
**Untersuchungen zum Einfluss
des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf
das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz
gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und
die Genexpression in den Blättern**

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
Philipps-Universität-Marburg
vorgelegt von

Beate Achatz
aus Offenbach a.M.

Marburg/Lahn 2006

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

Erstgutachter: PD Dr. Philipp Franken

Zweitgutachter: Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel (Universität Giessen)

Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2006

Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Untersuchungen zum Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf das Wachstum von *Hordeum vulgare*, die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* und die Genexpression in den Blättern,,

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 jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, 27. März 2006

Beate Achatz

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

- Waller, F.*, Achatz, B.*, Baltruschat, H.*, Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Hückelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. & Kogel, K.H. (2005)** The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13386-13391. * contributed equally to this work
- Waller, F., Achatz, B. and Kogel, K.H. (2006)** Analysis of the plant protective potential of the root endophytic fungus *Piriformospora indica* in cereals. In Varma, A.&Oelmüller, R. (eds.), *Advanced Techniques in Soil Microbiology*. Springer-Verlag, Heidelberg. (*im Druck*)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
1 Einleitung	5
1.1 Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen	5
1.1.1 Formen der Resistenz	6
1.1.2 Abwehrmechanismen	7
1.2 Mutualistische Wechselwirkungen	10
1.2.1 Mykorrhiza	10
1.2.2 Rhizobakterien-Symbiosen	12
1.2.3 Mutualistische Wechselwirkungen und ihr Einfluss auf Pflanzen	14
1.3 Induzierte Resistenz	16
1.3.1 Biologisch induzierte Resistenzen	16
1.3.1.1 SAR – Systemisch erworbene Resistenz	17
1.3.1.2 ISR – Rhizobakterien induzierte Resistenz	18
1.3.2 Chemisch induzierte Resistenz	18
1.4 Signalwege induzierter Resistenzen	20
1.5 <i>Hordeum vulgare</i> – <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	22
1.6 <i>Piriformospora indica</i>	26
1.7 Zielsetzung der Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Organismen	29
2.2 Vektoren und Plasmide	29
2.3 Oligonukleotide	30
2.4 Standard-Puffer, Lösungen und Medien	32
2.5 Kultivierung der verwendeten Organismen	37
2.5.1 <i>Hordeum vulgare</i>	37
2.5.2 <i>Piriformospora indica</i>	38
2.5.3 <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i> (<i>Bgh</i>)	38
2.5.4 <i>Escherichia coli</i>	38
2.6 Behandlungen der Pflanzen	38
2.6.1 Inokulation der Pflanzen mit <i>P. indica</i>	38
2.6.2 Inokulation der Pflanzen mit <i>Bgh</i>	39
2.6.3 Ernte der Pflanzen	40
2.7 Mikroskopische Untersuchungen	41
2.7.1 Färbungen pilzlicher Strukturen in den Wurzeln	41
2.7.2 Färbung pilzlicher Strukturen auf den Blättern	41
2.7.3 Mikroskopische Betrachtungen der Wurzelbesiedelung durch <i>P. indica</i>	41
2.7.4 Besiedelungsabschätzung der geernteten Pflanzen	41
2.7.5 Cytologische Untersuchungen der Pilz-Pflanzen-Interaktion <i>H. vulgare</i> – <i>Bgh</i>	42
2.8 Makroskopische Untersuchungen	43
2.8.1 Blattsegmenttest zur Untersuchung der Resistenz der Gerstenpflanzen gegen <i>Bgh</i>	43

2.8.2	Untersuchungen der Auswirkungen der <i>P. indica</i> -Besiedelung auf den Ertrag	43
2.8.2.1	Gefäßexperiment zur Bestimmung des Ertrags	43
2.8.2.2	Bestimmung verschiedener Ertragsparameter	45
2.8.3	Messung der Photosyntheseleistung <i>P. indica</i> -besiedelter Gerstepflanzen	46
2.8.4	Messung des Chlorophyllgehaltes der Pflanzen	47
2.8.5	Untersuchungen zur Qualitätsbestimmung im Korn	49
2.9	Photographische Dokumentationen	49
2.10	Molekularbiologische Methoden	50
2.10.1	RNA-Extraktion aus Blättern oder Wurzeln von Pflanzen	50
2.10.2	cDNA-Synthese	51
2.10.2.1	cDNA-Herstellung mittels SMART TM PCR Synthesis-Kit	51
2.10.2.2	cDNA-Herstellung mittels Superscript TM II RT(Invitrogen, Karlsruhe)	51
2.10.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	51
2.10.3.1	Standard-PCR	51
2.10.3.2	Semiquantitative RT-PCR	52
2.10.3.3	<i>RealTime</i> -PCR	52
2.10.3.4	Auswertung der <i>RealTime</i> -PCR	54
2.10.4	Gelelektrophorese	54
2.10.5	Klonierungen und Transformationen	55
2.10.6	Extraktion und Analyse von Plasmid-DNA	55
2.10.7	Extraktion und Analyse von genomischer DNA	56
2.10.8	Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren	56
2.10.9	Sequenzierungen	56
2.10.10	Homologiensuche der erhaltenen ESTs in verschiedenen Datenbanken	56
2.10.11	Northern-Blot Analysen	57
2.10.11.1	Northern-Blot-Herstellung	57
2.10.11.2	Herstellung ³² P-markierter Sonden	57
2.10.11.3	Northern Hybridisierung und Detektion der Hybridisierungssignale	58
2.10.12	Herstellung der SSH-Banken	58
2.10.13	Reverse Northern Hybridisierungen	59
2.10.13.1	Herstellung DIG-markierter Sonden	59
2.10.13.2	Hybridisierung der Membranen und Detektion	60
2.10.13.3	Quantifizierung von Signalintensitäten	60
2.10.14	Hybridisierung und Auswertung der GAN-1,5K-cDNA-Makroarrays	61
2.10.14.1	Synthese ³³ P-markierter komplexer cDNA-Sonden	62
2.10.14.2	Hybridisierung der GAN-Makroarrays	63
2.10.14.3	Auswertung und Datenanalyse der GAN-Makroarrays	64
2.10.15	Hybridisierung und Auswertung des 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®]	66
2.10.15.1	Synthese der Sonden und Hybridisierung des 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®]	66
2.10.15.2	Auswertung und Datenanalyse des 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®]	66
3	Ergebnisse	69
3.1	Charakterisierung und Quantifizierung der Wurzelbesiedelung von <i>Hordeum vulgare</i> durch <i>Piriformospora indica</i>	69
3.2	Charakterisierungen des Einflusses von <i>P. indica</i> auf <i>H. vulgare</i>	72
3.2.1	Einfluss auf Wachstumsförderung unter Gewächshaus-bedingungen	72
3.2.2	Einfluss auf Wachstumsförderung im Gefäßversuch unter Freilandbedingungen	74
3.2.3	Einfluss auf die Entwicklung der besiedelten Pflanzen	79
3.2.4	Einfluss auf den Ertrag und Ertragskomponenten	81
3.2.5	Einfluss auf Qualitätsparameter des Kornes	84
3.3	Einfluss der Besiedelung von <i>H. vulgare</i> mit <i>P. indica</i> auf die Interaktion mit dem Blattpathogen <i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	85
3.3.1	Untersuchungen zur Anfälligkeit besiedelter Gerstepflanzen mit <i>Bgh</i>	85
3.3.2	Makroskopische Analyse der Induzierten Resistenz gegen <i>Bgh</i>	85
3.3.3	Cytologische Analyse der induzierten Resistenz gegen <i>Bgh</i>	90

3.3.4	Vergleich der durch <i>P.indica</i> vermittelten induzierten Resistenz im Kultivar Ingrid wt mit der hypersuszeptiblen Mutante 105-6	92
3.4	Molekulare Analysen der differentiellen Genexpression in Blättern <i>P. indica</i> besiedelter Gerstenpflanzen	94
3.4.1	Zielgerichtete Expressionsanalysen bezüglich der durch <i>P. indica</i> hervorgerufenen induzierten Resistenz	94
3.4.2	Zielgerichtete Expressionsanalysen bezüglich der durch <i>P. indica</i> hervorgerufenen induzierten Resistenz unter dem Aspekt des <i>Primings</i>	100
3.4.3	Nichtzielgerichtete Ansätze zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Blättern <i>P. indica</i> -besiedelter Pflanzen	103
3.4.3.1	Herstellung und Analyse subtraktiver cDNA-Banken	103
3.4.3.2	cDNA-Array Analysen	106
3.4.3.2.1	Expressionsanalysen mittels des GAN-Makroarrays	108
3.4.3.2.2	RT-PCR Analysen ausgewählter Kandidatengene der GAN-Makroarrays	111
3.4.3.2.3	Expressionsanalysen mittels des 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®]	114
3.4.3.2.4	<i>RealTime</i> -PCR-Analysen ausgewählter Kandidaten der 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®] -Mikroarrays	120
3.5	Einfluss der Besiedelung mit <i>P. indica</i> auf Chlorophyllgehalt und Photosyntheseleistung	121
4	Diskussion	125
4.1	Besiedelung der Pflanzen durch <i>Piriformospora indica</i>	125
4.2	Besiedelung der Pflanzen durch <i>P. indica</i> und sein Einfluss auf die Pflanzen	128
4.2.1	Einfluss von <i>P. indica</i> auf das Wachstum	128
4.2.2	Einfluss von <i>P. indica</i> auf die Entwicklung	131
4.2.3	Einfluss von <i>P. indica</i> auf den Ertrag	133
4.3	Induzierte Resistenz durch <i>P. indica</i>	134
4.3.1	Einfluss der Wurzelbesiedelung auf Wechselwirkungen mit dem Blattpathogen <i>Bgh</i>	134
4.3.2	Mechanismen der induzierten Resistenz gegen <i>Bgh</i>	136
4.4	Differentielle Genexpression im Blatt durch die Wurzelbesiedelung mit <i>P. indica</i>	142
4.4.1	Suppressive Subtraktive Hybridisierungen (SSH)	142
4.4.2	Arrayanalysen	144
4.4.2.1	Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels Hybridisierung des GAN-1,5K-Makroarrays und des 22K <i>Barley1 GeneChip</i> [®] -Mikroarrays	145
4.4.2.2	Genexpressionsanalysen von durch <i>P. indica</i> -differentiell exprimierten Kandidatengenen	152
4.5	Abschließende Betrachtungen	161
5	Literatur	165
6	Anhang	185

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
Amp	Ampicillin
BC	Rückkreuzung (<i>backcross</i>)
BCI	<i>Barley chemically induced</i> , in Gerste chemisch induzierte
Bgh	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> (Echter Gerstenmehltau)
Bgt	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i> (Echter Weizenmehltau)
bIR	Biologisch induzierte Resistenz
Bp	Basenpaare
BTH	Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester
cDNA	komplementäre (<i>complementary</i>) DNA
cIR	Chemisch induzierte Resistenz
CM	Komplex (<i>complete</i>) Medium
cv.	Sorte, Kultivar (<i>Cultivar</i>)
DCINA	2,6-Dichlorisonikotinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest. H ₂ O	destilliertes Wasser
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESH	Sekundärhyphe (<i>elongating secondary hyphae</i>)
EST	<i>Expressed sequence tags</i>
Et	Ethylen
EtBr ⁻	Ethidium Bromid
f.sp.	<i>forma specialis</i>
gDNA	genomische DNA
HAU	Haustorium
HR	Hypersensitive Reaktion
IPAZ	Institut für Phytopathologie und angewandte Zoologie
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
IR	Induzierte Resistenz
ISR	Induzierte systemische Resistenz (<i>induced systemic resistance</i>)
JA	Jasmonat (<i>jasmonic acid</i>)
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasenpaare
LB	Luria Bertani
MOPS	Morpholin-3-propansulfonsäure
mRNA	Boten RNA (<i>messenger RNA</i>)
NPLZ	Nicht penetrierte lebende Zelle
Pap	Papille
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGPR	Wachstumsfördernde Rhizobakterien (<i>Plant growth promoting rhizobacteria</i>)
PR	<i>Pathogenesis related</i> (Pathogenese-bedingt)
RCI	<i>Rice chemically induced</i> , in Reis chemisch induzierte

Abkürzungsverzeichnis

RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNAse	Ribonuklease
ROI	Reaktive Sauerstoff intermediate (<i>reactive oxygen intermediate(s)</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SA	Salizylsäure
SAR	Systemisch erworbene Resistenz (<i>systemic acquired resistance</i>)
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfat</i>
SSC	NaCl/Natriumcitrat (<i>saline sodium citrate</i>)
SSH	Suppressive subtraktive Hybridisierung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TKG	Tausend-Korn-Gewicht
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WAI	Wochen nach Infektion (<i>weeks after infection</i>)
WCI	<i>Wheat chemically induced</i> , in Weizen chemisch induzierte
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid

Zusammenfassung

Der Wurzelendophyt *Piriformospora indica* wurde 1997 von der Spore eines AM-Pilzes in der indischen Halbwüste Thar isoliert. Wachstumsfördernde Eigenschaften dieses Endophyten konnten bei verschiedenen Pflanzenarten beobachtet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Wechselwirkungen von *P. indica* mit *Hordeum vulgare* näher zu untersuchen und systemische Wirkungen auf den Spross zu charakterisieren.

Die Besiedelung von Wurzeln mit *P. indica* führte im Gewächshaus zu einer signifikanten Förderung des Pflanzenwachstums. In Freilandgefäßexperimenten zeigte sich ein früheres Schieben der Ähren, eine erhöhte Ährenanzahl, sowie eine Ertragsteigerung von drei verschiedenen Gerstensorten zwischen 1,9 und 11 Prozent. Hinweise auf eine erhöhte Photosyntheserate und einen erhöhten Chlorophyllgehalt in den Blättern besiedelter Pflanzen, die sich aus der Analyse einer subtraktiven cDNA Bank ergaben, konnten bestätigt werden.

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss der Besiedelung auf die Resistenz der Pflanzen gegen das biotrophe Blattpathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) untersucht. Makroskopisch zeigte sich ein erhöhter Resistenzstatus der besiedelten Pflanzen, der auf der Basis von zytologischen Experimenten auf eine größere Penetrationsresistenz zurückgeführt werden konnte. Die beobachtete induzierte Resistenz war mit einer erhöhten Bereitschaft für die schnelle und effektive Aktivierung der zellulären Verteidigungsantwort assoziiert. Erste Genexpressionsanalysen zeigten, dass bekannte Wege systemisch induzierter Resistenzen hierbei nicht beteiligt zu sein scheinen, und dass die Aktivierung des antioxidativen Systems aber eine wichtige Rolle spielen könnte. Durch Hybridisierungen eines cDNA-Makroarrays und des 22K *Barley1 GeneChip*[®] (Affymetrix, Santa Clara, USA) wurden in Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen nur verhältnismäßig wenig differentiell exprimierte Gene identifiziert. Anschließende *RealTime*-PCR-Expressionsstudien bestätigten eine stärkere Induktion von zwei putativen Rezeptorkinasen in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen, 12h nach *Bgh*-Inokulation, die für Komponenten der Signalrezeption und Signaltransduktion kodieren. Dies deutet auf eine frühere Erkennung des Pathogens als Basis für die *P. indica*-induzierte Resistenz hin.

1 Einleitung

Pflanzen sind in der Natur der Besiedelung vieler Mikroorganismen ausgesetzt. Diese Besiedelung kann sowohl mutualistischer Natur, also zum Nutzen beider Partner, als auch parasitärer Natur sein. Die Pflanze bedient sich einer Vielzahl von Schutzmechanismen, um sich gegen das Eindringen und die Ausbreitung von Organismen zu wehren. Jegliche Mikroorganismen müssen für eine erfolgreiche Besiedelung der Pflanzen und ihrer weiteren Vermehrung zunächst diese Barrieren der pflanzlichen Abwehr überwinden. Die Ausbreitung phytopathogener Organismen in Kulturpflanzen kann zu erheblichen Schäden unter agronomischen Aspekten und zu einem Ausfall der gesamten Pflanze oder aber zu einer verminderten Menge oder Qualität des Erntegutes führen. Trotz pflanzenschutzlicher Maßnahmen liegen die durch phytopathogene Organismen entstandenen Ernteverluste weltweit bei ca. 13% mit steigender Tendenz. Hinzu kommen weitere Verluste durch abiotische Faktoren wie Dürren, Unwetter und Frost, sowie durch tierische Schädlinge und konkurrierende Wildkräuter, so dass nur ca. 50 % des potentiellen Ertrages überhaupt geerntet werden können (Oerke et al., 1994; Pinstrup-Andersen, 2001). Für weltweit relevante Kulturpflanzen, wie *Hordeum vulgare*, ist es daher von enormer Wichtigkeit, diesen Ausfall einzudämmen und vor allem nachhaltige Konzepte im Pflanzenschutz zu entwickeln.

1.1 Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen

Schafft es ein Mikroorganismus eine Pflanze erfolgreich zu besiedeln und sich auf ihr zu vermehren, so spricht man von einer kompatiblen Interaktion. Der Wirt wird als suszeptibel und das Pathogen als virulent bezeichnet (Schlösser, 1997). Wird der Mikroorganismus dagegen am Eindringen und seiner weiteren Vermehrung erfolgreich gehindert, spricht man von einer inkompatiblen Wechselwirkung zwischen einem resistenten Wirt und einem avirulenten Pathogen. Als Sonderfall kompatibler Wechselwirkungen gilt die Toleranz von Pflanzen gegenüber Pathogenen, oftmals trifft diese Form bei Viren zu (Agrios, 1997). Bei diesem Typ der Wirt-Pathogen-Interaktion verursacht der Befall einer Pflanze keine starken Krankheitssymptome und keine deutliche Reduktion der Biomasse bzw. des Ertrages. Das Pathogen entwickelt und vermehrt sich in gleichem Maße wie in nicht-toleranten anfälligen

Pflanzen. Der Regelfall ist allerdings die Inkompatibilität der Wechselbeziehung von Pflanzen und phytopathogenen Mikroorganismen (Schlösser, 1997).

1.1.1 Formen der Resistenz

Die Basisresistenz oder auch Nicht-Wirtsresistenz der Pflanzen beruht zum einen auf den Umweltansprüchen und der Physiologie der einzelnen Mikroorganismen, zum anderen auf einer Vielzahl pflanzenphysiologischer Komponenten, wie präformierter Barrieren (Agrios, 1997; Schlösser, 1997). Zu diesen präformierten (passiven) Barrieren gehören die Wachsschicht der Kutikula, die Zellwand und andere pflanzliche Strukturen, aber auch biochemische Komponenten (z.B. Phytoalexine), welche ständig vorhanden sind und ein Eindringen des Pathogens verhindern (Schlösser, 1997; Hammerschmidt, 1999). Es gibt viele verschiedene Verteidigungsmechanismen in dieser unspezifisch wirkenden Nicht-Wirtsresistenz, welche gegen ein breites Spektrum von Pathogenen effektiv sind. Diese Resistenz ist durch genetische Faktoren bedingt und verleiht einer Pflanzenart vollständige und dauerhafte Resistenz gegenüber allen Genotypen eines Pathogens.

Im Laufe der koevolutionären Entwicklung gelang es einzelnen Mikroorganismen, Komponenten der Basisresistenz zu umgehen und somit die Pflanze erfolgreich zu besiedeln. Es wurde eine Basiskompatibilität zwischen Pathogen und Pflanze erzeugt (Heath, 1987). Sie erforderte von den Pflanzen, trotz deren Basiskompatibilität sich selektiv gegen ein bestimmtes Pathogen zu verteidigen und eine hoch selektive Verteidigungsreaktion des Wirtes gegen ein einzelnes Pathogen oder eine bestimmte Rasse zu entwickeln (Prell & Day, 2001). Man spricht hier auch von Wirts-Resistenz oder Kultivar-spezifischer Resistenz.

Man unterscheidet in der Wirt-Resistenz, je nachdem ob eine Gruppe verschiedener Pathotypen oder nur eine einzelne physiologische Rasse des Erregers von der Pflanze erkannt wird und eine Resistenzantwort auslöst, zwischen Rassen-Sorten-unabhängiger (horizontaler oder quantitativer) Resistenz und Sorten-abhängiger (vertikaler oder qualitativer) Resistenz (van der Plank, 1984; Prell & Day, 2001).

Eine vertikale Resistenz liegt vor, wenn zwischen den Genotypen des Wirts und jenen des Erregers enge Wechselbeziehungen bestehen. Dies kommt darin zum Ausdruck, dass eine Kulturpflanzensorte gegenüber bestimmten Pathotypen anfällig ist, gegenüber anderen aber resistent. Solche Systeme scheinen in der Regel durch Gen-für-Gen-Beziehungen reguliert zu werden. Danach gilt die Hypothese, dass für

jedes Allel eines Avirulenzgens (*avr*) des Erregers ein entsprechendes Allel eines Resistenzgens (*R*) in der Wirtspflanze vorhanden ist (Flor, 1971). Ein wesentlicher Vorteil dieser pathotypenspezifischen Resistenz liegt darin, dass sie überwiegend qualitativ ist und somit einer Pflanze gegen einen bestimmten Pathotyp eines Erregers einen vollständigen Schutz verleiht. Ihre Wirksamkeit ist allerdings meist zeitlich begrenzt und hält nur so lange an, bis ein neuer Pathotyp an die resistente Sorte angepasst ist und sie befallen kann. Der Verlust der vertikalen Resistenz von Kulturpflanzensorten ist abhängig von dem auf den Erreger ausgeübten Selektionsdruck, der zur Selektion natürlicher resistenzüberwindender Mutanten führt (Prell & Day, 2001). Je größer der Flächenanteil einer resistenten Sorte in einem Gebiet, desto eher kommt es zur Selektion solcher neuer Pathotypen.

Bei der horizontalen Resistenz bestehen offenbar weniger enge Wechselbeziehungen zwischen den Genotypen des Wirtes und jenen des Erregers. Sie ist überwiegend quantitativer Art und verleiht meist keinen vollständigen Schutz. Eine Sorte mit horizontaler Resistenz reagiert gegenüber allen möglichen Pathotypen eines Erregers annähernd gleichartig. Es handelt es sich um eine permanente Resistenz, die grundsätzlich in allen Pflanzen vorhanden ist. Die meisten Pflanzen verfügen sowohl über horizontale als auch vertikale Resistenzen. Wird letztere durch neue Pathotypen eines Erregers überwunden, so bleibt immer noch ein gewisses Niveau an horizontaler Resistenz.

1.1.2 Abwehrmechanismen

Befällt ein Mikroorganismus eine Pflanze so wird er zunächst mit den präformierten Barrieren der strukturellen und chemischen Abwehr der Pflanze konfrontiert. Die Epidermiszellen bilden die erste Barriere für den Besiedler. Oft tragen sie zusätzlich zu einer verdickten Zellwand eine wasserabweisende Wachsschicht oder haben dichten Haarbewuchs. Dadurch wird eine Wasserfilmbildung auf der Blattoberfläche, in welchem Pathogene sich anlagern könnten und zum Keimen oder Vermehren befähigt wären, verhindert (Agrios, 1997). Während einige Pflanzenbesiedler, wie zum Beispiel die biotrophen Rostpilze (Mendgen et al., 1996) und das Tomatenpathogen *Cladospodium fulvum* (Oliver et al., 2000) diesen Weg durch die geschützten Epidermiszellen umgehen, indem sie einen eher indirekten Weg durch die Spaltöffnungen der Pflanzen wählen, dringen andere Organismen wie beispielsweise *Fusarium oxysporum* oder *Blumeria graminis* (Hahn, 2000; Hall &

Gurr, 2000; Heitefuss, 2001) nach Bildung von Apressorien durch direkte Penetration in die epidermalen Pflanzenzellen ein.

Neben mechanischen Barrieren gibt es biochemische Komponenten der präformierten Abwehr. Zu diesen zählen Inhibitoren hydrolytischer Enzyme, Gerbstoffe und Phenole, kohlenhydratbindende Lectine, hydrolytische Enzyme, wie Glucanasen und Chitinasen oder aber inhibierende Proteine wie Defensine, antimikrobiell wirksame Peptide in Speicher- und generativem Gewebe, und sekundäre Metabolite wie Saponine, Senföle und andere Toxine (Broekaert et al., 1995; Osbourn, 1996; Agrios, 1997; Schlösser, 1997; Heath, 2000).

Neben diesen präformierten Komponenten der pflanzlichen Abwehr zeigt die Pflanze auch induzierte Abwehrmechanismen. Diese können ebenfalls physikalischer oder biochemischer Natur sein. Sie werden durch Kontakt mit einem Mikroorganismus ausgelöst. Diese Abwehrmechanismen sind Resultat der Erkennung der Mikroorganismen die über spezifische Signaltransduktionskaskaden zur Aktivierung von Genen führt, die für die verschiedenen Komponenten der Verteidigung kodieren (Prell & Day, 2001).

Eine frühe Erkennung des Pathogens ist sehr wichtig für die Pflanze, um zusätzlich zu den präformierten Barrieren rechtzeitig weitere biochemische und strukturelle Abwehrkomponenten aufzubauen (Agrios, 1997). Erkennung zwischen Organismen beruht in der Natur auf der Wechselwirkung von Signalen und Rezeptoren. Verschiedene Pathogene geben an ihre Umgebung Substanzen wie Glykoproteine, Kohlenhydrate, Fettsäuren und Peptide ab. Einige dieser Substanzen wirken für die Erkennung durch die Pflanze als sogenannte Elizitoren, die von bestimmten Rezeptoren der Pflanze erkannt werden (Yoshikawa et al., 1993). Der Zeitpunkt der Erkennung und die Geschwindigkeit, in der die Pflanze Alarmsignale aussendet und ihre Verteidigung mobilisiert, legen fest, ob eine Infektion stattfindet oder wie stark das Pathogen sich entwickeln kann. Dies entscheidet wiederum darüber, in welchem Ausmaß sich Symptome entwickeln können (Agrios, 1997).

Für eine erfolgreiche Besiedelung müssen phytopathogene Organismen die pflanzlichen Zellen zunächst penetrieren. Mit Hilfe von lytischen Enzymen und unter Aufbau von hohem mechanischem Druck mittels bestimmter Penetrationsorgane, den sogenannten Apressorien, versucht das Pathogen die Barriere der Zellwand zu durchbrechen. An diesen Orten versuchter Penetration beginnt die Pflanze dem Pilz entgegenzuwirken, indem sie die Zellwand lokal verstärkt. Dies wird durch

Ablagerung von Zellwandmaterial, insbesondere Callose, hydroxyprolinreicher Glykoproteine, phenolischer Komponenten wie Lignin (Aist & Israel, 1986; Moerschbacher et al., 1990; Hammond-Kosack & Jones, 1996) und Suberin sowie mineralischer Elemente wie Silizium und Calcium erreicht. Viele dieser Substanzen formen komplexe Polymere und können gegenseitig Quervernetzungen eingehen (Brisson et al., 1994), wodurch verdickte Zellwandstrukturen, sogenannte Papillen gebildet werden, welche das Eindringen und die weitere Entwicklung des Pathogens verhindern (Agrios, 1997).

An den Orten versuchter Penetration werden zusätzlich verstärkt reaktive Sauerstoffintermediate wie Superoxid (O_2^-), Hydrogen-Peroxid (H_2O_2), und Hydroxylradikale (OH) freigesetzt. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr. Diese reaktiven Sauerstoffintermediate wirken zum einen direkt toxisch auf das Pathogen (Peng & Kuc, 1992) und schmälern so dessen Penetrationserfolg. Sie sind aber auch, wie insbesondere H_2O_2 , nötig für die Bildung von Lignin-Polymeren (Bolwell et al., 1995) und die schnelle Quervernetzung von Hydroxyprolin- und Prolinreichen Glykoproteinen (Bradley et al., 1992; Hammond-Kosack & Jones, 1996) und somit für die Bildung von Zellwandappositionen, den oben genannten Papillen. Dieser früh ausgelöste und lokal begrenzte Abwehrmechanismus verwehrt Bakterien und Pilzen den Zugang zu den Zellen und stellt eine sehr wichtige Resistenzantwort dar (Agrios, 1997).

Eine weitere wichtige Abwehrreaktion, welche die Ausbreitung des Pathogens in dem pflanzlichen Gewebe verhindern soll, ist der selbsteingeleitete Zelltod, die Hypersensitive Reaktion (HR) (Kombrink & Schmelzer, 2001). Sie führt zum schnellen Absterben der penetrierten oder auch benachbarter Zellen und hindert somit das Pathogen an seiner Ausbreitung. Besonders für obligat biotrophe Pathogene stellt diese Reaktion der Pflanze einen effektiven Schutz dar, da dem Pathogen die Nahrungsgrundlage entzogen wird. In Interaktionen mit hemibiotrophen und nekrotrophen Pathogenen ist die Rolle der HR weniger geklärt, da diese Pathogene Nährstoffe von toten Pflanzenzellen verwerten. Die Dekompartimentierung der Zelle könnte jedoch zu einer Freisetzung von vorhandenen toxischen Substanzen aus der Vakuole führen und somit zu einer erfolgreichen Bekämpfung des Pathogens (Hammond-Kosack & Jones, 1996; Osbourn, 1996).

Der Kontakt einer Pflanze mit einem Pathogen oder die Applikation eines Elizitors führt zu einer Akkumulation bestimmter Gen-Transkripte, deren korrespondierende Proteine kurze Zeit später nachweisbar sind. Diese neu synthetisierten Proteine werden als *defense related proteins* bezeichnet (Prell & Day, 2001). Eine Untergruppe dieser sind die PR-(*pathogenesis related*)-Proteine. Diese bilden eine heterogene Gruppe von verschiedenen Pflanzenproteinen, die zum Teil toxisch für die eindringenden Pathogenen sind (Stintzi et al., 1993; Muthukrishnan et al., 2001). Sie werden basierend auf ihren Aminosäuresequenzen und biochemischen Funktionen in 17 Familien unterteilt und als PR-1 bis PR-17 bezeichnet (van Loon & van Strien, 1999; Christensen et al., 2002; Collinge et al., 2002). Enzyme der PR-Familien umfassen lytische Enzyme wie β -1,3 Glukanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3, PR-4, PR-8 und PR-11), Thaumatin-ähnliche Proteine (PR-5), Proteaseinhibitoren (PR-6) Endoproteasen (PR-7), Lignin-formende Peroxidasen (PR-9) RIPs (*Ribosmen inhibierende Proteine*) (PR-10), Defensine (PR-12), Thionine (PR-13) und LTPs (*Lipid-Transfer-Proteine*) (PR-14) (Madigan et al., 2001; Muthukrishnan et al., 2001). Einigen aber nicht allen PR-Proteinen konnte eine Funktion zugeordnet werden. So ist die Funktion der zur Familie PR-1 gehörenden Proteine bis heute noch nicht geklärt (van Loon & van Strien, 1999). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Unterdrückung der PR-1b-Translation mittels RNA-Interferenz (RNAi) in Gerstenepidermiszellen zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* führt (Schultheiss et al., 2003). Man geht davon aus, dass nach Pathogenbefall etwa 1000 Gene neu exprimiert werden (Collinge et al., 2002). Daher repräsentiert der bisher identifizierte Teil an PR-Proteinen wohl einen eher kleinen Teil.

1.2 Mutualistische Wechselwirkungen

Neben Mikroorganismen die den Pflanzen Schaden zufügen gibt es auch Mikroorganismen, die durch Besiedelung der Pflanze neben ihrem eigenen Vorteil auch dieser Nutzen bringen. Solche Interaktionen, in denen beide Partner profitieren bezeichnet man als mutualistische Interaktionen.

1.2.1 Mykorrhiza

Die wohl häufigste mutualistische Symbiose zwischen Mikroorganismen und Pflanzen stellt die sogenannte Mykorrhiza dar. Die Bezeichnung Mykorrhiza (griech:

„Pilzwurzel“) wurde 1885 vom Botaniker A. B. Frank eingeführt, der die Vergesellschaftung von Bodenpilzen mit verschiedenen Baumarten entdeckte. In dieser symbiotischen Beziehung erhält die Pflanze vom Pilz Phosphat, Nitrat und andere Nährstoffe und stellt dem Pilz dafür im Gegenzug Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung (Smith & Smith, 1990). Aufgrund unterschiedlicher Kontaktformen zwischen den Symbiosepartnern werden verschiedene Mykorrhizatypen eingeteilt (Molina et al., 1992). Bei der Ektomykorrhiza umgeben die Pilzhypen die Pflanzenzellen der Wurzelrinde als „Hartigches Netz“ und die Pilze bleiben extrazellulär. Bei der Endomykorrhiza dringen die Pilzhypen hingegen auch in die Wurzelzellen ein. Der Pilz breitet sich sowohl durch inter- als auch intrazelluläre Hyphen in der Wurzel seines Wirtes aus.

Die weitere Einteilung der Endomykorrhiza in orchidoide, ericoide, arbutoide, monotropoide und arbuskuläre Mykorrhiza wurde aufgrund der Partner als auch strukturellen Besonderheiten der Interaktionen vorgenommen (Molina et al., 1992). Einen Sonderfall stellt hierin die orchidoide Mykorrhiza dar. Der pilzliche Partner, hier aus der Gruppe der Basidiomyceten, erhält nicht, wie bei den anderen Mykorrhizaformen, Kohlenstoffverbindungen, sondern gibt solche im Gegenteil über intrazelluläre Hyphenknäule an die in jungen Entwicklungsstadien chlorophylllosen Orchideen ab. Die Pilze der orchidoiden Mykorrhiza gehören zur Formgattung *Rhizoctonia* und können auf anderen Pflanzen auch als Pathogene interagieren (Pope & Carter, 2001).

Die häufigste Form der Endomykorrhiza ist die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Man findet diese in etwa 80 % aller Landpflanzen. Sie trägt ihren Namen aufgrund der verzweigten haustorialen Hyphenbäumchen an ihren Interaktionsstellen, welche sie in den pflanzlichen Zellen bildet, den sogenannten Arbuskeln (Abb. 1-1). Sie dienen dem Nährstoffaustausch zwischen Pflanze und Pilz. Das



Abb. 1-1: Arbuskeln der arbuskulären Mykorrhiza
Arbuskel von *Gigaspora margarita* mit verdickten großem Hyphenstrang (T) und Büscheln von feinen verzweigten Hyphen (Pfeile), den sogenannten Arbuskeln (Balken = 10 µm). An ihnen findet der Austausch von Nährstoffen zwischen beiden Symbionten statt.

Quelle: www.ffp.csiro.au/research/mycorrhiza/vam.html

Plasmalemma des Wirtes wird hier nicht durchbrochen, sondern bleibt als stark

vergrößerte periarbuskuläre Membran erhalten (Werner, 1992). Seit kurzem werden die AM-Pilze basierend auf rRNA-Sequenzanalysen in einem eigenen Phylum zusammengefasst, den Glomeromycota (Schüßler et al., 2001; Schüßler, 2002). Innerhalb dieses Phylums sind bisher ca. 150 Arten eingegliedert. AM-Pilze sind obligat biotrophe Wurzelsymbionten und können ihren Lebenszyklus nur durch Besiedelung des Wirtes beenden (Morton & Benny, 1990). Neben ihrer wichtigen Funktion bei der Ernährung kommt ihnen auch eine große Bedeutung für die Pflanzengesundheit zu, denn sie schützen die Pflanze vor abiotischen und biotischen Stressfaktoren (Galli et al., 1994; Azcon-Aguilar & Barea, 1996; Requena, 1997) (Kap. 1.2.3.).

1.2.2 Rhizobakterien-Symbiosen

Die Rhizosphäre von Wurzeln ist mit einer Vielfalt von Bakterien dicht besiedelt. Manche dieser Rhizobakterien profitieren nicht nur von den Nährstoffen, welche von der Pflanzenwurzel abgegeben werden, sondern üben auch auf direkten oder indirekten Weg einen positiven Einfluss auf die Pflanze aus.

Einen besonderen Fall der Bakterien-Pflanzen-Wechselwirkung stellt die Symbiose von Pflanzen mit Rhizobien oder Aktinomyzeten der Gruppe Frankia dar. Die bedeutendste ist die Interaktion zwischen bestimmten gramnegativen stickstofffixierenden Bakterien und Leguminosen. Zu den Leguminosen zählen wirtschaftlich bedeutende Pflanzen wie Sojabohne, Klee, Luzerne, Bohne und Erbse. Sie werden als Pflanzen definiert, die ihre Samen in einer Hülse tragen. Die Infektion einer Leguminose mit einer entsprechenden Bakterienart der Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Azorhizobium* führt zur Bildung von Wurzelknöllchen (Mylona et al., 1995), in denen die Bakterien in der Lage sind, gasförmigen Stickstoff in Stickstoffverbindungen zu fixieren (Madigan et al., 2001). Diese biologische Reduktion von Stickstoff kann nur von einigen Prokaryoten durchgeführt werden und ist ein sehr Sauerstoff-sensitiver Prozess. Die am stärksten leistungsfähigen Stickstofffixierer sind hier eine Symbiose mit höheren Pflanzen eingegangen, welche ihnen in den Knöllchen die Energie für die Stickstofffixierung und ein vor Sauerstoff schützende Umgebung zur Verfügung stellen. Währenddessen erhalten die Pflanzen von den Bakterien Ammonium, wodurch sie in ihrer Stickstoffernährung unterstützt werden. Die Mikroorganismen befinden sich in

den Zellen ihres Wirtes, sind allerdings durch Membranen des Plasmalemmas vom pflanzlichen Zytoplasma getrennt (Mylona et al., 1995).

Die Interaktion dieser Leguminosen-Symbiose beginnt mit Erkennung der Symbiosepartner, gefolgt von der Anlagerung der Rhizobien an die Wurzelhaare. Diese deformieren und die Bakterien gelangen in die Pflanze durch einen entstandenen Infektionsschlauch. Gleichzeitig führen mitotisch aktivierte kortikale Zellen zu der Entstehung eines Knöllchen-Primordiums. Der Infektionsschlauch wächst diesem entgegen und die Bakterien werden in das von der pflanzenbürtigen Peribakteroidmembran (PBM) umgebene Cytoplasma entlassen. Dieses Primordium entwickelt sich dann zu einem reifen Knöllchen und die Bakterien differenzieren in ihre endosymbiotische Form, das Bakteriod (Mylona et al., 1995). Bakteriod und PBM werden zusammen als Symbiosom bezeichnet. Alle Schritte der Knöllchenentwicklung benötigen die Expression von Knöllchen-spezifischen pflanzlichen Proteinen, den so genannten Nodulinen (von engl.=*nodule*) (van Kammen, 1984). Die Stickstofffixierung durch die Leguminosen-Rhizobium-Symbiose ist von beträchtlicher landwirtschaftlicher Bedeutung, da sie zu einer deutlichen Zunahme der Stickstoffverbindungen im Boden führt. Da in ungedüngten Böden oft Stickstoffmangel herrscht, haben Leguminosen mit Knöllchen unter diesen Bedingungen einen Selektionsvorteil.

Neben diesen Rhizobakterien, die eine direkte strukturelle Interaktion mit den Pflanzen eingehen wie beispielsweise die verschiedenen *Rhizobien*-Arten, gibt es in der Rhizosphäre von Pflanzen viele Mikroorganismen, welche ohne direkte Ausbildung einer strukturellen Interaktion für die Pflanzen von Nutzen sind. Zudem ist die Rhizosphäre aufgrund der angereicherten Nährstoffe durch die Pflanze ein bevorzugter Lebensraum für diese. Diese Rhizobakterien sind oft freilebend in sogenannten Mikrokolonien zusammengeschlossen. Eine Vergesellschaftung der Pflanzen mit diesen Bakterien macht sich meist in einer Wachstumsförderung der Pflanzen deutlich. Daher wurde der Begriff PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*) für diese Gruppe von Rhizobakterien geprägt (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Die Gruppe der PGPR schließt allerdings auch Organismen mit endophytischen Wechselwirkungen, wie beispielsweise *Pseudomonas fluorescens*, ein (z.B. Wang et al., 2005b).

1.2.3 Mutualistische Wechselwirkungen und ihr Einfluss auf Pflanzen

In mutualistischen Interaktionen steht der beidseitige Nutzen der Organismen im Vordergrund. Der fördernde Einfluss z.B. der Mykorrhizapilze auf die Pflanze zeigt sich in ihrer Beeinflussung der Pflanzenernährung, der Pflanzenentwicklung als auch der Wechselwirkung mit der abiotischen und der biotischen Umwelt, während die Pflanze dagegen ihre pilzlichen Symbiosepartner vorwiegend mit Kohlenstoffen versorgt und ihnen einen abgeschirmten Lebensraum bietet (Mylona et al., 1995). In der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose führt die Pflanze dem Pilz Photoassimilate zu (Pfeffer et al., 1999) und erhält dafür Mineralstoffe, d.h. hauptsächlich Phosphat (Harrison, 1999; Saito, 2000) aber auch Stickstoffverbindungen (Jia et al., 2004; Govindarajulu et al., 2005). In der beschriebenen Rhizobien-Symbiose ist es der Stickstoff, welcher der Pflanze durch den Pilz zugeführt, d.h. der Pflanze verfügbar gemacht wird.

Die Ernährung ist allerdings nicht der einzige wichtige Aspekt dieser beiden hier beschriebenen Symbiosen. Die Produktion von Phytohormonen, und somit ein Eingriff in die Physiologie und das Wachstum der Pflanzen, konnten durch arbuskuläre Mykorrhizapilze festgestellt werden (Barea & Azcon-Aguilar, 1982) und sind auch durch den Einfluss von Rhizobakterien bekannt (Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Auch veränderte Phytohormongehalte in verschiedenen Pflanzenorganen wurden in mykorrhizierten Pflanzen nachgewiesen (Allen et al., 1980; Allen et al., 1982; Barker & Tagu, 2000; Ludwig-Müller, 2000).

Eine weitere wichtige große Rolle spielt der Einfluss der Mikroorganismen auf die Pflanzengesundheit. Dies geschieht zum Teil durch antagonistische Wirkungen der Mikroorganismen in der Rhizosphäre untereinander oder aber durch direkte Interaktionen der Mikroorganismen mit der Pflanze und Induktion der pflanzeigenen Abwehr (Whipps, 2001).

Mykorrhizapilze schützen die Pflanze beispielsweise vor abiotischen und biotischen Stressfaktoren (Galli et al., 1994; Azcon-Aguilar & Barea, 1996; Requena, 1997) und können die Abwehrreaktion der Pflanze gegen andere pathogene Pilze beeinflussen (Hooker et al., 1994; Azcon-Aguilar & Barea, 1996; Harrier & Watson, 2004). Nicht nur lokale Resistenzreaktionen konnten beobachtet werden, sondern auch systemische Resistenzeffekte auf nicht-mykorrhizierte Bereiche der Wurzel (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002).

Diese induzierten protektiven Eigenschaften der Mykorrhizapilze wurden allerdings vorwiegend in den Wurzeln festgestellt, während die Blätter von mykorrhizierten Pflanzen eher eine höhere Anfälligkeit gegen phytopathogene Organismen zeigen (Dehne, 1982; Linderman R., 1994). So wurden bei Infektionen der Blätter von mit *Glomus intraradices* kolonisierten Tabakpflanzen durch den Erreger *Botrytis cinerea* oder den Tabak-Mosaik-Virus stärkere Krankheitssymptome hervorgerufen als in nicht-mykorrhizierten Pflanzen. Zudem wurde in diesen mykorrhizierten Pflanzen geringere Mengen an PR-1 und PR-3 in den Blättern nachgewiesen (Shaul et al., 1999). Bei Untersuchungen von mykorrhizierter Gerste mit dem obligat biotrophen Sprosspathogen *Blumeria graminis* konnte zwar festgestellt werden, dass gemessen an ihrer Kornzahl und Ährenmenge die Pflanzen weniger unter dem Pathogen litten, allerdings betrug die Sporulationsrate des Pathogens ungefähr das Doppelte (Gernns et al., 2001). Auch durch Wechselwirkungen mit PGPR konnten vielfach veränderte Resistenzen der Pflanzen festgestellt werden. Die Pflanzen zeigen beispielsweise stärkere Resistenzen gegen abiotische Stressformen, wie Salzstress (Mayak et al., 2004) aber im Gegensatz zur Mykorrhiza-Interaktion sind hier auch systemisch induzierte Resistenzen gegen Pathogene im Spross der besiedelten Pflanzen vielfach beschrieben (Pieterse et al., 1996; van Loon et al., 1998; van Wees et al., 1999; Pieterse et al., 2002) (Kap. 1.3.1.2).

All diese durch die Wurzelendophyten hervorgerufenen Auswirkungen auf die Pflanze machen sich meist in einem verbesserten Wachstum der Pflanzen bemerkbar. Endophyten-besiedelte Pflanzen haben, je nach Standort und Bedingungen im Boden, einen Vorteil gegenüber nicht kolonisierten Pflanzen. Die Änderungen der Ernährung und der Schutz durch die Mikroorganismen machen sich oftmals zusätzlich in einem höheren Ertrag bemerkbar (Gernns et al., 2001; Koide & Dickie, 2002; Dey et al., 2004; Khalid et al., 2004; Lekberg & Koide, 2005), der sich z.B. selbst unter Wasserstress zeigte (Al-Karaki et al., 2004). Zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnte zudem z.B. in mykorrhizierten Guavepflanzen eine Erhöhung der Nettophotosynthese festgestellt werden (Estrada-Luna et al., 2000). Teilweise konnte eine solche Erhöhung der Nettophotosyntheseleistung mit der Erhöhung des Phosphatgehaltes in den Pflanzen korreliert werden (Koch & Johnson, 1984; Black et al., 2000). Geringer Phosphatgehalt kann auch die Konzentration und Aktivität der RubisCO reduzieren und somit die Regeneration der Intermediate im Calvin-Zyklus verlangsamen (Lauer et al., 1989). Andererseits konnte eine erhöhte

Photosyntheserate auch unabhängig vom P-Status beobachtet werden (Bethlenfalvai et al., 1987; Davies et al., 1993; Fay et al., 1996).

1.3 Induzierte Resistenz

Induzierte Resistenz ist definiert als eine Erhöhung der pflanzeigenen Widerstandsfähigkeit nach Induktion durch exogen applizierte Faktoren, welche chemischen (chemisch induzierte Resistenz, cIR, Kap. 1.3.1) oder auch biologischen (Biologisch induzierte Resistenz, bIR, Kap. 1.3.2) Ursprungs sein können. Die Induzierte Resistenz (IR) vermittelt eine Widerstandskraft gegenüber einem breiten Spektrum von Pathogenen (Kessmann et al., 1994; Sticher et al., 1997). Die Zeit zwischen Induktion und einsetzender Schutzwirkung dauert bis zu mehreren Tagen und kann mehrere Tage bis einige Monate andauern. Sie tritt nicht nur an der Stelle der Initiierung auf, sondern auch distal in den nicht direkt betroffenen Bereichen der Pflanzen (Ryals et al., 1994). Sie ist somit nicht nur lokal begrenzt, sondern breitet sich über die ganze Pflanze aus. Daher wird diese Form induzierter Resistenz, entgegen lokal induzierter Resistenz, als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*= SAR) bezeichnet (Ryals et al., 1994; Sticher et al., 1997). Die verschiedenen Formen der induzierten Resistenz sind alle mit einer erhöhten Bereitschaft für die schnelle und effektive Aktivierung der zellulären Verteidigungsantwort assoziiert, welche nach Kontakt mit einem auslösenden Stimulus, wie einem nekrose-induzierenden Pathogen, Wurzelbesiedelung mit nicht-pathogenen Pseudomonaden oder Behandlung mit verschiedenen SA-Derivaten induziert werden (Conrath et al., 2001; Conrath et al., 2002).

Die erhöhte Resistenz kann einmal durch die Auslösung und Verstärkung zellulärer Abwehrmechanismen geschehen, kann sich aber auch in einer erhöhten Abwehrbereitschaft der Pflanze zeigen, die dazu führt, dass die Pflanze schneller und stärker auf eine Pathogenattacke reagiert. Diese erhöhte Abwehrbereitschaft wird Sensibilisierung oder auch *Priming* genannt (Conrath et al., 2001; Conrath et al., 2002; Kohler et al., 2002).

1.3.1 Biologisch induzierte Resistenzen

Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts wurde festgestellt, dass eine Pflanze, die eine erste Pathogen-Reaktion erfolgreich überstanden hat, gegen einen erneuten Befall resistenter ist (Chester, 1933). Pflanzen können somit vor weiteren

Pathogenangriffen geschützt sein, wenn sie vorher schon mit phytopathogenen Viren, Bakterien, oder Pilzen konfrontiert wurden.

1.3.1.1 SAR – Systemisch erworbene Resistenz

Die bisher am besten untersuchte Form der biologisch induzierten Resistenz ist die SAR in dikotyledonen Pflanzen. Sie wird durch nekrotisierende Pathogene ausgelöst und kann in dikotylen Pflanzen nur unter Akkumulation von Salizylsäure ausgeprägt werden (Gaffney et al., 1993; Sticher et al., 1997; van Loon et al., 1998). Mittels transgener Pflanzen, die das bakterielle *NahG*-Gen exprimieren, konnte gezeigt werden, dass Salizylsäure (SA) für die Ausprägung der SAR notwendig ist (Gaffney et al., 1993). *NahG* kodiert für eine SA-Hydroxylase, welche SA in das inaktive Catechol umwandelt. Transgene *NahG*-Pflanzen sind somit nicht mehr dazu fähig Salizylsäure zu akkumulieren. Zunächst wurde vermutet, dass Salizylsäure auch das systemische Signal ist. Dies konnte allerdings durch Experimente von Vernooij und Mitarbeitern 1994 widerlegt werden (Vernooij et al., 1994). Pfropfungsexperimente an Tabak zeigten, dass transgene *NahG*-Wurzelstöcke, obwohl sie unfähig waren SA zu akkumulieren, fähig waren ein Signal an nicht-transgene Pfropfstöcke weiterzugeben und diese für weitere Pathogeninfektionen resistenter machten. Umgekehrte Pfropfungen zeigten, dass das Signal in den von der Infektionsstelle entfernten Geweben SA benötigt, um die systemische Resistenz zu induzieren (Vernooij et al., 1994). Bislang konnte allerdings das systemische Signal noch nicht identifiziert werden.

In ersten molekularbiologischen Experimenten zu diesem Resistenzphänomen konnte gezeigt werden, dass die SAR-Antwort in dikotylen Pflanzen mit der Expression eines bestimmten Satzes an verteidigungsrelevanten Genen korreliert (Ward et al., 1991). Unter diesen fanden sich einige bekannte PR-Gene. Sie wurden als SAR-Gene bezeichnet, welche als molekulare Marker für diese Form der induzierten Resistenz angesehen werden (Ward et al., 1991). Das Spektrum der Resistenz und der Satz an induzierten Genen ist pflanzenspezifisch (Kessmann et al., 1994; Sticher et al., 1997). In *Arabidopsis thaliana* korrelierte die SAR beispielsweise mit der Expression von *Pr-1*, *Pr-2* und *Pr-5* (Uknes et al., 1992).

In monokotylen Pflanzen ist bisher kaum Information über pathogen-induzierte SAR vorhanden. Es liegen nur wenige Berichte vor, welche lokale und systemisch induzierte Resistenz in Monokotylen durch vorherige Pathogeninokulation belegen (Kessmann et al., 1994; Sticher et al., 1997; Kogel & Langen, 2005). Auch die Rolle

von PR-Proteinen und Salizylsäure konnte bisher in diesen Systemen nicht gezeigt werden. SA-Derivate können allerdings auch hier Resistenz gegen phytopathogene Pilze vermitteln (Kogel et al., 1994; Schweizer et al., 1997; Beßer et al., 2000). Da die SAR-Antwort auch in Monokotyledonen mittels derselben Chemikalien wie in Dikotyledonen aktiviert werden kann, wird vermutet, dass die Schlüsselstellen in der SAR-Signalkaskade auch in Monokotyledonen konserviert sind (Oostendorp et al., 2001). Über die Mechanismen induzierter Resistenz in Getreide ist bisher allerdings bis heute nur wenig bekannt (Kogel & Langen, 2005).

1.3.1.2 ISR – Rhizobakterien induzierte Resistenz

Um eine andere Form der biologisch induzierten Resistenz handelt es sich bei der ISR (*induced systemic resistance*), welche durch nicht-pathogene wurzelbesiedelnde Bakterien ausgelöst wird. In verschiedenen Systemen wurde festgestellt, dass eine Besiedelung der Rhizosphäre mit PGPR induzierte Resistenz auslösen kann (Alström, 1991), welche nicht nur lokal aufgrund antagonistischer Effekte beruht, sondern auch im Blatt nachzuweisen ist (Wei et al., 1991). Diese PGPR-vermittelte Resistenz wurde als induzierte systemische Resistenz bezeichnet (Kloepper et al., 1992). Pieterse und Kollegen konnten 1996 zeigen, dass Kolonisierung der Rhizosphäre durch *P. fluorescens* WCS417r in *Arabidopsis* zu einer Resistenz im Blatt gegen *Pseudomonas syringae* f.sp. *tomato* führte (Pieterse et al., 1996). Da diese Resistenz auch in transgenen *NahG*-Pflanzen beobachtet werden konnte, zeigte, dass diese Art der Resistenzinduktion, im Gegensatz zu den Mechanismen der SAR und cIR, von Salizylsäureakkumulation und PR-Genexpression unabhängig ist (Pieterse et al., 1996; van Wees et al., 1999).

1.3.2 Chemisch induzierte Resistenz

Durch Behandlung der Pflanzen mit einigen chemischen Substanzen ist es gelungen, den natürlichen Prozeß der Resistenzaktivierung zu simulieren. Substanzen, welche diese resistenz-induzierende Wirkung auf Pflanzen haben, nennt man Resistenzinduktoren. Kriterien für einen Resistenzinduktor sind dabei eine geringe oder keine direkte antimikrobielle Aktivität auf das Pathogen, die Aktivierung gleicher pflanzlicher Abwehrmechanismen wie die der natürlich induzierten Resistenz und eine möglichst breite Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Pathogenen (Kessmann et al., 1994).

Ähnlich wie nach der biologisch induzierten Resistenz wird durch die Behandlung der Pflanzen mit diesen Wirkstoffen ein breiter und langandauernder Schutz gegen phytopathogene Viren, Bakterien und Pilze erzielt. Induktion der chemisch induzierten Resistenz-Antwort löste die Expression der gleichen Gene wie in der pathogeninduzierten SAR-Antwort aus (Ward et al., 1991).

Resistenzinduktoren sind beispielsweise die Salizylsäure-Derivate 2,6-Dichlorisonicotinsäure (DCINA) und Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester (BTH) (Kessmann et al., 1994; Kogel et al., 1994).

Obwohl in monokotylen Pflanzen wie Getreide bisher eindeutige Hinweise für das Vorkommen einer SA-abhängigen SAR fehlen, konnte gezeigt werden, dass SA-Derivate auch hier systemische Resistenz gegen phytopathogene Pilze vermitteln können (Kogel et al., 1994; Schweizer et al., 1997; Beßer et al., 2000). Über den Mechanismus der Resistenzinduktion ist hier noch nicht sehr viel bekannt. In einigen monokotylen Pflanzen wurden nach chemischer Resistenzinduktion mit solchen Resistenzinduktoren Gene isoliert, welche eine differentielle Expression nach Behandlung mit dem Induktor zeigten (Görlach et al., 1996; Beßer et al., 2000; Schaffrath et al., 2000). Man benannte diese ihrer Herkunft nach als BCI- (*barley chemically induced*), WCI- (*wheat chemically induced*) oder RCI- (*rice chemically induced*) Gene. Diese chemisch induzierten Gene umfassen ein breites Spektrum. In Gerste wurden neun dieser chemisch induzierbaren Gene identifiziert und charakterisiert. Die Sequenzen lassen vermuten, dass *BCI-1* für eine Lipoxygenase, *BCI-2* für ein Thionin, *BCI-3* für eine saure Phosphatase, *BCI-4* für ein Ca²⁺-bindendes EF-Hand Protein, *BCI-7* für einen Serin-Proteaseinhibitor, *BCI-8* für eine Fettsäuredesaturase und *BCI-9* für eine Apyrase kodieren (Beßer et al., 2000). Ihre Expression wird durch endogene als auch exogene Erhöhung von Salizylsäure (SA) und verschiedene SA-Derivaten reguliert. Für alle BCI-Gene, außer *BCI-4*, wurde zudem gezeigt, dass sie außerdem durch exogene Applikation von Jasmonat induzierbar waren. Eine Induktion dieser neun Gene nach Pathogen-Infektion konnte nicht festgestellt werden (Beßer et al., 2000), weshalb sie auch als Marker für die chemische Resistenzinduktion angesehen werden können. Für *BCI-4* konnte anhand Überexpression in Epidermiszellen anfälliger Gerste mittels transienter Transformation gezeigt werden, dass dies zu einer Reduktion der Penetrationseffizienz von *Blumeria graminis* führt (Beßer, 2001), *BCI-4* also direkt an der Ausbildung der Resistenz beteiligt ist.

1.4 Signalwege induzierter Resistenzen

Die am längsten bekannte und am besten studierte Signaltransduktionskette systemisch induzierter Resistenz in Pflanzen ist in die biologisch induzierte SAR-Antwort involviert. Diese wird ausgelöst durch eine erste Infektion mit einem Nekrose auslösenden Pathogen. In diesem bekannten Weg spielt die Salizylsäure (SA) die Rolle einer wichtigen Schlüssel-Signalkomponente. Induktion durch ein Nekrose-auslösendes Pathogen führt zu einer endogenen Erhöhung an Salizylsäure, auch in systemischen Bereichen (Metraux et al., 1990; Gaffney et al., 1993). Die SAR-Antwort führt, wie oben schon erwähnt, zur Induktion eines bestimmten Satzes an PR-Genen, den sogenannten SA-regulierten PR-Genen (Abb. 1-2).

In *Arabidopsis thaliana* wurden bisher eine Reihe von Untersuchungen anhand von Mutanten vorgenommen. So konnten beispielsweise Mutanten identifiziert werden, die keine SA-abhängige SAR ausprägten, in ihrer SAR-Genexpression beeinträchtigt und nicht mehr chemisch induzierbar waren (*npr1/nim1 nonexpressor of PR-genes / noninducible immunity*) (Cao et al., 1994; Delaney et al., 1995). Das NPR-1/NIM1-Protein enthält ankyrinreiche Motive, die Protein-Protein Interaktionen vermitteln können und interagiert mit TGA-Transkriptionsfaktoren (Cao et al., 1997; Despres et al., 2000). Überexpression von NPR-1/NIM-1 führte zu erhöhter Resistenz und zur Akkumulation von PR-Proteinen (Cao et al., 1998). Die zuvor beschriebene chemisch induzierte Resistenz, welche durch Behandlung der Pflanzen sowohl mit BTH als auch mit SA, ausgelöst wird, aktiviert scheinbar diese SAR-Antwort. Sie führt zur Expression der gleichen Gene und benötigt dafür auch NPR-1 (Lawton et al., 1996) (Abb. 1-2).

Ein zweiter Signaltransduktionsweg der induzierten Resistenz in Pflanzen ist die durch Rhizobakterien vermittelte ISR-Antwort. Dieser Signaltransduktionsweg ist allerdings Salizylsäure-unabhängig (Pieterse et al., 1996), vielmehr sind Jasmonat- und Ethylen für diesen Weg entscheidend (Abb. 1-2). Außerdem wird eine andere Gruppe von Genen induziert (Pieterse et al., 1996). Allerdings wurde NPR-1 auch als Schlüssel der Signaltransduktion in dieser durch Rhizobakterien vermittelten ISR-Antwort identifiziert (Pieterse et al., 1998). Bindungen von Signalweg-spezifischen Proteinen an NPR-1 könnten die Trennung der SAR und ISR *downstream* von NPR-1 erklären.

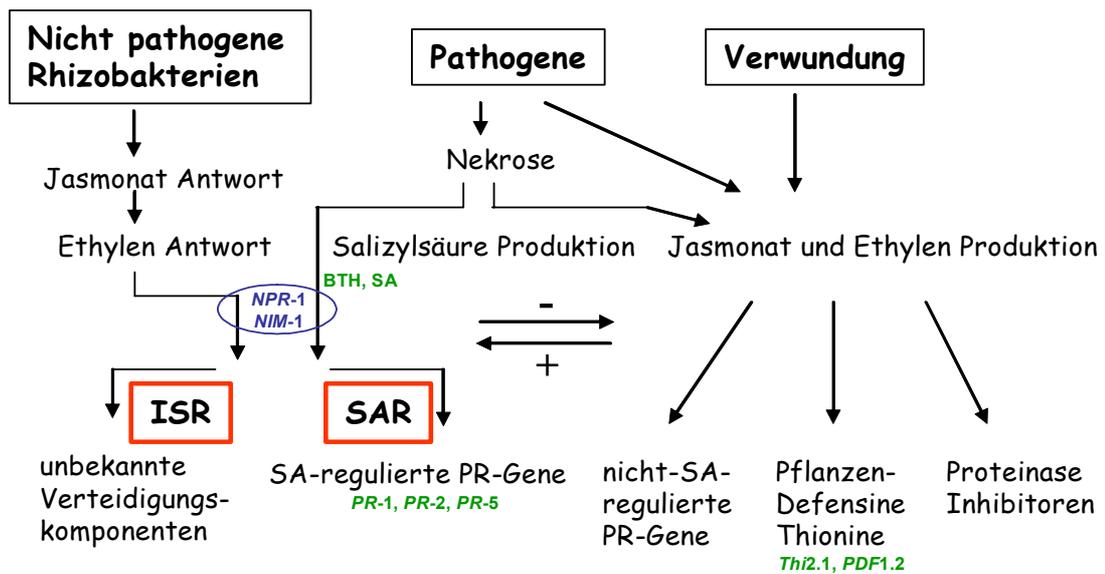


Abb. 1-2: Signalwege bekannter induzierter Resistenzmechanismen in Pflanzen

Es sind bisher drei Hauptwege induzierter Resistenz in Pflanzen bekannt. Der älteste bekannte Weg ist die SAR-Antwort der Pflanzen, welche durch Infektionen mit nekrotrophen Pathogenen ausgelöst wird und zu der Expression bestimmter Gene führt, den sogenannten SAR-Genen. Zu diesen zählen beispielsweise die Gene *PR-1*, *PR-2* und *PR-5*. In diesem Weg der induzierten Resistenz spielt die Salizylsäure eine notwendige Rolle. Hier greifen chemische Resistenzinduktoren wie exogen applizierte Salizylsäure (SA) oder SA-Derivate wie BTH (Benzo(1,2,3)-thiadiazolcarbothionsäure-S-methylester) ein. Ein anderer von SA-Produktion unabhängiger Signaltransduktionsweg induzierter Resistenz ist die Antwort der ISR (*induced systemic resistance*), welche durch die Interaktionen der Pflanzen mit nicht pathogenen Rhizobakterien in den Wurzeln hervorgerufen wird und an der Jasmonat und Ethylen beteiligt sind. Ein Verbindungsglied dieser beiden Signaltransduktionswege ist *NPR-1* (*Non-expressor of PR-Genes*) bzw. *NIM-1* (*noninducible immunity*). Jasmonat und Ethylen spielen auch im dritten Weg der induzierten Resistenz ausgelöst durch Verwundung eine Rolle, welche beispielsweise durch Insektenfraß induziert wird. Durch diesen Auslöser werden andere Proteine, wie Defensine (PDF1.2 in *A. thaliana*) und Thionine (Thi2.1 in *A. thaliana*) unabhängig von SA und *NPR-1* induziert. Das Muster der verschiedenen induzierten Abwehrantworten unterscheidet sich, doch gibt es auch enge Wechselwirkungen und gegenseitige Regulationen der Wege.

Diagramm: abgewandelt nach: (Pieterse & van Loon, 1999)

Die durch Verletzung hervorgerufene Signaltransduktion ist der dritte bekannte Weg der systemisch induzierten Resistenzen (Abb. 1-2). Ethylen und Jasmonat werden durch Verwundung produziert bzw. wenn Pflanzen von Pathogenen angegriffen werden. Es folgt eine Induktion verteidigungsrelevanter Gene, welche auch von Pathogenen induziert werden und die für Defensine und Thionine, kleine, cysteinreiche basische Proteine mit antimikrobieller Aktivität, kodieren. In *Arabidopsis* sind z.B. das Thionin-Gen *Thi2.1* und das Defensin-Gen *PDF1.2* durch Ethylen und Jasmonat sowohl lokal als auch systemisch induziert, jedoch nicht durch SA-Behandlung (Penninckx et al., 1996). Nach Herbivor-Angriff wird beispielsweise in Tomaten-Blättern der Proteinaseinhibitor Pin systemisch akkumuliert, was zur

Reduktion weiterer Insektenattacken führt (Ryan, 1992). Auch in diesem induzierten Resistenzmechanismus spielen die Produktion von Ethylen und Jasmonat eine wichtige Rolle. Einige Untersuchungen an Tomate deuten darauf hin, dass Jasmonat die Produktion des mobilen Signals reguliert, oder aber sogar selbst dieses Signal darstellt (Schilmiller & Howe, 2005).

Feys und Parker (Feys & Parker, 2000) diskutierten, dass die verschiedenen Signalwege parallel verlaufen, sich überkreuzen oder potenzieren können. Wechselwirkungen wie synergistische oder additive Wirkungen von Ethylen, Jasmonat und Salizylsäure sind beschrieben (Xu et al., 1994). So induziert Methyljasmonat beispielsweise die Stärke SA-induzierter PR-1 Genexpression in Tabak (Xu et al., 1994). Außerdem induzierte kombinierte Applikation von Methyljasmonat und Ethylen synergistisch die Expression von Mitgliedern der PR-1 und PR-5-Familien. Solche beschriebenen Wechselwirkungen zeigen das große regulatorische Potential der verschiedenen Signalwege der Induzierten Resistenz auf (Pieterse et al., 1998).

1.5 *Hordeum vulgare* – *Blumeria graminis f.sp. hordei*

Hordeum vulgare L. gehört zur Familie der Poaceae (Süßgräser). Sie wird landwirtschaftlich angebaut als Nahrungs- und Futtermittel sowie als Braugerste. Sie ist eine der ältesten Kulturpflanzen. Ihre Kultivierung geht bis auf die Zeit um 7000 v.Chr. zurück. Heute nimmt sie in der weltweiten Getreideproduktion nach Weizen, Reis und Mais den vierten Rang ein. Sie wird hauptsächlich in gemäßigten Klimazonen angebaut. Man unterscheidet Winter- und Sommergerste-Sorten. Während die Wintergerste vorwiegend als Futtermittel dient, wird die Sommergerste zur Nahrungsmittel- und Bierherstellung verwendet. Das Gerstengenom trägt einen diploiden Chromosomensatz und ist auf sieben Chromosomen verteilt. Es umfasst ca. 5,4 Mbp und ist somit ungefähr doppelt so groß wie das menschliche Genom. 70-80% der chromosomalen DNA besteht aus repetitiven Sequenzen (Graner & Altschmied, 2001). Aufgrund der großen landwirtschaftlichen Bedeutung und der Tatsache, dass sich das Genom der Gerste leichter analysieren lässt als das der hexaploiden bzw. tetraploiden Weizensorten, gewinnt diese Pflanze in der Genomanalyse zunehmend an Bedeutung (Graner & Altschmied, 2001).

Zu den Krankheitserregern, die jährlich in der Landwirtschaft zu den größten Ernteverlusten beitragen, gehören die Mehltaupilze. Sie infizieren über 650

monokotyle und über 9000 dikotyle Pflanzenarten (Schulze-Lefert & Vogel, 2000). Erreger einer der verbreitetsten Getreidekrankheiten, dem Echten Mehltau, ist *Blumeria graminis*. Er gehört zur Ordnung der Erysiphales innerhalb des Stammes der Ascomyceta und kommt in mehreren *forma speciales* vor. Der Echte Gerstenmehltaupilz *B. graminis* f.sp. *hordei* (Bgh) ist ein biotropher Ektoparasit der gemäßigt feucht bis trocken wechselnden Klimazonen (Hoffmann & Schmutterer, 1999). Er benötigt für die Vollendung seines Lebenszyklus die lebende Pflanze.

Wenn eine Spore auf die Oberfläche eines Wirtsblattes fällt, wird zunächst ein kurzer primärer Keimschlauch ausgebildet, der sich durch Sekretion von adhäsiven Materialien an die Oberfläche des Blattes anheftet. Zudem ist der primäre Keimschlauch nötig, um die oberflächliche Struktur zu erkennen, Signale in der Spore auszulösen und den sekundären appressorialen Keimschlauch auszubilden (Kunoh et al., 1979). Dieser wird 4-8 Stunden nach Inokulation gebildet. Nach Elongation dieses zweiten Keimschlauches kommt es zur Ausbildung einer spezialisierten Infektionsstruktur, dem sogenannten Appressorium. Nach ca. 12 Stunden ist das Appressorium vollständig ausgebildet und bildet 12 bis 15 Stunden nach der Keimung einen Penetrationskeil aus, um die pflanzliche Zellwand zu durchdringen. Im Appressorium entwickelt sich ein Turgordruck von 2-4 MPa. Mittels dieser mechanischen Kraft und durch die Aktivität von Cutinasen, Cellulasen und anderen lytischen Enzymen erfolgt die Penetration (Mendgen et al., 1996; Pryce-Jones et al., 1999). Bei Misserfolg durch Abwehr der Pflanze aufgrund von Papillenbildung oder lokalem Zelltod versucht der Pilz an anderen Orten erneut, die pflanzliche Zellwand zu durchdringen. Nach erfolgter Penetration wird ein spezialisiertes Ernährungsorgan, das sogenannte Haustorium, in der Pflanzenzelle ausgebildet, mit dessen Hilfe sich das Pathogen mit Nährstoffen für die weitere Entwicklung und eigene Reproduktion versorgt. Dieses fingerförmige Haustorium wird von einer extrahaustorialen Matrix umgeben und ist durch Einstülpung der pflanzlichen Plasmamembran hervorgegangen. Durch die Nährstoffversorgung des Pilzes über das Haustorium kommt es zur weiteren Myzelbildung des Pilzes, den sogenannten elongierten sekundären Hyphen (ESH) auf der Blattoberfläche. Danach bilden sich sekundäre bzw. tertiäre Haustorien, bis schließlich nach ca. fünf Tagen die ersten neuen Sporen produziert werden (Carver et al., 2001). Die Sporenträger wachsen senkrecht zur Blattoberfläche und schnüren bis zu 8 Konidien ab. Der Befall der Pflanzen ist ca. sieben Tage nach Infektion makroskopisch anhand weißer

mehligter Pusteln auf den Blattoberflächen zu erkennen. Die Konidien werden durch den Wind verbreitet und können auf einem neuen Wirt einen neuen asexuellen Vermehrungszyklus beginnen (Abb. 1-3).

Bei der sexuellen Vermehrung entstehen meist gegen Ende einer Vegetationsperiode die Fruchtkörper (Kleistothecien) mit bis zu 25 Ascis, die nach einer Meiose acht Ascosporen enthalten. Der Fruchtkörper bildet ein sogenanntes Überdauerungsorgan und kann bei geeigneten äußeren Bedingungen, wie beispielsweise ausreichender Feuchtigkeit aufplatzen und neue Ascosporen freisetzen (Agrios, 1997; Schlösser, 1997) (Abb. 1-3).

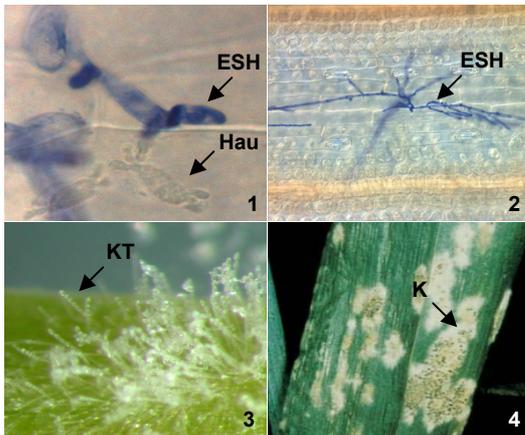
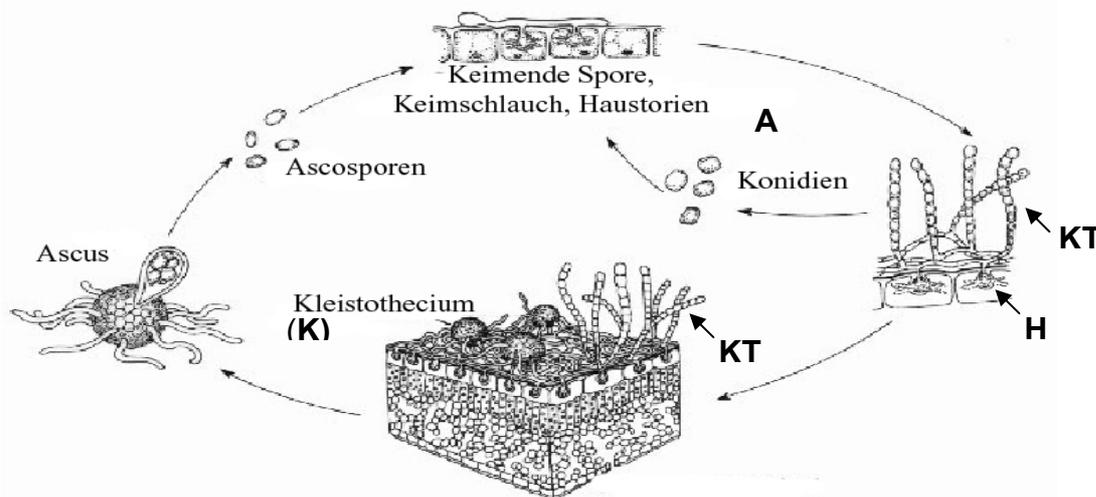


Abb. 1-3: Lebenszyklus des biotrophen Blattpathogen *Blumeria graminis*

Dargestellt ist der Lebenszyklus des obligat biotrophen Blattpathogens *B. graminis*. Wenn die Konidien des Pilzes auf Wirtspflanzen treffen, kommt es im kleinen vegetativen Zyklus (hier dargestellt als kleiner Kreislauf (A) zur erneuten Bildung von Konidienträgern (KT). Nach effektiver Penetration werden die fingerförmigen Haustorien ausgebildet (Hau) und elongierte sekundäre Hyphen (ESH) auf der Blattoberfläche gebildet. Die Konidienträger (KT) ragen dann senkrecht in die Luft um die Konidien mit dem Wind zu verbreiten. Der Pilz lässt sich auf der Blatt-

oberfläche anhand weißen Myzels erkennen. Die im sexuellen Zyklus gebildeten Kleistothecien sind zu späteren Zeitpunkten an ihrer schwarzen Färbung zu erkennen. Der große Zyklus (B) beschreibt den sexuellen Zyklus.

