursache für diese geringe Anzahl ist, dass aus dieser Gruppe von Pilzen bislang nur sehr wenige Sequenzinformationen vorliegen.

Weitere bekannt Genfragmente stammen aus cDNA-Banken aus extraradikulärem Myzel, die z.B. mit phosphatmangel- oder schwermetallinduzierten Genen angereichert waren (Rhody, 2003, Waschke et al., 2006). Die Isolierung von wenigen Genfragmenten geschah auch zufällig während anderer Untersuchungen, wie z.B. bei dem Ammonium-Transporter aus *G. intraradices* (López-Pedrosa et al., 2006).

Zur Erweiterung der bisherigen Datenmenge der symbiosespezifischen Gene des Modellmykorrhizapilzes *G. intraradices* wurden im Rahmen dieser Arbeit weitere cDNA-Banken erstellt.

5.2.1 Extraradikuläres Myzel

In der während dieser Arbeit zu erstellenden cDNA-Bank sollte der Gehalt an *housekeeping* Genen möglichst gering gehalten werden. Daher erfolgte eine Subtraktion der exprimierten Gene der asymbiotischen Phase von denen des extraradikulären Myzels. Hierdurch sollten sich speziell symbiosespezifische Gene anreichern lassen.

Die Analyse der 29 Genfragmente, die auf eine differentielle Expression hindeuteten, ergab, dass es sich dabei ausschließlich um rDNA-Sequenzen handelt. Dies könnte auf einen besonders aktiven Stoffwechsel der extraradikulären Hyphen hindeuten. Die Ergebnisse der BlastN Algorithmen wiesen jedoch Ähnlichkeiten zu Sequenzen verschiedene *G. intraradices* Isolate auf (s. Tab. 4-2). Hierbei sind die Sequenzunterschiede zwar minimal, aber signifikant (s. im Anhang Abb. A-2). Solche geringen Ungleichheiten in rDNA, ITS und auch proteinkodierenden Sequenzen, die aus Sporen von mehreren AM-Pilzen gewonnen wurden, sind nicht ungewöhnlich (Sanders et al., 1995, Clapp et al., 1999, Sanders, 2002, Jansa et al., 2002, de Souza et al., 2004, Corradi et al., 2004). Wodurch es zu dieser Heterogenität in den Sequenzen kommt, wird unterschiedlich diskutiert. Einerseits könnten sich die unterschiedlichen Allele eines Gens in verschiedenen Zellkernen befinden (Kuhn et

al., 2001, Hijiri und Sanders, 2004). Andererseits ist es möglich, dass die Allele auf verschiedenen Chromosomen in einem Zellkern (Polyploidie) auftreten (Pawlowska und Taylor, 2004).

Im Gegensatz dazu sind die rDNA-Sequenzen der großen Untereinheit in den Mitochondrien sehr homogen (Raab et al., 2005). Um aus den übrigen Genfragmente der cDNA-Bank nur proteinkodierende Gene zu isolieren, wurden diese mit rDNA spezifischen Sonden hybridisiert und die positiven Klone von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Dadurch ließen sich sieben weitere Genfragmente identifizieren, die jedoch keine Ähnlichkeiten zu bekannten Sequenzen aufwiesen (s. Tab. 4-3).

Infolgedessen wurde eine weitere cDNA-Bank aus RNA von extraradikulären Hyphen erstellt. Durch die Subtraktion spezifischer PCR-Produkte der rDNA-Fragmente sank deren Anzahl auf 10% der insgesamt erzeugten Klone.

Wie bereits in den keimenden Sporen wurden Gene im ERM isoliert die für Proteine des Cytoskeletts kodieren. Das Cytoskelett des Myzels dürfte ähnliche Aufgaben übernehmen wie das in der Keimhyphe der Sporen, z.B. beim Nährstofftransport (Bago et al., 2002a und b). Weitere Funktionen liegen indirekt auch im Spitzenwachstum der Hyphen, wie in *Aspergillus nudulans* gezeigt wurde (Sampson und Heath, 2005). Das Wachstum der Hyphen verlangsamte sich lediglich nach der Zerstörung der Mikrotubuli. Dieser indirekte Einfluss könnte am behinderten Transport der Vesikel, der Zellkerne, der Vakuolen, der Mitochondrien oder des Endoplasmatischen Retikulums liegen (Sampson und Heath, 2005, Wedlich-Soldner et al., 2002, Wu et al., 1998, Steinberg et al., 1998). Mikrotubili übernehmen Aufgaben bei der Hyphenverzweigung in *Neurospora crassa* (Mouriño-Pérez et al., 2006), dies könnte in AM-Pilzen u.A. für die Ausbildung der so genannten „*branched absorbing structures“* (Bago et al., 1998) zutreffen.

Zusätzlich ließen sich regulierende Proteine des Cytoskeletts, wie die Rho-GTPasen aus der Ras-Superfamilie identifizieren (Etienne-Manneville und Hall, 2002). Diese Familie der kleinen G-Proteine stehen für eine Vielzahl verschiedener Signalproteine, deren regulatorische Funktionen sehr vielfältig sind (Wennerberg et al., 2005). Darunter fallen unter anderem die Genexpression, die Zelldifferenzierung, die Endo- und Exocytose, die Koordination des Cytoskeletts und die Regulation der Replikation (Etienne-Manneville und Hall, 2002, Ridley, 2001, Wennerberg et al., 2005).

Die Replikation in extraradikulären Hyphen wurde bislang noch nicht untersucht, sie ließ sich jedoch schon im intraradikulären Myzel nachweisen (Bonfante und Perotto,

1995). Hinweise auf den Zellzyklus und somit auch auf die Replikation im ERM liefern die Isolierung verschiedener Zellzyklusgene in dieser Arbeit und die Expressionsanalysen des TOR2-Gens in *G. mosseae* (Requena et al., 2000). Dieses Gen kodiert für einen Kontrollpunkt des Zellzykluses.

Unter den während dieser Arbeit isolierten Genen befanden sich außerdem weitere Transkriptionsfaktoren und viele Gene des Proteinstoffwechsels, wie Translationsfaktoren, Peptidasen, Chaperone und Ubiquitin. Eines der klonierten Genfragmente wies eine hohe Sequenzähnlichkeit zu dem Stickstoffmetabolismus regulierendem Protein NmrA auf, das als Transkriptionsfaktor agiert. NmrA reguliert u.A. die Expression des Gens der Nitrat-Reduktase, deren Transkript in den Arbuskeln von *G. intraradices* akkumuliert (Kaldorf et al., 1998). Nitrat-Reduktase-Aktivität wurde bereits in keimenden Sporen von *G. mosseae* und in mykorrhizierten Wurzeln gezeigt (Ho und Trappe, 1975, Subramanian und Charest, 1998). In der Anwesenheit von Ammonium und Glutamin reprimiert NmrA die Expression der Nitrat-Reduktase (Lamb et al., 2003, Wilson und Arst, 1998), damit diese favorisierten N-Quellen genutzt werden. Expressionsstudien des NmrA-Gens liegen bisher noch nicht vor. Eine mögliche Ammonium- und Glutaminquelle innerhalb der Zelle stellt der ständige Auf- und Abbau von Proteinen dar, wodurch wiederum die Expression der Nitrat-Reduktase reprimiert sein müsste. Hierüber könnten Expressionsstudien mit unterschiedlichen Stickstoffformen im Medium Aufschluss geben.

Mit einem Ammonium-Transporter ließ sich ein weiteres Gen des Stickstoffstoffwechsels identifizieren, dessen Expression bereits unter verschiedenen Stickstoffbedingungen untersucht wurde (López-Pedrosa et al., 2006). Das Transporter-Gen wird auch in den extraradikulären Hyphen, deren Kultivierung ohne Ammonium im Medium erfolgte, transkribiert. Daher könnte es sich zusätzlich um einen Sensor für Ammonium handeln (López-Pedrosa et al., 2006).

Phosphat ist jedoch das Hauptelement, das bei mykorrhizierten Pflanzen zum verbesserten Wachstum beiträgt (Smith und Read, 1997). Dabei nehmen die AM-Pilze das Phosphat nicht nur für den Transport zur Pflanzen auf, sondern nutzen es auch selbst, z.B. bei der oxidative Phosphorylierung. Bei einem der isolierten Gene könnte es sich um eines für einen mitochondriellen Phosphat-Transporter handeln. Dieser Transporter ist an der inneren Membran des Mitochondriums lokalisiert und schleust das P_i ins Innere (Phelps et al., 1996).

Als ein weiteres Transportprotein ließen sich im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Transkripte von Aquaporinen isolieren. Aquaporine sind Membranproteine, die in erster Linie für den Transport von Wasser verantwortlich sind (Chrispeels und Agre, 1994), transportieren aber auch andere kleine Moleküle (Agre et al., 2002, Verkman und Mitra, 2000). In filamentösen Pilzen spielen die Aquaporine eine besondere Rolle bei der Nährstoffaufnahme, Osmoregulation und weiteren Transportprozessen (Pettersson et al., 2005). In arbuskelhaltigen Zellen ist die Expression von Aquaporinen erhöht (Krajinski et al., 2000, Roussel et al., 1997). Hier puffern sie vermutlich die osmotischen Fluktuationen dieser stark kompartimentierten Zellen. Eine Reihe von osmotisch aktiven Substanzen lassen sich auch in den pilzlichen Strukturen finden, wie Polyphosphat und diverse C-Verbindungen.

In *Saccharomyces cerevisiae* wurde eine weitere Funktion der Aquaporine identifiziert. Deletionsmutanten bildeten unter Nährstoffmangel weniger Sporen, diese wiederum wiesen eine schlechtere Fitness auf (Sidoux-Walter et al., 2004). Hier verhindern die Aquaporine die Einlagerung von zu viel Wasser neben den Speicherstoffen. In den sich bildenden Tochtersporen der AM-Pilze reichern sich ebenfalls Speicherstoffe an (Bago et al., 1999) und Aquaporine könnten eine Einlagerung von Wasser verhindern.

Für die Synthese der Speicherstoffe erhalten die AM-Pilze Hexosen von ihrem pilzlichen Partner (Smith und Read, 1997). Diese werden ins ERM transportiert und von dort aus in die sich bildenden Sporen eingelagert (Trepanier et al., 2005, Bago et al., 2003, Bago et al., 2002a). Außerdem ließen sich aktive Enzyme der Glykolyse, des Zitronensäurezykluses, des Pentosephosphatweges und des Glyoxylatzykluses nachweisen (Macdonald und Lewis, 1978, Saito, 1995). Gene, die für Enzyme aus diesen Stoffwechselwegen kodieren könnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit aus dem ERM isoliert (s. Tabelle 4-4). Nur in den intraradikulären Hyphen können die AM-Pilze bestimmte Fettsäuren, insbesondere die Palmitinsäure, synthetisieren (Trépanier et al., 2005). Diese dienen für die Bildung der Triazylglyzeride (TAG), der Hauptspeicherverbindung der AM-Pilze (Beilby und Kidby, 1980, Jabajihare, 1988). Eine Modifikation der Fettsäuren der TAG könnte auch innerhalb des extraradikulären Myzles erfolgen (Trépanier et al., 2005). So wurden in der vorliegenden Arbeit Gene für eine Fettsäure-Oxygenase und für eine Δ-9-Fettsäure-Desaturase identifiziert. Die TAG könnten aber schon in den Hyphen teilweise wieder abgebaut werden, da sich das Transkript eines Fettsäure-oxidierenden-

Multienzymkomplexes (FOX2) isolieren ließ.

AM-Pilze können Acetat und Glyzerin über die extraradikulären Hyphen ins Cytoplasma aufnehmen und für die Synthese von Glykogen und Trehalose nutzen (Pfeffer et al., 1999). Diese beiden Verbindungen sind in den ersten Tagen der Sporenkeimung leicht verfügbare Energiequellen für die AM-Pilze (Bécard et al., 1991, Bago et al., 1999). Ein Indiz für den Abbau dieser Speicherstoffe bereits im ERM ist die Identifizierung von Genen einer Glykogen-Phosphorylase und einer neutralen Trehalase. Dies könnte zur Pufferung des Glukosespiegels in den pilzlichen Strukturen dienen (Bago et al., 2003).

Die Aufgaben des extraradikulären Myzels sind sehr abwechslungsreich und daher ist die Vielfalt der exprimierten Gene deutlich gegenüber denen in keimenden Sporen erhöht. So nutzten die AM-Pilze die Hyphen, um neue Wurzeln zu besiedeln und bilden dort neue Sporen. In der asymbiotischen Phase laufen dagegen vermutlich nur die notwendigsten Prozesse ab, wodurch nur wenige der Speicherstoffe aufgebraucht werden.

5.2.2 Intraradikuläres Myzel

Die Isolierung einer größeren Anzahl exprimierter Gene direkt aus intraradikulären Myzel (IRM) ist bisher nicht gelungen, da noch keine Methode für die Extraktion intakter pilzlicher RNA aus mykorrhizierten Wurzeln existiert. Allerdings wurden einzelne Gene der AM-Pilze als Nebenprodukt in cDNA-Banken mykorrhizierter Wurzeln identifiziert, wie z.B. das Gen für einen Phosphat-Transporter von *G. versiforme* (Harrison und van Buuren, 1995). Für das Verständnis der obligat biotrophen Lebensweise der AM-Pilze müssen Informationen über mehr exprimierte Gene des intraradikulären Myzels gesammelt werden, denn pflanzliche Signalstoffe innerhalb der Wurzel ermöglichen vermutlich erst deren Expression (Trépanier et al., 2006, Bago und Bécard, 2002). Beispielsweise ließ sich die Synthese der Palmitinsäure nur im IRM nachweisen (Trépanier et al., 2006).

Daher war eines der Ziele dieser Arbeit transkribierte Gene der intraradikulären Strukturen von *G. intraradices* zu klonieren und zu identifizieren. Hierfür wurde die Symbiose mit der Modellpflanze *Medicago truncatula* gewählt, da bereits sehr viele Sequenzinformationen von dieser Pflanze vorliegen. Die Unterscheidung zwischen pflanzlichen und pilzlichen Gene sollte dadurch erleichtert werden. Um gleichzeitig möglichst viele pilzliche Gene zu identifizieren, wurden die mykorrhizierten Wurzeln

mit einer Glukoselösung behandelt. Das Wachstum des intraradikulären Myzels ließ sich in vorangehenden Studien durch die Zugabe von Glukose anregen (Douds et al., 2002).

In der erstellten cDNA-Bank deuteten jedoch nur 52 der 480 klonierten Genfragmente auf einen pilzlichen Ursprung und zugleich auf eine differentielle Expression hin. Weitere Analysen ergaben aber, dass es sich größtenteils um Gene von *M. truncatula* handelte. Diesen Genen wurde wohl fälschlicherweise ein pilzlicher Ursprung zugewiesen, da die Sequenzen mit großer Wahrscheinlichkeit hoch homologe Bereiche enthielten und dadurch Kreuzhybridisierungen möglich waren. Dem Pilz *G. intraradices* ließen sich nur zwei der Genfragmente zuordnen (s. Abb. 4-2).

Eines der beiden Gene kodiert vermutlich für eine Glyoxaloxidase. Dieses Enzym wirkt am Abbau von Lignin mit und ist in pathogenen Pilzen für eine erfolgreiche Besiedlung der Wurzel notwendig (Whittaker et al., 1999). In AM-Pilzen könnte eine Glyoxaloxidase für die Wurzelbesiedlung durch die Keimhyphen oder die Hyphen des extraradikulären Myzels eine entschiedene Rolle spielen (Garcia-Garrido et al., 2000, Jun et al., 2002, Harrison, 1999). Außerdem sind für die Ausbildung der Arbuskeln auch Zellwände zu durchbrechen. Neben des im Rahmen dieser Arbeit isolierten Glyoxaloxidase-Gens wurden bereits zwei weitere Transkripte isoliert (Jun et al., 2002, Rhody, 2003). Die Sequenzen weisen große Unterschiede auf (s. im Anhang Abb. A-1) und übernehmen somit vielleicht unterschiedliche Aufgaben innerhalb der Zelle (s. auch 5.1).

Das zweite aus *G. intraradices* isolierte Gen könnte laut Sequenzanalyse für das Hitzschockprotein Hsp70 kodieren. Diese Proteinfamilie übernimmt vielfältige Funktionen, unter anderem die Faltung neu gebildeter Proteine, die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Aufgaben bei der Replikation (Helmbrecht et al., 2000, Jolly und Morimoto, 2000). Unter Stressbindungen kommt es zu einer sehr starken Expression dieser Proteine. Die Hitzeschockproteine schützen stresslabile Proteine und bauen geschädigte Proteine ab (Zylicz et al., 2001, Skowyra et al., 1990, Wickner et la., 1999), wodurch sich die Überlebenschancen der Zelle erhöhen.

Die Auswertung der Daten ergab, dass die Methode der SSH nicht für die Isolierung von Genen AM-Pilze während der symbiotischen Entwicklung geeignet ist. Gleichzeitig wurden fast ausschließlich pflanzliche Gene isoliert. Die Entwicklung einer Methode zur direkten Isolierung der RNA aus dem intraradikulären Myzel der

AM-Pilze könnte zum Erfolg führen. Bisher besteht nur die Möglichkeit, gezielt Gene aus bestimmten Entwicklungsphasen der AM-Pilze zu isolieren, in dem degenerierte Oligonukleotide verwendet werden. Ein Glykogen-Synthase-Gen wurde durch diese Methode aus *G. intraradices* amplifiziert und kloniert (Bago et al., 2003). In Zukunft wird die Analyse der Genexpression von *G. intraradices* durch die begonnene Sequenzierung des Genoms vereinfacht. Nach Auswertung der ersten Daten ließ sich bereits ein Gen für eine meiosespezifische Rekombinase identifizieren (Lammers et al., 2006).