Bildquellen: Zyklus = verändert nach Schumann, G.L. 1993 (Schumann, 1993);

mikro- und makroskopische Bilder 1-3= diese Arbeit

4= http://www.bayercropscience.de/de/pf/diagnose_center/online_diagnose/index.asp?ID=0&detail=true&ID_DIAG=160

Das Pathosystem *H. vulgare* – *Bgh* ist eine der bestuntersuchten Wirt-Pathogen-Interaktionen. Da das Wachstum des Pilzes auf die Blattoberfläche beschränkt ist und die Sporen mit hoher Synchronität keimen, kann die Entwicklung des Pilzes

leicht verfolgt werden (Thordal-Christensen et al., 1999). Da die Interaktionen des Pilzes auf die Epidermis der Pflanzen beschränkt sind, lassen sich die Interaktionsstellen und die Abwehr der Pflanze gut mikroskopisch untersuchen.

Genetisch ist die Resistenz der Pflanzen gegen *Bgh* von einer Reihe von Resistenzgenen bestimmt. Um eine rassenunspezifische Resistenz von *H. vulgare* gegen *Bgh* handelt es sich bei der *mlo*-Resistenz, die durch Mutationen im *Mlo*-Gen bedingt ist. Bisher sind eine Vielzahl von Mutationen dieses Gens beschrieben. Bei der *mlo*-vermittelten Resistenz handelt es sich vermutlich um eine Penetrationsresistenz. Die Besonderheit dieser Resistenz ist, dass sie rezessiv und monogen vererbt wird. Sie entspricht nicht dem Gen-für-Gen-Modell nach Flor sondern wirkt gegen alle natürlichen Isolate des Echten Gerstenmehltaupilzes (Jørgensen, 1992; Büschges et al., 1997). Die Funktion von *mlo* hängt von zwei weiteren Proteinen ab, ROR1 und ROR2 (*required for mlo-specified resistance*). Mutationen in den für diese Proteine kodierenden Loci in *Mlo*-tragenden Pflanzen führen zu hyperanfälligen Linien (Freialdenhoven et al., 1996; Collins et al., 2003).

Bei *Mla* handelt es sich um ein dominant vererbtes Resistenzgen, bei dem ein Allel, wie vom Gen-für-Gen-Modell nach Flor (1971) gefordert, Resistenz gegen bestimmte *Bgh*-Rassen vermittelt. *Mla12* vermittelt beispielsweise die Resistenz gegenüber *Bgh* der Rasse A6, welche in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. Für die vollständige Ausbildung dieser Resistenz sind mindestens zwei weitere Loci notwendig, die als *Rar1* und *Rar2* (*required for Mla specified resistance*) bezeichnet werden (Freialdenhoven et al., 1994; Peterhänsel et al., 1997). In dieser *Mla12*-vermittelten Resistenz gelingt es dem Pilz zunächst in die Epidermiszellen einzudringen, wo er dann allerdings durch den lokalen Zelltod gestoppt wird (Peterhänsel et al., 1997; Schiffer et al., 1997). Die hypersensitive Reaktion (HR) wird begleitet von der Akkumulation von H₂O₂ (Hückelhoven et al., 2000) und erstreckt sich teilweise auch auf angrenzende Mesophyllzellen.

Das *Mlg*-Gen vermittelt ebenso wie *Mla12* Resistenz gegen *Bgh*A6. Es handelt sich hier um eine monoallelisch und semidominante Resistenz gegenüber bestimmten Rassen des Gerstenmehltaupilzes. Das Pathogen wird durch effektive Papillenbildung gestoppt, der sich oft eine HR der attackierten Epidermiszelle anschließt (Görg et al., 1993; Schiffer et al., 1997). Die *Mlg*-vermittelte Resistenz ist sowohl von *Ror1* und *Ror2* (*required for Mlg specified resistance*) abhängig, als auch von den erwähnten Komponenten *Rar1* und *Rar2* der *Mla*-vermittelten Resistenz

(Peterhänsel et al., 1997). Die Antwort der chemisch induzierten Resistenz durch DCINA in Gerste konnte auf cytologischer Ebene mit der Antwort der resistenzgenvermittelten *Mlg*-Resistenz gleichgesetzt werden. Die chemisch induzierte Resistenz wird daher auch als Phänokopie der *Mlg*-vermittelten Resistenz bezeichnet (Kogel et al., 1994).

Während *mlo*-vermittelte rassenunspezifische Resistenz gegenüber *Bgh* seit vielen Jahren trotz intensiver Nutzung im Feld stabil ist (Jørgensen, 1992; Heitefuss, 2001), kommt es bei den Resistenzgen-vermittelten rassenspezifischen Resistenzen im Anbau immer wieder zu virulenten *Bgh*-Isolaten. Daher ist der Einsatz von Fungiziden auch heute noch wirtschaftlich unabdingbar für die Mehltaubekämpfung. Aus ökologischen Gründen ist es allerdings notwendig, neue Pflanzenschutzkonzepte zu entwickeln. Ein Ansatz könnte in der Induzierten Resistenz liegen.

1.6 *Piriformospora indica*

Piriformospora indica wurde 1997 von der Spore eines AM-Pilzes in der indischen Thar-Halbwüste isoliert. Aufgrund der charakteristischen birnenförmigen Form seiner Chlamydosporen bekam er seinen Namen. Durch rDNA Sequenzierungen wurde er der Formgattung *Rhizoctonia* aus der Gruppe der Hymenomyceten (Basidiomycota) (Verma et al., 1998) und vor kurzem einer neu definierten Ordnung, den Sebaciniales, zugeordnet (Weiss et al., 2004). Diese Gruppe beinhaltet Organismen, welche mit Pflanzen einer breiten Vielfalt an Mykorrhiza-Symbiosen wie Ektomykorrhiza, orchidoide Mykorrhiza oder ericoide Mykorrhiza bilden.

Durch *Piriformospora indica* wurde eine Besiedelung der Wurzeln von Pflanzen aus den verschiedensten phylogenetischen Gruppen festgestellt (Varma et al., 1999). Durch inter- und intrazelluläres Hyphenwachstum breitet er sich in der Wurzel aus und ist sowohl in der Rhizodermis, als auch dem äußeren Kortex der pflanzlichen Wurzel zu finden. Chlamydosporen werden innerhalb des Wurzelgewebes, als auch extern in der Umgebung gebildet (Varma et al., 1998). Die Hyphen sind mit 0,7-3,5µm Durchmesser sehr viel dünner als die der AM-Pilze.

In Interaktionen von *P. indica* mit verschiedenen *Dactylorhiza* spezies konnte die Ausbildung einer funktionellen Orchideenmykorrhiza festgestellt werden (Blechert et al., 1998). Andererseits zeigte *P. indica* in der Interaktion mit Mais- und *Medicago truncatula* auch nekrotrophen Charakter (Rhody, 1999; Franken et al., 2000). Der am

deutlichsten hervortretende und bisher meist beschriebene Effekt ist der Einfluss des Wurzelendopyhten auf das Wachstum der Pflanzen. Dieser wachstumsfördernde Effekt wurde bereits in vielen dikotylen Pflanzen wie Tabak, Petersilie, Pappel (Varma et al., 1999) und *Medicago truncatula* (Achatz, 2002) beschrieben. Aber auch bei der monokotylen Pflanze *Zea mays* oder in der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, die keine AM bildet, konnte dieser Effekt beobachtet werden (Varma et al., 1999; Peskan-Berghöfer et al., 2004). Welche Mechanismen hinter den wachstumsfördernden Effekten des Pilzes liegen, ist bisher noch nicht geklärt. Ein negativer Effekt wurde das erste Mal 2005 durch Kaldorf et al. (Kaldorf et al., 2005) beschrieben. In Abhängigkeit von den Kulturbedingungen, d.h. bei Ammonium als Stickstoffquelle im Medium des Pilzes, zeigten Pappelblätter auf Kulturmedium bei Anwesenheit von *P. indica* Nekrosen.

Aufgrund seiner Herkunft, der Verwandtschaft und den Einflüssen, die *Piriformospora indica* durch seine Besiedelung auf die Pflanzen ausübt, wurde er in seiner Funktion häufig mit arbuskulären Mykorrhizapilzen verglichen (Varma et al., 1999; Singh et al., 2000; Varma et al., 2000a). So könnte die Erhöhung der Transkriptmenge der Nitratreduktase in Wurzeln und Spross besiedelter *A. thaliana* Pflanzen ein Hinweis für die Unterstützung der Stickstoffzufuhr darstellen (Sherameti et al., 2005).

Entgegen den arbuskulären Mykorrhiza-Pilzen ist es möglich, *P. indica* auch axenisch in Kultur zu halten (Abb. 1-4) und zu vermehren. Diese Eigenschaft und die damit verbundenen guten Untersuchungsmöglichkeiten im Gegensatz zu den obligat biotrophen arbuskulären Mykorrhizapilzen machen diesen Organismus sehr interessant für Grundlagenforschung und Anwendung.



Abb. 1-4: Der Wurzelendopyht *Piriformospora indica* in axenischer Kultur

P. indica ist nicht wie andere Wurzelendopyhten obligat an die Pflanze gebunden, sondern kann auch axenisch in Kultur gehalten werden.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion mit und die Auswirkungen des Wurzelendopyhten *P. indica* auf die Pflanze *Hordeum vulgare* näher zu charakterisieren. Es sollten zunächst die Auswirkungen auf das Wachstum, die Entwicklung und den Ertrag dieser Kulturpflanze untersucht werden. Der Einfluss von

P. indica auf die Interaktion der Pflanze mit dem Erreger des Echten-Gerstenmehltaus *Blumeria graminis f. sp. hordei* (Bgh) stellte einen weiteren Untersuchungsschwerpunkt dar. Nach ersten Hinweisen auf eine systemische Resistenz sollte diese detailliert makroskopisch, zytologisch und molekular untersucht werden. Systemisch induzierte Resistenzmechanismen sind bisher vorwiegend in dikotylen Pflanzen charakterisiert. Um einen Einblick in die Mechanismen des Einflusses der Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* auf *Hordeum vulgare* zu ermöglichen, wurde die Expression von Kandidaten-Genen, die für Komponenten bekannter Signaltransduktionswege der Induzierten Resistenz kodieren, untersucht. Zusätzlicher Schwerpunkt des molekularen Teils dieser Arbeit war die Suche nach differentiell exprimierten Genen in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. Neben der Herstellung von subtraktiven cDNA-Banken wurden dazu ein Makroarray sowie der 22K-*Barley1 GeneChip*[®]-Mikroarray (Affymetrix) verwendet, welche es erlaubten, eine große Anzahl von Genen in ihrer Expression zu untersuchen. Zusätzlich sollte in diesen Expressionsstudien *Priming*-Phänomenen als mögliche Faktoren der durch *P. indica* induzierten Resistenz nachgegangen werden.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen

Tab.: 2-1: Verwendete Organismen und ihre Herkunft

Organismus	Stamm, Kultivar	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	TOP10F ⁺	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α T1	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Hordeum vulgare</i>	cv. Ingrid	James McKey, University of Uppsala, Schweden
<i>Hordeum vulgare</i>	cv. Maresi	Groetzner Pflanzenzucht, Hamburg
<i>Hordeum vulgare</i>	cv. Annabell	Saatzucht Ackermann, Irlbach
<i>Hordeum vulgare</i>	cv. Braemar	Cebeco Seeds Ltd., Norfolk, UK
<i>Hordeum vulgare</i>	105-6 (<i>MLO</i> , <i>ror1</i>)	(Collins et al., 2003)
<i>Glomus mosseae</i>	BEG 12	Biorize, Dijon, Frankreich
<i>Piriformospora indica</i>		(Verma et al., 1998)
<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>	A6	DR. J. H. JØRGENSEN, Agricultural Research, Risø National Laboratory, Roskilde, Dänemark.

2.2 Vektoren und Plasmide

Tab. 2-2: Verwendete Vektoren und Plasmide

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
TOPO TM pCR 2.1	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Invitrogen (Karlsruhe)
pGEM [®] -Teasy	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Promega (Mannheim)
pGEM [®] -T	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Promega (Mannheim)

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Tab. 2-3: Verwendete Oligonukleotide und ihre Anlagerungstemperaturen (AT)

Name	Sequenz (5'→3')	AT [° C]	Herkunft
M13-for	GTAAAACGACGGCCAG	51,0	Invitrogen
M13-rev	CAGGAAACAGCTATGAC	50,4	Invitrogen
3' Smart CDS-PrimerIIA*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT ₍₃₀₎ N ₋₁ N (N = A, C, G, or T; N ₋₁ = A, G, or C) <i>Rsa</i> I	67,4	Clontech
Smart-PrimerIIA*	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGTACGCGGG	70,9	Clontech
Nested Primer 1**	TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGT	73,3	Clontech
Nested Primer 2R**	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT	67,6	Clontech
5' Smart-PCR-PrimerIIA*	AAGCAGTGGTAACAACGCAGAGT	65,0	Clontech
H-18S_for ^{Q1}	GCGAGCACCGACCTACTC	58	IPAZ
H-18S_150rev ^{Q2}	GGACCGGAATCCTATGATGTT	58	IPAZ
H-18S_rev	CGGCGGAGTCCTATAAGC	58	IPAZ
HvUbi_60deg_for	ACCCTCGCCGACTACAACAT	60	IPAZ
HvUbi_60deg_rev	CAGTAGTGGCGGTCTGAAGTG	60	IPAZ
piri_tef_150for	TCGTCTGCTGTCAACAAGATG	60	IPAZ
piri_tef_rev	ACCGTCTTGGGGTTGTATCC	60	IPAZ
HvOXLP_for	GGCCGACATGCATTACCAG	60	IPAZ
HvOXLP_rev	CATCTGATATTGCTGGGTCTG	60	IPAZ
HvPrx8-for ^{fl}	TCGAGGTCGACGTTACGATAAGC	61	diese Arbeit
HvPrx8-rev ^{fl}	TAGCTCGTCCGTCGATCACG	61	diese Arbeit
HvPrx8-1_for	AACGCGGCTCCGAACAACGGG	64	diese Arbeit
HvPrx8-1_rev	TTGGACGCGAAGTTCCTGACCG	64	diese Arbeit
JIP-23_for	TGCAAAGCAATGGCCTCTGGAGTG	64	diese Arbeit
JIP-23_rev	TCCCTTCACCGAAGTCCAGCTCTG	64	diese Arbeit
HvJIP-23-1_for	GGAGTGTGGTACCCCAT	60	diese Arbeit
HvJIP-23-1_rev	GGCACCAGTGGCATTGTAGA	60	diese Arbeit
BCI-1_for	GGAGCGTTCGACACAAAGAAG	60	IPAZ
BCI-1_rev	CTTTAGTGATGAGGGAGTCTGC	60	IPAZ
BCI-4_for	TAGGATCCATGCCCGGTCATCGACAATC	60	IPAZ
BCI-4_rev	AAGCTTCTCTCACTCTAAACTAGCACCAAG	60	IPAZ

Material und Methoden

Name	Sequenz (5'→3')	AT [° C]	Herkunft
HvBCI-9_for	CCTCGCTGGCTCATGAAGAA	60	IPAZ
HvBCI-9_rev	CGACGTCTGCTGCCATGTAG	60	IPAZ
HvPr1b_for	GCCCAAGCTAGTCATCTTGC	56	IPAZ
HvPr1b_rev	TGGTTTCTGTCCAACGATGT	56	IPAZ
HvPr5_for	TAGAGCTTGCAGCAATGTCGACC	60	IPAZ
HvPr5_rev	ATGGGCAGAAGGTGATCTGGTAG	60	IPAZ
NPR_for	GCAACAAATCTTGCGTGAAA	54	IPAZ
NPR_rev	TAGGATCTCTCCGCCTAGCA	54	IPAZ
APXfl1_for	GCCTGATCGGACTCTCAGC	58	IPAZ
APXfl2_rev	CGCGCATAGTAGCAGCAGTA	58	IPAZ
Cat 1_for	CCTTAATCAGCAGGGATGGA	56	IPAZ
Cat 1_rev	TCTGGATTTTCATGGGTGACA	56	IPAZ
Cat 2_for	GGCGTCAACACCTACACCTT	56	IPAZ
Cat 2_rev	TGGAGAGGAAGTCGATCCAG	56	IPAZ
GR_for	CAGTAATTTTCGGGTGGGAAA	56	IPAZ
GR_rev	GGCGGAATACAGAAAACAGC	56	IPAZ
MDHAR_for	TCATCGGTGGTGGCTACATA	58	IPAZ
MDHAR_rev	GTCAGGCACCTCTTTCTTGC	58	IPAZ
DHAR_Cyto_for	GACCGAGGTCTGCGTCAAG	60	diese Arbeit
DHAR_Cyto_rev	TCAGCAATCCATTTGCCATC	60	diese Arbeit
I14:3 PDI_for	GAGCCAAGGGGCTTTCCAGT	61	IPAZ
I14:3 PDI_rev	TGCTCAGAGCTCATCCTTCA	61	IPAZ
HvPDI-QP-for ^{Q1}	CAAGGATGAGCTCTGAGCAA	60	IPAZ
HvPDI-QP-rev ^{Q2}	CCAACACATCCAACAACCAA	60	IPAZ
K21:7_MSR_for	TCGCTTTGGCTTCAAGCAG	56	diese Arbeit
K21:7_MSR_rev	CCTTGCATTTAGGTACCAGCA	56	diese Arbeit
F11:1_GTCP_for	CTATGTCGGGGGCTCAAGT	60	diese Arbeit
F11:1_GTCP_rev	AGGCAACCCTGGACGACTAT	60	diese Arbeit
D-17:7-LLR_for	GAGCTGCAAGGATTGGTTTC	60	diese Arbeit
D-17:7-LLR_rev	ACCAAACACAGACCCTACGC	60	diese Arbeit
F-04:7-LLRcEG_for	GGAGCTTCAGGAGAACATGC	60	diese Arbeit
F-04:7-LLRcEG_rev	GTCTTGAGCGTGTCTGGAT	60	diese Arbeit
E-10:7_ECI_for	GATGGATGGCCATTGTGAAT	58	diese Arbeit
E10:7-ECI-1_for ^{Q1}	AGGGCATGCGTGCTATACTT	58	diese Arbeit

Name	Sequenz (5'→3')	AT [° C]	Herkunft
E-10:7_ECI-2_rev ^{Q2}	TACAAATGGAGGCTCCCTCA	58	diese Arbeit
J-23:7_SHBP_for	AATCTGAGGGCCACATTTGA	58	diese Arbeit
J-23:7_SHBP_rev	TGATCAACCTTGTCCAGCAC	58	diese Arbeit
L-21:1_ELGP_for	CAAGGCCATAAAGCTCTTCG	58	diese Arbeit
L-21:1_ELGP_rev	ATGACTACCGTGCTGGGTTC	58	diese Arbeit
L-11:5_CarbAH_for	GTTTCGAAACATGGGAGCAGT	58	diese Arbeit
L-11:5_CarbAH_rev	TCCTCGTCAGAAAATGGTGA	58	diese Arbeit
B-03:7_LBC_for	CATGGGGTCTTTGATTTTGG	58	diese Arbeit
B-03:7_LBC_rev	GGGAAAACCTTTGATCCGTGT	58	diese Arbeit
Con5494_PGDPH_for	CAGCTTCATGAGCGTTGGTA	60	diese Arbeit
Con5494_PGDPH_rev	CGCCTAGAGCTTGAGGAAGA	60	diese Arbeit
Con2123_S_Pox_for	CAAGCACGACAAGTACGTGAA	60	diese Arbeit
Con2123_S_Pox_rev	TGCTTAGCAAGGCTAGTTTAGTTC	60	diese Arbeit
Cont_17047_for	TGCCCCTAGAACTCAGCATT	60	diese Arbeit
Cont-17047_rev	AACAAAGGTATTCACATGAACTCAA	60	diese Arbeit
Y09233_CHS_for	GAGGTTCTGTCCGAGTACGG	60	diese Arbeit
Y09233_CHS_rev	AAGAGGACACCCCAGTCCTT	60	diese Arbeit
Con1580_x_Thion_for	GAGTTGCTGCAAGAACACGA	60	diese Arbeit
Con1580_x_Thion_rev	TGGGCCGCTTATGATTTTAC	60	diese Arbeit
Con3675_Expa_1for	CGCTTAGGCCTTTCCTTCTC	60	diese Arbeit
Con3675_Expa_rev	CGGTGTTTCCACAACACAAG	60	diese Arbeit
Con13252_PRPK_for	GGCTAAACGGAGATGAGCAG	60	diese Arbeit
Con13252_PRPK_rev	TCCTTCGACTGCAAGAGGTT	60	diese Arbeit

* Oligonukleotide von der Firma BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) als Komponenten des SMARTTM PCR cDNA Synthesis Kit

** Oligonukleotide von der Firma BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) als Komponenten des SMARTTM PCR-selectTM cDNA Subtraction System

^{Q1+Q2} Oligonukleotid-Paar zur Verwendung in *RealTime*-PCR

2.4 Standard-Puffer, Lösungen und Medien

Chemikalien und Labormaterial wurden von den Firmen Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) und Difco Laboratories (Heidelberg) bezogen. Verbrauchsmaterialien lieferten Sarstedt (Nürnberg), Noras (Suhl), Kobe (Marburg), MAGV (Rabenau).

Material und Methoden

Tab. 2-4: Puffer und Lösungen

TAE	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,0 EDTA
10 x TBE	900 mM 900 mM 25 mM	Tris Borsäure EDTA pH 8,0
TE	10 mM 1 mM	Tris-HCl pH 8,0 EDTA
Lösung 1 für Plasmidpräparation	50 mM 10 mM 100 µg/ml	Tris-HCl pH 7,5 EDTA RNase A
Lösung 2 für Plasmidpräparation	0,2 M 1 %	NaOH SDS
Lösung 3 für Plasmidpräparation	3 M	KAc pH 5,5
10 x DNA-Ladepuffer	50% (v/v) 0,1 M 1% (v/v) 4% (v/v)	Glyzerin EDTA SDS gesättigtes Bromphenolblau
2 x RNA-Ladepuffer	260 µl 720 µl 80 µl 80 µl 160 µl 100 µl add 1,5 ml	Formaldehyd (37 %) Formamid Glyzerin, autoklaviert gesättigtes Bromphenolblau 10x MOPS, pH 7,0 Ethidiumbromid (10 mg ml ⁻¹) Milli-Q Wasser
10 x MOPS-Puffer	200 mM 50 mM 10 mM 1% (v/v)	Morpholin-3-propansulfonsäure- Natriumacetat EDTA mit NaOH ad pH 7,0 DEPC autoklaviert
TNE	10 mM 0,1 mM 10 mM	Tris-HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 NaCl
DEPC behandeltes Wasser	0,1%	DEPC (4 h inkubiert und anschließend autoklaviert)

Tab. 2-5: RNA-Extraktion und Northern Blot

RNA-Extraktionslösung	38 % (v/v) 0,8 M 0,4 M 0,1 M 5 % (v/v)	gesättigtes Phenol Guanidin Thiocyanat Ammonium Thiocyanat Natrium Acetat, pH 5,0 Glyzerin
Transferpuffer	25 mM	Na-Phosphat-Puffer, pH 6,5

Material und Methoden

Tab. 2-6: Reverse Northern und DIG-Detektion

Denaturierungslösung	0,5 M 1,5 M	NaOH NaCl
Neutralisationslösung	0,5 M 1,5 M	Tris-HCl pH 8,0 NaCl
20 x SSC	0,4 M 4 M	Natriumcitrat pH 7,0 NaCl
Blocking Reagenz	10 %	Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) in DIG-Lösung 1 gelöst.
DIG-Standard-Hybridisierungspuffer	5 x 0,1 % 0,02 % 1 %	SSC N-Lauroylsarcosine SDS Blocking Reagenz
2 x Waschlösung	2 x 0,1 %	SSC SDS
0,1 x Waschlösung	0,1 x 0,1%	SSC SDS
DIG-Lösung 1	100 mM 150 mM	Maleinsäure pH 7,5 NaCl
DIG-Waschlösung	0,3%	Tween 20® in DIG-Lösung 1
DIG-Blockierungslösung	1 %	Blockingreagenz in DIG-Lösung 1
DIG-Detektionspuffer	100 mM 100 mM 50 mM	Tris-HCl pH 9,5 NaCl MgCl ₂

Material und Methoden

Tab. 2-7: GAN-Makroarray-Hybridisierungen

Lysis-Puffer	100 mM 500 mM 10 mM 1 % 5 mM	Tris LiCl EDTA LiDS mit HCl ad pH 8,0 DTT
Wasch-Puffer	10 mM 150 mM 1 mM 0,1 %	Tris LiCl EDTA mit HCl ad pH 8,0 LiDS
5 x RT-Puffer	250 mM 250 mM 50 mM	Tris KCl MgCl x 6 H ₂ O mit HCl ad pH 8.3
Elutionspuffer	2 mM	EDTA
100 x Denhardt's Reagenz	1 g 1 g 1 g add 50 ml	Ficoll Polyvinylpyrrolidone (Pvp) BSA H ₂ O
Makroarray-Hybridisierungslösung	20 ml 133,2 ml 20 ml 226,8 ml pro 50 ml + 500 µl	100 x Denhardt's Reagenz 20 x SSC 10 % SDS H ₂ O Lachssperm (10mg/ml)
0,2 x Waschlösung	0,2 x 0,1 %	SSC SDS
0,1 x Waschlösung	0,1 x 0,1 %	SSC SDS
Membran-Lagerungs-Lösung	0,2 x 0,2 mM	SSC NaN ₃

Tab. 2-8: Dünger

Wuxal top N (Schering, N/P/K: 12/4/6) NPK-Flüssigdünger	0,5 %
--	-------

Material und Methoden

Tab. 2-9: Kulturmedien

LB-Medium	10 g/L 5 g/L 10 g/L 15 g/L	Trypton Hefeextrakt NaCl Agar-Agar (für LB-Agar)
SOC	20 g/L 0,58 g/L 0,185 g/L 2,03 g/L 2,46 g/L 3,6 g/L	Trypton NaCl KCl MgCl ₂ ×7H ₂ O MgSO ₄ ×7H ₂ O Glukose
CM-Medium	50 ml/L 20 g/L 2 g/L 1 g/L 1 g/L 1 ml/L 1 ml/L 15 g/L	20 x Salzlösung Glukose Pepton Hefeextrakt Casaminosäuren Vitaminlösung Spurenelementelösung Agar-Agar (für CM-Agar)
20 x Salzlösung	120 g/L 30,4 g/L 10,4 g/L 10,4 g/L	NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl MgSO ₄
Spurenelementelösung	2,2 g 1,1 g 0,5 g 0,5 g 0,18 g 0,18 g 0,11 g 5,0 g ad 80 ml	ZnSO ₄ H ₃ BO ₃ MnCl ₂ FeSO ₄ CoCl ₂ CuSO ₄ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ Na ₄ EDTA H ₂ O
Vitaminlösung	0,01 % 0,01 % 0,01 % 0,01 % 0,01 % 0,01 % (w/v)	Biotin Pyridoxin-HCl Thiamin Riboflavin p-Aminobenzoessäure Nicotinsäureamid
Wasseragar-Platten	0,8% (w/v)	Agar-Agar

Tab. 2-10: Antibiotika und Nachweisreagenzien

Trypanblau-Färbelösung	0,1% (v/v)	Trypanblau in Laktophenol (25% (w/v) Phenol in Wasser/ Glycerin/ Milchsäure im Verhältnis 1:1:1)
Säurefuchsin-Färbelösung	875 ml 63 ml 63 ml 0,1 g	Milchsäure Glycerin H ₂ O Säurefuchsin
Säurefuchsin-Entfärbelösung	875 ml 63 ml 63 ml	Milchsäure Glycerin H ₂ O
Blatt-Entfärbelösung	800 ml 200 ml 1,5 g	Ethanol Chloroform Trichloressigsäure
Mikroskopierlösung	50 % (v/v)	Glycerin
Essigsäure Tinte	90 % (v/v) 10 % (v/v)	Essigsäure (25% (v/v)) Tinte 4001 (Pelikan, Hannover)
X-Gal IPTG	40 µg/ml 8 µg/ml	in DMSO in H ₂ O
Ampicillin	150 mg/ml	in H ₂ O

2.5 Kultivierung der verwendeten Organismen

2.5.1 *Hordeum vulgare*

Vor der Aussaat der Pflanzen wurde das Saatgut oberflächensterilisiert und vorgekeimt. Die Oberflächensterilisation erfolgte durch 2 min Schwenken in 80%igen Ethanol, gefolgt von 2 min in 4%iger NaOCl-Lösung. Daraufhin wurden die Samenkörner mehrmals mit sterilem Wasser gespült und auf mit sterilem Wasser befeuchtetes Whatmann-Papier in großen, sterilisierten Petrischalen (Ø 16 cm) ausgelegt. Nach dreitägiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur (RT) wurden je drei ausgekeimte Samen in 300 ml Pflanzgefäße gesetzt. Als Substrat diente ein sterilisiertes 2:1-Gemisch aus Seramis® (Masterfoods, Verden) und Oil-Dri® (Damolin, Mettmann).

Die Pflanzen wurden von unten mit deionisiertem Wasser gegossen und nach 14 Tagen und danach wöchentlich, mit 20 ml 0,5% (v/v) Wuxal-Dünger (Schering) je Pflanzgefäß gedüngt.

Die Anzucht der Pflanzen fand im Gewächshaus [22° C/18° C Tag/Nacht Zyklus, 60% relative Luftfeuchte, Lichtperiode 16h (30 kLux)] statt.

2.5.2 *Piriformospora indica*

Für die Kultivierung von *P. indica* wurde CM-Medium verwendet. Die Inkubation der Agarplatten erfolgte für die Kultivierung bei 25° C. Flüssigkulturen wurden mit von Agarplatten geschwemmten Sporen oder aus bewachsenen Agarplatten ausgestanzten Agarblöcken inokuliert und bei RT aerob auf einem Horizontalschüttler bei ca. 100 rpm inkubiert.

2.5.3 *Blumeria graminis f.sp. hordei* (Bgh)

Die Nachzucht des obligat biotrophen Pathogens wurde auf jungen Gerstenpflanzen des anfälligen Kultivars Ingrid durchgeführt. Der Pilz wurde durch regelmäßige Konidienübertragung auf neue Pflanzen vermehrt. Die Kultivierung der zur Nachzucht verwendeten Pflanzen erfolgte in einer Phytokammer unter kontrollierten Bedingungen bei 16-18° C, 60 % rel. Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit einer Intensität von 100 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.5.4 *Escherichia coli*

Die Anzucht von *E. coli*-Zellen erfolgte in LB-Medium bzw. auf LB-Agar, dem zur Selektion transformierter Bakterien, welche ein Ampicillinresistenz-tragendes Plasmid beeinhalteten sollten, 150 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin zugesetzt wurde. Die Kulturen wurden aerob bei 37° C inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden mit ca. 160 rpm bei gleicher Temperatur geschüttelt.

2.6 Behandlungen der Pflanzen

2.6.1 Inokulation der Pflanzen mit *P. indica*

Die Inokulation der Keimlinge mit *P. indica* in Topfkulturen erfolgte mit 4 g Pilzmyzel aus Flüssigkulturen. 300 ml-Pflanzgefäße wurden hierzu mit Substrat gefüllt und drei Keimlinge pro Topf in vorgefertigte Pflanzlöcher pikiert. Nach Filtrierung der pilzlichen Flüssigkulturen wurde 4 g Pilzmyzel pro 20 ml sterilem Wasser auf alle Pflanzlöcher je Topf verteilt.

Um eine Mykorrhizierung der Pflanzen zu erreichen, wurde das Substrat 1:10 mit Mykorrhizainokulum (*Glomus mosseae*) vermischt. Kontrollpflanzen wurden in gleichem Substrat, jedoch ohne Inokulum, angezogen. Die Anzucht der Pflanzen erfolgte im Gewächshaus bei 22° C/18° C Tag/Nacht Zyklus, 60% relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16h mit 30 kLux.

2.6.2 Inokulation der Pflanzen mit *Bgh*

Zur gleichmäßigen Inokulation der Pflanzen mit dem biotrophen Pathogen wurde ein Inokulationsturm verwendet. Zur Inokulation der adaxialen Seite der Gerstenblätter wurden die Blätter der Pflanzen so auf einem Tablett im Turm ausgerichtet und fixiert, dass die bestmögliche Inokulation der adaxialen Blattseite bei geringer Inokulationsdichte ermöglicht werden konnte.

Zur Inokulation der Pflanzen für die cytologischen Untersuchungen wurden die Blätter intakter Pflanzen auf einer planen Fläche unter dem Inokulationsturm zur Inokulation der adaxialen Blattseite fixiert. Nach der Inokulation wurden die intakten Pflanzen bis zum gewünschten Zeitpunkt der Pathogen-Pflanzen-Interaktion in einem Klimaschrank weiter kultiviert. Zum Zeitpunkt der gewünschten Beobachtung (24h, 32h, 48h oder 72h) wurden die Blätter abgeschnitten und in Entfärberlösung zum Entfärben und Fixieren gegeben.

Für dichte Inokulationen, wie für die spätere Verwendung der Pflanzen in der Molekularbiologie, wurden die Pflanzgefäße in den Turm gestellt.

Durch Schütteln von *Bgh*-infizierten Pflanzen mit deutlichen Konidienträgern (Pusteln) über den Versuchspflanzen in diesem Turm, wurden diese mit dem Pathogen infiziert. Eine gleichmäßige Verteilung der Konidien wurde durch eine rasche Verwirbelung der Luft im Turm und folgender kurzer Wartezeit gewährleistet. Die Pflanzen wurden je nach Verwendungszweck mit unterschiedlichen Sporendichten inokuliert (Tab. 2-11).

Tab. 2-11: Inokulationsdichten von *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* für die verschiedenen Versuchsansätze

Versuchsansatz	<i>Bgh</i> - Inokulationsdichte (Konidien / mm ²)
Blattsegmenttest	10-15
Cytologische-Studien	20-25
Molekularbiologie	80-100

Die Konidiendichte wurde durch Bestimmung der Konidienzahl / mm² kontrolliert.

Die Inkubationen der inokulierten Pflanzen erfolgten bis zur Ernte für definierte Zeitpunkte in Klimakammern bei 16-18° C, 50-60% relativer Luftfeuchte und einer Lichtperiode von 16 h mit einer Intensität von 50-60 µE s⁻¹ m⁻².

Nicht-inokulierte Pflanzen für die Kontrollen wurden unter gleichen Bedingungen wie die behandelten Pflanzen weiter herangezogen.

2.6.3 Ernte der Pflanzen

Die Pflanzen wurden entsprechend ihrer jeweiligen Verwendung nach ihrer Ernte verarbeitet. Für die makroskopischen, cytologischen und auch die molekularen Untersuchungen wurden die jüngsten- und die zweitjüngsten Blätter der Pflanzen

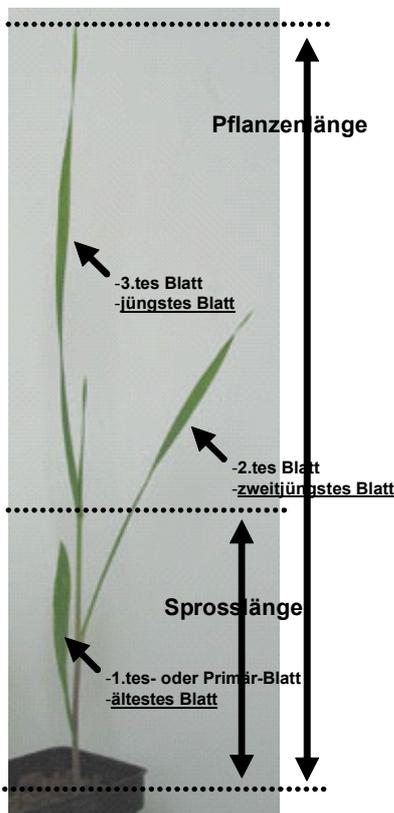


Abb. 2-1: Aufbau und Messparameter einer drei Wochen alten Gerstenpflanze

Dargestellt ist eine drei Wochen alte Gerstenpflanze mit den jeweiligen Benennungen ihrer Blattetagen, sowie den Messparametern Sprosslänge und Pflanzenlänge.

verwendet. Abbildung 2-1, gibt einen Überblick über den Habitus der Pflanzen drei Wochen nach Aussaat unter den in Kapitel 2.6.1. beschriebenen Bedingungen. Zur Bestimmung der Wachstumsparameter der Pflanzen als auch zur Beurteilung der Besiedelung wurden die Pflanzen von ihren Wurzeln getrennt und Länge- als auch Gewicht der Pflanzen bestimmt. Die Pflanzenlänge wurde jeweils bis zum obersten Punkt der Pflanzen gemessen, während als Sprosslänge die Länge bis zum Knotenpunkt des letzten vollentwickelten Blattes zum Erntezeitpunkt definiert wurde (Abb. 2-1). Zusätzlich wurden dazu korrespondierend das Pflanzengewicht und das Sprossgewicht bestimmt. Für eine Bestimmung der Wurzelmasse wurden diese von Substrat befreit und die Gesamtwurzelmasse pro Topf bestimmt. Von den Wurzeln der Pflanzen pro Topf wurde ein Teil für Färbungen zurückgehalten (Kap.

2.7.1). Bei den Pflanzen, welche bezüglich des systemischen Effektes des Wurzelendophyten auf die Blätter entweder für die cytologischen Resistenzstudien oder aber die molekularen Analysen verwendet wurden, wurde darauf geachtet, jeglichen Stress zu vermeiden.

Zur Verwendung für molekularbiologische Untersuchungen wurden direkt die jüngsten- und zweitjüngsten vollentwickelten Blätter in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° C gelagert.

2.7 Mikroskopische Untersuchungen

2.7.1 Färbungen pilzlicher Strukturen in den Wurzeln

Für die Anfärbung der Wurzelendophyten wurde ein Teil der Wurzeln im Dampfdrucktopf bis zum Aufbau des Überdrucks in 10% (w/v) KOH inkubiert, danach mit Wasser gewaschen und anschließend in 1%ige HCl-Lösung überführt. Darin wurden die Wurzel bei RT für mind. 2 h inkubiert. Nach diesem Ansäuern der Wurzeln wurden diese in Säurefuchsin-Färbelösung überführt, und durch erneutes Aufkochen im Dampfkochtopf erfolgte der Färbeprozess.

Die Wurzeln wurden danach in Säurefuchsin-Entfärbelösung gegeben und darin bis zur mikroskopischen Betrachtung bei RT gelagert.

2.7.2 Färbung pilzlicher Strukturen auf den Blättern

Zur Anfärbung der pilzlichen Strukturen auf den Blättern wurden diese nach Entfärbung und Fixierung (Kap. 2.7.5) für ca. 1 min in Essigsaurer-Tinte inkubiert. Durch kurzes Schwenken in Wasser wurde die überflüssige Tinte abgewaschen. Die Blätter wurden danach zur mikroskopischen Betrachtung in Mikroskopierlösung auf Objektträger gebettet.

2.7.3 Mikroskopische Betrachtungen der Wurzelbesiedelung durch *P. indica*

Die Besiedelung der Säurefuchsin-gefärbten Wurzeln wurde mittels Durchlicht-Mikroskopie überprüft. Zur Erkennung der sehr dünnen Hyphenstrukturen des Pilzes in den Wurzeln war allerdings eine Betrachtung der gefärbten Wurzeln unter Auflichtfluoreszenz nötig. Es wurden hierfür folgende Filter verwendet: Anregungsfilter 546 nm (BP 546), Farbteiler 580 nm (FT580), Langpassfilter 590 nm (LP 590) (Zeiss, Jena).

2.7.4 Besiedelungsabschätzung der geernteten Pflanzen

Nach Färbung der pilzlichen Strukturen in den Wurzeln wurden unterschiedliche Fragmente der Wurzeln auf Objektträgern aufgelegt und wie in Kapitel 2.7.3 beschrieben mikroskopisch betrachtet. Stichprobenweise wurden mehrere Fragmente betrachtet und die Menge an Chlamydosporen und Hyphen im Überblick abgeschätzt. Eine genauere quantitative Bestimmung der Besiedelung wurde später von einzelnen Versuchen mittels molekularer Methoden vorgenommen.

2.7.5 Cytologische Untersuchungen der Pilz-Pflanzen-Interaktion *H. vulgare* – *Bgh*

Die Entwicklungen des Echten Gerstenmehltaupilzes sowie Resistenzreaktionen der Pflanze auf Penetrationsversuche des Pilzes wurden mittels eines Durchlicht- und Auflichtfluoreszenz-Mikroskops (Axioplan, Zeiss, Jena) analysiert. Zur Betrachtung dieser Pilz-Pflanzen-Interaktionen wurde zunächst das Blattmaterial fixiert, entfärbt und anschließend der Pilz angefärbt. Die Entfärbung der Blätter erfolgte in zweimal 24-stündiger Inkubation in Blatt-Entfärbelösung. Anschließend wurden die Blätter in Mikroskopierlösung gelagert. Die Pilzstrukturen des Echten-Mehltaupilzes auf der Blattoberfläche wurden mit Essigsaurer-Tinte angefärbt. Das Blattfragment wurde hierzu zunächst kurz in einem Glas mit Wasser gespült und dann für ca. 30 Sekunden in Essigsäure-Tinte gelegt. Anschließend wurde das Blatt erneut in Wasser geschwenkt um überschüssige Tinte abzuwaschen. Das Blatt wurde dann in Mikroskopierlösung auf dem Objektträger luftblasenfrei mit der adaxialen Seite nach oben unter dem Deckglas eingebettet.

Zur Auswertung wurden die jüngsten vollentwickelten Blätter der drei Wochen alten mit dem Wurzelendopyhten besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen verwendet (Abb. 2-1). Pro Blattsegment wurden 100 Interaktionen ausgezählt und je Versuch 4-9 Blattsegmente in die Auswertungen einbezogen. Da die pilzliche Penetrationsrate in kurzen und langen epidermalen Zellen unterschiedlich ist wurden für die Analysen nur Interaktionen an kurzen Zellen herangezogen (Zelltyp A und B) welche über dem parenchymatischen Mesophyllgewebe nahe der Stomata liegen (für Blatttopographie siehe (Koga et al., 1990)).

Bei den attackierten Zellen unterschied man erfolgreich penetrierte Zellen, in denen es zur Etablierung eines Haustoriums des Pilzes kam, von Zellen, die den Penetrationsversuch des Pilzes abgewehrt hatten. Abgewehrte Interaktionen zeigten sich in Form von Papillenbildung an den Orten versuchter Penetration und wurden als „Nicht penetrierte lebende Zellen“ (NPLZ) gezählt. Eine andere Art der Abwehrreaktion der Pflanze ist der lokale Zelltod durch Ausbildung einer Hypersensitiven Reaktion (HR) der Zelle am Ort der versuchten Penetration.

Für die Beobachtung von autofluoreszierenden pflanzliche Strukturen, wie sie an den Orten der Papillenbildung und vor allem an den Orten der HR auftreten, wurde eine Filterkombination mit einer Anregungswellenlänge von 485 nm (BP 485), einem Farbteiler bei 510 nm (LT 510) und einem Langpassfilter bei 520 nm (LP 520)

benutzt (Zeiss, Jena). Zusätzlich wurde im Durchlicht mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC) gearbeitet, um schwach kontrastierte Bereiche besser auflösen zu können.

2.8 Makroskopische Untersuchungen

2.8.1 Blattsegmenttest zur Untersuchung der Resistenz der Gerstenpflanzen gegen *Bgh*

Für den Blattsegmenttest wurden die Blätter von Gerstenpflanzen abgetrennt und 7 cm große Fragmente mit der adaxialen Seite nach oben auf Wasseragarplatten (0,4% Benzimidazol) ausgelegt. Für den Test wurden die jüngsten- bzw. zweitjüngsten vollentwickelten Blätter (Abb. 2-1) verwendet, gemeinsam inokuliert, aber getrennt ausgewertet. Pro Prüfglied wurden jeweils neun Blätter verwendet. Als Kontrollen wurden zusätzlich Blätter ausgelegt, welche nicht inokuliert wurden.

Die Agarplatten wurden unter einem Inokulationsturm inokuliert (Kap. 2.6.2.) bis die gewünschte Konidiendichte erreicht wurde. Inkubiert wurden die Platten dann für 5-7 Tage im Klimaschrank (Kap. 2.6.2) und danach die Anzahl der Pusteln auf den mittleren 5 cm, bei starker Befallsdichte auf den mittleren 3 cm der Blattsegmente ermittelt. Nach Mittelwertberechnung der Pustelanzahl über die neun Blätter pro Prüfglied wurde zur Ermittlung der Signifikanz ein ungepaarter Student. T-Test durchgeführt.

2.8.2 Untersuchungen der Auswirkungen der *P. indica*-Besiedelung auf den Ertrag

2.8.2.1 Gefäßexperiment zur Bestimmung des Ertrags

Zur Untersuchung des Einflusses der Besiedelung von Gerstenpflanzen mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica* wurde ein Gefäßexperiment unter Freilandbedingungen an der Versuchsstation in Rauschholzhausen (Phytotron) durchgeführt.

Es wurden drei verschiedene Kultivare (cv. Ingrid, cv. Annabell, cv. Braemar) verwendet. Die Anzucht der Pflanzen bis zur Ertragsreife wurde unter definierten Düngebedingungen in dafür vorgesehenen 6 Liter Mitscherlichgefäßen (Stoma, Siegburg) durchgeführt. Als Substrat diente ein Gemisch aus Sand und Ackerboden der Vorfrucht Kartoffel (2:1). Der Nährstoffgehalt des verwendeten Ackerbodens wurde mit 13,35 mg/100 g K₂O und 10,52 mg/100g P₂O₅ und einem pH-Wert von 6,3 angegeben. Zu 6 kg des Bodengemisches wurden als Nährstoffe 0,25 g N, 0,4 g P,

1,6 g K, 0,2 g Mg sowie 1,5 g CaCO₃ Substrat zugefügt (Tab. 2-12). Eine zweite Stickstoffgabe (N₂) erfolgte zum Beginn des Schossens (DC31) der Pflanzen.

Für das Kultivar Ingrid wurden zusätzlich verschiedene Düngungsstufen (NK, NPK und NPK+, siehe Tab. 2-13) mit in die Untersuchungen einbezogen, um den Einfluss des Wurzelendophyten auf den Ertrag unter kontrollierten Düngestufen zu untersuchen.

Tab. 2-12: Tabelle der Düngelösungen für den Gefäßversuch sowie deren chem. Form

	Element	Menge	chem. Form der Gabe
Düngelösungen (flüssig)	N	2% (w/v)	NH ₄ NO ₃
	P	0,4% (w/v)	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ *H ₂ O
	K	2% (w/v)	K ₂ SO ₄
	Mg	0,12% (w/v)	MgSO ₄ *7 H ₂ O
	Ca	85% (w/v)	CaCO ₃ (Kohlensaurer Kalk)
(fest)			

Tab. 2-13: Tabelle der Düngevarianten der Pflanzen (cv. Ingrid) im Gefäßversuch – Nährstoffmengen

Variante	N		P	K	Mg	CaCO ₃
	N ₁	N ₂				
Kontrolle	0,5 g	0,25 g	0,4 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NK	0,5 g	0,25 g	-	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NPK	0,5 g	0,25 g	0,8 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NPK +	1,0 g	0,5 g	0,8 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g

Angaben in Gramm (g) / M.-Gefäß

Die Inokulation der Pflanzen mit *P. indica* erfolgte wie in Kap. 2.6.1. beschrieben zunächst in kleinen Anzuchttopfen im Gewächshaus. Für dieses Experiment wurden je zwei Pflanzen pro 300 ml Substrat mit 4 g *P. indica*-Inokulum inokuliert.

Die 3-4 Wochen alten Pflanzen wurden nach Kontrolle der Besiedelung ihrer Wurzeln (Kap. 2.7.2 und 2.7.4) in die, mit den definierten Düngungen vorbereiteten, Mitscherlichgefäße (6 l) getopft. Es wurden je sechs Pflanzen pro Mitscherlichgefäß gesetzt und unter Freilandbedingungen angezogen.

Insgesamt wurden pro Variante für die Kultivare Annabell und Braemar sechs Wiederholungen (Mitscherlichgefäße) verwendet. Für das Kultivar Ingrid und die verschiedenen Düngebedingungen wurden je vier Wiederholungen durchgeführt (Tab. 2-14). Zusätzlich wurden zur zwischenzeitlichen Überprüfung der Wurzelbesiedelung mittels Wurzelbohrungen pro Variante ein bis zwei Zusatzgefäße angesetzt.

Tab. 2-14 : Experimenteller Aufbau des Gefäßexperimentes zur Untersuchung des Einflusses der *P. indica*-Besiedelung auf den Ertrag in Gerste

		cv. Braemer	cv. Annabell	cv. Ingrid
Kontrolle	Kontrolle	6 Wdh.	6 Wdh.	4 Wdh.
	NK			4 Wdh.
	NPK			4 Wdh.
	NPK +			4 Wdh.
	Anzahl Töpfe	6	6	16
	Anzahl Pflanzen	36	36	96
	Anzuchttöpfe	18	18	48
P. indica	Kontrolle	6 Wdh.	6 Wdh.	4 Wdh.
	NK			4 Wdh.
	NPK			4 Wdh.
	NPK +			4 Wdh.
	Anzahl Töpfe	6	6	16
	Anzahl Pflanzen	36	36	96
	Anzuchttöpfe	18	18	48

1 Wdh. = 1 Mitscherlichgefäß = 6 Pflanzen

Um Schädlingsbefall während der Anzucht der Pflanzen und somit schädigende Wirkung auf Ertragsparameter unter Freilandbedingungen zu vermeiden, wurden die Pflanzen nach ersten Anzeichen von Befall mit dem Fungizid Opus® Top (250 g/Liter Fenpropimorph and 84 g/Liter Epoxiconazole; BASF, Ludwigshafen) (1,5 Liter/ha) und dem Insektizid Karate® (Syngenta, Basel) (150 ml/ha) behandelt.

2.8.2.2 Bestimmung verschiedener Ertragsparameter

Zur Auswertung des Ertrags der besiedelten bzw. nicht-besiedelten Gerstenpflanzen wurden verschiedene Parameter festgehalten. Nach Abreife der Pflanzen wurde die Anzahl der Ähren pro Gefäß, die Anzahl der Körner pro Ähre, der Kornertrag pro Gefäß, das Tausend-Korn-Gewicht (TKG) sowie der Ernteindex (Verhältnis des Kornertrages zur gesamten trockenen oberirdischen Biomasse) bestimmt.

Nach der Ernte wurde von den Körnern eine Einwaage von 5 g Korn nach einem Trockenvorgang bei 105° C in ihrem Gewicht bestimmt. Die gesamten Körner wurden luftgetrocknet und gewogen. Somit wurde die jeweilige relative Feuchte im Korn bestimmt und für die Gesamtauswertung alle Gewichtsdaten auf eine relative Feuchte von 14% umgerechnet.

Das Stroh wurde gesamt pro Topf bei 65 Grad Celsius getrocknet und die Trockenmasse bestimmt. Der Ernteindex gibt das Verhältnis von Korn- zu Strohertrag bezogen auf die Trockenmasse an.

Zur Ermittlung des Tausend-Korn-Gewichtes (TKG) wurden pro Gefäß viermal hundert Körner gewogen und der Mittelwert auf 1000 Körner hochgerechnet. Das so bestimmte TKG wurde dann auf 86 % Trockenmasse umgerechnet.

Ährenanalysen wurden durch Bestimmung der Anzahl der Körner pro Ähre, Ährenlänge und Anzahl der Ährchen pro Ähre durchgeführt.

2.8.3 Messung der Photosyntheseleistung *P. indica*-besiedelter Gerstepflanzen

Zur Messung des Gaswechsels an Gerstenblättern wurde das Porometer LI-6200 (LI-COR, Lincoln, NE, USA) verwendet.

Die drei Hauptkomponenten dieses Gerätes sind die Küvette, in die das Blatt eingespannt wird, der Infrarot Gasanalysator (LI-6250) und eine Kontrollkonsole. Die Messung in diesem Gerät erfolgt in einem geschlossenen System, der Küvette, welche gegen die Außenluft abgeschlossen ist. In dieser lässt sich die CO₂-Abnahme der Luft messen. Gleichzeitig gilt es dabei die Erhöhung der Luftfeuchtigkeit aufgrund der Transpiration des Blattes zu verhindern. Dies wird bei dem Messgerät dadurch erreicht, dass der transpirierte Wasserdampf in einem Nebenkreislauf des Systems mittels Überleitung über das Trocknungsmittel Magnesiumperchlorat, aus der Luft entfernt wird und somit die Luftfeuchtigkeit in der Küvette konstant gehalten wird. Die nötige Luftmenge, welche dazu über den Nebenkreislauf geleitet werden muss, wird vor der Messung in einer Kalibrierung des Gerätes bestimmt. Bei korrekter Einstellung heben sich die Transpiration des Blattes und der Wasserdampfentzug durch das Trocknungsmittel gerade auf, was eine gute Messung möglich macht.

In der Küvette, in welche das Blatt eingespannt wird, befinden sich zusätzlich Sensoren zur Messung von Blatttemperatur, Lufttemperatur und Luftfeuchte. Ein Ventilator in der Küvette gewährleistet eine gleichmäßige Luftzirkulation. Eine im Infrarot-Gasanalysator angebrachte Pumpe transportiert den Luftstrom aus der Küvette zum CO₂-Analysator zur Bestimmung der Kohlendioxid-Konzentration und wieder zurück in die Küvette.

Das Gerät wurde für die Messungen derart programmiert, dass jeweils eine Abnahme der absoluten CO₂-Konzentration im System um 4 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ einen Messpunkt lieferte. Dies wurde mit einer viermaligen Wiederholung durchgeführt, so dass die Messung nach einer photosynthetisch bedingten Abnahme der CO₂-Konzentration um 16 $\mu\text{mol mol}^{-1}$ beendet war. Die Dauer dieser definierten Abnahme war je nach Alter und Zustand des Blattes unterschiedlich lang.

Die Photosyntheserate wurde von der Gerätesoftware aus der Rate der CO₂-Abnahme über die Zeit, der vor Messbeginn bestimmten Fläche des eingespannten Blattabschnittes und dem absoluten Volumen des Systems (Volumen der Küvette, des Gasanalysators und der Schlauchverbindungen) berechnet (Li-COR, 1986; Technical Reference LI-6200).

Vor Beginn der Messungen wurden vorab nach Vorgaben des Herstellers einige Tests durchgeführt. An jedem Messtag wurde zunächst ein *Leak*-Test durchgeführt, um in einem definierten Zeitraum die Leckrate im System zu ermitteln und diese dann zur Korrektur in das System zu programmieren. Ein sogenannter K-Test untersuchte die Qualität des Trocknungsmittels und lieferte Aufschluss über allgemeine, die Ergebnisse verfälschende Fehler, wie z.B. eine verschmutzte Küvette.

Die Gaswechselfmessungen zur Bestimmung der Photosyntheserate wurden an den jüngsten vollentwickelten Blatt, d.h. dem dritten Blatt drei Wochen alter Gerstenpflanzen, durchgeführt. Die Messung erfolgte direkt am Wuchsort der Pflanzen (im Gewächshaus) unter den dort herrschenden Bedingungen.

Um ein Aussage über den Verlauf der Licht-Sättigungskurven von Blättern *P. indica*-besiedelter als auch nicht-besiedelter Pflanzen zu erhalten und so eine Aussage über mögliche Änderungen der Photosyntheseraten durch Besiedelung mit dem Wurzelendopyhten zu erhalten, wurde die Photosyntheserate in Bezug auf verschiedene Lichtintensitäten gesetzt, um Lichtsättigungskurven zu erstellen.

Es wurden folgende Lichtintensitäten zur Messung verwendet 0, 200, 400, 800, 1200, 1600 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Eingestellt wurden sie durch eine externe regulierbare Halogenleuchte, welche reguliert wurde, bis der Lichtsensor in der Küvette die gewünschte Lichtintensität anzeigte.

Pro Messpunkt wurden Werte von 4-6 Pflanzen bestimmt, wobei beginnend mit den niedrigen zu den hohen Lichtintensitäten gemessen wurde, um Stress der Pflanzen zu vermeiden. Für die Erstellung einer Lichtsättigungskurve wurden die Mittelwerte der Photosyntheseraten gegen die jeweilige Lichtintensität aufgetragen und mittels des Students T-Test Signifikanzen berechnet.

2.8.4 Messung des Chlorophyllgehaltes der Pflanzen

Die Messung des Chlorophyllgehaltes über die Zeit erfolgte mittels eines Chlorophyll-Gehalt-Messgerätes CCM-200 (Opti-Sciences Inc., Tyngsboro, MA, USA) Dieses

Gerät ermöglicht es, den relativen Chlorophyllgehalt zu bestimmen ohne die Pflanzen zu beschädigen.

Chlorophyll hat deutliche optische Absorptionseigenschaften, welche das CCM-200 zur Bestimmung der relativen Chlorophyllkonzentration nutzt. Aufgrund des grünen Erscheinungsbildes eines Blattes gibt es im Blau- und Rotspektralbereich starke Absorptionsbanden, aber nicht im Grün- bzw. Infrarotbereich (Abb. 2-2).

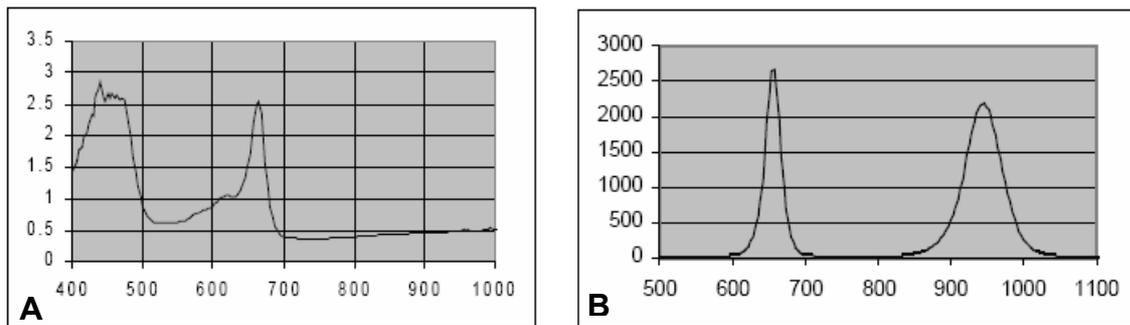


Abb. 2-2: Chlorophyll-Absorption (A) und Spektralbereich des CCM-200-Meßgerätes (B) zur Chlorophyllbestimmung

Chlorophyll absorbiert Licht im Blau und Rot-Spektralbereich (A) aber nicht im Grün- bzw. Infrarotbereich. Zur Bestimmung eines Maßes für den Chlorophyllgehalt der Blätter hat das CCM-200-Meßgerät ein LED-Spektrum (B) im Rot-Spektralbereich zur Messung von Veränderungen in diesem, sowie im Infrarotbereich, dessen Messung zur Einbeziehung physischer Unterschiede, wie z.B. der Gewebedicke dient.

Das CCM-200 nutzt zwei Wellenlängen für die Absorptionsmessung. Eine Wellenlänge fällt in den Bereich der Chlorophyllabsorption während die andere dazu dient, die physischen Unterschiede wie z.B. die Gewebedicke einzubeziehen (Abb. 2-2).

Durch Messung der im Rotbereich absorbierten Energiemenge kann somit auf die Menge des Chlorophylls im Gewebe geschlossen werden. Aus den Messungen beider gemessener Wellenlängen wird der Chlorophyll-Gehalt-Index (*Chlorophyll Content Index* = CCI) errechnet und ausgegeben. Dieser CCI ist proportional zu der Menge an Chlorophyll in der Probe.

Bei den Chlorophyllmessungen wurde darauf geachtet in der gleichen Blattetage, d.h. der jüngsten vollentwickelten Blätter, bzw. des Fahnenblattes, zu messen. Es wurden sieben Messungen pro Gefäß mit je sechs Pflanzen durchgeführt.

2.8.5 Untersuchungen zur Qualitätsbestimmung im Korn

Für die Qualitätsmessungen im Korn wurde eine Bestimmung der Phosphatkonzentration, des Gesamtstickstoffgehaltes und des Stärkegehaltes im Korn durchgeführt. Die Bestimmung des Gesamtstickstoffgehaltes erfolgte nach der Kjeldahl-Methode (Steffens et al., 2004). Nach dieser Methode werden die Stickstoffverbindungen in Ammoniumverbindungen überführt. Aus diesen wird durch Zugabe von Lauge Ammoniak freigesetzt, mit Destillation angetrieben und titriert.

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes in den Körnern wurde nach Zerkleinerung des Materials und Veraschung bei 520° C über Nacht durchgeführt. Die Asche wurde in 5 M HNO₃ gelöst und die Phosphatkonzentration in dem klaren Filtrat der Asche colorimetrisch in Form eines NH₄-Molybdovanado-P Komplexes bei 450 nm bestimmt (Gerike & Kurmies, 1952).

Die Stärkegehaltsbestimmung wurde von LUFA-NRW (Münster) durch eine polarimetrische Methode gemäß Amtsblatt der EG L209/23-27 1999 durchgeführt. Alle Messungen erfolgten in zweifacher Wiederholung.

2.9 Photographische Dokumentationen

Zur photographischen Dokumentation von Pflanzen oder Agarplatten wurde die PowerShot G2-Digitalkamera (Canon, Krefeld) benutzt.

Für Photographien mikroskopischer Präparate wurde eine dem Mikroskop aufgesetzte Digitalkamera (AxioCam color, Zeiss, Jena) verwendet. Als Software für diese Kamera diente das Programm AxioVision 3.0.6. SP2 (Zeiss Vision GmbH, Jena).

2.10 Molekularbiologische Methoden

2.10.1 RNA-Extraktion aus Blättern oder Wurzeln von Pflanzen

Zur Extraktion von Gesamt-RNA wurden jeweils die jüngsten- und zweitjüngsten vollentwickelten Blätter von mehreren 21 Tage alten Pflanzen (3tes- und 2tes-Blatt) (Abb. 2-1) zusammengeführt und in flüssigem Stickstoff gemörsert. Zur RNA-Extraktion aus den Wurzeln zur Untersuchung der Besiedelungsstärke wurden die Wurzeln der Pflanzen zuvor gründlich vom Substrat befreit. Das gemörserte Material wurde bis zur Extraktion bei -80° C gelagert.

Die Extraktion erfolgte auf Basis einer Guanidinthiocyanat/Phenol-Extraktion. Hierzu wurde ca. 300 mg gemörsertes Pflanzenmaterial in 1 ml RNA-Extraktionslösung und 200 µl Chloroform durch Vortexen homogenisiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf einem Horizontalschüttler wurde für 15 min mit 14.000 rpm bei 4° C zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg). Der Überstand wurde mit 850 µl Chloroform versetzt und mit diesem durch Vortexen stark vermischt. Nach einer 2-3 minütigen Inkubation bei RT folgte erneut eine Zentrifugation (15 min, 14.000 rpm, 4° C). Zur Fällung der RNA aus dem Überstand wurde dieser mit gleichem Volumen 5 M LiCl versetzt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Durch Zentrifugation (20 min, 14.000 rpm, 4° C) wurde die RNA aus der Lösung gefällt und das erhaltene RNA-Präzipitat zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das danach getrocknete RNA-Präzipitat wurde in 50 µl Milli-Q Wasser (Millipore, Eschborn) gelöst und zur Abtrennung von Polysacchariden nochmals für 10 min mit 14.000 rpm bei 4° C zentrifugiert. Die dann in Lösung befindliche RNA wurde von dem nun entstandenen Pellet abgenommen und bei -80° C aufbewahrt.

Die RNA-Extraktionen aus geringen Mengen an pflanzlichem Material oder aber die RNA-Aufreinigung für nachfolgende DNA-sensitive Methoden wie *RealTime*-PCR-Experimente und die Sondenherstellung zur Hybridisierung des Oligonukleotid-Mikroarrays *Barley1-GeneChip*[®] (Affymetrix, Santa Clara, USA) wurden mit dem RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die RNA wurde hierzu mit DNase I von unerwünschter DNA gereinigt.

Zur Kontrolle der Qualität der RNA erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA (Kap. 2.10.8) sowie eine elektrophoretische Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarosegel (Kap. 2.10.10.1).

2.10.2 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA dienten je nach Verwendungszweck zwei unterschiedliche Protokolle. Für die Synthese der cDNA für die subtraktiven Banken wurde der cDNA Synthesis Kit von BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) verwendet, während cDNA für RT-PCRs durch direkte reverse Transkription hergestellt wurde.

2.10.2.1 cDNA-Herstellung mittels SMART™ PCR Synthesis-Kit

Die Reagenzien für die cDNA-Synthese stammten von der Firma Clontech, Heidelberg.

2 µg RNA wurden in einem Volumen von 3 µl aufgenommen und mit je 1 µl cDNA-Synthese-(CDS)-Primer (10 µM) und 1 µl SMART II-Primer (10 µM) versetzt. Nach 2 min Inkubation bei 72° C und anschließender Kühlung auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 µl 5x Erststrang-Puffer, 1 µl 20 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTP und 1 µl Superscript II- Polymerase (200 U/µl) (Invitrogen, Karlsruhe). Das Reaktionsgemisch wurde für 1 Stunde bei 42° C inkubiert, in 40 µl TE (pH 8,0) aufgenommen und für 7 min bei 70° C inkubiert. Kurze Kühlung auf Eis stoppte die Reaktion und das Produkt konnte bei -20° C gelagert werden.

2.10.2.2 cDNA-Herstellung mittels Superscript™ II RT(Invitrogen, Karlsruhe)

Für die cDNA-Synthese diente die Superscript™ II (Invitrogen, Karlsruhe). Die cDNA-Synthese erfolgte nach Angaben des Herstellers. Es wurden 2 µg DNase-behandelte RNA in ein Reaktionsvolumen von 20 µl für die Synthesereaktion eingesetzt. Für die Transkriptasereaktion wurde ein Oligo(dT)₁₂₋₁₈ - und ein *random* Hexameroligonukleotid eingesetzt. Nach der Synthese wurde die cDNA einer RNaseH-Behandlung unterworfen. Hierzu wurden der cDNA 2,5 U Ribonuklease H (Fermentas, St. Leon-Rot) in einem Endvolumen von 100 µl zugesetzt. Die Behandlung erfolgte für 30 min bei 37° C im Thermoblock und folgenden 15 min bei 75° C zur Deaktivierung des Enzyms.

2.10.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

2.10.3.1 Standard-PCR

Die PCR wurde, falls nicht anderes angegeben, in 20 µl Volumen mit 1,5 U BioTherm Taq-Polymerase (Genecraft, Münster), je 1:10 mitgelieferten 10x Inkubationspuffers, 2 mM MgCl₂, je 1 µM der entsprechenden Oligonukleotide und 200 µM dNTPs

(Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt. Als Vorlage dienten genomische DNA-, Plasmid-DNA- oder cDNA-Mengen zwischen 100 pg und 100 ng. Die Amplifikationen wurden im Trio ThermoblockTM (Biometra, Göttingen) in Kombination mit dem Trio Heated Lid (Biometra, Göttingen) oder im Thermocycler (Perkin Elmer 2400, Perkin Elmer, Boston) durchgeführt.

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
95° C	94° C	AT	72° C	72° C	4° C
5 min	30 sec	30 sec	1 min	5 min	
20 – 34 x					

Die Anlagerungstemperaturen (AT) der Oligonukleotide in den PCR-Reaktionen richteten sich nach ihrem GC-Gehalt und ihrer Länge und sind für jedes verwendete Oligonukleotid in Tabelle 2-7 angegeben.

2.10.3.2 Semiquantitative RT-PCR

Zur semiquantitativen Überprüfung der Genexpression wurden Ein- bzw. Zwei-Schritt-RT-PCR-Analysen durchgeführt. Für die Ein-Schritt-RT-PCR wurde der *OneStep* RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden) verwendet.

In der semiquantitativen RT-PCR diene synthetisierte cDNA (Kap. 2.10.2) als Vorlage. Die PCR-Reaktion wurde mit spezifischen Oligonukleotiden der zu untersuchenden Gene bei entsprechender Anlagerungstemperatur (AT) durchgeführt (Tab. 2-7). Die Übereinstimmung der RNA (cDNA)-Konzentration in den unterschiedlichen Proben wurde mittels einer zusätzlichen Kontroll-Amplifizierung eines Bereiches der 18S-rDNA der Pflanze überprüft. Die Stärke der Banden dieses Amplifikationsproduktes sollte in der gelelektrophoretischen Auftrennung in allen Proben gleich sein.

2.10.3.3 RealTime-PCR

Quantifizierungen von cDNA mittels *RealTime*-PCR wurden mit dem Mx3000P-Cycler (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Zur Amplifikation wurde der SYBR[®]Green JumpStartTM Taq ReadyMixTM (Sigma, München) verwendet. Dieser Mix beinhaltet zur Minimierung unspezifischer Amplifikation eine *JumpStart Taq* welche durch eine Antikörperbindung ohne Hitzeaktivierung zunächst inaktiv ist. Dem

Mix, welcher bereits den Fluoreszenz Farbstoff SYBR Green, Reaktionspuffer und dNTPs beinhaltet, wurde in 2 x Konzentration geliefert.

Die Reaktion wurde in 0,2 ml „*Thermo-Stripes*“-Reaktionsgefäßen (ABgene, Hamburg) durchgeführt und mit den „*Ultra-Clear-Cap-Stripes*“-Deckeln (ABgene, Hamburg) verschlossen. Sie wurde in 20 µl Volumen mit je 10 µl des 2x SYBR®Green JumpStart™ Taq ReadyMix™ und je 0,7 µl der beiden entsprechenden Oligonukleotide (10 µM) und 5 µl der entsprechenden DNA-Vorlage durchgeführt.

Die Reaktion im Mx3000P-Cycler erfolgte mit 7 min Denaturierung bei 95° C, 40 Amplifizierungszyklen (30 s bei 95° C, 30 s der entspr. Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide (Tab. 2-3), 30 s bei 72° C) und

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6	Schritt 7
95° C	95° C	AT	72° C	95° C	AT	95° C
	(s.Tab 2-3)					
7 min	30 sec	30 sec	30 sec	1 min	30 sec	30 sec
	40 x					
			* (1)		** (2)	

Um die Amplifikationskinetik der PCR zu verfolgen, beinhaltet der Reaktionsmix der *RealTime*-PCR den DNA-Farbstoff *SybrGreen*. Die Fluoreszenz dieses Farbstoffes steigt bei Bindung an die große Furche der doppelsträngigen DNA. Im Verlauf der *RealTime*-PCR steigt mit zunehmender Zyklenzahl die Konzentration doppelsträngiger DNA und proportional dazu die Fluoreszenzintensität der Lösung. Diese wurde von dem Cycler nach jeder Elongationsphase (* (1)) festgehalten. Zusätzlich wurde am Ende der Amplifikation zur Überprüfung der Qualität der PCR eine Schmelzkurve (** (2)) (75° C in 0,2° C Schritten auf 95° C in je 6 s Intervallen) aufgenommen.

Durch die Darstellung der Fluoreszenz jeder Reaktion in Abhängigkeit zur Zyklenzahl wurde der CT (*Threshhold Cycle*) bestimmt. Er ist definiert als die Zyklenzahl, bei welcher die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die Darstellung und Auswertung der Rohdaten erfolgte mittels der mit dem Gerät gelieferten Software Mx3000P v2.00 Build 215 (Stratagene, Heidelberg).

Als Vorlage dienten genomische DNA- oder cDNA-Mengen zwischen 100 pg und 20 ng. Die Reaktionen wurden je DNA-Vorlage in dreifach technischer Wiederholung durchgeführt.

Relative Transkriptmengen einzelne Kandidatengene in den verschiedenen Behandlungen wurden während dieser Arbeit in vier unterschiedlichen Versuchsmaterialien untersucht. Die Daten wurden in einer ANOVA als Blockanalyse verrechnet. Wenn die Behandlung signifikant war ($P < 0,05$), wurde anschließend ein Mittelwertvergleich durchgeführt (*Least significant difference* = Grenzwertdifferenzierung). Die Analysen wurden in SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) durchgeführt.

2.10.3.4 Auswertung der *RealTime*-PCR

Die Bestimmung relativer Expressionsverhältnisse kommt ohne die Verwendung eines Mengen-Standards aus. Um die Menge einer spezifischen RNA oder DNA zu beschreiben, ist die Differenz der CT-Werte von Probe und Kontrolle entscheidend. Zum Vergleich der Genexpression von Probe und Kontrolle wurde die *RealTime*-PCR neben dem Zielgen (*target*) auch für ein Referenzgen (*ref*) durchgeführt. Die Berechnung des relativen Expressionsverhältnisses R aus den PCR-Effizienzen E und Delta-CT erfolgte dann mit der Formel nach (Pfaffl, 2001):

$$R = \frac{(E_{target})^{\Delta CT_{target}(Kontrolle-Probe)}}{(E_{ref})^{\Delta CT_{ref}(Kontrolle-Probe)}}$$

Laut (Livak & Schmittgen, 2001) kann für kurze Genprodukte eine Effizienz von 2 angenommen werden. Damit ergibt sich die Delta-Delta-Formel zur Berechnung der relativen Expressionsverhältnisses:

$$\text{rel. Menge an Transkript} = 2^{-\Delta\Delta CT} = 2^{(\Delta CT_{target} - \Delta CT_{ref})}$$

Für Genprodukte um 160 bp wurde während dieser Arbeit eine Effizienz von 2 angenommen. Bei größeren Genprodukten wurden diese durch Erstellung von Standardkurven überprüft.

Die Darstellung, Analyse und Zusammenstellung der Ergebnisse für die verschiedenen Behandlungen und Vorlagen erfolgte mit der Software Microsoft-Excel® (Microsoft, Redmond, USA).

2.10.4 Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA erfolgte je nach Größe der zu erwartenden Fragmente auf 1-2 %igen Agarosegelen (Roth, Karlsruhe), denen Ethidiumbromid (~1 µg/ml) zugesetzt wurde, bei einer angelegten Spannung von 100 V. Als Laufpuffer diente 1

x TBE (Sambrook J., 1989). Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1:10 Volumen 10x DNA-Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard diente eine 1 kb+ DNA Leiter oder eine 100 bp DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe). Die DNA-Banden konnten dann anhand von UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht und mit einem Duostore Videoprintgerät (INTAS, Göttingen) dokumentiert werden.

2.10.5 Klonierungen und Transformationen

Die PCR-Fragmente wurden nach Angaben des Herstellers in den Plasmidvektor pCR 2.1-TOPO[®] (Invitrogen, Karlsruhe) mit Hilfe des TOPO[™] TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) ligiert. Bei spezifischen PCR-Reaktionen wurde das PCR-Produkt direkt eingesetzt. Waren jedoch PCR-Produkte von unterschiedlichen Größen auf dem Agarosegel zu erkennen, wurde das gewünschte DNA-Fragment der zu erwarteten Größe mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraktion Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt und in die Ligation eingesetzt. Die Transformation erfolgte nach Angaben des Herstellers in chemokompetente *E. coli* TOP10F'-Zellen (Invitrogen, Karlsruhe).

2.10.6 Extraktion und Analyse von Plasmid-DNA

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen erfolgte aus je 3 ml-Übernachtskulturen mittels alkalischer Lyse (Sambrook J., 1989). Die Zellen, wurden in LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum angezogen, durch Zentrifugation (10 min, 6000 rpm) geerntet und zunächst in 200 µl Lösung 1 (Tab. 2-2) bei RT für 5 min inkubiert. Lyse der Zellen und Fällung der Proteine erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung 2 und 200 µl Lösung 3 unter jeweilig 5 minütiger Inkubation auf Eis. Die Plasmid-DNA wurde dann durch Zentrifugation (10 min, 13000 rpm) von den übrigen Bestandteilen der Zellen getrennt und durch Zugabe von 1 Volumen 100%igen Isopropanol (RT) und erneuter Zentrifugation (20 min, 13000 rpm) gefällt, wonach der Überstand verworfen werden konnte. Nach einem folgenden Waschschriff mit 70%igen Ethanol wurde die DNA in 30 µl 10 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und bei -20° C gelagert.

2.10.7 Extraktion und Analyse von genomischer DNA

Die Extraktion genomischer DNA aus den Blätter bzw. Wurzeln der Pflanzen erfolgte mittels des DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden) laut Protokoll des Herstellers.

2.10.8 Photometrische Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration ließ sich durch Absorption bei 260 nm mit einem Spektralphotometer (SmartSpecTMPlus, BIO-RAD, München) messen. Eine Absorption von $A_{260}=1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook J., 1989). Auch die Messung von RNA erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Eine Absorptionsänderung von $A_{260}=1$ entspricht hier einer Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook J., 1989). Als Maß für Verunreinigungen durch Proteine wurde zusätzlich der Koeffizient A_{260}/A_{280} bestimmt. Bei einem Wert von etwa 1,8 bei DNA und 2 bei RNA konnte man von einer ausreichend proteinarmen Lösung ausgehen.

2.10.9 Sequenzierungen

Sequenzierungen wurden durch Amplifikation mit M13-Oligonukleotiden von der Firma MWG (Ebersberg) oder am Institut für Biowissenschaften (Würzburg) durchgeführt.

2.10.10 Homologiensuche der erhaltenen ESTs in verschiedenen Datenbanken

Die erhaltenen EST-Sequenzen wurden mit verschiedenen Datenbanken verglichen. Zum einen wurden die Sequenzen mit der *H. vulgare* EST-Datenbank des TIGR *H. vulgare* Gene Index (*HvGI*) (<http://www.tigr.org/tdb/mtgi/>) analysiert. Dieser Abgleich erfolgte auf Nukleotidebene (BlastN).

Zusätzlich erfolgte eine Homologiesuche in der Nr-Datenbank des NCBI-Servers (National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mittels Abgleich der verschiedenen Leseraster mit den Aminosäuresequenzen der in den Datenbanken enthaltenen Genprodukte (BlastX, (Gish & States, 1993)).

2.10.11 Northern-Blot Analysen

2.10.11.1 Northern-Blot-Herstellung

10 µg RNA wurden in 1,2 %-igen denaturierenden Agarosegelen mit 5 % (v/v) Formaldehyd (37 %) in 1x MOPS-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Vor dem Auftragen der Proben wurde die RNA-Lösung 1:1 (v/v) mit 2x RNA-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 96° C im Thermoheizblock (Dri-Block DB.2A, Techne, Jahnsdorf) denaturiert. Dies diente dazu Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA über Nacht bei RT mittels Brückentransfer (Sambrook J., 1989) in 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,5 auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer, Mannheim) transferiert. Nach dem Transfer wurde die RNA durch UV-Bestahlung (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membran gebunden.

2.10.11.2 Herstellung ³²P-markierter Sonden

Die Synthese der ³²P-markierten Sonden erfolgte durch Einbau des Isotopes mittels Klenow-Enzym. Hierzu wurden die Inserts der Klone mit den entsprechenden Restriktionsenzymen aus ihren Vektoren herausgeschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Die Elution des Inserts aus dem Agarosegel erfolgte nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des MinElute Gel Extraktion-Kit (Qiagen, Hilden). Die Synthese und der Einbau des Isotopes erfolgten in folgendem Ansatz (*HexaLabel* DNA Labeling Kit (Fermentas, St. Leon Rot)):

Reaktionsansatz für ³³P-Sondenherstellung:

100 ng Template (aufgereinigtes Insertfragment)

+ 10 µl Hexanukleotid

5-10 Minuten, 95° C, kurz auf Eis abkühlen

+ 3 µl Mix A (dNTP ohne dCTPs)

+ 5 µl α-³²P-dCTP

+ 1 µl Klenow-Enzym exo⁻ (5 U/µl)

Inkubation für 1,5 h bei 37° C

Nach der Synthese der Sonde wurden nicht-inkorporierte Nukleotide unter Verwendung einer Sephadex-Zentrifugationssäule (MicroSpin G-25, Amersham Biosciences, Freiburg) vom Syntheseprodukt nach Herstellerangaben abgetrennt. Die so gereinigte Sonde wurde dann, bevor sie zur Hybridisierung eingesetzt wurde, 10 min bei 95° C denaturiert.

2.10.11.3 Northern Hybridisierung und Detektion der Hybridisierungssignale

Die Membranen wurden vor der Hybridisierung in 5 ml Rapid-Hyb-Puffer (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 65° C für 2 h im Hybridisierungsofen (Personal Hyb™, Stratagene, Heidelberg) prähybridisiert. Dann wurden 25 µl der denaturierten Sonde zugegeben und die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65° C.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zunächst 10 min mit 2 x SSC, 0,1% SDS (65° C), danach für 15 min in einer Schale im Wasserbad bei 65 ° C in 1 x SSC, 0,1% SDS und nochmals 15 min in 0,2 x SSC, 0,1% SDS gewaschen. Mittels eines Handmonitors wurde die Membran abgelesen. Es wurde solange weiter gewaschen bis kein starker Hintergrund mit dem Handmonitor zu detektieren war. Die Membran wurde dann in Plastikfolie eingeschweißt und es wurde ein Phosphorscreen (Kodak Imaging Screen-K, Bio-Rad, München) exponiert. Das Auslesen der Phosphorscreen-Platte fand in einem Phosphorimager (Molekular Imager® FX, Bio-Rad, München) statt und wurde mit dem Programm Quantity One-4.1.1 (Bio-Rad, München) in einer Auflösung von 100 µm eingelesen.

2.10.12 Herstellung der SSH-Banken

Zur Herstellung der subtraktiven Banken wurde das CLONTECH PCR-select™ cDNA Subtraction System (Clontech, Heidelberg) verwendet. Wegen der geringen Mengen an mRNA, wurde eine cDNA-Synthese mit dem SMART™PCR cDNA Synthese System (Clontech, Heidelberg) (Kap. 2.10.2.1) durchgeführt, das durch einen Amplifikationsschritt die erforderliche Menge cDNA lieferte. Die Produkte der Subtraktion wurden in den pGEM®-Teasy-Vektor (Promega, Mannheim) oder TOPO™ pCR 2.1 (Invitrogen, Karlsruhe) kloniert. Die resultierenden cDNA-Banken wurden in 50% Glyzerin konserviert und die enthaltenen Klone hinsichtlich ihrer differentiellen Expression mittels Reverse-Northern-Hybridisierung (Kap. 2.10.12) untersucht. Darin wurden die Insertionen mit M13-Primern amplifiziert und auf Membranen geblottet. Diese wurden dann mit cDNA-Sonden hybridisiert, die aus den verwendeten Ausgangsmaterialien hergestellt wurden. Klone, die nach der Hybridisierung mit den beiden Sonden eine unterschiedliche Signalintensität zeigten, wurden sequenziert.

2.10.13 Reverse Northern Hybridisierungen

Die zu untersuchenden Genfragmente wurden in Volumen von 50 µl mittels PCR mit den Oligonukleotiden M13-for und M13-rev vervielfältigt. Als Vorlage dienten 50 ng Plasmid-DNA. Eine Erhöhung der Spezifität konnte durch Verringerung der MgCl₂-Konzentration auf 1,25 mM erzielt werden. Die zu analysierenden PCR-Fragmente wurden dann auf 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt. Nach Färbung und Dokumentation der Gele wurden diese 2x 15 min in Denaturierungslösung und 2x 15 min in Neutralisierungslösung inkubiert. Der Transfer auf Hybond N⁺-Nylonmembranen (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) erfolgte über Nacht mittels Brückentransfer (Sambrook J., 1989).

Für den Transfer mittels Dot-Blot, wurden die PCR-Produkte nach Kontrolle auf 1,5%igen Agarosegelen in 10x SSC aufgenommen (4,4 µl/100 µl) und mit Hilfe einer Bio-DotTM-Apparatur (BIO-RAD Laboratories, California) durch Anlegen eines Vakuums mit 100 mbar unter Einsatz der VacuGene Pump-Apparatur (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) auf Nylonmembranen (Pall Biodyne Plus Membran, PALL, Dreieich) aufgebracht.

Nach dem Transfer wurde die DNA durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker 2400, Stratagene, Heidelberg) kovalent an die Membranen gebunden. Zur Prähybridisierung wurden die Membranen 1 h bei 65° C im Hybridisierungssofen (Personal HybTM, Stratagene, Heidelberg) in DIG-Standardhybridisierungspuffer inkubiert.

2.10.13.1 Herstellung DIG-markierter Sonden

Zur Markierung der cDNA wurde Digoxigenin verwendet. Der Einbau von Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim) in die cDNA erfolgte über PCR. Bedingt durch die Methode der SMARTTM-cDNA-Synthese (Kap. 2.9.3) konnte der SMART-PCR-Primer für die Markierung durch PCR verwendet werden. Als Vorlage wurde 1 µl Erststrang-cDNA in die Reaktion eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten im Thermocycler (Biometra, Göttingen) unter folgenden Bedingungen:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4	Schritt 5	Schritt 6
94° C	95° C	65° C	72° C	72° C	4° C
1 min	15 sec	30 sec	1 min	5 min	
24 x					

Es wurden jeweils 20 µl dieser Sonde in 15 ml DIG-Standardhybridisierungspuffer aufgenommen.

2.10.13.2 Hybridisierung der Membranen und Detektion

Die Hybridisierung der Membranen mit den DIG-markierten Proben erfolgte über Nacht. Sie wurde wie die Prähybridisierung bei einer Temperatur von 65° C im Hybridisierungsofen (Personal Hyb™, Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

Der Hybridisierung folgend wurden die Membranen zunächst 2x 5 min bei RT mit 2x Waschlösung und dann 2x 15 min mit 0,1x Waschlösung bei Hybridisierungstemperatur inkubiert. Danach wurden die Membranen in eine Hybridisierungsschale mit DIG-Waschlösung überführt und für 5 min schüttelnd bei RT inkubiert. Um unspezifischen Hybridisierungen vorzubeugen, wurde die Membran danach 30-60 min in DIG-Blockierungslösung inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Anti-DIG-Antikörper gekoppelt an eine alkalischer Phosphatase (Roche, Mannheim) (1:20000 verdünnt in DIG-Blockierungslösung). Dieser Inkubationsschritt erfolgte nicht länger als 30 min. Nach zweimaligen Waschen in DIG-Waschlösung (2x 15 min) wurde der pH mit DIG-Detektionspuffer für 5 min äquilibriert. Das Substrat (CDP-Star, Roche, Mannheim) wurde 1:100 in DIG-Detektionspuffer verdünnt eingesetzt und gleichmäßig auf der Oberfläche der Membranen verteilt. Danach wurden die Membranen mit Plastikfolie abgedeckt und 5 min bei RT inkubiert.

Die Belichtung der Röntgenfilme (FUJI, Tokio, Japan) erfolgte dann je nach Signalstärke mit verschiedenen Expositionszeiten, die Entwicklung des Filmes erfolgte mittels einer Entwicklermaschine (KONICA SRX-101, Konica, Hamburg).

2.10.13.3 Quantifizierung von Signalintensitäten

Die Signalintensitäten der Dot-Blot-Hybridisierungsexperimente wurden mittels Computeranalyse quantifiziert. Die Autoradiographien wurden dazu mit einem Scanner (Nikon scantouch 210, Nikon, Düsseldorf) in den Computer eingelesen und zunächst in Adobe Photoshop™ (Adobe Systems Incorporated, Mountain View, USA) für die weitere Bearbeitung auf das nötige Format gebracht. Mit dem Programm Image Quant (Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) wurden über die Signale des Filmes mit je gleich großem Volumen Pixelintensitäten in definierten Felder bestimmt und mit einem entsprechendem Feld des Hintergrundes abgeglichen. Die Signalstärke wurde so abzüglich der

Hintergrundintensität berechnet. Diese erhaltenen Werte für die jeweiligen Signalstärken wurden dann in Microsoft Excel[®] (Microsoft, Redmond, USA) weiter bearbeitet.

2.10.14 Hybridisierung und Auswertung der GAN-1,5K-cDNA-Makroarrays

Die GAN-1,5K-cDNA-Makroarrays wurden in Kooperation des IPAZ mit dem IPK Gartersleben hergestellt (Schäfer, 2003; Eichmann et al., 2006).

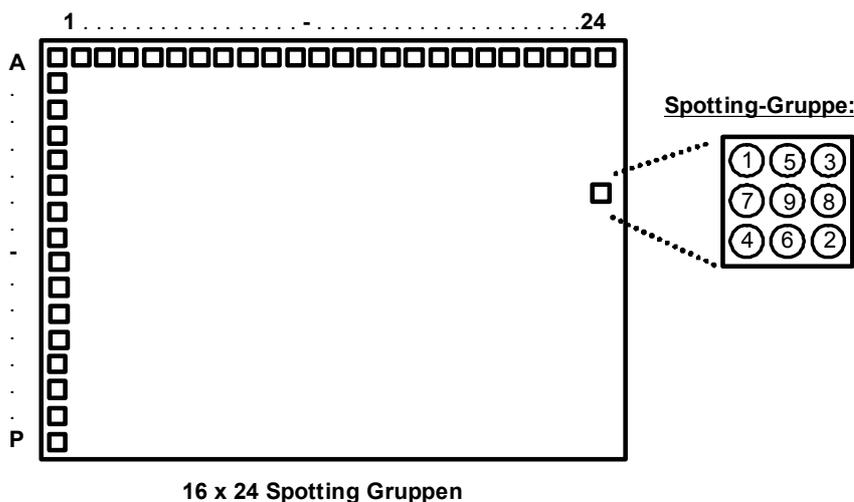


Abb. 2-3: Aufbau des GAN-Makroarrays

Die 1536 auf dem Array vorhandenen cDNA-Fragmente befinden sich mit jeweils einem Replikat in 16 x 24 Spottinggruppen auf der Membran. Jede Spottinggruppe besteht aus 9 Spots, in welchen jeweils Spot 1+2, 3+4, 5+6, 7+8 das gleiche Fragment beeinhalteln. Der mittlere Spot Nr. 9 ist jeweils leer.

Der GAN-cDNA-Makroarray trägt 1536 cDNA-Fragmente in jeweils zwei Replikaten. Auf den Membranen befinden sich somit 3072 cDNA-Fragmente. Die Fragmente sind in so genannten *spotting*-Gruppen auf den Membranen aufgebracht. Eine

Spotting-Gruppe besteht aus 9 Spots im 3x3 Format. Der mittlere Spot blieb jeweils leer (Schäfer, 2003) (Abb. 2-3).

Die Hybridisierungen wurden mit vier unterschiedlich behandelten Materialien durchgeführt (34-f-2004, 34-g-2004, Tab. 6-1). Es wurde das Blatt-Material drei Wochen alter *P. indica*-besiedelter und nicht-besiedelter Pflanzen sowohl ohne als auch nach Inokulation mit dem Pathogen *Blumeria graminis* für die Hybridisierungen verwendet. Die Pflanzen ohne Pathogenbehandlung wurden zur gleichen Zeit wie die infizierten Pflanzen (12 h nach Inokulationszeitpunkt) geerntet und unter den gleichen Bedingungen kultiviert. Es wurden die jüngsten- und zweitjüngsten Blätter der Pflanzen zusammengeführt und für die cDNA-Synthese der Sonden eingesetzt (Kap. 2.6.3). Zur Hybridisierung der Membranen wurden radioaktiv markierte komplexe cDNA-Sonden verwendet.

2.10.14.1 Synthese ³³P-markierter komplexer cDNA-Sonden

Zur Herstellung der Sonden wurden jeweils die jüngsten- und zweitjüngsten Blätter von drei Wochen alten Gerstenpflanzen, welche mit dem Wurzelendopyhten besiedelt oder nicht besiedelt waren, verwendet. Zudem wurde von jedem Versuch zusätzlich ein 12 h-Zeitpunkt nach *Bgh*-Inokulation zur Hybridisierung verwendet.

Zur Herstellung der radioaktiven Sonden wurde das Blattmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff gemörsert. Danach wurde aus ca. 300 mg gemörsertem Material zunächst poly(A)+-RNA mittels oligo(dT)-magnetischer *Beads* (Dyna, Hamburg) gewonnen. Hierzu wurde die gemörserte Probe in 1,5 ml Lysis-Puffer homogenisiert. Nach folgender Zentrifugation (5 min, 14.000 rpm, 4° C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die Zentrifugation wiederholt. Der Überstand wurde dann zur Bindung zu den zuvor zweimal in Lysis-Puffer gewaschenen magnetischen *Beads* gegeben und 5 min bei RT schwenkend inkubiert. Nach magnetischer Trennung der *Beads* vom Überstand wurde dieser verworfen und die *Beads* 3x mit je 500 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dreimaliger Äquilibrierung der *Beads* in je 250 µl RT-Puffer wurde die Erststrangsynthese durchgeführt.

Die Erststrangsynthese erfolgte unter Verwendung der AMV Reversen Transkriptase (Promega, Mannheim).

10 µl	5x AMV RT-Puffer
0,5 µl	100 mM DTT
12,5 µl	2 mM dNTP-Mix
1,5 µl	RNase-Inhibitor (30 U/µl)
3,0 µl	AMV Reverse Transkriptase (10 U/µl)
ad 50 µl	dest. H ₂ O

Dieser Ansatz wurde zu den Dynabeads pipettiert, für eine Stunde bei 42° C inkubiert und dabei alle 10 min vorsichtig durchmischt. Nach magnetischer Trennung wurde der Überstand verworfen und die *Beads* zweimal mit 250 µl 1xRT-Puffer gewaschen. Das Entfernen der mRNA von den *Beads* erfolgte in zwei Schritten mit jeweils 50 µl Elutionspuffer durch Inkubation bei 95° C. Nach jeder Elution wurde der Überstand sofort nach magnetischer Trennung entfernt und die *Beads* zweimal mit dest. H₂O gewaschen. Die Synthese der ³³P-markierten cDNA konnte dann direkt an den *Beads* erfolgen, an welchen der Erststrang nun kovalent gebunden vorlag.

Die zur radioaktiven Markierung verwendete *random* Oligonukleotid-Lösung und der benötigte Puffer wurden dem *Megaprime DNA Labeling Kit* (Amersham Biosciences,

Freiburg) entnommen. Als Polymerase diente das Klenow Enzym (USB, Cleveland, USA).

Der folgende Ansatz wurde dann zu den gewaschenen Dynabeads gegeben:

- 35 µl dest. H₂O
- 5 µl (dN)₆-*random* Oligonukleotid-Lösung
=> 95° C, für 5 min
- 10 µl Labeling Puffer
- 5 µl α-33-P-dCTP (10µCi/µl)
- 1 µl Klenow-Polymerase (10U/µl)

Dieser Ansatz wurde für eine Stunde bei 37° C inkubiert und währenddessen alle 10 min durchmischt. Nach magnetischer Trennung wurden die nichtinkorporierten Nukleotide von den *Beads* getrennt und verworfen und die *Beads* mit 150 µl Elutionspuffer gewaschen. Zur Elution wurden die *Beads* in 150 µl Elutionspuffer für 3 min bei 95° C inkubiert und nach folgender magnetischer Trennung wurde der Überstand sofort in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Diese Elution der markierten Sonde von den *Beads* wurde ein zweites Mal wiederholt. Die resultierenden 300 µl Eluat wurden dann auf AnoporeTM-Säulchen (0,2 µm) (Whatman, Maidstone, UK) gegeben und durch Zentrifugation (10000rpm, 30 sec) aufgereinigt.

Zur Überprüfung der radioaktiven Markierung wurde die Aktivität der Sonde mit dem Szintillationszähler (*Multi-Purpose Scintillation Counter*, Beckmann Coulter, Krefeld) bestimmt. Diese Überprüfung diente zusätzlich dazu, gleiche Aktivitäten der jeweils zu vergleichenden Sonden in den folgenden Hybridisierungen der Membranen einzusetzen.

2.10.14.2 Hybridisierung der GAN-Makroarrays

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurden die Membran mit 6 x SSC angefeuchtet und für zwei Stunden in 15 ml Macroarray-Hybridisierungslösung [5xDenhardt/0,5%SDS/6xSSC/Lachssperm(10mg/l)] im Hybridisierungssofen bei 65° C prähybridisiert.

Zur Hybridisierung der Arrays wurden 10 ml frische Macroarray-Hybridisierungslösung zu den Membranen gegeben und mit 10 µl frisch denaturierter Sonde (10 min, 95° C) versetzt. Die Hybridisierung erfolgte dann über Nacht im Hybridisierungssofen bei 65° C.

Am darauffolgenden Tag wurden die Membranen zunächst für 15 min in 0,2 x Waschlösung bei 65° C und anschließend für 15 min in 0,1 x Waschlösung gewaschen. Die Filter wurden dann auf mit Membran-Lagerungs-Lösung angefeuchtetes Whatmann-Papier gelegt und luftblasenfrei in Folie eingeschlagen. Die Exposition der Filter erfolgte dann für drei Tage auf Fuji BAS-MS 2025 Imager Screens (BIO-RAD, München), welche dann mit dem Phosphoimager (*Molecular Imager FX phosphoimager*, BIO-RAD, München) ausgelesen wurden.

2.10.14.3 Auswertung und Datenanalyse der GAN-Makroarrays

Durch die vier verschiedenen Materialien zur Hybridisierung (Kap. 2.11.31), war es möglich fünf verschiedene Vergleiche der Hybridisierungssignale untereinander durchzuführen (Abb. 2-4).

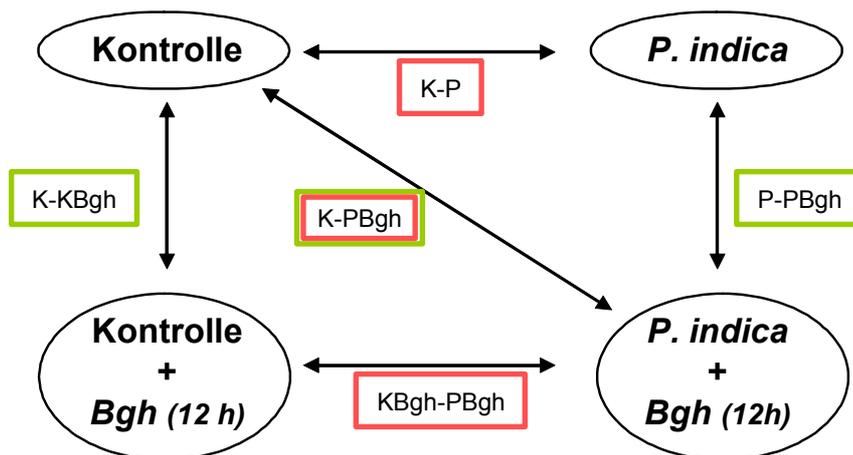


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der verwendeten Materialien für die Array-Hybridisierungen und mögliche Vergleiche der Regulationen in diesem System

Dargestellt sind in ovaler Markierung die vier verschiedenen Materialien, welche zur Hybridisierung der Arrays verwendet wurden. Es handelt sich um jeweils ein Gemisch aus den jüngsten und zweitjüngsten Blättern drei Wochen alter Gerstepflanzen mit (P) oder ohne (K) Besiedlung durch *P. indica* in den Wurzeln. Zusätzlich wurden ein Teil der Pflanzen mit dem Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) inokuliert und das Material dieser Interaktion (12h nach Inokulierung) zur Hybridisierung verwendet. In dem Schema dargestellt sind die möglichen Vergleiche (Pfeile) mit ihrer jeweiligen Benennung. Die ausschlaggebenden Faktoren der Regulationen in den jeweiligen Vergleichen sind farblich hervorgehoben. Bei den Vergleichen im roten Kasten handelt es sich um eine erwartete Regulation durch den Wurzelendophyten *P. indica*, während ein grüner Kasten *Bgh*-Regulationen hervorhebt.

Die Auswertung der Signalintensitäten auf den Arrays erfolgte mit dem Programm Array Vision 8.0 (Imaging Research Inc., St. Catharines, Kanada). Das Programm bestimmt die Signalintensitäten der einzelnen Spots und bestimmte den lokalen Hintergrund um die jeweiligen *Spotting*-Gruppen. Zusätzliches wies das Programm

anhand einer *Spotting*-Liste den einzelnen Signalen auf den Membranen die Klonbezeichnung zu.

Die Normalisierung und die Analyse der Rohdaten in den einzelnen Vergleichen erfolgte mit einem von Lothar Altschmied (IPK, Gatersleben) zur Verfügung gestellten Makro für das Programm R (<http://www.r-project.org>). Dieses Makro normalisierte die Signalstärken über den Logarithmus des Median der Signalstärken der verschiedenen Membranen und filterte die Werte nach den von dem Benutzer gewählten Bedingungen. Für die in dieser Arbeit analysierten Makroarrays wurden folgende Bedingungen gewählt:

- Signalstärke größer als 5x über dem lokalen Hintergrund
- Signalstärken der beiden Spot-Replikate dürfen sich nicht mehr als 1,5 fach voneinander unterscheiden
- Signalintensitäten müssen sich in den jeweiligen Vergleichen mehr als 2,5-fach voneinander unterscheiden.

Die Anhand dieses Programms erhaltenen Daten wurden mittels des Programms Excel (Microsoft, Redmond, USA) weiter analysiert. Der Grad der Induktion eines Genes wurde ermittelt, indem die Signalstärke eines cDNA-Fragments nach Hybridisierung auf der Membran der behandelten Probe durch die Signalstärke der dazugehörigen Vergleichsmembran dividiert wurde. Durch den dazugehörigen Kehrwert konnte der Wert für die Repression der Gene in dem jeweiligen Vergleich ermittelt werden.

Für die Kontrolle und die *P. indica*-Hybridisierung wurde neben den zwei biologischen Wiederholungen von einem der Versuche (34g-2004) eine technische Wiederholung durchgeführt und zusätzlich in die Auswertungen einbezogen. Hierfür wurde jeweils dieselbe Sonde auf zwei neuen Membranen angewendet. Pro Prüfglied wurde dadurch eine unterschiedliche Menge an Membranen beprobt, was unterschiedliche Anzahlen an möglichen Einzelvergleichen der Membranen untereinander mit sich brachte. Aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an Membranen wurden nur die Gene als differentiell reguliert angesehen, welche die Kriterien innerhalb eines Vergleiches in den beiden biologischen Wiederholungen erfüllten. Zusätzlich mussten diese Gene in die gleiche Richtung reguliert sein.

2.10.15 Hybridisierung und Auswertung des 22K *Barley1* GeneChip[®]

Für die Hybridisierung des 22K *Barley1* GeneChip[®] (Affymetrix, Santa Clara, USA) (Close et al., 2004) wurde cRNA der vier verschiedenen Behandlungen (Kap. 2.10.13, Abb. 2-4) aus drei biologischen Experimenten (34f-2004, 34g-2004, 34j-2004, Tab. 6-1) markiert und jeweils ein Array damit hybridisiert. Je Behandlung gingen also drei unabhängige biologische Wiederholungen in die Auswertung ein.

2.10.15.1 Synthese der Sonden und Hybridisierung des 22K *Barley1* GeneChip[®]

Für die Herstellung der Sonden wurde Gesamt-RNA zunächst mit dem RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und nach Protokoll mit DNase I von unerwünschter DNA gereinigt. Zur Kontrolle der Qualität der RNA erfolgte eine photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA (Kap. 2.10.8) sowie eine elektrophoretische Auftrennung der RNA im denaturierenden Agarosegel (Kap. 2.10.10.1). Nach der cDNA-Synthese wurde aus dieser Biotin-markierte komplementäre RNA (cRNA) hergestellt, diese aufgereinigt, fragmentiert und für die Hybridisierung der 22K *Barley1* GeneChip[®]-Arrays verwendet. Die Durchführung der Sondenherstellung, die Hybridisierung der Arrays und das Einlesen der Signale in den Computer erfolgte nach Angaben des Herstellers (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) im Affymetrix *Corelab* an der Ludwig-Maximilians-Universität München (Abteilung Biologie, AG Soll).

2.10.15.2 Auswertung und Datenanalyse des 22K *Barley1* GeneChip[®]

Die Datenanalyse des 22K *Barley1*-GeneChip[®]-Mikroarrays erfolgte mit der GeneChip[®] Operating Software (GCOS, Affymetrix, Santa Clara, USA). Mittels dieser Software wurde im ersten Schritt der Auswertung eine Normalisierung der Signalintensitäten aufgrund der Gesamtsignalintensitäten für jeden Array vorgenommen und danach über einen *Scaling*-Faktor auf eine Gesamtintensität angeglichen. Erst nach diesen zwei Schritten ist es möglich die Signale der 12 beprobten Arrays miteinander mittels verschiedener Signifikanzanalysen zu analysieren und die verschiedenen Genregulationen zu untersuchen (Abb. 2-4).

Jede einzelne Sequenz auf diesem Array wird durch ein Oligonukleotidsatz (*ProbeSet*) repräsentiert, welches aus elf Paaren (*ProbePair*) von 25-mer Oligonukleotiden besteht. Jedes Paar besteht wiederum aus einer *Match*- und einer

Mismatch-Sequenz, welche sich nur in einer Base an Position 13 des 25-mers unterscheidet. Dieser spezielle Aufbau des Arrays und die große Anzahl an Signalstärken machen Signifikanz-Analysen möglich. Eine Auswertung über mehrere statistische Algorithmen, um eine Aussage über die Signifikanz und Klarheit der Aussagen treffen zu können, wurde mit Hilfe der *GeneChip*[®] Operating Software (GCOS, Affymetrix, Santa Clara, USA) durchgeführt. Diese Auswertungssoftware bedient sich dreier Algorithmen um die Regulationsaussagen statistisch abzusichern. Dem *Detection-Call*, dem *Change-Call* und dem *Fold-Change*. Der *Detection-Call* trifft eine Aussage über die Spezifität der Sequenz oder aber die Anwesenheit der Transkripte in den Sonden. Er lautet entweder: anwesend (P), schwach (M) oder abwesend (A). Der *Change-Call* trifft eine statistische Aussage über die Verhältnisse der jeweiligen Signalintensitäten auf den Arrays der verschiedenen Behandlungen und gibt eine Signifikanz über die *ProbePairs* eines jeden *ProbeSets* an. Es gibt fünf mögliche *Change-Calls*: Induziert (I), schwach Induziert (MI), kein Unterschied (NC), schwach Reprimiert (MD) und Reprimiert (D). Der *Change-Call* beschreibt somit ein qualitatives Maß bezüglich Induktion oder Repression. Der letzte Signifikanz-Algorithmus dient zur Berechnung der Stärke der Änderungen der Transkriptmenge und resultiert letztendlich in der Rubrik *Fold Change* (FC).

Da in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Versuchsansätzen je Vergleich und Behandlung jeweils drei unabhängige biologische Replikate in die Auswertungen eingebracht wurden war es möglich, neun paarweise Einzelvergleiche durchzuführen (Kap. 3.4.3.2.3., Abb. 3-32). Die Darstellung, Analyse und Zusammenstellung der Ergebnisse für die verschiedenen Behandlungen und die Vergleiche der Expressionsmuster unter verschiedenen Gesichtspunkten erfolgte mittels Microsoft-Excel[®] (Microsoft, Redmond, USA).

Informationen bezüglich des Array-Aufbaus, Sequenzdaten der Oligonukleotidsätze (*ProbeSets*) und Annotationsinformationen der *Affymetrix-GeneChips*[®] sind im NetAffx[™] Analysis Center zu finden (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>). Diese Sequenzinformationen der *ProbeSets* wurden im Folgenden dazu verwendet, spezifische Oligonukleotide zu entwerfen, um die jeweilige Genexpression in quantitativen *RealTime*-PCR-Analysen (Kap. 2.10.3.3) näher zu untersuchen. Komplette Datensätze verschiedener Experimente von Mikroarrays sind öffentlich in einer Datenbank (BarleyBase, <http://barleybase.org/>) zugänglich, und können somit Expressionsvergleichen in unterschiedlichen experimentellen Systemen dienen.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der Besiedelung von *Hordeum vulgare* mit dem pilzlichen Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf Blätter und Spross untersucht.

Der Ergebnisteil gliedert sich in fünf Kapitel. Im ersten Teil wird die Besiedelung der Wurzeln näher untersucht. Im zweiten Teil werden die Auswirkungen auf das Wachstum, die Entwicklung und den Ertrag charakterisiert. Im dritten Kapitel steht der Einfluss des Pilzes auf die Interaktion der Pflanze mit dem Blattpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* im Vordergrund. Das vierte Kapitel beschäftigt sich mit der Identifizierung von Genen, die in den Blättern durch die Wurzelbesiedelung mit *P. indica* reguliert sind. Mit verschiedenen Methoden wurde versucht, Gene, die in den Blättern differentiell exprimiert werden, zu finden, um so einen Einblick in die Resistenzmechanismen oder die Signaltransduktion von der Wurzel zu den Blättern zu bekommen. Das letzte Kapitel schließlich beleuchtet den Einfluss des Wurzelendophyten auf Chlorophyllmenge und Photosyntheserate.

3.1 Charakterisierung und Quantifizierung der Wurzelbesiedelung von *Hordeum vulgare* durch *Piriformospora indica*

Die Besiedelung der Wurzeln durch *P. indica* wurde bereits an einer ganzen Reihe von Pflanzen verschiedener phylogenetischer Gruppen festgestellt (z.B. (Varma et al., 1999; Peskan-Berghöfer et al., 2004). Durch Inokulierung von Keimlingen mit Myzel und Sporen aus Flüssigkulturen zu Beginn der Kultivierung der Pflanzen im Gewächshaus konnte auch in *H. vulgare* eine Besiedelung durch den Wurzelendophyten beobachtet werden. Durch die Pilzanfärbung in den Wurzeln mittels des Farbstoffes Säurefuchsin zeigten sich deutlich pilzliche Strukturen, d.h. Hyphen und Chlamydosporen (Abb. 3-1). Während sich die Chlamydosporen schon sehr einfach mittels Durchlichtmikroskopie erkennen lassen, handelt es sich bei den Hyphen um sehr dünne Strukturen, die hier nicht zu erkennen sind. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff ermöglichte es allerdings, mittels Fluoreszenzanregung die Hyphen in den Wurzelzellen sichtbar zu machen. So konnten die Hyphen des Wurzelendophyten, sowohl inter- als auch intrazellulär, festgestellt werden. Wie auch in den bereits beschriebenen anderen besiedelten Pflanzenarten kommt es in *H.*

vulgare zu einer Besiedelung der Wurzeln, welche sich auf die Rhizodermis und den äußeren Kortex der Wurzeln beschränkt (Abb. 3-1).

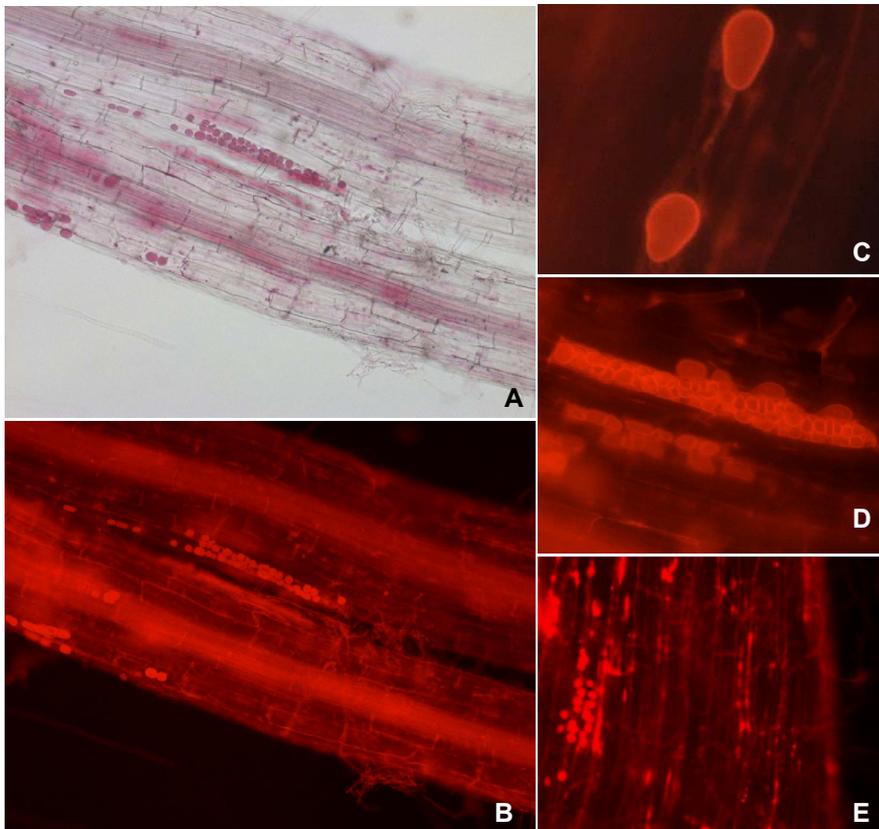


Abb. 3-1: Wurzeln von *Hordeum vulgare* 21 Tage nach Inokulation mit dem Wurzelendophyten *Piriformospora indica*.

Dargestellt sind mikroskopische Aufnahmen von besiedelten Gerstenwurzeln im Durchlicht (A) bzw. Auflichtfluoreszenz (B-E). Zu erkennen sind die mit Säurefuchsin angefärbten intrazellulären Chlamydosporen des Pilzes. Der Pilz trägt seinen Namen aufgrund der birnenförmigen Gestalt der Chlamydosporen (C). Die Zellen besiedelter Pflanzen können sehr dicht mit Chlamydosporen gefüllt sein. Durch die Fluoreszenz der Säurefuchsinfärbung lassen sich die dünnen Hyphengeflechte des Pilzes erkennen (B, E).

Die sehr dünnen Pilzhyphen und die feinen Wurzeln der jungen Gerstenpflanzen machten eine mikroskopische Quantifizierung des Pilzes schwierig. Von jedem Experimentansatz im Rahmen dieser Arbeit wurden von zwei beziehungsweise drei Wochen alten Pflanzen Wurzeln aus verschiedenen Töpfen angefärbt und der Grad der Besiedelung bestimmt (Tab. 6-1). Durch die mikroskopische Analyse war es allerdings nur möglich, eine Aussage über die Menge an Chlamydosporen und den ungefähren Eindruck des Besiedelungsgrades der Wurzeln zu treffen, da die Quantifizierung des Grades der Hyphenbesiedelung nur ungefähr abzuschätzen war. Da die Vermutung nahe liegt, dass Unterschiede in der Besiedelungsstärke auch unterschiedliche Effekte auf die Pflanzen und vor allem auf die in dieser Arbeit

untersuchten systemischen Effekte wie Resistenz und differentielle Genexpression in den Blättern haben könnten, wurde eine molekulare Methode der Quantifizierung des Pilzes in den Wurzeln vorgenommen. Hierzu wurde mittels *RealTime*-PCR ein relatives Verhältnis von den pilzlichen Nukleinsäuren zu den pflanzlichen Nukleinsäuren in den Wurzeln ermittelt. Für diese relative Quantifizierung dienten das Gen *PiTef1* (AJ249912) (Bütehorn et al., 2000) des Translationselongationsfaktors EF1 α des Pilzes sowie das Gen des Ubiquitins *Mub1* (M60175) der Pflanze. Da neben der einfachen Anwesenheit des Pilzes wahrscheinlich auch dessen Aktivität einen wichtigen Einfluss auf die Pflanze haben könnte, wurde diese relative Quantifizierung nicht nur mit genomischer DNA, sondern auch mit cDNA durchgeführt (Abb. 3-2). Mittels dieser Methode wurden die Wurzelproben der vier Hauptversuche dieser Arbeit 34f-, 34g-, 34j- und 34k-2004 (siehe Anhang, Tab. 6-1) untersucht, deren Material später für die molekularen Untersuchungen (Kap. 3.4) verwendet wurde. Die Wurzeln der drei Wochen alten Pflanzen dieser vier Versuche hatten im mikroskopischen Bild annähernd gleiche Besiedelungsdichte.

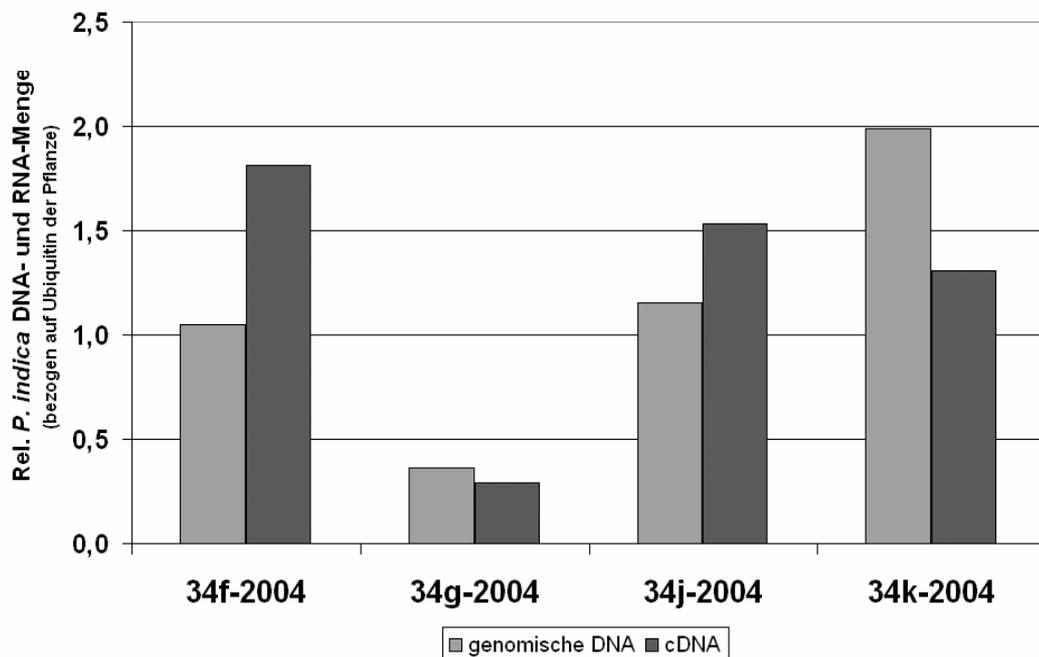


Abb. 3-2: Relative Mengen an Nukleinsäuren von *P. indica* zu pflanzlichen Nukleinsäuren

Dargestellt sind die relativen Mengen des Gens *PiTef1* (AJ249912) von *P. indica* bezogen auf die Menge des pflanzlichen Ubiquitin-Gens *Mub1* (M60175). Diese relative Quantifizierung wurde mittels quantitativer *RealTime* PCR durchgeführt, zum einen auf Basis von genomischer DNA, zum anderen auf Basis von cDNA aus den Wurzeln der Pflanzen. Zur Extraktion der Nukleinsäuren wurde ein Gemisch aus Wurzeln von drei Wochen alten *P. indica* besiedelten Pflanzen aus vier verschiedenen Versuchen eingesetzt.

Betrachtet man die relativen Mengen von *P. indica* anhand der auf genomische DNA beruhenden Quantifizierung, so erkennt man in den Versuchen 34j-2004 und 34f-2004 etwa identische Werte, während im Versuch 34g-2004 die Menge zum Zeitpunkt drei Wochen nach Infektion geringer und im Versuch 34k-2004 doppelt so hoch ist. Zu erkennen waren außerdem unterschiedliche Verhältnisse von cDNA zu genomischer DNA. Während in den Versuchen 34f- und 34j-2004 die relative Menge von *P. indica* auf Basis der cDNA größer war als auf der genomischen DNA, zeigte sich in Versuch 34g-2004 und in Versuch 34k-2004 zu den jeweils untersuchten Zeitpunkten ein gegensätzliches Bild (Abb. 3-2). Zusätzlich ließen sich im Laufe der Zeit unterschiedliche Besiedelungsstärken erkennen.

3.2 Charakterisierungen des Einflusses von *P. indica* auf *H. vulgare*

Die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* zeigt unterschiedliche Auswirkungen auf die Pflanzen, von denen der Einfluss auf das Wachstum die deutlichste und am häufigsten beschriebene ist (Sahay & Varma, 1999; Varma et al., 1999; Varma et al., 2000a; Peskan-Berghöfer et al., 2004; Kaldorf et al., 2005). Das folgende Kapitel dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Charakterisierung des Einflusses der Besiedelung der Wurzeln von *H. vulgare* auf das Wachstum und den Ertrag der Pflanzen.

3.2.1 Einfluss auf Wachstumsförderung unter Gewächshausbedingungen

H. vulgare Pflanzen wurden mit *P. indica* inokuliert und parallel zu den entsprechenden Kontrollen im Gewächshaus angezogen. Durch die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* zeigt sich ein Effekt auf das Wachstum der gesamten Pflanze (Abb. 3-3, Abb. 3-4). Die besiedelten Pflanzen sind insgesamt größer und zeigen einen kräftigeren Spross, breitere Blattspreiten, sowie ein stärkeres Wurzelwachstum (Abb. 3-3).



Abb. 3-3: *H. vulgare* 21 Tage nach Besiedelung mit *P. indica*
Besiedelte Gerstepflanzen jeweils rechts im Bild zeigen gegenüber den Kontrollen deutliche Unterschiede in Sprosslänge (A) und -dicke (B), sowie in Blattbreite (jüngstes Blatt) (C) und Wurzelmasse (D).

Zur genaueren Analyse wurden die Pflanzenlängen und -gewichte ermittelt. Es zeigten sich sowohl signifikant höhere Spross-, als auch Wurzelgewichte besiedelter Pflanzen (Abb. 3-4). Auch eine signifikante Zunahme in den Gewichten der jüngsten und zweitjüngsten Blätter der drei Wochen alten Pflanzen im Gewächshaus konnte festgestellt werden. Zu den oftmals deutlich sichtbaren Unterschieden in der Größe der Pflanzen zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Pflanzengewichte (Abb. 3-4). Gleiche Tendenzen ergaben sich auch für die Sprossgewichte und die Sprosslängen. Aufgrund der geringen Anzahl der Versuche, die in diese Untersuchungen eingingen, waren diese allerdings nicht signifikant.

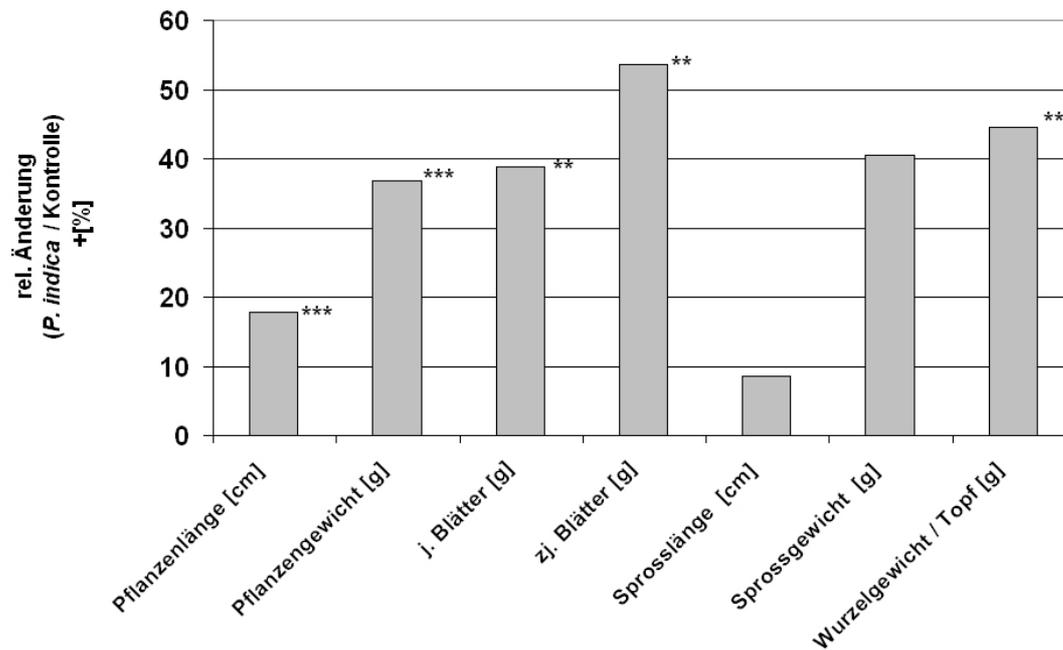


Abb. 3-4: Einfluss der Wurzelbesiedelung mit *P. indica* auf das Wachstum von *H. vulgare*

H. vulgare (cv. Ingrid) wurde mit *P. indica* inokuliert und nach 21 Tagen Wachstum im Gewächshaus geerntet. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der verschiedenen Messparameter. Pro Versuch gingen jeweils vier Töpfe mit je drei Pflanzen in die Auswertungen ein. Pflanzlängen, -gewicht und Wurzelgewicht gingen aus 16 Versuchen hervor. Gewichte der jüngsten (j.) und zweitjüngsten (zj.) Blätter wurden pro Topf in elf Versuchen bestimmt. Sprosslänge und -gewicht beziehen sich auf drei Versuche. Signifikante Unterschiede zwischen *P. indica* besiedelten Pflanzen und Kontrollen über die Versuche sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

3.2.2 Einfluss auf Wachstumsförderung im Gefäßversuch unter Freilandbedingungen

Zur Untersuchung, ob sich neben dem wachstumsfördernden Effekt auch ein Einfluss auf die Entwicklung und den Kornertrag in *H. vulgare* beobachten lässt, wurde ein Gefäßexperiment unter Freilandbedingungen durchgeführt. In folgendem Kapitel soll zunächst der Einfluss auf das Wachstum unter den gewählten Bedingungen näher charakterisiert werden.

Es wurden drei verschiedene Sommergersten-Kultivare verwendet und zudem ein Kultivar (cv. Ingrid) unter verschiedenen Düngevarianten in das Experiment einbezogen. Das Kultivar Ingrid wurde für diese Nährstoffversuche gewählt, da mit diesem die meisten Vorversuche bezüglich der Auswirkungen des Wurzelendophyten auf die Pflanzen im Gewächshaus und Labor durchgeführt worden waren. Wegen der großen Grundanfälligkeit gegen Mehltau fand cv. Ingrid sowohl in cytologischen als auch molekularen Resistenzuntersuchungen bereits

vielfach Verwendung. Für das Ertragsexperiment wurden neben diesem etwas älteren Kultivar zusätzlich zwei Kultivare der aktuellen Sortenliste verwendet, cv. Annabell und cv. Braemar. Die Wahl der Düngevarianten basierte auf der Überlegung, dass die Besiedelung der Pflanze mit *P. indica* deren Nährstoffaufnahme verbessern könnte und dass sich dies besonders unter Mangelbedingungen zeigen würde. Um eine Aussage über eine mögliche Wirkungsweise von *P. indica* zu bekommen wurde daher die Phosphat- und Stickstoffdüngung variiert. Neben einer Grunddüngung wurden eine phosphatlimitierte Variante (NK), eine Variante mit doppelt Phosphat (NPK), und eine Volldüngevariante sowohl mit doppelter Phosphat- als auch doppelter Stickstoffgabe (NPK+) untersucht (Abb. 3-5).



B

Variante	N		P	K	Mg	CaCO ₃
	N ₁	N ₂				
GD	0,5 g	0,25 g	0,4 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NK	0,5 g	0,25 g	-	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NPK	0,5 g	0,25 g	0,8 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g
NPK +	1,0 g	0,5 g	0,8 g	1,6 g	0,2 g	1,5 g
Angaben in Gramm (g) / M.-Gefäß						

ohne P

2x fach P

2x fach N

2x fach P

2x fach N

Abb. 3-5: Freiland-Gefäßversuch zur Langzeituntersuchung *P. indica* besiedelter Gerstepflanzen

Drei verschiedene Sommergerstenkultivare, Annabell, Braemar und Ingrid wurden mit dem Wurzelendophyten *P. indica* inokuliert und nach vier Wochen im Gewächshaus unter Freilandbedingungen in 6 l Mitscherlich-Gefäßen (A) unter definierter Grunddüngung (GD) (B) bis zur Endreife herangezogen. Für das Kultivar Ingrid wurden zusätzlich verschiedene Düngevarianten in die Untersuchungen mit einbezogen. Variiert wurde die Stickstoff- als auch Phosphatkonzentration des Bodens (B). Für cv. Annabell und cv. Braemar wurden je sechs Wiederholungen (Wdh.), d.h. sechs Mitscherlichgefäße mit je sechs Pflanzen, herangezogen. Die Untersuchung des Einflusses der Besiedelung unter verschiedenen Düngungen in cv. Ingrid wurde in je vier Wiederholungen durchgeführt.

Die Pflanzen für diesen Versuch wurden zunächst mit *P. indica* inokuliert und vier Wochen im Gewächshaus vorgezogen. Nachdem die Besiedelung durch den

Wurzelendophyten mikroskopisch nachgewiesen wurden die Pflanzen in Mitscherlichgefäße mit definierten Düngungen (Abb. 3-5 B) umgesetzt und unter Freilandbedingungen bis zur Endreife herangezogen. Zur Beobachtung der Auswirkungen der Besiedelung wurden während der Wachstumsperiode zu verschiedenen Zeitpunkten die Sprosslängen der Pflanzen vermessen (Abb. 3-6).

In allen Kultivaren sowie in den unterschiedlichen Düngevarianten des Kultivares Ingrid zeigten stets die Pflanzen mit dem Wurzelendophyten das stärkere Wachstum. Das Maß der Sprosslängenunterschiede zeigte sich als variabel, weshalb diese nicht immer signifikant waren. Der Größenunterschied über die Zeit blieb aber in etwa konstant, was in den Graphen durch eine Parallelverschiebung der Werte deutlich wird. Während des Versuches konnten folgende Beobachtungen gemacht werden:

Während das Kultivar Ingrid zum Pflanzzeitpunkt in die Freilandgefäße, also nach drei Wochen den stärksten Wachstumsunterschied zeigte, kam es nach einiger Zeit zu einer Abnahme dieses Größenunterschiedes. Zum Zeitpunkt der ersten Messung der Sprosslängen in den Freilandgefäßen (8 WAI) zeigten sich größere und stark signifikante Sprosslängenunterschiede in den Kultivaren Annabell und Braemar. Besonders in dem Kultivar Annabell konnte zu diesem Zeitpunkt der größte Unterschied in der Wuchshöhe von besiedelten zu nicht besiedelten Pflanzen beobachtet werden.

Nach 7 Wochen wurden mittels Bodenbohrungen aus für diesen Zweck bepflanzten Zusatzgefäßen Wurzeln entnommen und mikroskopisch die Besiedelung mit *P. indica* getestet. Anhand deutlicher Chlamydosporen in den Wurzeln zeigte sich zu diesem Zeitpunkt in den Proben des Kultivares Annabell die stärkste Besiedelung. In den Kultivaren Braemar und Ingrid konnten zu diesem Zeitpunkt Hyphen, jedoch keine Chlamydosporen festgestellt werden.

Im Vergleich der Düngevarianten des Kultivares Ingrid (Abb. 3-6 B) zeigte sich in der NPK+-Variante zu allen drei Messzeitpunkten der größte und signifikanteste Unterschied in der Wuchshöhe. Selbst in dieser Volldüngevariante und einer vollen Stickstoffdüngung kam es zu einer starken Beeinflussung des Wachstums der Pflanzen durch den Wurzelendophyten.

Ergebnisse

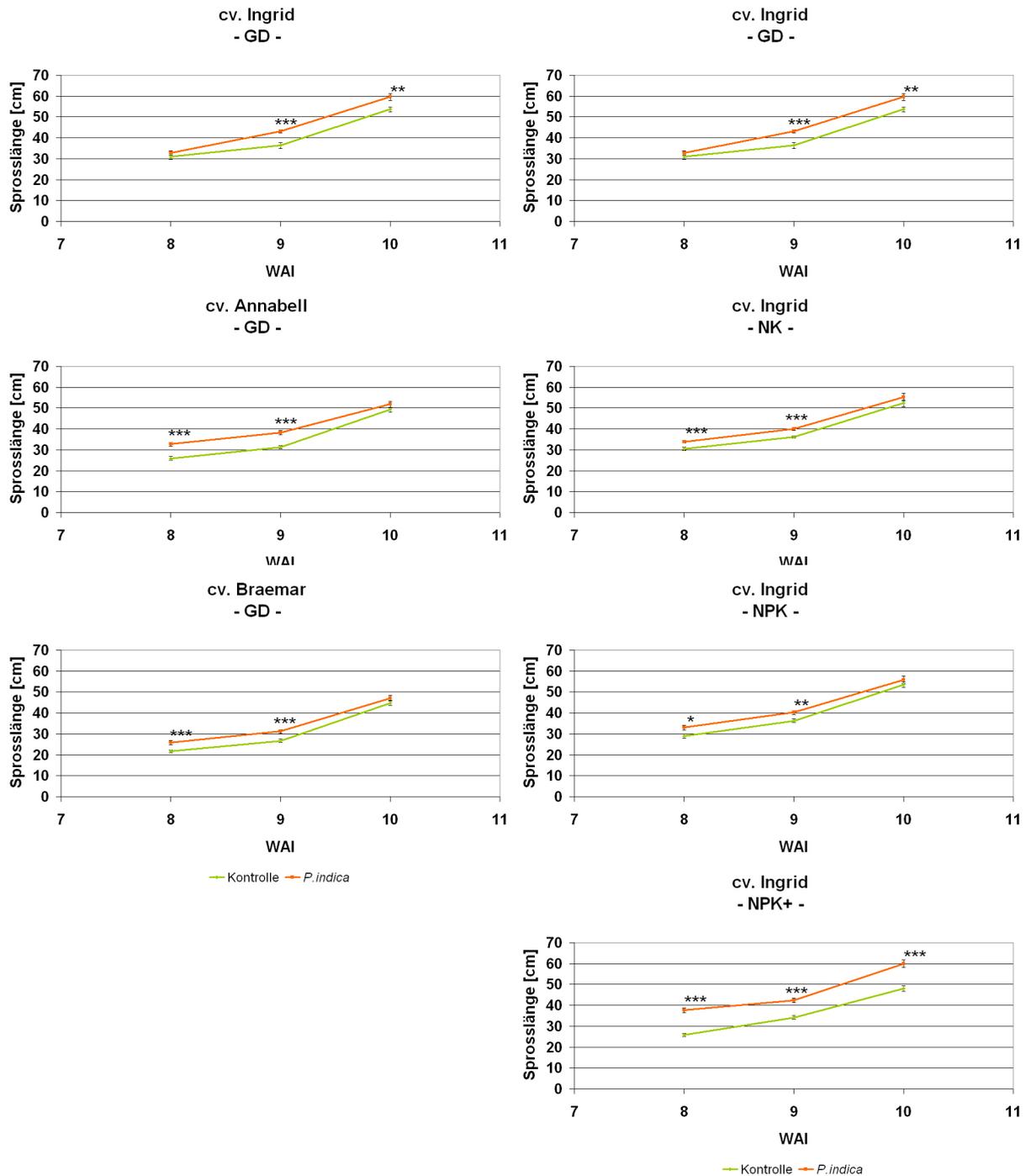


Abb. 3-6: Sprosswachstum in verschiedenen Kultivaren und Düngevarianten *P. indica*-besiedelter- und nicht besiedelter Pflanzen.

Zu drei verschiedenen Zeitpunkten wurden die Sprosslängen der nicht inokulierten Kontrollpflanzen und der mit dem Wurzelendophyten *P. indica*-besiedelten Gerstenpflanzen bestimmt. Es wurden zu jedem Zeitpunkt sechs Pflanzen pro Wiederholung in ihren Sprosslängen vermessen. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler der Sprosslängen gemessen bis zum letzten Blatt, bzw. Fahnenblatt, von vier Wiederholungen in cv. Ingrid (24 Pflanzen) bzw. von sechs Wdh. (36 Pflanzen) in cv. Annabell und cv. Braemar. Links (A) dargestellt sind die Wachstumsmessungen der Kultivare in den Grunddüngungen (GD) untereinander, rechts im Bild (B) die Messungen des Kultivars Ingrid in den verschiedenen Düngevarianten (Abb. 3-5 B). Signifikante Unterschiede zwischen allen mit *P. indica* besiedelten und den nicht-besiedelten Pflanzen (Kontrolle) sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

Während der Wachstumsphase wurden die Sprosslängen von der Spossbasis bis zum Punkt des letzten Blattes der Pflanzen bestimmt. Da sich zum Zeitpunkt des Ährenschiebens diese Höhe nicht mehr ändert, wurde die Endmessung der Sprosslängen zum Zeitpunkt der Ernte bis zur Grannenspitze durchgeführt (Abb. 3-7). Es lässt sich erkennen, dass sich zu diesem Zeitpunkt in den Grunddüngungen die Wuchshöhen der mit *P. indica* besiedelten Pflanzen nicht mehr von denen der Kontrollen unterscheiden. Allerdings zeigten sich in der phosphatlimitierten Variante NK und in der Volldüngevariante NPK+ eine signifikant größere Wuchshöhe bei den mit *P. indica* besiedelten Pflanzen.

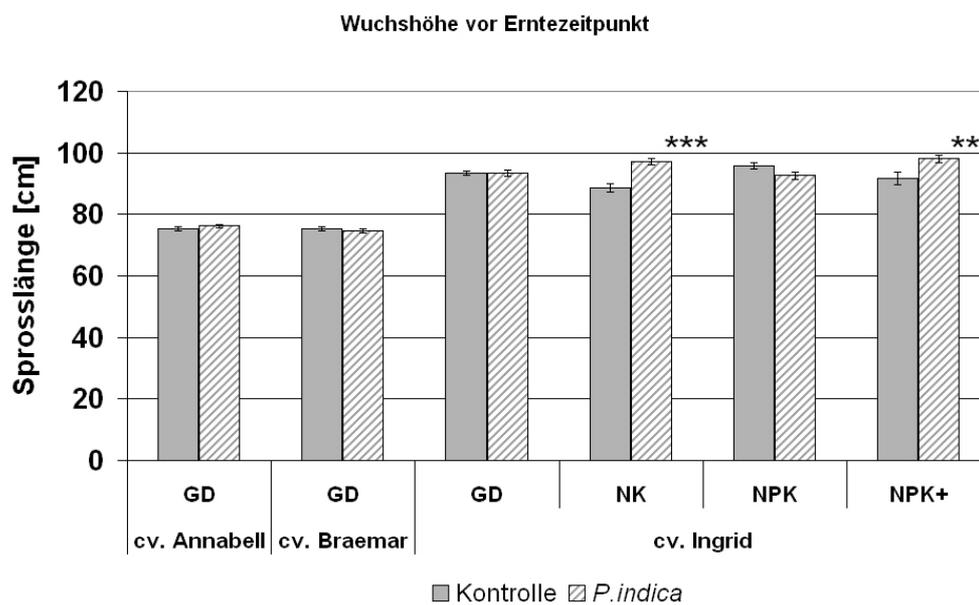


Abb. 3-7: Sprosslängen der mit *P. indica* besiedelten und nicht besiedelten Gerstepflanzen zum Erntezeitpunkt

Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Sprosslängen der nicht inokulierten Kontrollpflanzen und der mit dem Wurzelendophyten *P.indica* besiedelten Gerstepflanzen bestimmt. Pro Wiederholung wurden sechs Pflanzen in ihren Sprosslängen vermessen. Es wurden vier Wiederholungen in cv. Ingrid bzw. sechs Wdh. in cv. Annabell und cv. Braemar durchgeführt in einer Grunddüngung (GD), bzw. versch. Düngevarianten (Abb. 3-5 B) für Kultivar Ingrid. Dargestellt sind die Mittelwerte der Sprosslängen und deren Standardfehler, gemessen bis zur Grannenspitze. Signifikanzen zwischen allen mit *P. indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

Man erkennt an den Sprosslängen, dass sich die modernen Kultivare Annabell und Braemar durch eine kleinere Wuchsform auszeichnen, während es sich bei dem cv. Ingrid um eine hoch wachsende Sorte handelt.

3.2.3 Einfluss auf die Entwicklung der besiedelten Pflanzen

Neben dem Wachstum ist der Zeitpunkt der Blütenbildung für Ertrag und Erntezeitpunkt entscheidend. Besonders für agronomisch genutzte Pflanzen wie die Gerste kann deshalb eine beschleunigte Entwicklung wirtschaftlich von Bedeutung sein.

Zur Bonitur der Entwicklung der Pflanzen wurden in dem Gefäßversuch unter Freilandbedingungen neben den Wachstumsunterschieden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten die Entwicklungsstadien der vorhandenen Ähren in drei Klassen eingeteilt (Tab. 3-1), um so den Zeitpunkt des Ährenschiebens festzuhalten. Die Anzahl der Ähren der entsprechenden Klassen wurden zu zwei Zeitpunkten festgehalten (Abb. 3-8).

Tab. 3-1: Klassenzuordnung verschiedener Entwicklungsstadien der Ähren von *H. vulgare*.

Um den Zeitpunkt des Ährenschiebens festzuhalten und somit die Entwicklung der mit *P.indica* besiedelten- gegenüber nicht-besiedelten Gerstenpflanzen zu vergleichen, wurde der Entwicklungszustand der Ähren in drei Klassen eingeteilt. In der Tabelle dargestellt ist die Klasseneinteilung nach Erscheinungsbild mit einer kurzen Beschreibung.

	Klasse 1	Klasse 2	Klasse 3
Erscheinungsbild:			
Beschreibung:	Nur Grannen erkennbar	Grannen und teilweise Korn sichtbar	Gesamte Ähre, voll entwickelt und aus dem Halm geschoben

Ergebnisse

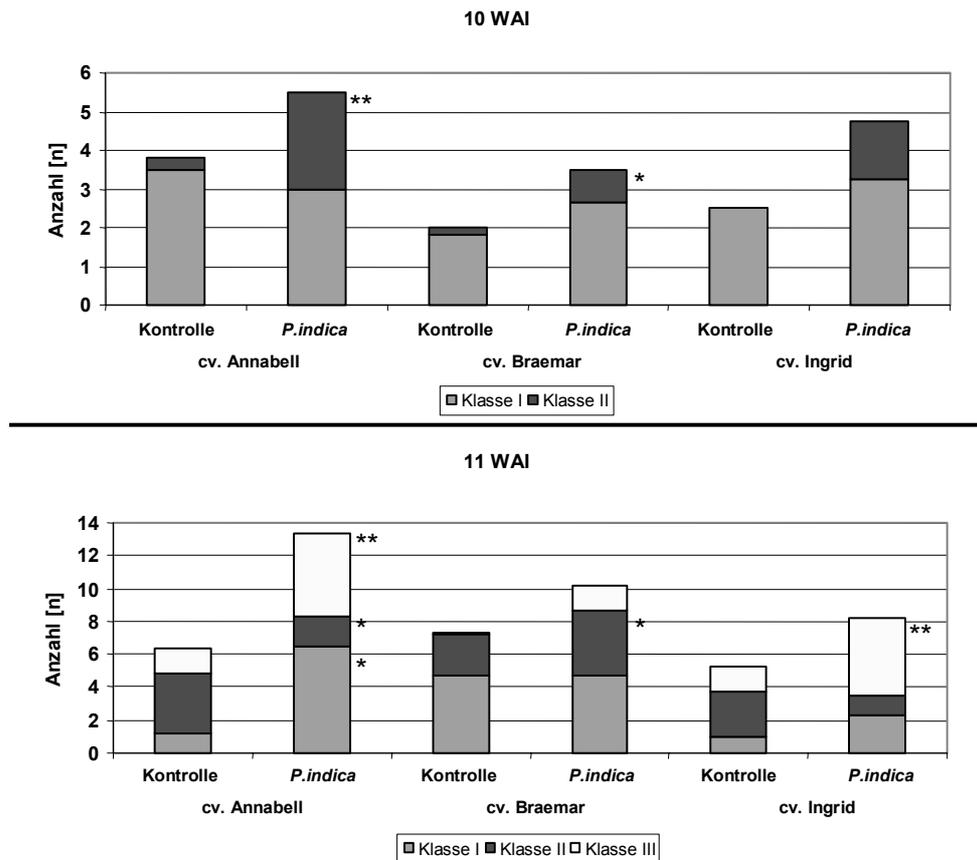


Abb. 3-8: Entwicklung der Ähren von *P. indica* besiedelten Gerstenpflanzen

Die Entwicklungsstufen der Ähren wurden in drei Klassen eingeteilt (Tab. 3-1) Die Anzahl von Ähren der jeweiligen Klasse pro Gefäß wurde nach 10 bzw. 11 Wochen bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs Gefäßen der Kultivare Annabell und Braemar (je 36 Pflanzen) und aus vier Gefäßen des Kultivars Ingrid (24 Pflanzen). Dargestellt ist der Vergleich in der Grunddüngewariante. Signifikanzen zwischen mit *P.indica* besiedelten und nicht-besiedelten Kontrollpflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$).

Die Ährenentwicklung in den mit *P. indica* besiedelten Pflanzen war beschleunigt (Abb. 3-8). Zu beiden Zeitpunkten waren insgesamt mehr Ähren in den Varianten mit Pilz sichtbar. Zudem befinden sich zu beiden Zeitpunkten mehr Ähren in einem weiteren Entwicklungszustand als in den Kontrollpflanzen ohne Wurzelendophyten. Diese Ergebnisse ließen sich in einem weiteren Experiment im darauf folgenden Jahr 2005 bestätigen und konnte in allen drei Kultivaren beobachtet werden. Rein visuell beurteilt schienen die Ähren der nicht besiedelten Pflanzen etwas länger grün zu sein.

3.2.4 Einfluss auf den Ertrag und Ertragskomponenten

Der schon in den vorherigen Kapiteln 3.2.2.f vorgestellte Gefäßversuch diente in erster Linie der Ertragsbestimmung. Nach Abreife der Pflanzen wurden verschiedene Ertragskomponenten bestimmt. Hierzu zählten neben der Gesamtertragsmenge pro Gefäß die mittlere Ährenanzahl pro Gefäß sowie die mittlere Kornmenge pro Ähre, der Strohertrag und der daraus resultierende Ernteindex (Verhältnis Korn:Stroh). In Tabelle 3-2 sind die Ergebnisse der verschiedenen Kultivare aus der Grunddüngung dargestellt.

Tab. 3-2: Ertrag und verschiedene Ertragsparameter *P.indica*-besiedelter Pflanzen

Zur Bestimmung der Auswirkung der Besiedelung mit dem Wurzelendophyten *P.indica* auf den Ertrag der Pflanzen wurden verschiedene Ertragsparameter bestimmt. In der Tabelle dargestellt sind die Mittelwerte aus vier Wiederholungen für das Kultivar Ingrid und aus je sechs Parallelen für die Kultivare Annabell und Braemar. Die Ergebnisse beziehen sich auf die Pflanzen der Grunddüngung aus einem Gefäßexperiment im Sommer 2004.

Kultivar	<i>P. indica</i>	Ertrag Gefäß ⁻¹ [g]	TKG	Ähren Gefäß ⁻¹	Körner Ähre ⁻¹	Stroh- ertrag Gefäß ⁻¹ [g]	Ernte- index Gefäß ⁻¹
Ingrid wt	ninok.	50.3 ± 1.56	48.0 ± 0.90	47.8 ± 2.22	22.4 ± 0.93	52.4 ± 3.14	0.96 ± 0.04
	inok.	53.1 ± 2.76	48.1 ± 0.65	51.5 ± 1.29*	22.5 ± 1.86	53.2 ± 1.02	0.99 ± 0.06
Braemar	ninok.	53.3 ± 1.15	56.2 ± 1.25	42.3 ± 2.16	22.9 ± 0.85	47.4 ± 1.89	1.13 ± 0.04
	inok.	54.3 ± 1.51	55.4 ± 1.21	42.2 ± 3.43	23.5 ± 0.90	46.9 ± 2.55	1.16 ± 0.07
Annabell	ninok.	53.9 ± 3.61	50.6 ± 1.28	47.3 ± 3.50	23.1 ± 1.41	46.4 ± 3.46	1.17 ± 0.11
	inok.	59.9 ± 1.73**	50.6 ± 0.96	50.0 ± 2.45	23.7 ± 0.98	48.0 ± 1.35	1.25 ± 0.04
Signifikanz (P Werte)							
<i>Piriformospora</i>		0.000	0.625	0.043	0.291	0.493	0.042
Kultivar		0.000	0.000	0.000	0.199	0.000	0.000
<i>Piriform.</i> x Kultivar		0.036	0.582	0.255	0.838	0.551	0.663
Fehler df		26	26	26	26	26	26

ninok. = nicht inokuliert, inok. = inokuliert, TKG = Tausend-Korn-Gewicht, Ertrag und TKG sind auf 14% Feuchtegehalt eingestellt;

In dem Kultivar Annabell konnte eine signifikante Ertragssteigerung von +11% in den besiedelten Pflanzen gegenüber den nicht inokulierten Kontrollen festgestellt werden. Bei dem Kultivar Ingrid lag dieser Unterschied im Gesamtertrag bei +5,6 % und bei dem Kultivar Braemar bei +1,9 %. Der Einfluss des Pilzes auf den Gesamtertrag der beiden Kultivare Ingrid und Annabell zeigte sich in einer Erhöhung der Ährenanzahl pro Gefäß sowie in einer geringen Erhöhung der Körnerzahl pro Ähre, während das Tausend-Korn-Gewicht (TKG) nahezu unverändert blieb. In allen drei Kultivaren ließ sich durch Besiedelung mit *P. indica* eine tendenzielle Erhöhung des Ernteindex

feststellen. Die Zunahme des Ertrages durch den Wurzelendophyten ging somit nicht mit einer zusätzlichen Erhöhung des Gesamt-Strohertrages pro Gefäß einher.