In der cDNA-Bank aus dieser Arbeit wurden einige mykorrhizaregulierte Gene von *M. truncatula* ermittelt. Darunter fanden sich die Gene für eine Glutathion-Transferase (GST) und einer Rio-Kinase, deren Expressionsmuster über quantitative Real-Time-PCR ermittelt wurden (s. Abb. 4-3). *G. intraradices* regulierte die Transkription dieser Gene in den untersuchten Wurzeln jedoch herunter. Eine erhöhte Expressionsstärke ließ sich nur für die Rio-Kinase in der Topfkultur zeigen.

Durch Promotor- und Expressionsstudien ließ sich allerdings schon eine Induktion der Aktivität bzw. RNA-Akkumulierung durch die Kolonisierung mit einem AM-Pilz nachweisen (Strittmatter et al., 1996, Wulf et al., 2003). Dabei konnte in *Solanum tuberosum* eine spezifische Induktion der Promotoraktivität in arbuskelhaltigen Zellen gezeigt werden (Strittmatter et al., 1996), während in *M. truncatula* der Promotor auch in angrenzenden Zellen aktiviert wird und die Expression in den Wurzeln anstieg (Wulf et al., 2003). Bei dem während dieser Arbeit isolierten GST-Gen (*MtGST8*) konnte keine verstärke Expression durch die Kolonisierung mit *G. intraradices* festgestellt werden. Sowohl die GST-Gene von *M. truncatula* als auch das GST1-Gen von *S. tuberosum* ließen sich in die Tau-Klasse der Glutathion-Transferasen einteilen (s. Abb. 5-3), einer pflanzenspezifischen Klasse (Dixon et al., 2002). Im Durchschnitt haben die bisher untersuchten Pflanzen 20 bis 25 Gene aus dieser Klasse, die alle regulatorische Funktionen beim oxidativen Stress übernehmen (Kilili et al., 2002). Die wahrscheinlich entgegengesetzte Regulation des *MtGST8*-Gens könnte aber an einer möglichen anderen Funktion innerhalb der Zelle liegen, wie schon für andere GST's der Tau-Klasse beschrieben (Kilili et al., 2002). Für eine genauere Aussage über die Expression wären weitere Studien unter anderen Stressbedingungen oder auch Promotoranalysen notwendig.

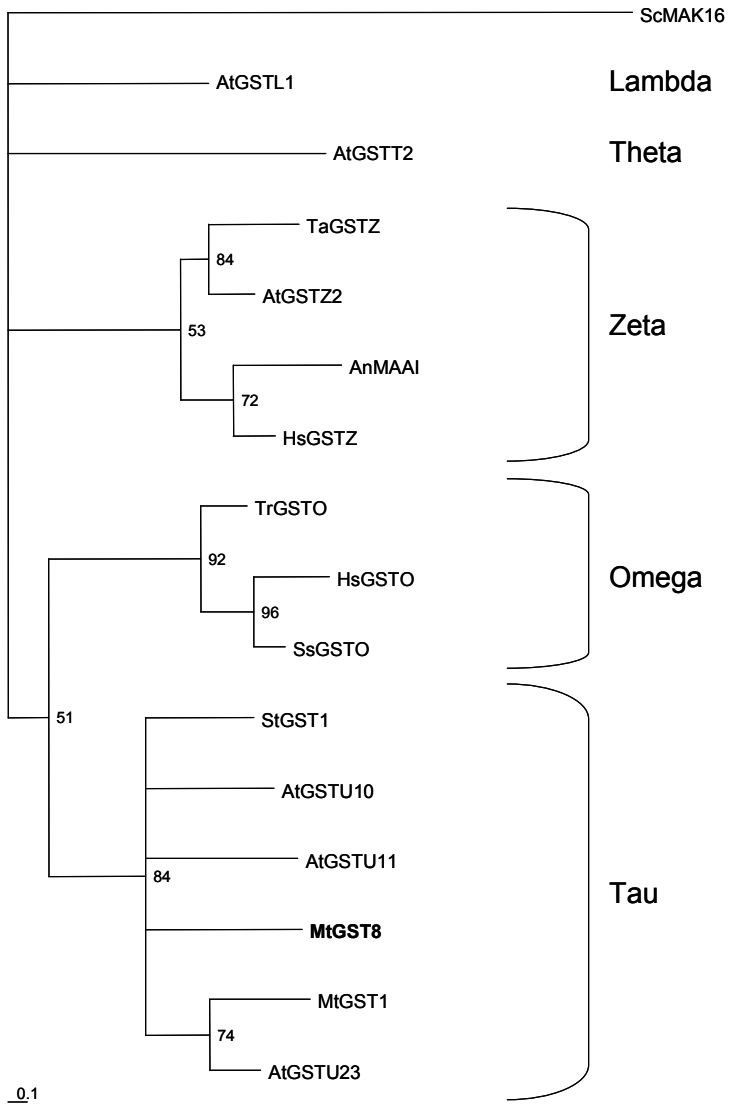


Abbildung 5-3: Phylogenetischer Stammbaum pflanzlicher Glutathion-Transferasen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen des während dieser Arbeit isolierten Glutathioin-Transferase-Gens *MtGST8* (diese Arbeit) wurde mit den mykorrhizainduzierten Genen von *M. truncatula MtGST1* (Wulf et al., 2003) und von *S. tuberosum StGST1* (Strittmatter et al., 1996) unter der Verwendung von ClustalW mit folgenenden Sequenzen aus verschiedenen GST-Klassen verglichen: Lambda Protein von *Arabidopsis thaliana* (AL162973); Theta Protein von *A. thaliana* (NM_123489); Proteine der Zeta Klasse von *Triticum aestivum* (AAB60886), *A. thaliana* (NM_126295), *Aspergillus nidulans* (O43123) und *Homo sapiens* (AAB96392); Omega Klasse Proteine von *Takifugu rubripes* (AAL08414), *H. sapiens* (NP_899062) und von *Sus scrofa* (NP_999215) und Tau-Proteinen von *A. thaliana*: AtGSTU10 (NM_106118), AtGSTU11 (NM_105661) und AtGSTU23 (NM_106481). Als *Outgroup* diente das MAK16 Protein von *S. cerevisiae* (NP_009377). Der Sequenzvergleich wurde phylogenetisch mit dem Programm PUZZLE unter 1000 Wiederholungen analysiert und der Stammbaum mit dem Programm TREEVIEW erstellt.

Die Expressionsstärken des Rio-Kinase-Gens lieferten widersprüchliche Ergebnisse, da in der Topfkultur eine erhöhte Expression durch die Mykorrhiza erzielt wurde, während sie sich in den mykorrhizierten Wurzeln aus der *in vitro* Kultur reduzierte. Dies verdeutlicht insbesondere, dass die Daten aus der Wurzelkultur nur Hinweise geben und weitere Untersuchungen erforderlich sind, um gesicherte Aussagen treffen zu können.

5.3 Phosphat-Transporter von *Glomus intraradices*

Der Wachstumseffekt mykorrhizierter Pflanzen beruht oft auf einer verbesserten Phosphat-Versorgung dieser Pflanzen (Smith und Read, 1997). Die pilzlichen Hyphen können den Wurzelraum für die Pflanze erheblich erweitern und vermutlich auch über eigene Exsudate das Phosphat aus dem Boden lösen (Tawaraya et al., 2006). Daher ist der Transport des Phosphats durch die AM-Pilze besonders interessant.

In keimenden Sporen von *G. margarita* nimmt der Keimschlauch anorganisches Phosphat parallel über ein *high affinity* und ein *low affinity* System auf (Thompson et al., 1990). Das erste *high affinity* Transportsystem aus einem AM-Pilz wurde bereits 1995 molekularbiologisch charakterisiert (Harrison und van Buuren, 1995). In den folgenden Jahren ließen sich die homologen Systeme in *G. intraradices* und *G. mosseae* isolieren und analysieren (Maldonado-Mendoza et al., 2001, Benedetto et al., 2005). Die Expressionsmuster weisen auf eine unterschiedliche Regulation in den drei Organismen hin. *G. versiforme* (*GvPT*) exprimiert den Transporter nur in den extraradikulären Hyphen, während *G. mosseae* (*GmosPT*) das Gen auch im IRM transkribiert (Harrison und van Buuren, 1995, Benedetto et al., 2005). Das Gen des Phosphat-Transporters (*GiPT*) lässt sich in den extraradikulären Hyphen von *G. intraradices* durch erhöhte Phosphatbedingungen im Medium regulieren (Maldonado-Mendoza et al., 2001).

Ein dem Phosphat-Transport assoziiertem Protein kodierendes Gen befand sich unter den isolierten *EST's* der asymbiotischen Phase. Die cDNA-Sequenz weist sehr hohe Ähnlichkeiten zum Gen für Pho88p aus *S. cerevisiae*, einem Membranprotein, auf. Sowohl in Deletions- und Überexpressionsmutanten war die Phosphat-Aufnahme reduziert (Yompakdee et al., 1996b). Dieses Protein greift vermutlich über die Interaktion mit Pho81p regulatorisch in den Phosphat-Transport ein (Yompakdee et al., 1996b, Oshima, 1997). Unter phosphatlimitierenden Bedingungen steigert Pho88p zusammen mit Pho86p die Pho81p-Aktivität in den Hefezellen. Das Pho81p wiederum aktiviert die Transkription der PHO-Gene (Yompakdee et al., 1996a, Oshima, 1997, Persson et al., 2003).

Die Expression der Gene des Phosphat-Transporter (*GiPT*) und des dem Phosphat-Transport assoziierten Proteins (*GiPTaP*) wurden in den einzelnen Stadien des Lebenszykluses sowie während der Besiedlung von *M. truncatula* untersucht (s. Abb. 4-5). Die Transkription von *GiPT* ließ sich durch eine erhöhte

Phosphat-Konzentration im Medium reprimieren (Maldonado-Mendoza et al., 2001). Eine Steigerung der Expression um das 52-fache wurde durch die zusätzliche Glukose im intraradikulären Myzel erreicht.

Stehen mykorrhizierten Wurzeln mehr Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung, führte dies im extraradikulären Myzel von *G. intraradices* zu einer Steigerung der P_i-Aufnahme sowie zu einer Stimulierung des P_i-Transports zur Wurzel (Bücking und Shachar-Hill, 2005). Die gleiche Rückkopplung wurde bei *G. margarita*, durch die Reduktion an Poly-Phosphat im IRM nach der Zufuhr von Glukose und Saccharose, dokumentiert (Solaiman und Saito, 2001). Eine Wirkung auf die Expression von *GiPT* im extraradikulären Myzel von *G. intraradices* hat die Verfügbarkeit an Kohlenhydraten im IRM allerdings nicht (Olsson et al., 2006). Daher scheint bislang nur der externe Phosphat-Gehalt die Expression des Phosphat-Transporters im ERM zu beeinflussen.

Durch die Verwendung von mykorrhizierten MtSucS1-*antisense* Pflanzen ließ sich der Zusammenhang zwischen Kohlenhydraten und der Expression des Phosphat-Transporter-Gens im IRM bestätigen (s. Abb. 4-5). Die Unterdrückung der Translation der Saccharose-Synthase könnte den Transport der Hexosen zwischen den beiden Organismen stören (Hohnjec, 2001), wodurch sich die Versorgung des Pilzes verschlechtert. Die Expression in den intraradikulären Hyphen war sehr gering und reduzierte sich in den *antisense* Pflanzen nochmals. Diese geringeren Expressionsstärken lassen sich jedoch nicht durch eine schlechtere Mykorrhizierung erklären, wobei in den Antisensepflanzen weniger Arbuskeln zu beobachten waren. Die Steigerung der Expression nach acht Wochen deutet auf einen erhöhten Bedarf an Kohlenhydraten z.B. für die Sporenbildung hin. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen steht das gleich bleibende Expressionsmuster des Transportergens während der Besiedlung der Wurzeln von *Pisum sativum* und der entsprechenden Mutante (RisNod24). Dies könnte durch die mögliche Aufnahme der Kohlenhydrate über die intraradikulären Hyphen erklärt werden (Ferrol et al., 2002), da die Mutante keine Arbuskeln mehr ausbildet (Gianinazzi-Pearson, et al., 1991).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse von *GiPTaP* weisen in der *in vitro* Kultur ein ähnliches Muster auf, jedoch mit geringeren Niveauunterschieden (s. Abb. 4-5). Während der Besiedlung der *M. truncatula* und *P. sativum* Varianten nahm die Expression über den untersuchten Zeitverlauf ab. Die Expressionsstärke ist jedoch im Vergleich zu der von *GiPT* deutlich erhöht. Dies deutet auf die Beteiligung an

einem anderen Transportkomplex hin. Solch ein Transport-Komplex wäre z.B. auch im Tonoplasten möglich, da der Transfer des Polyphosphates innerhalb der Hyphen in den Vakuolen erfolgt (Ezawa et al., 2001 und 2002).

In den Vakuolen wird das Polyphosphat vermutlich über eine Exopolyphosphatase wieder abgebaut und P_i wird frei (Ezawa et al., 2001). Über welche Mechanismen das P_i wieder ins Cytoplasma und anschließend in den Apoplasten transportiert wird sind zurzeit unbekannt. In *S. tuberosum* ließ sich jedoch kein Transportkomplex im Tonoplasten nachweisen (Gordon-Weeks et al., 2003), wobei es jedoch Hinweise auf einen ATP-abhängingen Transport gibt (Raghothama und Karthikeyan, 2005, Sakano et al., 1995). Außerdem könnte es sich bei dem Produkt von *GiPTaP* auch um einen Sensor des Phosphat-Gehaltes im Cytosol handeln, wie es auch beim Pho88p in Hefe vermutet wird, da über dieses Protein die Aktivität eines wichtigen Transkriptionsregulators der *PHO*-Gene, das Pho81p, reguliert wird (Yompakdee et al., 1996b, Oshima, 1997, Persson et al., 2003). Dies müsste allerdings für das Gen von *G. intraradices* zumindest in den entsprechenden Hefemutanten mittels heterologer Expression überprüft werden, da bislang für AM-Pilze kein Transformationssystem zur Verfügung steht.

5.4 Stickstoffaufnahme in keimenden Sporen

Stickstoff stellt neben Phosphat einen der limitierenden Nährstoffe der Pflanzen dar. Die Mykorrhizierung ermöglicht eine verbesserte Stickstoffversorgung der Pflanzen (Review: He et al., 2003). In vielen Studien wurde bereits die Aufnahme des Stickstoffs in verschiedenen Formen und dessen Transfer innerhalb des extraradikulären Myzels näher untersucht (z.B. Ames et al., 1983, Bago et al., 1996, Johanssen et al., 1996, Hawkins et al., 2000, Toussaint et al., 2004, Govindarajulu et al., 2005). Bisher gibt es kaum Untersuchungen über den Stickstoffmetabolismus in keimenden Sporen, sowie Hinweise über dessen Aufnahme. Einzig wurden bisher die Expression des Glutamin-Synthetase-Gens und die Aktivität der Nitrat-Reduktase in Sporen von *G. mosseae* nachgewiesen und untersucht (Breuninger et al., 2004, Ho und Trappe 1975). Auch die RNA-Akkumulierung des Glutamin-Synthetase-Gens ließ sich durch die Form der Stickstoffquelle in *G. intraradices* nicht beeinflussen, jedoch deren Enyzmaktivität (Breuninger et al., 2004) (siehe auch 5.1 und 5.4). Die Expression dieser Gene deutet auf die aktive Aufnahme von Ammonium bzw. Nitrat der keimenden Sporen hin. Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-PCR wurde

hingegen eine erhöhte Expression des Glutamin-Synthetase-Gens in den extraradikulären Hyphen durch Nitrat ermittelt (Govindarajulu et al., 2005), allerdings erfolgte die RNA-Isolierung erst drei Wochen nach Zugabe von Nitrat.

Eine Möglichkeit des Nachweises der Nitrat-Aufnahme geschieht über die Alkalisierung des Mediums (Marschner und Römheld, 1983, Marschner et al., 1986) und konnte für die Keimung von *G. rosea* Sporen im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden (s. Abb. 4-6 und 4-7). Die Aufnahme von Nitrat geschieht wie im ERM vermutlich über einen NO_3^-/H^+-Symporter (s. Abb. 5-2) oder NO_3^-/OH^--Antiporter (Bago et al., 1996). Die favorisierte Stickstoffquelle der meisten Organismen stellt jedoch Ammonium dar, da es im Boden leichter verfügbar ist. Dies konnte auch für AM-Pilze gezeigt werden (Johansen et al., 1993).

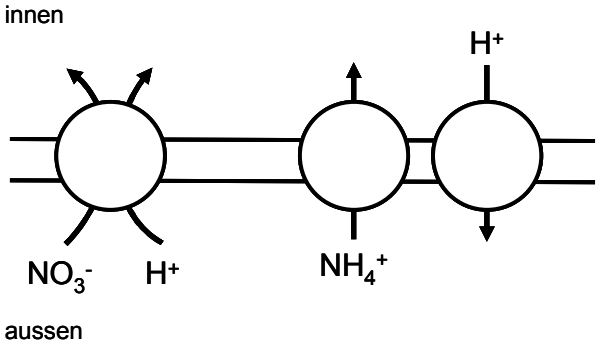


Abbildung 5-2. Darstellung der möglichen Transportmechanismen für Nitrat und Ammonium. (nach Forde, 2000)

Einen Hinweis auf die mögliche NH_4^+-Aufnahme der keimenden *G. rosea* Sporen gab ebenfalls eine Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich (s. Abb. 4-6 und 4-7). Für jedes aufgenommene Ammonium-Ion wird parallel ein Proton aus der Zelle bzw. ein Hydroxid-Ion herein transportiert (s. Abb. 5-2) (Ninnemann et al., 1994).

In einem weiteren Experiment stellte sich außerdem heraus, dass es auch zu einer Alkalisierung des Mediums kommt, wenn keine Stickstoffquelle zur Verfügung stand (s Abb. 4-7). Dies könnte auf den Transport eines anderen Elementes, z.B. das im verwendeten Medium enthaltene Sulfat hindeuten.