Über alle Kultivare zeigte sich ein deutlich signifikanter Einfluss des Pilzes auf den Gesamtertrag, sowie ein signifikanter Einfluss des Pilzes auf die Anzahl der Ähren pro Gefäß und den Ernteindex. Der Einfluss des Kultivares zeigte sich in allen Parametern, außer der Körneranzahl pro Ähre, hoch signifikant. Interessanterweise scheint es eine Wechselwirkung zwischen Pilz und Kultivar in der Auswirkung auf den Gesamtertrag zu geben.

In Abb. 3-9 sind die Werte einiger Ertragskomponenten relativ zur Kontrolle dargestellt (Abb. 3-9 A), zusätzlich in den verschiedenen Düngevarianten im Kultivar Ingrid (Abb. 3-9 B). Diese relative Darstellungsweise der Ergebnisse in Abbildung 3-9 A zeigt, dass die Ertragserhöhung in den Kontrolldüngewarianten sowohl im Kultivar Ingrid als auch im Kultivar Annabell aus einer erhöhten Ährenanzahl pro Gefäß sowie einer leicht erhöhten Kornzahl pro Ähre resultierte. Betrachtet man den Einfluss des Pilzes auf die Ertragskomponenten in den einzelnen Düngevarianten, so ließ sich in der phosphatlimitierten Düngevariante NK eine ähnliche Erhöhung des Ertrags durch *P. indica* wie in der Grunddüngung beobachten (Abb. 3-9B). Hier war allerdings nicht die Ährenanzahl vergrößert, sondern es zeigte sich eine Änderung im Tausend-Korn-Gewicht der besiedelten Pflanzen. Ähnlich verhielt es sich in der Volldüngevariante NPK+. In der NPK-Düngung mit doppeltem Phosphatgehalt gegenüber der Grunddüngung zeigte sich kein Einfluss des Wurzelendophyten auf den Ertrag.

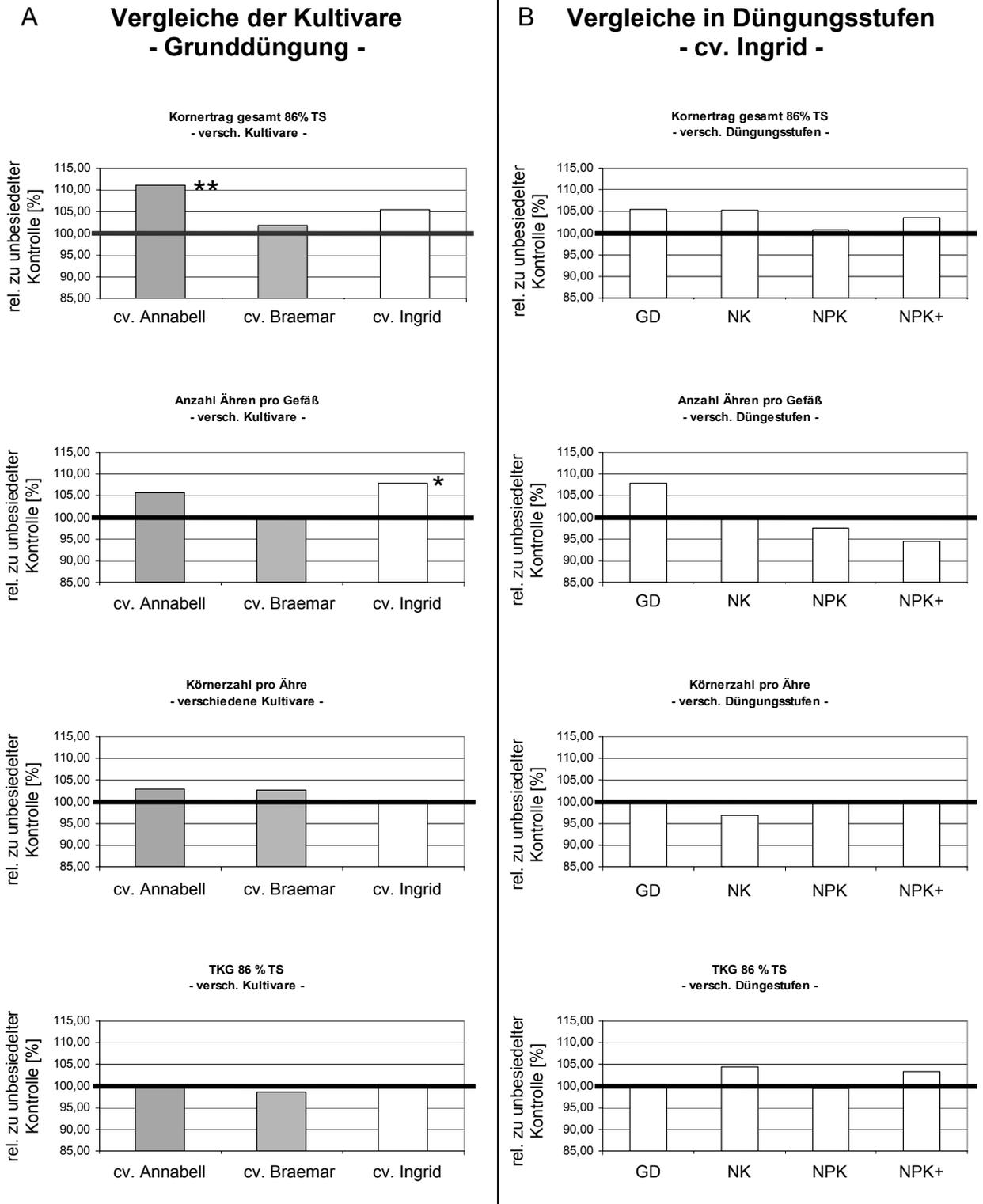


Abb. 3-9: Einfluss der Besiedelung der Pflanzen mit *P. indica* auf verschiedene Ertragskomponenten

Dargestellt sind die relativen Werte einzelner Ertragsparameter der besiedelten Pflanzen zu den entsprechenden Kontrollpflanzen. Die Werte resultieren aus dem Mittel von sechs Wiederholungen in den Kultivaren Annabell und Braemar, sowie dem Mittel aus vier Wiederholungen in dem Kultivar Ingrid und den dazugehörigen Düngungsstufen. Kornertrag und TKG wurden auf 86% relativer Trockensubstanz (TS) berechnet. Signifikanzen zwischen mit *P.indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$).

3.2.5 Einfluss auf Qualitätsparameter des Korns

Als Qualitätsparameter des Korns wurden der Gehalt an Stickstoff, Phosphor und Stärke gemessen (Abb. 3-10). Vor allem Stickstoff, der mit dem Proteingehalt der Gewebe korreliert, und Stärke stellen wichtige Qualitätsparameter dar.

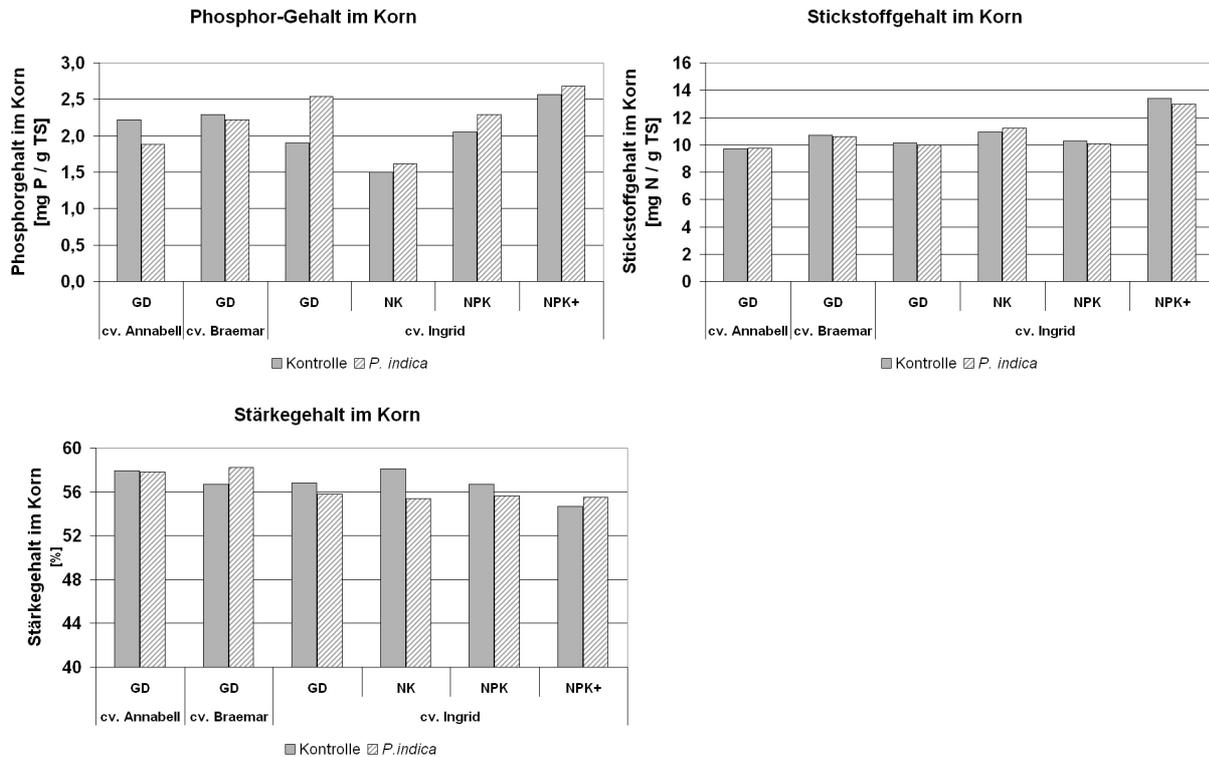


Abb. 3-10: Phosphor-, Stickstoff- und Stärkegehalt im Korn von mit *P. indica* besiedelten Gerstepflanzen

In je zwei Wiederholungen wurde der Phosphor-, Stickstoff- und Stärkegehalt in Körnern von *P. indica* besiedelten Pflanzen pro Gramm Trockensubstanz (TS) gemessen. Dargestellt ist das Mittel beider Messungen eines Gemisches von je 10 g Körnern aus allen Gefäßwiederholungen.

Die Phosphormenge im Korn korrelierte mit der Düngung der Pflanzen. Bei geringer Phosphatmenge (NK) war sie am niedrigsten, während sie in der Volldüngung (NPK+) am höchsten war. Im Kultivar Ingrid zeigte sich tendenziell etwas mehr Phosphor in den Körnern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. Der Stickstoffgehalt im Korn variiert nur wenig durch die Düngungen, war jedoch auch in der Volldüngevariante am höchsten. Es konnte weder im Phosphor-, im Stickstoff-, oder im Stärkegehalt der Körner besiedelter Pflanzen eine wesentliche Änderung durch die Besiedelung mit dem Wurzelendophyten festgestellt werden.

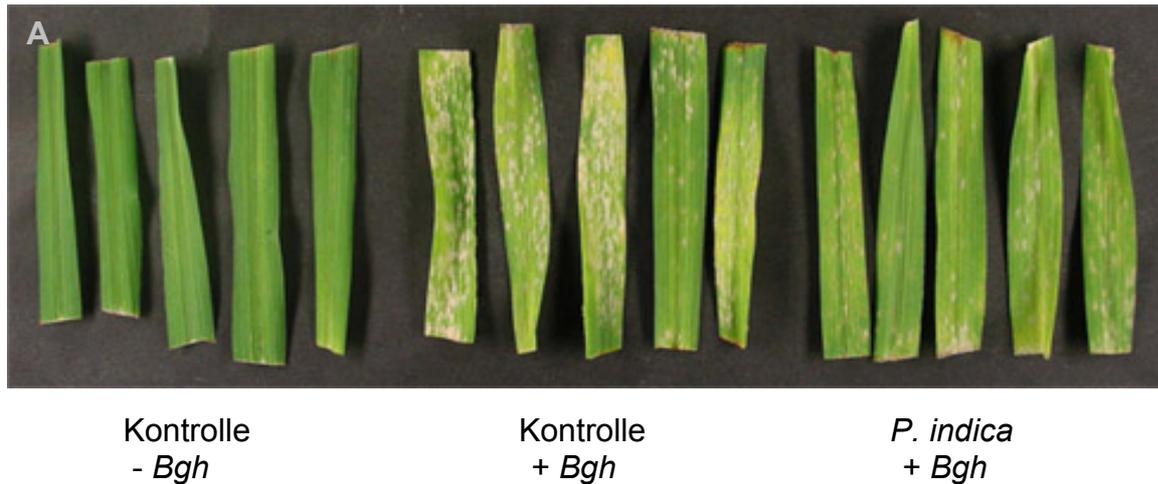
3.3 Einfluss der Besiedelung von *H. vulgare* mit *P. indica* auf die Interaktion mit dem Blattpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*

3.3.1 Untersuchungen zur Anfälligkeit besiedelter Gerstenpflanzen mit *Bgh*

Die Untersuchung der Wirts-Resistenz gegen das biotrophe Pathogen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (*Bgh*) wurde zunächst mit Hilfe von Blattsegmenttests durchgeführt. Blattsegmente der jüngsten vollentwickelten Blätter von zwei bzw. drei Wochen alten Pflanzen wurden auf Benzimidazol-haltige Wasseragarplatten ausgelegt und mit dem Pathogen gleichmäßig inokuliert. Nach fünf- bis siebentägiger Inkubation im Klimaschrank wurde die Anzahl der Pusteln pro Blattsegment bestimmt. In weiteren Untersuchungen wurde die Interaktion cytologisch untersucht.

3.3.2 Makroskopische Analyse der Induzierten Resistenz gegen *Bgh*

Im Blattsegmenttest zeigte sich auf den jüngsten- als auch auf den zweitjüngsten voll entwickelten Blättern von drei Wochen alten Gerstenpflanzen eine deutliche Reduktion der Pustelanzahl (Abb. 3-11). Zu diesem Zeitpunkt handelt es sich bei dem jüngsten voll entwickelten Blatt um das dritte Blatt, bei dem zweitjüngsten voll entwickelten Blatt um das zweite Blatt der Pflanzen. Deren Anfälligkeit gegen *Bgh* wurde untereinander verglichen (Abb. 3-11 B). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Pustelanzahl auf den obersten (jüngsten) Blättern um 60,1 %, und auf den unteren (zweitjüngsten) Blättern um 48,3 %. Die Anfälligkeit der oberen Blätter war deutlich höher als die der unteren. Dieses Ergebnis ließ sich mit gleichen Tendenzen in einer Reihe von Ansätzen wiederholen.



B

**Blattsegmenttest:
Versuch 34e-2003**

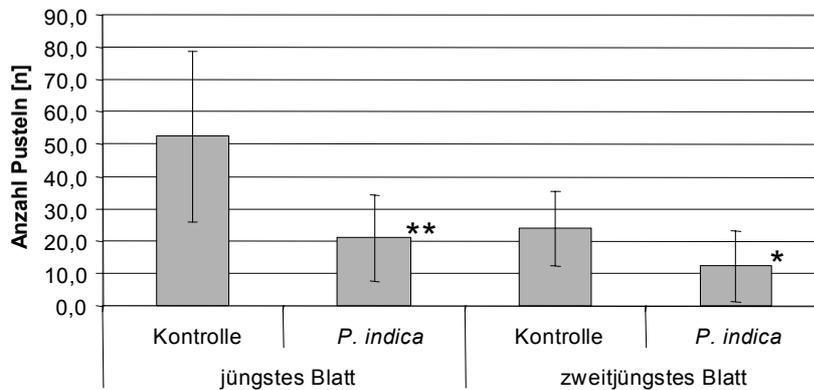


Abb. 3-11: Anfälligkeit von Blättern *P.indica*-besiedelter Pflanzen gegenüber nicht-besiedelten Kontrollpflanzen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Pustelanzahlen auf Blättern drei Wochen alter Gerstenpflanzen, welche gleichzeitig in einem Blattsegmenttest mit *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* inokuliert wurden. Sieben Tage nach Infektion wurden die Pusteln gezählt. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Krankheitssymptome (a). In (b) sind die Mittelwerte aus je 11 Blättern und deren Standardabweichungen dargestellt. Signifikanzen zwischen mit *P. indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$).

Da die Besiedelung der Pflanzen mit dem Wurzelendophyten von Versuch zu Versuch in ihrer Intensität variierte und unterschiedliche Auswirkung auf die Resistenz gegen *Bgh* haben konnte, wurde in jedem Material eine Resistenzuntersuchung durchgeführt. Um das Ausmaß der Resistenz statistisch zu erfassen wurde über 16 Versuche eine Metaanalyse durchgeführt (Abb. 3-12). In der Tabelle (Abb. 3-12 A) sind die Mittelwerte der Pustelanzahlen auf den Blättern in den einzelnen Versuchen mit ihren Standardabweichungen dargestellt. Wie in biologischen Systemen zu erwarten, fallen diese unterschiedlich hoch aus. Daher

Ergebnisse

wurde die Signifikanz in den einzelnen Versuchen mittels des statistischen Maßes des ungepaarten Student-T-Tests analysiert und ebenfalls in der Tabelle dargestellt.

A

Versuche	jüngstes Blatt				zweitjüngstes Blatt			
	Kontrolle	<i>P.indica</i>		proz. Anteil Pusteln auf <i>P.indica</i> -Blatt [%]	Kontrolle	<i>P.indica</i>		proz. Anteil Pusteln auf <i>P.indica</i> -Blatt [%]
	MW Anzahl Pusteln / 5 cm	MW Anzahl Pusteln / 5 cm	T-Test		MW Anzahl Pusteln / 5 cm	MW Anzahl Pusteln / 5 cm	T-Test	
34f_2003	147,10 ± 41,39	53,40 ± 44,84	0,0001	36,30	57,80 ± 16,69	41,67 ± 16,93	0,0520	72,09
34e-2003	52,45 ± 26,39	20,91 ± 13,42	0,0021	39,86	23,75 ± 11,58	12,27 ± 10,90	0,0235	51,67
34c-2004	98,48 ± 31,31	43,49 ± 61,56	0,0296	44,16	-	-	-	-
34e-2004	49,44 ± 17,02	27,70 ± 13,33	0,0063	56,02	24,22 ± 12,63	29,00 ± 15,70	0,4778	119,72
34f_2004	18,11 ± 17,02	3,30 ± 3,16	0,0317	18,22	17,78 ± 16,57	8,00 ± 6,58	0,1026	45,00
34g_2004	18,56 ± 18,37	1,11 ± 1,45	0,0118	5,99	1,89 ± 1,62	0,78 ± 1,39	0,1379	41,18
34h-2004	55,89 ± 29,04	55,56 ± 60,67	0,9883	99,40	60,89 ± 27,04	40,00 ± 28,04	0,0866	65,69
34j-2004	7,45 ± 8,87	3,45 ± 10,47	0,3010	46,34	1,75 ± 2,00	1,36 ± 1,58	0,4442	77,92
34k-2004	34,00 ± 31,67	24,36 ± 34,68	0,4104	71,66	17,08 ± 13,44	34,36 ± 23,16	0,0310	201,15
34l_2004	26,78 ± 30,73	2,11 ± 2,52	0,0289	7,88	7,22 ± 3,42	4,78 ± 3,03	0,1282	66,15
34m_2004	96,00 ± 47,02	62,60 ± 45,71	0,1156	65,21	25,00 ± 23,24	11,30 ± 8,26	0,1043	45,20
34q-2004	45,89 ± 17,20	13,33 ± 7,86	0,0001	29,06	22,67 ± 7,28	5,44 ± 8,59	0,0003	24,02
Ge1-2005	14,25 ± 38,05	8,10 ± 30,59	0,4682	56,82	6,00 ± 7,91	5,08 ± 13,91	0,9726	84,71
Ge2-2005	20,09 ± 19,03	31,78 ± 20,27	0,2010	158,17	5,40 ± 4,72	7,17 ± 3,59	0,0020	132,85
Ge3-2005	7,18 ± 10,86	1,36 ± 1,95	0,0263	18,99	5,83 ± 13,96	0,91 ± 1,17	0,1727	15,58
Ge4-2005	63,78 ± 32,87	11,33 ± 7,28	0,0001	17,77	2,44 ± 1,13	0,56 ± 0,53	0,0080	22,73

B

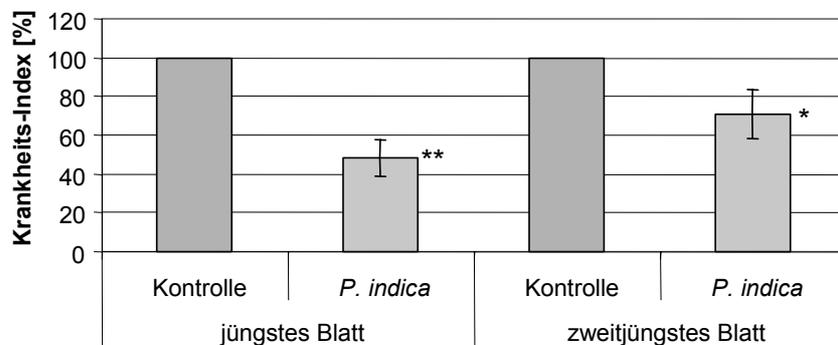


Abb. 3-12: Metaanalyse der Anfälligkeit von mit *P.indica* besiedelten Gerstenpflanzen gegenüber *B. graminis* f.sp. *hordei*. In 16 Experimenten wurde die Anfälligkeit der Blätter von drei Wochen alten Gerstenpflanzen, welche mit *P.indica* besiedelt waren, im Blattsegmenttest untersucht und zur Metaanalyse zusammengefasst. Die Blätter zeigten eine deutliche Reduktion der Krankheitssymptome, d.h. der sporentragenden Pusteln des Blattpathogens *B. graminis* (A). Graph B zeigt den Mittelwert der relativen Anfälligkeit zur Kontrolle aus den 16 Experimenten. Signifikanzen zwischen mit *P.indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (gepaarter Student. t-Test. * = $P < 0,05$. ** = $P < 0,01$).

Es zeigte sich über alle Experimente eine deutliche induzierte Resistenz gegenüber *Bgh* in besiedelten Pflanzen. Auf den jüngsten voll entwickelten Blättern von drei Wochen alten Pflanzen konnte eine hochsignifikante Reduktion der Pustelanzahl um

51,72 Prozent, auf den zweitjüngsten vollentwickelten Blättern eine signifikante Resistenz mit 28,92 Prozent festgestellt werden (Abb. 3-12 B).

Neben der quantitativen Aussage der Resistenz durch verringerte Pustelanzahlen auf Blättern besiedelter Pflanzen konnte beobachtet werden, dass die Pusteln auf deren Blättern kleiner, d.h. in ihrem Erscheinungsbild filigraner waren (Abb. 3-13).

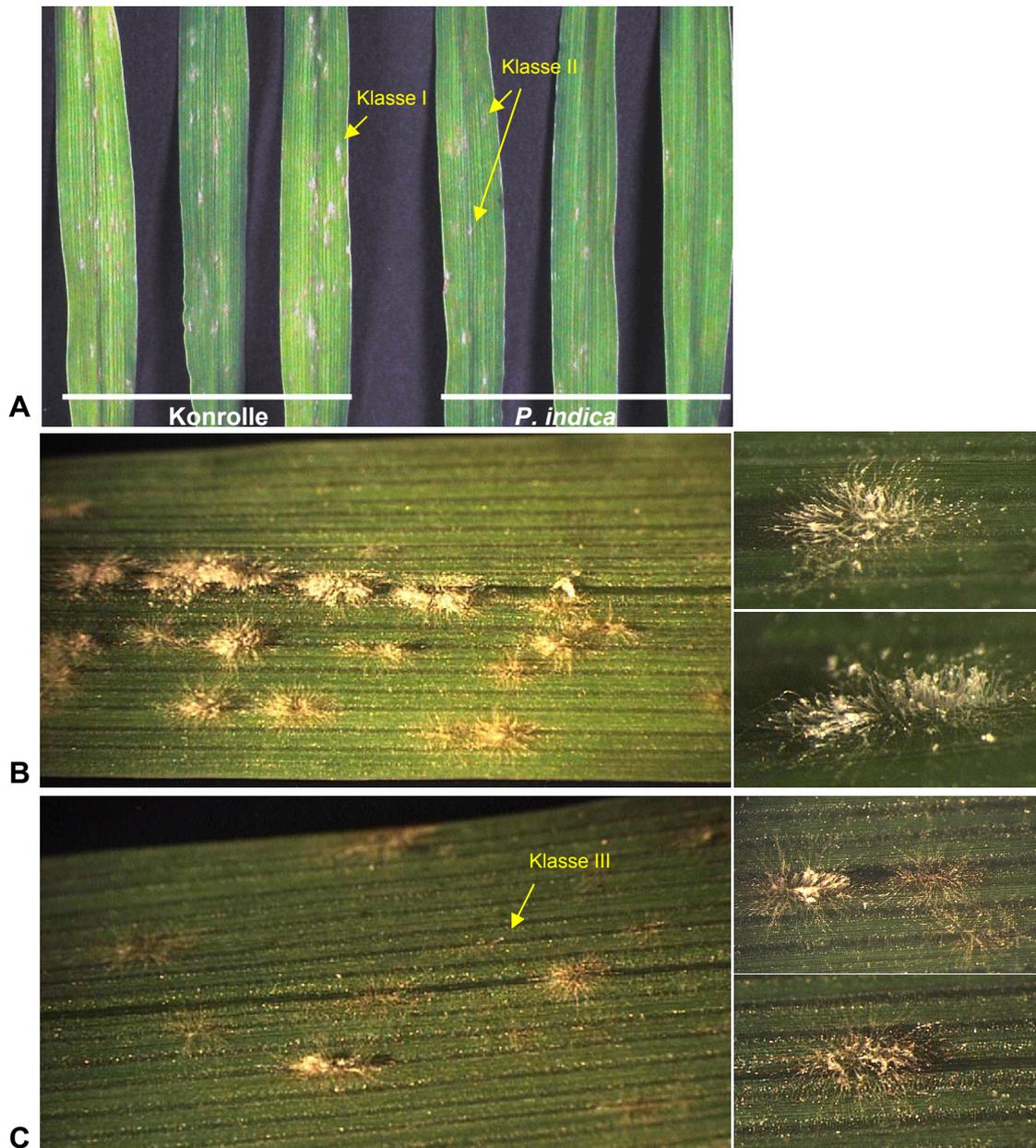


Abb. 3-13: *B. graminis* f.sp. *hordei*-Pusteln auf Gerstenblättern

Mehltaupusteln auf den jüngsten Blättern von 21 Tage alten Pflanzen sechs Tage nach Inokulation (A). Die Pusteln auf den Blättern von *P.indica*-besiedelten Pflanzen (C) wirkten öfter filigraner und von ihrer Farbe eher bräunlich im Gegensatz zu dem Pustelerscheinungsbild auf den Blättern von Kontrollpflanzen (B). Diese erscheinen gedrungener und weiß. Zur Quantifizierung dieses Phänotyps wurden weiße gedrungene Pusteln einer Klasse I zugeschrieben, filigranere kleinere Pusteln der Klasse II. Pusteln, welche nicht mehr mit dem Auge, aber mit dem Binokular erkennbar waren, wurden zu Klasse III gezählt.

Um diese Beobachtung zu quantifizieren wurden drei verschiedene Klassen für das Pustelerscheinungsbild gebildet (Abb. 3-13). Auffällige große weiße gedrungene Pusteln wurden der Klasse I zugeteilt, die filigraner wirkenden Pusteln, welche mit dem bloßem Auge aber noch zu sehen waren, zur Klasse II. Zu Klasse III wurden schließlich Pusteln gezählt, welche nur mit dem Binokular erkennbar waren. Die Ergebnisse von drei Versuchen sind in Abb. 3-14 dargestellt.

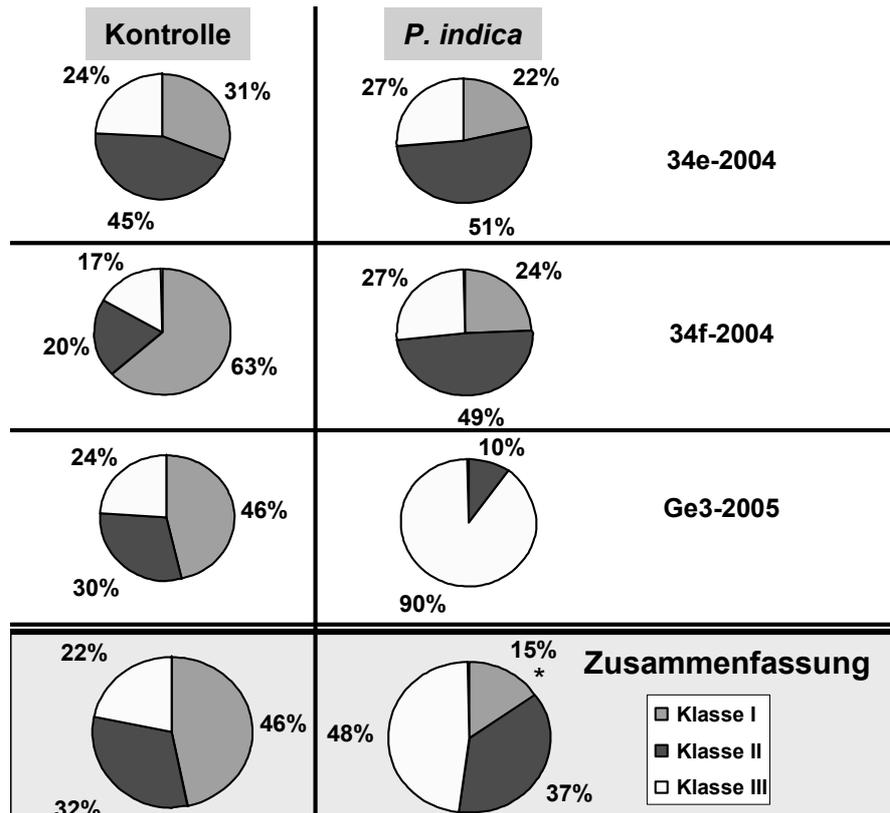


Abb. 3-14: Klassifizierung der Pusteln auf *P. indica*-besiedelten und nicht besiedelten Kontrollpflanzen

Anhand ihrer Erscheinung (Abb. 3-13) wurden die Pusteln des Mehltauereggers *B. graminis* f. sp. *hordei* auf den jüngsten Blättern des Blattsegmenttest *P.indica* besiedelter und nicht-besiedelter Gerstepflanzen drei verschiedenen Klassen zugeordnet. Klasse I = Dicke, weiß erscheinende Pusteln. Klasse II = kleinere, filigranere, bräunlich wirkende Pusteln. Klasse III = nur unter dem Binoklar (20-fache Vergrößerung) erkennbare Pusteln. Dargestellt sind die prozentualen Mittelwerte von je neun Blättern eines Experimentes. Signifikanzen zwischen mit *P.indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (gepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$).

Wie in Abbildung 3-14 dargestellt kam es auf den Blättern *P.indica* besiedelter Pflanzen zu einer Verschiebung hin zu filigraner wirkenden Pusteln.

3.3.3 Cytologische Analyse der induzierten Resistenz gegen *Bgh*

Um die makroskopisch beobachtete induzierte Resistenz näher zu charakterisieren, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten die Wechselwirkungen mit *B. graminis* mikroskopisch untersucht. Hierzu wurden Pflanzen mit *Bgh* inokuliert und danach zu verschiedenen Zeitpunkten die Blätter zur mikroskopischen Betrachtung entfärbt und fixiert. Es konnten die bekannten Abwehrmechanismen der Pflanzenzellen gegen das pilzliche Pathogen, wie Papillenbildung und Ausbildung der hypersensitiven Reaktion an Orten versuchter Penetration, beobachtet werden (Abb. 3-15).

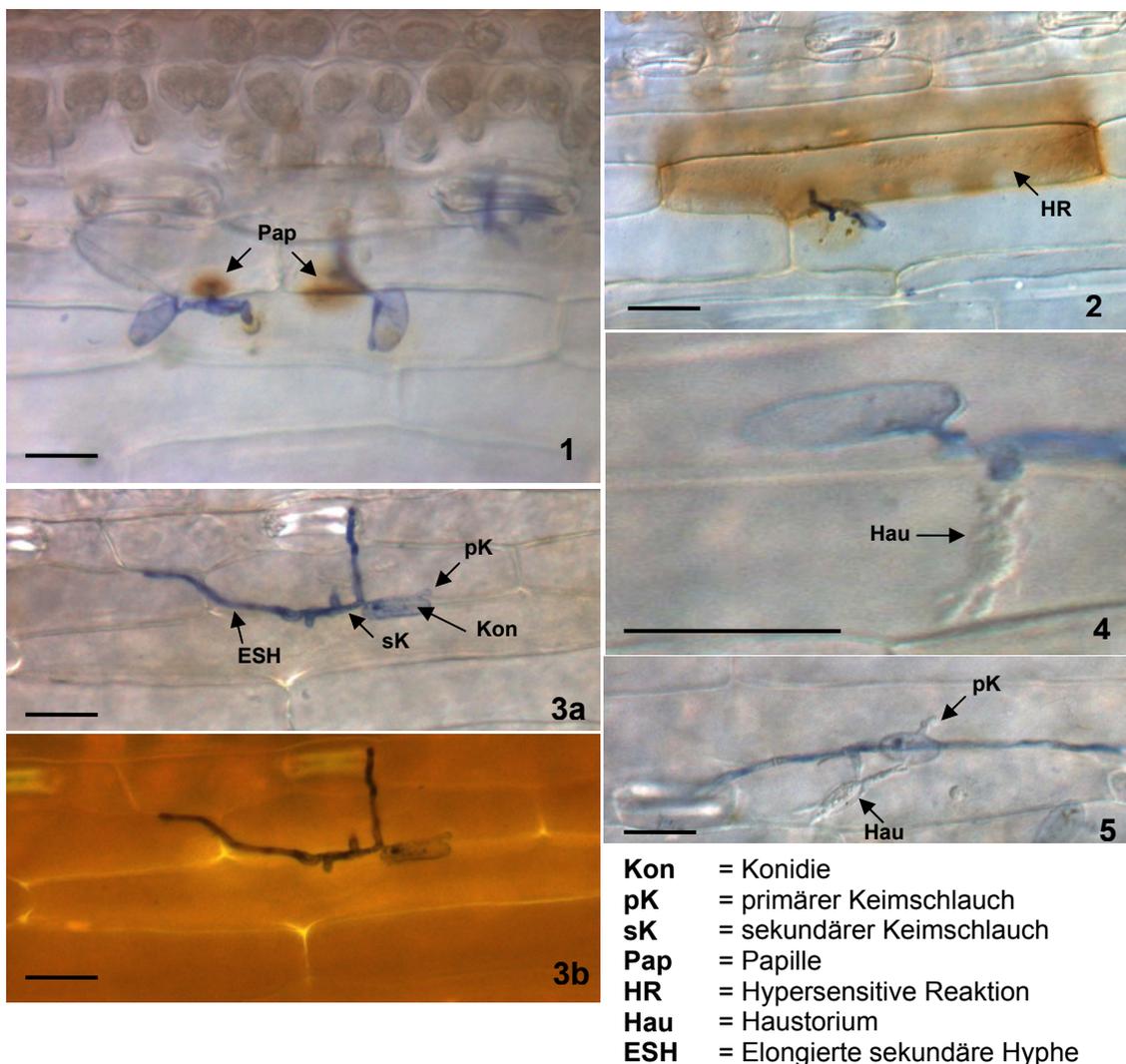


Abb. 3-15: Interaktionen des Mehltaupilzes *B. graminis* f.sp. *hordei* mit seinem Wirt *H. vulgare*
B. graminis wird von der Pflanze entweder durch eine lokale Verstärkung der Zellwand am Ort der versuchten Penetration (Papille) (1) oder aber durch Ausbildung einer Hypersensitiven Reaktion der penetrierten Zelle, d.h. dem lokalen Zelltod (2,3) an seiner Ausbreitung in der Pflanze gehindert. Ist die Penetration allerdings erfolgreich, bildet der Pilz in der penetrierten Pflanzenzelle sein Ernährungsorgan, das Haustorium (4,5), aus. Dargestellt sind Interaktionen zu einem Zeitpunkt von 48 h (1,4 = 32 h) nach Inokulierung der Pflanzen mit dem Pathogen. Durch Färbung mit Diaminobenzidin werden die Orte der Akkumulation von H_2O_2 anhand einer Braunfärbung sichtbar. Die Orte der HR-Reaktion lassen sich durch Autofluoreszenz der Zellen erkennen, da es hier zu einer Akkumulation von phenolischen Komponenten kommt (3b). Balken= 20 μ m

Zur Auswertung wurden diese Interaktionstypen quantifiziert. Mit den Auswertungen des Blattsegmenttests korrelierend zeigte sich auf cytologischer Ebene eine Reduktion der Penetration in Form von verminderter Haustorienanzahl auf den Blättern *P. indica*-besiedelter Gerstenpflanzen gegenüber den Blättern der Kontrollpflanzen (Abb. 3-16). Parallel dazu konnte eine Erhöhung der bekannten Abwehrmechanismen, wie Papillenbildung und Hypersensitive Reaktion, in den Blättern der besiedelten Pflanzen beobachtet werden (Abb. 3-16). Es wurden verschiedene Zeitpunkte der Interaktion mit *Bgh* untersucht. In vier von fünf Experimenten konnten zu späten Interaktionszeitpunkten (48 h und 72 h) frühe Abwehrreaktionen in Form einer Penetrationsresistenz, wie einer Zunahme der nicht penetrierten lebenden Zellen (NPLZ) sowie Ausbildung der Hypersensitiven Reaktion (HR) der nicht penetrierten Zellen, festgestellt werden. Durch diese erhöhte Penetrationsresistenz ergab sich eine signifikant verminderte Bildung von Haustorien. Dies deutet auf eine Erhöhung der aktiven Verteidigungsmechanismen hin.

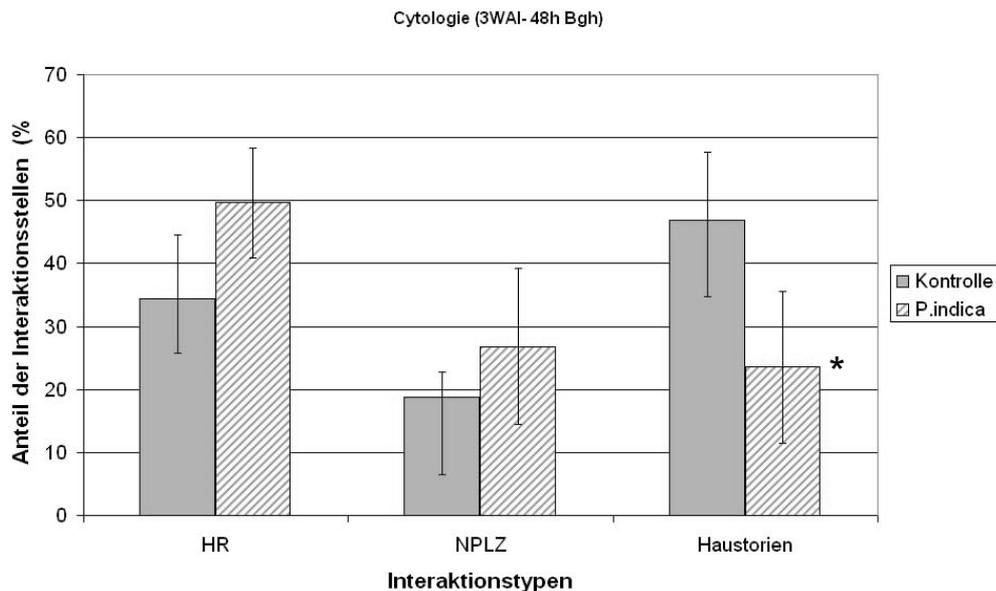


Abb. 3-16: Cytologische Quantifizierung der *Bgh*-Interaktionen auf Blättern von *P. indica* besiedelten Gerstenpflanzen gegenüber nicht-besiedelten Kontrollpflanzen

Die Interaktionsstellen zwischen Pathogen und Wirt wurden 48h nach Inokulation mit dem Pathogen *B. graminis* ausgewertet und quantifiziert. Es wurden jeweils die jüngsten Blätter von drei Wochen alten besiedelten Pflanzen sowohl mit als auch ohne Wurzelendophyt untersucht und jeweils die relative Anzahl an penetrierten Zellen mit Haustorien, bzw. nicht penetrierten lebenden Zellen (NPLZ) und Zellen welche eine hypersensitive Reaktion (HR) ausgebildet hatten, bestimmt (Abb. 3-15). Dargestellt sind die Mittel und Standardabweichungen aus jeweils vier Blättern mit je 100 Interaktionen pro Blatt.

3.3.4 Vergleich der durch *P.indica* vermittelten induzierten Resistenz im Kultivar Ingrid wt mit der hypersuszeptiblen Mutante 105-6

Bei der Mutante 105-6 handelt es sich um eine Gerstenlinie des Genotyps *MLO*, *ror1-2*. Sie ist als Nachkomme aus einer Kreuzung einer *ror*-Mutante (Hintergrund BCIngrid *mlo-5*) x Sultan 5 (*MLO*, *ROR1*, *ROR2*) entstanden (Collins et al., 2003). Im Vergleich zum Kultivar Ingrid wt, welches *Mlo* und *Ror1* trägt, handelt es sich bei der Linie 105-6 um eine Mutante im *Ror1*-Lokus. Sie wurde als hypersuszeptibel gegenüber *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* beschrieben (Collins et al., 2003). Mikroskopische Analysen ergaben, dass die Mutation im *ror1*-Lokus zu einer Verminderung der Penetrationsresistenz führt (Freialdenhoven et al., 1996; Trujillo et al., 2004).

In Abbildung 3-17 A+B lässt sich die deutlich höhere Anfälligkeit der Mutante 105-6 gegenüber der Linie Ingrid wt erkennen. Neben der höheren Anfälligkeit der Linie 105-6 zeigte sich in dieser Linie eine schwächere Reduktion des Befalls der Blätter durch Besiedelung der Pflanzen mit *P. indica* als im Kultivar Ingrid. Dies wurde über drei Versuche bestätigt werden (Abb. 3-17 C). Während die Verminderung der relativen Anfälligkeit, d.h. die induzierte Resistenz in Linie Ingrid wt bei ca. 80 Prozent lag, betrug sie in der Mutante nur 40 Prozent.

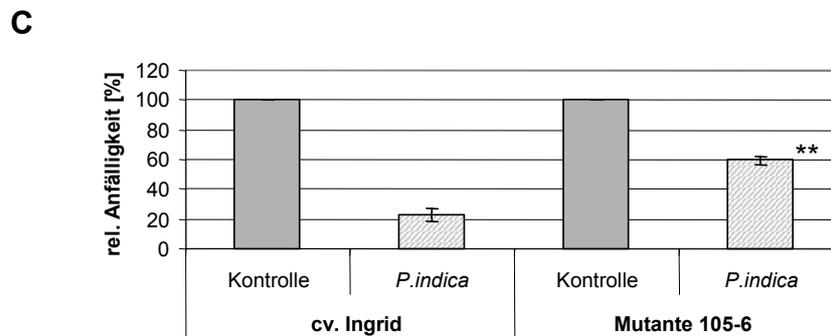
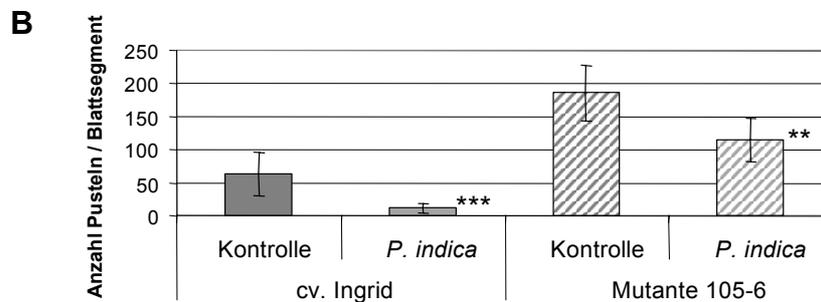
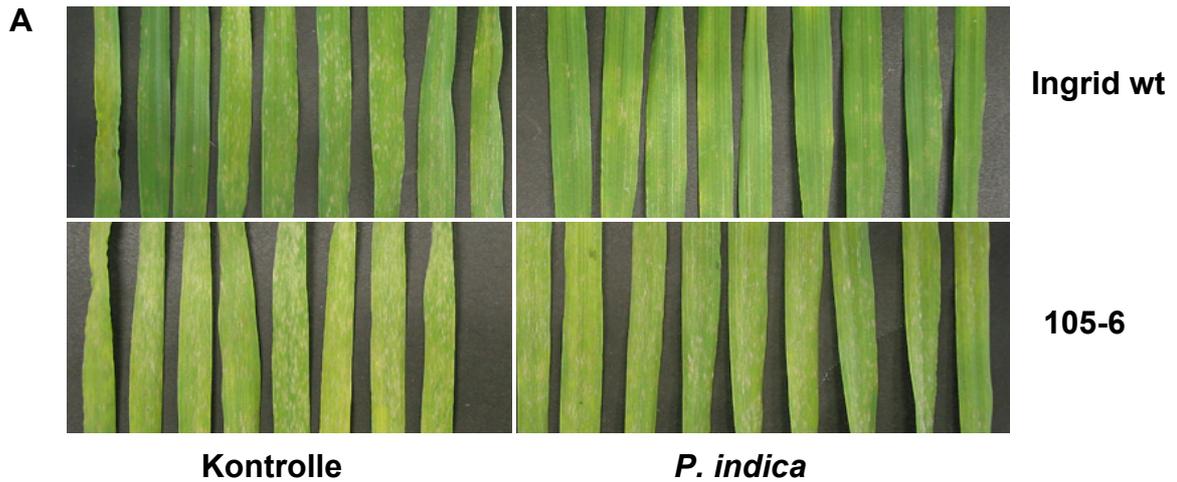


Abb. 3-17: Vergleich der *P. indica* induzierten Resistenz in Ingrid (*MLO*, *ROR-1*) mit der hypersuszeptiblen Mutante 105-6 (*MLO*, *ror-1*).

In **A** dargestellt sind die Blattsegmente der jüngsten Blätter drei Wochen alter *P. indica*-besiedelter Pflanzen und von nicht-besiedelten Kontrollen der Linie Ingrid wt sowie der *Bgh*-hochanfälligen Mutante 105-6 sechs Tage nach Infektion mit dem Blattpathogen *Bgh*. In **B** ist jeweils das Mittel der Anzahl von Pusteln auf 3 cm Blattsegment der jüngsten Blätter eines Testes mit 9 Blattsegmenten dargestellt. Standardabweichungen sowie Signifikanzen zwischen *P. indica* besiedelten und nicht-besiedelten Kontrollen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$). **C** zeigt die relative Anfälligkeit der jeweiligen Linien zu ihren Kontrollen im Mittel über drei durchgeführte Versuche. Signifikanzen zwischen *P. indica* und den zugehörigen Kontrollen sind hier durch den ungepaarten Student. T-Test über drei Versuche ermittelt (* = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

3.4 Molekulare Analysen der differentiellen Genexpression in Blättern *P. indica* besiedelter Gerstenpflanzen

Zur Untersuchung der molekularen Ursachen für die durch *P. indica*-Besiedelung in den Pflanzen hervorgerufenen Effekte wurden zwei verschiedene Strategien gewählt. Zum einen dienten ausgewählte Gene dazu, der Frage nachzugehen, ob bekannte Mechanismen der induzierten Resistenz bzw. an der Pflanzenverteidigung beteiligte Systeme in der durch *P. indica* hervorgerufenen Resistenz gegen *Bgh* eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu diesem zielgerichteten Ansatz mit festgelegter Ausgangshypothese wurde parallel versucht, differentiell exprimierte Gene in den Blättern besiedelter Pflanzen zu identifizieren, um dadurch Hinweise auf weitere Auswirkungen der Wurzelbesiedelung auf die Blätter zu bekommen. Hierbei handelt es sich um einen nicht-zielgerichteten Ansatz, der dazu diente, neue Hypothesen zu entwickeln.

3.4.1 Zielgerichtete Expressionsanalysen bezüglich der durch *P. indica* hervorgerufenen induzierten Resistenz

Für die zielgerichtete Suche wurden Gene ausgewählt, von denen bekannt ist, dass sie in bisher untersuchten systemisch induzierten Resistenzen wie der systemisch erworbenen Resistenz (SAR), der chemisch induzierten Resistenz (cIR), der durch Rhizobakterien induzierten systemischen Resistenz (ISR), oder aber im antioxidativen System der Pflanzen eine Rolle spielen.

Bei den verwendeten Markern handelte es sich um Gene aus vier verschiedenen Gruppen: Pathogen-, Salizylsäure-, und Jasmonat-responsive Gene, sowie Gene, welche im antioxidativen System der Pflanzen involviert sind (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Ausgewählte Gene für die Expressionsanalysen zur Untersuchung der durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen Resistenz in den Blättern von *H. vulgare*

Die Tabelle zeigt die für gezielte Expressionsanalysen verwendeten Gene mit den Funktionen der von ihnen kodierten Proteine und dem Organismus, aus welchem sie isoliert wurden. Die letzte Spalte zeigt die Signalwege, in welche sie involviert sind, und für die sie als Markergene in dem in dieser Arbeit untersuchten System behandelt werden sollten.

Gen	Funktion	Organismus	Verwendet als Marker für:
<i>PAL14-16</i>	Phenylalanin Ammonium Lyase	<i>H. vulgare</i>	Pathogenantwort (Eckey et al., 2004)
<i>PR-5</i>	Thaumatin-ähnliches Protein	<i>H. vulgare</i>	Pathogenantwort, (SAR) (Bryngelsson & Green, 1989)
<i>PR-1b</i>	antifungales Protein	<i>H. vulgare</i>	Pathogenantwort, (SAR) (Bryngelsson et al., 1994; Schultheiss et al., 2003)
<i>GLP-4</i>	Germin-ähnliches Protein (mögl. Funkt.=Superoxid-Dismutase)	<i>H. vulgare</i>	Pathogenantwort, Antioxidatives System (Zhang et al., 1995; Christensen et al., 2004)

Ergebnisse

Gen	Funktion	Organismus	Verwendet als Marker für:
<i>TaPOX381</i> <i>PRX-8</i>	Peroxidasen	<i>T. aestivum</i> <i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System, Pathogenantwort (Schweizer et al., 1989; Green, 1991)
<i>TaWIR5</i>	Glutathion S-Transferase	<i>T. aestivum</i>	Antioxidatives System, Pathogenantwort (Dudler et al., 1991)
<i>APX</i>	Ascorbat Peroxidase	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System, Pathogenantwort (Hückelhoven et al., 2001)
<i>pBI-1</i>	Bax-Inhibitor-1	<i>H. vulgare</i>	Zelltod, cIR, Pathogenantwort (Hückelhoven et al., 2003)
<i>HvS40</i>	-	<i>H. vulgare</i>	Seneszenz (Krupinska et al., 2002)
<i>JIP-23</i>	-	<i>H. vulgare</i>	Jasmonatantwort (Hause et al., 2002)
<i>BCI-9</i>	Apyrase	<i>H. vulgare</i>	cIR, Salizylsäure, exog. Jasmonat (Beßer et al., 2000)
<i>BCI-7</i>	Serin-Proteaseinhibitor	<i>H. vulgare</i>	cIR, Salizylsäure, exog. Jasmonat (Beßer et al., 2000)
<i>BCI-4</i>	Ca ²⁺ -bindendes EF-Hand- Protein	<i>H. vulgare</i>	cIR, Salizylsäure (Beßer et al., 2000)
<i>BCI-3</i>	Saure Phosphatase	<i>H. vulgare</i>	cIR, Salizylsäure, exog. Jasmonat (Beßer et al., 2000)
<i>BCI-1</i>	Lipoxygenase	<i>H. vulgare</i>	cIR, Salizylsäure, exog. Jasmonat (Beßer et al., 2000)
Aktin	Aktin	<i>H. vulgare</i>	Konstitutiv-Kontrolle (Hückelhoven et al., 2001)
<i>Ubi1</i>	Ubiquitin	<i>H. vulgare</i>	Konstitutiv-Kontrolle (Schultheiss et al., 2002)
<i>CAT1</i>	Catalase 1	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System (Skadsen et al., 1995)
<i>CAT2</i>	Catalase 2	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System (Skadsen et al., 1995)
<i>GR</i>	Glutathion Reduktase	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System
<i>MDHAR</i>	Monodehydroascorbat- Reduktase	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System
<i>DHAR</i>	Dehydroascorbat- Reduktase	<i>H. vulgare</i>	Antioxidatives System

Zur Überprüfung, ob Salizylsäure in der durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen Resistenz einen Rolle spielt (SA-Weg), wurden die chemisch induzierten BCI (*barley chemically induced*)-Gene ausgewählt (Tab. 3-3.). *PR-1* und *PR-5* sind vielfach als Markergene der SAR-Antwort in dikotylen Pflanzen beschrieben (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992). Die Expression der BCI-Gene wird allerdings nicht nur durch endogene oder exogene Erhöhung von Salizylsäure (SA) und verschiedenen SA-Derivaten, sondern auch durch die Applikation von exogenem Jasmonat reguliert. Dies wurde für alle BCI-Gene außer für *BCI-4* gezeigt (Beßer et al., 2000). Eine Induktion dieser Gene nach *Bgh*-Infektion konnte nicht festgestellt werden (Beßer et al., 2000). Zur Überprüfung, ob Jasmonat, welches in der ISR oder der induzierten Resistenz durch Verwundung involviert ist, in dem hier untersuchten System eine Rolle spielt, wurde das Gen für das 23 kDa Jasmonat-induzierte-Protein (*JIP-23*) in die Untersuchungen einbezogen. *JIP-23* ist sowohl

durch exo- als auch endogene Jasmonaterhöhung induzierbar (Hause et al., 1996). Die vierte Gruppe der in die Expressionsuntersuchungen einbezogenen Gene, *GLP-4*, *APX*, *TaPOX381* und *TaWIR5*, kodiert für Enzyme des antioxidativen Systems der Pflanzen (Tab. 3-3).

Ein Dot-Blot-Experiment zur Untersuchung der Expression dieser Kandidatengene sollte zunächst Aufschluss über ihre Regulation geben. PCR-Fragmente dieser Gene wurden auf Nylonmembranen aufgebracht und mit markierten komplexen cDNA-Sonden aus Blättern fünf Wochen alter *P. indica*-besiedelter bzw. nicht-besiedelter Kontrollpflanzen hybridisiert.

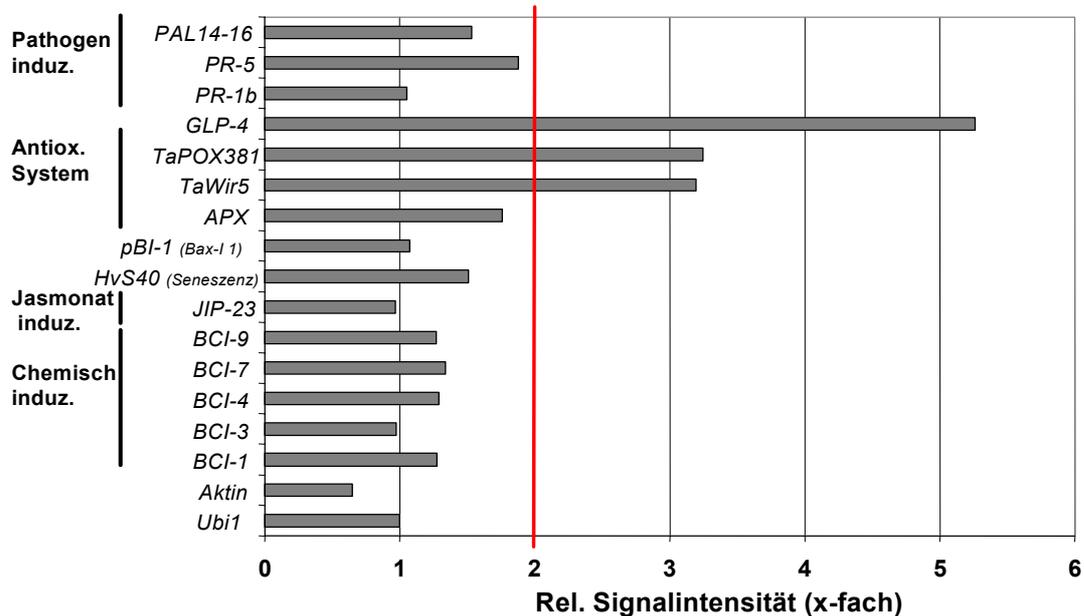


Abb. 3-18: Relative Signalintensitäten ausgewählter Genfragmente im Dot-Blot-Experiment

PCR-Fragmente von ausgewählten Genen wurden auf Nylonmembranen mittels einer Dot-Blot-Vorrichtung aufgebracht und sowohl mit DIG-markierter cDNA aus Blättern *P. indica* besiedelter- als auch nicht besiedelter Gerstenpflanzen (5 WAI) hybridisiert. Dargestellt ist das Verhältnis der Signalintensitäten des *P. indica*-Materials zu denen der nicht-besiedelten Kontrollen. Kalibriert wurden die Signalstärken auf die Signalintensität des Ubiquitinfragmentes *Ubi1*. Links im Bild dargestellt ist die Einteilung der Gene nach Gruppen ihrer bekannten Induktionsart in Gerste. Der Rote Balken zeigt als Grenze die zweifache Signalstärke in Material von *P. indica* besiedelten Pflanzen bezogen auf die Kontrollen an. Fragmente der Gene für Aktin und Ubiquitin (*Aktin* und *Ubi1*) dienten als Kontrollen. Die Benennung der Gene und Information zu ihrer Regulation sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Wie aus Abbildung 3-18 hervorgeht, zeigte sich durch *P. indica*-Besiedelung weder eine Regulation der in Gerste bekannten chemisch induzierbaren- und Salizylsäure-regulierten- *BCI*-Gene, noch der bekannten pathogenresponsiven PR-Gene (*PAL14-16*, *PR-1*, *PR-5*) oder dem Jasmonat-Marker-Gen *JIP-23*. Es konnte jedoch eine erhöhte Signalintensität einiger Gene beobachtet werden, denen eine Rolle im antioxidativen System der Pflanzen zugeordnet wird.

Zur Überprüfung des Ergebnisses wurde eine semiquantitative RT-PCR mit RNA des für den Dot-Blot verwendeten Materials (5 WAI) und auch mit Material eines anderen Versuches (3 WAI) durchgeführt. Diese bestätigten die Tendenzen der Dot-Blot-Hybridisierungen (Abb. 3-19 A). Zu beiden Zeitpunkten wurde weder eine deutliche Erhöhung der Salizylsäure-induzierbaren BCI-Gene, noch eine Erhöhung der PR-Gene festgestellt. Auch das Jasmonat-Marker-Gen *JIP-23* zeigte keine erhöhte Transkriptmenge in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. Nur die Gene des antioxidativen Systems schienen stärker exprimiert, was im Falle von *GLP-4* auch im Northern Blot Experiment (Abb. 3-19 B) beobachtet werden konnte.

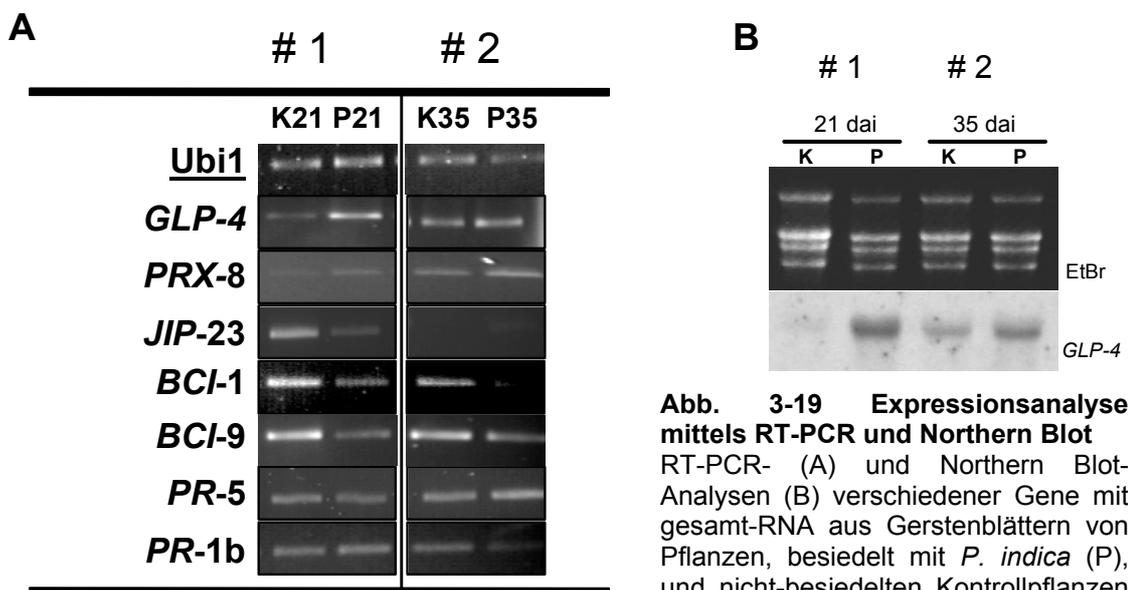


Abb. 3-19 Expressionsanalyse mittels RT-PCR und Northern Blot
RT-PCR- (A) und Northern Blot-Analysen (B) verschiedener Gene mit gesamt-RNA aus Gerstenblättern von Pflanzen, besiedelt mit *P. indica* (P), und nicht-besiedelten Kontrollpflanzen (K). Die Proben stammten aus zwei

verschiedenen Experimenten (#1,#2), 21 Tage, bzw. 35 Tage nach Infektion. RT-PCR Analyse auf das Ubiquitin-Gen (A) bzw. die Kontrollfärbung der geladenen RNA mit EtBr im Northern Blot dienten zur Kalibrierung. Die Benennung der Gene und Information zu ihrer Regulation sind in Tabelle 3-3 dargestellt. (#1= 34-a-2001 #2= 35-b-2001)

Die in diesen Experimenten deutlich nachgewiesene starke differentielle Expression des *GLP-4*-Gens konnte in folgenden Versuchen mit schwächer besiedelten Pflanzen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Es lag die Vermutung nahe, dass eventuell die Besiedelungsstärke mit den systemischen Auswirkungen zusammenhängen könnte. Für die darauffolgenden Untersuchungen wurden daher Versuche verwendet, welche mikroskopisch eine ähnliche Besiedelungsstärke sowie eine große Menge der mikroskopisch leicht zu erkennenden Chlamydosporen in den Wurzeln zeigten (Tab. 6-1). Um die Ergebnisse zu verifizieren wurde die Expression der gewählten Markergene in drei weiteren unabhängigen Versuchen (34-j-, 34f-, 34g-2004) mittels semiquantitativer RT-PCR erneut untersucht (Abb. 3-20). Als

Positivkontrolle der SA-responsiven Gene und Auswirkungen der chemisch induzierten Resistenz in Gerste wurden das Material von 10 Tage alten Pflanzen 48 h nach Behandlung mit BTH und die dazugehörigen Kontrollen in die Untersuchungen einbezogen.

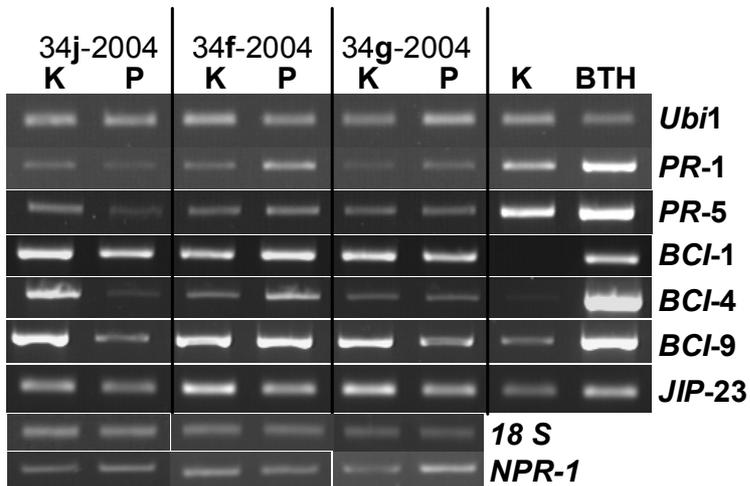


Abb. 3-20: Expression Salizylsäure-, Pathogen- und Jasmonat-responsiver Gene
 Dargestellt ist das Ergebnis semiquantitativer RT-PCR Untersuchungen aus drei verschiedenen Versuchen (34j-2004, 34f-2004, 34g-2004, Tab. 6-1). Als Material wurden die jüngsten und die zweitjüngsten Blätter von drei Wochen alten *P. indica* besiedelten (P), bzw. nicht-besiedelten (K) Pflanzen gemischt und zur Herstellung von cDNA verwendet. Als Kontrolle diente Blattmaterial von 10 Tage alter Gerste 48 h nach Behandlung mit dem chemischen Induktor (BTH) als auch die dazugehörigen Kontrollen (K). Als Kontrolle für gleichmäßige cDNA-Menge in den PCR-Ansätzen diente die Amplifikation des Ubiquitin-Genes (*Ubi1*). Die Benennung der Gene und Information zu ihrer Regulation sind in Tabelle 3-3 dargestellt.

Auch in diesen drei Versuchen konnte keine deutliche Erhöhung der Transkriptmenge der *PR*-, der *BCI*-Gene oder des Jasmonat-induzierbaren *JIP-23* Gens in den Blättern der *P. indica*-besiedelten Pflanzen festgestellt werden (Abb. 3-20). Aufgrund der Bedeutung des *NPR-1*-Genproduktes in der SAR- und ISR-Antwort dikotyle Pflanzen wurde auch dessen Genexpression mittels semiquantitativer-RT-PCR untersucht (Abb. 3-20). Auch hierbei waren keine deutlichen Expressionsunterschiede über die drei Versuche zu erkennen (Abb. 3-20).

Das antioxidative System der Pflanzen spielt bei der Abwehr gegen *Bgh* eine wichtige Rolle (Vanacker et al., 1998). Daher wurde dem durch die Dot-Blot-Experimente erhaltenen Hinweis, dass es durch die Besiedelung mit *P. indica* zu einer Änderung im antioxidativen System der Pflanzen kommt, nachgegangen. Anhand enzymatischer Messungen konnte eine deutliche Erhöhung der Aktivität der Glutathion-Reduktase und der Dehydroascorbat-Reduktase in den Blättern *P. indica* besiedelter-Pflanzen festgestellt werden (Helmut Baltruschat persönliche Mitteilung,

Waller et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurden deshalb die Transkriptmengen der Gene, die sowohl für diese Enzyme, als auch für andere Schlüsselenzyme des antioxidativen Systems der Pflanzen kodieren (Tab. 3-3), mittels semiquantitativer RT-PCR in den Blättern untersucht. Für die cDNA-Synthese wurden diesmal *random*-Hexamerprimer eingesetzt, welche es möglich machten, die 18S-rRNA Menge sowohl zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung als auch gleicher RNA-Mengen in der cDNA-Synthese und somit der cDNA-Menge in der spezifischen Test-PCR zu verwenden. Abb. 3-21 zeigt das Ergebnis der semiquantitativen RT-PCR.

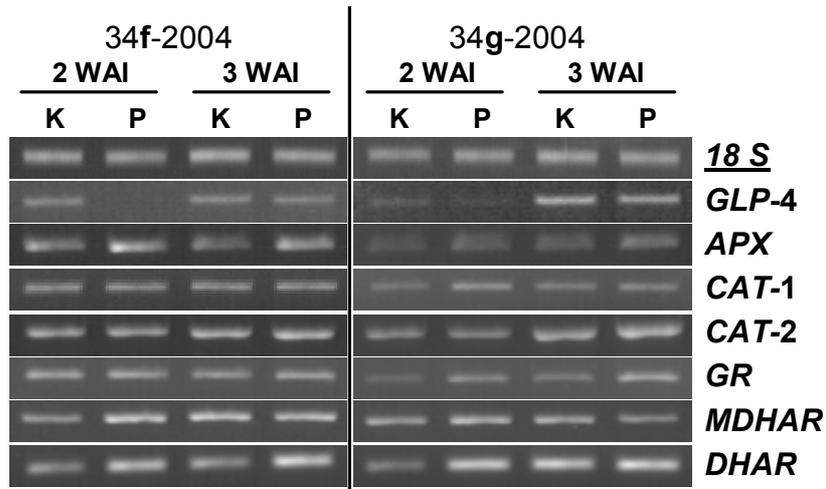


Abb. 3-21: Genexpression von Genen des antioxidativen Systems in Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Transkriptmenge von Genen des antioxidativen Systems der Pflanzen in den Blättern *P. indica*-besiedelter (P) und nicht-besiedelter Kontrollpflanzen (K) untersucht. Für die RNA-Extraktion wurden jeweils die jüngsten als auch zweitjüngsten Blätter der Pflanzen gemischt. Als Kontrolle wurden zur cDNA-Synthese *random* Hexameroligonukleotide eingesetzt und die 18S-rRNA Menge untersucht. Die Benennung der Gene und Information zu ihrer Regulation sind in Tabelle 3-3 dargestellt. (Versuchsmaterial (34f-2004, 34g-2004, Tab. 6-1)

Für das zuvor in dem Dot-Blot-Experiment untersuchte *GLP-4*-Gen konnte entgegen den vorherigen Untersuchungen (Abb. 3-21) keine erhöhte Transkriptmenge festgestellt werden (Abb. 3-22). Eine schwache Induktion des Gens *DHAR* und für die Ascorbat-Peroxidase zeigte sich sowohl in zwei als auch in drei Wochen alten Pflanzen. In weiteren untersuchten Materialien konnte diese Erhöhung der Transkriptmenge allerdings nicht bestätigt werden (Abb. 3-24). Auch für alle anderen Gene wurden leicht erhöhte Transkriptmengen in *P. indica*-besiedelten Pflanzen einzelner Experimente beobachtet. In keinem Fall war es aber möglich, diese Beobachtung in allen Versuchen zu bestätigen. Auch in den Genexpressionsstudien mittels Array-Hybridisierungen, welche im Kapitel 3.4.3.2 beschrieben werden, konnte keine *P. indica*-Regulation der Gene des antioxidativen Systems festgestellt werden.

3.4.2 Zielgerichtete Expressionsanalysen bezüglich der durch *P. indica* hervorgerufenen induzierten Resistenz unter dem Aspekt des *Primings*

Phänomene der induzierten Resistenz (IR) sind alle mit einer erhöhten Bereitschaft für die schnelle Aktivierung der zellulären Verteidigungsantwort assoziiert. Diese erhöhte Abwehrbereitschaft wird Sensibilisierung oder auch *Priming* genannt (Conrath et al., 2001; Conrath et al., 2002; Kohler et al., 2002). Zur Untersuchung, ob sich durch die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* ein solcher *Priming*-Effekt in der Genexpression der untersuchten Markergene für die induzierten Resistenzmechanismen bzw. für das antioxidative System der Pflanzen widerspiegelt, wurden die Blätter zusätzlich mit *Bgh* inokuliert und nach verschiedenen Zeitpunkten zur Expressionsanalyse geerntet.

In Northern Blot Experimenten (Abb. 3-22) zeigte sich wie erwartet weder zu dem früheren 12 h-, noch zu den späteren 24 h-, bzw. 48 h-Zeitpunkten nach *Bgh*-Infektion eine verstärkte Expression des *JIP-23*-Gens oder der chemisch induzierbaren Gene *BCI-1* und *BCI-9*. Für das pathogenresponsive Gen *PR-5* ist eine starke Induktion der Expression 24 h nach Inokulation zu erkennen, welche nach 48 h wieder schwächer wird. Für die untersuchten Gene konnte weder eine Regulation, noch ein *Priming*-Effekt durch die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* beobachtet werden.

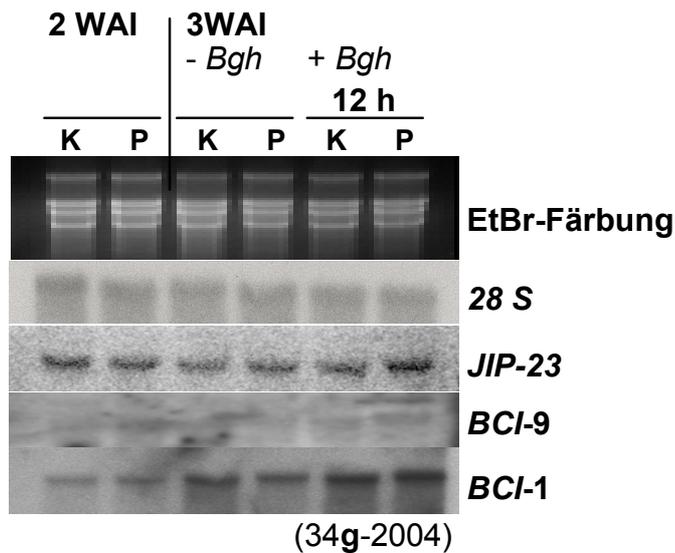
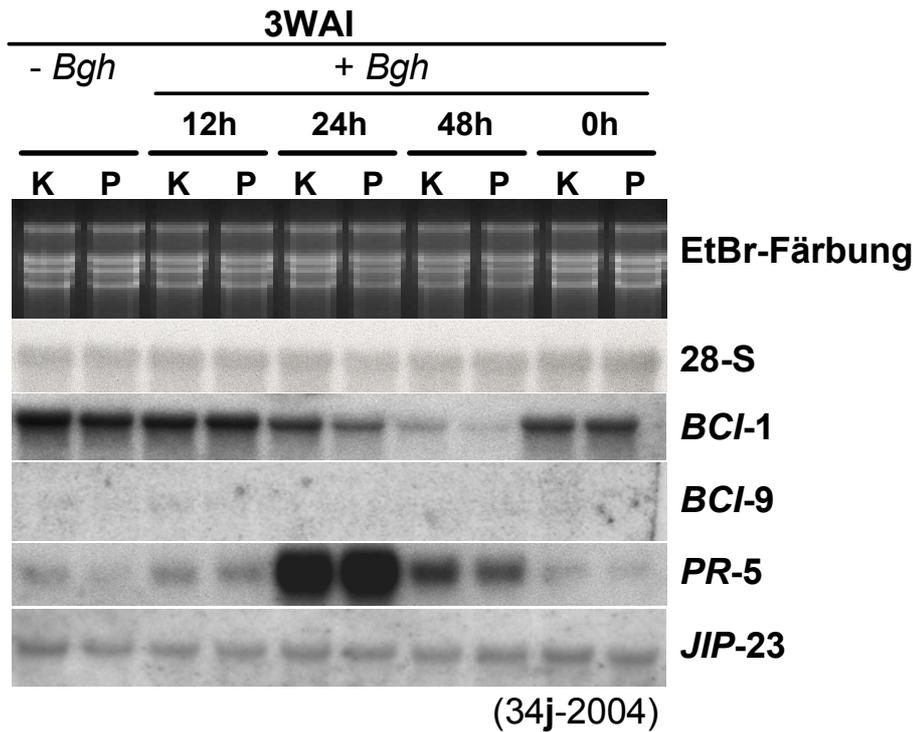
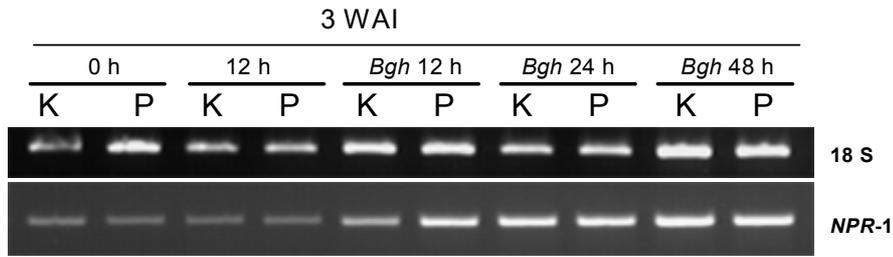


Abb. 3-22: Northern Blot Analyse einzelner Markergene der induzierten Resistenz in Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen nach Inokulation mit dem Pathogen *Bgh*
 In Material von zwei bzw. drei Wochen alten Gerstenpflanzen wurde die Expression einzelner Gene in Northern Blot Experimenten überprüft. Als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung wurden die Gele mit EtBr gefärbt sowie die Membranen ein zweites Mal mit einer Sonde für die 28 S-rDNA hybridisiert. Die Beschreibungen zu den untersuchten Genen finden sich in Tab. 3-3. (Versuchsmaterial: 34j-2004, 34g-2004, Tab.6-1)

Zusätzlich wurde die NPR-1-Transkriptmenge untersucht (Abb. 3-23). Während sich eine leichte Induktion durch *Bgh* feststellen ließ, blieben die Transkriptmengen durch *P. indica*, bis auf eine leichte Erhöhung in einem Versuch zum Zeitpunkt 12 h nach *Bgh*-Inokulation (Abb. 3-23) unbeeinflusst.

Ergebnisse

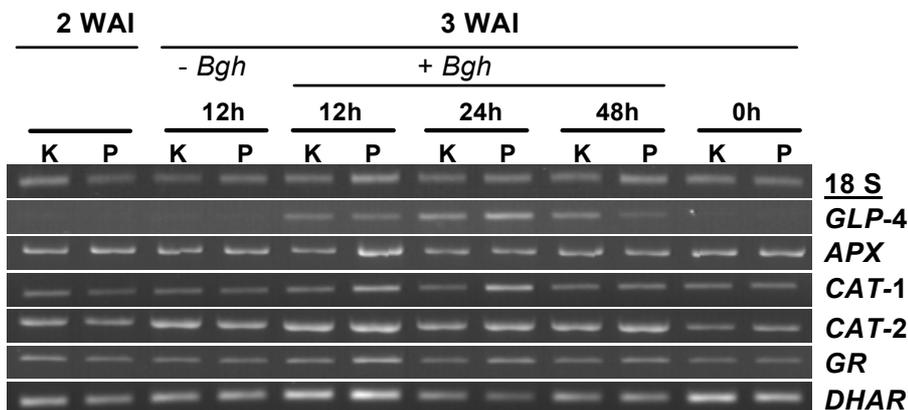


(Versuch 34k-2004)

Abb. 3-23: Semiquantitative RT-PCR-Untersuchungen der Expression des *Npr-1*-Gens in Gerstebältern durch *P. indica* und *Bgh*

In Blattmaterial drei Wochen alter Pflanzen, wurde die Expression des *NPR-1*-Genes mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Als Kontrolle diente die 18 S-rDNA Menge in der untersuchten cDNA, bei deren Synthese *random*-Hexamer-Primer eingesetzt wurden. Untersucht wurde das Blattmaterial der jüngsten und zweitjüngsten Blätter drei Wochen (WAI) alter Kontrollen und *P. indica*-besiedelter Pflanzen (12h, 24h und 48 nach *Bgh*-Inokulation). (Versuchsmaterial: 34k-2004)

Auch die Gene des antioxidativen Systems wurden hinsichtlich des *Primings* untersucht. Es zeigte sich bei fast allen Genen, weder ohne noch mit dem Pathogen *Bgh*, eine eindeutige Änderung der Expression in den Blättern durch Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* (Abb. 3-24). Unter Berücksichtigung der 18S-rRNA Kontrolle konnte lediglich eine leichte Erhöhung der Transkriptmenge des Gens für die Ascorbat-Peroxidase und die Glutathion-Reduktase 12 h nach *Bgh*-Inokulation in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen festgestellt werden. Allerdings ließ sich dies in keinem weiteren Versuch eindeutig verifizieren.



(Versuch 34j-2004)

Abb. 3-24: Genexpressionsanalyse von Genen des antioxidativen Systems in Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen unter *Priming*-Bedingungen

Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde die Transkriptmenge von Genen des antioxidativen Systems der Pflanzen in den Blättern *P. indica*-besiedelter (P) und nicht-besiedelter Kontrollpflanzen (K) sowohl vor und nach verschiedenen Zeitpunkten der Inokulation mit dem Pathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) untersucht. Für die RNA-Extraktion wurden die jüngsten und die zweitjüngsten Blätter jeweils zwei (2WAI), bzw. drei Wochen (3 WAI) alter Pflanzen gemischt. Als Kontrolle wurden zur cDNA-Synthese *random* Hexameroligonukleotide eingesetzt und die Transkriptmenge des 18S-rDNA-Gens bestimmt. Die Benennung der Gene und Information zu ihrer Regulation sind in Tabelle 3-3 dargestellt. (Versuchsmaterial: 34j-2004)

3.4.3 Nichtzielgerichtete Ansätze zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen

Für die Suche nach differentiell exprimierten Genen wurde zunächst die Methode der Subtraktiven Hybridisierung (SSH) angewendet, mittels welcher cDNA-Fragmente differentiell exprimierter Gene in cDNA-Banken angereichert werden. Weiterhin wurde die Methode der Makro- bzw. Mikroarraytechnologie eingesetzt, welche es ermöglicht, eine große Anzahl von Genen mit relativ einfachem experimentellem Aufwand in ihrer Expression zu analysieren und dadurch Aussagen über deren Regulation zu erhalten. Beide Methoden können so zu neuen Hypothesen für weitere gezielte Untersuchungen führen.

3.4.3.1 Herstellung und Analyse subtraktiver cDNA-Banken

Die suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) diente zunächst der Anreicherung von cDNA-Fragmenten von Genen, die in Blättern von *P. indica*-besiedelten Pflanzen stärker exprimiert waren als in den entsprechenden Kontrollen. Für diesen ersten Ansatz wurde cDNA aus Blättern von Kontrollpflanzen von der aus Blättern der *P. indica*-besiedelten Pflanzen subtrahiert (SSH1). Zur cDNA-Synthese wurde RNA aus den jüngsten und zweitjüngsten Blättern von Pflanzen 21 Tage nach Inokulierung (21 WAI) verwendet, die nach der Subtraktion verbleibende cDNA wurde amplifiziert, kloniert und transformiert. 480 (5x96) Transformanden wurden zur weiteren Analyse in Mikrotiterplatten vereinzelt. Die Insertionen dieser Transformanden wurden mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte parallel auf je vier Nylonmembranen aufgebracht. 175 PCR-Fragmente wurden dann durch Reverse-Northern-Hybridisierung an komplexe cDNA Sonden hinsichtlich der Expression der entsprechenden Gene überprüft. Die Sonden stammten zum einen aus dem gleichen Experiment (21 WAI) bzw. einem weiteren Experiment (35 WAI). Von diesem ersten Test wurden 28 Klone zu einem erneuten Hybridisierungsexperiment ausgewählt, anschließend 8 Klone sequenziert und die Sequenzen mit den Einträgen der TIGR *Barley Gene Index*-Datenbank verglichen (Tab. 3-4). Fünf der Sequenzen zeigten Identität zu dem Gen der großen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase (RubisCO) aus *H. vulgare*.

Tab. 3-4: cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. cDNA von RNA aus Blättern von Kontrollpflanzen wurde von cDNA aus Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen subtrahiert und kloniert. Dargestellt sind Sequenzen von Klonen, die in zwei reversen Northern Blot Analysen an komplexen cDNA Sonden von *P. indica*-besiedelten Pflanzen stärker hybridisieren als an eine Sonde aus den entsprechenden Kontrollpflanzen, ihre Längen, ihre möglichen Funktionen, die durch eine BlastN Suche im *TIGR-Barley-Gene-Index* (HvGI) ermittelt wurden, sowie die zugehörige Signifikanz und der Prozentsatz an identischen Nukleotiden.

Klon ¹	Seq.-Länge ² [nt]	mögliche Funktion (BlastN im <i>TIGR-Barley-Gen-Index</i>) ³	Signifikanz ³	Identität bp/bp [%] ³
PC1Aa2	339	Photosystem II thylakoid Membrane Protein	8,6e ⁻⁷²	338/339 (99%)
PC1Ag3	546	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	2,6e ⁻¹¹⁸	544/546 (99%)
PC1Ah5	531	Photosystem II Phosphoprotein psbH - chloroplast (<i>Secale cereale</i>) cytochrome b6	3,7e ⁻⁸⁶ 1,0e ⁻²⁴	461/515 (89%) 135/139 (97%)
PC1Bb11	298	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	2,6e ⁻⁶²	296/298 (99%)
PC1Bd6	252	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	6,3e ⁻⁵²	250/252 (99%)
PC1Db12	252	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	9,7e ⁻⁵³	252/252 (100%)
PC1Eb1	324	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	1,4e ⁻⁶⁸	323/324 (99%)
PC1Eb2	439	<i>Zea mays</i> , Chloroplast rRNA-Operon	6,6e ⁻⁵⁶	266/266 (100%)

¹ richtet sich nach der Benennung des cDNA-Klons in der cDNA-Bank

² Längen beziehen sich auf die sequenzierte Größe der Insertionen ohne Vektor und Primer-Sequenz

³ Stand August 2005. BlastN-Suche erfolgte im HvGI der TIGR-Datenbank (www.tigr.org)

Um spezifische Klone mit Genen in den cDNA-Banken anzureichern, welche an der Resistenzausbildung in Blättern *P. indica*- besiedelter Pflanzen involviert sein könnten, wurden zwei neue SSH-Banken hergestellt. In diesen beiden Ansätzen sollte der Unterschied der Expression von den gegen Mehltau anfälligeren mykorrhizierten Pflanzen und den gegen Mehltau resistenteren *P. indica*-besiedelten Pflanzen analysiert werden (Abb. 3-25). Zum einen wurde cDNA aus den Blättern mykorrhizierter *Glomus mosseae*-besiedelter

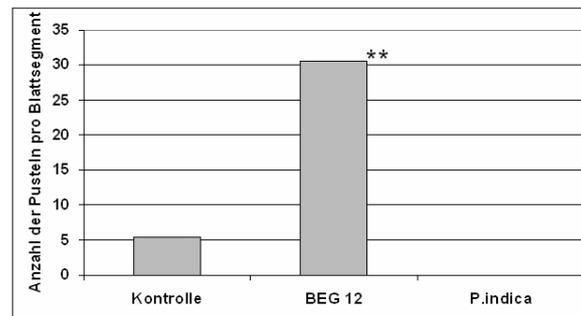


Abb. 3-25: Bgh-Anfälligkeit von Blättern mykorrhizierter Pflanzen und *P. indica*-besiedelten Pflanzen gegenüber Kontrollen

Getestet wurde die *Bgh*-Anfälligkeit *Glomus mosseae*- (BEG 12) und *P. indica* besiedelter Pflanzen gegenüber Kontrollen. Dargestellt ist das Mittel der Anzahl der Pusteln pro Blattsegment. Je Prüfglied wurden zehn Blattfragmente in die Auswertung einbezogen. In diesem Experiment befanden sich auf keinem Blatt der *P. indica*-besiedelten Pflanzen Pusteln. (Material wurde von Helmut Baltruschat zur Verfügung gestellt).

Kontrollpflanzen von der cDNA aus den Blättern der *P. indica*-besiedelten Pflanzen subtrahiert (SSH 2). Dieser Ansatz sollte dazu dienen, in der *Bgh*-Interaktion (24h

nach Inokulierung) in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen stärker induzierte Gene als in den in dieser Interaktion anfälligeren Blättern mykorrhizierter Pflanzen zu finden. Mit diesem Ansatz könnten auch Gene identifiziert werden, die in der *Bgh*-Interaktion auf mykorrhizierten Pflanzen supprimiert sind. Nach Subtraktion und Klonierung wurden 288 Transformanten zur weiteren Analyse vereinzelt, 161 Insertionen mittels PCR amplifiziert und mit Hilfe von reversen Northern Blot Analysen überprüft. Als dritte Subtraktion (SSH 3) wurde cDNA aus den Blättern der *P. indica*-besiedelter Pflanzen von der cDNA aus den Blättern der mykorrhizierter Pflanzen subtrahiert, um stärker induzierte Gene in der Interaktion mit Mehltau in mykorrhizierten Pflanzen zu identifizieren, wie z.B. induzierte Suszeptibilitäts- oder reprimierte Resistenzfaktoren. Von dieser Subtraktion wurden ebenfalls ~61 Klone mittels

reversen Northern Blot analysiert. Da in der ersten subtraktiven Bank bereits aufgefallen war, dass viele Klone Fragmente der großen Untereinheit der RubisCO enthielten, wurden zur Kontrolle die subtrahierte und die nicht subtrahierte cDNA der beiden neuen SSHs auf Membranen gebracht und mit einer Sonde des gesamten Gens für die große Untereinheit der RubisCO hybridisiert (Abb. 3-26). Dies zeigte eine spezifischere und geringere Hybridisierung in der subtrahierten cDNA als in den nicht-subtrahierten Kontrollen. Trotzdem konnten auch nach Subtraktion noch hybridisierende Fragmente beobachtet werden.

Aus diesem Grund wurde die RubisCO-Sonde auch für die Hybridisierung der reversen Northern Blot Membranen verwendet. Starke Signale mit dieser Sonde deuteten auf RubisCO-Fragmente hin. Schließlich wurden 6 Klone der SSH2 und 7 Klone aus der SSH3 zur Sequenzierung ausgewählt (Tab. 3-5).

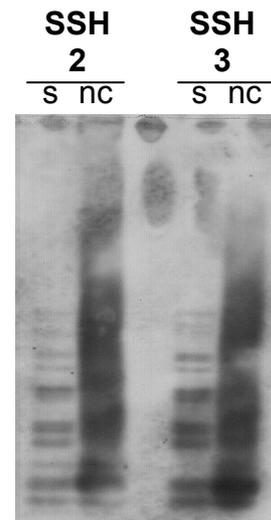


Abb. 3-26: Überprüfung der SSH-Banken 2 und 3 auf Ribulose-bis-phosphat-Carboxylase (RubisCO)-Transkripte

Dargestellt ist das Ergebnis der Hybridisierung der subtrahierten (s) und nicht-subtrahierten cDNA (nc) der SSH-Banken 2 und 3 mit einer Sonde des Gens für die große Untereinheit der Ribulose-bis-phosphat-Carboxylase (RubisCO) aus Gerste.

Ergebnisse

Tab. 3-5: cDNA-Klone potentiell differentiell exprimierter Gene in Blättern *P. indica*-besiedelter bzw. mykorrhizierter Pflanzen unter dem Einfluss von *Bgh*. cDNA von Blättern *P. indica*-besiedelter und *Bgh* inokulierter Pflanzen (24h) wurden subtrahiert von cDNA aus Blättern mykorrhizierter (BEG12) und *Bgh* inokulierter Pflanzen (SSH2). Diese Subtraktion wurde auch in die gegensätzliche Richtung durchgeführt (SSH3). Dargestellt sind Sequenzen von Klonen aus diesen beiden Subtraktionen, die entweder an die komplexe cDNA-Sonden der *Bgh*-inokulierten Blätter *P. indica*- (*), bzw. *G. mosseae*- (**), besiedelter Pflanzen stärker hybridisierten. Angegeben sind die Sequenz-Längen, die mögliche Funktion des jeweiligen Gens, die durch eine BlastN Suche im *TIGR-H. vulgare*-Gene-Index (HvGI) ermittelt wurden sowie die zugehörige Signifikanz und der Prozentsatz an identischen Nukleotiden.

Klon ¹	Länge [nt] ²	mögliche Funktion (BlastN im <i>TIGR-Barley-Gen-Index</i>) ³	Signifikanz ³	Identität bp/bp [%] ³
P+B+Icb5*	462	<i>Solanum nigrum</i> chloroplast tRNA-Ala, tRNA-Ile, 16S rRNA, tRNA-Val, <i>rps12</i> , <i>rps7</i> , <i>ndhB</i> Gene	2,9e ⁻⁵³	256/256 (100%)
P+B+Icb12*	465	ATP-Synthase C Kette (Lipid-bindendes Protein) (Untereinheit III)	1,6e ⁻⁸⁷	421/443 (95%)
B+P+1Ag1*	221	Maturase K	1,9e ⁻⁴³	214/214 (100%)
P+B+1Be6**	702	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	4,3e ⁻¹⁵³	700/703 (99%)
P+B+1Bf11**	442	F1F0-ATPase Inhibitor Protein	1,9e ⁻⁴⁶	226/227 (99%)
P+B+Ice8 **	806	Maturase K	1,7e ⁻¹⁶⁹	782/807 (96%)
P+B+Ice10**	734	Photosystem II 10 kDa Polypeptid	5,3e ⁻¹³¹	625/653 (95%)
B+P+1Ac3**	484	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	3,5e ⁻¹⁰¹	255/257 (99%)
B+P+1Ae6**	627	Photosystem II thylakoid membrane protein	1,8e ⁻¹²⁸	589/590 (99%)
B+P+1Af9 **	252	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase/oxygenase, große Untereinheit	9,7e ⁻⁵³	252/252 (100%)
B+P+1Bb9**	188	Entwicklungsspezifisch reguliertes GTP-bindendes Protein 2 (DRG 2)	7,5e ⁻³⁸	188/188 (100%)
B+P+1Bc5**	472	ATP-Synthase C Kette (Lipid-bindendes Protein) (Untereinheit III)	3,5e ⁻⁸⁶	419/446 (93%)
B+P+Ibh1 **	295	Unbekannte Funktion	0,00020	124/194 (63%)

¹ richtet sich nach der Benennung des cDNA-Klons in der cDNA-Bank, Sequenzen

² Längen beziehen sich auf die sequenzierten Insert-Größen ohne Vektor und Primer-Sequenzen

³ Stand August 2005. BlastN-Suche erfolgte im HvGI der öffentlich zugänglichen TIGR-Datenbank (www.tigr.org)

* stärker induziert in Blättern *Bgh*-inokulierter *P. indica*-besiedelter Pflanzen

** stärker induziert in Blättern *Bgh*-inokulierten mykorrhizierten-(BEG12) Pflanzen

Durch die subtraktiven Hybridisierungen wurden viele Fragmente der großen Untereinheit der RubisCO aus *H. vulgare* erhalten. Andere Sequenzen zeigten Identität zu Genen, deren Produkte am Energiestoffwechsel der Pflanzen beteiligt sind. Viele diese Gene sind im Chloroplastengenom kodiert.

3.4.3.2 cDNA-Array Analysen

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression standen zwei unterschiedliche Arrays aus *Hordeum vulgare* zur Verfügung. Zum einen der GAN-1,5K-cDNA-

Makroarray, welcher 1536 cDNA-Fragmente trägt. Von diesen stammten 1344 aus einer cDNA-Bibliothek (GAN), die RNA hierfür wurde aus Gerstenepidermen nach Behandlung mit BTH isoliert (Eichmann et al., 2006). Zusätzlich befanden sich auf diesem Array Genfragmente von 192 gezielt ausgesuchten Klonen, welche entweder als Pathogen-responsiv oder als chemisch induzierbar charakterisiert waren (Beßer et al., 2000; Hückelhoven et al., 2001; Eckey et al., 2004; Jansen et al., 2005). Zur Herstellung dieses Arrays wurden PCR-Fragmente der cDNA-Klone in jeweils zwei Kopien mit den Nylonmembranen quervernetzt. Aufgrund der Dichte, mit welcher die Fragmente auf die Membranen aufgebracht waren, spricht man bei diesem Array von einem Makroarray.

Zum anderen wurde der kommerziell erhältliche 22K *Barley1 GeneChip*[®] (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) für Hybridisierungsexperimente verwendet. Das Konzept zur Herstellung dieses Arrays resultierte aus einem Modell für Pflanzen ohne bisher vollständig sequenziertes Genom. Er wurde auf der Basis von 350 000 hochqualitativen ESTs aus 84 cDNA-Bibliotheken und zusätzlichen 1145 Gerste-Genom-Sequenzen aus dem *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) entworfen. Der Array repräsentiert insgesamt 22840 Sequenzen und deckt damit einen großen Teil des Gerstengenoms ab. Entgegen dem relativ kleinen, oben beschriebenen GAN-Makroarray handelt es sich bei diesem Arraytyp um ein Olinukleotid-Mikroarray. Durch eine solche Mikroarraytechnologie wird eine hohe Spezifität der Hybridisierung gewährleistet und es werden sehr spezifische Expressionsstudien von tausenden von Genen gleichzeitig möglich.

Zur Hybridisierung der Arrays wurde in dem hier untersuchten System für die Identifizierung von systemisch differentiell regulierten Genen sowohl cDNA aus Blättern *P. indica*-besiedelter als auch nicht besiedelter Kontrollpflanzen verwendet. Um auch das Phänomen des *Priming* zu untersuchen (Kap. 3.4.2), wurde zusätzlich Material *Bgh*-besiedelter und nicht-besiedelter Pflanzen (12 h nach Inokulation) in die Hybridisierungsexperimente mit einbezogen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Appressorium des Pathogens gebildet und die Penetration beginnt. Die Pflanzen ohne Pathogenbehandlung wurden zur gleichen Zeit wie die infizierten Pflanzen geerntet und unter gleichen Bedingungen kultiviert.

Durch die Verwendung der vier unterschiedlichen Ansätze ließen sich verschiedene Vergleiche durchführen (Abb. 2-4, Tab. 3-6, Abb. 3-27). Auf der Basis dieser

Vergleiche konnte auf die mögliche Rolle der Gene in der durch *P. indica*-induzierten Resistenz zurückgeschlossen werden.

Tab. 3-6: Dargestellt sind die Möglichkeiten der Vergleiche von Array-Hybridisierungen aus den vier verwendeten Materialien. Es wurde Material aus Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen (P) und nicht-besiedelter Kontrollen (K) für die Hybridisierungen der Makroarrays eingesetzt, von denen eine Hälfte zusätzlich mit *Bgh* inokuliert wurde (*PBgh*, *KBgh*). In der ersten Spalte finden sich die Kurzbenennungen der Vergleiche, welche ausführlich in der mittleren Spalte benannt sind. In der letzten Spalte ist der ursächliche Faktor der Regulation in dem jeweiligen Vergleich angegeben.

Benennung	Vergleich	Regulation
P-K	<i>P. indica</i> ↔ Kontrolle	<i>P. indica</i>
<i>Bgh</i> -K	Kontrolle + <i>Bgh</i> (12h) ↔ Kontrolle	<i>Bgh</i>
<i>PBgh</i> -P	<i>P. indica</i> + <i>Bgh</i> (12 h) ↔ <i>P. indica</i>	<i>Bgh</i>
<i>PBgh</i> - <i>KBgh</i>	<i>P. indica</i> + <i>Bgh</i> (12 h) ↔ Kontrolle + <i>Bgh</i> (12h)	<i>P. indica</i> - Priming -
<i>PBgh</i> -K	<i>P. indica</i> + <i>Bgh</i> (12h) ↔ Kontrolle	- <i>P. indica</i> + <i>Bgh</i> -

Vor der Verwendung des Pflanzenmaterials zur Sondenherstellung für die Array-Hybridisierungen wurde mikroskopisch überprüft, ob die Wurzeln ein ähnliches Besiedelungsbild zeigten (Kap. 3.1, Tab. 6-1). Zusätzlich wurden zuvor Pflanzen aus den jeweiligen Experimenten im Blattsegmenttest auf ihre Anfälligkeit gegen *Bgh* untersucht und somit der Resistenzstatus der Pflanzen festgestellt. Es kam nur Pflanzenmaterial zum Einsatz, welches eine Reduktion der *Bgh*-Pustelzahl auf den Blättern besiedelter Pflanzen gegenüber den Blättern nicht besiedelter Kontrollpflanzen zeigte. Zusätzlich wurde zur Überprüfung der *Bgh*-Infektion mittels RT-PCR die Expression von *GLP-4* und *PR-5* untersucht. Da die Transkripte dieser beiden Gene schon 12 h nach *Bgh*-Infektion verstärkt nachzuweisen sind, dienten sie zur Kontrolle der *Bgh*-induzierten Genaktivierung.

3.4.3.2.1 Expressionsanalysen mittels des GAN-Makroarrays

Die Hybridisierungen der GAN-Makroarrays mit den vier unterschiedlich behandelten Proben (Tab. 3-6) wurden mit radioaktiv markierten komplexen cDNA-Sonden aus zwei biologischen Experimenten durchgeführt (34f-2004, 34g-2004, Tab. 6-1). Die Normalisierung und Auswertung der Signalintensitäten in den einzelnen Vergleichen erfolgte mittels unterschiedlicher Software-Programme (Kap. 2.10.13.3). Mit diesen wurden Kandidaten ausgewählt, deren Signale größer als 5-fach über dem Hintergrund lagen, deren Kopien auf einer Membran nicht mehr als 1,5-fach voneinander abwichen und deren Unterschied in den beiden zu vergleichenden Behandlungen größer als 2,5-fach war. Bei den durch diese vergleichenden Analysen erhaltenen Kandidaten handelte es sich um potentiell differentiell

exprimierte Gene der jeweiligen Vergleiche. Es wurden nur Gene als differentiell reguliert angesehen und in die Auswertungen aufgenommen, die in beiden biologischen Wiederholungen identifiziert werden konnten.

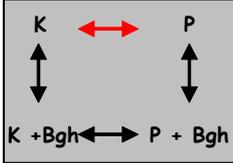
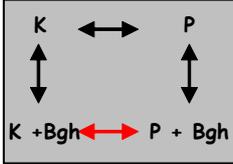
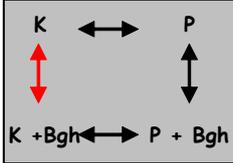
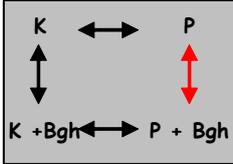
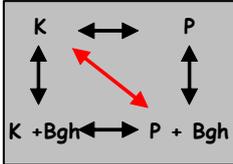
	<u>Vergleich:</u>	<u>Anzahl regulierter Gene:</u> (5-fach über Hintergr.-Sign., >2,5 fach reguliert)	<u>Regulation:</u>	
			induziert	reprimiert
	P-K	19	1	18
	PBgh-KBgh	5	1	4
	KBgh-K	15	5	10
	PBgh-P	6	4	2
	PBgh-K	18	10	8

Abb. 3-27: *P. indica* und *B. graminis* regulierte Gene. Nylonmembranen mit 1536 verschiedenen Genfragmenten wurden mit cDNA von Blättern drei Wochen alter Gerstepflanzen, die mit (P) bzw. ohne (K) *P. indica* besiedelt und jeweils zur Hälfte mit dem Blattpathogen *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* (*Bgh*) inokuliert waren, hybridisiert. Dargestellt ist die Anzahl der Gene in fünf Vergleichen, deren Signalintensitäten 5-fach über dem Hintergrundsignal und in zwei biologischen Wiederholungen mindestens 2,5-fach induziert oder reprimiert erschienen.

In den fünf Vergleichen wurden insgesamt 63 Sequenzen identifiziert, die in beiden biologischen Wiederholungen differentielle Hybridisierungsmuster zeigten. (Abb. 3-27). Die Experimente ergaben in dem Vergleich P-K (Abb. 2-4, Tab: 3-6) ein *P. indica*-induziertes und 18 reprimierte Gene. In *Bgh* inokulierten Blättern wurde durch Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* (PBgh-KBgh) ein Gen induziert und vier Gene reprimiert. Ohne *P. indica* Besiedelung (KBgh-K) zeigten fünf Gene eine durch *Bgh* - Inokulation verstärkte RNA Akkumulation, während zehn durch das Pathogen reprimiert wurden. Das Verhältnis änderte sich bei *P. indica*-Besiedelung der

Ergebnisse

Wurzeln zu vier induzierten und zwei reprimierten Genen (*PBgh-P*). Vergleich man Pflanzen, die sowohl mit *P. indica* wie auch mit *Bgh* inokuliert waren mit nicht besiedelten Kontrollen (*PBgh-K*), so konnten zehn Gene als induziert und acht als reprimiert identifiziert werden.

Der größte Teil der auf dem GAN-Makroarray vorhandenen Genfragmente war bereits sequenziert. Die vorhandenen Sequenzen der potentiell regulierten Gene wurden mit den Datenbanken *HvGI* (TIGR) und *GeneBank* (NCBI) verglichen. Unter den 63 der in den fünf Vergleichen gefundenen Genen befanden sich 40 unterschiedliche Gene, somit kamen 23 der Gene in verschiedenen Vergleichen mehrmals vor. In Tabelle 3-7 sind alle anhand der Hybridisierungen identifizierten differentiell regulierten Gene mit ihren jeweiligen Regulationen in den verschiedenen Vergleichen zusammengestellt. Die Regulation der einzelnen Gene in den verschiedenen Vergleichen ist im Überblick dargestellt. Die ausführlichen Tabellen der Einzelvergleiche der verschiedenen Prüfglieder untereinander finden sich in Tab. 6-2 im Anhang.

Tab. 3-7: Differentiell exprimierte Kandidatengene unter Einfluss von *P. indica*-Besiedelung in den Wurzeln und Infektion mit *Bgh* Aufgeführt ist die Regulation der Gene anhand der Signalintensitäten auf den Makroarrays in fünf verschiedenen Vergleichen (Abb. 2-4, Tab. 3-6). Die Pfeile zeigen Induktion (↑) bzw. Reprimierung (↓) der Gene an.

Klon [*]	mögliche Funktion ^{**}	PBgh-K	P-K	Bgh-K	PBgh-P	PBgh-KBgh
HvD00125	Keine Homologie	↑				
HvD00150	Leucin-reiche Region tragendes Protein (LRR) ¹	↑				
Hv14MK	Leucin-reiche Region tragendes extracell. Glycoprot. (LRR_c_EG) ^{1, QPCR}	↑				
HvD00155	YME1 Protein (TAT-bindendes Homolog 11)	↑				
HvD00126	Vitellogenin B1	↑				
Ta0008EX	Weizen WIR1	↓				
Hv24MK	Lipase-ähnliches Protein	↑			↑	
HvD00196	Polyubiquitin OUB2	↑			↑	
Hv0366GL	Lycopene beta-Cyclase (LBC) ^{1, QPCR}	↑		↑		
GAN001H18	ORF1	↓		↓		
HvD00154	Wiskott-Aldrich Syndrome Protein	↑		↑	↑	
GAN001M08	Arginyl-tRNA Synthetase	↓		↓	↓	
GAN001D12	Keine Homologie	↓	↓	↓		
GAN001F11	Konserviertes oligomeres Golgi-Transport Complex Protein, Untereinheit 5 (GTCP) ¹	↓	↓	↓		
Hv17MK	Chlorophyll a/b-bindendes Protein II Precursor	↓	↓		↓	↓
GAN002I14	Protein-Disulfidisomerase Precursor (PDI) ^{1, QPCR}	↑		↑	↑	↑
GAN003L11	Kohlendioxid-Anhydrase, Chloroplast Precursor (CarbAH) ¹	↓				↓
Hv0456GL	Lipoxygenase 2.1, Chloroplast Precursor		↓			
GAN003B19	Unbekannte Funktion		↓			
GAN003E17	Unbekannte Funktion – ähnlich Auxin reguliertem Protein		↓			

Ergebnisse

Klon*	mögliche Funktion**	PBgh-K	P-K	Bgh-K	PBgh-P	PBgh-KBgh
GAN003C04	Unbekannte Funktion		↓			
Ta0016EX	Pr1-1, <i>T. aestivum</i>		↑			
HvD00171	Sedoheptulose-1 7-bisphosphatase Chloropl. Prec. (SHBP) ¹		↓			
GAN004K21 ^x	Methionin Sulfoxide Reduktase A (MSR) ¹ + F6-Protein		↓			
GAN001L21	Extra-großes G-Protein (ELGP) ¹		↓			
GAN003L21	Unbekannte Funktion		↓			
GAN001L22 ^x	Frühes Nodulin + 4, Nitrophenylphosphatase		↓			
GAN002L22	Keine Homologie		↓			
GAN003F17	Keine Homologie		↓			
Hv0306GL	Chlorophyll A-B bindendes Protein des LHCII Type III		↓			
GAN003E18	Keine Homologie		↓	↓		
Hv0370GL	Fructose 1,6-bisphosphat Aldolase		↓			
GAN004E10	Extracelluläre Invertase (ECI) ^{1, QPCR}		↓		↑	
GAN004I16	Unbekannte Funktion			↑		
GAN001F12	Konserviertes oligomeres Golgi-Transport Complex Protein, Untereinheit 5			↓		
HvD00195	Polyubiquitin OUB2			↓		
GAN003K22	Unbekannte Funktion			↓		
GAN001M04	Keine Homologie			↓		
HvC200120	Keine Homologie			↑		↓
GAN003F10 ^x	Unbekannte Funktion + Chlorophyll a/b bindendes Protein			↓		↓

¹ ausgewählt zur Überprüfung der Expression zunächst mittels semiquantitativer *Two-Step*-RT-PCR
^{QPCR} ausgewählt zur Überprüfung der Expression mittels quantitativer *RealTime*-PCR (QPCR)

* Die Bezeichnung richtet sich nach der Benennung des cDNA-Klons in der cDNA-Bibliothek, bzw. in der Sequenzdatenbank (<https://gabi.rzpd.de>), (Eichmann et al., 2006)

** Die Homologiesuche erfolgte nach Sequenzabgleich mit dem HvGI der TIGR-Datenbank (www.tigr.org), mögliche Funkt.-Angabe nach dortiger Identität und Annotierung (Tab. 6-2)

^x Diese Klone tragen zwei verschiedene Sequenzen.

3.4.3.2.2 RT-PCR Analysen ausgewählter Kandidatengene der GAN-Makroarrays

Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde zunächst die Expression einiger Kandidatengene, welche aufgrund der Funktion ihrer Geneprodukte interessant sein könnten oder welche eine interessante Regulation zeigten, mittels RT-PCR untersucht (grau hinterlegte Sequenzen in Tab. 3-7). Darunter befand sich die Sequenz eines chimären Klons, dessen abgeleitete Aminosäuresequenz einerseits Homologie zu einer Methionin-Sulfoxidreduktase (MSR), andererseits zu einem F6-Protein zeigte. Zwei weitere Gene kodierten wahrscheinlich für ein *extra großes-G*-Protein (ELGP) und für eine extrazelluläre Invertase (ECI). Alle drei Gene waren in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen schwächer exprimiert. Das Gen für die extrazelluläre Invertase zeigte eine interessante Regulation, da sie ähnlich dem Gen für eine Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (HvD00171) durch *P. indica* alleine

reprimiert wurde, auf den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen durch *Bgh*-Infektion aber induziert war. GAN002I14 (*PDI*) und GAN1131 (*GTCP*) zeigten sowohl auf Kontrollpflanzen, als auch auf *P. indica*- besiedelten Pflanzen eine deutliche Regulation durch *Bgh*. Anhand der Hybridisierungsmuster handelte es sich bei dem *PDI* zusätzlich um einen *Priming*-Kandidaten, da seine Induktion durch *Bgh* auf *P. indica* besiedelten Pflanzen stärker war als auf den nicht-besiedelten Pflanzen (Tab. 6-2). Auch bei den fünf folgenden Genen (Hv24MK: Lipase-ähnliches Protein, GAN003L11: *Kohlendioxid-Anhydrase, Chloroplast Precursor*, Hv0366GL: *Lycopene beta-Cyclase*, HvD00150: *Leucin-Reiche Region (LRR)-tragendes Protein*, Hv14MK: *Leucine-reiche Region (LRR)-tragendes extracell. Glycoprot*) könnten die Regulationsmuster auf einen *Priming*-Effekt hindeuten. Die semiquantitativen RT-PCR Experimente mit RNA aus den beiden Materialien, welche auch für die Array-Hybridisierungen verwendet wurden (34f-2004 und 34g-2004), konnten allerdings nur für die Gene, die für eine Protein-Disulfidisomerase (*PDI*), ein leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein (*LRR_c_EG*) und für ein LRR-Protein kodierten, eine Induktion durch *Bgh* bestätigen (Abb. 3-28).

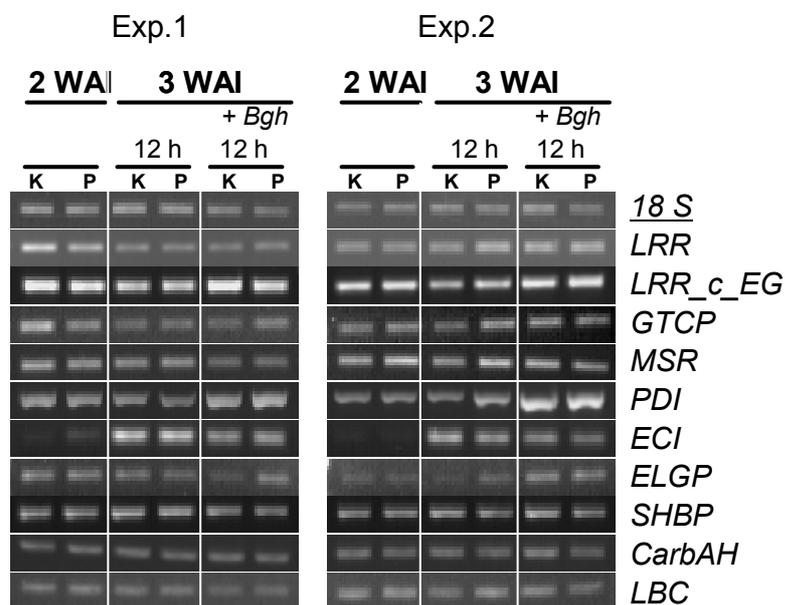


Abb. 3-28: RT-PCR Analysen von Kandidatengenen der Hybridisierungsexperimente des GAN-Makroarray

In semiquantitativen RT-PCR Experimenten mittels genspezifischer Oligonukleotide wurde die Transkriptmenge von Kandidatengenen des GAN-Makroarrays in den Blättern zwei (2WAI) bzw. drei (3WAI) Wochen alter *P. indica*-besiedelter (P) als auch nicht-besiedelter Kontrollpflanzen (K) untersucht. Zusätzlich wurde für den 3WAI-Zeitpunkt die Expression der Gene in den Blättern 12h nach Inokulation mit dem Pathogen *B. graminis* überprüft. Für die cDNA-Synthese wurden Hexamer-Oligonukleotide eingesetzt, um die 18S-rNA Akkumulierung zur Kontrolle zu ermöglichen. Die Benennung der Gene und ihre Regulation in den Hybridisierungsexperimenten der Arrays sind in Tab. 3-8 hervorgehoben. (Versuchsmaterial: 34f-2004 (Exp.1), 34g-2004 (Exp.2))

Ansonsten wurde mittels der semiquantitativen RT-PCR bei keinem der Gene, weder durch *P. indica*-Besiedelung noch durch *Bgh*-Infektion, eine deutliche Regulation festgestellt.

Drei der Kandidatengene wurden zusätzlich mit Hilfe der quantitativen *RealTime*-PCR in vier biologischen Wiederholungen (34f-2004, 34g-2004, 34j-2004 und 34k-2004, Tab. 6-1) untersucht (Abb. 3-29).

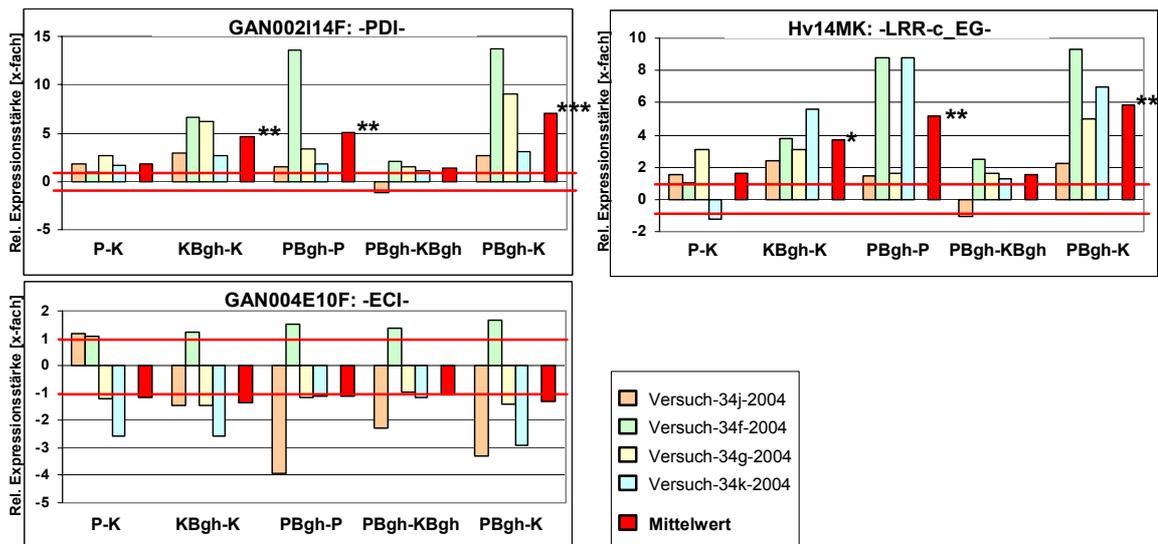


Abb. 3-29: *RealTime*-PCR Analyse von Kandidatengenen der GAN-Makroarrays

Drei Gene, welche auf dem GAN-Makroarray ein interessantes Expressionsmuster zeigten, wurden in ihrer Expression in Material von vier Versuchen untersucht; eine Protein-Disulfidisomerase (PDI), ein leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein (LRR_c_EG) und eine extrazelluläre Invertase (ECI). Das Material 34f-2004 und 34g-2004 wurde bereits für die Hybridisierung der Membranen verwendet. Bei den Versuchen 34j-2004 und 34k-2004 handelt es sich um biologisch unabhängige Materialien. Gezeigt werden die x-fachen Expressionsstärken der Gene in fünf verschiedenen Regulationsvergleichen (Tab. 3-7) Pro Vergleich ist die Expressionstärke in jedem der vier Versuchsmaterialien gezeigt. Der letzte Balken in dem jeweiligen Vergleich gibt jeweils den Mittelwert mit Signifikanz (Grenzwertdifferenz(LSD): * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$) an. Die hervorgehobenen (roten) horizontalen Linien geben den Schwellenwert von 1-facher bzw. -1-facher Regulation an. Zur Kalibrierung diente die Transkriptmenge von 18S-rDNA in der mittels *random* Hexamer-Oligonukleotide hergestellten cDNA der Blätter.

Die Induktion der Protein-Disulfidisomerase (*PDI*) 12 h nach Infektion mit *Blumeria graminis* konnte sowohl in Blättern von Kontrollpflanzen als auch in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen bestätigt werden. Erkennbar sind allerdings stärkere Schwankungen in den einzelnen Versuchen auf den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. Eine signifikante Regulation durch den Wurzelendophyten alleine sowie auf dem Hintergrund der *Bgh*-Inokulation, dem direkten *Priming*-Ansatz (PBgh-KBgh), wurde nicht festgestellt. Beim Vergleich der Transkriptmengen in Blättern *P. indica*-besiedelter und *Bgh*-inokulierter Pflanzen mit denen in Blättern von unbehandelten Kontrollpflanzen (PBgh-K) zeigte sich aber über alle Experimente

eine signifikante Induktion. Dieser Kandidat PDI wurde auch gewählt, da sich in den Arrayexperimenten eine stärkere Induktion dieses Gens durch *Bgh* in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen (PBgh-P) als in denen der Kontrollpflanzen (KBgh-K) zeigte. Aufgrund der Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten wurde dies mittels der *RealTime*-PCR nicht eindeutig bestätigt. Nur in dem Versuch 34f-2004 konnte eine solche Regulation nachgewiesen werden. Hier wird der sogenannte *Priming*-Effekt sichtbar. Für das Gen *LRR_c_EG* zeigte sich in der *RealTime*-PCR ein ähnliches Bild. Auch dieses Gen war in den Vergleichen KBgh-K und PBgh-P eindeutig induziert, allerdings auch im Vergleich PBgh-P stärkeren Schwankungen in der Regulation unterworfen. In dem Vergleich PBgh-K ließ sich die signifikante Induktion bestätigen. In drei von vier Versuchen zeigte sich auch in dem Vergleich PBgh-KBgh eine leichte Induktion, welche allerdings im Mittel nicht signifikant war. Eine schwache Induktion nur durch *P. indica* konnte in zwei von vier Versuchen beobachtet werden. Für die Expression des Gens für die extrazelluläre Invertase konnte keine signifikant differentielle Regulation festgestellt werden.

3.4.3.2.3 Expressionsanalysen mittels des 22K *Barley1 GeneChip*[®]

Der 22K *Barley1 GeneChip*[®]-Mikroarray basiert auf EST- und genomischen Sequenzen, die verschiedenen Qualitäts- und Spezifitätstests unterzogen waren. Jede einzelne Sequenz wird durch einen Satz an Oligonukleotiden repräsentiert, welcher aus elf Paaren von 25-mer Oligonukleotiden besteht. Jedes Paar besteht wiederum aus einer *Match*- und einer *Mismatch*-Sequenz, welche sich nur in einer Base an Position 13 des 25-mers unterscheiden. Die Höhe der Hybridisierung zu diesen *Mismatch*-Sequenzen gibt ein Maß für die Nicht-Spezifität und das Hintergrundsignal. Um räumliche Fehler in den Signalen auszuschließen, wurden diese elf Oligonukleotidpaare zufällig über den Array verteilt. Dieser spezielle Aufbau des Arrays und die große Anzahl an Signalen für eine Sequenz erlauben mit Hilfe statistischer Verfahren hoch signifikante Expressionsanalysen über eine sehr große Anzahl an Genen. Der Einsatz hochspezifischer kurzer Oligonukleotide minimiert außerdem das Risiko möglicher Kreuzhybridisierungen, wie sie bei einem cDNA-Makroarray eher auftreten können. Auch geringe Expressionsunterschiede können dadurch ermittelt werden.

Die Auswertungssoftware bedient sich dreier Algorithmen um die Regulationsaussagen statistisch abzusichern: dem *Detection-Call*, dem *Change-Call* und dem *Fold-Change* (Kap. 2.10.14.2). Der *Detection-Call* für einen jeweiligen

Oligonukleotidsatz bezieht sich auf die Hybridisierungsverteilung an die *Match*- und die *Mismatch*- Sequenzen und erlaubt so die Aussage für ein bestimmtes Transkript: anwesend (P), schwach (M), oder abwesend (A). Um Unterschiede in der Genexpression durch die verschiedenen Behandlungen zu detektieren, werden die Verhältnisse der jeweiligen Signalintensitäten verglichen. Hierüber trifft der *Change-Call* eine statistische Aussage. Für jeden Vergleich gibt es fünf mögliche *Change-Calls*: Induziert (I), schwach Induziert (MI), kein Unterschied (NC), schwach Reprimiert (MD) und Reprimiert (D). Der *Change-Call* beschreibt somit ein qualitatives Maß bezüglich Induktion oder Repression eines bestimmten Transkriptes aufgrund der verschiedenen Behandlungen. Der letzte Signifikanz-Algorithmus dient der vergleichenden Quantifizierung der Transkriptmenge und resultiert letztendlich in der Rubrik *Fold Change* (FC). Da diese drei Kriterien, nach welchen die Software analysiert, unabhängig voneinander berechnet werden, machen sie eine detaillierte Auswertung möglich. Für robuste Unterschiede ist es entscheidend, alle drei Kriterien in Verbindung zu betrachten. Die bisher besprochenen Kriterien gelten für den Einzelvergleich von zwei Arrays.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für die Hybridisierung dieser Arrays cDNA der vier verschiedenen Behandlungen aus drei biologischen Wiederholungen (34f-2004, 34g-2004, 34j-2004) markiert und jeweils ein Array damit hybridisiert. Nach Normalisierung wurden die Signale der 12 Arrays unter den unterschiedlichen Aspekten der Regulationen (Vergleiche: P-K, KBgh-K, PBgh-P, PBgh-KBgh; Tab. 3-6) mittels der oben beschriebenen Signifikanzanalysen ausgewertet. Da in den untersuchten Versuchsansätzen je Vergleich und Behandlung jeweils drei unabhängige biologische Wiederholungen in die Auswertungen eingingen, war es möglich, neun paarweise Einzelvergleiche durchzuführen und somit neun *Change Calls* in einem Vergleich zu erhalten (Abb. 3-30).

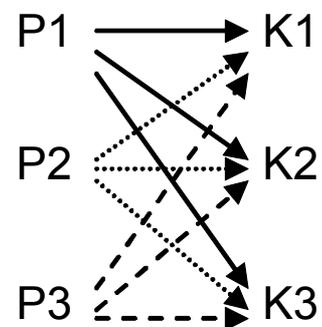


Abb.3-30: Matrix der paarweisen Vergleiche über drei biologische Wiederholungen der Barley1-Mikroarray-Hybridisierungen

Dargestellt sind die möglichen paarweisen Vergleiche innerhalb der drei verschiedenen Materialien aus drei biologischen Wiederholungen. Für die Hybridisierungen der Arrays wurde Material der drei Versuche, 34f-2004 (1) 34g-2004 (2) und 34j-2004 (3) verwendet. Jede Behandlung (Experiment-Array) (hier P für *P. indica*) wurde mit jeder der drei unbehandelten Referenzen (*Baseline*-Arrays) (hier K für Kontrolle) verglichen. Daraus resultieren neun Einzelvergleiche.

Basierend auf der statistischen Analyse dieser neun Einzelvergleiche konnten Veränderungen der jeweiligen Transkriptmengen ermittelt werden.

Abbildung 3-31 zeigt das Ergebnis der Hybridisierungsexperimente über die drei Versuche und vier verschiedenen Vergleiche. Unter dem stringenten Kriterium, nur Gene, die in allen Wiederholungen signifikante Signale ergaben (*Detection-Call*: anwesend) und neun gleiche Regulationen (*Change-Call*) in den möglichen paarweisen Einzelvergleichen (Abb. 3-30, Tab. 3-6) in die Auswertung aufzunehmen zeigten sich weder in dem Vergleich P-K, noch dem Vergleich PBgh-KBgh *P. indica* regulierte Gene (Abb. 3-31). Allerdings konnten 176 durch *Bgh* potentiell differentiell regulierte Gene identifiziert werden. 134 dieser Gene waren induziert, 42 Gene reprimiert. Diese Anzahl entsprach einem Anteil von 0,8 % der repräsentierten Sequenzen auf dem Array. Unter diesen befanden sich bekannte aber auch bisher unbekannte *Bgh*-regulierte Gene (Tab. 6-3). Interessanterweise konnten unter diesen stringenten Kriterien in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen nur 16 Gene nach *Bgh*-Behandlung als reguliert beobachtet werden (Abb. 3-31).

Die geringe Menge an Kandidaten unter den oben genannten stringenten Analysebedingungen ließ es daher für sinnvoll erscheinen, die Stringenz etwas zu reduzieren, um zum einen mehr Kandidaten zu bekommen und zum anderen die Regulation einzelner Kandidaten aus einzelnen Vergleichen in allen anderen Vergleichen zu analysieren. Auch nach Angaben des Herstellers der Arrays können bei mehreren biologischen Wiederholungen die Kriterien dafür, ein Gen als reguliert anzusehen, weniger streng gehandhabt werden. Daher wurde in einer zweiten Analyse der Schwellenwert des *Change Calls* von 9 auf 6 reduziert. In Abb. 3-31 sind die Ergebnisse für die einzelnen Vergleiche in einer zweiten Spalte (rote Zahlen) angegeben.

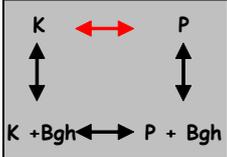
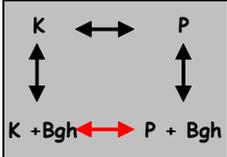
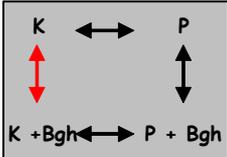
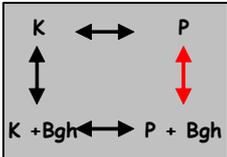
Vergleich:	Anzahl regulierter Gene:		Regulation:			
	CC in 9 Vergl.	CC in >6 Vergl.	induziert		reprimiert	
			CC in 9 Vergl.	CC in >6 Vergl.	CC in 9 Vergl.	CC in >6 Vergl.
 K-P	1	500	0 (0)	198 (19)	1 (0)	302 (8)
 KBgh-PBgh	3	493	1 (0)	247 (13)	2 (1)	246 (37)
 K-KBgh	176	967	134 (67)	504 (101)	42 (13)	463 (40)
 P-PBgh	16	434	12 (5)	308 (37)	4 (3)	126 (24)

Abb. 3-31: Differenziell regulierte Gene aus den Hybridisierungen des 22K *Barley1*-Mikroarrays (Affymetrix) in vier verschiedenen Vergleichen unter dem Einfluss der *P. indica*-Besiedelung und des Pathogens *B. graminis*

Der 22K *Barley1* GeneChip® (Affymetrix) mit 22840 verschiedenen Oligonukleotidsätzen wurde mit cDNA von Blättern drei Wochen alter Gerstepflanzen mit (P) bzw. ohne (K) *P. indica*-Besiedelung oder *Bgh*-Inokulation (12h) hybridisiert. Gezeigt ist die Anzahl der Gene in vier Vergleichen, deren Signalintensitäten in 9 bzw. mehr als 6 möglichen Einzelvergleichen (*Change Calls*=CC) der jeweils drei biologischen Wiederholungen (34f-2004, 34g-2004, 34j-2004) auf eine Induktion oder Repression des jeweiligen Genes hinwiesen. Die Anzahl der Gene, welche zusätzlich im Mittelwert über alle drei biologischen Wiederholungen eine Regulation von mind. 2-facher Intensität zeigten, sind in Klammern dargestellt.

Für die weiteren Auswertungen wurden 12 Gene in ihrer Regulation genauer betrachtet, welche unter stringenten Bedingungen (9 *Change Calls*) in dem Vergleich PBgh-P induziert schienen (Abb. 3-31). In Tabelle 3-8 ist das Ergebnis der Regulation dieser Kandidaten in allen anderen Vergleichen dargestellt. Interessanterweise konnte bei keinem dieser Kandidaten eine eindeutige Regulation durch *Bgh* in den Blättern von nicht-besiedelten Kontrollpflanzen beobachtet werden. Da die Pflanzen der KBgh- als auch PBgh-Behandlungen allerdings gleichzeitig inokuliert und geerntet wurden, dürfte somit ein Unterschied in der Reaktion gegen *Bgh* nur in der Besiedelung durch *P. indica* begründet sein. Dies deutet auf einen *Priming*-Effekt durch *P. indica* hin.

Ergebnisse

Tab.3-8: Differentiell regulierte Gene aus Hybridisierungen des 22K *Barley1 GeneChip*[®]

Mikroarrays. In einer vergleichenden Analyse wurden vier verschiedene Regulationen (Tab. 3-6, Abb. 2-2) in drei biologischen Wiederholungen mittels der Affymetrix-Software (GCOS) ausgewertet.

Dargestellt sind die Ergebnisse für 12 Oligonukleotidsätze, die unter stringenten Bedingungen eine eindeutige Induktion in dem Vergleich PBgh-P zeigten (Abb. 3-31). Zusätzlich sind die Regulationen dieser Kandidaten gleichzeitig in den anderen Vergleichen dargestellt. CI und CD geben die Anzahl an Hybridisierungsergebnissen für Induktion bzw. Repression an (*Change Calls*). FC gibt das Maß der Regulationsstärke an (*Fold Change*), wobei Ergebnisse, die über 2 liegen, farblich hinterlegt sind.

Unter Sign. werden die Ergebnisse der Signifikanztests über die Mittelwerte der drei biologischen Wiederholungen gezeigt. In der zweiten Tabelle sind die möglichen Funktionen der zu den Oligonukleotidsätzen zugehörigen Gene gezeigt.

Oligonukleotidsatz	KBgh-K				PBgh-P				P-K				PBgh-KBgh			
	CI	CD	FC	Sign	CI	CD	FC	Sign	CI	CD	FC	Sign	CI	CD	FC	Sign
Contig18399_at	3	2	1,15	None	9	0	3,07	Up	0	4	-1,25	None	7	0	2,14	None
HVSMEm0005L12r2_at	6	0	1,69	Up	9	0	2,5	Up	2	2	1,01	None	5	0	1,49	None
Contig25691_at	4	2	1,07	None	9	0	2,41	Up	1	5	-1,58	None	3	0	1,43	None
HVSMEm0005L12r2_x_at	6	0	1,54	None	9	0	2,28	Up	3	1	1	None	5	0	1,48	None
Contig13252_s_at	7	0	1,58	None	9	0	2,16	Up	3	2	-1,03	None	5	0	1,33	None
Contig21914_at	4	0	1,38	None	9	0	1,87	Up	0	0	-1,04	None	3	0	1,3	None
Contig3638_at	8	0	1,81	None	9	0	1,87	Up	6	0	1,32	None	5	0	1,36	None
Contig10245_at	7	0	1,57	Up	9	0	1,61	Up	1	0	1,08	None	2	0	1,1	None
Contig26351_at	4	2	1,09	None	9	0	1,57	Up	2	1	-1,1	None	3	0	1,31	None
Contig5597_s_at	2	2	1,14	None	9	0	1,48	Up	2	0	1,07	None	5	0	1,39	Up
Ebem05_SQ003_F24_s_at	4	1	1,19	None	9	0	1,37	Up	0	2	1,08	None	3	0	1,25	None
HVSMEm0015J04f_s_at	2	1	1,07	None	9	0	1,25	Up	1	0	1,23	None	8	0	1,43	Up

Oligonukleotidsatz	mögliche Funktion
Contig18399_at	Keine Homologie
HVSMEm0005L12r2_at	Rezeptor Proteinkinase
Contig25691_at	Keine Homologie
HVSMEm0005L12r2_x_at	Rezeptor Proteinkinase
Contig13252_s_at	Rezeptor Proteinkinase
Contig21914_at	Calmodulin ähnliches Protein
Contig3638_at	Leucin-reiche Region tragendes extracell. Glycoprot. (LRR_c_EG)
Contig10245_at	Krankheitsresistenz bezogenes Protein
Contig26351_at	Thioredoxin m2
Contig5597_s_at	Keine Homologie
Ebem05_SQ003_F24_s_at	Keine Homologie
HVSMEm0015J04f_s_at	70 kDa Peptidylprolyl Isomerase (Peptidylprolyl cis-trans isomerase) (PPIase) (Rotamase)

Interessanterweise konnte wie auf dem Makroarray auch hier im Vergleich PBgh-P ein Gen für ein LRR_c_EG-(leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein) identifiziert werden. Dieses Protein könnte ähnlich wie die Rezeptor Proteinkinase, die sogar dreimal gefunden wurde, eine Rolle in der Signaltransduktion während der Wechselwirkung von Gerste mit *Bgh* spielen. Daher wurden diese Kandidaten ausgewählt, um ihre Regulation mittels *RealTime*-PCR zu überprüfen. Das Ergebnis der genauen Quantifizierung des LRR_c_EG-Gens wurde bereits in Abb. 3-29 dargestellt.

Ergebnisse

Um weitere Kandidatengene aus anderen Regulierungsmustern zu identifizieren, die ebenfalls für den systemischen Effekt von *P. indica* interessant sein könnten, wurden auch weniger signifikante Regulationen (≥ 6 *Change-Calls*, Abb. 3-31) in die Betrachtung mit einbezogen. Die Regulation der Gene aus den einzelnen Vergleichen wurde dann zusätzlich in den anderen Vergleichen betrachtet. Aus diesen Listen (Tab. 6-3 bis Tab. 6-7) wurden neben einer oben schon erwähnten putativen Rezeptorkinase (Contig 13252_s_at) eine kleinere Anzahl weiterer interessanter Kandidatengene herausgesucht, welche auf Grund ihrer Regulation, bzw. Funktion, für die *RealTime*-PCR ausgewählt wurden (Tab. 3-9).

Tab.3-9: Differentiell regulierte Gene aus Hybridisierungen des 22K *Barley1 GeneChip*[®] Mikroarrays zur Überprüfung mittels *RealTime*-PCR Dargestellt sind die Ergebnisse für 7 Oligonukleotidsätze, die zur weiteren Überprüfung mittels *RealTime*-PCR aufgrund ihrer Funktion, bzw. Regulation gewählt wurden. Beschreibung der Tabelle s. Legende-Tab. 3.8

	KBgh-K				PBgh-P				P-K				PBgh-KBgh			
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.
Contig5494_at	9	0	3,14	Up	6	2	1,77	None	8	1	2,43	None	5	3	1,37	None
Contig2123_s_at	9	0	7,78	Up	6	1	2,77	None	8	0	2,68	None	4	4	-1,05	None
Y09233_at	0	2	-0,54	None	4	0	1,6	None	1	0	2,56	Up	6	0	4,1	None
Contig3675_at	0	6	-1,88	None	0	4	-1,53	None	0	8	-3,43	Down	0	5	-2,79	None
Contig1580_x_at	3	3	1,2	None	0	8	-6,14	Down	4	3	-2,22	None	0	7	-16,36	None
Contig13252_s_at	7	0	1,58	None	9	0	2,16	Up	3	2	-1,03	None	5	0	1,33	None
Contig17047_at	9	0	1,5	Up	5	0	1,23	None	1	1	1,36	None	0	0	1,11	None
Oligonukleotidsatz	mögliche Funktion															
Contig5494_at	Phosphoglycerat Dehydrogenase (PGDH)															
Contig2123_s_at	Peroxidase															
Y09233_at	Chalkone Synthase															
Contig3675_at	Expansin															
Contig1580_x_at	Thionin precursor, Blatt															
Contig13252_s_at	Rezeptor Proteinkinase															
Contig17047_at	Rost Resistenz Protein															

Die Gene für die Phosphoglycerat-Dehydrogenase (Contig 5494_at, PGDH) und die Peroxidase (Contig 2123_s_at) wurden gewählt, da sie 12 h nach *Bgh*-Inokulation signifikant induziert, sowie in dem Vergleich P-K, recht deutlich induziert waren. Chalkonsynthese und Expansin schienen nur durch *P. indica* systemisch reguliert zu sein. Das Gen für das Thionin zeigte ein besonders interessantes Expressionsmuster, da es nur in doppelinfizierten Pflanzen signifikant herunterreguliert wird. Das letzte Gen in der Liste (Contig17047_at) wurde schließlich auf der Basis der interessanten Homologie ausgewählt.

3.4.3.2.4 *RealTime*-PCR-Analysen ausgewählter Kandidaten der 22K *Barley1 GeneChip*[®]-Mikroarrays

Für die in Tab.3-9 aufgeführten Kandidaten wurden spezifische Oligonukleotide entworfen und in der quantitativen *RealTime*-PCR zur Überprüfung der Regulation eingesetzt. Die Regulation wurde in den fünf Vergleichen und in vier biologischen Materialien untersucht (Abb. 3-32).

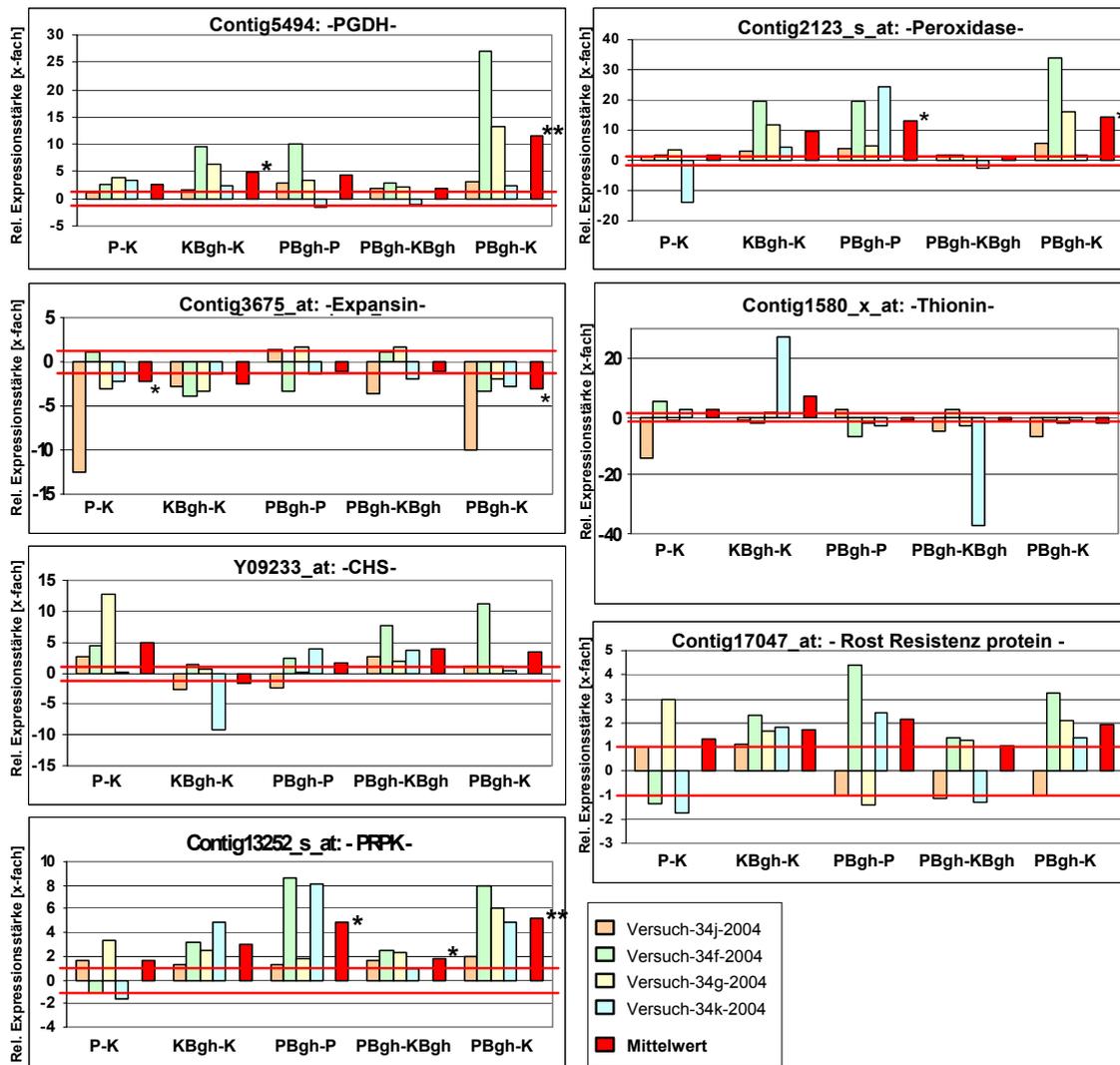


Abb. 3-32: *RealTime*-PCR Analyse von Kandidatengenen des 22K *Barley1 GeneChip*[®]

Gene, welche auf dem 22K *Barley1 GeneChip*[®]-Mikroarray ein interessantes Expressionsmuster zeigten, wurden in ihrer Expression in Material von vier Versuchen untersucht. Die Materialien 34f-2004, 34g-2004 und 34j-2004 wurden bereits für die Hybridisierung der Membranen verwendet. Gezeigt werden die x-fachen Expressionsstärken der Gene in fünf verschiedenen Regulationsvergleichen (Tab. 3-6) Pro Vergleich ist die Expressionstärke in jedem der vier Versuchsmaterialien gezeigt. Der letzte (rote) Balken in dem jeweiligen Vergleich gibt jeweils den Mittelwert an, die Sterne die entsprechenden Signifikanzen (Grenzwertdifferenz(LSD): * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$). Die hervorgehobenen (roten) horizontalen Linien markieren einen Schwellenwert von 1-facher Induktion bzw. Repression. Zur Kalibrierung diente die Transkriptmenge der 18 S rDNA.

Bei den beiden durch Contig5494 (PDGH) und Contig 2123_s_at (Peroxidase) repräsentierten Genen, welche anhand ihrer Induktion durch *Bgh* ausgewählt wurden (Tab. 3-9), konnte diese Induktion in jeweils drei Versuchen mittels *RealTime*-PCR bestätigt werden. Für das Contig5494 ergab sich in diesem Vergleich (KBgh/K) eine Signifikanz über alle Experimente. Wie schon bei der Überprüfung der GAN-Makroarraykandidaten beobachtet wurde, zeigten sich auch hier größere Schwankungen der Genregulation in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen (Vergleich PBgh-P). Eine Induktion durch *P. indica* konnte in drei von vier Versuchen für das PDGH-Gen festgestellt werden. Bei dem Peroxidasegen ließ sich keine Induktion durch alleinige *P. indica*-Besiedelung bestätigen.

Das Gen für das Expansin (Contig3675_at) zeigte geringere Transkriptmengen in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen. Signifikant war dieses Ergebnis allerdings nur in Abwesenheit des Pathogens *Bgh*, bzw. in dem Vergleich PBgh-K. Bei dem Gen für die Chalkonsynthase (Y09233_at, CHS) und bei dem *Streifen-Rost-Resistenz*-Gen (Contig17047) konnte keine signifikante Regulation festgestellt werden. Für das aus dem Vergleich PBgh-P der Array-Hybridisierungen identifizierte Rezeptor-Proteinkinasegen wurde auch in der *RealTime*-PCR-Quantifizierung eine signifikante Induktion beobachtet. In Versuch 34f-2004 und Versuch 34k-2004 zeigte sich bei diesem Gen eine stärkere Induktion durch *Bgh* auf den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen.

3.5 Einfluss der Besiedelung mit *P. indica* auf Chlorophyllgehalt und Photosyntheseleistung

Da in den molekularen Ansätzen dieser Arbeit mehrfach Gene für die Ribulose-bisphosphat-dehydrogenase und für andere Chloroplasten-kodierte Gene identifiziert werden konnten, wurde in dem in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Gefäßexperiment der Chlorophyllgehalt mit einem Absorptionsmessgerät bestimmt (Abb. 3-33). Dabei konnte zu verschiedenen Zeitpunkten in den Kultivaren Annabell und Braemar eine signifikante Erhöhung der Chlorophyllmenge durch die Besiedelung mit *P. indica* festgestellt werden. In dem Kultivar Ingrid zeigte sich diese nur in der Volldüngungsvariante NPK+ acht und neun Wochen nach Inokulation. Interessanterweise wurde bei dieser Variante zum Ende hin eine frühere Abnahme der Chlorophyllmenge beobachtet. Allerdings war diese nicht signifikant.