5.5 Differentielle Genexpression von ausgewählten *Glomus intraradices* Genen für Enzyme aus dem Kohlenhydratmetabolismus

In der arbuskulären Mykorrhiza ist der Nährstoffaustausch zwischen dem pilzlichen und pflanzlichen Partner eines der Hauptmerkmale der mutualistischen Interaktion

(Smith und Read, 1997). Während die Pflanze über die intraradikulären Strukturen des AM-Pilz besser mit Mikronährstoffen, wie z.B. Phosphat versorgt wird (s. 5.3), erhält der AM-Pilz von der Wirtspflanze im Gegenzug Kohlenhydrate, insbesondere in Form von Hexosen (Shachar-Hill et al., 1995, Solaiman und Saito, 1997, Smith und Read, 1997, Bago et al., 2000). AM-Pilze können Kohlenstoffverbindungen wie Glyzerin und Acetat (Lammers et al., 2001), jedoch keine Zucker (Pfeffer et al., 1989) über das extraradikuläre Myzel aufnehmen. Für die vegetative Vermehrung der AM-Pilze ist diese geringe Aufnahme jedoch nicht ausreichend. Kohlenstoff wird in den AM-Pilzen hauptsächlich als Triazylglyzeride (TAG) (Beilby und Kidby, 1980, Jabaji-Hare, 1988, Gaspar et al., 1997), sowie als Glykogen (Bonfante et al., 1994, Shachar-Hill et al., 1995) und Trehalose (Bécard et al., 1991) gespeichert. Daher besteht ein besonderes Interesse am Kohlenstoff- und Lipidstoffwechsel der AM-Pilze. Die Synthese der Fettsäuren und die der TAG stellen wichtige Aspekte in der obligat biotrophen Lebensweise der AM-Pilze dar (Trépanier et al., 2005, Pfeffer et al., 1999). Die Bildung der Palmitinsäure ließ sich ausschließlich im intraradikulären Myzel nachweisen (Trépanier et al., 2005). Der Transport der TAG und der Palmitinsäure in die extraradikulären Hyphen erfolgt wahrscheinlich über die Strömung des Cytoplasmas. Im ERM können die TAG für die Energiegewinnung genutzt (Lammers et al., 2001) oder in die sich bildenden Sporen eingelagert werden. Die Palmitinsäure wird im ERM modifiziert oder verlängert (Tépanier et al., 2005). Über ß-Oxidation der Fettsäuren und Glyoxylatzyklus hat der AM-Pilz dann die Möglichkeit im ERM und in keimenden Sporen die notwendigen Verbindungen für die Synthese von Kohlenhydraten (Gluconeogenese) bereitzustellen (Lammers et al., 2001, Bago et al., 2003). In zwei Studien wurde die Expression von Genen für Enzyme des C-Stoffwechsels (Bago et al., 2003, Lammers et al., 2001) untersucht, jedoch nicht während des gesamten Lebenszykluses.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA-Akkumulierung von Genen für Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels während des Lebenszyklus und bei erhöhter Verfügbarkeit von Glukose im IRM untersucht. Gleichzeitig erfolgte die Ermittlung der relativen Expressionsstärken der pilzlichen Gene bei der Besiedlung von unterschiedlichen Wirtspflanzen in der Topfkultur zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Identifizierung von geeigneten Genen erfolgte aus den während dieser Arbeit erstellten cDNA-Banken, aus der Literatur (Bago et al., 2003, Lammers et al., 2001) sowie mittels Durchsuchen von bestehenden Genbanken.

5.5.1 Expression in der Wurzelkultur

Mit Beginn der Keimung beginnen die AM-Pilze mit dem Abbau der leicht verfügbaren Speicherstoffe Glykogen und Trehalose (Bécard et al., 1991). Das Gen für eine neutrale Trehalase ließ sich in der cDNA-Bank aus Transkripten des ERM (s. Tab. 4-4) und während der asymbiotischen Lebensphase identifizieren (Jun et al., 2002). Der Abbau des Glykogen geschieht mittels der Glykogen-Phosphorylase, dessen Transkript in der Asymbiose isoliert wurde (s. Tab. 4-2). Weiterführende Expressionsstudien zu diesen Genen fanden im Rahmen dieser Arbeit nicht statt, sind in zukünftigen Untersuchungen aber mit einzubeziehen.

Die entstandenen Glukoseeinheiten gehen über die Glykolyse, den Citratzyklus oder den Pentosephosphatweg in den pilzlichen Stoffwechsel ein (Bago et al., 1999). Über die Bestimmung von Enzymaktivitäten konnten diese Stoffwechselwege während des asymbiotischen Wachstums von *G. mosseae* und *G. margarita* bereits nachgewiesen werden (Macdonald und Lewis, 1978, Saito, 1995). Einen Hinweis auf glykolytische Aktivität während der Keimung von *G. intraradices* liefert die Expression der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase in diesem Stadium (s. Abb 4-9).

Fünf Tage nach der Keimung beginnt sich der Gehalt an TAG zu reduzieren (Beilby und Kidby, 1980, Gaspar et al., 1994), vermutlich mittels einer membrangebundenen Lipase (Gaspar et al., 1997). Freiwerdende Fettsäuren werden über die ß-Oxidation zu Acetyl-CoA abgebaut, die zwei vorletzten Schritte dieser Reaktion katalysiert ein bifunktionales auf dem FOX2 Gen kodiertes Enzym (Hiltunen et al., 1992, Trotter, 2001). Ein mögliches FOX2-Transkript ließ sich in der cDNA-Bank aus keimenden *G. intraradices* Sporen isolieren (s. Tab. 4-1). Bei der durchgeführten Expressionsstudie von *GiFOX2* konnte die höchste RNA-Akkumulierung in der asymbiotischen Entwicklungsphase ermittelt werden (s. Abb. 4-9). Daraus lässt sich schließen, dass in sieben Tage lang gekeimten *G. intraradices* Sporen die Gewinnung von Energie, Reduktionsäquivalenten und Kohlenhydraten fast ausschließlich aus den Speicherlipiden erfolgt. Weitere Erkenntnisse über die Umstellung der C-Quelle auf molekularer Ebene könnten durch Expressionsstudien der Gene für FOX2, der neutralen Trehalase und der Glykogen-Phosphorylase in keimenden Sporen unterschiedlichen Alters gewonnen werden.

Eine *de novo* Synthese von Fettsäuren findet laut neuesten Studien nicht in der asymbiotischen Entwicklung statt. Die Fettsäureketten können jedoch verlängert oder modifiziert werden (Trépanier et al., 2005). Ein Indiz für eine Verlängerung der

freiwerdenden Fettsäuren liefert die Expression des Gens für ein Fettsäure elongierenden Enzym (*GiELO*) (s. Abb. 4-9). Eine Verlängerung der Fettsäuren könnte z.B. für die Bildung von Membramlipiden erforderlich sein.

Das aus der ß-Oxidation entstandene Acteyl-CoA kann unter anderem in den Citratzyklus eingeschleust werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Einschleusung in den Glyoxylatzyklus dar (Lammers et al., 2001), wie es auch beim Wachstum von Keimlingen ölhaltiger Samen (Eastmond et al., 2000) oder von Pilzen und Bakterien auf Medien mit Fettsäuren, Ethanol oder Acetat als einzige Energiequelle (Kornberg und Krebs, 1957) erfolgt. Mutanten, bei denen eines der beiden Schlüsselenzyme des Glyoxylatzyklus, die Isocitrat-Lyase oder die Malat-Synthase, funktionslos ist weisen ein reduziertes Wachstum auf solchen Medien auf (Lorenz und Fink, 2002, Cornah et al., 2004, Eastmond et al., 2000). Durch die Zugabe von Zuckern kann das Wachstum wieder Wildtyp-Niveau erreichen (Eastmond et al., 2000). Dieses reduzierte Wachstum führt bei pathogenen Organismen zur Avirulenz (McKinney et al., 2000, Lorenz und Fink, 2001, Wang et al., 2003), wodurch diese beiden Enzyme einen neuen Ansatzpunkt für die Entwicklung von Medikamenten darstellen (Ebel et al., 2006). Die Keimung von Arabidopsis-Samen, die eine funktionslosen Malat-Synthase besaßen, war allerdings nicht beeinträchtigt (Cornah et al., 2004). Für AM-Pilze könnte dies auch zutreffen, da für die Keimung zunächst Trehalose und Glykogen verbraucht werden und erst anschließend die Speicherlipide. Die Isolierung der Gene für die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase erfolgte bereits 2001 und standen so für Expressionsstudien zur Verfügung (Lammers et al., 2001). Eine Induktion der Transkription beider Gene ließ sich während der asymbiotischen Entwicklung von *G. intraradices* nachweisen (s. Abb. 4-9). Ein weiterer Hinweis auf den Glyoxylatzyklus in AM-Pilzen ist der Nachweis von Glyoxysom-ähnlichen Strukturen in den Hyphen der keimenden Sporen und des extraradikulären Myzels von *G. intraradices* (Bonfante et al., 1994, Bago et al., 1998, Lammers et al., 2001). Unter der Verwendung von spezifischen Inhibitoren der Schlüsselenzyme könnte die Funktion des Glyoxylatzyklus während der asymbiotischen und der präsymbiotischen Entwicklung, sowie für die Besiedlung der Wurzel von AM-Pilzen näher untersucht werden.

Der Glyoxylatzyklus übernimmt anaploretische Funktionen wenn dem Organismus ausschließlich Lipide als C-Quelle zur Verfügung stehen (s. Abb. 5-3). Bei der Spaltung von Isocitrat entstehen Glyoxylat und Succinat, letzteres wird über die

Reaktionen des Citratzyklus in Oxalacetat umgewandelt. Ein zweites Oxalacetat entsteht in den weiteren Schritten des Glyoxylatzyklus. Eines der gebildeten Oxalacetat-Moleküle wird acetyliert und der Glyoxylatzyklus schließt sich. Aus dem zweiten Molekül entsteht über die Gluconeogenese eine Hexose. Oxalacetat wird unter ATP-Verbrauch mittels der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) zu Phosphoenolpyruvat decarboxyliert und somit in die Gluconeogenese eingeschleust (Kornberg und Beevers 1957, Canvin und Beevers, 1961).

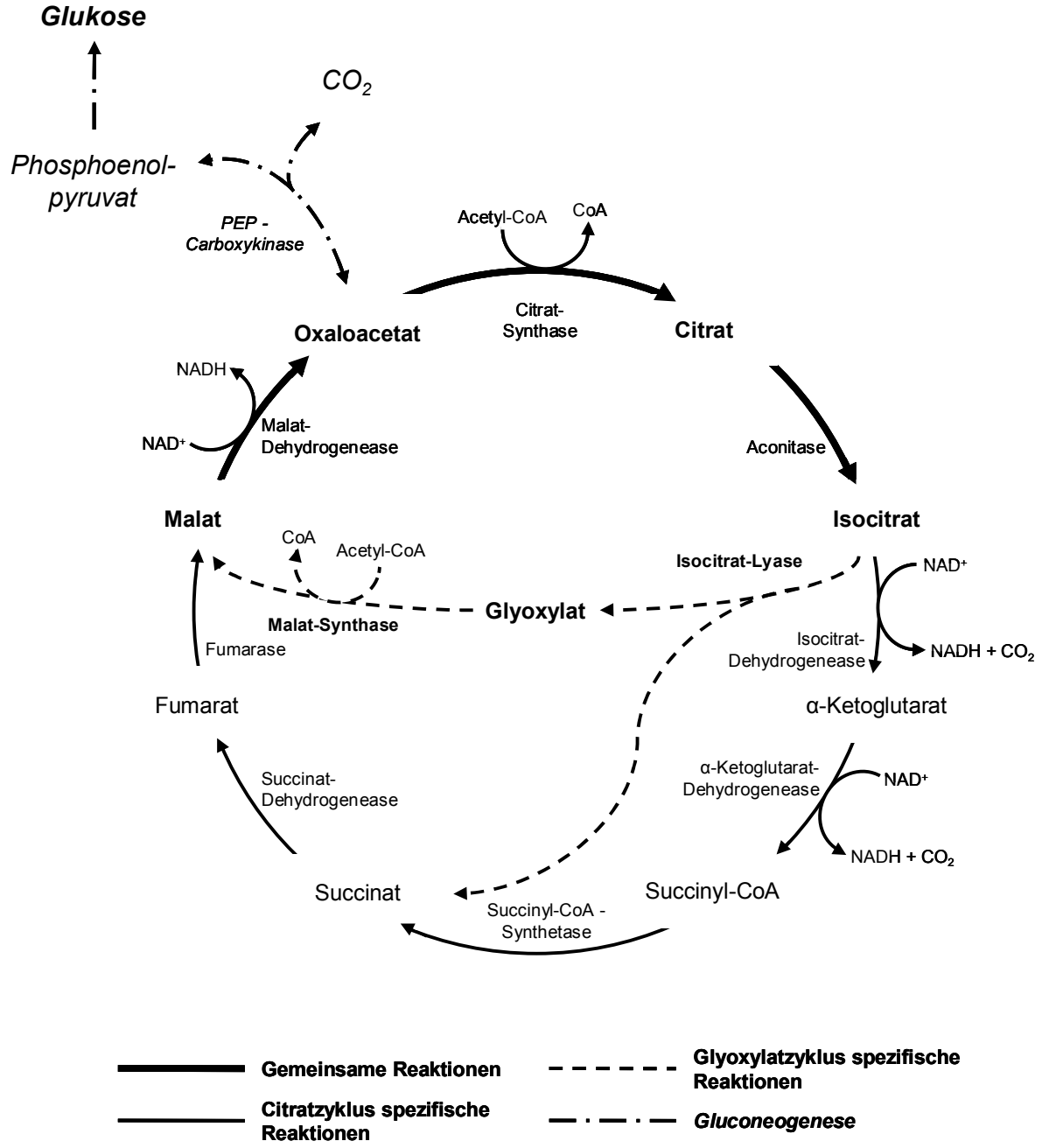


Abbildung 5-3:Darstellung des Glyoxylatzyklus, des Citratzyklus und deren Verknüpfung zur Gluconeogenese. Modifiziert nach Lorenz und Fink, 2002

Die PEPCK stellt ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese während des Wachstums von Keimlingen ölhaltiger Samen dar. *A. thaliana* PEPCK *antisense* Linien sind im Wachstum stärker reprimiert als Mutanten im Glyoxylatzyklus (Rylott et al., 2003). Die Bildung neuer Hexosen über den Glyoxylatzyklus und der sich anschließenden Gluconeogenese ließ sich in keimenden Sporen und ERM durch biochemische Untersuchungen bereits vermuten (Bago et al., 1999, Lammers et al., 2001). Die PEPCK katalysiert die Reaktion in beide Richtungen, d.h. PEP könnte auch zu Oxalacetat carboxyliert werden, wie im Myzel von *Amantia muscaria* vermutet (Wingler et al., 1996). Dies könnte auch für AM-Pilze zutreffen, da sich sowohl Keimungsrate, wie auch asymbiotisches und präsymbiotisches Wachstum unter erhöhten CO_2-Konzentrationen steigern lässt (Bécard und Piché, 1989b, Bécard et al., 1992). Die Daten aus den Genexpressionsstudien dieser Arbeit von den sieben Tage gekeimten Sporen (s. Abb. 4-9) deuten aber auf Gluconeogenese während des Hyphenwachstums hin, da zu diesem Zeitpunkt vermutlich die Speicherlipide genutzt werden (s. oben). CO_2-Fixierung durch die PEPCK erfolgt eher während der Keimung der Sporen, wo Glukose leicht aus Glykogen und Trehalose zu gewinnen ist. In der Gluconeogenese neu gebildete Glukose könnte für die Bildung der leicht verfügbaren Speicherstoffe Trehalose und Glykogen verwendet werden, worauf z.B. die Expression der Glykogen-Synthase in den keimenden Sporen hindeutet (s. Abb. 4-9). Hierdurch lässt sich der Glukosespiegel des Cytoplasmas konstant halten. Ein Modell des Kohlenhydratstoffwechsels von AM-Pilzen während des asymbiotischen Wachstums ist in Abb. 5-4 gezeigt.

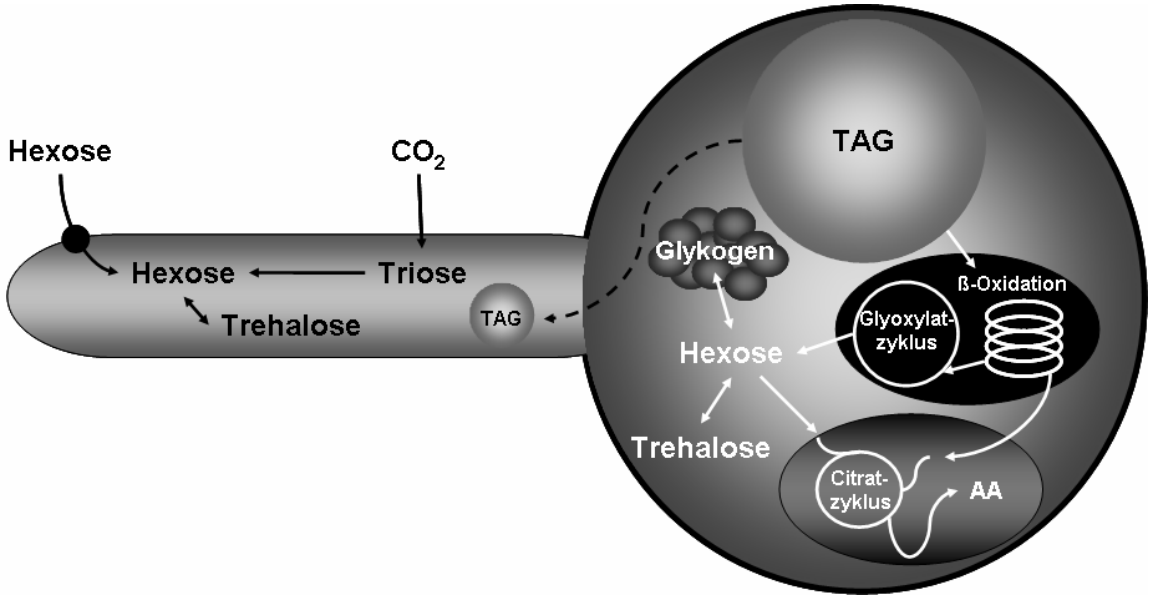


Abbildung 5-4: Modell des Kohlenhydratstoffwechsels in keimenden Sporen von AM-Pilzen. Modifiziert nach Bago et al., 2000

Durch Wurzelexsudate von Wirtspflanzen erfolgt eine Stimulierung des Wachstum und führt zu verstärkten Verzweigungen der Keimhyphen (unter anderem: Mosse und Hepper, 1975, Bécard und Piché, 1989a und b, Tawaraya et al., 1996). Gleichzeitig findet eine Aktivierung des Stoffwechsels statt, der sich in gesteigerter Respiration und einer erhöhten Anzahl an Mitochondrien bemerkbar macht (Tamasloukht et al., 2003, Besserer et al., 2006). Über die Exsudate erreicht den AM-Pilz vermutlich auch das Signal, vermehrt Speicherlipide zu verbrauchen. Dieser Einfluss müsste sich auf die Expression der untersuchten Gene ausweiten und sollte in weiterführenden Experimenten näher untersucht werden.