Ergebnisse

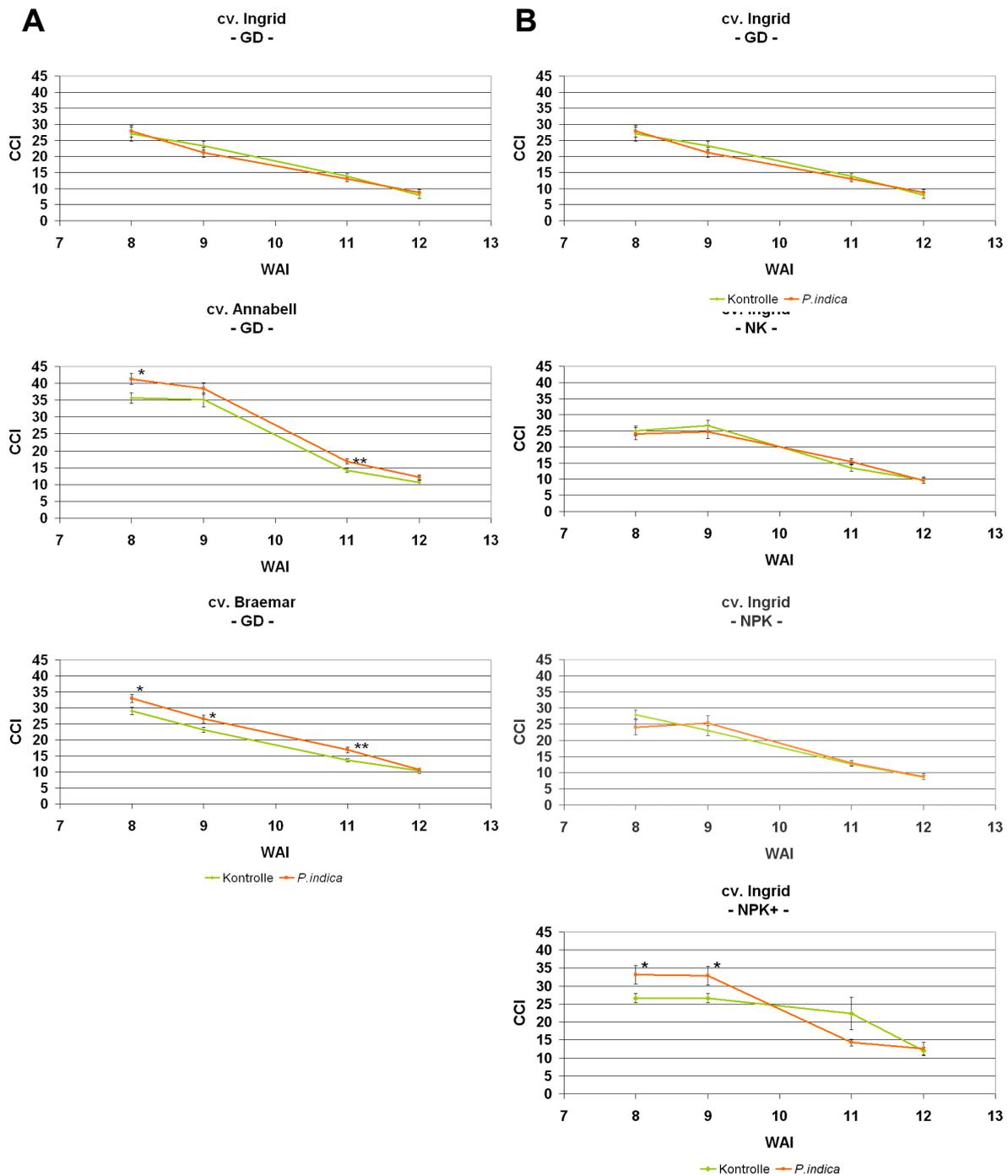


Abb. 3-33: Chlorophyllgehalt der Pflanzen in den Freilandgefäßexperimenten

Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurde der Chlorophyll-Gehalt-Index (*chlorophyll content index*=CCI) von mit *P. indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen mittels eines Absorptionsmessgerätes gemessen. Dargestellt sind pro Messzeitpunkt die Mittelwerte aus sechs bis neun Messungen pro Gefäß in sechs Wiederholungen der Kultivare Annabell und Braemar (36 Messungen) und jeweils vier Wiederholungen in dem Kultivar Ingrid (24 Messungen). Rechts (A) dargestellt sind die Ergebnisse der Kultivare in den Grunddüngungen untereinander - Links (B) die Ergebnisse der Messungen des Kultivars Ingrid in den verschiedenen Düngevarianten.

Signifikante Unterschiede zwischen allen mit *P.indica* besiedelten und nicht-besiedelten Pflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. t-Test, * = $P < 0,05$, ** = $P < 0,01$, *** = $P < 0,001$).

Neben der Chlorophyllmenge in den besiedelten Pflanzen stellte sich die Frage, ob *P. indica* auch einen Einfluss auf die Photosyntheseleistung in den Blättern der Pflanzen haben könnte. An den jüngsten Blättern von drei Wochen alten Pflanzen wurde hierfür im Gewächshaus die Photosyntheserate bei verschiedenen Lichtintensitäten bestimmt. In zwei Vorversuchen konnten Tendenzen einer leichten Erhöhung der Photosyntheserate in den jüngsten Blättern festgestellt werden. Aufgrund der schnellen Reaktion der Photosynthese auf äußere physiologische Umstände, die auf Grund der generellen Änderungen der Photosyntheseraten über den Tag, auch durch die Messungen verursacht werden können, war es nötig, an jedem Tag einer Messung Lichtsättigungskurven zu erstellen. Um eine statistische Aussage mittels Mehrfachmessungen treffen zu können und auftretenden Stress der Pflanzen zu vermeiden, wurden in einem weiteren Experiment jeweils mehrere Pflanzen unter steigenden Lichtintensitäten vermessen und eine Lichtsättigungskurve erstellt (Abb.3-34).

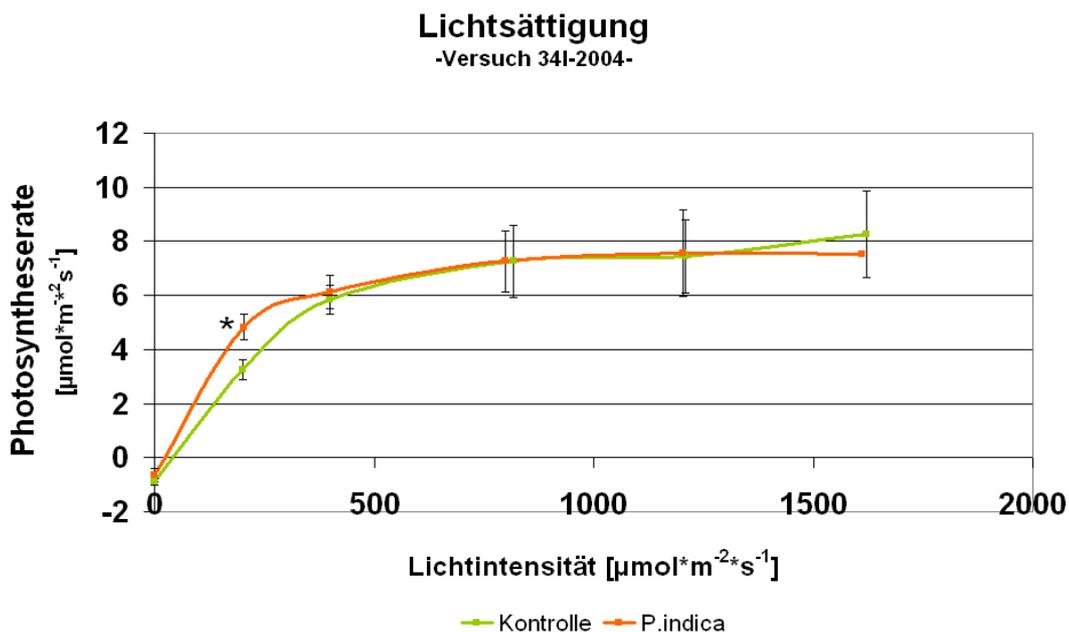


Abb.3-34: Lichtsättigungskurve des dritten Blattes von Gerstepflanzen

Dargestellt sind Lichtsättigungskurven von Blättern *P. indica* besiedelter bzw. nicht-besiedelter Kontrollpflanzen. Gemessen wurden die jüngsten vollentwickelten Blätter von drei Wochen alten Pflanzen. Im Graph sind die Mittelwerte der Photosyntheserate über mehrere Messungen in Abhängigkeit von der Lichtintensität mit den zugehörigen Standardabweichungen aufgetragen. Signifikanzen zwischen *P. indica* besiedelten (*P. indica*) und nicht-besiedelten (Kontroll)-Pflanzen sind gezeigt (ungepaarter Student. T-Test, *= $P < 0,05$, **= $P < 0,01$).

Anhand der Standardabweichungen ist zu erkennen, dass die einzelnen Messungen starken Schwankungen unterworfen sind. Es zeigte sich aber in diesem Experiment bei der Lichtintensität von $200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eine signifikante Erhöhung der

Ergebnisse

Photosyntheserate in den jüngsten vollentwickelten Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen.

4 Diskussion

Einflüsse von Mikroorganismen, welche mit Pflanzen in Wechselwirkung treten, können sehr unterschiedlich sein. Das Spektrum von parasitären bis zu mutualistischen Interaktionstypen ist breit und äußerst vielfältig. In der Rhizosphäre sind die Pflanzen vielen dieser Mikroorganismen ausgesetzt. Manche suchen diesen Bereich des Bodens auf, um von dem größeren Nährstoffgehalt in dieser Region zu profitieren. Andere wiederum benötigen die direkte Interaktion mit der Pflanze, um ihren Nährstoffbedarf zu decken. Dabei führen sie als Pathogene entweder durch nekrotrophen Charakter das Absterben der besiedelten Zellen herbei und ernähren sich von dem toten Gewebe, oder aber sie brauchen die lebenden Zellen um ihren Nährstoffbedarf zu decken und schaden somit der Pflanze. In mutualistischen Interaktionen hingegen profitieren die Mikroorganismen nicht nur von der Pflanze, sondern sie nutzen ihr auch. Dieser positive Einfluss kann sich auf die Pflanzenernährung, die -entwicklung oder aber deren Resistenz bzw. Toleranz gegen abiotische und biotische Einflüsse auswirken (Gianinazzi et al., 1995; Azcon-Aguilar & Barea, 1996; Requena, 1997; Strack et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit dem Einfluss des Wurzelendophyten *Piriformospora indica* auf die Kulturpflanze *Hordeum vulgare* und trug dazu bei, seine Effekte auf diese Kulturpflanze zu charakterisieren. Vor allem galt es, die Auswirkungen auf den Spross zu untersuchen und die damit verbundenen molekularen Mechanismen zu identifizieren.

4.1 Besiedelung der Pflanzen durch *Piriformospora indica*

Das Wirtsspektrum des Wurzelendophyten *P. indica* wurde bereits als sehr breit beschrieben. Er besiedelt eine Reihe von dikotylen Pflanzen, wie Tabak, Petersilie, Pappel und *Medicago truncatula* (Varma et al., 1999; Achatz, 2002; Pham et al., 2004b). Aber auch monokotyle Pflanzen wie *Zea mais*, *Setaria italica* und *Oryza sativa* L. wurden bereits als Wirte identifiziert (Varma et al., 1999; Pham et al., 2004b). Entgegen den arbuskulären Mykorrhizapilzen konnte gezeigt werden, dass auch Brassicaceen und Cruziferen und somit auch der molekulare Modellorganismus *Arabidopsis thaliana* zu seinem Wirtsbereich gehören (Kumari et al., 2003; Peskan-Berghöfer et al., 2004). Der Pilz breitet sich in den Wurzeln seiner Wirte sowohl durch inter- als auch intrazelluläres Hyphenwachstum aus und bildet in

und außerhalb der Wurzel Chlamydosporen (Verma et al., 1998). Die Besiedelung beschränkt sich wie bei den arbuskulären Mykorrhizapilzen auf den äußeren Cortex der Wurzeln. *P. indica* breitet sich nicht in die oberirdischen Teile der Pflanzen aus, und diese lassen sich von ihm auch nicht besiedeln (Varma et al., 2000b).

Auch in der weltweit sehr wichtigen Kulturpflanze *Hordeum vulgare* konnte eine Besiedelung durch *P. indica* festgestellt werden. Wie in den bisher untersuchten Pflanzen waren die sehr dünnen Hyphen sowohl inter- als auch intrazellulär zu erkennen und nur auf den äußeren Cortex der Wurzeln beschränkt. Ebenso konnte die Manifestierung des Pilzes mittels deutlicher Chlamydosporen in den Zellen besiedelter Pflanzen festgestellt werden. Die Besiedlungsstärke reichte von einigen wenigen Hyphenstrukturen in den Wurzeln bis hin zu deren massiven Besiedelung, bei der die Cortezellen prall mit Chlamydosporen des Pilzes gefüllt und kaum noch Bereiche ohne Strukturen des Wurzelendophyten erkennbar waren. Die Hyphen von *P. indica* sind mit einem Durchmesser von ca. 0,7 – 3,5 µm sehr dünn (Verma et al., 1998), ca. vier- bis fünfmal dünner als die der AM-Pilze. Daher gestaltete sich die Quantifizierung der Besiedlungsstärke durch die Hyphen in den relativ feinen Gerstenwurzeln anhand mikroskopischer Analyse äußerst schwierig. Vergleichende Quantifizierungen können mikroskopisch hauptsächlich nur über die Chlamydosporendichte in den untersuchten Fragmenten und Bereichen durchgeführt werden (Bütehorn et al., 2000). Die spätere Verwendung der Pflanzen zur Untersuchung systemischer Effekte der Wurzelbesiedelung auf deren Blätter machten aber eine genaue Quantifizierung notwendig. Hierzu wurde die Methode der *RealTime*-PCR gewählt. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer hohen Sensitivität und ihrer Spezifität. Alle Handhabungsschritte nach der PCR, wie die Analyse der Amplifikate in der Gelelektrophorese, welche Ungenauigkeiten hervorrufen können, sind bei dieser Methode unnötig (Heid et al., 1996).

Identifizierungen und Quantifizierungen von pilzlichen Interaktionen mit Pflanzen mittels *RealTime*-PCR wurden in der letzten Zeit häufiger angewendet (McCartney et al., 2003; Atkins & Clark, 2004; Pico et al., 2005; Ward et al., 2005). Sogar die Möglichkeit, den Infektionsverlauf von Pathogenen über die Zeit mittels dieser Methode zu verfolgen, wurde an Rostpilzen der Gattung *Melampsora* an Pappel gezeigt (Boyle et al., 2005). Auch zur Quantifizierung von Mykorrhiza-Interaktionen in den Wurzeln von Tomate und *Medicago truncatula* diente diese Technik bereits (Alkan et al., 2003; Isayenkov et al., 2004). Für die Untersuchungen im Rahmen der

vorliegenden Arbeit wurde das *Pitef1*-Gen des Pilzes verwendet, welches für den Translationselongationsfaktor EF1 α kodiert (Bütehorn et al., 2000). Bütehorn und Mitarbeiter stellten bereits fest, dass die Transkriptmenge dieses Gens mit wachsender Besiedelung der Wurzeln über die Zeit zunimmt.

In den mikroskopisch ähnlich stark besiedelten Wurzeln von vier Versuchen konnten drei Wochen nach Inokulation mit *P. indica* nur in zwei Versuchen (34f- und 34j-2004) gleiche relative Mengen an pilzlicher und pflanzlicher genomischer DNA aber eine größere relative cDNA Menge festgestellt werden. Da die metabolische Aktivität in pilzlichen Sporen meist sehr gering ist, lässt dieses Ergebnis vermuten, dass hier entweder mehr Hyphenstrukturen des Pilzes vorhanden- oder diese metabolisch aktiver waren. Bei Versuch 34f-2004 handelte es sich um den Versuch mit der höchsten relativen cDNA-Menge. In einem anderen Versuch (34g-2004) lag sowohl die relative Menge an genomischer DNA als auch an cDNA niedriger als in diesen beiden Versuchen. Dieser Versuch zeigt somit nicht nur eine schwächere Besiedelung der Wurzeln, sondern auch eine schwächere metabolische Aktivität.

Gerade für systemische Untersuchungen der Besiedelung auf den Spross ist eine genaue Quantifizierung mit Fokus auf die Aktivität des Wurzelendophyten in der Interaktion notwendig. Da die Besiedelung, beeinflusst durch äußere Umstände und Bedingungen sich von Versuch zu Versuch stark unterscheiden kann, erscheint es wichtig, künftig die Besiedelung der Pflanzen genauer zu quantifizieren, um dadurch die Reaktionen der Pflanzen mit der Besiedelungsintensität besser korrelieren zu können. Auch wäre es von Vorteil, für die Untersuchungen ein *P. indica*-responsives Gen aus Pflanzen zu finden, um bessere Aussagen über den Interaktionsstatus der Besiedelung treffen zu können. So zeigten Isayenkov und Mitarbeiter (2004) bereits bei der arbuskulären Mykorrhiza, dass es neben der Quantifizierung der rDNA bzw. rRNA Menge des Pilzes sinnvoll ist, die Menge bestimmter pflanzlicher Gen-Transkripte zu untersuchen, um zusätzliche Information über den symbiotischen Zustand des kolonisierten Wurzelsystems zu bekommen. Sie wählten dafür das Gen *MtPT4*, welches für einen Phosphattransporter kodiert (Harrison et al., 2002) und dessen Expression wichtige Information über den Interaktionszustand geben kann (Isayenkov et al., 2004). Die Menge des Transkriptes von *MtPT4* korrelierte bei fortgeschrittener massiver Besiedelung nicht mehr mit der pilzlichen rDNA-Menge, aber mit der Menge an Arbuskeln in den untersuchten Wurzeln.

4.2 Besiedelung der Pflanzen durch *P. indica* und sein Einfluss auf die Pflanzen

4.2.1 Einfluss von *P. indica* auf das Wachstum

Die deutlichste Auswirkung von *P. indica* zeigte sich bisher in einem verstärkten Wachstum der von ihm besiedelten Pflanzenarten (Bsp. in: (Sahay & Varma, 1999; Varma et al., 1999; Peskan-Berghöfer et al., 2004)). Auch in der in dieser vorliegenden Arbeit untersuchten Interaktion von *H. vulgare* (cv. Ingrid) mit dem Wurzelendophyten *P. indica* konnte ein Einfluss auf das Wachstum festgestellt werden. Eine Korrelation zwischen Besiedelungsmuster, bzw. stärkerer Hyphen oder Chlamydosporen-Menge in den Wurzeln und dem Einfluss auf die Pflanzenlänge unter Gewächshausbedingungen war nicht festzustellen. Selbst bei geringer Besiedelung mit dem Wurzelendophyten wurde noch eine signifikante Änderung des Pflanzenwachstums beobachtet. Ebenso zeigte sich, dass die Wachstumseffekte unabhängig davon waren, ob nur Hyphen oder auch viele Sporen anwesend waren. In der Literatur werden vor allem drei Gründe für eine Wachstumsförderung von Wurzelendophyten auf ihren Wirt diskutiert, eine verbesserte Nährstoffversorgung der Pflanze durch die Mikroorganismen (Biodünger-Wirkung), ein Eingriff in den Hormonhaushalt der Pflanzen (Bioregulator-Wirkung), oder der Schutz vor biotischem als auch abiotischem Stress (Bioprotektor-Wirkung) (Gianinazzi et al., 1995; Bloemberg & Lugtenberg, 2001). Bei symbiotischen Beziehungen zwischen Pflanze und Pilz steht oft die bessere Nährstoffversorgung für die Pflanze durch den Interaktionspartner im Vordergrund. In der weit verbreiteten arbuskulären Mykorrhiza (AM) spielt beispielsweise die Nährstoffversorgung durch den pilzlichen Symbionten eine entscheidende Rolle. Die Pflanze erhält vom Pilz vor allem Phosphat, aber auch Nitrat und andere Mineralien, und stellt ihm dafür im Gegenzug Kohlenhydrate zur Verfügung (Smith & Smith, 1990). Die Absorptionsrate von wachsenden Wurzeln ist um einiges höher als die Diffusionsrate von Phosphat im Boden. Das führt zu einer Auszehrungszone um die Wurzeln und limitiert dadurch die Phosphataufnahme der Pflanze. Durch die Symbiose mit den AM-Pilzen werden den Pflanzen neue Quellen von löslichem Phosphat zur Verfügung gestellt (Karandashov & Bucher, 2005). Entgegen der arbuskulären Mykorrhizasymbiose liegt der Schwerpunkt der Untersuchungen der Ektomykorrhiza vorwiegend auf der Versorgung mit Stickstoff (Smith & Smith, 1990; Selle et al., 2005). Auch in den mutualistischen Interaktionen von Pflanzen mit knöllchenbildenden Rhizobien und anderen stickstofffixierenden

Rhizobakterien ist oftmals Stickstoff die Komponente, die der Pflanze zugeführt und besser zugänglich gemacht wird (Mylona et al., 1995).

Phosphat und Stickstoff sind für das Wachstum und die Entwicklung von Pflanzen essentiell notwendig. Durch die oben erwähnte Auszehrungszone von Phosphat um die Wurzeln und die schlechte Löslichkeit und damit schlechte Verfügbarkeit von Stickstoff in den Böden sind solche endophytischen Wechselwirkungen für die Pflanzen von großem Vorteil. Vor allem in nährstoffarmen Böden haben die Pflanzen durch solche Interaktionen mit Wurzelsymbionten wesentliche Vorteile, was sich in einem verbesserten Wachstum der besiedelten Pflanzen äußert.

Der Mechanismus der Wachstumsförderung durch *P. indica* ist bisher unbekannt. Da eine verstärkte saure Phosphataseaktivität im Myzel von *P. indica* sowie eine Verwertbarkeit organischer als auch anorganischer Phosphatquellen festgestellt werden konnte, wurde ein positiver Einfluss durch verbesserte Phosphatversorgung diskutiert (Varma et al., 2000a; Pham et al., 2004a). In der Interaktion mit *A. thaliana* wurden von Shahollari und Mitarbeitern eine erhöhte Phosphat-Aufnahme beobachtet (Shahollari et al., 2005). Barazani und Mitarbeiter dagegen konnten in Tabak keine Veränderungen in dem Gesamt-Phosphat- als auch Stickstoffgehalt der Blätter durch Besiedelung mit *P. indica* beobachten (Barazani et al., 2005). GUS-Aktivität in Kartoffel-Wurzeln, welche ein Promotor-GUS-Reporter-Gen-Konstrukt des mykorrhizaspezifischen Phosphattransporters *StPT3* trugen, konnte nach Inokulation mit *P. indica* nicht gezeigt werden (Karandashov et al., 2004). Eine Rolle von Stickstoff in der Interaktion von *P. indica* mit *A. thaliana*, wurde von Sherameti und Mitarbeitern diskutiert. Sie konnten eine verstärkte Akkumulierung von Stickstoff und eine induzierte Expression eines Nitratreduktasegens in Wurzeln von *P. indica*-besiedelten *A. thaliana* Pflanzen zeigen (Sherameti et al., 2005). Ob die Stimulierung der Nitrat-Assimilation oder auch eine verbesserte Phosphataufnahme durch *P. indica* der Grund für die Wachstumsförderung ist, bleibt zu untersuchen. Allerdings sollte bei solchen Untersuchungen auch immer berücksichtigt werden, unter welchen Düngebedingungen sie durchgeführt werden. Außerdem sind Versuche, die nicht gleichzeitig den Wachstumszuwachs berücksichtigen, schlecht zu interpretieren.

Der Einfluss dieser beiden Hauptnährstoffe wurde auch in den Untersuchungen an *H. vulgare* in einem Gefäßexperiment unter Freilandbedingungen näher untersucht. Neben der Sorte Ingrid wurden zwei weitere Kultivare in die Untersuchungen mit einbezogen, die Sorten Braemar und Annabell. Alle drei Sommergerstensorten

wurden in einer Grunddüngung angezogen, während bei der Sorte Ingrid zusätzlich die Phosphat- und Stickstoffkonzentrationen variiert wurde, um den Einfluss dieser wichtigen Nährstoffe in dieser *P. indica* - *H. vulgare*-Interaktion zu untersuchen.

Auch unter Freilandbedingungen zeigte sich in allen drei Kultivaren eine Wachstumsförderung durch *P. indica*. Am deutlichsten war diese Wachstumsförderung bei dem Kultivar Annabell, was in diesem Versuch mit der Beobachtung korrelierte, dass die Pflanzen die deutlichste Besiedelung der Wurzeln zeigten. Auch in allen Düngevarianten bei dem Kultivar Ingrid zeigte sich ein signifikanter Einfluss der Wurzelbesiedelung auf das Wachstum der Pflanzen. Deutliche Unterschiede des Einflusses durch *P. indica* zwischen den einzelnen Düngevarianten waren allerdings nicht zu erkennen. In der Grunddüngung zeigte sich zum Zeitpunkt der Ernte kein Unterschied in der Pflanzenlänge von besiedelten zu nicht-besiedelten Pflanzen. Würde der Pflanze in dieser Interaktion ähnlich wie bei den AM-Pilzen mehr Phosphat zugeführt werden, hätte der Vorteil durch die Besiedelung mit dem Pilz an einem deutlichen Unterschied im Wachstum in der phosphatlimitierten NK-Variante erkennbar sein müssen. Solch ein verbessertes Wachstum wurde aber während der Wachstumsphase zu keinem Zeitpunkt festgestellt. Nur der letzte Messwert bis zur Grannenspitze, kurz vor dem Zeitpunkt der Ernte, zeigte eine signifikante Erhöhung der Sprosslänge der besiedelten Pflanzen unter Phosphatlimitierung. Auch in der NPK+ Variante, in der Phosphat wieder gegenüber Stickstoff geringer ist, zeigte sich diese signifikant erhöhte Pflanzenlänge der besiedelten Pflanzen. Dieses Ergebnis könnte auf einen auf Phosphat basierenden Effekt hinweisen. Auffallend war allerdings, dass während des Wachstums die stärksten Wuchsunterschiede durch *P. indica*-Besiedelung in der Volldüngevariante NPK+ festgestellt wurden. Dies lässt als hauptsächlichen Grund einen Nährstoffeffekt auf Basis von Phosphat oder Stickstoff nicht zu und spricht vielmehr dafür, dass eine verbesserte Nährstoffversorgung das Wachstum nur marginal zu beeinflussen scheint.

Neben einer guten Nährstoffversorgung spielen Phytohormone in der Regulation von Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen von Pflanzen eine große Rolle. Neben verbesserter Nährstoffversorgung könnten beispielsweise auch Veränderungen in Phytohormonkonzentrationen besiedelter Pflanzen zu dem verbesserten Wachstum führen. Eine Synthese von Phytohormonen und ein Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen durch Pilze, welche mit

Pflanzen interagieren, wurden sowohl in parasitären (Mende et al., 1997), als auch in mutualistischen Interaktionen (Barea & Azcon-Aguilar, 1982; Barker & Tagu, 2000) beschrieben. So führt beispielsweise die Abgabe von Gibberellinen durch das Reispathogen *Gibberella fujikoro* zu einer starken Verlängerung der Internodien (Mende et al., 1997) und verursacht schließlich ein Umfallen des Sprosses. Auch von Ektomykorrhizapilzen (Scagel & Linderman, 1998) und AM-Pilzen (Barea & Azcon-Aguilar, 1982) ist die Synthese von Phytohormonen beschrieben. Durch AM-Pilzinteraktionen konnten zudem eine Erhöhung des Cytokinin- und ABA-Spiegels in verschiedenen Pflanzenorganen von Moskitogras festgestellt werden (Allen et al., 1980; Allen et al., 1982). Barker et al. (2000) diskutierten den Unterschied der Rolle von Phytohormonen in der AM gegenüber der Ektomykorrhiza (Barker & Tagu, 2000). Während in der AM Cytokinin-Akkumulierung eine wichtige Rolle zu spielen scheint, ist es in der Ektomykorrhiza Auxin. Neben dem Gesamtgehalt sind vermutlich Gradienten und Verhältnisse dieser Phytohormone an der Auslösung morphologischer Veränderungen durch die pilzlichen Interaktionen maßgebend (Barker & Tagu, 2000). Hormonale Steuerungen werden in der Regel durch das Zusammenspiel mehrerer Hormone bewirkt (Borgmann, 2000a). Somit wären genaue Analysen der Phytohormone in verschiedenen Geweben und zu verschiedenen Entwicklungsstadien notwendig, um die Rolle von Phytohormonen an den durch die Besiedelung mit *P. indica* ausgelösten Mechanismen nachzuweisen.

4.2.2 Einfluss von *P. indica* auf die Entwicklung

Ein Einfluss des Pilzes auf die Entwicklung in Gerste konnte in allen drei untersuchten Kultivaren festgestellt werden. Der Zeitpunkt des Ährenschiebens trat in den besiedelten Varianten jeweils früher ein. Dies zeigte sich an der Anzahl sowie an dem Entwicklungszustand der Ähren. Dieser Effekt wurde in zwei weiteren Experimenten im Jahr 2005 bestätigt und die Tendenzen zusätzlich in den verschiedenen Düngevarianten beobachtet. Es zeigte sich dort zusätzlich eine leichte Verzögerung der Entwicklung in den phosphatlimitierten Varianten (Daten nicht gezeigt), die durch die Bedeutung dieses Nährstoffes für die Reproduktion terrestrischer Pflanzen erklärt werden kann. Im Verlauf der Entwicklung von Pflanzen trifft Mangel an einem Wachstumsfaktor stets die Organe, die sich zu diesem Zeitpunkt im Stadium der Anlage oder Ausbildung befinden (Borgmann, 2000b).

Dass der Wurzelendopyht *P. indica* die Blütenmenge beeinflussen kann, wurde bereits an den medizinischen Pflanzen *Spilanthes calva* und *Withania somnifera* im Feldversuch beobachtet (Rai et al., 2001). Besiedelte Wildtabakpflanzen zeigten ebenfalls eine vermehrte Blütenbildung. Hier konnte zusätzlich eine um zwei Tage frühere Blütenbildung festgestellt werden (Barazani et al., 2005). Ein Einfluss auf die Reproduktivität der Pflanzen ist auch für die AM-Pilze gezeigt worden (Koide, 2000). Diskutiert und erklärt wird diese Beeinflussung der Reproduktivität durch die bessere Versorgung der Pflanzen mit Phosphat und Stickstoff (Koide & Dickie, 2002).

Neben der Versorgung mit Nährstoffen spielen die Phytohormone eine entscheidende Rolle für die pflanzliche Entwicklung. Die Tatsache, dass neben der Wachstumsförderung auch ein Einfluss auf die Entwicklung der besiedelten Pflanzen eintrat, spricht somit zusätzlich für eine Änderung in dem Hormonhaushalt der *P. indica*-besiedelten Pflanzen.

Für eine Kulturpflanze wie die Gerste ist es unter angewandten Aspekten von großer Bedeutung, ob die schnellere Entwicklung durch die Besiedelung auch mit einer zeitlichen Verschiebung der Vollreife einhergeht und sich daraus Änderungen im Erntezeitpunkt ergeben könnten. Der lange Abreifeprozess der Gerste und der im Vergleich durch den Wurzelendophyten in der Entwicklung hervorgerufene, nur geringe zeitliche Unterschied, machen eine solche Quantifizierung allerdings sehr schwierig. Visuelle Betrachtungen ließen den Eindruck entstehen, dass *P. indica*-besiedelte Pflanzen auch etwas früher abzureifen scheinen. Dieser Eindruck konnte allerdings nicht dokumentiert werden. Um diese Beobachtung abzusichern und zu quantifizieren könnte man die Pflanzen zu einem früheren Zeitpunkt, d.h. im noch nicht trockenen Zustand, ernten und Feuchtigkeitsbestimmung des Korns durchführen. Da der in dieser Arbeit durchgeführte Versuch aber auf die Ertragsbestimmungen ausgelegt war, konnten zur Klärung dieser Frage hierfür nur visuelle Eindrücke ermittelt, bzw. Chlorophyllmessungen an den intakten Pflanzen durchgeführt werden (Kap. 3.5). In der Landwirtschaft ist gerade der Erntezeitpunkt sehr entscheidend. Je nach Klimazone und Standort kann es im frühen Herbst zu starken Regenfällen oder schlechten Witterungsverhältnissen kommen, was die Ernte sehr erschweren und unter Umständen Schäden bis zur völligen Vernichtung des Ertrags verursachen kann. Unterschiede im Zeitpunkt der Vollertragsreife könnten daher auch von Nutzen sein.

4.2.3 Einfluss von *P. indica* auf den Ertrag

Durch *P. indica*-Besiedelung konnte neben dem Einfluss auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanzen auch über alle Varianten und die drei verwendeten Sorten ein Mehrertrag anhand der Ertragsmenge pro Gefäß gezeigt werden. In dem Kultivar Annabell wurde eine signifikante Erhöhung von +11% festgestellt. In den anderen Kultivaren lag diese bei +5,6%, bzw. +1,9%. Die Besiedelung der Pflanzen mit *P. indica* wirkt sich scheinbar in erster Linie auf eine erhöhte Sprossung der Pflanzen aus, woraus die Ertragssteigerung zu resultieren scheint. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch Mykorrhizierung von chinesischem Hanf (*Abutilon theophrasti*) gezeigt: Hier wurde eine erhöhte Samenproduktion durch mehr Verzweigungen und daraus resultierender größerer Blütenmenge der mykorrhizierten Pflanzen hervorgerufen (Koide et al., 1994). Ertragserhöhungen durch Einfluss von Mykorrhizapilzen oder aber dem Einfluss von PGPRs sind in der Literatur vielfältig erwähnt, aber nicht detailliert beschrieben. Lekberg und Mitarbeiter führten eine Metaanalyse über den Einfluss von Mykorrhizapilzen auf Ertragserhöhungen von Studien durch, welche zwischen den Jahren 1988 und 2003 durchgeführt wurden, und konnten eine durchschnittliche Ertragssteigerung von 23 % im Feld über alle Behandlungen zeigen (Lekberg & Koide, 2005).

Betrachtet man den Einfluss von *P. indica* in den einzelnen Düngevarianten auf den Ertrag in dem Kultivar Ingrid, so konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. In der phosphatlimitierten Düngevariante NK war die Erhöhung allerdings tendenziell gleich der Erhöhung in der Kontrolldüngewariante. Die Erhöhung war hier jedoch eher auf eine Änderung im TKG zurückzuführen und nicht auf eine Erhöhung der Ährenzahl. Der Einfluss der Umwelt auf das TKG ist in der Literatur allerdings als relativ gering beschrieben, während pflanzenbauliche Maßnahmen die Kornzahl pro Ähre relativ stark beeinflussen können (Borgmann, 2000b). In der NPK-Düngung war diese Tendenz einer Ertragserhöhung nicht mehr festzustellen, während sie aber in der NPK+-Variante wieder auftrat. Dies könnte für einen Effekt des N/P-Verhältnisses sprechen. Wie schon erwähnt, kann nicht nur P, sondern auch N während des Stadiums der Anlage und Ausbildung von Organen kritisch für die Ertragsbildung sein. Daher wird in der Landwirtschaft zum Zeitpunkt der Bestockung und des Schossens für ausreichende Stickstoffversorgung der Pflanzen gesorgt (Borgmann, 2000b). Wie auch an den Ergebnissen der Ährenanzahlen in den verschiedenen Düngevarianten zu erkennen, kommt es in der Volldüngevariante und vor allem durch

Stickstoff zu einer vermehrten Bestockung und somit zu mehr Ähren pro Gefäß. N-Düngung zum Bestockungszeitpunkt wirkt zunächst wurzelbildend und dann über die Cytokinine auf die Seitentriebbildung (Borgmann, 2000b). Daran wird deutlich, dass hormonelle Änderungen und Nährstoffzufuhr zusammenhängen. In wie weit ein solcher Zusammenhang bei der Besiedelung mit *P. indica* eine Rolle spielt, bleibt noch zu klären.

Für den Anbau und die spätere Verwendung der Ernte ist eine gute Qualität der Körner entscheidend. Beispielsweise ist der Proteingehalt im Korn ein Qualitätszeichen für die Back- und Brauqualität des Getreides. Die erhöhte Ertragsbildung der Pflanzen durch die Besiedelung mit *P. indica* zeigte keine negativen Auswirkungen auf die Qualität der Körner. Diese unterschied sich nicht maßgeblich zwischen den Kontrollen und den besiedelten Pflanzen. Sogar die massive Ertragserhöhung in der Hochleistungssorte ‚Annabell‘ blieb ohne negative Auswirkungen auf die Qualität. Der tendenziellen Erhöhung des Phosphorgehaltes im Korn in dem Kultivar Ingrid durch *P. indica* sollte in zukünftigen Untersuchungen weiter nachgegangen werden.

4.3 Induzierte Resistenz durch *P. indica*

4.3.1 Einfluss der Wurzelbesiedelung auf Wechselwirkungen mit dem Blattpathogen *Bgh*

Wurzelendophyten können neben Pflanzenernährung und -entwicklung auch die Wechselwirkung der Pflanzen mit anderen Mikroorganismen beeinflussen. Solche Wirkungen sind sowohl von den arbuskulären Mykorrhizapilzen als auch von den PGPR (*plant growth promoting rhizobacteria*) beschrieben. Neben direkten antagonistischen Wirkungen in der Rhizosphäre können Wurzelendophyten auch die pflanzeigene Abwehr induzieren (Azcon-Aguilar & Barea, 1996).

Während systemische Resistenzinduktionen durch Interaktionen mit Rhizobakterien auf das Blatt vielfältig beschrieben und untersucht wurden (Wei et al., 1991; Pieterse et al., 1998; van Loon et al., 1998; Pieterse et al., 2002) ist über solche systemischen Effekte durch pilzliche Endophyten nur wenig bekannt. Durch eine Besiedelung der Pflanzen mit AM-Pilzen wurden zwar neben lokalen- auch systemische Effekte gegen Pathogene nachgewiesen (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002), diese beschränken sich allerdings meistens nur auf die Wurzel. Generell wird von einem höheren Resistenzstatus besiedelter Pflanzen in den Wurzeln, dagegen jedoch von

einer höheren Anfälligkeit gegen Blattpathogene berichtet (Dehne, 1982; Shaul et al., 1999; Gernns et al., 2001). So zeigten Untersuchungen mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Tabakpflanzen stärkere Krankheits Symptome gegenüber *Botrytis cinerea* oder dem Tabak-Mosaik-Virus als nicht-mykorrhizierte Pflanzen (Shaul et al., 1999). Dies ging einher mit einer geringeren Transkriptmenge von PR-1 und PR-3 in den Blättern der Pflanzen (Shaul et al.). Zudem konnte in Gerste eine erhöhte Toleranz gegen das obligat biotrophe Blattpathogen *Blumeria graminis* festgestellt werden (Gernns et al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen der Wurzelbesiedelung mit *P. indica* auf Infektionen mit dem biotrophen Pathogen *B. graminis* f. sp. *hordei* näher untersucht. In zahlreichen Resistenzuntersuchungen mittels Blattsegmenttests konnte eine höhere Resistenz *P. indica*-besiedelter Pflanzen gegen dieses Pathogen beobachtet werden. Diese Resistenz äußerte sich vor allem in einer verminderten Anzahl an Pusteln. Eine Korrelation der Stärke des Resistenzeffektes mit der Besiedelungsintensität des Wurzelendophyten konnte allerdings nicht beobachtet werden. Resistenzen traten auch in Pflanzen auf, welche im mikroskopischen Bild eine eher schwache Besiedelung durch den Wurzelendophyten zeigten. Selbst bei Abwesenheit von Chlamydosporen konnte ein resistenzinduzierender Effekt auf die Blätter festgestellt werden.

In einigen Versuchen war zusätzlich zu beobachten, dass entgegen den weißen, dichten Pusteln auf den Blättern von Kontrollpflanzen sie bei *P. indica*-Besiedelung bräunlicher, kleiner und filigraner in ihrer Struktur erschienen. Pustelanzahl und Erscheinungsbild könnten auf eine veränderte Reproduktionsfähigkeit des Pathogens hinweisen.

Gernns und Mitarbeiter wiesen einen Einfluss der Wurzelbesiedelung von Gerste mit einem AM-Pilz auf die Sporulationsrate des Pathogens nach. Während die mykorrhizierten Pflanzen, gemessen an Kornzahl und Ährenmenge, scheinbar weniger unter dem Pathogen litten, also toleranter waren, erhöhte sich die Sporulationsrate des Pathogens allerdings um mehr als das Doppelte (Gernns et al., 2001). Eine solche bisher beobachtete und diskutierte höhere Anfälligkeit mykorrhizierter Pflanzen gegenüber biotrophen Blattpathogenen wurde mit einer erhöhten Nährstoffversorgung der besiedelten Pflanzen erklärt (Schönbeck et al., 1993; Gernns et al., 2001). Eine Beeinträchtigung der Entwicklung biotropher Pathogene auf induziert resistenten Pflanzen nach Bakterienkulturfiltratbehandlung

wurde allerdings ebenfalls beschrieben. So blieben die Kolonien der Echten Mehлтаupilze kleiner und verfügten über eine geringere Myzeldichte. Sie bildeten eine geringere Anzahl an Konidiophoren und Konidien pro Konidienträger, was zu einer z.T. stark verminderten Sporulation führte. Das Volumen der gebildeten Konidien sowie ihre Infektiosität waren eingeschränkt (Dehne et al., 1984). Das geringere Kolonienwachstum war auf eine verminderte Anzahl an Sekundärhaustorien zurückzuführen; für das Pathogen war dadurch nur eine verminderte Nährstoffaufnahme möglich, was zu einer verzögerten und verlangsamten Entwicklung führte (Schönbeck et al., 1993).

Um einen Einfluss der *P. indica*-Besiedelung auf die Entwicklung des Pathogens genauer zu untersuchen, wäre eine detaillierte und kinetische Analyse, beispielsweise durch Quantifizierung von Primär-, Sekundär-, als auch Tertiärhaustorien zu den späten Zeitpunkten der *Bgh*-Interaktion vorzunehmen. Dagegen wurde in dieser Arbeit die Wechselwirkung zu früheren Zeitpunkten auf cytologischer als auch auf molekularer Ebene untersucht, um Aufschluss über den Mechanismus der systemisch induzierten Resistenz zu bekommen.

4.3.2 Mechanismen der induzierten Resistenz gegen *Bgh*

In der cytologischen Analyse der durch *P. indica* geringeren Anfälligkeit gegen das Blattpathogen *B. graminis* wurde, korrespondierend mit der auf makroskopischer Ebene festzustellenden verminderten Symptomausprägung, eine signifikant verminderte Haustorienanzahl in Blättern infizierter *P. indica*-besiedelter Pflanzen nachgewiesen. Entgegen der Versuchsmethode des Blattsegmenttests waren die *Bgh*-inokulierten Blätter nicht von den Pflanzen getrennt. Dies bestätigt den systemischen Charakter der durch *P. indica* induzierten Resistenz. Neben einer signifikanten Reduktion der Haustorien konnte eine erhöhte Penetrationsresistenz, bzw. eine erhöhte hypersensitive Reaktion in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen gegenüber den Blättern nicht-besiedelter Kontrollpflanzen festgestellt werden. Der Effekt der durch *P. indica* induzierten Resistenz geht somit nicht mit einem cytotoxischen Effekt einher, sondern beruht eher auf einer aktiven Abwehr seitens der Pflanze.

Einen weiteren Hinweis für eine solche induzierte Penetrationsresistenz und damit eine aktive Abwehr von Seiten der Pflanze ergaben auch die Untersuchungen der Mutante 105-6. Bei dieser handelt es sich um eine Gerstenlinie des Genotyps *MLO*,

ror1-2, die als hypersuszeptibel gegenüber *Bgh* beschrieben wurde (Collins et al., 2003). So zeigte sich auch im Rahmen dieser Arbeit im Vergleich mit der Wildtypelinie Ingrid eine erhöhte Basisanfälligkeit der Mutante. Zusätzlich zu dieser erhöhten Anfälligkeit konnte eine schwächer ausgeprägte induzierte Resistenz durch *P. indica* festgestellt werden. Im Vergleich zu Ingrid wt war die relative Reduktion der Pustelanzahl auf den Blättern besiedelter 105-6-Linien nur halb so groß. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass es sich um eine induzierte aktive Resistenz der Pflanze in Form einer Penetrationsresistenz handelt. Damit ist ROR1 eventuell neben der *mlo*-vermittelten- und der Hintergrund-Resistenz (Freialdenhoven et al., 1996; Trujillo et al., 2004) wahrscheinlich auch ein wichtiger Faktor in der *P. indica*-vermittelten Resistenz. Um dies zu beweisen und um evtl. einen *ror*-Effekt zu begründen wären weitere cytologische Untersuchungen nötig.

Für systemisch induzierbare Resistenzen gibt es in Pflanzen verschiedene Mechanismen, bei denen Salizylsäure, Jasmonat oder Ethylen eine wichtige Rolle spielen. Die Signaltransduktionswege biologisch induzierter Resistenzen, wie die der SAR-Antwort und der ISR-Antwort, sind besonders in dikotylen Pflanzen vielfältig untersucht worden. Gezielte Mutanten- (Delaney et al., 1995; Suzuki et al., 2004) und Mikroarrayanalysen (Schenk et al., 2000; Verhagen et al., 2004; Eulgem, 2005) in *Arabidopsis* machen es mittlerweile möglich, hier die verschiedenen Signalkaskaden der Pflanzen genau zu untersuchen. Aufgrund der guten genetischen Untersuchungsmethoden ist es in *Arabidopsis* und anderen dikotylen Pflanzen wie Tabak bereits gelungen, eine Vielzahl von Markergenen dieser Signaltransduktionskaskaden zu identifizieren und Abhängigkeiten dieser untereinander zu identifizieren (Baker et al., 1997; Feys & Parker, 2000). So korrelierte beispielsweise die Expression der schon lange bekannten pathogenresponsiven Gene *PR-1*, *PR-2* und *PR-5* mit der SAR-Antwort, so dass diese Gene als Markergene für diesen Weg der induzierten Resistenz verwendet werden können (Ward et al., 1991; Uknes et al., 1992). Als Marker für Jasmonatakkumulation in Pflanzen dienen verschiedene danach benannte Jasmonat-induzierte Proteine wie beispielsweise das identifizierte JIP-23 (Hause et al., 1996). *NPR-1* nimmt eine wichtige Stellung in der SAR und ISR ein (Pieterse et al., 1998; Spoel et al., 2003).

In monokotylen Pflanzen ist hingegen bezüglich pathogen-induzierter Resistenzen wie der SAR noch relativ wenig bekannt (Kessmann et al., 1994; Kogel & Langen, 2005). Auch konnte die Rolle von PR-Proteinen und Salizylsäure hier noch nicht eindeutig geklärt werden. So fehlt beispielsweise ein Zusammenhang sowohl zwischen pathogen-induzierter Salizylsäure-Akkumulation und PR-Genexpression (Vallélian-Bindschedler et al., 1998), als auch von Verteidigungsantworten wie der HR und Papillenbildung mit Salizylsäure-Akkumulation in Gerste (Hückelhoven et al., 1999). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Salizylsäure-Derivate auch hier eine systemische Resistenz gegen phytopathogene Pilze vermitteln (Kogel et al., 1994; Schweizer et al., 1997) und als Markergene für diese Antwort wurden die sogenannten BCI-Gene identifiziert (Beßer et al., 2000).

Um im Rahmen dieser Arbeit Hinweise auf Mechanismen der *P. indica*-induzierten Resistenz gegen *Bgh* zu erhalten, wurden verschiedene Markergene bekannter induzierter Resistenzmechanismen aus den verschiedenen bisher beschriebenen Systemen in ihrer Expression näher untersucht. Neben pathogen-, SA- bzw. JA-responsiven Genen wurden auch solche mit einbezogen, die eine Rolle im antioxidativen System der Pflanzen spielen, da reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) bei der Abwehr von *Bgh* beteiligt sind (Thordal-Christensen et al., 1997; Vanacker et al., 1998; Hückelhoven & Kogel, 2003).

In einem ersten Dot-Blotexperiment und weiteren Genexpressionsanalysen wurde in den Blättern durch *P. indica*-Besiedelung der Wurzeln keine Regulation der Gene nachgewiesen, die in Gerste durch Salizylsäure, durch Pathogene, oder durch Jasmonat induziert werden. Auch die Transkriptmenge des NPR1-Gens zeigte sich in Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen unverändert. Die Beobachtung, dass *NPR-1* scheinbar konstitutiv exprimiert ist und Transkriptänderungen nach SA-Behandlung nur um das zweifache anstiegen, lassen allerdings vermuten, dass *NPR-1* auf Proteinebene reguliert wird (Cao et al., 1998; Dong, 2004). Informationen der Regulation und Funktion dieses Systems in Monokotylen fehlen bisher.

Auch nach einer Inokulation der Blätter mit dem Pathogen *Bgh* zeigte sich kein Einfluss der *P. indica*-Besiedelung auf die Expression dieser Gene. Allerdings konnte in dem ersten Dot-Blotexperiment eine Induktion von Genen des antioxidativen Systems festgestellt werden. So kam es zu einer Induktion des *GLP-4*-Gens aus Gerste, dessen Produkt die Funktion einer Superoxid-Dismutase trägt (Christensen et al., 2004), sowie zu stärkeren Signalen der Fragmente von zwei Peroxidasen, als

auch einer Glutathion-S-Transferase. *GLP-4*-Transkripte akkumulieren bereits sehr früh in der Interaktion mit *Bgh* und sind in der Epidermis lokalisiert. Aufgrund seines Expressionsmusters wurde eine Funktion des GLP-4-Proteins in der Bildung von Zellwandappositionen als Antwort auf die *Bgh*-Interaktion vermutet (Wei et al., 1998; Schweizer et al., 1999; Druka et al., 2002; Christensen et al., 2004). Transiente Expressionsstudien zeigen, dass dieses Gen eine Rolle in der *Bgh*-Abwehr in den Epidermiszellen spielt (Christensen et al., 2004). Dieses Gen scheint aber nur unter bestimmten Umständen durch *P. indica* induziert, da seine Regulation nicht verifiziert werden konnte.

Veränderungen des antioxidativen Systems der Pflanzen wurde in Genexpressionsstudien weiter nachgegangen. Bis auf eine leichte Erhöhung der RNA-Akkumulierung der Dehydroascorbat-Reduktase und auch der Ascorbat-Peroxidase konnten hier keine eindeutigen Veränderungen der an diesem System beteiligten Gene festgestellt werden. Auch in den später zur Identifizierung

differentiell regulierter Gene diskutierten Array-Hybridisierungen wurde keine signifikante Regulation von Genen des antioxidativen Systems beobachtet.

Eine Regulation der Gene des antioxidativen Systems auf transkriptioneller Ebene ist bisher nicht eindeutig beschrieben. Die Veränderungen in diesem System wurden vorwiegend mittels Enzymaktivitätsmessungen

bestimmt (Vanacker et al., 1998; Mittova et al., 2000; Wu & von, 2002). Dass zusätzlich viele Isoenzyme

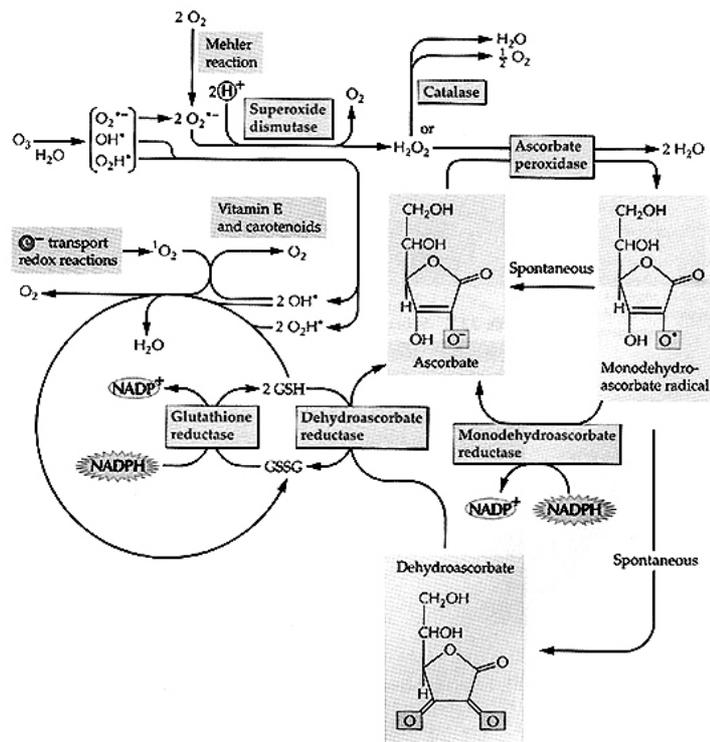


Abb.4-1: Antioxidatives System der Pflanzen

Dargestellt sind die Komponenten des antioxidativen Systems der Pflanzen. Der Ascorbat-Glutathion-Zyklus ist hervorgehoben. Sauerstoffradikale werden über Redoxsysteme, bei welchen Ascorbat und Glutathion eine wichtige Rolle spielen, abgebaut (Quelle: verändert nach: (Bray et al., 2000))

des antioxidativen Systems der Pflanzen beschrieben sind (Ishikawa et al., 1997; Asada, 1999; Mittler, 2002; Wang et al., 2004), müsste in einer Genexpressionsanalyse mittels genspezifischer Oligonukleotide berücksichtigt werden. Auch posttranslationale Veränderungen können an Enzymaktivitätsveränderungen beteiligt sein (Haridas et al., 2005). Daher war eine starke Änderung der Genexpression der antioxidativen Enzyme durch die Besiedelung mit *P. indica* nicht unbedingt auf Transkriptionsebene zu erwarten.

Der Hinweis einer Veränderung der am antioxidativen System (Abb. 4-1) der Pflanzen beteiligten Komponenten in *H. vulgare* durch Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* wurde mittels enzymatischer Messungen von Helmut Baltruschat und Mitarbeitern weiter untersucht. Neben einer signifikanten Erhöhung der Ascorbat-Konzentration und einer stark erhöhten Dehydrogenascorbat-Reduktase (DHAR)-Aktivität in den Wurzeln *P. indica* besiedelter Pflanzen, konnte in den Blättern sowohl eine erhöhte Glutathion-Menge als auch eine stark erhöhte Glutathion-Reduktase (GR)-Aktivität gezeigt werden (Waller et al., 2005). Auch Hinweise auf eine Erhöhung der Ascorbat-Peroxidase und DHAR in Blättern wurden festgestellt (Helmut Baltruschat, persönliche Mitteilung). Alle diese Ergebnisse bestätigten eine systemische Induktion der antioxidativen Kapazität durch *P. indica*-Besiedelung trotz der nicht signifikanten Resultate aus den RNA-Akkumulierungsexperimenten.

Die Veränderungen im antioxidativen System der Pflanzen durch *P. indica*-Besiedelung könnten einen wichtigen Hinweis für die Mechanismen der induzierten Resistenz darstellen. Reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) sind toxische Nebenprodukte des aeroben Stoffwechsels und die antioxidativen Enzyme werden dafür benötigt, diese abzubauen (Asada, 1999) (Abb. 4-1). Dass Pflanzen aber auch aktiv reaktive Sauerstoffintermediate (ROIs) produzieren, um Signalprozesse, wie programmierten Zelltod, abiotische Stressantworten, Pathogenantworten oder systemische Signale zu kontrollieren, wurde in den letzten Jahren deutlich (Mittler, 2002). Damit verbunden wurde in den letzten Jahren die Kontrolle der ROI-Konzentrationen in den Zellen näher untersucht. Glutathion und Ascorbat spielen hier eine sehr wichtige Rolle (Abb. 4-1). Bei Glutathion handelt es sich um einen sehr großen Thiol-Disulfid Redox-Puffer der pflanzlichen Zellen (May et al., 1998; Schafer & Buettner, 2001). Daher wurden bereits auch Messungen des

Gesamtglutathiongehaltes und Glutathion durchgeführt, um das Redox-Umfeld in Pflanzen nach Pathogenbefall näher zu untersuchen (Vanacker et al., 2000). Änderungen im Glutathionpool nach Behandlung von *Arabidopsis* mit DCINA (2,6 Dichlorisonicotinsäure) konnten nachgewiesen werden (Mou et al., 2003). Änderungen im Glutathiongehalt scheinen somit auch an Prozessen der systemisch induzierten Resistenz beteiligt. Dass Redoxprozesse auch durch *Bgh*-Befall eine Änderung in den Zellen erfahren (Vanacker et al., 1998; Vanacker et al., 2000) machen dies im Hinblick auf die durch den Wurzelendophyten induzierte Resistenz sehr interessant.

In pflanzlichen Verteidigungsreaktionen wie der Papillenbildung und der HR ist die Akkumulation von reaktiven Sauerstoffintermediaten (ROIs) involviert (Hückelhoven & Kogel, 2003). H_2O_2 spielt eine wichtige Rolle in dem Prozess der Abwehr gegen *Bgh*. An den Orten der lokalen Abwehr gegen *Bgh* wird vermehrt H_2O_2 akkumuliert (Thordal-Christensen et al., 1997).

Neben dem Nachweis der scheinbar aktiveren pflanzlichen Abwehr gegen *Bgh* in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen wurde mittels H_2O_2 -Anfärbung durch den Farbstoff Diaminobenzidin eine erhöhte Hintergrundfärbung in den jüngsten Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen 32 h nach Inokulierung mit dem Pathogen *Bgh* beobachtet. Diese Beobachtung konnte bisher nicht quantitativ auf die Interaktionsstellen der *Bgh*-Interaktionen festgelegt werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings weist diese Beobachtung darauf hin, dass nach Pathogenbehandlung in den Blättern besiedelter Pflanzen verstärkt H_2O_2 angereichert ist. Ein erhöhter H_2O_2 -Spiegel würde einen erhöhten Resistenzstatus der Pflanzen gegen *Bgh* erklären. Durch parallele Erhöhung des antioxidativen Potentials durch *P. indica*-Besiedelung, könnten die pflanzlichen Zellen mit dieser verstärkten ROS-Akkumulierung besser umgehen und werden dadurch toleranter für den eigenen Abwehrmechanismus.

Die RNA-Akkumulierungsuntersuchungen dieser Arbeit lassen keine Beteiligung von bisher bekannten induzierten Resistenzwegen an der durch den Wurzelendophyten *P. indica* beschriebenen systemischen Resistenz in Gerste vermuten. Die Balance zwischen H_2O_2 , welches einen Resistenzfaktor gegen das Pathogen *Bgh* bildet, und dem antioxidativen System, welches die Toleranz dieses für die Zellen toxische ROI fördert, scheint aber eine wichtige Rolle einzunehmen.

4.4 Differentielle Genexpression im Blatt durch die Wurzelbesiedelung mit *P. indica*

Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene wurden im Verlauf vorliegender Arbeit zwei Methoden verwendet, die suppressive subtraktive Hybridisierung und die Hybridisierung von Arrays.

4.4.1 Suppressive Subtraktive Hybridisierungen (SSH)

Die Methode der SSH wurde bereits in pflanzlichen Systemen angewendet, um nach Pathogenbefall, chemischer Induktion oder abiotischem Stress die molekularen Mechanismen zu untersuchen (Birch et al., 1999; Xiong et al., 2001; Jarosch, 2002). Aber auch bei der Identifikation regulierter Gene in symbiotischen Interaktionen fand diese Methode bereits Verwendung (Franken & Requena, 2001; Grunwald et al., 2004). Sie beruht auf der selektiven Amplifizierung differentiell exprimierter Genfragmente (Diatchenko et al., 1996).

Nach einer ersten suppressiven subtraktiven Hybridisierung zur Identifizierung induzierter Gene in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen konnten durch reverse Northern-Hybridisierungen unter den vielen so angereicherten Genen nur wenigen eine differentielle Regulation zugeschrieben werden. Auffallend war, dass unter diesen Kandidaten vorwiegend Sequenzidentitäten zu dem Gen für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase auftraten. Neben dieser konnten drei weitere Kandidaten aus dem Chloroplastengenom identifiziert werden; die Gene für das Photosystem-II-Thylakoid-Membran-Protein, für das Photosystem-II-Phosphoprotein *psbH* und für ein chloroplastidäres rRNA-Operon.

In zwei weiteren Hybridisierungen sollte die stärkere Anfälligkeit von mykorrhizierten Pflanzen, bzw. die größere Resistenz *P. indica*-besiedelter Pflanzen gegen *Bgh*, genutzt werden, um in Resistenzmechanismen involvierte Gene zu identifizieren. Um einen möglichen *Priming*-Effekt bezüglich der induzierten Resistenz einzuschließen, wurden die Blätter 12 h vor der RNA-Extraktion *Bgh*-inokuliert. Allerdings ließen sich wiederum nur wenige und nur chloroplastenkodierte Gene in den Banken identifizieren. Wie schon in anderen Berichten beschrieben können die systemischen Effekte auf Genexpressionsebene in den Blättern wurzelbesiedelter Pflanzen recht schwach ausfallen (Kim et al., 2004; Verhagen et al., 2004). Wurzelbesiedelung durch *P. chlororaphis* O6 induziert systemische Resistenz in Gurkenpflanzen gegen durch *Corynespora cassiicola* hervorgerufene Blattflecken (Kim et al., 2004). Kim und

Mitarbeiter setzten in die Hybridisierung cDNA aus pathogen-inokulierten Blättern von O6 besiedelten Pflanzen gegen solche von O6 unbesiedelten Pflanzen ein. Die Ausbeute an differentiell exprimierten Genen im Blatt war auch hier sehr gering. Von 50000 Klonen der cDNA-Bibliothek zeigten 100 differentielle Hybridisierungssignale, in 20 davon getesteten bestätigten sie 6. Die entsprechenden Gene waren auch in diesem System nicht durch die alleinige *P. chlororaphis*-Interaktion induziert (Kim et al., 2004). Sie vermuteten hier eine Sensibilisierungs-Reaktion, welche den ISR Mechanismus erklären könnte (Conrath et al., 2002).

Die Tatsache, dass durch die SSH-Banken und anschließenden reversen Northern-Blot-Analysen nur chloroplastenkodierte Gene als differentiell exprimiert identifiziert wurden, könnte durch eine mögliche erhöhte Chloroplastenmenge in *P. indica*-besiedelten Pflanzen zu erklären sein. Dies ließ zusammen mit der Beobachtung, dass *P. indica*-besiedelte Pflanzen zu ihrem kräftigeren Erscheinungsbild auch teilweise in einem kräftigeren und satteren Grün erschienen, daher weitere Untersuchungen der Chlorophyllmenge und der Photosyntheseleistung sinnvoll erscheinen. An den Pflanzen des Freilandversuches zur Bestimmung des Ertrags konnte eine leicht erhöhte Chlorophyllmenge in den Blättern besiedelter Pflanzen festgestellt werden. Ebenso ergaben erste Photosynthesemessungen eine erhöhte Photosyntheserate in den Niedriglichtbereichen, was auf eine höhere Lichteffizienz der besiedelten Pflanzen hindeutet. Mittels exakter Chlorophyllgehaltbestimmungen könnten diese Beobachtungen in einen gemeinsamen Zusammenhang gebracht werden.

Dass Besiedelungen durch Wurzelendophyten eine Auswirkung auf die Photosyntheseleistung der Blätter herbeirufen können, ist bereits mehrfach gezeigt (Wright et al., 1998; Black et al., 2000; Gernns et al., 2001; Jia et al., 2004). Gründe für diese systemische Wirkung werden unterschiedlich diskutiert. Wright und Mitarbeiter (1998) vermuten, dass z.B. AM-Pilze als *sink* für Assimilate dienen und dadurch eine Stimulierung der CO₂-Assimilationsrate des pflanzlichen Partners erst ermöglicht wird (Wright et al., 1998). Black und Mitarbeiter argumentieren dagegen, dass eine Erhöhung der Photosyntheserate in Blättern von mykorrhizierten Gurkenpflanzen eher mit dem erhöhten Phosphat-Status als Folge der Mykorrhizierung, anstatt durch einen erhöhten *sink* für Assimilate zu erklären ist (Black et al., 2000). Um der Ursache für die erhöhte Photosyntheserate in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen detailliert nachzugehen wäre es wichtig, mehr über die

Phosphat-, und die Kohlenstoffverteilung in den Blättern, bzw. den physiologischen Zustand der Blätter zu erfahren. Ein wichtiger Zeitpunkt für weitere solcher Untersuchungen, z.B., um unter anderem den positiven Einfluss auf den Ertrag unter physiologischen Aspekt zu erklären, wäre der Zeitpunkt der Kornfüllung. Durch Mykorrhizierung konnte während dieses Zeitpunktes in mykorrhizierten Gerstenpflanzen beispielsweise eine Erhöhung der Netto-Assimilationsleistung von +34% festgestellt werden (Gernns et al., 2001).

Ein interessanter Befund, vor allem unter dem Aspekt der Herkunft des Endophyten aus der Halbwüste Thar, ist die Steigerung der Photosyntheseleistung durch die *P. indica*-Besiedelung bei geringer Lichtintensität. Unter Wüstenbedingungen ist es den Pflanzen nur unter früh morgendlichen, bzw. spät abendlichen Tageszeiten möglich, ihre Spaltöffnungen für den Gasaustausch zu öffnen. Eine auch nur gering erhöhte Photosyntheseleistung zu diesen Zeitpunkten wäre für die Pflanzen von großem Vorteil.

4.4.2 Arrayanalysen

Arrayanalysen ermöglichen es, gleichzeitig eine große Anzahl von Genen in ihrer Regulation zu untersuchen. Die ersten Arraytypen Mitte der achtziger Jahre trugen DNA-Fragmente, die punktförmig mit je 300 µm Durchmesser auf Nylonmembranen aufgebracht waren. Die Dichte lag um die 2000 Proben pro Array. Seit Mitte der neunziger Jahre wurden die sogenannten Mikroarrays entwickelt, bei denen Glasträger DNA-Fragmente in Punkten bis zu mittlerweile unter 20 µm Durchmesser tragen. Dadurch können heutzutage Arrays mit sehr großen Mengen an spezifischen Genfragmenten für Expressionsanalysen eingesetzt werden. 1995 dokumentierten P.O. Brown und Mitarbeiter als Erste die Verwendung eines Mikroarrays. Sie untersuchten die differentielle Genexpression zwischen Blatt- und Wurzelgeweben von *A. thaliana* (Schena et al., 1995) Seitdem wurden zur Quantifizierung differentieller Genexpression Untersuchungen an den unterschiedlichsten Pflanzen durchgeführt (Zhu & Wang, 2000; Aharoni & Vorst, 2002; Close et al., 2004). Mikroarrayanalysen zur Erforschung von Pilz-Wurzelinteraktionen werden aber erst in der letzten Zeit verstärkt verwendet (Hohnjec et al., 2005). Die Untersuchungen der Mykorrhizasymbiose bezüglich differentieller Genexpression beschränken sich bis heute vorwiegend auf den direkten Interaktionsort, die Wurzel (Wulf et al., 2003; Grunwald et al., 2004; Gümil et al., 2005; Hohnjec et al., 2005).

Genexpressionsanalysen im Blatt sind nur sehr selten beschrieben. Hier wurden nur vereinzelt Kandidatengene in ihrer Expression analysiert (Kaldorf et al., 1998; Ferrol et al., 2002) oder mit Hilfe des differentiellen Displays in Blättern mykorrhizierter Tomatenpflanzen eine geringe Zahl an Genen identifiziert (Taylor & Harrier, 2003). Mikroarrayanalysen, welche ein umfangreiches Bild der Genexpressionen bezüglich eines systemischen Einflusses pilzlicher Wurzelbesiedelungen auf das Blatt zulassen, wurden bisher nur für die Rhizobakterien-Interaktionen durchgeführt (Cartieaux et al., 2003; Verhagen et al., 2004; Wang et al., 2005b). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit sollten durch Wurzelbesiedelung mit *P. indica* hervorgerufene Änderungen der Genexpression im Blatt untersucht werden, um mögliche systemische Wirkungen auf das Blatt, die Signaltransduktion, oder Mechanismen der systemisch induzierten Resistenz, zu identifizieren.

4.4.2.1 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels Hybridisierung des GAN-1,5K-Makroarrays und des 22K *Barley1 GeneChip*[®]-Mikroarrays

Um Gene mit differentieller RNA-Akkumulierung in den Blättern *P. indica* besiedelter Pflanzen zu finden, welche in anderen experimentellen Systemen Resistenz-assoziiert oder BTH induziert exprimiert werden, wurde in einer ersten Versuchsreihe der GAN-Makroarray verwendet. In der Analyse des cDNA-Makroarrays bezüglich differentieller Genregulation in den Blättern durch *P. indica*-Besiedelung der Wurzeln (P-K-Vergleich, Tab. 3-6) konnten 19 aus 1536 Kandidatengene identifiziert werden. Zur Analyse eines möglichen *Priming*-Effektes durch *P. indica*-Besiedelung der Wurzeln in der Interaktion mit dem Blattpathogen *Bgh* wurde zusätzlich Blattmaterial 12 h nach Inokulation mit dem Pathogen *B. graminis* zur Hybridisierung verwendet. Zu diesem Zeitpunkt ist das Appressorium gebildet und die Penetration beginnt (Heitefuss, 2001). Viele regulatorische Prozesse entscheiden hier über den Fortgang der Infektion. In diesem sogenannten *Priming*-Vergleich (PBgh-KBgh-Vergleich) wurden allerdings auch nur wenige durch *P. indica*-Einfluss potentiell differentiell exprimierte Gene identifiziert. Die Regulation der Gene in diesem Vergleich war zudem in beiden biologischen Experimenten recht uneinheitlich, so dass letztendlich auf dem GAN-Makroarray nur fünf Gene dem Kriterium einer einheitlichen Regulation in dem Vergleich PBgh-KBgh genügten.

Um die Auswirkungen der Wurzelbesiedelung mit *P. indica* auch auf die Expression eines sehr großen Spektrums an Genen in den Blättern zu untersuchen, wurde

zusätzlich der 22K *Barley1 GeneChip*[®] für die Untersuchungen der Genexpression verwendet. Unter hohen Stringenzbedingungen konnten aber auch hier nur sehr wenige Kandidaten aus den Vergleichen P-K bzw. PBgh-KBgh identifiziert werden. Zunächst überraschend war die Tatsache, dass in dem alleinigen P-K-Vergleich trotz der vielfach beobachtbaren Veränderungen der besiedelten Pflanzen keinerlei hoch signifikant differentiell exprimierte Gene identifiziert werden konnten. Bisherige Untersuchungen von systemisch hervorgerufenen Änderungen der Genexpression in den Blättern durch Wurzelinteraktionen zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Verhagen, Wang und Mitarbeiter analysierten erst kürzlich die durch Rhizobakterien-Interaktionen in den Wurzeln hervorgerufene differentielle Genregulation in den Blättern mittels Mikroarray-Hybridisierungen (Verhagen et al., 2004; Wang et al., 2005b). Während in den Blättern von *A. thaliana* Verhagen und Mitarbeiter keine konsistenten Unterschiede der Genexpression durch die Besiedelung der Wurzeln mit dem Rhizobakterium *P. fluorescens* WCS417r feststellen konnten (Verhagen et al., 2004) identifizierten im selben System Wang und Mitarbeiter einige differentielle exprimierte Gene, allerdings durch Besiedelung mit einem anderen *P. fluorescens*-Stamm (Wang et al., 2005b). Beide Bakterienstämme induzieren eine ISR-Antwort in *Arabidopsis thaliana*. Wang diskutiert diese Diskrepanz mit einem unterschiedlichen Einfluss der verschiedenen Stämme auf die Genregulation in dem jeweiligen System. In einer vorherigen Studie in Tomate konnte von Cartieaux und Mitarbeitern (2003) auch systemische Änderungen der Genexpression im Blatt, bereits vor Pathogeninokulation, durch alleinige Interaktion der Wurzeln mit dem Rhizobakterium *Pseudomonas thivervalensis* festgestellt werden (Cartieaux et al., 2003). Diese Untersuchungen zeigen, dass relativ nah verwandte Mikroorganismen unterschiedliche Auswirkungen auf die systemische Veränderung der Genexpression aufweisen können. Dass bei der Interaktion der Pflanzen mit *P. indica* nur wenige Gene signifikante Expressionsunterschiede zeigten, ist deshalb nicht ungewöhnlich. Durch detaillierte Expressionsanalysen mittels *RealTime*-PCR zeigte sich, dass die Regulationen durch die Pathogeninteraktion mit *Bgh* über die vier Experimente reproduzierbar waren. Dies traf neben dem Gen einer Protein-Disulfidisomerase (PDI, GAN002114) und dem Gen eines leucinreichen extrazellulären Glykoproteins (LRR_c_EG, Hv14MK) aus den GAN-Makroarrayhybridisierungen auch für die Gene einer Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGDH, Contig5494_at), einer Peroxidase (Contig2123_s_at), eines möglichen Rost-Resistenz-Proteins (Contig17047_at) und

eine Rezeptorproteinkinase (Contig13252) zu. Regulationen der Kandidatengene durch alleinige Besiedelung mit *P. indica* waren dagegen nur sehr gering, zeigten sich nicht eindeutig und über alle Versuche und Behandlungen. Eine differentielle Regulation durch alleinige *P. indica*-Besiedelung konnte nur für ein Expansin-Gen (Contig3675_at) bestätigt werden.

Obwohl auch auf dem großen *Barley1 GeneChip*[®] unter stringenten Bedingungen keine *P. indica*-regulierten Gene hervortraten, konnten durch *Bgh*-Inokulation 176 potentiell differentieell regulierte Gene identifiziert werden. Da einige dieser Gene bereits in der Literatur als *Bgh*-reguliert beschrieben sind, stellte dieser Vergleich eine Art Positivkontrolle des Hybridisierungsexperimentes dar. So fanden sich in dieser Gruppe z.B. einige Peroxidase- und PR-Gene, sowie an der Proteinprozessierung beteiligte Gene, wie beispielsweise mehrere Gene für Calreticulin, das schon nach 12 h *Bgh*-Inokulierung bereits als induziert identifiziert und bestätigt wurde (Eichmann et al., 2006), aber auch verschiedene Chaperone. Protein-Sekretion und Prozessierung sind sowohl in Verteidigungs- als auch Stressantworten von Pflanzen involviert (Walther-Larsen et al., 1993; Boston et al., 1996; van der Hoorn & Jones, 2004). Es konnten zudem Gene identifiziert werden, die in der Interaktion drei Wochen alter Gerstenpflanzen mit *Bgh* und dem 12h-Interaktionszeitpunkt nach Inokulation noch nicht beschrieben wurden.

Bezogen auf die induzierte Resistenz kann das Phänomen des *Primings* sehr entscheidend sein. Dieses ist nicht nur durch einen Einfluss auf die Expression bestimmter Gene beschrieben, sondern dadurch, dass Gene erst nach Kontakt mit dem Pathogen schneller oder stärker auf diesen reagieren können (Conrath, 2001, Conrath, 2002, Kohler 2002). Wie oben schon erwähnt, wurde durch Mikroarrayhybridisierungen in *Arabidopsis* wurde gezeigt, dass eine durch Wurzelbesiedelung mit *P. fluorescens* ausgelöste induzierte systemische Resistenz in den Blättern nicht mit einer Veränderung der Genexpression in den Blättern assoziiert war. Nach Pathogenbefall zeigte hier aber eine große Menge an pathogenresponsiven Genen einen Unterschied in der Expressionsstärke (Verhagen et al., 2004). In Blättern von Gurkenpflanzen konnten dagegen nur wenige Gene identifiziert werden, welche nach Inokulierung mit dem Pathogen *Corynespora cassiicola* in *Pseudomonas chlororaphis* O6-besiedelten Pflanzen einen *Priming*-Effekt zeigten (Kim et al., 2004).

Aufgrund der Möglichkeit, in dem eigentlichen *Priming*-Vergleich (PBgh-KBgh) vielleicht nur sehr kleine Expressionsunterschiede zu erhalten, wurde in den GAN-Makroarrayanalysen zusätzlich der Vergleich PBgh-K in die Untersuchungen mit einbezogen. Dieser müsste Kandidatengene beeinhaltend, welche durch *P. indica* und *Bgh* gemeinsam hochreguliert werden, aber in den Einzelvergleichen durch die geringen Expressionsunterschiede nicht auffallen. *Priming*-Kandidaten mit geringen Expressionsunterschieden könnten sich in diesem Vergleich finden lassen. So wurden aus diesem Vergleich mittels der Hybridisierung 18 potentiell differentiell exprimierte Gene identifiziert, also mehr als in dem alleinigen PBgh-KBgh-Vergleich. Der Aspekt des *Primings* konnte zwar anhand der Arrayhybridisierungen bei einzelnen Kandidatengenen aufgegriffen werden, wurde jedoch nicht aus dem Gesamtbild der Expressionsanalysen ersichtlich. Dass in keinem der beiden verwendeten Arraytypen mehr Kandidaten in dem *Priming*-Vergleich PBgh-KBgh als in dem Vergleich P-K festgestellt wurden, wäre so mit einem fehlenden *Priming*-Effekt in dem System zu begründen. Der Interaktionszeitpunkt nach Pathogenbehandlung könnte hier allerdings sehr wichtig sein. Für die Untersuchungen der differentiellen Genexpression wurde der Zeitpunkt der Appressoriumbildung während der *Bgh*-Interaktion gewählt. Bezüglich der Pathogenerkennung könnten aber auch sehr viel frühere Reaktionen der Zellen während der Interaktion für die Untersuchung der *P. indica*-induzierten Resistenz ausschlaggebend sein, welche zu dem untersuchten Zeitpunkt nicht mehr zu identifizieren wären.

Dass auf dem GAN-Makroarray Gene angereichert sind, welche resistenzassoziiert, bzw. BTH-induziert exprimiert werden, machte ihn für die Untersuchung der durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen Resistenz gegen *Bgh* interessant. Er wurde bereits in Untersuchungen bzgl. Wirts-, bzw. Nichtwirtsresistenz gegen das Pathogen *Bgh* verwendet, und die aus diesen Experimenten resultierten Kandidaten konnten erfolgreich bestätigt werden (Eichmann et al., 2006). In dieser Arbeit über Expressionsanalysen zur Pathogeninteraktion von Gerstebältern mit *Blumeria graminis spec.*-Interaktionen konnten mit diesem Array 105 potentiell differenzierte Kandidaten identifiziert werden. Elf davon wurden ausgewählt und alle unabhängig bestätigt (Eichmann et al., 2006). Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war sehr hoch. Eine hohe Reproduzierbarkeit von Kandidatengenen aus diesem Array konnte auch in Genexpressionsuntersuchungen mit dem Pathogen *Bipolaris sorokiniana*

erzielt werden (Schäfer, 2003). In einer Arbeit über chemisch induzierte Resistenz (Kah, 2005) wurden aus ersten Hybridisierungen dieser Arrays unter gleichen Selektionsbedingungen 59 Gerstengene in zwei von vier Hybridisierungen als induziert identifiziert. Von diesen zeigte in weiteren Dot-Blot-Experimenten allerdings nur ca. die Hälfte eine differentielle Expression. Mittels unabhängiger semiquantitativer RT-PCR konnte dann nur bei fünf von 13 ausgewählten Kandidatengenen eine differentielle Regulation durch BTH bestätigt werden. Physiologische Unterschiede der Pflanzen zum Zeitpunkt der BTH-Applikation und unterschiedliche Aufnahme und Verteilung des Resistenzinduktors wurden hier als Gründe für eine schlechtere Reproduzierbarkeit durch mögliche unterschiedliche Ausprägungen des *Priming*-Status angegeben (Kah, 2005). Verglichen mit den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde in der vorliegenden Arbeit nur eine sehr kleine Menge potentiell *P. indica*-regulierter Gene gefunden. Gegenüber einer direkten und somit besser definierbaren Interaktion mit Pathogenen auf den Blättern, wie in den Arbeiten von Eichmann, Schäfer und Mitarbeitern untersucht (Schäfer, 2003; Eichmann et al., 2006), wurde hier ein systemischer Einfluss durch *P. indica* untersucht. Neben dem physiologischen Zustand der Pflanzen, wie schon in der Arbeit über Genregulationen durch BTH diskutiert (Kah, 2005), könnte in diesem System zusätzlich die Besiedelungsstärke in den Wurzeln maßgeblichen Einfluss auf die Genregulation in den Blättern haben (Kap. 4.1, 4.3.1.), was zusätzlich in zukünftigen Arbeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit systemischer Expressionsuntersuchungen stärker berücksichtigt werden müsste.

Die geringe Menge der differentiiell regulierten Gene aus den Kandidaten des GAN-Arrays durch *P. indica*-Besiedelung in den Wurzeln ließe sich auch durch einen möglichen anderen, bisher unbekanntem Resistenzmechanismus erklären. Denn schon in den zielgerichteten Untersuchungen der Genexpression bestimmter Resistenzgene konnte keine Regulation durch *P. indica* festgestellt werden (Kap. 4.3.2). Auch die nicht zu beobachtende Änderung der Genexpression in dem direkten *Priming*-Vergleich PBgh-KBgh spricht für diese Annahme.

Eine Auswirkung des *Priming*-Effektes in unserem untersuchten System könnte allerdings die Beobachtung darstellen, dass nach Inokulierung mit dem Pathogen auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen (PBgh-P-Vergleich) weniger regulierte Gene gefunden wurden als auf Kontrollpflanzen (KBgh-K-Vergleich). Auffallend war außerdem, dass nur wenige rein *Bgh* induzierte Gene (KBgh-K) mit denen auf Blättern *P. indica*-

besiedelter Pflanzen (PBgh-P) übereinstimmten. Das weist auf Unterschiede in der molekularen Reaktion auf das Pathogen in besiedelten Pflanzen hin. Bei derart regulierten Genen könnte es sich beispielsweise um Suszeptibilitätsfaktoren handeln, die in *P. indica*-besiedelten Pflanzen supprimiert sind. Eine solche Variabilität war auch auf dem *Barley1 GeneChip*[®] zu erkennen. Gegenüber der Expression während der *Bgh*-Interaktion auf unbesiedelten Pflanzen (KBgh-K-Vergleich) entsprachen sehr viel weniger Gene den gleichen Kriterien der differentiellen Regulation durch *Bgh* in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen (PBgh-P-Vergleich). Interessant war beispielsweise, dass in einem direkten Vergleich der Genregulationen von den zwölf Genen, die unter den stringenten Kriterien auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen als *Bgh*-induziert herausgefiltert wurden, keines eine signifikante *Bgh*-Regulation auf den Blättern der Kontrollpflanzen zeigte.

Auffallend war, dass in allen durchgeführten Vergleichen für die Genexpression über die verschiedenen Versuche und Behandlung bei Einfluss von *P. indica* eine stärkere Variabilität festzustellen war. Änderungen der Transkriptmengen in den Blättern waren durch *P. indica* Besiedelung der Wurzeln nur sehr gering und variierten zwischen den einzelnen Versuchen. Auch durch *Bgh* zeigte sich in den detaillierten Expressionsstudien eine stärkere Varianz der relativen Induktionslevel auf den Blättern von *P. indica*-besiedelten Pflanzen, worauf die Hybridisierungsexperimente beider Arrays bereits hinwiesen. Solche Induktionen durch *Bgh* auf Blättern besiedelter Pflanzen konnten selbst dann mittels *RealTime*-PCR bestätigt werden, wenn nur in 6 von 9 Fällen eine Induktion in den Hybridisierungen angezeigt wurde, wie beispielsweise im Vergleich PBgh-P bei dem Peroxidase-Gen (Contig2123_s_at) und dem Gen der Phosphoglycerat-Dehydrogenase (PGDH, Contig5494_at).

Dem Grund für die starken Varianzen der Genexpression in Blättern besiedelter Pflanzen müsste in folgenden Untersuchungen weiter nachgegangen werden. Ein wichtiger dabei zu berücksichtigender Aspekt scheint der Besiedelungszustand der Wurzeln zum Zeitpunkt der Genexpressionsuntersuchung zu sein. Daher bleibt es weiteren Versuchen überlassen, näheres über die Wechselwirkungen des Pilzes in den Wurzeln zu erfahren, um vor allem im molekularen Bereich Rückschlüsse auf die systemischen Auswirkungen ziehen zu können. Einzelne Teilergebnisse in der Analyse dieser systemisch beeinflussten Genregulation unterstützten den bereits in Kapitel 4.1. diskutierten Aspekt, dass die Aktivität des Pilzes neben seiner Anwesenheit auch bei systemischen Auswirkungen eine große Rolle spielen könnte.

Dieser Beobachtung weiter nachzugehen und die Aktivität des Pilzes mit den genauen Auswirkungen auf die Pflanzen und den Genexpressionsmustern in Verbindung zu bringen, wäre im Zusammenhang weiterer systemischer Genexpressionuntersuchungen sicher wichtig.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist ersichtlich, dass scheinbar keine sehr großen Veränderungen auf Transkriptionsebene im Blatt durch Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* stattfinden. Obwohl die Verwendung von Arrays ein enormes Potential besitzt, unbekannte Mechanismen aufzuklären und beteiligte Systeme zu identifizieren, darf man die Grenzen dieser Technologie nicht außer Acht lassen. So ist die Fokussierung auf RNA-Akkumulierung nicht zwingend ausreichend, um alle wichtigen Auswirkungen von Organismen-Interaktionen auf molekularer Ebene zu erfassen. Gründe dafür sind zum einen, dass sich RNA und Proteinmengen unterscheiden können. Zum anderen kann die Funktion von exprimierten Proteinen durch posttranslationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, verändert werden. Z.B. kann dies für die Aktivität von Enzymen zutreffen, die den zellulären Redoxstatus kontrollieren. Dies gilt aber auch vor allem für Elemente von Signaltransduktionswegen, denen wichtige Funktionen in Interaktionen zwischen verschiedenen Organismen zukommen und die auch bei den systemischen Effekten der *P. indica*-Besiedelung auf den Spross eine bedeutende Rolle spielen könnten. Daher wäre es notwendig, neben RNA-Akkumulierungen auch Proteinmengen und -modifikationen zu berücksichtigen. Ein weiterer Punkt, der bei Genexpressionsstudien berücksichtigt werden sollte ist, dass biologische Prozesse durch große Gruppen von in miteinander verwobenen Netzwerken organisierten Genen reguliert sind. Die biologische Funktion ist nur selten die Eigenschaft eines einzelnen Moleküls. Stattdessen resultiert die Funktion aus komplexen Interaktionen einer großen Anzahl von Molekülen. So könnte es sein, dass durch alleinige Besiedelung mit *P. indica* keine großen Expressionsveränderungen in den Blättern hervorgerufen werden, allerdings durch viele kleine, schwerer detektierbare Veränderungen trotzdem biologische Effekte auftreten. Daher sollte, um die Mechanismen der Zellen als ein ganzes zu verstehen, im Sinne von Netzwerken gedacht werden (Sweetlove & Fernie, 2005). Diese Überlegungen sollten bei Untersuchungen bezüglich eines solchen komplexen biologischen Systems mit vielen unbekanntem Faktoren, wie der *P. indica*-Interaktion mit den Pflanzen, deren

systemische Auswirkungen und der Interaktionen dieser mit weiteren Organismen keinesfalls außer Acht gelassen werden.

4.4.2.2 Genexpressionsanalysen von durch *P. indica*-differentiell exprimierten Kandidatengenen

Aufgrund interessanter Regulationsmuster und Funktionen wurden zunächst aus dem GAN-Makroarray-Hybridisierungsergebnis zehn Gene zur Untersuchung ihrer Expression mittels semiquantitativer PCR ausgewählt. Nur für die Kandidatengene für ein leucinreiches Protein (LRR, HvD00150), ein leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein (LRRcEG, Hv14MK) und vor allem eine Protein-Disulfidisomerase (PDI, GAN002I14) konnte eine Induktion 12 h nach *Bgh*-Inokulation nachgewiesen werden. Eine Regulation durch *P. indica*-Besiedelung, sowohl ohne Pathogeninokulierung als auch unter dem *Priming*-Aspekt 12 h nach *Bgh*-Inokulierung, wurde mittels dieser Methode für keines der untersuchten Gene bestätigt.

Dieses Ergebnis könnte bereits darauf hinweisen, dass die Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica* die Regulation der untersuchten Gene im Blatt nur sehr gering beeinflusst, die detektierten Unterschiede anhand der Array-Hybridisierungen mit Randbedingungen der Methodik zu erklären sind, und daher auch mit der Methode der semiquantitativen RT-PCR nicht detektiert werden konnten. Genregulationen mittels Hybridisierungsexperimenten werden oftmals aufgrund möglicher unspezifischer Bindungen und Kreuzhybridisierungen unterschätzt (Meyers et al., 2004). Mittels genspezifischer Primer in PCR-Experimenten ist es allerdings möglich, Hybridisierungsungenauigkeiten wie Kreuzhybridisierungen in den Bedingungen auszuschließen und die Regulationen detailliert zu untersuchen. Da mittels der semiquantitativen RT-PCR aber auch keine großen Unterschiede der Transkriptmengen festgestellt werden konnten, wurden für genauere Analysen die quantitative *RealTime*-PCR ausgewählt. Diese Methode der *RealTime*-PCR macht es möglich, auch sehr geringe Unterschiede von Transkriptmengen genau zu analysieren (Heid et al., 1996). Die Regulation der Gene wurde in vier verschiedenen Experimenten untersucht. Drei Kandidatengene aus den GAN-Makroarrayhybridisierungen, welche für die extrazelluläre Invertase (GAN004E10), eine Protein-Disulfidisomerase (GAN002I14) und ein leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein (Hv14Mk) kodierten, wurden zur Expressionsanalyse mittels *RealTime*-PCR ausgewählt. Weitere sieben Gene, resultierten aus den Hybridisierungen des

Barley1 GeneChip[®]. Die ausgewählten Gene und die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen werden im Folgenden erläutert.

Extrazelluläre Invertasen (ECIs) katalysieren die irreversible Hydrolyse von Saccharose zu Glukose und Fruktose. Sie spielen eine sehr wichtige Rolle im Prozess der Assimilat-Partitionierung in den Pflanzen. Eine große Anzahl von Studien belegt, dass eine verbreitete Antwort auf Pathogen-Interaktionen in Pflanzen eine Erhöhung der ECI-Aktivität zur Folge hat (Roitsch et al., 2003). Eine Verbindung zwischen Kohlenhydratstatus der Zellen und Pathogenantwort zeigt auch der Befund, dass viele PR-Gene Zucker-induzierbar sind (Roitsch, 1999). Auch während der Interaktion mit Mehltau kommt es zur Akkumulation von ECIs (Scholes et al., 1994; Greenshields et al., 2004). Mehltaupilzen ist es nicht möglich Disaccharide wie Saccharose aufzunehmen, und sie sind daher auf die Invertasen angewiesen. Im Hinblick auf die Wirt-Pathogeninteraktion handelt es sich daher bei den ECIs eher um Suszeptibilitätsfaktoren. Dass die auf dem GAN-Makroarray repräsentierte ECI (GAN004E10) in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen reprimiert, allerdings nach Mehltau-Inokulation im Vergleich PBgh-P induziert war, machte sie zu einem interessanten Kandidaten. Eine Repression dieses Gens in den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen könnte eine Rolle in der Resistenz gegen Mehltau spielen. In anderen Hybridisierungsexperimenten des gleichen GAN-Makroarrays mit Material von BTH-behandelten Pflanzen zeigte sich eine deutliche Induktion dieses Gens durch diesen chemischen Induktor (Kah, 2005), was im Gegensatz zu der Repression durch *P. indica*-Besiedelung steht. Nur in einem der vier untersuchten Experimente zeigte sich eine leichte Repression des Gens durch *P. indica*-Besiedelung. Da die untersuchten Gene großen Genfamilien angehören, könnte eine mögliche Fehlerquelle bei der Regulationsüberprüfung in der Wahl der Oligonukleotide liegen, da vielleicht mit diesen ein anderes Mitglied, oder ein Pool von Mitgliedern einer Genfamilie welche anderen Regulationen unterliegen, amplifiziert werden könnten.

Ein zweiter interessanter Kandidat, bezogen auf die Resistenz gegen das Pathogen *Bgh*, war das Gen einer **Protein-Disulfidisomerase** (PDI, GAN002114). Durch die Hybridisierung der Makroarrays und die Überprüfung durch semiquantitative RT-PCR und *RealTime*-PCR konnte eine eindeutige Induktion des Gens in den drei Wochen alten Gerstebblättern 12 h nach Inokulation mit dem Pathogen *Bgh* festgestellt

werden. Eine höhere Transkriptmenge von PDI (GAN002I14) in dem Vergleich PBgh-P gegenüber dem Vergleich KBgh-K wurde nur in einem dieser Versuche festgestellt; sie betrug ungefähr das Dreifache. Interessanterweise handelte es sich bei diesem Versuch (34f-2004) um den mit der höchsten relativen *PiTef1*-cDNA-Menge und somit evtl. dem Versuch mit der höchsten pilzlichen Aktivität (Kap. 4.1). Der sensitivere *Priming*-Vergleich PBgh-K zeigte dennoch eine signifikante Induktion von PDI (GAN002I14) in allen vier Versuchen, was eine leichte Geninduktion durch gleichzeitigen Einfluss von *Bgh* und *P. indica* vermuten lässt. Eine Induktion durch *Bgh*-Inokulierung zeigte sich auch in Primärblättern von 7 Tage alten Pflanzen 12 h nach *Bgh*, bzw. *B. graminis* f.sp. *tritici*-Inokulation (Eichmann et al., 2006). Im Vergleich der Signalintensitäten von GAN002I14 auf den Hybridisierungsexperimenten unter *P. indica* und *Bgh* war auffallend, dass die Induktion des Gens durch *Bgh* auf den *P. indica*-besiedelten Pflanzen stärker war als auf Blättern der Kontrollpflanzen. Dies machte dieses Gen zu einem interessanten Kandidaten bezüglich eines möglichen *Priming*-Effektes. Protein-Disulfidisomerasen sind bekannt als molekulare Chaperone und Komponenten von Signaltransduktionswegen in tierischen Systemen. Mit dem pflanzlichen Verteidigungssystem wurden sie erstmal durch Ray und Mitarbeiter (2003) in Verbindung gebracht (Ray et al., 2003). Diese fanden zu frühen Zeitpunkten nach Infektion mit dem hemibiotrophen Pathogen *Mycosphaerella graminicola*, eine ähnliche Regulation von PDI wie die der Resistenz-bezogenen PR-Proteine PR-1, PR-2 und PR-5 in Weizen. Sie diskutierten deshalb bereits eine regulatorische Funktion von PDI in der pflanzlichen Resistenz-Signaltransduktionskette (Ray et al., 2003). Vor kurzem wurde zudem gezeigt, dass Chaperone verteidigungsrelevanter sekretorischer Signaltransduktionsketten für die BTH-induzierte bakterielle Resistenz in *Arabidopsis* benötigt werden und deshalb dem Sekretionsapparat der Pflanzen eine wichtige Rolle in der SAR-Antwort zukommt (Wang et al., 2005a). Durch transiente Herunterregulierung der Genexpression durch doppelsträngige RNAi in transienten Transformationsexperimenten konnte in Gerste mittels der Sequenz des auf dem GAN-Makroarray repräsentierten PDI-Gens eine tendenzielle Erhöhung der Anfälligkeit gegen *Bgh* gezeigt werden (Eichmann, 2005). Überexpression in diesem transienten System hatte dagegen keinen Einfluss auf die Resistenz.

Von dem *Barley1 GeneChip*[®] wurden die **Phosphoglycerat-Dehydrogenase** (PGDH, Contig5494_at) und die **Peroxidase** (Contig2123_s_at) gewählt, da ihr

Expressionsmuster auf den Arrays eine signifikante Induktion nach 12h *Bgh*-Inokulation zeigte, sie allerdings auch in dem P-K-Vergleich induziert zu sein schienen. Aufgrund dessen könnten sie interessante Kandidaten bezüglich der induzierten Resistenz sein. Bei PGDH handelt es sich um das erste Enzym der Serinbiosynthese. Sie katalysiert die Oxidation von 3-Phosphoglycerat zu 3-Phosphohydroxy-Pyruvat und verwendet dafür NAD⁺ als Kofaktor. Serin ist ein Zwischenprodukt wichtiger Stoffwechselwege, wie der photorespiratorischen Verstoffwechslung von 3-Phosphoglycerat (3PGA) (Walton & Woolhouse, 1986). Zum anderen ist es ein wichtiger Vorläufer in der Glycin-, Tryptophan- und Cystein-Synthese, an der Umwandlung von Homocystein und Methionin (Walton & Woolhouse, 1986) und außerdem an der biochemischen Antwort von Pflanzen gegen verschiedene Formen von abiotischen Stress beteiligt. Akkumulation von Serin wurde in Pflanzen, welche bei geringen Temperaturen oder erhöhter Salinität wuchsen, beschrieben (Ho & Saito, 2001). Anhand der relativen Quantifizierung dieses Gens mittels *RealTime*-PCR konnte die Induktion dieses Gens 12 h nach Inokulation mit *Bgh* bestätigt werden. Durch alleinige *P. indica*-Besiedelung zeigte sich in drei von vier Experimenten eine, wenn auch nur sehr schwache Induktion, welche sich allerdings nicht als signifikant über alle Versuche erwies. Im Hinblick auf die zudem durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufene Toleranz gegen Salzstress (Waller et al., 2005) könnte die, wenn auch nur schwache Induktion dieses Gens, von Interesse sein. Peroxidasen sind am Abbau von H₂O₂ beteiligt, und eine Rolle an pflanzlichen Abwehrreaktionen wie auch der Abwehr gegen das biotrophe Pathogen *Blumeria graminis* wurden gezeigt (Vanacker et al., 2000; Hückelhoven et al., 2001; Liu et al., 2005). Auch in Resistenzreaktionen gegen abiotischen Stress der Pflanzen, wie gegen Salz, sind Peroxidasen beteiligt (Kim et al., 2005). Im Hinblick auf die durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufene systemische Resistenz wurde bereits eine Veränderung des antioxidativen Systems der Pflanzen diskutiert (Kap. 4.3.2.). Eine Induktion der Peroxidase durch alleinige Besiedelung des Wurzelendophyten konnte nicht bestätigt werden, sie zeigte sich allerdings durch *Bgh*-Inokulation in drei von vier Experimenten, und auch auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen war diese *Bgh*-Induktion festzustellen, allerdings stärkeren Schwankungen über die vier Experimente unterworfen.

Ein Gen, welches für ein **Expansin** kodiert, wurde zur näheren Überprüfung gewählt, da es in 8 Fällen in dem Vergleich P-K reprimiert war und auch über die

Mittelwertvergleiche eine signifikante Repression zeigte. Ebenso ergab sich bei diesem Gen durch *Bgh*-Inokulierung eher eine Tendenz zur Repression. Die pflanzliche Zellwand ist wichtig für die Stabilität der Pflanze und spielt eine wichtige Rolle im Wachstum, der Differenzierung, der Kommunikation, dem Wassertransport und der Verteidigung. Expansine sind bekannt als Regulatoren der Zellwandstreckung. Sie sind an der Zellwunderweichung beteiligt, welche für das Streckungswachstum nötig ist. Des Weiteren spielen sie eine Rolle in Prozessen, wie Fruchtreife, Blattabreife und Keimung (Li et al., 2003). Die Expansin-Genexpression korreliert mit dem Eintreten, der Erhöhung und der Einstellung des Zellwachstums (Cosgrove, 2005). Ethylen ist an der Regulation der Expansine beteiligt, d.h. es führt zu einer Induktion mancher Expansine (Belfield et al., 2005; Vreeburg et al., 2005). In dem hier untersuchten System konnte eine Repression des untersuchten Expansin-Genes durch den Wurzelendophyten, wie diese in der Arrayhybridisierung festgestellt wurde, bestätigt werden. Die oben beschriebenen Funktionen der Expansine werfen allerdings die Frage auf, welche Funktion dem hier untersuchten Gen in den *P. indica*-besiedelten Pflanzen zukommt, da diese sowohl ein stärkeres Wachstum als auch eine erhöhte Resistenz zeigen. Da Expansine für die Erweichung der Zellwand benötigt werden (Li et al., 2003) könnte womöglich eine Repression des Gens, eine Penetrationsresistenz gegenüber *Bgh* unterstützen. Allerdings gehören die Expansine einer sehr großen Genfamilie an und die Regulationen und biologischen Funktionen der einzelnen Gene werden derzeit immer noch untersucht (Cosgrove, 2005).

Ein Gen für ein **Thionin** zeigte sich in 8 Fällen in den Vergleichen PBgh-P und PBgh-KBgh reprimiert, durch alleinige *P. indica*-Besiedelung allerdings nicht reguliert. Thionine sind kleine pflanzliche Proteine, die in der pflanzlichen Abwehr involviert sind. Im Hinblick auf die Resistenz *P. indica*-besiedelter Pflanzen ist dies ein interessantes Kandidatengen. Thionine sind als Pathogen-, Methyljasmonat-, und verwundungsinduziert beschrieben (Epple et al., 1995; Vignutelli et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass Jasmonat auch an der Akkumulation von Thioninen in Gerste beteiligt ist (Andresen et al., 1992). Eine Induktion von Thionin als Antwort auf das nekrotrophe Pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthiolae* wurde in *Arabidopsis* festgestellt (Epple et al., 1995), doch konnte dort eine Induktion durch das biotrophe Pathogen *Erysiphe orontii* nicht gezeigt werden (Reuber et al., 1998). Daten in Gerste bezüglich Thioninexpression durch *Bgh* liegen bisher nicht vor. In dem

Kandidatengenansatz zur gezielten Untersuchung von an IR-beteiligten Genen konnte keine Induktion des Jasmonat-responsiven Genes *JIP-23* in *P. indica*-besiedelten Pflanzen festgestellt werden, was unter anderem zu der Hypothese führt, dass kein bisher bekannter Weg der induzierten Resistenz von Pflanzen an der *P. indica*-induzierten Resistenz beteiligt ist (Kap. 4.3). Wie die Expression solcher bestimmter, an bekannten Resistenzwegen involvierter Proteine in Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen reguliert ist, bleibt detaillierter zu analysieren.

Das Gen für eine **Chalkon-Synthase** wurde als Kandidat in die *RealTime*-PCR-Analyse einbezogen, da es in Resistenzreaktionen von Pflanzen eine Rolle spielt. Das Expressionsmuster dieses Gens wies in dem *Priming*-Vergleich eine Induktion in 6 von 9 Fällen auf und zeigte in keinem anderen Vergleich eine klare Regulation. Über den Mittelwertvergleich zeigte sich aber auch eine Induktion des Gens durch die alleinige Besiedelung der Wurzeln mit *P. indica*. Chalkon-Synthasen katalysieren den ersten Schritt in der Flavonoid-Synthese. Flavonoide sind an verschiedenen physiologischen Funktionen beteiligt und spielen eine entscheidende Rolle in der Interaktion von Pflanzen mit ihrer Umwelt. So absorbieren Flavonoide UV Licht und schützen dadurch die Pflanzen (Strid et al., 1994). Zum anderen akkumulieren sie in vielen Pflanzenspezies bei Pathogenbefall. Ihre Bedeutung als antibiotisches Phytoalexin ist vielfach bewiesen (Christensen et al., 1998). Deshalb macht eine differentielle Genexpression in Verbindung mit einer *P. indica*-Besiedelung dieses Kandidatengen für detaillierte Expressionsstudien interessant. Bei der Regulation des Chalkon-Synthasegens fiel auf, dass es im *Priming*-Vergleich (PBgh-KBgh) eine nur sehr schwache Regulation durch den Wurzelendophyten zeigte, in jedem der vier Experimente allerdings leicht induziert zu sein schien. Auch durch alleinige *P. indica*-Besiedelung der Pflanzen konnte in drei von vier Versuchen eine Induktion dieses Gens festgestellt werden. Diese Regulation konnte zwar anhand der Einzelvergleiche in der Arrayhybridisierungen nicht ermittelt werden, zeigte sich aber sowohl durch eine Signifikanz über den Mittelwertvergleich der drei Arrays, als auch eine insgesamt 2,5-fache Induktion. In Bezug auf die durch *P. indica*-induzierte Resistenz könnte dieses Ergebnis auf eine verstärkte Akkumulierung von Flavonoiden hindeuten und als eine Ursache für die *P. indica*-induzierte Resistenz diskutiert werden. Allerdings müsste dies durch entsprechende biochemische Analyse überprüft werden.

Der letzte Kandidat, der aufgrund seiner Funktion in der Abwehr für diese Expressionsanalyse ausgewählt wurde, war ein Gen für ein mögliches **Rost-Resistenz-Protein**, welches sich in den Kontrollpflanzen durch *Bgh*-Inokulation signifikant induziert zeigte. Diesem Gen könnte somit auch eine Rolle in der Abwehr gegen den biotrophen Mehltauerreger zukommen. Die *Bgh*-Induktion des Gens war allerdings auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen schwächer und in den zwei anderen Vergleichen war keine deutliche Änderung der Transkriptmenge durch die Hybridisierung festzustellen. In der Überprüfung mittels *RealTime*-PCR lies sich eine nur schwache *Bgh*-Induktion in drei von vier Experimenten bestätigen. Die Ergebnisse auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen waren hier allerdings wieder stärkeren Schwankungen unterworfen. In zwei von vier Experimenten war diese Induktion stärker als auf den *Bgh*-inokulierten Kontrollpflanzen, andererseits ergab sich auch in zwei Experimenten nahezu keine Regulation durch *Bgh* auf *P. indica*-besiedelten Pflanzen.

Zwei aufgrund ihrer Funktion interessante Gene, welche hier zum Schluss diskutiert werden sollen, kodieren für potenziell an Pathogen-Erkennungsprozessen beteiligte Komponenten. Das Gen für ein **leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein** (LRR_c_EG, Hv14MK) wurde mittels Hybridisierungen des GAN-Makroarrays identifiziert, das Gen für eine **Rezeptor-Proteinkinase** (Contig13252_s_at) zeigte eine interessante Regulation auf dem *Barley1 GeneChip*[®]. Bei beiden Kandidaten war auffällig, dass ihre Regulation auf mögliche *Priming*-Prozesse hinwies. Das Kandidatengen Hv14MK war in dem Hybridisierungsexperiment nur in dem Vergleich PBgh-K induziert, während das Gen für die mutmaßliche Rezeptor-Proteinkinase stärker in den besiedelten- (PBgh-P-Vergleich) als in den nicht-besiedelten Pflanzen (KBgh-K) durch *Bgh* induziert war. Durch PCR-Analysen wurde die Regulation dieser beiden Gene näher untersucht.

Die Induktion von Hv14MK im Vergleich PBgh-K konnte mittels *RealTime*-PCR verifiziert werden. In der semiquantitativen RT-PCR und der *RealTime*-PCR konnte zusätzlich eine Induktion durch *Bgh* 12 h nach Inokulation festgestellt werden, welche sich in der Arrayhybridisierung nicht zeigte. Auch für die untersuchte Rezeptor-Proteinkinase, konnte eine signifikante Induktion in den beiden *Priming*-Vergleichen PBgh-KBgh und PBgh-K sowie dem Vergleich PBgh-P mittels *RealTime*-PCR festgestellt werden. Die Induktion der beiden Gene durch *Bgh* auf Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen (PBgh-P) fiel dabei in zwei Experimenten stärker aus als

auf den Kontrollpflanzen (KBgh-K). Darunter befand sich interessanterweise wieder der Versuch 34f-2004, der vermutlich die höchste *P. indica*-Aktivität aufwies (s.o. und Kap. 4.1.).

Unter den 12 mittels des *Barley1 GeneChip*[®] identifizierten Genen, mit einer möglichen *Priming*-Regulation, fanden sich zudem zwei weitere Oligonukleotidsätze (HVSMEEm005L12r2_at, HVSMEEm0005L12r2_x_at), welche Gene für Rezeptor-Proteinkinasen repräsentierten, als auch ein weiterer Oligonukleotidsatz (Contig3638_at), welcher Ähnlichkeit zum gleichen leucinreichen extrazellulären Glykoprotein wie die oben beschriebene Sequenz Hv14MK hat. Nähere Sequenzanalysen ergaben, dass Hv14MK und Contig3638_at zu unterschiedlichen TIGR-Contig-Sequenzen identisch waren und somit wahrscheinlich zwei unterschiedliche Gene repräsentierten. Das mutmaßliche LRR-Protein aus Hirse, zu dessen Gen beide Sequenzen Identität zeigten, enthält neben LRR-Domänen auch N-Glykosylierungs-Domänen, welche die Funktion eines extrazellulären Glykoproteins vermuten lassen (Hipskind, 1996). Hipskind und Mitarbeiter stellten eine lokale, nicht aber systemische Regulation der Transkriptmenge dieses Gens durch Befall mit dem Pathogen *Colletotricum graminicola* fest (Hipskind et al., 1996). Aufgrund hoher Ähnlichkeit des kodierenden Gens zu der extrazellulären Domäne rezeptorähnlicher Proteinkinasen in *Arabidopsis* (Hipskind et al., 1996) könnten diese Gene direkt an Signaltransduktionsprozessen der durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen systemischen Resistenz beteiligt sein.

Von den drei auf dem *Barley1 GeneChip*[®] repräsentierten Sequenzen, welche Rezeptor-Proteinkinasen repräsentierten, war Contig13252_s_at identisch zu der TC-Sequenz TC136410 aus dem TIGR-*Hordeum vulgare* Gene-Index (HVGI). Auch die anderen beiden Sequenzen, HVSMEEm005L12r2_at und HVSMEEm005L12r2_x_at, waren dieser TC-Sequenz sehr ähnlich. HVSMEEm005L12r2_at ist dabei über seine gesamte Sequenz von 205 bp, 100 %ig identisch zum 3'-Bereich von HVSMEEm005L12r2_x_at. Es konnten mittels des *Barley1 GeneChip*[®] somit zwei unterschiedliche Gene mit identischer Regulation identifiziert werden. Alle drei Sequenzen besitzen eine putative Serin/Threonin-Proteinkinase Domäne. Über extrazelluläre Domänen dieser durch *P. indica* regulierten Rezeptorkinasen kann aufgrund der unvollständigen Sequenz allerdings keine genaue Aussage getroffen werden. Große Ähnlichkeit der Sequenzen zu einer

Lectin-ähnlichen Rezeptorkinase aus Reis könnten für das Vorhandensein einer extrazelluläre Lectindomäne sprechen.

Rezeptorproteinkinasen (*receptor-like-proteinkinases* = RLKs) werden mit vielen zellulären Signalwegen, welche in der pflanzlichen Entwicklung, der Selbstinkompatibilität, aber auch bei der pflanzlichen Verteidigung eine Rolle spielen, in Verbindung gebracht. Sie bilden eine Untergruppe der Proteinkinasen und sind durch eine extrazelluläre Domäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Kinasedomäne charakterisiert (Becraft 1998, Lease, 1998). Die pflanzlichen RLKs tragen, bis auf sehr wenig bisher bekannte Ausnahmen (z.B. (Mu et al., 1994)), eine hoch konservierte katalytische Serin/Threonin-Kinase Domäne und zusätzlich eine sehr variable extrazelluläre Domäne, welche es den Proteinen ermöglicht, selektiv auf verschiedene extrazelluläre Signale zu antworten (Walker, 1994; aus He, 2004). Bei Signalerkennungsprozessen bezogen auf Pathogenerkennung spielen RLKs eine wichtige Rolle. So sind Rezeptor-Proteinkinasen in Pflanzen auch vielfach als Resistenzfaktoren identifiziert worden (Gomez-Gomez & Boller, 2000; Brueggeman et al., 2002; Sun et al., 2004). Bisher wurde eine große Anzahl an Genen kloniert und charakterisiert, welche Resistenz gegen eine Vielzahl von Pathogenen vermitteln (Hammond-Kosack & Jones, 1997; Richter & Ronald, 2000; Hulbert et al., 2001). Ein Beispiel für ein solches Resistenzgen, ist *Pto* aus Tomate (Martin et al., 1993). Es kodiert für ein Protein mit einer Serin/Threonin-spezifischen Kinase. Dieses beinhaltet weder eine LRR-Domäne noch eine Nukleidbindestelle (NBS) und benötigt für die Funktion der Signalerkennung weitere Proteine (Salmeron et al., 1994; Zhou et al., 1995; Zhou et al., 1997). Um ein membrangebundenes Resistenzgen-Produkt handelt es sich bei *Xa21* aus Reis, welches eine Resistenz gegen verschiedene *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* vermittelt. *Xa21* kodiert für ein Protein mit einem putativen Signalpeptid aus extrazytoplasmatischen LRRs mit vielen potentiellen Glykosylierungsmotiven, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Serin/Threonin-Kinasedomäne (Song et al., 1995). Die Entdeckung dieses R-Genproduktes war der erste Hinweis dafür, dass R-Proteine allein sowohl eine Rezeptorfunktion als auch eine Signalfunktion beinhalten können (Hammond-Kosack & Jones, 1996). So wurden inzwischen zahlreiche andere Resistenzgene identifiziert, charakterisiert und ihre Bedeutung für die Resistenz nachgewiesen. Andererseits sind viele Resistenzgenprodukte, wie z.B. Rezeptorkinasen bisher in ihrer Funktion noch

unbekannt. Beispielsweise bilden von 400 Genen, welche für putative Rezeptorkinasen in *A. thaliana* kodieren, 216 Gene mit LRR-Motiv-tragenden Produkten die größte Gruppe. Doch waren davon bis zum Zeitpunkt einer Veröffentlichung von Dievart und Mitarbeitern nur von zehn Kandidaten die Funktion bekannt und näher untersucht (Dievart & Clark, 2004).

Alle während dieser Arbeit identifizierten und durch *P. indica* regulierten Rezeptorproteinkinasen zeigten Homologie zu Rezeptorproteinkinasen, allerdings lediglich in deren Kinasedomäne. Aufgrund fehlender Sequenzidentitäten zu den extrazellulären Domänen der identifizierten Gene auf den Arrays, konnte keine eindeutige Aussage über genauere Eingliederungen der von *P. indica* differentiell regulierten Rezeptorkinasen getroffen werden. Die Identifizierung der gesamten Gensequenzen wäre daher nötig, um eine Aussage über eine Funktion dieser Gene in Pathogen-Erkennungsprozessen treffen zu können. Eine veränderte Regulation dieser Gene und eine dadurch mögliche Beschleunigung der Erkennung des Pathogens könnte für die pflanzliche Verteidigung entscheidend sein. Den differentiell regulierten Genen für die Rezeptorkinase bzw. für das LRR-Protein könnte dabei eine entscheidende Bedeutung zukommen. Es wäre interessant, die Expression dieser Gene zu früheren Zeitpunkten der Pathogen-Interaktion detaillierter zu analysieren. Eine veränderte Regulation von möglichen Rezeptorproteinkinasen durch den Einfluss von *Piriformospora indica*, gerade auch mit Hinblick auf eine mögliche *Priming*-Reaktion, könnte ausschlaggebend für Veränderungen in der Pathogenerkennung und somit sehr entscheidend für die beobachtete verstärkte aktive pflanzliche Abwehr sein.

4.5 Abschließende Betrachtungen

Auch in Gerste zeigt die Besiedelung mit dem Wurzelendophyten *P. indica*, wie in den anderen bisher untersuchten von ihm besiedelten Pflanzen (Varma et al., 1999; Pham et al., 2004b), einen wachstumsfördernden Einfluss auf die Pflanzen. Dies äußerte sich unter anderem in einer schnelleren Entwicklung durch früheres Ährenschieben und in einer relevanten Ertragsteigerung. Was diese Effekte genau hervorruft, konnte nicht geklärt werden. Da allerdings sowohl bei ausreichender Phosphat- und Stickstoffdüngung diese Auswirkungen sichtbar waren, liegt es nahe, dass hier vor allem phytohormonelle Änderungen eine wichtige Rolle spielen könnten. Ähnliche Auswirkungen auf das Wachstum, die Entwicklung und

Ertragsförderung von Pflanzen sind auch durch die weit verbreiteten, obligat biotrophen, arbuskulären Mykorrhizapilze beschrieben.

In makroskopischen als auch cytologischen Experimenten konnte eine Erhöhung der Resistenz gegen das Blattpathogen *Blumeria graminis* gezeigt und auf eine Erhöhung der pflanzeigenen Abwehr zurückgeführt werden. Hierin liegt ein großer Unterschied zu den weit verbreiteten Mykorrhiza-Pilzen, da bei diesen bisher eher eine erhöhte Suszeptibilität gegen sprosspathogene Organismen beschrieben wurde. Expressionsanalysen bekannter Gene zeigten, dass bekannte Signaltransduktionswege der induzierten Resistenz (IR) oder der systemisch erworbenen (SAR) Resistenz nicht involviert sind. Die Induktion des antioxidativen Systems scheint hingegen eine wichtige Rolle bezüglich der induzierten Resistenz zu spielen. Durch Hybridisierungen von cDNA-Makro- als auch Oligonukleotid-Mikroarrays (Affymetrix) ergaben sich für eine Reihe von Genen Hinweise von differentieller Genexpression. In den Hybridisierungen und *RealTime*-PCR-Experimenten zeigte sich allerdings, dass die gefundenen Expressionsmuster in vier biologischen Wiederholungen nicht regelmäßig auftraten, obwohl die phänotypischen Unterschiede eindeutig waren und in allen Experimenten zu Tage traten. Die Streuungen der systemisch veränderten Genexpression in den Blättern und scheinbar kleine Amplituden in den veränderten Expressionsstärken machten eindeutige Aussagen, selbst über mehrere Experimente, schwierig. Um den Mechanismus der durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen systemischen Resistenz näher zu klären und andere systemische Effekte auf die Blätter zu untersuchen, wäre es in weiteren Forschungsarbeiten dahingehend wichtig, der genauen Besiedelungsquantifizierung und der Charakterisierung genauer Besiedelungsstadien auch weiterhin eine große Aufmerksamkeit zu widmen. Einen interessanten Aspekt auf die durch *P. indica* induzierte Resistenz lieferte die Identifizierung von zwei Genen für an Signalprozessen beteiligte Komponenten, die Gene für eine Rezeptor-Proteinkinase sowie für ein leucinreiches extrazelluläres Glykoprotein. Differentielle Genexpression solcher an der Erkennung von Pathogenen beteiligter Komponenten könnten zu einer früheren oder stärkeren Resistenzantwort führen. Detaillierte Expressionsanalysen weiterer Kandidatengene wären für die Klärung von durch *P. indica*-Besiedelung hervorgerufenen veränderten Mechanismen in den Pflanzen notwendig.

In der Landwirtschaft werden derzeit viele Anstrengungen zur Ertragssteigerung im Getreideanbau unternommen. Dabei ist neben der Optimierung der Nährstoff- und Wasserzufuhr und Züchtungsansätzen der Einsatz von Wurzelendophyten ein viel versprechender Ansatz.

Ryan und Mitarbeiter diskutierten den Aspekt, dass den AM-Pilzen in vielen produktionsorientierten agrikulturellen Systemen nicht die entscheidende Rolle der Ernährungsverbesserung und des Wachstums der Pflanzen zugeschrieben werden kann (Ryan & Graham, 2002). Hingegen limitieren erhöhte Phosphatkonzentrationen durch Düngungen eher die AM-Kolonisierung. Um die möglichen positiven Einflüsse der AM-Pilze für den Anbau gezielt zu nutzen, müssten also Veränderungen des agrikulturellen Systems vorgenommen werden. Reduktion der P-Düngung, sowie die Verwendung von Kultivaren, welche responsiver für AM-Pilze sind, und eine Optimierung der Bodenbearbeitung, wären hierfür förderlich (Ryan & Graham, 2002). Weitere Untersuchungen und Optimierungen für die Ertragssteigerung durch *P. indica* wären auch in diese Sinne durchzuführen. Die Möglichkeit der axenischen Kultivierbarkeit von *P. indica* und die gute Besiedelung auch bei hohem P-Gehalt im Boden und der in dieser Arbeit behandelte systemische Effekt der Resistenzerhöhung, auch im Spross, geben ihm gegenüber den Mykorrhizapilzen einen Vorteil in der Anwendung. Ziel der Pflanzenzüchter ist es zudem Hochleistungssorten zu entwickeln, die neben einem erhöhten Resistenzpotential keinen negativen Einfluss auf die Fitness der Pflanzen zeigen. Erhöhung der Resistenz von Pflanzen geht oft auf Kosten des Ertrages und führt zu verminderten Ernten (Purrington, 2000; Bostock, 2005). Durch die *P. indica*-induzierte Resistenz konnte bisher kein solcher negativer Effekt festgestellt werden. Künftige Untersuchungen müssten klären, wie dieser Pilz preiswert vermehrt werden kann, ob Sporen oder Hyphen das bessere Inokulum darstellen und wie eine Inokulumproduktion in großem Maßstab aussehen und schließlich zur Anwendung gebracht werden könnte.

5 Literatur

- Achatz, B. (2002)** Wachstumsförderung, Wechselwirkung mit Blattpathogenen und Regulation der Genexpression in *Medicago truncatula* durch arbuskuläre Mykorrhiza und *Piriformospora indica*. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Agrios, G.N. (1997)** *Plant pathology*. Academic Press, London.
- Aharoni, A. & Vorst, O. (2002)** DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology*, **48**, 99-118.
- Aist, J.R. & Israel, H.W. (1986)** Autofluorescent and ultraviolet-absorbing components in cell walls and papillae of barley coleoptiles and their relationship to disease resistance. *Canadian Journal of Botany*, **64**, 266-272.
- Alkan, N., Gadkar, V., Coburn, J., Yarden, O. & Kapulnik, Y. (2003)** Quantification of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in host tissue using real-time polymerase chain reaction. *New Phytologist*, **161**, 877-885.
- Al-Karaki, G., McMichael, B. & Zak, J. (2004)** Field response of wheat to arbuscular mycorrhizal fungi and drought stress. *Mycorrhiza*, **14**, 263-269.
- Allen, M.F., Moore, J.T.S. & Christensen, M. (1980)** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae: I. Cytokinin increases in the host plant. *Canadian Journal of Botany*, **58**, 371-374.
- Allen, M.F., Moore, T.S. & Christensen, M. (1982)** Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II. Altered levels of gibberellin-like substances and abscisic-acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany*, **60**, 468-471.
- Alström, S. (1991)** Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *Journal of General and Applied Microbiology*, **37**, 495-501.
- Andresen, I., Becker, W., Schluter, K., Burges, J., Parthier, B. & Apek, K. (1992)** The identification of leaf thionin as one of the main jasmonate-induced proteins of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Molecular Biology*, **19**, 193-204.
- Asada, K. (1999)** The water-water cycle in the chloroplast: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **50**, 601-639.
- Atkins, S.D. & Clark, I.M. (2004)** Fungal molecular diagnostics: a mini review. *Journal of Applied Genetics*, **45**, 3-15.
- Azcon-Aguilar, C. & Barea, J.M. (1996)** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens- an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza*, **6**, 457-464.
- Baker, B., Zambryski, P., Staskawicz, B. & Dineshkumar, S.P. (1997)** Signaling in plant-microbe interactions. *Science*, **276**, 726-733.
- Barazani, O., Benderoth, M., Groten, K., Kuhlemeier, C. & Baldwin, I.T. (2005)** *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia*, **146**, 234-243.
- Barea, J.M. & Azcon-Aguilar, C. (1982)** Production of plant growth-regulating substances by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Applied and Environmental Microbiology*, **43**, 810-813.
- Barker, S.J. & Tagu, D. (2000)** The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation*, **19**, 144-154.

- Belfield, E.J., Ruperti, B., Roberts, J.A. & McQueen-Mason, S. (2005)** Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra*. *Journal of Experimental Botany*, **56**, 817-823.
- Beßer, K. (2001)** Chemisch Induzierte Resistenz im Pathosystem Gerste – Echter Gerstenmehltau: Identifizierung und Charakterisierung differentiell exprimierter Gene der Gerste. Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen.
- Beßer, K., Jarosch, B., Langen, G. & Kogel, K.H. (2000)** Expression analysis of genes induced in barley after chemical activation reveals distinct disease resistance pathways. *Molecular Plant Pathology*, **1**, 277-286.
- Bethlenfalvay, G.L., Brown, M.S., Mihara, K.L. & Stafford, A.E. (1987)** Glycine-Glomus-Rhizobium symbiosis. V. Effects of mycorrhiza on nodule activity and transpiration in soybeans under drought stress. *Plant Physiology*, **85**, 115-119.
- Birch, P.R.J., Avrova, A.O., Duncan, J.M., Lyon, G.D. & Toth, R.L. (1999)** Isolating of potato genes that are induced during an early stage of the hypersensitive response by *Phytophthora infestans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 356-361.
- Black, K.G., Mitchell, D.T. & Osborn, B.A. (2000)** Effect of mycorrhizal-enhanced leaf phosphate status on carbon partitioning, translocation and photosynthesis in cucumber. *Plant, Cell & Environment*, **23**, 797-809.
- Blechert, O., Kost, G., Hassel, A., Rexer, K.H. & Varma, A. (1998)** First remarks on the symbiotic interaction between *Piriformospora indica* and terrestrial orchids. In Varma, A. & Hock, B. (eds.), *Mycorrhiza*. Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 683-688.
- Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J. (2001)** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion Plant Biology*, **4**, 343-350.
- Bolwell, G.P., Butt, V.S., Davies, D.R. & Zimmerlin, A. (1995)** The origin of the oxidative burst in plants. *Free Radical Research*, **23**, 517-532.
- Borgmann, F. (2000a)** Biologische Grundlagen des Pflanzenbaus. In Entrup, N.L. & Oehmichen, J. (eds.), *Lehrbuch des Pflanzenbaues*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, Vol. Band 1, pp. 243-336.
- Borgmann, F. (2000b)** Ertragsbildung der Kulturpflanzen. In Entrup, N.L. & Oehmichen, J. (eds.), *Lehrbuch des Pflanzenbaues*. Verlag Th. Mann, Gelsenkirchen, Vol. Band 1, pp. 337-355.
- Bostock, R.M. (2005)** Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annual Review in Phytopathology*, **43**, 545-580.
- Boston, R.S., Viitanen, P.V. & Vierling, E. (1996)** Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, **32**, 191-222.
- Boyle, B., Hamelin, R.C. & Seguin, A. (2005)** In vivo monitoring of obligate biotrophic pathogen growth by kinetic PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1546-1552.
- Bradley, D.J., P., K. & Lamb, C.J. (1992)** Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell*, **70**, 21-30.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000)** Responses to abiotic stresses. In Buchanan, B. & Gruissem, W. & Jones, R. (eds.), *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville.
- Brisson, L.F., Tenhaken, R. & Lamb, C. (1994)** Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, **6**, 1703-1712.

- Broekaert, W.F., Terras, F.R., Cammue, B.P. & Osborn, R.W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiology*, **108**, 1353-1358.
- Brueggeman, R., Rostoks, N., Kudrna, D., Kilian, A., Han, F., Chen, J., Druka, A., Steffenson, B. & Kleinhofs, A. (2002) The barley stem rust-resistance gene Rpg1 is a novel disease-resistance gene with homology to receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9328-9333.
- Bryngelsson, T. & Green, B. (1989) Characterisation of a pathogenesis related, thaumatin-like protein isolated from barley challenged with an incompatible race of mildew. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **35**, 45-52.
- Bryngelsson, T., Sommer-Knudsen, J., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Ek, B. & Thordal-Christensen, H. (1994) Purification, characterization, and molecular cloning of basic PR-1-type pathogenesis-related proteins from barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**, 267-275.
- Büschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F. & Schulze-Lefert, P. (1997) The barley Mlo gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell*, **88**, 695-705.
- Bütehörn, B., Rhody, D. & Franken, P. (2000) Isolation and characterisation of *Pitef1* encoding the translation elongation factor EF-1 alpha of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biology*, **2**, 687-692.
- Cao, H., Bowling, S.A., Gordon, A.S. & Dong, X. (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **6**, 1583-1592.
- Cao, H., Glazebrook, J., Clarke, J.D., Volko, S. & Dong, X. (1997) The *Arabidopsis* NPR1 gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. *Cell*, **88**, 57-63.
- Cao, H., Li, X. & Dong, X. (1998) Generation of broad-spectrum disease resistance by overexpression of an essential regulatory gene in systemic acquired resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 6531-6536.
- Cartieaux, F., Thibaud, M.C., Zimmerli, L., Lessard, P., Sarrobert, C., David, P., Gerbaud, A., Robaglia, C., Somerville, S. & Nussaume, L. (2003) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* colonized by a plant-growth promoting rhizobacterium reveals a general effect on disease resistance. *Plant Journal*, **36**, 177-188.
- Carver, T., Wright, A. & Thomas, B. (2001) The ups and downs of a plant pathogen's early life. *Iger Innovations*, **5**, 18-21.
- Chester, K.S. (1933) The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quarterly Review of Biology*, **8**, 275-324.
- Christensen, A.B., Cho, B.H., Naesby, M., Gregersen, P.L., Brandt, J., Madriz-Ordenana, K., Collinge, D.B. & Thordal-Christensen, H. (2002) The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. *Molecular Plant Pathology*, **3**, 135-144.
- Christensen, A.B., Gregersen, P.L., Schroder, J. & Collinge, D.B. (1998) A chalcone synthase with an unusual substrate preference is expressed in barley leaves in response to UV light and pathogen attack. *Plant Molecular Biology*, **37**, 849-857.

- Christensen, A.B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjaer, M.F., Dudler, R. & Schweizer, P. (2004) The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 109-117.
- Close, T.J., Wanamaker, S.I., Caldo, R.A., Turner, S.M., Ashlock, D.A., Dickerson, J.A., Wing, R.A., Muehlbauer, G.J., Kleinhofs, A. & Wise, R.P. (2004) A new resource for cereal genomics: 22K barley GeneChip comes of age. *Plant Physiology*, **134**, 960-968.
- Collinge, D.B., Gregersen, P.L. & Thordal-Christensen, H. (2002) The nature and role of defense response genes in cereals. In R.R., B.&Bushnell, W.R.&Dik, A.J.&Carver, T.L. (eds.), *The powdery mildews*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, pp. 134-160.
- Collins, N.C., Thordal-Christensen, H., Lipka, V., Bau, S., Kombrink, E., Qiu, J.L., Huckelhoven, R., Stein, M., Freialdenhoven, A., Somerville, S.C. & Schulze-Lefert, P. (2003) SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, **425**, 973-977.
- Conrath, U., Pieterse, C.M. & Mauch-Mani, B. (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends in Plant Science*, **7**, 210-216.
- Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Schwindling, S. & Kohler, A. (2001) Priming as a mechanism induced systemic resistance of plants. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 113-119.
- Cordier, C., Pozo, M.J., Barea, J.M. & Gianinazzi-Pearson, V. (1998) Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 1017-1028.
- Cosgrove, D.J. (2005) Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **6**, 850-861.
- Davies, F.T., Potter, J.R. & Linderman, R., G. (1993) Drought response of mycorrhizal pepper plants independent of leaf P concentration-response in gas exchange and water relations. *Physiologia Plantarum*, **87**, 45-53.
- Dehne, H.W. (1982) Interaction between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology*, **72**, 1115-1119.
- Dehne, H.W., Stenzel, K. & Schönbeck, F. (1984) Zur Wirksamkeit induzierter Resistenz unter praktischen Anbaubedingungen. III. Reproduktion Echter Mehлтаupilze auf induziert resistenten Pflanzen. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, **91**, 258-265.
- Delaney, T.P., Friedrich, L. & Ryals, J.A. (1995) *Arabidopsis* signal transduction mutant defective in chemically and biologically induced disease resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 6602-6606.
- Despres, C., DeLong, C., Glaze, S., Liu, E. & Fobert, P.R. (2000) The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, **12**, 279-290.
- Dey, R., Pal, K.K., Bhatt, D.M. & Chauhan, S.M. (2004) Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogaea* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. *Microbiological Research*, **159**, 371-394.
- Diatchenko, L., Lau, Y.F., Campbell, A.P., Chenchik, A., Moqadam, F., Huang, B., Lukyanov, S., Lukyanov, K., Gurskaya, N., Sverdlov, E.D. & Siebert, P.D. (1996) Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 6025-6030.
- Dievart, A. & Clark, S.E. (2004)** LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development*, **131**, 251-261.
- Dong, X. (2004)** NPR1, all things considered. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 547-552.
- Druka, A., Kudrna, D., Kannangara, C.G., von Wettstein, D. & Kleinhofs, A. (2002)** Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 850-855.
- Dudler, R., Hertig, C., Rebmann, G., Bull, J. & Mauch, F. (1991)** A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathion-S-transferases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **4**, 14-18.
- Eckey, C., Korell, M., Leib, K., Biedenkopf, D., Jansen, C., Langen, G. & Kogel, K.H. (2004)** Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology*, **55**, 1-15.
- Eichmann, R. (2005)** Molecular analyses on the mechanism of nonhost resistance of barley (*Hordeum vulgare* L.) to the wheat powdery mildew fungus (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). Justus-Liebig Universität Giessen, Giessen.
- Eichmann, R., Biemelt, S., Schäfer, P., Scholz, U., Jansen, C., Felk, A., Schäfer, W., Langen, G., Sonnewald, U., Kogel, K.H. & Hückelhoven, R. (2006)** Macroarray expression analysis of barley susceptibility and nonhost resistance to *Blumeria graminis*. *Journal of Plant Physiology*, **163**, 657-670.
- Epple, P., Apel, K. & Bohlmann, H. (1995)** An *Arabidopsis thaliana* thionin gene is inducible via a signal transduction pathway different from that for pathogenesis-related proteins. *Plant Physiology*, **109**, 813-820.
- Estrada-Luna, A.A., Davies Jr., F.T. & Egilla, J.N. (2000)** Mycorrhizal fungi enhancement of growth and gas exchange of micropropagated guava plantlets (*Psidium guajava* L.) during *ex vitro* acclimatization and plant establishment. *Mycorrhiza*, **10**, 1-8.
- Eulgem, T. (2005)** Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends in Plant Science*, **10**, 71-78.
- Fay, P., Mitchell, D.T. & Osborne, B.A. (1996)** Photosynthesis and nutrient-use efficiency of barley in response to low arbuscular mycorrhizal colonisation and addition of phosphorus. *The New Phytologist*, **132**, 425-433.
- Ferrol, N., Pozo, M.J., Antelo, M. & Azcon-Aguilar, C. (2002)** Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H⁺-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 1683-1687.
- Feys, B.J. & Parker, J.E. (2000)** Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. *Trends in Genetics*, **16**, 449-455.
- Flor, H.H. (1971)** Current status of the gene-for-gene concept. *Annual Review of Phytopathology*, **9**, 275-296.
- Franken, P. & Requena, N. (2001)** Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges. *New Phytologist*, **150**, 517-523.
- Franken, P., Requena, N., Bütchorn, 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.

- Freialdenhoven, A., Peterhansel, C., Kurth, J., Kreuzaler, F. & Schulze-Lefert, P. (1996) Identification of genes required for the function of non-race-specific mlo resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell*, **8**, 5-14.
- Freialdenhoven, A., Scherag, B., Hollricher, K., Collinge, D.B., Thordal-Christensen, H. & Schulze-Lefert, P. (1994) *Nar-1* and *Nar-2*, two loci required for *Mla12*-specified race-specific resistance to powdery mildew in barley. *Plant Cell*, **6**, 983-994.
- Gaffney, T., Friedrich, L., Vernooij, B., Negrotto, D., Nye, G., Uknes, S., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1993) Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science*, **261**, 754-756.
- Galli, U., Schüepp, H. & Brunold, C. (1994) Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum*, **92**, 364-368.
- Gerike, S. & Kurmies, B. (1952) Die kolorimetrische Phosphorsäurebestimmung mit Ammonium-Vanadat-Molybdat und ihre Anwendung in der Pflanzenanalyse. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, **104**, 235-247.
- Gernns, H., von Alten, H. & Poehling, H.-M. (2001) Arbuscular mycorrhiza increased the activity of a biotrophic leaf pathogen - is a compensation possible? *Mycorrhiza*, **11**, 237-243.
- Gianinazzi, S., Trouvelot, A., Lovato, P., Vantuinen, D., Franken, P. & Gianinazzipearson, V. (1995) Arbuscular mycorrhizal fungi in plant production of temperate agroecosystems. *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**, 305-311.
- Gish, W. & States, D.J. (1993) Identification of protein coding regions by database similarity search. *Nature Genetics*, **3**, 266-272.
- Gomez-Gomez, L. & Boller, T. (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*, **5**, 1003-1011.
- Görg, R., Hollricher, K. & Schulze-Lefert, P. (1993) Functional analysis and RFLP-mediated mapping of the *Mlg* resistance locus in barley. *Plant Journal*, **3**, 857-866.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K.H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. & Ryals, J. (1996) Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. *Plant Cell*, **8**, 629-643.
- Govindarajulu, M., Pfeffer, P.E., Jin, H., Abubaker, J., Douds, D.D., Allen, J.W., Bucking, H., Lammers, P.J. & Shachar-Hill, Y. (2005) Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, **435**, 819-823.
- Graner, A. & Altschmied, L. (2001) Gerste- ein Modell zur Erforschung komplexer Getreidegenome. *GenomXPress*, **1**, 5-12.
- Green, R.M. (1991) Isolation and characterisation of genes induced in barley during powdery mildew infection. Universtiy of Cambridge, UK, Cambridge, UK.
- Greenshields, D.L., Wang, F., Selvaraj, G. & Wei, Y. (2004) Activity and gene expression of acid invertases in einkorn wheat (*Triticum monococcum*) infected with powdery mildew. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **26**, 506-513.
- Grunwald, U., Nyamsuren, O., Tamasloukht, M., Lapopin, L., Becker, A., Mann, P., Gianinazzi-Pearson, V., Krajinski, F. & Franken, P. (2004) Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. *Plant Molecular Biology*, **55**, 553-566.

- Güimil, S., Chang, H.S., Zhu, T., Sesma, A., Osbourn, A., Roux, C., Ioannidis, V., Oakeley, E.J., Docquier, M., Descombes, P., Briggs, S.P. & Paszkowski, U. (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 8066-8070.
- Hahn, M. (2000) The rust fungi. In Kronstad, J.W. (ed.), *Fungal pathology*. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 267-306.
- Hall, A.A. & Gurr, S.J. (2000) Initiation of appressorial germ tube differentiation and appressorial hooking: distinct morphological events regulated by cAMP signalling in *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological & Molecular Plant Pathology*, **56**, 39-46.
- Hammerschmidt, R. (1999) Phytoalexins: What Have We Learned After 60 Years? *Annual Review of Phytopathology*, **37**, 285-306.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D. (1996) Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, **8**, 1773-1791.
- Hammond-Kosack, K.E. & Jones, J.D. (1997) Plant Disease Resistance Genes. *Annual Reviews in Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **48**, 575-607.
- Haridas, V., Kim, S.O., Nishimura, G., Hausladen, A., Stamler, J.S. & Gutterman, J.U. (2005) Avicinylation (thioesterification): a protein modification that can regulate the response to oxidative and nitrosative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 10088-10093.
- Harrier, L.A. & Watson, C.A. (2004) The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems. *Pest Management Science*, **60**, 149-157.
- Harrison, M.J. (1999) Molecular and Cellular Aspects of the Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology*, **50**, 361-389.
- Harrison, M.J., Dewbre, G.R. & Liu, J. (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell*, **14**, 2413-2429.
- Hause, B., Demus, U., Teichmann, C., Parthier, B. & Wasternack, C. (1996) Developmental and tissue-specific expression of JIP-23, a jasmonate-inducible protein of barley. *Plant and Cell Physiology*, **37**, 641-649.
- 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.
- Heath, M. (1987) Evolution of plant resistance and susceptibility to fungal invaders. *Canadian Journal of Plant Pathology*, **9**, 389-397.
- Heath, M.C. (2000) Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 315-319.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. (1996) Real time quantitative PCR. *Genome Research*, **6**, 986-994.
- Heitefuss, R. (2001) Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example. *Naturwissenschaften*, **88**, 273-283.
- Hipskind, J.D., Nicholson, R.L. & Goldsbrough, P.B. (1996) Isolation of a cDNA encoding a novel leucine-rich repeat motif from *Sorghum bicolor* inoculated with fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **9**, 819-825.

- Ho, C.L. & Saito, K. (2001)** Molecular biology of the plastidic phosphorylated serine biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Amino Acids*, **20**, 243-259.
- Hoffmann, G.M. & Schmutterer, H. (1999)** *Parasitäre Krankheiten und Schädlinge an landwirtschaftlichen Kulturpflanzen*. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Hohnjec, N., Vieweg, M.F., 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.
- Hooker, J.E., Jaizme-Vega, M. & Atkinson, D. (1994)** Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In Gianinazzi, S. & Schüepp, H. (eds.), *Impact of arbuscular mycorrhizas on sustainable agriculture and natural ecosystems*. Birkhäuser, Basel, pp. 191-200.
- Hückelhoven, R., Dechert, C. & Kogel, K.H. (2003)** Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 5555-5560.
- Hückelhoven, R., Dechert, C., Trujillo, M. & Kogel, K.H. (2001)** Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*, **47**, 739-748.
- Hückelhoven, R., Fodor, J., Preis, C. & Kogel, K.H. (1999)** Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology*, **119**, 1251-1260.
- Hückelhoven, R. & Kogel, K.H. (2003)** Reactive oxygen intermediates in plant-microbe interactions: who is who in powdery mildew resistance? *Planta*, **216**, 891-902.
- Hückelhoven, R., Trujillo, M. & Kogel, K.H. (2000)** Mutations in Ror1 and Ror2 genes cause modification of hydrogen peroxide accumulation in mlo-barley under attack from the powdery mildew fungus. *Molecular Plant Pathology*, **1**, 287-292.
- Hulbert, S.H., Webb, C.A., Smith, S.M. & Sun, Q. (2001)** Resistance gene complexes: evolution and utilization. *Annual Review in Phytopathology*, **39**, 285-312.
- Isayenkov, S., Fester, T. & Hause, B. (2004)** Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *Journal of Plant Physiology*, **161**, 1379-1383.
- Ishikawa, T., Yoshimura, K., Tamoi, M., Takeda, T. & Shigeoka, S. (1997)** Alternative mRNA splicing of 3'-terminal exons generates ascorbate peroxidase isoenzymes in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. *Biochemical Journal*, **328 (Pt 3)**, 795-800.
- Jansen, C., Korell, M., Eckey, C., Biedenkopf, D. & Kogel, K.H. (2005)** Identification and transcriptional analysis of powdery mildew-induced barley genes. *Plant Science*, **168**, 373-380.
- Jarosch, B. (2002)** Der Einfluß des Mlo-Locus auf genetisch vermittelte und chemisch induzierte Resistenz der Gerste [*Hordeum vulgare* L.] gegenüber pilzlichen Pathogenen. Justus-Liebig Universität, Giessen.
- Jia, Y., Gray, V.M. & Straker, C.J. (2004)** The influence of Rhizobium and arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen and phosphorus accumulation by *Vicia faba*. *Annals of Botany*, **94**, 251-258.

- Jørgensen, J.H. (1992)** Discovery, characterization and exploitation of *Mlo* powdery mildew resistance in barley. *Euphytica*, **63**, 141-152.
- Kah, B. (2005)** Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der chemisch induzierten Resistenz in Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber dem Echten Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Justus-Liebig Universität, Giessen.
- Kaldorf, M., Koch, B., Rexer, K.H., Kost, G. & Varma, A. (2005)** Patterns of interaction between populus Esch5 and *Piriformospora indica*: a transition from mutualism to antagonism. *Plant Biology*, **7**, 210-218.
- 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.
- Karandashov, V. & Bucher, M. (2005)** Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends in Plant Science*, **10**, 22-29.
- Karandashov, V., Nagy, R., Wegmuller, S., Amrhein, N. & Bucher, M. (2004)** Evolutionary conservation of a phosphate transporter in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 6285-6290.
- Kessmann, H., Staub, T., Hofmann, C., Maetzke, T., Herzog, J., Ward, E., Uknes, S. & Ryals, J. (1994)** Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, **32**, 439-459.
- Khalid, A., Arshad, M. & Zahir, Z.A. (2004)** Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *Journal of Applied Microbiology*, **96**, 473-480.
- Kim, M.S., Kim, Y.C. & Cho, B.H. (2004)** Gene expression analysis in cucumber leaves primed by root colonization with *Pseudomonas chlororaphis* O6 upon challenge-inoculation with *Corynespora cassiicola*. *Plant Biology*, **6**, 105-108.
- Kim, S.Y., Lim, J.H., Park, M.R., Kim, Y.J., Park, T.I., Seo, Y.W., Choi, K.G. & Yun, S.J. (2005)** Enhanced antioxidant enzymes are associated with reduced hydrogen peroxide in barley roots under saline stress. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **38**, 218-224.
- Kloepper, J.W., Tuzun, S. & Kuc, J.A. (1992)** Proposed definitions related to induced disease resistance. *Biocontrol Science & Technology*, **2**, 349-351.
- Koch, K.E. & Johnson, C.R. (1984)** Photosynthate partitioning in split-root citrus seedlings with mycorrhizal and nonmycorrhizal root systems. *Plant Physiology*, **75**, 26-30.
- Koga, H., Bushnell, W.R. & Zeyen, R.J. (1990)** Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Canadian Journal of Botany*, **68**, 2344-2352.
- Kogel, K.H., Beckhove, U., Dreschers, J., Munch, S. & Romme, Y. (1994)** Acquired resistance in barley (the resistance mechanism induced by 2,6-dichloroisonicotinic acid is a phenocopy of a genetically based mechanism governing race-specific powdery mildew resistance). *Plant Physiology*, **106**, 1269-1277.
- Kogel, K.H. & Langen, G. (2005)** Induced disease resistance and gene expression in cereals. *Cellular Microbiology*, **7**, 1555-1564.
- Kohler, A., Schwindling, S. & Conrath, U. (2002)** Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **128**, 1046-1056.

- Koide, R.T. (2000)** Functional complementarity in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **147**, 233-235.
- Koide, R.T. & Dickie, I.A. (2002)** Effects of mycorrhizal fungi on plant populations. *Plant and soil*, **244**, 307–317.
- Koide, R.T., Shumway, D.L. & Mabon, S.A. (1994)** Mycorrhizal fungi and reproduction of field populations of *Abutilon theophrasti* Medic. (Malvaceae). *New Phytologist*, **126**, 123-130.
- Kombrink, E. & Schmelzer, E. (2001)** The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 69-78.
- Krupinska, K., Haussuhl, K., Schafer, A., van der Kooij, T.A., Leckband, G., Lorz, H. & Falk, J. (2002)** A novel nucleus-targeted protein is expressed in barley leaves during senescence and pathogen infection. *Plant Physiology*, **130**, 1172-1180.
- Kumari, R., Kishan, H., Bhoon, Y.K. & Varma, A. (2003)** Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. *Current Science*, **85**, 1672-1674.
- Kunoh, H., Itoh, O., Kohno, M. & Ishizaki, H. (1979)** Are primary germ tubes of conidia unique to *Erysiphe graminis*? *Annal. Phytopathol. Soc. Japan*, **45**, 675-682.
- Lauer, M.J., Pallardy, S.G., Blevins, D.G. & Randall, D.G. (1989)** Whole leaf carbon exchange characteristics of phosphate-deficient soybean (*Glycine max* L.). *Plant Physiology*, **91**, 848-854.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessmann, H., Staub, T. & Ryals, J. (1996)** Benzothiadiazole induces disease resistance in *Arabidopsis* by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. *Plant Journal*, **10**, 71-82.
- Lekberg, Y. & Koide, R.T. (2005)** Is plant performance limited by abundance of arbuscular mycorrhizal fungi? A meta-analysis of studies published between 1988 and 2003. *New Phytologist*, **168**, 189-204.
- Li, Y., Jones, L. & McQueen-Mason, S. (2003)** Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology*, **6**, 603-610.
- Linderman R., G. (1994)** Role of VAM fungi in biocontrol. In Pflieger, F.L.&Linderman Robert, G. (eds.), *Mycorrhizae and plant health*. The American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 1-26.
- Liu, G., Sheng, X., Greenshields, D.L., Ogieglo, A., Kaminskyj, S., Selvaraj, G. & Wei, Y. (2005)** Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 730-741.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001)** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Ludwig-Müller, J. (2000)** Hormonal balance in plants during colonisation by mycorrhizal fungi. In Kapulnik, Y.&Douds Jr, D.D. (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 263-287.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. (2001)** *Brock - Biology of microorganisms*. Prentice Hall, New Jersey.
- Martin, G.B., Brommonschenkel, S.H., Chunwongse, J., Frary, A., Ganai, M.W., Spivey, R., Wu, T., Earle, E.D. & Tanksley, S.D. (1993)** Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato. *Science*, **262**, 1432-1436.