Die Transkripte aller untersuchten Gene ließen sich ebenfalls im extraradikulären Myzel nachweisen (s. Abb. 4-9), wobei die Expressionsstärken von *GiELO* und *GiGAPDH* in dieser Entwicklungsphase am höchsten waren. Die Hyphen des ERM werden mit TAG, Glykogen und Trehalose aus dem intraradikulären Myzel mit Kohlenstoff versorgt (Bago et al., 2002a, 2002b, 2003). Es erfolgt auch der Transport von freien Fettsäuren, die im ERM modifiziert und verlängert werden können (Trépanier et al., 2005). Aufgrund der Sequenzähnlichkeiten lässt sich vermuten, dass diese Elongase, spezifisch gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren modifiziert (Meyer et al., 2004).

Im ERM ließ sich die Aktivität glykolytischer Enzyme kaum oder gar nicht nachweisen (Macdonald und Lewis, 1978, Saito, 1995). Die Gluconeogenese wird jedoch durch den Glyoxylatzyklus angetrieben (s. oben), wodurch sich die hohe Expressionsstärke von *GiGAPDH* erklären lässt. Die GAPDH ist sowohl glykolytisch als auch während der Gluconeogenese aktiv und müsste in *G. intraradices* auf ihre Aktivität hin näher untersucht werden. Es zeigte sich auch eine RNA-Akkumulierung der Gene für die PEPCK, der Isocitrat-Lyase und der Malat-Synthase, deren Genprodukte im Glyoxylatzyklus und der Gluconeogenese aktiv sind (s. oben). Die erhöhte Expression der Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase im ERM lässt sich aber auch über das Alter des verwendeten ERM erklären. Während Seneszenz sind diese Genprodukte in erhöhter Anzahl in Pflanzen nachzuweisen (Graham et al., 1992). Dies könnte auch für die verwendeten Hyphen des extraradikulären Myzels gelten, da sie bei der Ernte bereits ein Alter von sieben Wochen erreicht hatten und deren Aktivität bereits nach wenigen Tagen beginnt abzunehmen. Inwieweit die Seneszenz mit einer gesteigerten Aktivität des Glyoxylatzyklus zusammenhängt, konnte bisher jedoch nicht gezeigt werden.

Der Nachweis eines aktiven Glyoxylatzyklus im ERM (Lammers et al., 2001, Bago et al., 2002) schließt auch den Abbau von Fettsäuren über die ß-Oxidation mit ein. Aus diesem Grund ließ sich die Expression von *GiFOX2* im ERM nachweisen, ist aber im Vergleich zur asymbiotischen Entwicklung reduziert (s. Abb. 4-9).

Für die Einlagerung in die sich bildenden Sporen wird die neu synthetisierte Glukose in Glykogen und Trehalose umgewandelt. Parallel wird sie für die Bildung von Ribonukleotiden und Reduktionsäquivalenten in den oxidativen Pentosephosphatweg eingeschleust (Pfeffer et al., 1999). In weiteren Experimenten sollten Hyphen unterschiedlichen Alters sowie auch Gene aus dem Pentosephosphatweg, z.B. für die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, mit einbezogen werden.

In Abbildung 5-5 ist ein Modell des Kohlenhydratstoffwechsels im extraradikulären und intraradikulären Myzel gezeigt.

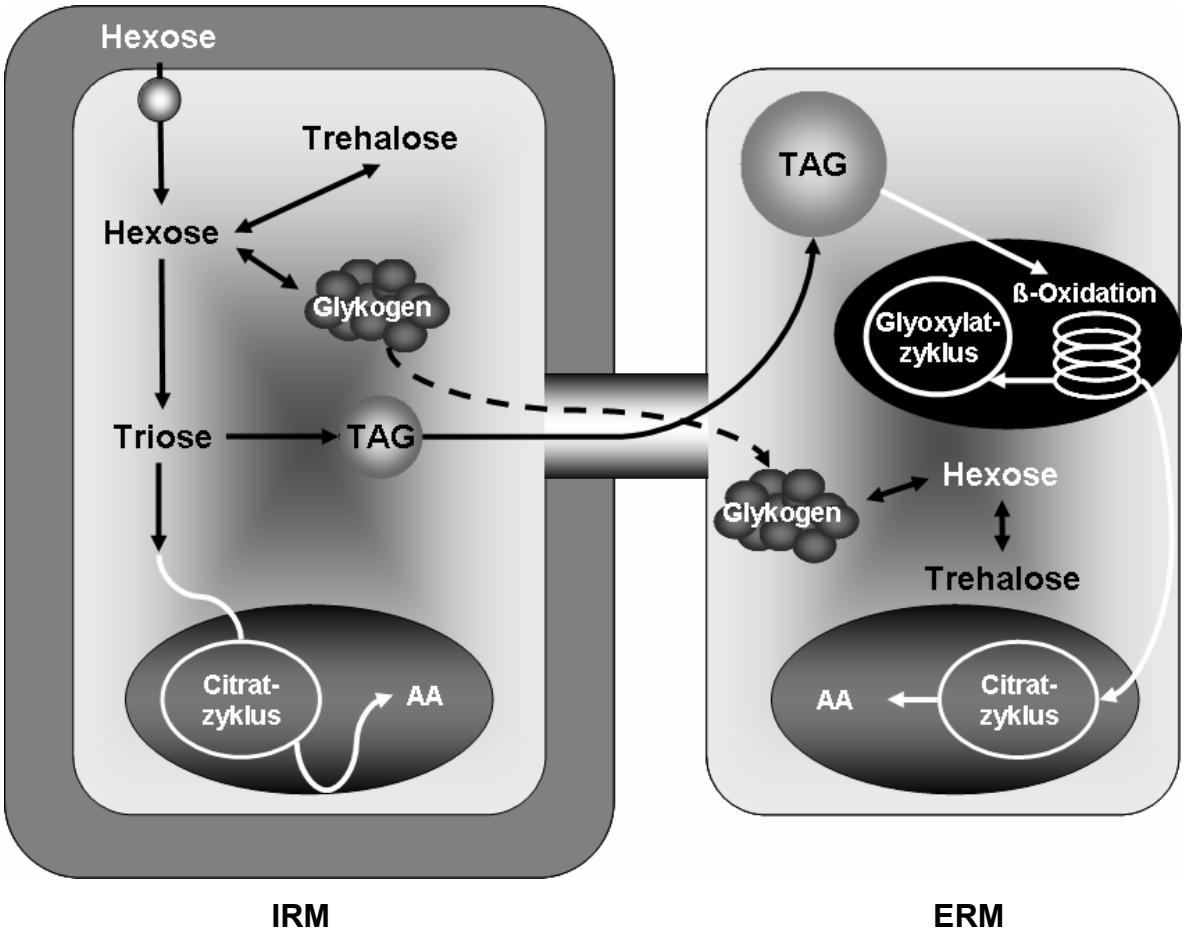


Abbildung 5-5: Modell des Kohlenhydratstoffwechsels während der symbiotischen Entwicklung von AM-Pilzen. Modifiziert nach Bago et al., 2000

Die relative Expression der ausgewählten Gene wurde im intraradikulären Myzel zusätzlich unter dem Einfluss der Glukose-Verfügbarkeit untersucht (siehe 3.4.3.1), da dies die Haupttransportform der Kohlenhydraten von der Pflanze zum AM-Pilz

darstellt (Smith und Read, 1997). In einigen Fällen ließ sich die Genexpression in den mykorrhizierten Wurzeln durch Glukose induzieren, wie z.B. der PEPCK (s. Abb. 4-9). Die Refixierung von CO_2 stellt vermutlich die Funktion der PEPCK dar, da ausreichend Glukose im IRM verfügbar sein sollte und sich die Aktivität der Gluconeogense nicht nachweisen ließ (Pfeffer et al., 1999, Bago et al., 2000). In Hefe wirkte sich die Zugabe von Glukose reprimierend auf die Transkription aus (Hynes et al., 2002), während sich in *Candida albicans* keine Unterschiede in der Promotoraktivität mittels unterschiedlicher C-Quellen zeigten (Eschrich et al., 2002). In *Corynebacterim glutamicum* ist die *in vivo* Aktivität der PEPCK auch unter hohen Glukose-Konzentrationen nicht gemindert und übernimmt anaploretische Funktionen (Petersen et al., 2000, 2001). Die Fixierung von CO_2 durch die PEPCK wurde ansonsten nur unter anaeroben Bedingungen bei Bakterien beschrieben (Laivenieks et al., 1997, Kapke et al., 1980), wird aber auch bei Ektomykorrhizapilzen angenommen (Wingler et al., 1996). Das so gebildete Oxalacetat kann in den Citratzyklus eingeschleust oder zur Bildung von Aminosäuren genutzt werden. Die Bildung des Glykogens dient im Cytoplasma des AM-Pilzes gleichzeitig zur Pufferung des Glukosespiegels (Pfeffer et al., 1999). Den Einbau der Glukose in Glykogen und Trehalose in AM-Pilzen ließ sich in verschiedenen 1-[^{13}C]-Glukose Fütterungs-Experimenten zeigen (Shachar-Hill et al., 1995, Pfeffer et al., 1999, Bago et al., 2003). Die RNA-Akkumulierung dieses Gens erhöhte sich durch die Zufuhr von Glukose im IRM (s. Abb. 4-9), dessen Expression durch Glucose-6-Phosphat induziert werden kann (Pederson et al., 2004, Villar-Palasi und Guinovart, 1997, Francois und Parrou, 2001).

In den durchgeführten Expressionsstudien ergaben sich widersprüchliche Ergebnisse in der Expression der Gene für die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase im IRM. So ist die RNA-Akkumulierung der Malat-Synthase durch die Glukosegabe erhöht und die Isocitrat-Lyase hingegen reduziert.

Die reprimierende Wirkung der Glukose auf die Expression der Isocitrat-Lyase, wie im Übrigen auch für die Malat-Synthase, konnte in Hefe bereits früher gezeigt werden (Fernandez et al., 1993, Caspary et al., 1997). Pflanzliche und pilzliche Gene der Enzyme unterliegen ebenfalls dieser Regulation (Graham et al., 1994, Bowyer et al., 1994) und werden anscheinend stets synchron reguliert. Die Expression des Gens der Malat-Synthase müsste in weiteren Experimenten nochmals genauer untersucht werden. Ebenso sollten die Enzymaktivitäten der Schlüsselenzyme des

Glyoxylatzyklus unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Hilfreich wäre hier z.B. auch eine Behandlung der mykorrhizierten Wurzeln mit Acetat, wodurch eine Induktion dieser Gene erfolgen sollte (Bowyer et al., 1994). Auf einen inaktiven Glyoxylatzyklus lässt sich auch durch die Abwesenheit von Glyoxysomen-ähnlichen Strukturen im IRM schließen (Bonfante-Fasolo, 1984, Lammers et al., 2001).
Die Expression aller weiteren Gene (*GiGAPDH*, *GiFOX2* und *GiELO*) änderte sich durch die Glukosegabe nicht signifikant (s. Abb. 4-9). In weiterführenden Expressionsstudien sollten Gene für die Synthese von Fettsäuren und TAG mit untersucht werden. Deren Expression müsste nach den bisherigen Erkenntnissen nur im IRM exprimiert werden und unterliegen eventuell auch einer Regulation durch Hexosen.

5.5.2 Expression in der Topfkultur mit *Medicago truncatula* und *Pisum sativum*

Expressionsstudien von Genen aus AM-Pilzen wurden bislang oft nur in Wurzelkultur durchgeführt (Lammers et al., 2001, Bago et al., 2002a, 2003). In den Untersuchungen der RNA-Akkumulierung von pflanzlichen Genen konnte gezeigt werden, dass man nicht ohne Einschränkungen die Ergebnisse von Expressionsstärken in Wurzelkulturen auf die in Topfkulturen übertragen kann (s. Abb. 4-3). Daher erfolgte auch die Aufnahme der RNA-Akkumulierung der Gene des Kohlenhydratmetabolismus von *G. intraradices* während der Besiedelung von *M. truncatula* und *P. sativum* in der Topfkultur (s. Abb. 4-10 und 4-11).
Neben den Wildtypen standen bei beiden verwendeten Pflanzenarten eine *antisense* bzw. eine entsprechenden Mutante für die Untersuchungen zur Verfügung. Die Versorgung des Pilzes mit Kohlenhydraten ist in diesen Pflanzen eingeschränkt, einmal durch die eingeschränkte Expression der Sucrose-Synthase in *M. truncatula* (Hohnjec, 2001), sowie die nicht vollständige Ausbildung von Arbuskeln in *P. sativum* (Gianninazzi-Pearson et al., 1991).
Die Expression der ausgewählten Gene war in den mykorrhizierten Wurzeln der Wildtyppflanzen meistens signifikant erhöht. Bei drei Genen konnte gleichzeitig eine zyklische Expression festgestellt werden. Dieses Phänomen ließ sich bereits für die GAPDH in *S. cerevisiae* und *N. crassa* zeigen (Liu et al., 2002, Shinohara et al., 1998). Die Oszillation war abhängig vom Zellzyklus oder dem Tagesrhythmus. Dies könnte auch für AM-Pilze zutreffen, da nicht immer zur exakt gleichen Uhrzeit die

Ernte erfolgen konnte.

Die erhöhte Akkumulierung der Transkripte in den Wildtyppflanzen steht im Widersprich zu bekannten Regulationsmechanismen einiger Gene. So werden die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase unter den vermutet besseren Bedingungen in der Versorgung mit Kohlenhydraten nicht reprimiert (s. 5.5.1).

Unter diesen Bedingungen scheint die Expression der pilzlichen Gene weiteren Regulationsmechanismen zu unterliegen. Die geringe Verfügbarkeit an Kohlenhydraten bei der Besiedlung von *M. truncatula* hat vermutlich weiter reichende Auswirkungen als erwartet und müsste in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden. Während der Mykorrhizierung könnte die Ausbildung von Arbuskeln eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression übernehmen.

Für eine genauere Einordnung dieser Ergebnisse müssten noch weitere Analysen durchgeführt werden. So muss die Probennahme schon zu früheren Zeitpunkten der Symbiose und jeweils zur gleichen Uhrzeit erfolgen. Die Dauer sollte weiterhin auf mindestens 12 Wochen ausgedehnt werden, da zu diesem Zeitpunkt schon Sporen gebildet wurden, über deren Anzahl man weitere Schlüsse ziehen kann. Gleichzeitig sollte zu einigen Zeitpunkten die Ernte auch zu zwei weiteren Tageszeiten erfolgen, um Hinweise auf eine oszillierende Genexpression zu erhalten.

5.6 Glutathion-Transferasen von *Glomus intraradices*

In den erstellten cDNA-Banken ließ sich eine Reihe von Genen für verschiedene Stressproteine isolieren. Unter Ihnen befanden sich mehrere Glutathion-Transferasen (s. Tab 4-1, 4-4). Einige dieser Gene waren identisch mit schwermetallinduzierten Genen für Glutathion-Transferasen (GSTs) einer weiteren cDNA-Bank (Rhody, 2002).

Die Funktionen der GSTs in der pflanzlichen Zelle liegen unter normalen Bedingungen im Sekundär-Metabolismus, wie bei der Bildung von Anthocyanen (Marrs, 1996, Mueller et al., 2000). Stress löst in den Zellen eine erhöhte Synthese von GSTs aus (Kilili et al., 2004, Ulmasov et al., 1995). GST's katalysieren die S-Konjugation elektrophiler toxischer Verbindungen an die Thiolgruppe des reduzierten Glutathions (Sheehan et al., 2001, Wilce und Parker, 1994). Dadurch sind diese Verbindungen für die Zelle weniger toxisch und können aus der Zelle heraus oder in die Vakuole transportiert werden. Expressionsanalysen aus mehreren Studien zeigten, dass die Expression der GST insbesondere durch oxidativen Stress ansteigt

(Yin et al., 2000, Fraser et al., 2002, Veal et al., 2002, Kilili et al., 2004). Die reaktiven Sauerstoffmoleküle stellen einen der wichtigsten *second messenger* der Zelle dar, deren Bildung z.B. durch Schwermetalle ausgelöst wird (Marrs, 1996, Schutzendübel und Polle, 2002). Transgene Pflanzen, die konstitutiv GST's exprimierten, wiesen eine erhöhte Toleranz gegenüber verschiedenen Stressfaktoren auf (Roxas et al., 2000, Ezaki et al., 2000, Takesawa et al., 2002, Yu et al., 2003).

Pflanzen besitzen eine hohe Anzahl an Genen für GSTs, so wurden in *A. thaliana* bisher 48 verschiedene GST-Gene identifiziert (Wagner et al., 2002). Daher hat man die Glutathion-Transferasen schon früh in verschiedenen Klassen eingeteilt (Droog, 1997, Dixon et al., 2002). Hinzu kommen spezifische Klassen für bakterielle und tierische GST's, so dass bis heute ca. 44 verschiedene Klassen bekannt sind. Über die Glutathion-Transferasen der Pilze sind wenige Studien über deren Rolle und deren Einteilung durchgeführt worden. In einer kürzlich erschienenen Publikation erfolgte die erste Einteilung GST's aus Pilzen und Hefen im Vergleich zu anderen Organismen (McGoldrick et al., 2005). Die im Rahmen dieser Arbeit isolierten, sowie die schwermetallinduzierten GST-Gene (Rhody, 2002), wurden anhand dieser Klassifizierung in die einzelnen Klassen eingruppiert (s. Abb. 4-12). GST2, GSTSp2a und GSTSp2b ließen sich in Cluster 2 und alle weiteren Gene in die Phi-Klasse einordnen (Waschke et al., 2006). Eine eindeutige Unterscheidung der einzelnen Gene ist erst möglich, wenn deren genomische Struktur aufgeklärt ist.

Bisher waren in Pilzen nur zwei GST-Gene aus der Phi-Klasse identifiziert, über deren Expression jedoch keine Studien vorliegen. In Cluster 2 ist ein GST-Gen aus *A. nidulans* bekannt, dessen RNA unter dem Einfluss von Xenobiotika und Schwermetallen akkumuliert (Fraser et al., 2002). Ausgewählte GST-Gene von *G. intraradices* wurden während des Lebenszyklus und unter der Einwirkung von Schwermetallen auf ihre Expression hin untersucht (s. Abb. 4-13, 4-14) (Waschke et al., 2006).

Mit Ausnahme von *GiGST5* waren die Expressionsstärken der GST-Gene in den Hyphen des extraradikulären Myzels signifikant erhöht. Die in mykorrhizierten Wurzeln verstärkte Bildung von H_2O_2 (Salzer et al., 1999) könnte für die Induktion von pflanzlichen GST-Genen während der Besiedlung mit AM-Pilzen verantwortlich sein (Strittmatter et al., 1996, Franken et al., 2000, Bestel-Corre et al., 2002, Wulf et al., 2003). Dies führte jedoch nicht zu einer Induktion der GST-Gene im intraradikulären Myzel von *G. intraradices*. Ebenfalls erhöht war die

Expressionsstärke der sieben Wochen alten Hyphen des ERM im Vergleich zu den zwei Wochen alten Kontroll-Hyphen des Schwermetall-Versuchs. Die mögliche einsetzende Seneszenz im älteren Myzel könnte eine Erklärung sein, da sich in Studien eine Korrelation zwischen Seneszenz und einer erhöhten RNA-Akkumulierung von GST-Genen zeigen ließ (Kunieda et al., 2005).

Die Inkubation mit verschiedenen Schwermetallen (s. Abb. 4-14) resultierte in einer drastischen Akkumulierung der Transkripte der GST-Gene, wie es sich auch schon für andere Organismen darstellte (s. oben). Dies könnte einer der Mechanismen der AM-Pilze sein, Pflanzen auf mit Schwermetallen kontaminierten Böden zu einem besseren Wachstum zu verhelfen (Davies et al., 2001, El-Kherbawy et al., 1989, Heggo und Angle et al., 1990). Ob diese Akkumulierungen auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, konnte mittels des gewählten Ansatzes nicht geklärt werden. Hierfür müssten zusätzliche Expressionsstudien mit weiteren reaktiven Sauerstoff bildenden Substanzen behandelten extraradikulären Hyphen durchgeführt werden.

6 Literatur

Acsai J, Largent DL. **1983a.** Fungi associated with *Arbutus menziesii*, *Arctostaphylos manzanita*, and *Arctostaphylos uva-ursi* in central and northern california. *Mycologia* **75:** 544-547.

Acsai J, Largent DL. **1983b.** Ectomycorrhizae of selected conifers growing in sites which support dense growth of bracken fern. *Mycotaxon* **16:** 509-518.

Acsai J, Largent DL. **1983c.** Mycorrhizae of *Arbutus menziesii* pursh and *Arctostaphylos manzanita* parry in northern california. *Mycotaxon* **16:** 519-536.

Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S. **2002.** Aquaporin water channels - from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology Online* **542:** 3-16.

Akazawa T, Okamoto K. **1980.** Biosynthesis and metabolsim of sucrose. In:*The Biochemistry of Plants 3*. 199-220.

Akiyama K, Matsuzaki K, Hayashi H. **2005.** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **435:** 824-827.

Alkan N, Gadkar V, Coburn J, Yarden O, Kapulnik Y. **2004.** Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytologist* **161:** 877-885.

Ames RN, Reid CPP, Porter LK, Cambardella C. **1983.** Hyphal uptake and transport of nitrogen from 2 N-15-labeled sources by *Glomus mosseae*, a vesicular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **95:** 381-396.

Ashford AE, Allaway WG. **2002.** The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244:** 177-187.

Åstrom H, Giovannetti M, Raudaskoski M. 1994. Cytoskeletal components in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7:** 309-312.

Avigad G. **1982.** Sucrose and other disaccharides. In: Loewus FA, Tanner W, eds. *Encyclopedia of Plant Physiology (New Series) vol 13A*. Berlin: Springer, 216-347.

Bago B, Vierheilig H, Piche Y, Azcon-Aguilar C. **1996.** Nitrate depletion and pH changes induced by the extraradical mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* grown in monoxenic culture. *New Phytologist* **133:** 273-280.

Bago B, Azconaguilar C, Goulet A, Piche Y. **1998.** Branched absorbing structures (Bas) - a feature of the extraradical mycelium of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **139:** 375-388.

Bago B, Pfeffer PE, Douds DD, Brouillette J, Bécard G, Shachar-Hill Y. **1999.** Carbon metabolism in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* as revealed by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Plant Physiology* **121:** 263-271.

Bago B. **2000.** Putative sites for nutrient uptake in arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **226:** 263-274.

Bago B, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. **2000.** Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas. *Plant Physiology* **124:** 949-957.

Bago B, Bécard G. **2002.** Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. In: COST 838.

Bago B, Zipfel W, Williams RM, Jun J, Arreola R, Lammers PJ, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. **2002a.** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* **128:** 108-124.

Bago B, Pfeffer PE, Zipfel W, Lammers P, Shachar-Hill Y. **2002b.** Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. Metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* **244:** 189-197.

Bago B, Pfeffer PE, Abubaker J, Jun J, Allen JW, Brouillette J, Douds DD, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. **2003.** Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131:** 1496-1507.

Barker DG, Bianchi S, Blondon F. **1990.** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* **8:** 40-49.

Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. **2004.** Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of .Microbiology* **50:** 521-577.

Beilby JP, Kidby DK. **1980.** Biochemistry of ungerminated and germinated spores of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus caledonius*: changes in neutral and polar lipids. *Journal of Lipid Research* **21:** 739-750.

Beilby JP, Kidby DK. **1982.** The early synthesis of RNA, protein, and some associated metabolic events in germinating vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores of *Glomus caledonius*. *Canadian Journal of Microbiology* **28:** 623-628.

Benedetto A, Magurno F, Bonfante P, Lanfranco L. **2005.** Expression profiles of a phosphate transporter gene *GmosPT* from the endomycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* **15:** 620-627.

Berch SM, Allen TR, Berbee ML. **2002.** Molecular detection, community structure and phylogeny of ericoid mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **244:** 55-66.

Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Poinsot V, Dieu M, Dierick JF, Van Tuinen D, Remacle J, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. **2002.** Proteome analysis and identification of symbiosis-related proteins from *Medicago truncatula* Gaertn. by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis* **23:** 122-137.

Bethlenfalvay GJ, Reyes-Solis MG, Camel SB, Ferrera-Cerrato R. **1991.** Nutrient transfer between the root zones of soybean and maize plant connected by a common mycorrhizal mycelium. *Physiologia Plantarum* **82:** 423-432.

Bevege DI, Bowen GD, Skinner MF. **1975.** Comparative carbohydrate physiology od ecto- and endomycorrhiza. In: Sandres PE, Mosse B, Tinker PB, eds. *Endomycorrhiza*. London: Acacdemic Press, 149-174.

Bécard G, Fortin JA . **1988.** Early events of vesicular-arbucular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytologist* **108:** 211-218.

Bécard G, Piche Y. **1989a.** New aspects on the acquisition of biotropic status by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **112:** 77-83.

Bécard G, Piche Y. **1989b.** Fungal growth stimulation by CO_2 and root exudates in vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology* **55:** 2320-2322.

Bécard G, Doner LW, Rolin DB, Douds DD, Pfeffer PE. **1991.** Identification and quantification of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi by in vitro 13C NMR and HPLC analyses. *New Phytologist* **118:** 547-552.

Bécard G, Doud DD, Pfeffer PE. **1992.** Extensive *in vitro* hyphal growth of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inthe presence of CO_2 and flavonols. *Applied and Environmental Microbiology* **58:** 821-825.

Bécard G, Pfeffer PE. **1993.** Status of nuclear division in arbuscular mycorrhizal fungi during *in vitro* development. *Protoplasma* **194:** 62-68.

Bécard G, Taylor LP, Douds DD, Pfeffer PE, Doner LW. **1995.** Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8:** 252-258.

Bianciotto V, Bonfante P. **1993.** Evidence of DNA replication in an arbuscular mycorrhizal fugnus in abscence of a host-plant. *Protoplasma* **176:** 100-105.

Bianciotto V, Barbiero G, Bonfante P. **1995.** Analysis of cell cycle in arbusular mycorrhizal fungus by flow cytometry and bromodeoxyuridine labelling. *Protoplasma* **188:** 161-169.

Bianciotto V, Bonfante P. **1998.** Presymbiotic versus symbiotic phase in arbuscular endomycorrhizal fungi. In: Varma A, Hock B, eds. *Mycorrhiza*. Heidelberg: Springer-Verlag, 229-251.

Bidartondo MI, Bruns TD. **2001.** Extreme specificity in epiparasitic Monotropoideae (Ericaceae): widespread phylogenetic and geographical structure. *Molecular Ecology* **10:** 2285-2295.

Bjorkman E. **1960.** Monotropa-Hypopitys l - An Epiparasite on Tree Roots. *Physiologia Plantarum* **13:** 308-327.

Boisson-Dernier A, Chabaud M, Garcia F, Becard G, Rosenberg C, Barker DG. **2001.** *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14:** 695-700.

Bonfante-Fasolo P. **1984.** Anatomy and morphology of VA mycorrhizae. In: Powell CL, Bagyaraj DJ, eds. *VA Mycorrhiza*. CRC Press, Boca Rotan, Fl, USA, 5-33.

Bonfante P, Balestrini R, Mendgen K. **1994.** Storage and secretion processes in the spore of *Gigaspora margarita* Becker & Hall as revealed by high-pressure freezing and freeze substitution. *New Phytologist* **128:** 93-101.

Bonfante P, Perotto S. **1995.** Transley review No. 82 Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* **130:** 3-21.

Bowyer P, De L, Jr., Turner G. **1994.** Regulation of the expression of the isocitrate lyase gene (acuD) of Aspergillus nidulans. *Molecular and General Genetics* **242:** 484-489.

Brechenmacher L, Weidmann S, Van Tuinen D, Chatagnier O, Gianinazzi S, Franken P, Gianinazzi-Pearson V. **2004.** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stages of *Medicago truncatula-Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza* **14:** 253-262.

Breuninger M, Trujillo CG, Serrano E, Fischer R, Requena N. **2004.** Different nitrogen sources modulate activity but not expression of glutamine synthetase in arbuscular mycorrhizal fungi. *Fungal Genetics and Biology* **41:** 542-552.

Breuninger M, Requena N. **2004.** Recognition events in AM symbiosis: analysis of fungal gene expression at the early appressorium stage. *Fungal Genetics and Biology* **41:** 794-804.

Brundrett MC, Abbott LK, Jasper DA. **1999.** Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. *Mycorrhiza* **8:** 305-314.

Brundrett MC. **2002.** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* **154:** 275-304.

Buée M, Rossignol M, Jauneau A, Ranjeva R, Bécard G. **2000.** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13:** 693-698.

Burleigh SH, Cavagnaro T, Jakobsen I. **2002.** Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany* **53:** 1593-1601.

Burset M, Seledtsov IA, Solovyev VV. **2000.** Analysis of canonical and non-canonical splice sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Research* **28:** 4364-4375.

Bücking, H., Shachar-Hill Y. **2005.** Phosphate uptake, transport and transfer by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is stimulated by increased carbohydrate availability. *New Phytologist* **165:** 899-912.

Bücking H, Heyser W. **2001.** Microautoradiographic localization of phosphate and carbohydrates in mycorrhizal roots of *Populus tremula* x *Populus alba* and the implications for transfer processes in ectomycorrhizal associations. *Tree Physiology* **21:** 101-107.

Cannon SB, Crow JA, Heuer ML, Wang X, Cannon EKS, Dwan C, Lamblin AF, Vasdewani J, Mudge J, Cook A, Gish J, Cheung F, Kenton S, Kunau TM, Brown D, May GD, Kim D, Cook DR, Roe BA, Town CD, Young ND, Retzel EF. **2005.** Databases and Information Integration for the *Medicago truncatula* Genome and Transcriptome. *Plant Physiology* **138:** 38-46.

Canvin DT, Beevers H. 1961. Sucrose synthesis from acetate in the germinating castor bean: kinetics and pathway. *Journal of Biological Chemistry* **236:** 988-995.

Carvalho LM, Correia PM, Martins-Loucao MA. **2004.** Arbuscular mycorrhizal fungal propagules in a salt marsh. *Mycorrhiza* **14:** 165-170.

Caspary F, Hartig A, Schuller HJ. **1997.** Constitutive and carbon source-responsive promoter elements are involved in the regulated expression of the *Saccharomyces cerevisiae* malate synthase gene *MLS1*. *Molecular and General Genetics* **255:** 619-627.

Chabaud M, de Carvalho-Niebel F, Barker DG. **2003.** Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1. *Plant Cell Reports* **22:** 46-51.

Chabot S, Becard G, Piche Y. **1992.** Life-cycle of *Glomus intraradices* in root organ culture. *Mycologia* **84:** 315-321.

Chin-A-Woeng TFC, dePriester W, vanderBij AJ, Lugtenberg BJJ. **1997.** Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10:** 79-86.

Chiocchio V, Venedikian N, Martinez AE, Menendez A, Ocampo JA, Godeas A. **2000.** Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *International Microbiology.* **3:** 173-175.

Chrispeels MJ, Agre P. **1994.** Aquaporins: water channel proteins of plant and animal cells. *Trends in Biochemical Sciences* **19:** 421-425.

Clapp JP, Fitter AH, Young JPW. **1999.** Ribosomal small subunit sequence variation within spores of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora* sp. *Molecular Ecology* **8:** 915-921.

Cook DR, VandenBosch K, de Bruijn FJ, Huguet T. **1997.** Model legumes gGet the nod. *The Plant Cell* **9:** 275-280.

Cook DR. **1999.** *Medicago truncatula* - a model in the making! Commentary. *Current Opinion in Plant Biology* **2:** 301-304.

Cook DR, Denarie J 2000. Progress in the genomics of *Medicago truncatula* and the impact for grain legume crops. *Grain Legumes Magazin* ***No. 28*** *12-13.*

Corkidi L, Rincon E. **1997.** Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico .1. Mycorrhizal status and inoculum potential along a successional gradient. *Mycorrhiza* **7:** 9-15.

Cornah JE, Germain V, Ward JL, Beale MH, Smith SM. **2004.** Lipid utilization, gluconeogenesis, and seedling growth in Arabidopsis mutants lacking the glyoxylate cycle enzyme malate synthase. *Journal of Biological Chemistry* **279:** 42916-42923.

Corradi N, Kuhn G, Sanders IR. **2004.** Monophyly of beta-tubulin and H^+-ATPase gene variants in *Glomus intraradices*: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes. *Fungal Genetics and Biology* **41:** 262-273.

Craig EA, Gambill BD, Nelson RJ. **1993.** Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **57:** 402-414.

Cuartero J, Bolarin MC, Asins MJ, Moreno V. **2006.** Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* **57:** 1045-1058.

Dalpé Y, Diop TA, Plenchette C, Gueye M. **2000.** Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza* **10:** 125-129.

Danneberg G, Latus C, Zimmer W, Hundeshagen B, Schneider-Poetsch HJ, Bothe H. **1993.** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology* **141:** 33-39.

Davies FT, Puryear JD, Newton RJ, Egilla JN, Grossi JAS. **2001.** Mycorrhizal fungi enhance accumulation and tolerance of chromium in sunflower (*Helianthus annuus*). *Journal of Plant Physiology* **158:** 777-786.

de Souza FA, Kowalchuk GA, Leeflang P, van Veen JA, Smit E. **2004.** PCR-denaturing gradient gel electrophoresis profiling of inter- and intraspecies 18S rRNA gene sequence heterogeneity is an accurate and sensitive method to assess species diversity of arbuscular mycorrhizal fungi of the genus Gigaspora. *Applied and Environmental Microbiology* **70:** 1413-1424.

Dehne HW. **1982.** Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* **72:** 1115-1119.

Dickson S. **2004.** The Arum-Paris continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **163:** 187-200.

Dixon DP, Lapthorn A, Edwards R. **2002.** Plant glutathione transferases. *Genome Biology* **3 (3):** Reviews3004.1-3004.10.

Dodd JC, Boddington CL, Rodriguez A, Gonzalez-Chavez C, Mansur I. **2000.** Mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from different genera: form, function and detection. *Plant and Soil* **226:** 131-151.

Douds Jr DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. **2000.** Carbon partioning, cost, and metabolism of arbuscular mycorrhizas. In: Kapulnik Y, Douds Jr DD, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, 107-129.

Douds D. **2002.** Increased spore production by *Glomus intraradices* in the split-plate monoxenic culture system by repeated harvest, gel replacement, and resupply of glucose to the mycorrhiza. *Mycorrhiza* **12:** 163-167.

Downie JA, Walker SA. **1999.** Plant responses to nodulation factors. *Current Opinion in Plant Biology* **2:** 483-489.