- May, M.J., Vernoux, T., Leaver, C.J., van Montagu, M. & Inze, D. (1998) Glutathion homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, **49**, 649-667.
- Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R. (2004) Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology & Biochemistry*, **42**, 565-572.
- McCartney, H.A., Foster, S.J., Fraaije, B.A. & Ward, E. (2003) Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. *Pest Management Science*, **59**, 129-142.
- Mende, K., Homann, V. & Tudzynski, B. (1997) The geranylgeranyl diphosphate synthase gene of *Gibberella fujikuroi* - isolation and expression. *Molecular & General Genetics*, **255**, 96-105.
- Mendgen, K., Hahn, M. & Deising, H. (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol*, **34**, 367-386.
- Metraux, J.P., Singer, H., Ryals, J., Ward, E., Wyss-Benz, M., Gaudin, J., Raschdorf, K., Schmid, E., Blum, W. & Inverardi, B. (1990) Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science*, **250**, 1004-1006.
- Meyers, B.C., Galbraith, D.W., Nelson, T. & Agrawal, V. (2004) Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiology*, **135**, 637-652.
- Mittler, R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, **7**, 405.
- Mittova, V., Volokita, M., Guy, M. & Tal, M. (2000) Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia Plantarum*, **110**, 42-51.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U., Gorrichon, L. & Reisener, H.-J. (1990) Specific Inhibition of Lignification Breaks Hypersensitive Resistance of Wheat to Stem Rust. *Plant Physiology*, **93**, 465-470.
- Molina, R., Massicotte, H. & Trappe, J.M. (1992) Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: community-ecological consequences and practical implications. In Allen, M.F. (ed.), *Mycorrhizal functioning: an integrative plant-fungal process*. Chapman & Hall, New York, London, pp. 357-423.
- Morton, J.B. & Benny, G.L. (1990) Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (*Zygomycetes*): a new order, *Glomales*, two new suborders, *Glomineae* and *Gigasporineae*, and two new families, *Acaulosporaceae* and *Gigasporaceae*, with an emendation of *Glomaceae*. *Mycotaxon*, **37**, 471-491.
- Mou, Z., Fan, W. & Dong, X. (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell*, **113**, 935-944.
- Mu, J.H., Lee, H.S. & Kao, T.H. (1994) Characterization of a pollen-expressed receptor-like kinase gene of *Petunia inflata* and the activity of its encoded kinase. *Plant Cell*, **6**, 709-721.
- Muthukrishnan, S., Liang, G.H., Trick, H.N. & Gill, B.S. (2001) Pathogenesis-related proteins and their genes in cereals [Review]. *Plant Cell Tissue & Organ Culture*, **64**, 93-114.
- Mylona, P., Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1995) Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell*, **7**, 869-885.
- Oerke, E.C., Dehne, H.W., Schönbeck, F. & Weber, A. (1994) *Crop production and crop protection - estimated losses in major food and cash crops*. Elsevier, Amsterdam.

- Oliver, R.P., Henricot, B. & Segers, G. (2000)** *Cladosporium fulvum*, cause of leaf mould of tomato. In Kronstad, J.W. (ed.), *Fungal Pathology*. Kluwer Academic Publishers, London, pp. 65-91.
- Oostendorp, M., Kunz, W., Dietrich, B. & Staub, T. (2001)** Induced disease resistance in plants by chemicals. *European Journal of Plant Pathology*, **107**, 19-28.
- Osborn, A.E. (1996)** Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell*, **8**, 1821-1831.
- Peng, M. & Kuc, J. (1992)** Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity in vitro and on tobacco leaf disks. *Phytopathology*, **82**, 696-699.
- Penninckx, I.A., Eggermont, K., Terras, F.R., Thomma, B.P., De Samblanx, G.W., Buchala, A., Metraux, J.P., Manners, J.M. & Broekaert, W.F. (1996)** Pathogen-induced systemic activation of a plant defensin gene in *Arabidopsis* follows a salicylic acid-independent pathway. *Plant Cell*, **8**, 2309-2323.
- Peskan-Berghöfer, T., Shahollari, B., Giong, P.H., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A. & Oelmüller, R. (2004)** Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum*, **122**, 465-477.
- Peterhänsel, C., Freialdenhoven, A., Kurth, J., Kolsch, R. & Schulze-Lefert, P. (1997)** Interaction analyses of genes required for resistance responses to powdery mildew in barley reveal distinct pathways leading to leaf cell death. *Plant Cell*, **9**, 1397-1409.
- Pfaffl, M.W. (2001)** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, **29**, e45.
- Pfeffer, P.E., Douds Jr, D.D., Becard, G. & Shachar-Hill, Y. (1999)** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology*, **120**, 587-598.
- Pham, G.H., Kumari, R., Singh, A., Malla, R., Prasad, R., Sachdev, M., Kaldorf, M., Buscot, F., Oelmüller, R., Hampp, R., Saxena, A.K., Rexer, K.H., Kost, G. & Varma, A. (2004a)** Axenic Culture of Symbiotic Fungus *Piriformospora indica*. In Varma, A.&Abbot, L.&Werner, D.&Hampp, R. (eds.), *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 593-612.
- Pham, G.H., Singh, A., Malla, R., Kumari, M., Prasad, R., Sachdev, M., Rexer, K.H., Kost, G., Luis, P., Kaldorf, M., Buscot, F., Herrmann, S., Peskan, T., Oelmüller, R., Saxena, A.K., Declerck, S., Mittag, M., Stabentheiner, E., Hehl, S. & Varma, A. (2004b)** Interaction of *Piriformospora indica* with diverse microorganisms and plants. In Varma, A.&Abbot, L.&Werner, D.&Hampp, R. (eds.), *Plant Surface Microbiology*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 237-264.
- Pico, B., Sifres, A. & Nuez, F. (2005)** Quantitative detection of cucumber vein yellowing virus in susceptible and partially resistant plants using real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, **128**, 14-20.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., Hoffland, E., van Pelt, J.A. & van Loon, L.C. (1996)** Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**, 1225-1237.

- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., Ton, J., van Pelt, J.A. & van Loon, L.C. (2002) Signalling in rhizobacteria-induced systemic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology*, **4**, 535-544.
- Pieterse, C.M., van Wees, S.C., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. & van Loon, L.C. (1998) A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **10**, 1571-1580.
- Pieterse, C.M.J. & van Loon, L.C. (1999) Salicylic acid-independent plant defence pathways [Review]. *Trends in Plant Science*, **4**, 52-58.
- Pinstrup-Andersen, P. (2001) The future world food situation and the role of plant diseases. *The Plant Health Instructor*. DOI:10.1094/PHI-I-2001-0425-01
- Pope, E.J. & Carter, D.A. (2001) Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia*, **93**, 712-719.
- Pozo, M.J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J.M. & Azcon-Aguilar, C. (2002) Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany*, **53**, 525-534.
- Prell, H.H. & Day, P.R. (2001) *Plant-Fungal Pathogen Interaction*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Pryce-Jones, E., Carver, T. & Gurr, S.J. (1999) The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 175-182.
- Purrington, C.B. (2000) Costs of resistance. *Current Opinion in Plant Biology*, **3**, 305-308.
- Rai, M., Acharya, D., Singh, A. & Varma, A. (2001) Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza*, **11**, 123-128.
- Ray, S., Anderson, J.M., Urmeev, F.I. & Goodwin, S.B. (2003) Rapid induction of a protein disulfide isomerase and defense-related genes in wheat in response to the hemibiotrophic fungal pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Molecular Biology*, **53**, 701-714.
- Requena, N. (1997) Mycorrhizal symbiosis and management of the mycorrhizosphere as a tool for the restoration of degraded semi-arid ecosystems. *Recent Research Development in Microbiology*, **1**, 267-276.
- Reuber, T.L., Plotnikova, J.M., Dewdney, J., Rogers, E.E., Wood, W. & Ausubel, F.M. (1998) Correlation of defense gene induction defects with powdery mildew susceptibility in *Arabidopsis* enhanced disease susceptibility mutants. *Plant Journal*, **16**, 473-485.
- Rhody, D. (1999) Mikroskopische und molekulare Analyse der Wechselwirkungen zwischen *Piriformospora indica* und Wurzeln von *Zea mays*. Philipps-Universität Marburg, Marburg.
- Richter, T.E. & Ronald, P.C. (2000) The evolution of disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, **42**, 195-204.
- Roitsch, T. (1999) Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology*, **2**, 198-206.
- Roitsch, T., Balibrea, M.E., Hofmann, M., Proels, R. & Sinha, A.K. (2003) Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein. *Journal of Experimental Botany*, **54**, 513-524.
- Ryals, J., Uknes, S. & Ward, E. (1994) Systemic acquired resistance. *Plant Physiology*, **104**, 1109-1112.

- Ryan, C.A. (1992)** The search for the proteinase inhibitor-inducing factor, PIIF. *Plant Molecular Biology*, **19**, 123-133.
- Ryan, M.H. & Graham, J.H. (2002)** Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture? *Plant and Soil*, **244**, 263–271.
- Sahay, N.S. & Varma, A. (1999)** Piriformospora indica: a new biological hardening tool for micropropagated plants. *FEMS Microbiol Lett*, **181**, 297-302.
- Saito, M. (2000)** Symbiotic exchange of nutrients in arbuscular mycorrhizas: transport and transfer of phosphorus. In Kapulnik, Y.&Douds, D.D. (eds.), *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Niederlande.
- Salmeron, J.M., Barker, S.J., Carland, F.M., Mehta, A.Y. & Staskawicz, B.J. (1994)** Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. *Plant Cell*, **6**, 511-520.
- Sambrook J., F.E.F., Maniatis T.A. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor New York.
- Scagel, C., F. & Linderman, R., G. (1998)** Relationships between differential *in vitro* indole-acetic acid or ethylene production capacity by ectomycorrhizal fungi and conifer seedling responses in symbiosis. *Symbiosis*, **24**, 13-34.
- Schafer, F.Q. & Buettner, G.R. (2001)** Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*, **30**, 1191-1212.
- Schäfer, P. (2003)** Cytological and molecular investigations of cereal resistance mechanisms against the hemibiotrophic pathogen *Bipolaris sorokiniana*. Justus-Liebig Universität, Giessen.
- Schaffrath, U., Zabbai, F. & Dudler, R. (2000)** Characterization of RCI-1, a chloroplastic rice lipoxygenase whose synthesis is induced by chemical plant resistance activators. *Eur J Biochem*, **267**, 5935-5942.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. & Brown, P.O. (1995)** Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.
- Schenk, P.M., Kazan, K., Wilson, I., Anderson, J.P., Richmond, T., Somerville, S.C. & Manners, J.M. (2000)** Coordinated plant defense responses in Arabidopsis revealed by microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 11655-11660.
- Schiffer, R., Görg, R., Jarosch, B., Beckhove, U., Bahrenberg, G., Kogel, K.H. & Schulze-Lefert, P. (1997)** Tissue dependence and differential cordycepin sensitivity of racespecific resistance responses in the barley-powdery mildew interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **10**, 830-839.
- Schillmiller, A.L. & Howe, G.A. (2005)** Systemic signaling in the wound response. *Current Opinion in Plant Biology*, **8**, 369-377.
- Schlösser, E. (1997)** *Allgemeine Phytopathologie*. Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart.
- Scholes, J.D., Lee, P.J., Horton, P. & Lewis, D.H. (1994)** Invertase: understanding changes in the photosynthetic and carbohydrate metabolism of barley leaves infected with powdery mildew. *New Phytologist*, **126**, 213-222.
- Schönbeck, F., Steiner, U. & Kraska, T. (1993)** Induced resistance: criteria, mechanisms, practical application and estimation. *Journal of Plant Diseases and Protection*, **100**, 541-557.
- Schultheiss, H., Dechert, C., Kiraly, L., Fodor, J., Michel, K., Kogel, K.H. & Hückelhoven, R. (2003)** Functional assessment of the pathogenesis-related protein PR-1b in barley. *Plant Science*, **165**, 1275-1280.

- Schultheiss, H., Dechert, C., Kogel, K.H. & Huckelhoven, R. (2002)** A small GTP-binding host protein is required for entry of powdery mildew fungus into epidermal cells of barley. *Plant Physiology*, **128**, 1447-1454.
- Schulze-Lefert, P. & Vogel, J. (2000)** Closing the ranks to attack by powdery mildew. *Trends in Plant Science*, **5**, 343-348.
- Schumann, G.L. (1993)** *Plant Diseases: Their Biology and Social Impact*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.
- Schüßler, A. (2002)** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil*, **244**, 75-83.
- Schüßler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001)** A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: Phylogeny and evolution. *Mycological Research*, **105**, 1413-1421.
- Schweizer, P., Buchala, A. & Metraux, J.P. (1997)** Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. *Plant Physiology*, **115**, 61-70.
- Schweizer, P., Hunziker, W. & Moesinger, E. (1989)** cDNA cloning, in vitro transcription and partial sequence analysis of mRNAs from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) with induced resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Plant Molecular Biology*, **12**, 643-654.
- Schweizer, P., Pokorny, J., Abderhalden, O. & Dudler, R. (1999)** A transient assay system for the functional assessment of defense-related genes in wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 647-654.
- Selle, A., Willmann, M., Grunze, N., Gessler, A., Weiss, M. & Nehls, U. (2005)** The high-affinity poplar ammonium importer PttAMT1.2 and its role in ectomycorrhizal symbiosis. *New Phytologist*, **168**, 697-706.
- Shahollari, B., Varma, A. & Oelmüller, R. (2005)** Expression of a receptor kinase in *Arabidopsis* roots is stimulated by the basidiomycete *Piriformospora indica* and the protein accumulates in Triton X-100 insoluble plasma membrane microdomains. *Journal of Plant Physiology*, **162**, 945-958.
- Shaul, O., David, R., Sinvani, G., Ginzberg, I., Ganon, D., Wininger, S., Ben-Dor, B., Badani, H., Ovdad, N., Kapulnik, Y. & Figures, P. (2000)** Plant defense responses during arbuscular mycorrhiza symbiosis. In G.K., P.&D.D., D. (eds.), *Current Advances in Mycorrhizae Research*. The American Phytopathological Society, St. Paul, pp. 61-68.
- Shaul, O., Galili, S., Volpin, H., Ginzberg, I., Elad, Y., Chet, I. & Kapulnik, Y. (1999)** Mycorrhiza-induced changes in disease severity and PR protein expression in tobacco leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **12**, 1000-1007.
- Sherameti, I., Shahollari, B., Venus, Y., Altschmied, L., Varma, A. & Oelmüller, R. (2005)** The endophytic fungus *Piriformospora indica* stimulates the expression of nitrate reductase and the starch-degrading enzyme glucan-water dikinase in tobacco and *Arabidopsis* roots through a homeodomain transcription factor which binds to a conserved motif in their promoters. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 26241-26247
- Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.-H. & Varma, A. (2000)** Plant productivity determinants beyond minerals, water and light: *Piriformospora indica*: A revolutionary plant growth promoting fungus. *Current Science*, **79**, 1548-1554.
- Skadsen, R.W., Schulze-Lefert, P. & Herbst, J.M. (1995)** Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme genes in barley. *Plant Molecular Biology*, **29**, 1005-1014.

- Smith, S.E. & Smith, F.A. (1990)** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *New Phytologist*, **114**, 1-38.
- Song, W.Y., Wang, G.L., Chen, L.L., Kim, H.S., Pi, L.Y., Holsten, T., Gardner, J., Wang, B., Zhai, W.X., Zhu, L.H., Fauquet, C. & Ronald, P. (1995)** A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science*, **270**, 1804-1806.
- Spoel, S.H., Koornneef, A., Claessens, S.M., Korzelius, J.P., Van Pelt, J.A., Mueller, M.J., Buchala, A.J., Metraux, J.P., Brown, R., Kazan, K., Van Loon, L.C., Dong, X. & Pieterse, C.M. (2003)** NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol. *Plant Cell*, **15**, 760-770.
- Steffens, D., Mühling, K.H. & Schubert, S. (2004)** *Agrikulturchemisches Praktikum*. Verlag Grauer, Beuren, Stuttgart.
- Sticher, L., Mauch-Mani, B. & Metraux, J.P. (1997)** Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol*, **35**, 235-270.
- Stintzi, A., Heitz, T., Prasad, V., Wiedemann-Merdinoglu, S., Kauffmann, S., Geoffroy, P., Legrand, M. & Fritig, B. (1993)** Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. *Biochimie*, **75**, 687-706.
- Strack, D., Fester, T., Hause, B., Schliemann, W. & Walter, M.H. (2003)** Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *Journal of Chemical Ecology*, **29**, 1955-1979.
- Strid, A., Chow, W.S. & Anderson, J.M. (1994)** UV-B damage and protection at the molecular level in plants. *Photosynthesis Research*, **39**, 475-489.
- Sun, X., Cao, Y., Yang, Z., Xu, C., Li, X., Wang, S. & Zhang, Q. (2004)** Xa26, a gene conferring resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *Plant Journal*, **37**, 517-527.
- Suzuki, H., Xia, Y., Cameron, R., Shadle, G., Blount, J., Lamb, C. & Dixon, R.A. (2004)** Signals for local and systemic responses of plants to pathogen attack. *J Exp Bot*, **55**, 169-179.
- Sweetlove, L.J. & Fernie, A.R. (2005)** Regulation of metabolic networks: understanding metabolic complexity in the systems biology era. *New Phytologist*, **168**, 9-24.
- Taylor, J. & Harrier, L.A. (2003)** Expression studies of plant genes differentially expressed in leaf and root tissues of tomato colonised by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Molecular Biology*, **51**, 619-629.
- Thordal-Christensen, H., Gregersen, P.L. & Collinge, D.B. (1999)** The barley/*Blumeria* (syn. *Erysiphe*) *graminis* interaction. In *Mechanisms of Resistance*. Kluwer Verlag, Dordrecht, Niederlande, pp. 77-100.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z.G., Wei, Y.D. & Collinge, D.B. (1997)** Subcellular localization of H₂O₂ in plants - H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal*, **11**, 1187-1194.
- Trujillo, M., Kogel, K.H. & Huckelhoven, R. (2004)** Superoxide and hydrogen peroxide play different roles in the nonhost interaction of barley and wheat with inappropriate formae speciales of *Blumeria graminis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 304-312.
- Uknes, S., Mauch Mani, B., Moyer, M., Potter, S., Williams, S., Dincher, S., Chandler, D., Slusarenko, A., Ward, E. & Ryals, J. (1992)** Acquired resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **4**, 645-656.

- Vallélian-Bindschedler, L., Métraux, J.P. & Schweizer, P. (1998) Salicylic acid accumulation in barley is pathogen specific but not required for defense-gene activation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **11**, 702–705.
- van der Hoorn, R.A. & Jones, J.D. (2004) The plant proteolytic machinery and its role in defence. *Current Opinion in Plant Biology*, **7**, 400-407.
- van der Plank, J.E. (1984) *Disease resistance in plants*. Academic press, Orlando, USA.
- van Kammen, A. (1984) Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter*, **2**, 43-45.
- van Loon, L.C., Bakker, P.A. & Pieterse, C.M. (1998) Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 453-483.
- van Loon, L.C. & van Strien, E.C. (1999) The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **55**, 85-97.
- van Wees, S.C., Lujendijk, M., Smoorenburg, I., van Loon, L.C. & Pieterse, C.M. (1999) Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in *Arabidopsis* is not associated with a direct effect on expression of known defense-related genes but stimulates the expression of the jasmonate-inducible gene *Atvsp* upon challenge. *Plant Molecular Biology*, **41**, 537-549.
- Vanacker, H., Carver, T.L. & Foyer, C.H. (2000) Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction. *Plant Physiology*, **123**, 1289-1300.
- Vanacker, H., Carver, T.L.W. & Foyer, C.H. (1998) Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, **117**, 1103-1114.
- Varma, A., Singh, A., Sudha, Sahay, N.S., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., Deka, D., Bharti, K., Hurek, T., Blechert, O., Rexer, K.H., Kost, G., Hahn, A., Maier, W., Walter, M., Strack, D. & Kranner, I. (2000a) *Piriformospora indica*: An axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. In Hock, B. (ed.), *The Mycota IX-Fungal Associations*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Varma, A., Singh, B.B., Karnani, N., Lichtenberg-Frate, H., Hofer, M., Magee, B.B. & Prasad, R. (2000b) Molecular cloning and functional characterisation of a glucose transporter, CaHGT1, of *Candida albicans*. *FEMS Microbiology Letters*, **182**, 15-21.
- Varma, A., Verma, S., Sudah, Sahay, N. & Franken, P. (1999) *Piriformospora indica*, a cultivable plant growth-promoting root endophyte. *Applied & Environmental Microbiology*, **65**, 2741-2744.
- Verhagen, B.W., Glazebrook, J., Zhu, T., Chang, H.S., van Loon, L.C. & Pieterse, C.M. (2004) The transcriptome of rhizobacteria-induced systemic resistance in arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **17**, 895-908.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K.-H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Buetehorn, B. & Franken, P. (1998) *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia*, **90**, 896-903.
- Vernooij, B., Friedrich, L., Morse, A., Reist, R., Kolditz-Jawhar, R., Ward, E., Uknes, S., Kessmann, H. & Ryals, J. (1994) Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell*, **6**, 959-965.

- Vignutelli, A., Wasternack, C., Apel, K. & Bohlmann, H. (1998) Systemic and local induction of an *Arabidopsis* thionin gene by wounding and pathogens. *Plant Journal*, **14**, 285-295.
- Vreeburg, R.A., Benschop, J.J., Peeters, A.J., Colmer, T.D., Ammerlaan, A.H., Staal, M., Elzenga, T.M., Staals, R.H., Darley, C.P., McQueen-Mason, S.J. & Voesenek, L.A. (2005) Ethylene regulates fast apoplastic acidification and expansin A transcription during submergence-induced petiole elongation in *Rumex palustris*. *Plant Journal*, **43**, 597-610.
- Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., von Wettstein, D., Franken, P. & Kogel, K.H. (2005) The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 13386-13391.
- Walther-Larsen, H., Brandt, J., Collinge, D.B. & Thordal-Christensen, H. (1993) A pathogen-induced gene of barley encodes a HSP90 homologue showing striking similarity to vertebrate forms resident in the endoplasmic reticulum. *Plant Molecular Biology*, **21**, 1097-1108
- Walton, N.J. & Woolhouse, H.W. (1986) Enzymes of serine and glycine metabolism in leaves and non-photosynthetic tissues of *Pisum sativum* L. *Planta*, **167**, 119-128.
- Wang, B., Lutge, U. & Ratajczak, R. (2004) Specific regulation of SOD isoforms by NaCl and osmotic stress in leaves of the C3 halophyte *Suaeda salsa* L. *Journal of Plant Physiology*, **161**, 285-293.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M. & Dong, X. (2005a) Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance. *Science*, **308**, 1036-1040.
- Wang, Y., Ohara, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y. & Mayama, S. (2005b) Microarray analysis of the gene expression profile induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens* FPT9601-T5 in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **18**, 385-396.
- Ward, E., Kanyuka, K., Motteram, J., Korniyukhin, D. & Adams, M.J. (2005) The use of conventional and quantitative real-time PCR assay for *Polymyxa graminis* to examine host plant resistance, inoculum levels and intraspecific variation. *New Phytologist*, **165**, 875-885.
- Ward, E., Uknes, S. & Williams, S. (1991) Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. *Plant Cell*, **3**, 1085-1094.
- Wei, G., Kloepper, J.W. & Tuzun, S. (1991) Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by selected strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, **81**, 1508-1512
- Wei, Y.D., Zhang, Z.G., Andersen, C.H., Schmelzer, E., Gregersen, P.L., Collinge, D.B., Smedegaardpetersen, V. & Thordalchristensen, H. (1998) An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology*, **36**, 101-112.
- Weiss, M., Selosse, M.A., Rexer, K.H., Urban, A. & Oberwinkler, F. (2004) Sebaciniales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with a broad mycorrhizal potential. *Mycol Res*, **108**, 1003-1010.
- Werner, D. (1992) *Symbiosis of plants and microbes*, London: Chapman & Hall.
- Whipps, J.M. (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot*, **52**, 487-511.

- Wright, D.P., Scholes, J.D. & Read, D.J. (1998)** Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment*, **21**, 209-216.
- Wu, Y.X. & von, T.A. (2002)** Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. *Environmental Pollution*, **116**, 37-47.
- Wulf, A., Manthey, K., Doll, J., Perlick, A.M., 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.
- Xiong, L., Lee, M.W., Qi, M. & Yang, Y. (2001)** Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 685-692.
- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M. & Bressan, R.A. (1994)** Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate. *Plant Cell*, **6**, 1077-1085.
- Yoshikawa, M., Yamaoka, N. & Takeuchi, Y. (1993)** Elicitors: Their significance and primary modes of action in the induction of plant defense reactions. *Plant & Cell Physiology*, **34**, 1163-1173.
- Zhang, Z.G., Collinge, D.B. & Thordal-Christensen, H. (1995)** Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal*, **8**, 139-145.
- Zhou, J., Loh, Y.T., Bressan, R.A. & Martin, G.B. (1995)** The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. *Cell*, **83**, 925-935.
- Zhou, J., Tang, X. & Martin, G.B. (1997)** The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *EMBO Journal*, **16**, 3207-3218.
- Zhu, T. & Wang, X. (2000)** Large-scale profiling of the *Arabidopsis* transcriptome. *Plant Physiology*, **124**, 1472-1476.

6 Anhang

Versuchs-Nr.	Ernte	Besiedelungs-typ	Besiedelung	Wachstum			Blattsegmentfest	
				Sproßlänge (rel. Pzu K) [%]	Sproßgewicht (rel. PzuK) [%]	Wurzelgewicht (rel. Pzu K) [%]	jüngstes Blatt	zweitjüngstes Blatt
34e-2003	3 WAI	Sporen und Hyphen					pro. Anteil Pusteln auf <i>P.indica</i> -Blatt [%]	Sign.
34f-2003	3 WAI	Sporen und Hyphen					39,86 **	51,67 *
34-2004	3 WAI	Hyphen	keine starke Besiedelung (einige Wurzelhaare waren besiedelt)	115,56	163,64 ***	140,44	36,30 ***	72,09 *
34c-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	sehr viele Hyphen, sehr wenig Sporen	126,32 ***	211,08 ***	189,30 *	44,16 *	-
34d-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	viele Hyphen, sehr wenig Sporen (etwas mehr als 34c)	128,45 ***	166,81 ***	191,93 *	nicht auswertbar	-
34e-2004	3 WAI	Hyphen	einige Hyphen, keine Sporen (beginnende Sporenbildung) (x(x))	114,63 **	114,68 -	118,18 -	56,02 **	119,72 -
34f-2004	2 WAI	Sporen und Hyphen						
34f-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen					18,22 *	45,00 -
34g-2004	2 WAI							
34g-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	viele Hyphen etwas weniger als 34f-2004, viele Sporen (xxx)	117,00 ***	142,69 **	117,15 -	5,99 *	41,18 -
34h-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	viele Hyphen, viele Sporen (nicht so viel wie 34g)				99,40 -	65,69 -
34i-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	<10%, x, nur ganz vereinzelt Besiedelung	99,55 -	99,54 -	73,72 *		
34j-2004	2 WAI	Sporen und Hyphen	sehr gute starke Besiedelung, viele Wurzelhaare mit Sporen					
34j-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	viele Hyphen, viele Sporen	133,71 *	147,13 -	93,44 -	46,34 -	77,92 -
34k-2004	3 WAI	Sporen und Hyphen	viele Hyphen, viele Sporen				71,66 -	201,15 *
34l-2004	3 WAI	Hyphen	einige Hyphen (manche Teile stark)	117,53 **	158,66 ***	238,83 **	7,88 *	66,15 -
34m-2004	3 WAI							
34q-2004	3 WAI	Hyphen	einige Hyphen, keine Sporen	109,33 -	103,17 -	100,60 -	65,21 -	45,20 -
34r-2004	3 WAI							
34s-2004	3 WAI							
34t-2004	3 WAI							
GE 1-2005	3 WAI	Hyphen	viele Hyphen, ganz vereinzelt Sporen	123,71 ***	176,13 ***	187,84 **	56,82 -	84,71 -
GE 2-2005	3 WAI	Hyphen	einige Hyphen, keine Sporen	113,67 *	167,57 **		158,17 -	132,85 **
GE 3-2005	3 WAI	Hyphen	viele Hyphen, sehr vereinzelt Sporen					
GE 4-2005	3 WAI	Hyphen	teilweise sehr viele Hyphen, keine Sporen				18,99 *	15,58 -
GE11-2005	3 WAI	Hyphen	Sporen	132,71 ***	176,48 ***		17,77 ***	22,73 **
GE12-2005	3 WAI	Hyphen	viele Hyphen, viele Sporen				30,30 *	
GE12-2005	3 WAI	Hyphen	viele Hyphen, viele Sporen				15,38 -	

Tab.6-1: Besiedelungsstärken, Wachstumsparameter und Blattsegmenttests der verwendeten Versuche In der Tabelle dargestellt sind die verwendeten Versuche mit ihren jeweiligen Besiedelungsstärken zum Zeitpunkt der Ernte (x-WAI = x-Wochen nach Inokulation mit *P. indica*). Angegeben ist der Besiedelungstyp, d.h. ob nur Hyphen, oder auch Chlamydosporen in den Wurzeln vorhanden waren und in welcher relativen Intensität diese mikroskopisch sichtbar waren. Die Wachstumsparameter, Sprosslänge, Sprossgewicht und Wurzelgewicht wurden jeweils von 4 mal 4 Pflanzen/Topf bestimmt und die Mittelwerte der *P. indica*-besiedelten Pflanzen relativ zu den Kontrollen angegeben. Die Signifikanz wurde mittels des ungepaarten Student. T-Test berechnet (*= P<0,05; **= P<0,01; ***=P<0,001). Die Resistenz gegen *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* wurde im Blattsegmenttest von jeweils 9 Blättern des jüngsten (3.ten) und zweitjüngsten (2.ten) Blattes drei Wochen alter Pflanzen bestimmt und das Mittel der Pusteln auf den Blättern *P. indica*-besiedelter Pflanzen relativ zu der mittleren Pustelanzahl auf den Blättern von Kontrollpflanzen gesetzt. Die Signifikanz wurde auch hier mit dem ungepaarten Student. T-Test berechnet und angegeben (s.o.)

Tab.6-3: Bgh-induzierte Gene aus Hybridisierungen des 22K Barley1 GeneChip® Mikroarray Dargestellt sind die Gene welche in mindestens 9 Einzelvergleichen (*ChangeCalls*) im Vergleich KBgh-K induziert waren . Zusätzlich sind die Regulationen dieser Kandidatengene in den anderen Vergleichen dargestellt (Tab. 3-6, Abb. 2-4). CI und CD geben die Anzahl an Hybridisierungsergebnissen für Induktion bzw. Repression an (*Change Calls*). FC gibt das Maß der Regulationsstärke an (*Fold Change*) wobei Ergebnisse, die über 2, bzw. unter -2 fach liegen farblich hinterlegt sind. Unter Sign. werden die Ergebnisse der Signifikanztests über die Mittelwerte der drei biologischen Wiederholungen gezeigt. Die Genfunktionszuordnung (*Description*) richtet sich nach den Annotierungen laut Affymetrix (Santa Clara, USA) (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)

Description	KBgh-K			PBgh-P			P-K			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.				
<none>	9	0	9,16	Up	6	2	2,31	None	7	1	3,91	None	4	4	-1,02	None
peroxidase	9	0	7,94	Up	5	1	2,82	None	6	0	2,94	Up	4	4	1,05	None
peroxidase	9	0	7,78	Up	6	1	2,77	None	8	0	2,68	None	4	4	-1,05	None
peroxidase	9	0	7,5	Up	7	2	4,11	None	6	1	1,59	None	3	5	-1,15	None
germin A	9	0	6,57	Up	5	1	2,86	None	3	4	1,82	None	3	5	-1,26	None
<none>	9	0	4,46	Up	6	1	2,04	None	6	0	2,02	None	3	3	-1,09	None
dnak-type molecular chaperone HSP70	9	0	4,37	Up	6	1	1,98	None	6	0	2,36	None	4	3	1,07	None
hypothetical protein pBH6-17	9	0	4,02	Up	4	2	1,23	None	6	1	2,39	Up	2	5	-1,37	None
hypothetical protein pBH6-17	9	0	3,97	Up	5	1	1,86	None	6	1	1,67	None	2	5	-1,28	None
pathogenesis-related protein 4	9	0	3,86	Up	5	2	1,83	None	6	1	1,89	None	2	6	-1,11	None
disulfide isomerase	9	0	3,66	Up	5	1	2,03	None	6	0	1,88	None	4	3	1,04	None
putative serine/threonine-specific receptor protein kinase	9	0	3,59	Up	8	0	2,6	None	3	3	1,72	None	5	1	1,24	None
glycosyl hydrolase family 17	9	0	3,56	Up	8	1	2,35	None	3	2	1,58	None	4	4	1,04	None
proteinase inhibitor	9	0	3,54	Up	4	2	1,61	None	7	1	1,84	None	3	4	-1,19	None
expressed protein	9	0	3,52	Up	7	1	1,92	None	6	0	1,93	None	3	3	1,06	None
disulfide isomerase-related protein	9	0	3,47	Up	8	0	2,59	None	5	0	1,66	None	4	2	1,24	None
naK-type molecular chaperone BIP	9	0	3,31	Up	6	1	1,71	None	6	0	1,9	None	2	2	-1,02	None
peroxidase	9	0	3,28	Up	6	1	2,05	None	4	0	1,46	None	2	5	-1,09	None
Pathogenesis-related protein 1C precursor	9	0	3,17	Up	7	1	2,24	None	7	2	1,55	None	3	4	1,09	None
putative phosphoglycerate dehydrogenase	9	0	3,14	Up	6	2	1,77	None	8	1	2,43	None	5	3	1,37	None
<none>	9	0	3,1	Up	8	0	2,7	None	4	0	1,59	None	5	2	1,38	None
putative UDP-galactose transporter MSS4	9	0	3,07	Up	7	1	1,75	None	6	0	1,75	None	2	2	-1	None
calreticulin	9	0	3,04	Up	7	1	1,85	None	6	0	1,72	None	4	3	1,05	None
peroxidase	9	0	2,94	Up	6	1	1,98	None	4	2	1,29	None	2	4	-1,15	None
putative peroxidase	9	0	2,85	Up	7	1	3,25	None	2	3	-1,09	None	2	3	1,05	None
Putative glutathione S-transferase	9	0	2,83	Up	5	1	1,54	None	5	1	1,86	None	0	3	1,02	None
calreticulin	9	0	2,83	Up	7	1	2,07	None	6	0	1,73	None	5	3	1,26	None
GLUCAN ENDO-1,3-BETA-GLUCOSIDASE GIII PRECURSOR	9	0	2,82	Up	7	0	2,86	None	0	3	-1,12	None	2	4	-1,11	None
blue copper-binding protein homolog	9	0	2,81	Up	6	0	2,71	None	1	0	1,27	None	4	2	1,22	None
<none>	9	0	2,77	Up	4	1	1,28	None	7	1	1,97	None	3	3	-1,1	None
methionine synthase protein	9	0	2,75	Up	5	1	1,44	None	6	2	1,74	None	1	3	-1,1	None
Pathogenesis-related protein 1A/1B precursor	9	0	2,68	Up	6	1	2,06	None	6	1	1,33	None	3	4	1,03	None
<none>	9	0	2,62	Up	5	1	1,85	None	4	0	1,37	None	1	2	-1,03	None
Putative phosphoribosylanthranilate transferase	9	0	2,61	Up	5	2	1,58	None	7	1	1,54	None	2	3	-1,07	None
bZIP family transcription factor	9	0	2,59	Up	7	0	1,73	Up	6	0	1,64	Up	3	2	1,09	None
33 kDa secretory protein-like	9	0	2,59	Up	5	1	1,69	None	4	2	1,51	None	3	3	-1,01	None
germin-like protein	9	0	2,58	Up	5	1	2,07	None	3	4	-1,21	None	2	6	-1,51	None
<none>	9	0	2,57	Up	6	0	1,42	None	5	1	1,49	None	0	3	-1,21	Down
putative protein	9	0	2,56	Up	7	1	2,19	None	3	1	1,4	None	4	2	1,19	None
OSJNB60012E08.10	9	0	2,56	Up	6	0	1,47	None	6	0	1,72	None	3	2	-1,01	None
ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR (GRP94 HOMOLOG)	9	0	2,55	Up	7	1	1,7	None	6	0	1,63	None	4	2	1,09	None
putative protein	9	0	2,53	Up	7	0	2,08	None	6	0	1,52	None	4	2	1,25	None
germin-like protein	9	0	2,48	Up	4	2	1,53	None	2	3	1,1	None	2	6	-1,47	None
SERK2 protein	9	0	2,47	Up	7	1	1,59	None	5	0	1,58	None	3	2	1,02	None
putative ammonium transporter	9	0	2,46	Up	5	0	1,19	None	5	1	1,94	None	0	3	-1,06	None
PIR7A PROTEIN	9	0	2,42	Up	5	1	1,22	None	3	1	1,56	None	2	3	-1,27	None

Fortsetzung II Tab.6-3:

Description	KBgh-K			PBgh-P			P-K			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.				
P0697C12.13	9	0	2,39	Up	6	1	1,37	None	5	1	1,71	None	3	0	-1,02	None
cinnamyl alcohol dehydrogenase 1a	9	0	2,36	Up	6	1	1,36	None	5	1	1,54	None	0	1	-1,13	None
cellulose synthase-like protein OsCslE1	9	0	2,35	Up	7	1	1,74	None	4	1	1,51	None	4	2	1,12	None
<none>	9	0	2,33	Up	4	1	1,29	None	4	1	1,32	None	0	7	-1,37	Down
putative glucosyltransferase	9	0	2,32	Up	4	1	1,13	None	5	1	1,92	None	0	2	-1,07	None
WIR1 protein	9	0	2,29	Up	5	2	1,28	None	4	2	1,33	None	0	6	-1,35	None
signal peptidase	9	0	2,27	Up	7	0	1,75	None	5	0	1,32	None	4	3	1,02	None
hypothetical protein	9	0	2,26	Up	6	1	1,68	None	4	0	1,44	None	4	2	1,07	None
glutathione transferase F5	9	0	2,24	Up	4	1	1,31	None	3	0	1,53	None	0	3	-1,12	None
putative NADH oxidoreductase	9	0	2,14	Up	6	0	1,81	None	3	0	1,12	None	2	3	-1,05	None
putative calreticulin	9	0	2,14	Up	6	1	1,4	None	4	2	1,49	None	1	3	-1,03	None
hypothetical protein	9	0	2,12	Up	6	0	1,44	None	2	0	1,39	Up	4	3	-1,06	None
chitinase (EC 3.2.1.14) cht2b precursor	9	0	2,12	Up	7	0	1,94	Up	2	0	1,13	None	3	2	1,03	None
) putative transport protein SEC61 beta-subunit	9	0	2,12	Up	5	1	1,5	None	4	1	1,47	None	1	2	1,04	None
ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR (GRP94 HOMOLOG)	9	0	2,1	Up	4	0	1,53	Up	6	0	2,01	Up	4	0	1,47	None
<none>	9	0	2,1	Up	5	1	1,67	None	3	1	1,16	None	2	3	-1,09	None
OSJNB0012E08.10	9	0	2,06	Up	6	1	1,47	None	6	0	1,38	None	2	2	-1,01	None
dnaK-type molecular chaperone HSC70-11, mitochondrial	9	0	2,02	Up	5	0	1,29	None	6	0	1,93	None	6	0	1,23	None
OSJNB0053G03.14	9	0	2,01	Up	6	0	1,67	None	0	0	1,03	None	3	4	-1,16	None
ER lumen protein retaining receptor (HDEL receptor)	9	0	2,01	Up	8	1	1,83	None	3	0	1,26	None	3	2	1,15	None
<none>	9	0	2	Up	4	1	1,19	None	3	0	1,57	None	0	3	-1,07	None
putative glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	9	0	1,94	Up	6	0	1,55	Up	3	0	1,23	None	0	0	-1,02	None
putative calreticulin	9	0	1,92	Up	7	1	1,54	None	3	0	1,1	None	1	3	-1,13	None
Ferredoxin III, chloroplast precursor (Fd III)	9	0	1,92	Up	6	0	1,47	Up	6	0	1,57	Up	3	0	1,21	None
hypothetical protein	9	0	1,9	Up	5	0	1,37	None	5	1	1,45	None	0	0	1,04	None
serine carboxypeptidase II-like protein	9	0	1,88	Up	5	0	1,91	None	0	3	-1,42	None	0	4	-1,4	None
methylenetetrahydrofolate reductase	9	0	1,86	Up	5	2	1,2	None	3	0	1,28	None	1	4	-1,22	None
probable transport protein	9	0	1,85	Up	6	0	2,36	Up	0	0	1,03	None	4	3	1,31	None
Probable microsomal signal peptidase 22 kDa subunit	9	0	1,85	Up	6	0	1,52	None	4	0	1,23	None	3	2	1,01	None
Sec61p	9	0	1,84	Up	6	0	1,56	None	3	0	1,23	None	2	2	1,04	None
putative protein; protein	9	0	1,84	Up	6	0	1,32	None	3	0	1,13	None	0	1	-1,22	None
HSP like protein	9	0	1,84	Up	7	1	1,61	None	6	1	1,2	None	4	3	1,05	None
F11A.17.8	9	0	1,83	Up	4	1	1,22	None	6	1	1,44	None	0	1	-1,04	None
signal peptidase subunit	9	0	1,82	Up	8	1	1,67	None	3	0	1,15	None	3	2	1,05	None
putative calreticulin	9	0	1,82	Up	6	1	1,32	None	3	2	1,11	None	1	3	-1,25	None
hypothetical protein	9	0	1,82	Up	6	0	1,49	None	4	0	1,15	None	2	2	-1,06	None
AAK68910.1_5e-71 caffeic acid O-methyltransferase	9	0	1,82	Up	5	1	1,23	None	5	1	1,26	None	0	3	-1,17	None
putative calreticulin	9	0	1,81	Up	5	1	1,2	None	2	0	1,21	None	1	4	-1,24	None
Probable microsomal signal peptidase 25 kDa subunit	9	0	1,81	Up	6	0	1,49	None	3	0	1,16	None	2	3	-1,05	None
putative protein	9	0	1,8	Up	7	0	1,38	None	5	0	1,23	None	5	1	-1,06	None
putative mitogen-activated protein kinase kinase	9	0	1,8	Up	7	1	1,47	None	3	0	1,17	None	2	3	-1,04	None
oxalate oxidase	9	0	1,79	Up	7	1	2,26	None	1	6	-1,53	None	0	3	-1,22	None
ESTs D24970(R2869)	9	0	1,77	Up	3	1	1,11	None	4	0	1,44	None	0	3	-1,11	None
wall-associated kinase 4	9	0	1,76	Up	7	0	1,4	None	4	0	1,25	None	1	0	-1,01	None
Tubulin beta-3 chain (Beta-3 tubulin)	9	0	1,76	Up	4	1	1,42	None	5	2	1,2	None	1	1	-1,03	None
<none>	9	0	1,76	Up	5	1	1,43	None	2	2	-1,02	None	0	4	-1,25	None

Fortsetzung III Tab. 6-3:

Description	KBgh-K			PBgh-P			P-K			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign	CI	CD	FC	Sign	CI	CD	FC	Sign				
<none>	9	0	1,75	Up	5	1	1,28	None	3	0	1,59	None	3	1	1,16	None
Tubulin alpha-2 chain	9	0	1,74	Up	4	1	1,26	None	5	1	1,29	None	0	3	-1,07	None
putative 3-dehydroquininate dehydratase	9	0	1,73	Up	4	1	1,33	None	5	1	1,25	None	0	0	-1,04	None
Pathogen-related protein	9	0	1,71	Up	5	1	1,32	None	5	1	1,09	None	0	2	-1,18	None
<none>	9	0	1,71	Up	5	0	1,28	None	3	1	1,27	None	0	0	-1,05	None
Putative AMP-binding protein	9	0	1,7	Up	4	1	1,14	None	3	0	1,23	None	0	3	-1,21	None
<none>	9	0	1,7	Up	5	1	1,28	None	4	0	1,18	Up	2	3	-1,13	None
putative glycerophosphodiester phosphodiesterase	9	0	1,68	Up	6	0	1,48	Up	5	1	1,24	None	2	0	1,1	None
expressed protein	9	0	1,68	Up	4	1	1,35	None	3	0	1,12	None	1	3	-1,11	None
DnaJ protein homolog	9	0	1,68	Up	6	1	1,44	None	3	0	1,21	None	2	0	1,04	None
argininosuccinate lyase (AATgH)	9	0	1,66	Up	4	2	1,19	None	5	0	1,41	None	3	4	1,01	None
<none>	9	0	1,66	Up	5	1	1,33	None	2	0	1,09	None	2	4	-1,15	None
Tubulin alpha chain	9	0	1,64	Up	6	1	1,64	None	5	0	1,44	None	4	0	1,44	Up
adenosine kinase	9	0	1,64	Up	6	1	1,3	None	4	1	1,21	None	3	4	-1,04	None
<none>	9	0	1,64	Up	6	0	1,43	None	0	1	-1,03	None	1	4	-1,17	None
Tubulin beta-2 chain	9	0	1,63	Up	4	1	1,18	None	2	2	1,06	None	0	3	-1,3	None
L-aspartate oxidase-like protein	9	0	1,62	Up	3	0	1,19	None	3	0	1,36	None	0	0	-1	None
cytochrome b5 reductase	9	0	1,6	Up	5	1	1,31	None	4	0	1,24	None	3	2	1,01	None
Arabidopsis thaliana chromosome 3, At3g05800--hypothetical protein	9	0	1,6	Up	5	1	1,27	None	6	0	1,15	None	1	2	-1,09	None
Tubulin alpha-2 chain	9	0	1,59	Up	5	1	1,19	None	4	0	1,3	None	1	2	-1,03	None
Tubulin alpha chain	9	0	1,58	Up	6	0	1,69	None	5	0	1,41	None	5	0	1,51	Up
hypothetical protein	9	0	1,57	Up	5	0	1,29	None	5	0	1,23	None	0	0	1,01	None
<none>	9	0	1,57	Up	3	0	1,24	None	4	2	1,1	None	0	0	-1,15	None
Tubulin alpha-2 chain	9	0	1,55	Up	5	1	1,18	None	4	0	1,33	None	1	2	1,01	None
putative signal sequence receptor, alpha subunit	9	0	1,55	Up	4	1	1,22	None	5	0	1,18	None	0	3	-1,08	None
OSJNBa00940T5.3	9	0	1,53	Up	3	1	1,13	None	4	0	1,27	None	0	0	-1,07	None
secretory protein	9	0	1,52	Up	5	0	1,57	None	0	0	-1,21	None	2	5	-1,17	None
membrane associated protein	9	0	1,52	Up	5	0	1,26	None	3	0	1,2	None	1	0	-1	None
putative stripe rust resistance protein	9	0	1,5	Up	5	0	1,23	None	1	1	1,36	None	0	0	1,11	None
Proteasome subunit beta type 3	9	0	1,49	Up	5	0	1,12	None	3	0	1,25	None	0	1	-1,07	None
monosaccharide transporter 3	9	0	1,49	Up	3	0	1,38	Up	5	0	1,17	None	0	0	1,08	None
<none>	9	0	1,47	Up	2	3	1,02	None	4	3	1,05	None	0	3	-1,37	None
cytochrome b245 beta chain homolog rbohA	9	0	1,46	Up	5	0	1,34	None	3	0	1,22	None	4	0	1,12	None
root cap-specific protein	9	0	1,43	Up	5	1	1,11	None	6	0	1,35	None	0	0	1,06	None
putative phosphomannomutase	9	0	1,39	Up	6	0	1,33	None	3	0	1,15	None	4	1	1,1	None
tryptophan synthase beta chain	9	0	1,38	Up	5	1	1,36	None	3	0	1,05	None	3	2	1,03	None
carboxypeptidase D (EC 3.4.16.6) precursor	9	0	1,34	Up	4	1	1,18	None	2	2	-1,02	None	1	5	-1,16	None
Proteasome subunit alpha type 3	9	0	1,33	Up	4	0	1,18	None	1	0	1,04	None	0	0	-1,09	None
temperature stress-induced lipocalin	9	0	1,31	Up	4	0	1,19	None	2	0	1,12	None	2	2	1,03	None
beta 5 subunit of 20S proteasome	9	0	1,3	Up	4	0	1,23	None	5	0	1,07	None	1	1	1,01	None
<none>	9	0	1,3	Up	2	0	1,09	None	2	0	1,11	None	0	0	-1,08	None
protein transport protein subunit	9	0	1,29	Up	3	0	1,18	None	1	0	1,03	None	0	1	-1,06	None

Tab.6-4: Bgh-reprimierte Gene aus Hybridisierungen des 22K Barley1 GeneChip® Mikroarray Dargestellt sind die Gene welche in mindestens 9 Einzelvergleichen (ChangeCalls) im Vergleich KBgh-K reprimiert waren. Bei den letzten vier aufgeführten Genen in der Tabelle handelt es sich um die durch Bgh reprimierten Gene auf *P.indica*-besiedelten Pflanzen. Zusätzlich sind die Regulationen dieser Kandidatengene in den anderen Vergleichen dargestellt (Tab. 3-6, Abb. 2-4). CI und CD geben die Anzahl an Hybridisierungsergebnissen für Induktion bzw. Repression an (Change Calls). FC gibt das Maß der Regulationsstärke an (Fold Change) wobei Ergebnisse, die über 2, bzw. unter -2-fach liegen farblich hinterlegt sind. Unter Sign. werden die Ergebnisse der Signifikanztests über die Mittelwerte der drei biologischen Wiederholungen gezeigt. Die Genfunktionszuordnung (Description) richtet sich nach den Annotierungen laut Affymetrix (Santa Clara, USA) (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)

Description	KBgh-K			PBgh-P			P-K			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.				
OSJNB0072N21.4	0	9	-3.07	Down	0	6	-2.43	None	0	4	-1.43	None	0	3	-1.13	None
<none>	0	9	-2.98	Down	0	6	-2.63	Down	2	4	-1.2	None	3	3	-1.06	None
putative caltractin	0	9	-2.79	Down	1	5	-2.67	None	1	5	-1.48	None	3	0	1.13	None
germin-like protein 1	0	9	-2.67	Down	2	5	-2.16	None	1	7	-1.89	None	1	7	-1.53	None
<none>	0	9	-2.63	Down	0	8	-2.3	Down	1	2	-1.17	None	1	1	-1.03	None
<none>	0	9	-2.38	Down	1	5	-1.89	None	0	6	-1.73	None	0	4	-1.37	None
histone H1-like protein	0	9	-2.25	Down	2	5	-1.2	None	0	8	-2.09	Down	1	2	-1.12	None
<none>	0	9	-2.23	Down	3	6	-1.21	None	0	5	-1.53	None	3	2	1.2	None
putative zinc finger transcription factor	0	9	-2.21	Down	0	8	-2.2	Down	2	3	-1.18	None	0	2	-1.18	None
<none>	0	9	-2.15	Down	0	1	-1.22	None	0	4	-1.43	Down	3	0	1.23	None
OSJNBa0064H22.14	0	9	-2.15	Down	1	3	-1.11	None	0	4	-1.46	None	3	0	1.33	None
aquaporin 2	0	9	-2.14	Down	1	7	-1.79	None	0	6	-1.41	None	1	6	-1.18	None
AT5g47240/MQL5_10	0	9	-2.11	Down	3	5	-1.17	None	0	5	-1.4	None	3	1	1.28	None
<none>	0	9	-1.95	Down	2	3	-1.06	None	0	4	-1.52	None	2	0	1.21	None
unknown	0	9	-1.86	Down	3	5	-1.66	None	0	6	-1.52	None	3	5	-1.37	None
putative protein	0	9	-1.84	Down	0	6	-1.48	None	0	3	-1.2	None	1	1	1.04	None
bHLH protein; protein id: At5g57150.1	0	9	-1.82	Down	1	5	-1.35	None	0	6	-1.34	None	4	2	1.01	None
putative CTP synthase	0	9	-1.79	Down	1	5	-1.19	None	0	5	-1.42	None	0	3	1.06	None
<none>	0	9	-1.77	Down	1	5	-1.47	None	0	3	-1.2	None	2	0	1	None
putative Ca2+-H+-exchanging protein	0	9	-1.76	Down	2	4	-1.09	None	0	4	-1.24	None	4	0	1.3	None
metal-transporting P-type ATPase-like protein	0	9	-1.76	Down	2	4	-1.42	None	0	6	-1.45	None	0	2	-1.17	None
bHLH protein; protein id: At5g57150.1	0	9	-1.73	Down	1	4	-1.19	None	0	4	-1.28	None	4	2	1.14	None
putative PGPD14 protein (pollen germination related protein)	0	9	-1.73	Down	3	2	1.02	None	0	3	-1.31	None	5	0	1.36	None
putative PGPD14 protein (pollen germination related protein)	0	9	-1.7	Down	3	1	1.04	None	0	3	-1.39	None	4	0	1.28	Up
Hypothetical protein	0	9	-1.69	Down	1	5	-1.29	None	0	3	-1.12	None	3	2	1.17	None
KH domain protein; protein id: At2g25970.1	0	9	-1.69	Down	0	3	-1.02	None	0	3	-1.41	Down	1	0	1.18	None
putative protein; protein id: At5g48960.1	0	9	-1.68	Down	1	4	-1.19	None	0	3	-1.28	None	3	0	1.11	None
<none>	0	9	-1.63	Down	0	7	-1.74	None	0	4	-1.24	None	0	3	-1.32	None
P0009G03.18	0	9	-1.59	Down	1	4	-1.33	None	0	3	-1.26	Down	1	2	-1.06	None
<none>	0	9	-1.56	Down	3	2	1.05	None	0	3	-1.24	Down	7	0	1.18	None
<none>	0	9	-1.54	Down	2	2	1.05	None	1	4	-1.19	None	6	0	1.36	Up
<none>	0	9	-1.54	None	0	5	-1.47	Down	0	4	-1.13	None	1	0	-1.07	None
similar to salt-inducible protein	0	9	-1.53	Down	0	4	-1.3	None	0	3	-1.15	None	1	0	1.02	None
unknown protein	0	9	-1.51	Down	1	4	-1.25	None	0	3	-1.2	None	3	0	1	None
cinnamyl alcohol dehydrogenase	0	9	-1.47	Down	0	3	-1.19	None	0	6	-1.44	Down	0	5	-1.17	None
PsbQ domain protein family	0	9	-1.47	Down	0	5	-1.37	None	0	6	-1.36	None	0	3	-1.27	Down
galactokinase like protein	0	9	-1.46	Down	1	4	-1.21	None	0	3	-1.18	None	1	0	1.02	None
<none>	0	9	-1.44	Down	0	4	-1.48	Down	0	3	-1.09	None	0	0	-1.12	None
<none>	0	9	-1.43	Down	1	5	-1.54	None	1	3	-1.06	None	1	4	-1.14	None
Expressed protein; protein id: A13g26085.1	0	9	-1.41	Down	0	4	-1.19	None	0	3	-1.2	Down	0	1	-1.01	None
calcium-binding protein, putative; protein	0	9	-1.38	Down	1	0	-1.11	None	0	0	-1.03	None	3	0	1.2	None
<none>	0	9	-1.34	Down	0	5	-1.31	Down	0	2	-1.09	None	0	1	-1.07	None
thionin	4	4	-1.05	None	0	9	-10.6	Down	6	3	-1.58	None	1	7	-1.6	None
putative subtilase	0	7	-2.11	None	0	9	-2.43	Down	1	2	-1.03	None	2	3	-1.19	None
putative protein; protein id: At5g67390.1	0	7	-1.68	None	0	9	-2.13	Down	2	2	1.01	None	0	3	-1.26	None
subtilisin-like proteinase	0	7	-1.86	None	0	9	-1.82	Down	2	2	-1.06	None	5	2	-1.04	None

Tab.6-5: P. indica-induzierte Gene aus Hybridisierungen des 22K Barley1 GeneChip® Mikroarray Dargestellt sind die Gene welche in mehr als 6 ChangeCalls (CI) in dem Vergleich P-K induziert waren und eine größer 2-fache Regulation (Fold Change (FC)) zeigten. Zusätzlich sind die Regulationen dieser Kandidatengene in den anderen Vergleichen dargestellt (Tab. 3-6, Abb. 2-4). CI und CD geben die Anzahl an Hybridisierungsergebnissen für Induktion bzw. Repression in den Einzelvergleichen (Change Calls) an. FC gibt das Maß der Regulationsstärke (Fold Change) an, wobei Ergebnisse, die über 2, bzw. unter -2-fach liegen farblich hinterlegt sind. Unter Sign. werden die Ergebnisse der Signifikanztests über die Mittelwerte der drei biologischen Wiederholungen gezeigt. Die Genfunktionszuordnung (Description) richtet sich nach den Annotierungen laut Affymetrix (Santa Clara, USA) (<http://www.affymetrix.com/analysis/index.affx>)

Description	P-K			KBgh-K			PBgh-P			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.
<none>	7	1	3,91	None	9	0	9,16	Up	6	2	2,31	None	4	4	-1,02	None
multidrug resistance protein 1 homolog	6	1	3,67	None	2	2	-1	None	2	6	-3,38	None	4	1	1,09	None
4-coumarate-CoA ligase-like protein	6	1	3,42	None	5	1	1,57	None	2	6	-2,03	None	2	3	1,07	None
<none>	6	2	3,28	None	6	2	1,58	None	3	2	-1,03	None	7	2	2,03	None
peroxidase	6	0	2,94	Up	9	0	7,94	Up	5	1	2,82	None	4	4	1,05	None
metallothionein	7	0	2,73	None	4	2	1,44	None	2	5	-1,39	None	3	2	1,36	None
peroxidase	8	0	2,68	None	9	0	7,78	Up	6	1	2,77	None	4	4	-1,05	None
sucrose--fructan 6-fructosyltransferase large chain	6	3	2,6	None	7	2	2,93	None	4	3	1,07	None	4	3	-1,05	None
<none>	7	2	2,44	None	5	2	1,32	None	4	3	-1,07	None	7	2	1,73	None
putative phosphoglycerate dehydrogenase	8	1	2,43	None	9	0	3,14	Up	6	2	1,77	None	5	3	1,37	None
hypothetical protein pBH6-17	6	1	2,39	Up	9	0	4,02	Up	4	2	1,23	None	2	5	-1,37	None
dnaK-type molecular chaperone HSP70	6	0	2,36	None	9	0	4,37	Up	6	1	1,98	None	4	3	1,07	None
cysteine proteinase	6	1	2,21	None	4	2	1,22	None	3	3	1,09	None	6	2	1,97	None
canalicular multispecific organic anion transporter 2-like protein	7	1	2,11	None	4	0	1,3	None	2	5	-1,42	None	4	2	1,15	None
beta-1,3-glucanase precursor	7	0	2,1	None	7	0	2,81	None	6	0	1,91	None	5	0	1,43	None
<none>	6	0	2,02	None	9	0	4,46	Up	6	1	2,04	None	3	3	-1,09	None
putative RNA helicase	6	0	2,02	None	1	0	1,1	None	1	4	-1,7	None	1	0	1,07	None
ENDOPLASMIN HOMOLOG PRECURSOR (GRP94 HOMOLOG)	6	0	2,01	Up	9	0	2,1	Up	4	0	1,53	Up	4	0	1,47	None
GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein; protein id: Af5g55050.1	7	1	2	None	8	1	2,12	None	3	4	-1,24	None	2	4	-1,31	None

Tab.6-6: P. indica-reprimierte Gene aus Hybridisierungen des 22K Barley1 GeneChip® Mikroarray Dargestellt sind die Gene welche in mehr als 6 ChangeCalls (CD) in dem Vergleich P-K reprimiert waren und eine kleiner-2-fache Regulation (Fold Change (FC)) zeigten. Erläuterungen der Abkürzungen siehe Legende 6-5.

Description	P-K			KBgh-K			PBgh-P			PBgh-KBgh						
	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.	CI	CD	FC	Sign.
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	0	7	-2,54	None	0	7	-2,25	None	3	3	-2,13	None	0	7	-2,39	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	2	7	-2,38	None	1	6	-1,83	None	5	3	-1,72	None	2	7	-2,24	None
chlorophyll a/b-binding protein type lb, 21K chain precursor	1	7	-2,37	None	1	5	-1,89	None	4	3	-2,17	None	0	6	-2,73	None
hypothetical protein	2	6	-2,29	None	1	5	-2,1	None	0	6	-1,11	None	3	3	-1,21	None
putative alpha/beta hydrolase	1	6	-2,11	None	1	5	-1,41	None	3	3	-1,2	None	0	7	-1,79	Down
histone H1-like protein HON101	0	8	-2,09	Down	0	9	-2,25	Down	2	5	-1,2	None	1	2	-1,12	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	2	6	-2,05	None	0	7	-3,14	None	4	5	-3,64	None	2	7	-2,38	None
peroxidase	0	6	-2,01	Down	2	1	-1,06	None	1	3	1,08	None	0	7	-1,77	None

Tab.6-7: P. indica regulierte Gene unter Einfluss von Bgh aus Hybridisierungen des 22K Barley1 GeneChip® Mikroarray Dargestellt sind die Gene welche in mindestens 6 Einzelvergleichen (ChangeCalls) in dem Vergleich PBgh-KBgh induziert (CI), bzw. reprimiert (CD) waren und eine größer 2-, bzw. kleiner -2-fache-Regulation (Fold Change (FC) zeigten). Zusätzlich sind die Regulationen dieser Kandidatengene in den anderen Vergleichen dargestellt (Tab. 3-6, Abb. 2-4). Erläuterungen der Abkürzungen siehe auch Legende 6-3.

Description	PBgh-KBgh			KBgh-K			PBgh-K			P-K						
	CI3	CD3	FC3	CI	CD	FC	Sign.	CI1	CD1	FC1	Sign1	CI2	CD2	FC2	Sign2	
<none>	6	1	4,17	None	7	2	1,62	None	8	0	35,44	Up	0	3	-5,24	None
correspond to a region of the predicted gene-hypothetical protein	6	0	2,73	None	1	1	-1,2	None	6	0	3,12	Up	0	2	-1,37	None
<none>	7	1	2,69	None	0	7	-2,4	Down	4	3	1,18	None	3	5	-1,05	None
<none>	7	0	2,66	None	2	4	-1,45	None	4	1	1,58	None	3	3	1,16	None
Thiol protease SEN102 precursor	6	1	2,66	None	1	3	-1,42	None	6	1	2,6	None	3	3	-1,39	None
bHLH protein; protein	6	1	2,43	None	1	7	-2,23	None	5	3	1,52	None	2	5	-1,39	None
Putative AP2 domain transcriptional regulator	6	0	2,28	Up	0	4	-1,6	None	6	0	1,73	None	1	5	-1,21	None
<none>	6	0	2,28	Up	0	3	-1,23	None	4	2	1,63	None	3	3	1,14	None
putative protein; protein	7	0	2,24	None	0	5	-1,26	None	6	2	1,58	None	3	4	1,13	None
unknown protein	6	1	2,23	None	1	7	-2,19	None	5	2	1,33	None	2	5	-1,3	None
<none>	7	0	2,14	None	3	2	1,15	None	9	0	3,07	Up	0	4	-1,25	None
P0497A05.19	7	0	2,13	None	0	6	-1,58	None	6	1	1,38	None	2	4	-1,02	None
<none>	7	2	2,03	None	6	2	1,58	None	3	2	-1,03	None	6	2	3,28	None
thionin	1	7	-15,99	None	4	4	-1,05	None	0	9	-10,61	Down	6	3	-1,58	None
putative acid phosphatase	2	6	-4,92	None	5	3	1,63	None	4	3	-1,44	None	2	5	-2,09	None
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	1	6	-3,8	None	3	5	-1,19	None	3	5	-3,76	None	2	6	-1,2	None
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	0	7	-3,2	None	2	6	-1,46	None	4	5	-3,14	None	2	6	-1,49	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	0	7	-3,07	None	0	8	-2,01	None	2	5	-3,13	None	2	6	-1,96	None
ribulose-bisphosphate carboxylase	0	7	-2,98	None	3	5	-1,55	None	3	5	-2,81	None	2	6	-1,59	None
pvs protein 1 - kidney bean mitochondrion	0	6	-2,92	None	4	4	1,18	None	0	5	-1,95	None	2	3	-1,27	None
<none>	0	6	-2,91	Down	0	5	-1,82	None	0	3	-3,44	None	1	6	-1,54	None
Ribulose biphosphate carboxylase small chain PW9, chloroplast precursor	0	7	-2,77	Down	4	5	-1,26	None	4	5	-2,77	None	2	6	-1,26	None
chlorophyll a/b-binding protein type lb, 21K chain precursor	0	6	-2,73	None	1	5	-1,89	None	4	3	-2,17	None	1	7	-2,37	None
putative xylanase inhibitor; protein	0	8	-2,64	Down	4	1	1,23	None	2	4	-1,26	None	2	4	-1,71	None
putative ribosomal protein L28	0	6	-2,58	Down	0	4	-1,19	None	0	3	-1,69	None	0	5	-1,81	None
Avr9/CF9 rapidly elicited protein 65	0	7	-2,52	Down	4	4	-1,21	None	4	4	-1,62	None	2	7	-1,89	None
putative protein; protein	0	7	-2,46	Down	4	2	1,06	None	3	4	-1,53	None	2	6	-1,52	None
P0520B06.12	0	6	-2,46	None	0	4	-1,36	None	0	4	-2,48	None	1	5	-1,35	None
wheat aluminum induced protein wali 5	1	6	-2,43	None	7	0	2,82	None	5	2	1,96	None	4	3	-1,69	Down
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	0	7	-2,39	None	0	7	-2,25	None	3	3	-2,13	None	0	7	-2,54	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	2	7	-2,38	None	0	7	-3,14	None	4	5	-3,64	None	2	6	-2,05	None
putative glycine decarboxylase subunit	0	9	-2,37	Down	4	2	-1,01	None	4	5	-1,42	None	2	6	-1,69	None
herbicide safener binding protein 1	0	7	-2,37	Down	1	4	-1,28	None	1	6	-1,87	None	1	6	-1,63	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	0	7	-2,35	None	1	6	-2,06	None	2	3	-2,44	None	2	7	-1,98	None
putative pectinacetyltransferase	0	6	-2,33	Down	1	0	1,28	None	0	1	-1,22	None	0	2	-1,5	None
expressed protein; protein	0	8	-2,32	None	3	5	-1,41	None	4	3	-1,41	None	2	7	-1,75	None
RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN CLONE 512	0	6	-2,3	Down	2	2	-1,04	None	3	3	-1,66	None	1	5	-1,44	None
Ribosome recycling factor, chloroplast precursor (Ribosome releasing factor, chloroplast)	0	6	-2,29	Down	2	5	-1,11	None	1	3	-1,91	None	2	6	-1,34	None
putative ribosomal protein L28	0	6	-2,27	None	3	2	-1,16	None	0	3	-1,97	None	2	3	-1,33	None
<none>	1	8	-2,26	None	8	0	3,09	Up	4	3	1,23	None	4	3	1,11	None
<none>	0	7	-2,26	Down	3	4	-1,1	None	4	5	-1,54	None	2	7	-1,61	None
chlorophyll a/b-binding protein WCAB precursor	2	7	-2,24	None	1	6	-1,83	None	5	3	-1,72	None	2	7	-2,38	None
Ribulose biphosphate carboxylase small chain, chloroplast precursor	0	6	-2,23	None	3	4	-1,22	None	3	5	-1,6	None	2	6	-1,7	None
cold-regulated protein	2	7	-2,18	None	2	5	-1,37	None	2	4	-1,67	None	1	7	-1,79	None
ic62 protein	0	8	-2,16	Down	2	4	-1,34	None	4	3	-1,7	None	2	6	-1,71	None
ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit	0	8	-2,11	None	3	5	-1,3	None	4	4	-1,61	None	2	7	-1,7	None
expressed protein; protein	0	8	-2,1	Down	2	4	-1,29	None	4	3	-1,67	None	2	6	-1,62	None
plastid-specific ribosomal protein 6 precursor	0	8	-2,07	None	2	5	-1,22	None	1	3	-2,01	None	2	6	-1,28	None
Putative L-ascorbate peroxidase, chloroplast precursor (Thylakoid luminal 29 kDa protein)	0	8	-2,06	Down	2	5	-1,22	None	3	4	-1,37	None	2	6	-1,83	None
chlorophyll a/b binding protein precursor	0	7	-2,05	Down	1	5	-1,42	None	3	3	-1,54	None	1	7	-1,89	None

Danksagung

Herrn PD Dr. Philipp Franken möchte ich herzlich für die Überlassung des äußerst interessanten Themas danken, ebenso für seine konstruktive Betreuung, permanente Hilfsbereitschaft und Förderung während dessen Bearbeitung.

Gleicher Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Kogel, der mir die Möglichkeit gab, die ursprünglich am MPI in Marburg in Zusammenarbeit mit seiner Arbeitsgruppe in Gießen begonnenen Arbeiten direkt im IPAZ Gießen fortzusetzen. Dies machte es möglich, den Fortgang der Arbeiten im Gesamtprojekt verfolgen zu können und zahlreiche anregende Diskussionen im Rahmen der SAR-Forschergruppe auch für die eigenen Arbeiten zu nutzen.

Herrn Prof. Dr. R. Thauer möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am MPI in Marburg und für seine formale Betreuung, auch in der Zeit über die praktischen Arbeiten am Institut hinaus, danken, welche es mir ermöglichte, jederzeit hilfreiche Institutseinrichtungen, wie eine hervorragend ausgestattete Bibliothek und EDV-Systeme dort vor Ort zu nutzen.

Zudem möchte ich allen in anderen *P. indica*-Projekten engagierten Personen danken. Diesbezüglich möchte ich Herrn PD Dr. Helmut Baltruschat hervorheben, der die *P. indica*-Arbeiten über Induzierte Resistenz in Gerste begonnen hat und meine Arbeit nach ersten Einführungen mit Diskussionsbereitschaft weiter begleitete. Besonders sei auch Herrn Dr. Frank Waller gedankt, der die *P. indica* Arbeiten am IPAZ koordiniert und mit vielen fachlichen Gesprächen den Fortgang der Arbeit begleitete. Auch Sachin Deshmukh und Monika Sharma, mit denen ich unzählige aufschlussreiche Diskussionen führen und praktische Erfahrungen austauschen konnte, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Ralph Hückelhoven für die ständige Diskussionsbereitschaft, vor allem seine wohlthuende Unterstützung bei Fragen zur Cytologie und Pathologie des *Bgh*. Dr. Gregor Langen danke ich für dessen stete Kommunikationsbereitschaft und Unterstützung bei vielen technischen Fragenstellungen, insbesondere was die Lösung von EDV-Problemen jeglicher Art betrifft.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Franken und allen ehemaligen Mitarbeitern des Stockwerks A2 am Max-Planck-Institut in Marburg und den vielen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des IPAZ in Gießen möchte ich für ihre immerwährende Hilfsbereitschaft und das anregende und sehr angenehme Arbeitsklima danken. Ein angenehmes Arbeitsklima lässt Rückschläge leichter verdauen und Erfolge schöner feiern. Ein herzliches Dankeschön geht selbstverständlich an die vielen Laborkollegen und Technischen Assistenten, die uns allen bei der Projektarbeit den Arbeitsalltag vereinfachen. Gedankt sei an dieser Stelle vor allem Petra Mann und Maritha Lippmann in der Arbeitsgruppe am MPI in Marburg sowie Daggi Biedenkopf und Christina Neumann am IPAZ in Gießen für ihre praktische Unterstützung und ihr Organisationstalent bei der Abwicklung der labortechnischen Arbeiten.

Aber auch anderen Arbeitsgruppen soll an dieser Stelle herzlich gedankt werden. Eine angenehme Zusammenarbeit mit Dr. Jörg Kämper am MPI sei hier zu erwähnen, der die Auswertungen der Mikroarrays ermöglichte und in allen Fragen zu

Danksagung

Mikroarrays und deren Beurteilung hilfreich zur Seite stand. Auch PD Dr. H.-W. Koyro aus der Pflanzenökologie unter Prof. Jäger am IFZ in Gießen möchte ich für die unbürokratische Bereitstellung des Photosynthesemessgerätes herzlich danken, sowie Nicole Geißler und Sayed Hussin für deren technische Einweisungen in die Arbeitsweise des Gerätes und Tricks und Kniffe im *troubleshooting* bei dessen Betrieb.

Bezüglich der Messungen des Einflusses von *P. indica* auf den Ertrag möchte ich mich ganz besonders bei Tobias Heier und Sibylle von Rüden für die Zusammenarbeit bedanken. Die unterhaltsamen Ausflüge zu dem Versuchsgut Rauischholzhausen werde ich nie vergessen, genauso wenig wie die schweißtreibenden Arbeiten auf dem Versuchsfeld selbst an furchtbar heißen Tagen. Für die Betreuung der Pflanzen vor Ort bedanke ich mich bei Herrn Markus Kolmer und Mitarbeitern. Bei Herrn Prof. Dr. Dr. W. Friedt bedanke ich mich dafür, überhaupt die Möglichkeit zur Durchführung von Versuchen auf dem Versuchsgut geboten bekommen zu haben ... und damit zur Verwirklichung dieses Projektes.

Zu guter Letzt möchte ich natürlich noch allen Freunden über das Labor hinaus danken, meine Eltern und meinen Bruder Gregor mit eingeschlossen, welche den Alltag und so manche Freuden und Sorgen neben dem Labor während der Laufzeit der hier vorgelegten Untersuchungen mit mir teilten. Heißt es doch so schön: Geteiltes Leid ist halbes Leid und geteilte Freud´ ist doppelte Freud!

Finanziell unterstützt wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen der SAR-Forschergruppe (FOR 343) „Erhöhung des Resistenzpotentials der Gerste“

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Beate Achatz
Geburtsdatum 10.02.1977
Geburtsort Offenbach/M.

Schulbildung

1983 – 1987 Grundschule Limeshain
1987 – 1996 Wolfgang-Ernst-Gymnasium Büdingen
Juni 1996 Abschluß: Abitur

Studium

Okt. 1996 Aufnahme des Biologie-Studiums an der Philipps-Universität Marburg

Okt. 1998 Vordiplom

Hauptstudium mit den Schwerpunktfächern Mikrobiologie, Genetik, Biochemie / Immunologie und als Zusatzfach Parasitologie

März/April 2001 Diplomprüfungen in Mikrobiologie, Genetik und Biochemie

Mai 2001-Feb. 2002 Diplomarbeit in der AG Franken der Abteilung Biochemie am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg mit dem Thema: „Wachstumsförderung, Wechselwirkung mit Blattpathogenen und Regulation der Genexpression in *Medicago truncatula* durch arbuskuläre Mykorrhiza und *Piriformospora indica*“

März 2002 Erhalt des akademischen Grades des Dipl. Biol.

April 2002 Aufnahme der Arbeiten zur Promotion in der Abteilung Biochemie am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg. Die Arbeit wurde als Teil einer Forschergruppe in Kooperation mit dem Institut der Phytopathologie und angewandten Zoologie (IPAZ) begonnen und seit ca. Jan. 2004 dort vor Ort in Gießen fortgesetzt.