Droog F. **1997.** Plant glutathione S-transferases, a tale of theta and tau. *Journal of Plant Growth Regulation* **16:** 95-107.

Duddridge JA, Finlay RD, Read DJ, Soderstrom B. **1988.** The structure and function of the vegetative mycelium of ectomycorrhizal plants. 3. Ultrastructural and autoradiographic analysis of inter-plant carbon distribution through intact mycelial systems. *New Phytologist* **108:** 183-188.

Duff SMG, Plaxton WC, Lefebvre DD. **1991.** Phosphate-starvation response in plant-cells - denovo synthesis and degradation of acid-phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88:** 9538-9542.

Dunlop J, Gardiner S. **1993.** Phosphate uptake, proton extrusion and membrane electropotentials of phosphorus-deficient *Trifolium repens* L. *Journal of Experimental Botany* **44:** 1801-1808.

Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA. **2000.** Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97:** 5669-5674.

Ebel F, Schwienbacher M, Beyer J, Heesemann J, Brakhage AA, Brock M. **2006.** Analysis of the regulation, expression, and localisation of the isocitrate lyase from *Aspergillus fumigatus*, a potential target for antifungal drug development. *Fungal Genetics and Biology.* **43:** 476-489.

Egger KN. **1996.** Molecular systematics of E-strain mycorrhizal fungi: *Wilcoxina* and its relationship to *Trichariana* (Pezizales). *Canadian Journal of Botany.* **774:** 773-779.

El-Kherbawy M, Angle JS, Heggo A, Chaney RL. **1989.** Soil pH, rhizobia and vesicular-arbuscular mycorrhiza inoculation effects on growth and heavy metal uptake of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Biology and Fertility of Soils* **8:** 61-65.

Engvild KC. **1987.** Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **74:** 711-713.

Eschrich D, Kötter P, Entian KD. **2002.** Gluconeogenesis in *Candida albicans*. *FEMS Yeast Research* 315-325.

Etienne-Manneville S, Hall A. **2002.** Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420:** 629-635.

Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Matsumoto H. **2000.** Expression of aluminum-induced genes in transgenic arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiology* **122:** 657-666.

Ezawa T, Smith SE, Smith FA. **2001.** Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **149:** 555-563.

Ezawa T, Smith SE, Smith FA. **2002.** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant and Soil* **244:** 221-230.

Fernandez E, Fernandez M, Moreno F, Rodicio R. **1993.** Transcriptional regulation of the isocitrate lyase encoding gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **333:** 238-242.

Ferrol N, Barea JM, Azcon-Aguilar C. **2000.** The plasma membrane H^+-ATPase gene family in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Current Genetics* **37:** 112-118.

Ferrol N, Barea JM, zcon-Aguilar C. **2002.** Mechanisms of nutrient transport across interfaces in arbuscular mycorrhizas. *Plant and Soil* **244:** 231-237.

Fieuw S, Willenbrink J. **1990.** Sugar transport and sugar-metabolising enzymes in sugar beet storage roots (*Beta vulgaris* ssp. altissima). *Journal of Plant Physiology* **137:** 216-223.

Fitter AH, Moyersoen B. **1996.** Evolutionary trends in roots-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London- Series B: Biological Sciences* **351:** 1367-1375.

Fitze D, Wiepning A, Kaldorf M, Ludwig-Muller J. **2005.** Auxins in the development of an arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize. *Journal of Plant Physiology* **162:** 1210-1219.

Forde, BG 2000. Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1465(1-2):219-35.

Fossa A, Beyer A, Pfitzner E, Wenzel B, Kunau WH. **1995.** Molecular cloning, sequencing and sequence analysis of the fox-2 gene of Neurospora crassa encoding the multifunctional beta-oxidation protein. *Molecular and General Gentics* **247:** 95-104.

Francois J, Parrou JL. **2001.** Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiology Reviews* **25:** 125-145.

Frank B. **1885.** Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft* **3:** 128-148.

Franken P, Gianinazzi-Pearson V. **1996.** Phage cloning of ribosomal RNA genes from the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerd. & Trappe and *Scutellospora castanea* Walker. *Mycorrhiza* **6:** 167-173.

Franken P, Lapopin L, Meyer-Gauen G, Gianinazzi-Pearson V. **1997.** RNA accumulation and genes expressed in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycologia* **89:** 295-299.

Franken P, Ressin B, Lapopin L, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S. **1998.** PCR cloning of gene rom arbuscular mycorrhizal fungi.In: Varma A, Hock, B eds. *The mycorrhizal manual.* Springer, Berlin Heidelberg New York 401-412.

Franken P, Requena N, Bütehorn B, Krajinski F, Kuhn G, Lapopin L, Mann P, Rhody D, Stommel M. **2000.** Molecular analysis of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Archives of Agronomy and Soil Science* **45:** 271-286.

Franken P, Kuhn G, Gianinazzi-Pearson V. **2002.** Development and molecular biology of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Osiewacz HD, ed. *Molecular biology of fungal development*. New York: Marcel Dekker, Inc., 325-348.

Fraser JA, Davis MA, Hynes MJ. **2002.** A Gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to *URE2* of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Applied and Environmental Microbiology* **68:** 2802-2808.

Fridovich I. **1995.** Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Reviews in Biochemistry* **64:** 97-112.

Fritsche W. **1999.** *Mikrobiologie*. Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmgH Heidelberg - Berlin.

Frugoli J, Harris J. **2001.** *Medicago truncatula* on the Move! *The Plant Cell* **13:** 458-463.

Galli U, Schüepp H, Brunold C. **1994.** Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* **92:** 364-368.

Garcia-Garrido JM, Tribak M, Rejon-Palomares A, Ocampo JA, Garcia-Romera I. **2000.** Hydrolytic enzymes and ability of arbuscular mycorrhizal fungi to colonize roots. *The Journal of Experimental Botany* **51:** 1443-1448.

Gaspar ML, Pollero RJ, Cabello MN. **1994.** Triacylglycerol consumption during spore germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of the American Oil Chemists Society* **71:** 449-452.

Gaspar ML, Pollero R, Cabello M. **1997.** Partial purification and characterization of a lipolytic enzyme from spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Mycologia* **89:** 610-614.

Gaur A, Adholeya A. **2002.** Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biology and Fertility of Soils* **35:** 214-218.

George E. **2000.** Nutrient uptake. In: Kapulnik Y, Douds Jr DD, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, 307-343.

Gianinazzi-Pearson V, Branzanti B, Gianinazzi S. **1989.** *In vitro* enhancement of spore germination and early hyphal growth of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus by host root exudates and plant flavonoids. *Symbiosis* **7:** 243-255.

Gianinazzi-Pearson V, Gininazzi S, Guillemin JP, Trouvelot A, Duc G. **1991.** Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. In: Hennecke H, Verma DPS, eds. *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 336-342.

Giovannetti M, Sbrana C, Logi C. **1994.** Early processes involved in host recognition by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **127:** 703-709.

Giovannetti M, Sbrana C. **1998.** Meeting a non-host: the behaviour of AM fungi. *Mycorrhiza* **8:** 123-130.

Giovannetti M. **2000.** Spore Germination and Pre-Symbiotic Mycelial Growth. In: Kapulnik Y, Douds Jr DD, eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, 47-68.

Gogala N. **1991.** Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* **47:** 331-340.

Gollotte A, Gianinazzi-Pearson V, Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Gianinazzi S. **1993.** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a 'locus a' myc$^-$ mutant of *Pisum sativum* L. *Planta* **191:** 112-122.

Gordon-Weeks R, Tong Y, Davies TGE, Leggewie G. **2003.** Restricted spatial expression of a high-affinity phosphate transporter in potato roots. *Journal of Cell Science* **116:** 3135-3144.

Gordon AJ, Minchin FR, Skot L, James CL. **1997.** Stress-induced declines in soybean N-2 fixation are related to nodule sucrose synthase activity. *Plant Physiology* **114:** 937-946.

Govindarajulu M, Pfeffer PE, Jin HR, Abubaker J, Douds DD, Allen JW, Bucking H, Lammers PJ, Shachar-Hill Y. **2005.** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **435:** 819-823.

Graham IA, Leaver CJ, Smith SM. **1992.** Induction of malate synthase gene expression in senescent and detached organs of cucumber. *The Plant Cell* **4:** 349-357.

Graham IA, Denby KJ, Leaver CJ. **1994.** Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *Plant Cell* **6:** 761-772.

Grunwald U. **2004.** Analyse der Genregulation in *Medicago truncatula* und *Pisum sativum* während der Entwicklung arbuskulärer Mykorrhiza. Philipps-Universtität Marburg.

Hall JL. **2002.** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* **53:** 1-11.

Harley JL, Harley EL. **1987.** A check list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* **105:** 1-102.

Harrison MJ, van Buuren ML. **1995.** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378:** 626-629.

Harrison MJ. **1999.** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50:** 361-389.

Harrison MJ. **2000.** Molecular genetics of model legumes. *Trends in Plant Sciences.* **5:** 414-415.

Harrison MJ, Dewbre GR, Liu JY. **2002.** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisiton of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14:** 2413-2429.

Harrison MJ. **2005.** Signaling in the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Reviews in Microbiology* **59**: 19-42

Hause B, Maier W, Miersch O, Kramell R, Strack D. **2002.** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* **130:** 1213-1220.

Hawker JS. **1985.** Sucrose. In: Dey PM, Dixon RA, eds. *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*. London: Academic Press, 1-51.

Hawkins HJ, Johansen A, George E. **2000.** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* **226:** 275-285.

He XH, Critchley C, Bledsoe C. **2003.** Nitrogen transfer within and between plants through common mycorrhizal networks (CMNs). *Critical Reviews in Plant Sciences* **22:** 531-567.

Heggo A, Angle JS. **1990.** Effects of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on heavy metal uptake by soybeans. *Soil Biology and Biochemistry* **ss:** 865-869.

Helmbrecht K, Zeise E, Rensing L. **2000.** Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review. *Cell Proliferation.* **33:** 341-365.

Hepper CM. **1987.** VAM spore germination and hyphal growth in vitro- prospects for axenic culture. In: Sylvia D, Hung L-L, Graham JH, eds. *7 th NACOM, Mycorrhizae in the Next Decade, practical applications and research priorities, University of Florida, Gainesville*. 172-174.

Hijri M, Sanders IR. **2004.** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genetics and Biology* **41:** 253-261.

Hiltunen JK, Wenzel B, Beyer A, Erdmann R, Fossa A, Kunau WH. **1992.** Peroxisomal multifunctional beta-oxidation protein of *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular analysis of the fox2 gene and gene product. *Journal of Biological Chemistry* **267:** 6646-6653.

Hitz WD, Schmitt MR, Card PJ, Giaquinta RT. **1985.** Transport and metabolism of 1'-fluorosucrose, a sucrose analog not subject to invertase hydrolysis. *Plant Physiology* **77:** 291-295.

Ho I, Trappe JM. **1975.** Nitrate reducing capacity of two vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia.* **67:** 886-888.

Hoekstra MF, Dhillon N, Carmel G, DeMaggio AJ, Lindberg RA, Hunter T, Kuret J. **1994.** Budding and fission yeast casein kinase I isoforms have dual- specificity protein kinase activity. *Molecular Biology of the Cell* **5:** 877-886.

Hohnjec N. **2001.** Das Knöllchenamplifizierte exprimierte Saccharose-Synthase-Gen *MtSucS1* der Modell-Leguminose *Medicago trunctula:* Aufklärung der genomischen Organisation, Identifizierung relevanter Promotorbereiche und Konstruktion transgener Pflanzen mit modifiziertem MtSucS1-Proteingehalt. Universität Bielefeld.

Hohnjec N, Perlick AM, Puhler A, Kuster H. **2003.** The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene MtSucS1 is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16:** 903-915.

Hohnjec N, Vieweg ME, Puhler A, Becker A, Kuster H. **2005.** Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **137:** 1283-1301.

Holford ICR. **1997.** Soil phosphorus: Its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research* **35:** 227-239.

Hosny M, Hijri M, Passerieux E, Dulieu H. **1999.** rDNA units are highly polymorphic in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). *Gene* **226:** 61-71.

Hynes MJ, Draht OW, Davis MA. **2002.** Regulation of the *acuF* gene, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *The Journal of Bacteriology* **184:** 183-190.

Jabajihare S. **1988.** Lipid and fatty-acid profiles of some vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi - contribution to taxonomy. *Mycologia* **80:** 622-629.

Jakobsen I, Rosendahl L. **1990.** Carbon flow into soil and external hyphae from roots of mycorrhizal cucumber plants. *New Phytologist* **115:** 77-83.

Jansa J, Mozafar A, Banke S, McDonald BA, Frossard E. **2002.** Intra- and intersporal diversity of ITS rDNA sequences in *Glomus intraradices* assessed by cloning and sequencing, and by SSCP analysis. *Mycological Research* **106:** 670-681.

Johansen A, Jakobsen I, Jensen ES. **1993.** Hyphal transport by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus of N apllied to the the soil as ammonium or nitrate. *Biology and Fertility of Soils* **16:** 66-70.

Johansen A, Finlay RD, Olsson PA. **1996.** Nitrogen metabolism of external hyphae of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **133:** 705-712.

Jolly C, Morimoto RI. **2000.** Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *JNCI Cancer Spectrum* **92:** 1564-1572.

Joner EJ, Johansen A. **2000.** Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* **104:** 81-86.

Juge C, Samson J, Bastien C, Vierheilig H, Coughlan A, Piche Y. **2002.** Breaking dormancy in spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*: a critical cold-storage period. *Mycorrhiza* **12:** 37-42.

Jun J, Abubaker J, Rehrer C, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y, Lammers PJ. **2002.** Expression in an arbuscular mycorrhizal fungus of genes putatively involved in metabolism, transport, the cytoskeleton and the cell cycle. *Plant and Soil* **244:** 141-148.

Kaldorf M, Schmelzer E, Bothe H. **1998.** Expression of maize and fungal nitrate reductase genes in arbuscular mycorrhiza. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11:** 439-448.

Kapke PA, Brown AT, Lillich TT. **1980.** Carbon dioxide metabolism by *Capnocytophaga ochracea*: identification, characterization, and regulation of a phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Infection and Immunity* **27:** 756-766.

Khan AG. **1993.** Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New-South-Wales, Australia. *Mycorrhiza* **3:** 31-38.

Kilili KG, Atanassova N, Vardanyan A, Clatot N, Al-Sabarna K, Kanellopoulos PN, Makris AM, Kampranis SC. **2004.** Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **279:** 24540-24551.

Koide RT, Schreiner RP. **1992.** Regulation of the vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43:** 557-581.

Koide RT, Kabir Z. **2000.** Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologist* **148:** 511-517.

Kornberg HL, Krebs HA. **1957.** Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. *Nature* **179:** 988-991.

Kornberg HL, Beevers H. **1957.** The glyoxylate cycle as a stage in the conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Biochimica et Biophysica Acta* **26:** 531-537.

Koske RE. **1981.** Multiple germination by spores of Gigaspora-Gigantea. *Transactions of the British Mycological Society* **76:** 328-330.

Kosuta S, Chabaud M, Lougnon G, Gough C, Denarie J, Barker DG, Becard G. **2003.** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131:** 952-962.

Krajinski F, Biela A, Schubert D, Gianinazzi-Pearson V, Kaldenhoff R, Franken P. **2000.** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* **211:** 85-90.

Krajinski F, Hause B, Gianinazzi-Pearson V, Franken P. **2002.** *Mtha*1, a plasma membrane H^+-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression. *Plant Biology* **4:** 754-761.

Krämer U. **2005.** Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils. *Current Opinion in Biotechnology* **16:** 133-141.

Kuhn G, Hijri M, Sanders IR. **2001.** Evidence for the evolution of multiple genomes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **414:** 745-748.

Kunieda T, Fujiwara T, Amano T, Shioi Y. **2005.** Molecular cloning and characterization of a senescence-induced tau-class glutathione S-transferase from barley leaves. *Plant Cell Physiol* **46:** 1540-1548.

Lamb HK, Leslie K, Dodds AL, Nutley M, Cooper A, Johnson C, Thompson P, Stammers DK, Hawkins AR. **2003.** The negative transcriptional regulator NmrA discriminates between oxidized and reduced dinucleotides. *Journal of Biological Chemistry* **278:** 32107-32114.

Lammers PJ, Jun J, Abubaker J, Arreola R, Gopalan A, Bago B, Hernandez-Sebastia C, Allen JW, Douds DD, Pfeffer PE, Shachar-Hill Y. **2001.** The glyoxylate cycle in an arbuscular mycorrhizal fungus. Carbon flux and gene expression. *Plant Physiology* **127:** 1287-1298.

Lammers PJ, Koul R, Colonnne P, Shapiro HJ, Detter C, Linquist E, Richardson P, Glomus Genome Consortium I, Moutogolis P. The genome project for *Glomus intraradices*, a model arbuscular mycorrhizal fungi. 5th International Conference on Mycorrhiza. 2006.

Landwehr M, Hildebrandt U, Wilde P, Nawrath K, Toth T, Biro B, Bothe H. **2002.** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza* **12:** 199-211.

Lanfranco L, Garnero L, Bonfante P. **1999.** Chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*: full sequence of a gene encoding a class IV chitin synthase. *FEMS Microbiology Letters* **170:** 59-67.

Lanfranco L, Bolchi A, Cesale RE, Ottonello S, Bonfante P. **2002.** Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbucular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* **130:** 58-67.

Lanfranco L, Novero M, Bonfante P. **2005.** The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiology* **137:** 1319-1330.

Lapik YR, Kaufman LS. **2003.** The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell* **15:** 1578-1590.

Lapopin L, Gianinazzi-Pearson V, Franken P. **1999.** Comparative differential display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* and a mutant defective in late stage development. *Plant Molecular Biology* **41:** 669-677.

Le Quéré A, Stgrup EK, Rajashekar B, Schutzendubel A, Canback B, Johansson T, Tunlid A. **2006.** Screening for rapidly evolving genes in the ectomycorrhizal fungus *Paxillus involutus* using cDNA microarrays. *Molecular Ecology* **15:** 535-550.

Lefebvre DD, Duff SM, Fife CA, Julien-Inalsingh C, Plaxton WC. **1990.** Response to phosphate deprivation in *Brassica nigra* suspension cells: Enhancement of intracellular, cell surface, and secreted phosphatase activities compared to increases in Pi-absorption rate. *Plant Physiology* **93:** 504-511.

Leyval C, Turnau K, Haselwandter K. **1997.** Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. *Mycorrhiza* **7:** 139-153.

Litchfield DW. **2003.** Protein kinase CK2: structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochemical Journal* **369:** 1-15.

Liu W, Wang J, Mitsui K, Shen H, Tsurugi K. **2002.** Interaction of the GTS1 gene product with glyceraldehyde- 3-phosphate dehydrogenase 1 required for the maintenance of the metabolic oscillations of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Journal* **269:** 3560-3569.

López-Pedrosa A, Gonzalez-Guerrero M, Valderas A, zcon-Aguilar C, Ferrol N. **2006.** *GintAMT1* encodes a functional high-affinity ammonium transporter that is expressed in the extraradical mycelium of *Glomus intraradices*. *Fungal Genetetics and Biology* **43:** 102-110.

Lorenz MC, Fink GR. **2002.** Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryotic Cell* **1:** 657-662.

Lugtenberg BJ, Dekkers LC. **1999.** What makes Pseudomonas bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* **1:** 9-13.

Lugtenberg BJ, Dekkers L, Bloemberg GV. **2001.** Molecular determinants of rhizosphere colonization by Pseudomonas. *Annual Reviews in Phytopathology* **39:** 461-490.

Lynch J. **1995.** Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* **109:** 7-13.

MacDonald RM, Lewis M. **1978.** The occurrence of some acid phosphatases and dehydrogenases in the in the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *New Phytologist* **80:** 135-141.

Malcova R, Rydlova J, Vosatka M. **2003.** Metal-free cultivation of *Glomus* sp BEG 140 isolated from Mn-contaminated soil reduces tolerance to Mn. *Mycorrhiza* **13:** 151-157.

Maldonado-Mendoza IE, Dewbre GR, Harrison MJ. **2001.** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14:** 1140-1148.

Marrs KA. **1996.** The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47:** 127-158.

Marrs KA, Walbot V. **1997.** Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase *Bronze2* gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiology* **113:** 93-102.

Marschner H, Römheld V. **1983.** In vivo meaurement of root-induced pH changes at the soil-root interface: effect of plant species and nitrogen source. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde* **111:** 241-251.

Marschner H, Römheld V, Horst WJ, Martin P. **1986.** Root-induced changes in rhizpsphere: importance for the mineral nutrittion of plants. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie und Bodenkunde* **149:** 441-456.

Marsh JF, Schultze M. **2001.** Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants. *New Phytologist* **150:** 525-532.

McCord JM, Fridovich I. **1969.** Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (Hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry* **244:** 6049-6055.

McGoldrick S, O'Sullivan SM, Sheehan D. **2005.** Glutathione transferase-like proteins encoded in genomes of yeasts and fungi: insights into evolution of a multifunctional protein superfamily. *FEMS Microbiology Letters* **242:** 1-12.

McKinney JD, Honer zu BK, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Jr., Russell DG. **2000.** Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature* **406:** 735-738.

Mengel K, Kirkby EA. **1982.** *Principles of Plant Nutrition*. Kluwer Academic Publishers.

Meyer A, Kirsch H, Domergue F, Abbadi A, Sperling P, Bauer J, Cirpus P, Zank TK, Moreau H, Roscoe TJ, Zahringer U, Heinz E. **2004.** Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *Journal of Lipid Research* **45:** 1899-1909.

Molina R, Massicotte H, Trappe JM. **1992.** Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In: Allen MF, ed. *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. New York, London: Chapman & Hall, 357-423.

Morell M, Copeland L. **1984.** Enzymes of sucrose breakdown in soybean nodules - alkaline invertase. *Plant Physiology* **74:** 1030-1034.

Morell M, Copeland L. **1985.** Sucrose synthase of soybean nodules. *Plant Physiology* **78:** 149-154.

Mosse B, Hepper C. **1975.** Vesicular-arbuscular mycorrhizal infections in root organ-cultures. *Physiological Plant Pathology* **5:** 215-&.

Mouriño-Pérez RR, Roberson RW, Bartnicki-Garcia S. **2006.** Microtubule dynamics and organization during hyphal growth and branching in *Neurospora crassa*. *Fungal.Genet.Biol.* **43:** 389-400.

Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. **2000.** AN9, a petunia glutathione S-transferase required for anthocyanin sequestration, is a flavonoid-binding protein. *Plant Physiology* **123:** 1561-1570.

Nagahashi G. **2000.** *In vitro* and *in situ* techniques to examine the role of roots and root exudates during AM fungus-host interaction. In: Kapulnik Y, Douds DD, Jr., eds. *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, 287-305.

Natvig DO, Sylvester K, Dvoracheck WH, Baldwin JL. **1996.** Superoxide dismutases and catalases. In: Bramble, Marzluf, eds. *The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology*. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 191-209.

Ninnemann O, Jauniaux JC, Frommer WB. **1994.** Identification of a high affinity $NH4^+$ transporter from plants. *EMBO Jornal* **13:** 3464-3471.

Nollen EAA, Morimoto RI. **2002.** Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing `heat shock' proteins. *Journal of Cell Science* **115:** 2809-2816.

Ober ES, Luterbacher MC. **2002.** Genotypic variation for drought tolerance in *Beta vulgaris*. *Annals in Botany (London)* **89 Spec No:** 917-924.

Olsson PA, Hansson MC, Burleigh SH. **2006.** Effect of P availability on temporal dynamics of carbon allocation and *Glomus intraradices* high-affinity P transporter gene induction in arbuscular mycorrhiza. *Applied and Environmental Microbiology* **72:** 4115-4120.

Oshima Y. **1997.** The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Genetic Systems* **72:** 323-334.

Palma JM, Longa MA, Rio LA, Arines J. **1993.** Superoxide dismutase in vesicular arbuscular-mycorrhizal red clover plants. *Physiologia Plantarum* **87:** 77-83.

Paszkowski U. **2006.** A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytologist* **172:** 35-46.

Pawlowska TE, Taylor JW. **2004.** Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **427:** 733-737.

Pederson BA, Wilson WA, Roach PJ. **2004.** Glycogen synthase sensitivity to glucose-6-P is important for controlling glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279:** 13764-13768.

Peiter E, Schubert S. **2003.** Sugar uptake and proton release by protoplasts from the infected zone of *Vicia faba* L. nodules: evidence against apoplastic sugar supply of infected cells. *Journal of Experimental Botany* **54:** 1691-1700.

Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F. **2003.** Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **43:** 225-244.

Peterson RL, Uetake Y, Zelmer C. **1998.** Fungal symbioses with orchid protocorms. *Symbiosis* **25:** 29-55.

Peterson RL, Massicotte H, Melville L. **2004.** *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology*. Ontario: National Research Council of Canada.

Pettersson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S. **2005.** Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biology of the Cell* **97:** 487-500.

Pfeffer PE, Douds DD, Becard G, Shachar-Hill Y. **1999.** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* **120:** 587-598.

Phelps A, Briggs C, Mincone L, Wohlrab H. **1996.** Mitochondrial phosphate transport protein. replacements of glutamic, aspartic, and histidine residues affect transport and protein conformation and point to a coupled proton transport path. *Biochemistry* **35:** 10757-10762.

Phillips JM, Hayman DS. **1970.** Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55:** 158-&.

Pirozynski KA, Malloch DW. **1975.** The origin of land plants: a matter of mycotrophism. *Biosystems* **6:** 153-164.

Pozo MJ, zcon-Aguilar C, Dumas-Gaudot E, Barea JM. **1999.** beta-1,3-glucanase activities in tomato roots inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi and/or Phytophthora parasitica and their possible involvement in bioprotection. *Plant Science* **141:** 149-157.

Pratt WB, Toft DO. **2003.** Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-vased chaperone machinery. *Experimental Biology and Medicine* **228:** 111-133.

Raab PA, Brennwald A, Redecker D. **2005.** Mitochondrial large ribosomal subunit sequences are homogeneous within isolates of Glomus (arbuscular mycorrhizal fungi, Glomeromycota). *Mycological Research* **109:** 1315-1322.

Raghothama KG, Karthikeyan AS. **2006.** Phosphate acquisition. *Plant and Soil* **274:** 37-49.

Rasmussen HN. **1995.** *Terrestrial orchids from seed to mycotrophic plant*. Cambridge: Cambridge University Press.

Read DJ. **1996.** The structure and function of the ericoid mycorrhizal root. *Annals of Botany* **77:** 365-374.

Read DJ, Duckett JG, Francis R, Ligrone R, Russel A. **2000.** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355:** 815-830.

Redecker D, Thierfelder H, Werner D. **1995.** A new cultivation system for arbuscular mycorrhizal fungi on glass beads. *Angewandte Botanik* **69:** 189-191.

Redecker D, Kodner R, Graham LE. **2000.** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289:** 1920-1921.

Remy W, Taylor TM, Hass H, Kerp H. **1994.** Four hunderd-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91:** 11841-11843.

Requena N, Füller P, Franken P. **1999.** Molecular characterisation of *GmFOX*2, an evolutionary highly conserved gene from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*, down-regulated during interaction with rhizobacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12:** 934-942.

Requena N, Mann P, Franken P. **2000.** A homologue of the cell-cycle check-point TOR2 from *Saccharomyces cerevisiae* exists in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Protoplasma* **212:** 89-98.

Requena N, Breuninger M, Franken P, Ocon A. **2003.** Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H^+-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* 3549. *Plant Physiology* **132:** 1540-1549.

Rhody D. **2002.** Erste Schritte zur Etablierung und Verbesserung von Transformationssystemen für wurzelbesiedelnde Pilze. Philipps-Universität Marburg.

Richardson AE. **1994.** Soil microorganisms and phosphorous availability. *Siol Biota* 50-62.

Richter G. **1998.** *Stoffwechselphysiologie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.

Richter K, Buchner J. **2001.** Hsp90: chaperoning signal transduction. *Journal of Cell Physiology* **188:** 281-290.

Ridley AJ. **2001.** Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends in Cell Biology* **11:** 471-477.

Roussel H, Bruns S, Gianinazzi-Pearson V, Hahlbrock K, Franken P. **1997.** Induction of a membrane intrinsic protein-encoding mRNA in arbuscular mycorrhiza and elicitor-stimulated cell suspension cultures of parsley. *Plant Science* **126:** 203-210.

Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD. **2000.** Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant and Cell Physiology* **41:** 1229-1234.

Rydlova J, Vosatka M. **2003.** Effect of *Glomus intraradices* isolated from Pb-contaminated soil on Pb uptake by *Agrostis capillaris* is changed by its cultivation in a metal-free substrate. *Folia Geobotanica* **38:** 155-165.

Rylott EL, Gilday AD, Graham IA. **2003.** The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. *Plant Physiology* **131:** 1834-1842.

Saito M. **1995.** Enzyme activities of the internal hyphae and germinated spores of arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita* Becker &Hall. *New Phytologist* **129:** 425-431.

Sakano K, Yazaki Y, Okihara K, Mimura T, Kiyota S. **1995.** Lack of control in inorganic phosphate uptake by *Catharanthus roseus* (L.) G. Don cells (cytoplasmic inorganic phosphate homeostasis depends on the tonoplast inorganic phosphate transport system?). *Plant Physiology* **108:** 295-302.

Salzer P, Corbiere H, Boller T. **1999.** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208:** 319-325.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **1989.** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

Sampson K, Heath IB. **2005.** The dynamic behaviour of microtubules and their contributions to hyphal tip growth in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* **151:** 1543-1555.

Sanders FE, Tinker PB. **1971.** Mechanism of absorption of phosphate from soil by endogone mycorrhizas. *Nature* **233:** 278-&.

Sanders IR, Alt M, Groppe K, Boller T, Wiemfen A. **1995.** Identification of ribosomal DNA polymorphisms among and within spores of the Glomales: application to studies on the genetic diversity of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *New Phytologist* **130:** 419-427.

Sanders IR. **2002.** Ecology and evolution of multigenomic arbuscular mycorrhizal fungi. *The American Naturalist* **160, Supplement:** S128-S141.

Sawaki H, Saito M. **2001.** Expressed genes in the extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, in the symbiotic phase. *FEMS Microbiology Letters* **195:** 109-113.

Sawaki H. **2002.** Sequence similarity of glutathione S-transferase between a land plant and an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Biotechnology* **19:** 197-201.

Scales PF, Peterson RL. **1991a.** Structure of ectomycorrhizae formed by *Wilcoxia mikolae* var *mikolae* with *Picea mariana* and *Betula alleghaniensis*. *Canadian Journal of Botany* **69:** 2149-2157.

Scales PF, Peterson RL. **1991b.** Structure and development of *Pinus banksiana* - *Wilcoxia* ectendomycorrhizae. *Canadian Journal of Botany* **69:** 2135-2148.

Schlegel HG. **1992.** *Allgemeine Mikrobiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York.

Schutzendübel A, Polle A. **2002.** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53:** 1351-1365.

Schüßler A, Schwarzott D, Walker C. **2001.** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105:** 1413-1421.

Shachar-Hill Y, Pfeffer PE, Douds D, Osman SF, Doner LW, Ratcliffe RG. **1995.** Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiology* **108:** 7-15.

Sheehan D, Meade G, Foley VM, Dowd CA. **2001.** Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal* **360:** 1-16.

Shinohara ML, Loros JJ, Dunlap JC. **1998.** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated on a daily basis by the circadian clock. *Journal of Biological Chemistry* **273:** 446-452.

Sidoux-Walter F, Pettersson N, Hohmann S. **2004.** The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqy1 is involved in sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101:** 17422-17427.

Simon L, Lalonde M, Bruns TD. **1992.** Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Applied and Environmental Microbiology* **58:** 291-295.

Siqueira JO, Safir GR, Nair MG. **1991.** Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds. *New Phytologist* **118:** 87-93.

Skowyra D, Georgopoulos C, Zylicz M. **1990.** The *Escherichia coli* Dnak gene-product, the Hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated Rna-Polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* **62:** 939-944.

Smith FA, Smith SE. **1997.** Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist* **137:** 373-388.

Smith FA, Jakobsen I, Smith SE. **2000.** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **147:** 357-366.

Smith FW. **2001.** Sulphur and phosphorus transport systems in plants. *Plant and Soil* **232:** 109-118.

Smith SE, Smith FA. **1990.** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* **114:** 1-38.

Smith SE, Read DJ. **1997.** *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.

Smith SE, Dickson S, Smith FA. **2001.** Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology* **28:** 683-694.

Smith SE, Smith FA, Jakobsen I. **2003.** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* **133:** 16-20.

Solaiman MZ, Saito A. **2001.** Phosphate efflux from intraradical hyphae of *Gigaspora margarita* in vitro and its implication for phosphorus translocation. *New Phytologist* **151:** 525-533.

Somerville C, Koornneef M. **2002.** A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nature Reviews Genetics.* **3:** 883-889.

Spanu PD. **2006.** Why do some fungi give up their freedom and become obligate dependants on their host? *New Phytologist* **171:** 447-450.

Staehelin C, Charon C, Boller T, Crespi M, Kondorosi A. **2001.** *Medicago truncatula* plants overexpressing the early nodulin gene enod40 exhibit accelerated mycorrhizal colonization and enhanced formation of arbuscules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98:** 15366-15371.

Steinberg G, Schliwa M, Lehmler C, Bolker M, Kahmann R, McIntosh JR. **1998.** Kinesin from the plant pathogenic fungus *Ustilago maydis* is involved in vacuole formation and cytoplasmic migration. *Journal of Cell Science* **111:** 2235-2246.

Stommel M, Mann P, Franken P. **2001.** Construction and analysis of an EST library using RNA from activated spores of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* **10:** 281-285.

Streeter JG. **1995.** Recent developments in carbon transport and metabolism in symbiotic systems. *Symbiosis* **19:** 175-196.

Strittmatter G, Gheysen G, Gianinazzi-Pearson V, Hahn K, Niebel A, Rohde W, Tacke E. **1996.** Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato gst1 gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9:** 68-73.

Subramanian KS, Charest C. **1998.** Arbuscular mycorrhizae and nitrogen assimilation in maize after drought and recovery. *Physiologia Plantarum* **102:** 285-296.

Sylvia DM. **1988.** Activity of external Hyphae of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology & Biochemistry* **20:** 39-43.

Takesawa T, Ito M, Kanzaki H, Kameya N, Nakamura I. **2002.** Over-expression of zeta glutathione S-transferase in transgenic rice enhances germination and growth at low temperature. *Molecular Breeding* **9:** 93-101.

Tamasloukht M, Sejalon-Delmas N, Kluever A, Jauneau A, Roux C, Becard G, Franken P. **2003.** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* **131:** 1468-1478.

Tawaraya K, Watanabe S, Yoshida E, Wagatsuma T. **1996.** Effect of onion (*Allium cepa*) root exudates on the hyphal growth of *Gigaspora margarita*. *Mycorrhiza* **6:** 57-59.

Tawaraya K, Naito M, Wagatsuma T. **2006.** Solubilization of insoluble inorganic phosphate by hyphal exudates of arbuscular mycorrhizal fungi. *Journal of Plant Nutrition* **29:** 657-665.

Thomson BD, Clarkson DT, Brain P. **1990.** Kinetics of phosphorus uptake by the germ-tubes of the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **116:** 647-653.

Titus JH, Titus PJ, Nowak RS, Smith SD. **2002.** Arbuscular mycorrhizae of Mojave Desert plants. *Western North American Naturalist* **62:** 327-334.

Toussaint JP, St-Arnaud M, Charest C. **2004.** Nitrogen transfer and assimilation between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* Schenck & Smith and Ri T-DNA roots of *Daucus carota* L. in an in vitro compartmented system. *Canadian Journal of Microbiology* **50:** 251-260.

Trepanier M, Becard G, Moutoglis P, Willemot C, Gagne S, Avis TJ, Rioux JA. **2005.** Dependence of arbuscular-mycorrhizal fungi on their plant host for palmitic acid synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* **71:** 5341-5347.

Trotter PJ. **2001.** The genetics of fatty acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Nutrition* **21:** 97-119.

Tsai SM, Phillips DA. **1991.** Flavonoids released naturally from alfalfa promote development of symbiotic *Glomus* spores *in vitro*. *Applied and Environmental Microbiology* **57:** 1485-1488.

Tullio M, Pierandrei F, Salerno A, Rea E. **2003.** Tolerance to cadmium of vesicular arbuscular mycorrhizae spores isolated from a cadmium-polluted and unpolluted soil. *Biology and Fertility of Soils* **37:** 211-214.

Udvardi MK. **2001.** Legume models strut their stuff. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14:** 6-9.

Uetake Y, Kojima T, Ezawa T, Saito M. **2002.** Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **154:** 761-768.

Ulmasov T, Ohmiya A, Hagen G, Guilfoyle T. **1995.** The soybean *GH2/4* gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiology* **108:** 919-927.

van Buuren ML, Lanfranco L, Longato S, Minerdi D, Harrison MJ, Bonfante P. **1999.** Construction and characterization of genomic libraries of two endomycorrhizal fungi: *Glomus versiforme* and *Gigaspora margarita*. *Mycological Research* **103:** 955-960.

Van Tuinen D, Zhao B, Gianinazzi-Pearson V. **1998.** PCR in studies of AM fungi: from primers to application. In: Varma A, ed. *Mycorrhiza Manual*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 387-400.

Veal EA, Toone WM, Jones N, Morgan BA. **2002.** Distinct Roles for Glutathione S-Transferases in the Oxidative Stress Response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of Biological Chemistry* **277:** 35523-35531.

Verkman AS, Mitra AK. **2000.** Structure and function of aquaporin water channels. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **278:** F13-F28.

Villar-Palasi C, Guinovart JJ. **1997.** The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *The FASEB Journal* **11:** 544-558.

Vreeland P, Kleiner EF, Vreeland H. **1981.** Mycorrhizal symbiosis of sarcodes-sanguinea. *Environmental and Experimental Botany* **21:** 15-25.

Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F. **2002.** Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Molecular Biology* **49:** 515-532.

Wais RJ, Galera C, Oldroyd G, Catoira R, Penmetsa RV, Cook D, Gough C, Denarie J, Long SR. **2000.** Genetic analysis of calcium spiking responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97:** 13407-13412.

Wang GM, Coleman DC, Freckman DW, Dyer MI, Mcnaughton SJ, Acra MA, Goeschl JD. **1989.** Carbon partitioning patterns of mycorrhizal versus non-mycorrhizal plants - real-time dynamic measurements using (Co2)-C-11. *New Phytologist* **112:** 489-493.

Wang PC, Vancura A, Mitcheson TG, Kuret J. **1992.** Two genes in *Saccharomyces cerevisiae* encode a membrane-bound form of casein kinase-1. *Molecular Biology of the Cell* **3:** 275-286.

Waschke A, Sieh D, Tamasloukht B, Fischer K, Franken P. 2006. Identification of heavy metal induced genes encoding glutathione S-transferases in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Mycorrhiza* **in press**.

Wasternack C, Hause B. **2002.** Jasmonates and octadecanoids: Signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, Vol 72* **72:** 165-221.

Watanabe T, Shirai N, Okada H, Honda Y, Kuwahara M. **2001.** Production and chemiluminescent free radical reactions of glyoxal in lipid peroxidation of linoleic acid by the ligninolytic enzyme, manganese peroxidase. *FEBS Journal* **268:** 6114-6122.

Wedlich-Soldner R, Schulz I, Straube A, Steinberg G. **2002.** Dynein supports motility of endoplasmic reticulum in the fungus *Ustilago maydis*. *Molecular Biology of the Cell* **13:** 965-977.

Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. **2005.** The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118:** 843-846.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. **1990.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols*. New York: Academic press, 315-322.

Whittaker MM, Kersten PJ, Cullen D, Whittaker JW. **1999.** Identification of catalytic residues in glyoxal oxidase by targeted mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry* **274:** 36226-36232.

Wickner S, Maurizi MR, Gottesman S. **1999.** Posttranslational quality control: Folding, refolding, and degrading proteins. *Science* **286:** 1888-1893.

Wilce MC, Parker MW. **1994.** Structure and function of glutathione S-transferases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1205:** 1-18.

Wilson RA, Arst HN, Jr. 1998. Mutational analysis of AREA, a transcriptional activator mediating nitrogen metabolite repression in *Aspergillus nidulans* and a member of the "Streetwise" GATA family of transcription factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62:** 586-596.

Wingler A, Wallenda T, Hampp R. **1996.** Mycorrhiza formation on Norway spruce (*Picea abies*) roots affects the pathway of anaplerotic CO_2 fixation. *Physiologia Plantarum* **96:** 699-705.

Wright DP, Read DJ, Scholes JD. **1998a.** Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell and Environment* **21:** 881-891.

Wright DP, Scholes JD, Read DJ. **1998b.** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of Trifolium repens L. *Plant, Cell and Environment* **21:** 209-216.

Wu Q, Sandrock TM, Turgeon BG, Yoder OC, Wirsel SG, Aist JR. **1998.** A fungal kinesin required for organelle motility, hyphal growth, and morphogenesis. *Molecular Biology of the Cell* **9:** 89-101.

Wulf A, Manthey K, Doll J, Perlick AM, Linke B, Bekel T, Meyer F, Franken P, Kuster H, Krajinski F. **2003.** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16:** 306-314.

Yin Z, Ivanov VN, Habelhah H, Tew K, Ronai Z. **2000.** Glutathione S-transferase p elicits protection against H_2O_2-induced cell death via coordinated regulation of stress kinases. *Cancer Research* **60:** 4053-4057.

Yompakdee C, Bun-Ya M, Shikata K, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y. **1996.** A putative new membrane protein, Pho86p, in the inorganic phosphate uptake system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **171:** 41-47.

Yompakdee C, Ogawa N, Harashima S, Oshima Y. **1996.** A putative membrane protein, Pho88p, involved in inorganic phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics.* **251:** 580-590.

Young BW, Massicotte HB, Tackaberry LE, Baldwin QF, Egger KN. **2002.** Monotropa uniflora: morphological and molecular assessment of mycorrhizae retrieved from sites in the Sub-Boreal Spruce biogeoclimatic zone in central British Columbia. *Mycorrhiza* **12:** 75-82.

Young JC, Moarefi I, Hartl FU. **2001.** Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* **154:** 267-274.

Young ND, Cannon SB, Sato S, Kim D, Cook DR, Town CD, Roe BA, Tabata S. **2005.** Sequencing the Genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiology* **137:** 1174-1181.

Yu T, Li YS, Chen XF, Hu J, Chang X, Zhu YG. **2003.** Transgenic tobacco plants overexpressing cotton glutathione S-transferase (GST) show enhanced resistance to methyl viologen. *Journal of Plant Physiology* **160:** 1305-1311.

Yu TEJC, Egger KN, Peterson RL. **2001.** Ectendomycorrhizal associations - characteristics and functions. *Mycorrhiza* **11:** 167-177.

Zézé A, Dulieu H, Gianinazzi-Pearson V. **1994.** DNA cloning and screening of a partial genomic library from an arbuscular mycorrhizal fungus, *Scutellospora castanea*. *Mycorrhiza* **4:** 251-254.

Zhao ZW, Xia YM, Qin XZ, Li XW, Cheng LZ, Sha T, Wang GH . **2001.** Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza* **11:** 159-162.

Zylicz M, King FW, Wawrzynow A. **2001.** Hsp70 interactions with the p53 tumour suppressor protein. *EMBO Journal* **20:** 4634-4638.

7 Anhang

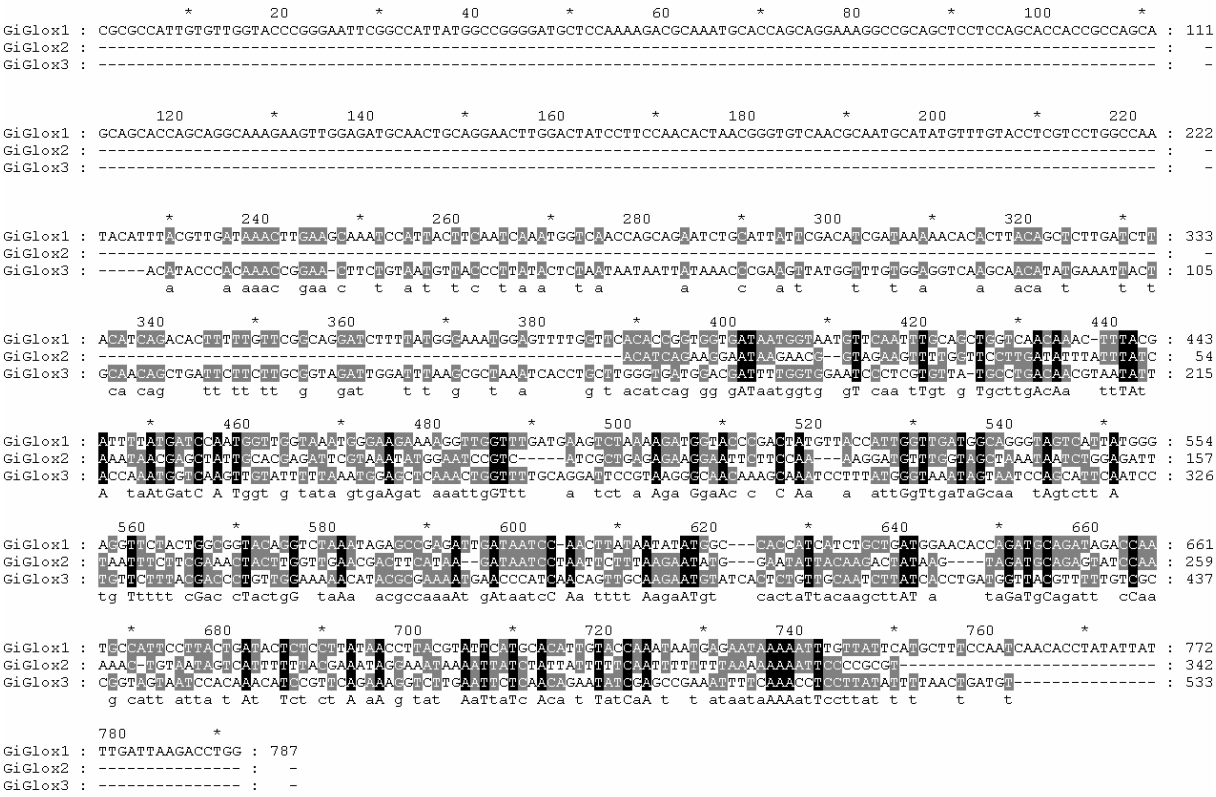


Abbildung A-1: Darstellung des Sequenzvergleichs der bisher in *Glomus intraradices* isolierten EST's für Glyoxaloxidasen. Die Sequenzen zweier bisher bekannten EST's von Glyoxaloxidasen *GiGlox1* (BI246189, Jun et al., 2002) und *GiGlox2* (AM168258, Rhody, 2003) wurden mit der in der asymbiotischen Entwicklungsphase isolierten *GiGlox3* verglichen.

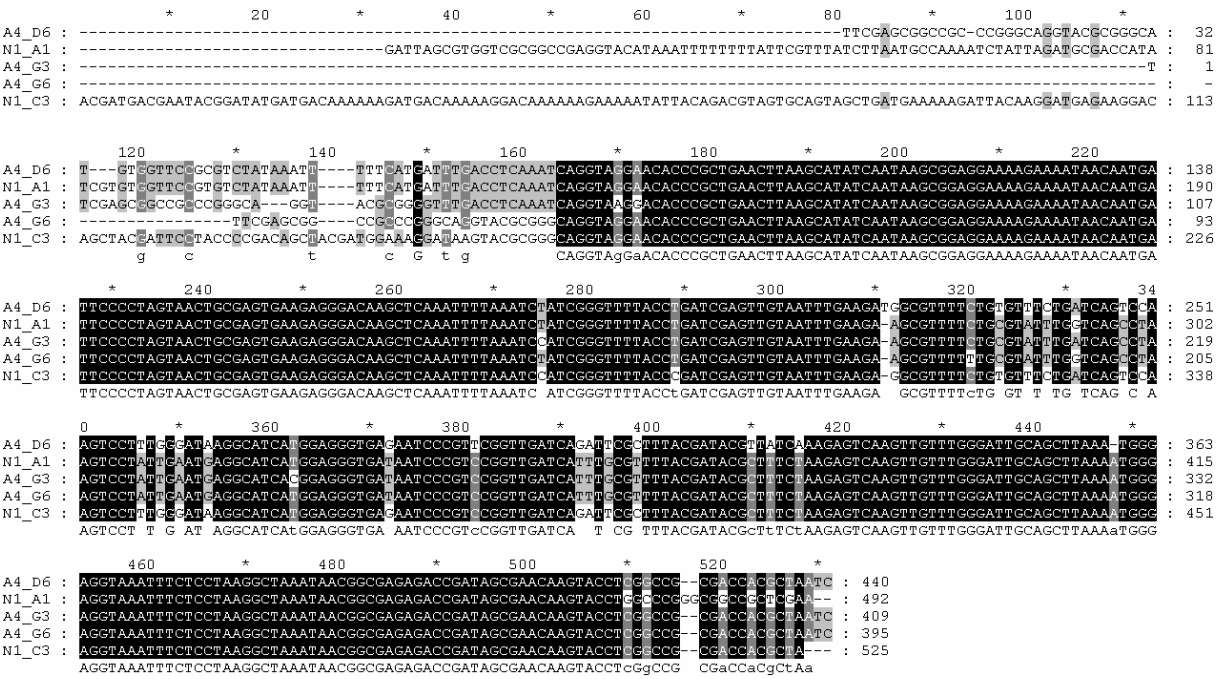


Abbildung A-2: Darstellung des Sequenzvergleichs der während der symbiotischen Entwicklung von *Glomus intraradices* isolierten rRNA-Sequenzen. Die Sequenzen der fünf verschiedenen 25S ribosomalen Gene aus der symbiotischen Entwicklungsphase wurden miteinander verglichen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Astrid Waschke geb. Klüver
Geburtsdatum	23.02.1976
Geburtsort	Bremen
Familienstand	verheiratet

Ausbildung

seit 2001	Anfertigung der Dissertation: – von September 2001 bis September 2002 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biochemie, in Marburg/Lahn unter der Anleitung von PD Dr. P. Franken, – von Oktober 2002 bis März 2003 am CNRS in Castanet-Tolosan-Cedex, Frankreich, unter der Anleitung von Prof. Dr. Guillaume Bécard und – von April 2003 bis Dezember 2006 am Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V. in der Abteilung Pflanzenernährung unter der Anleitung von PD Dr. P. Franken.
2000 – 2001	Anfertigen der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von P. Franken „Untersuchungen zur Morphologie und RNA-Akkumulierung während der präsymbiontischen Entwicklung in dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Gigaspora rosea*“
2000	Diplomprüfung in Mikrobiologie, Genetik und Biochemie
1998 – 2000	Hauptstudium an der Philipps-Universität –Marburg
1998	Vordiplom im Fach Biologie
1995 – 1998	Grundstudium im Fach Biologie an der Universität Bremen
1992 – 1995	Schulzentrum des Sekundarbereichs II Horn -Gymnasium- in Bremen, Abschluß Allgemeine Hochschulreife.

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn PD Dr. Philipp Franken für die Begleitung über den gesamten Zeitraum der Erstellung dieser Doktorarbeit danken. Durch ausgezeichnete Betreuung, die Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und die Gewährung des Freiraums für selbstständiges Arbeiten hat er zum Erfolg wesentlich beigetragen. Zusätzlich danke ich allen ehemaligen Mitgliedern der AG Franken am MPI für terrestische Mikrobiologie in Marburg für die gute Zusammenarbeit.

Für die freundliche Aufnahme und die wissenschaftliche Unterstützung während meines Aufenthaltes am CNRS in Castanet-Tolosan, Frankreich, möchte ich mich bedanken, insbesondere bei Prof. Guilaume Bécard. Wertvolle Ergebnisse lieferte die Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld im Rahmen der Sequenzierungen für diese Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt den Mitarbeitern und der Leitung des IGZ in Großbeeren. Durch Diskussionen im Kreise der Doktoranden und Wissenschaftler konnte ich neue Erkenntnisse sammeln und miteinbeziehen, insbesondere Silke Ruppels weitergegebenes Wissen und ihre Erfahrung über die Real-Time-PCR. Für die tagtägliche Zusammenarbeit im Labor möchte ich mich bei allen Mitgliedern des S1-Labors bedanken. Im Besonderen gilt mein Dank Kerstin Fischer für die gute Unterstützung in allen Bereichen.

Für die Unterstützung im privaten Umfeld möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, wobei mein „kleiner“ Bruder Nils zusätzliche fachliche Anregungen gab. Allen weiteren Angehörigen und Freunden danke ich für Geduld und Verständnis.

Meinem Ehemann Wolfram danke ich von Herzen für die Begleitung über den gesamten Zeitraum. Er war es der mir immer zur Seite stand, mich motivierte und mir die phasenweise nötige Zuversicht in das Gelingen dieser Arbeit schenkte.

Die Arbeit wurde finanziell unterstützt von der DFG im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 395 „Interaktion, Anpassung und katalytische Fähigkeiten von Bodenmikroorganismen” an der Philipps-Universität Marburg.

Weitere Unterstützung für die Zeit in Frankreich erfolgte durch die Marie Curie Training Site „Plant Cell Signaling and Biotechnology“.

Zusätzlich wurde diese Arbeit in Teilen finanziert durch die DFG im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen“ und durch das Institut für Gemüse- und Zierpflanzenbau Großbeeren/Erfurt e.V.