

**Analyse der Genregulation in  
*Medicago truncatula* und *Pisum sativum*  
während der Entwicklung  
arbuskulärer Mykorrhiza**

**Dissertation**

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

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität-Marburg  
vorgelegt von

**Ulf Grunwald**  
aus Husum

Marburg/Lahn April 2004

---

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden vom Oktober 2000 bis März 2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Biochemie, in Marburg/Lahn unter Anleitung von Herrn Dr. P. Franken durchgeführt.

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

Erstgutachter: Dr. P. Franken

Zweitgutachter: Prof. Dr. A. Batschauer

Tag der mündlichen Prüfung:

---

## Erklärung

Ich versichere, dass meine Dissertation

**„Analyse der Genregulation  
in *Medicago truncatula* und *Pisum sativum*  
während der Entwicklung arbuskulärer Mykorrhiza“**

selbständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet und sämtliche Stellen, die im Wortlaut oder dem Sinn nach anderen Werken entnommen sind, mit Quellenangaben kenntlich gemacht habe. Die Versicherung schließt Zeichnungen und Skizzen mit ein.

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

Marburg, 1. April 2004

---

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

**Grunwald U**, Nyamsuren O, Tamasloukht B, Lapopin L, Becker A, Mann P, Gianinazzi-Pearson V, Krajinski, Franken P (2004) Identification of mycorrhiza-regulated genes with arbuscule development-related expression profile. (eingereicht)

Krajinski F, Frenzel A, Manthey K, Perlick A, **Grunwald U**, Franken P, Bekel T, Bartels D, Meyer F, Pühler A, Küster H (2004) Identification of novel mycorrhiza-specific genes in *Medicago truncatula* using EST sequencing coupled to *in silico* and experimental expression profiling. (eingereicht)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	1
<b>Zusammenfassung</b> .....	3
<b>1 Einleitung</b> .....	5
1.1 Einteilung der Mykorrhiza .....	5
1.2 Der Nährstoffaustausch der arbuskulären Mykorrhiza .....	6
1.3 Die Rolle von Phytohormonen bei der Bildung der arbuskulären Mykorrhiza .....	11
1.4 Die Analyse von Mykorrhizamutanten .....	13
1.5 <i>Medicago truncatula</i> als Modellorganismus in der Mykorrhizaforschung .....	15
<b>2 Material und Methoden</b> .....	18
2.1 Organismen .....	18
2.2 Vektoren und Plasmide .....	18
2.3 Oligonukleotide .....	19
2.4 Puffer, Lösungen und Medien .....	20
2.5 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	22
2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	23
2.6.1 Standard-PCR .....	23
2.6.2 Expand High Fidelity PCR .....	23
2.6.3 Real-Time-PCR .....	23
2.7 Extraktion von Plasmid-DNA .....	25
2.8 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen .....	26
2.9 Agarose-Gelelektrophorese .....	26
2.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	26
2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten .....	26
2.12 Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen .....	27
2.13 Sequenzierungen von DNA-Fragmenten .....	27
2.14 Kultivierung von <i>Agrobacterium rhizogenes</i> .....	27
2.15 Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>A. rhizogenes</i> -Zellen .....	27
2.16 Wurzeltransformation von <i>Medicago truncatula</i> mit <i>A. rhizogenes</i> .....	28
2.17 Anzucht und Inokulierung von <i>M. truncatula</i> .....	29
2.17.1 Sterilisation und Keimung der Samen .....	29
2.17.2 Inokulierung der Keimlinge .....	29
2.17.3 Applikation von Indol-3-Buttersäure (IBA) .....	30
2.17.4 Applikation von Abscisinsäure (ABA) .....	30
2.17.5 Applikation von Phosphat .....	31

## Inhaltsverzeichnis

---

2.18	Ernte der Wurzeln und Auswertung der Infektion.....	31
2.18.1	Ernte der Wurzeln.....	31
2.18.2	Färbung der Pilzhyphen.....	31
2.18.3	Abschätzung der Mykorrhizierung.....	32
2.19	Qualitativer $\beta$ -Glukuronidase-Test.....	33
2.20	Messung von Abscisinsäure.....	34
2.21	Extraktion von RNA aus Pflanzenwurzeln.....	35
2.22	Northern Hybridisierung.....	35
2.23	cDNA-Synthese.....	35
2.23.1	SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit.....	36
2.23.2	Reverse Transkription mit SuperScript™ II RT.....	36
2.24	Herstellung und Bearbeitung von <i>P. sativum</i> Makroarrays.....	36
2.24.1	Herstellung der Makroarrays.....	36
2.24.2	Synthese radioaktiver Sonden.....	36
2.24.3	Hybridisierung.....	37
2.24.4	Datenanalyse.....	37
2.25	Herstellung und Bearbeitung von <i>M. truncatula</i> cDNA-Arrays.....	37
2.25.1	Herstellung der cDNA-Arrays.....	37
2.25.2	Synthese der cDNA-Sonden.....	39
2.25.3	Hybridisierung.....	41
2.25.4	Datenanalyse.....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>44</b>
3.1	Transkriptom-Analysen in <i>Medicago truncatula</i> .....	44
3.2	Phytohormone in Wurzeln von <i>M. truncatula</i> .....	54
3.3	RNA-Akkumulierung im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung.....	55
3.4	Untersuchungen zur H <sup>+</sup> -ATPase <i>Mtha1</i> .....	64
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>67</b>
4.1	Mykorrhiza-regulierte Gene in <i>Medicago truncatula</i> .....	67
4.2	Arbuskel-assoziierte Genexpression in <i>Pisum sativum</i> .....	77
4.3	Induktion von <i>Mtha1</i> in symbiontischen Geweben.....	83
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
sscDNA	Einzelstrang-cDNA
dscDNA	Doppelstrang-cDNA
cv	Kultivar
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („Desoxyribonucleic Acid“)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
PCR	Polymerasekettenreaktion („Polymerase Chain Reaction“)
RNA	Ribonukleinsäure („Ribonucleic Acid“)
rpm	Umdrehungen pro Minute („Rounds per Minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat („Sodiumdodecylsulfat“)
SSC	NaCl/Natriumcitrat („Salin Sodium-Citrate“)
SSH	Suppressive subtraktive Hybridisierung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-inolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid

---

## Zusammenfassung

Ein zentrales Merkmal der arbuskulären Mykorrhiza (AM), einer symbiontischen Interaktion zwischen Pflanzenwurzeln und Bodenpilzen des Phylums Glomeromycota, ist die durch den Pilz verbesserte Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen, vor allem mit Phosphat. Die Promoteraktivität des H<sup>+</sup>-ATPase Gens *Mtha1* aus *Medicago truncatula* wurde sowohl in arbuskelhaltigen Zellen der Wurzelrinde als auch in der Fixierungszone und dem Meristem von Wurzelknöllchen lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass der durch die ATPase gebildete Protonengradient, nicht nur in Mykorrhizen, sondern auch in Knöllchen am Nährstofftransfer beteiligt sein könnte.

Zur erfolgreichen Etablierung der AM benötigen beide Symbionten einen ständigen Signalaustausch. Wachstums- und Entwicklungsprozesse steuernde Phytohormone, wie Abscisinsäure (ABA) und Indol-3-Buttersäure (IBA), könnten aufgrund eines Konzentrationsanstiegs in mykorrhizierten Wurzeln an der AM-Bildung beteiligt sein. Eine Veränderung der pflanzlichen Genexpression erfolgt demnach nicht nur direkt durch AM Pilze, sondern auch über sekundäre Effekte, wie variierende Phytohormon- und veränderte Phosphatkonzentrationen. Durch die Untersuchung von Transkriptionsprofilen wurden in Wurzeln von *M. truncatula* 568 Gene identifiziert, die durch die AM Pilze *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* oder *Gigaspora rosea*, aber nicht durch appliziertes ABA, IBA oder Phosphat reguliert werden. Geringe Gemeinsamkeiten der pflanzlichen Transkriptionsprofile unterstrichen dabei die physiologischen und morphologischen Unterschiede zwischen den Mykorrhizen, die durch verschiedene AM Pilze gebildet werden. Die Verwendung der suppressiven subtraktiven Hybridisierung in Kombination mit Makroarray-Analysen resultierte in der Identifizierung von 17 AM-regulierten Genen aus *Pisum sativum*, die alle bis auf eine Ausnahme eine Arbuskel-assoziierte Expression zeigten, aber nicht durch Interaktionen mit dem Symbionten *Rhizobium leguminosarum* oder dem Wurzelpathogen *Aphanomyces euteiches* induziert wurden. Bestätigung differentieller Genexpression erfolgte für neun Gene im Northern Blot oder über semiquantitative RT-PCR. Homologiesuche der Gensequenzen aus der Erbse in *M. truncatula* EST-Datenbanken resultierte in der Identifizierung einer Familie von Trypsin-Inhibitoren, von denen fünf Mitglieder, durch Real-Time-PCR bestätigt, eine AM-spezifische Induktion zeigten. Demnach kann das Modell *M. truncatula* zur molekularen Analyse von wirtschaftlich bedeutenden Leguminosen wie die Erbse herangezogen werden.

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Einteilung der Mykorrhiza

Pflanzenwurzeln sind in der Natur mit Bodenmikroorganismen vergesellschaftet. Ist eine solche Wechselwirkung mit einem Nutzen für beide Partner verbunden, spricht man von einer mutualistischen Symbiose. Mikroorganismen können pilzlichen oder bakteriellen Ursprungs sein, verbessern die Vitalität der Pflanzen und helfen ihnen extreme Lebensräume zu besiedeln. Zu der Gruppe der bakteriellen Symbionten zählen zum Beispiel die Knöllchenbakterien sowie Vertreter der Aktinomyzeten (*Frankia* sp.), die aufgrund ihrer Fähigkeit Luftstickstoff zu fixieren, Pflanzen nach der Kolonisierung mit diesem Nährstoff versorgen (Pawlowski & Bisseling, 1996). Eine Assoziation mit Bodenpilzen hingegen wirkt vor allem über die Vergrößerung der Absorptionsoberfläche der Pflanzenwurzeln und verbessert auf diese Weise die Aufnahme vieler verschiedener Mineralstoffe. Diese als Mykorrhiza bezeichnete Symbiose ist in der Umwelt sehr weit verbreitet und wegen ihrer ökologischen Bedeutung und ihrem Anwendungspotential in der Pflanzenproduktion ein interessantes Untersuchungsobjekt.

Der Begriff Mykorrhiza, der sich aus den griechischen Worten „mykes“ für Pilz und „rhiza“ für Wurzel zusammensetzt, wurde von A.B. Frank im Jahre 1885 eingeführt und geprägt (Frank, 1885). Aufgrund struktureller Unterschiede der Kontaktstellen zwischen Pflanze und Pilz erfolgt die Einteilung in verschiedene Mykorrhizatypen (Molina et al., 1992).

Die Ektomykorrhiza (ektotrophe Mykorrhiza) entsteht zwischen holzigen Angiospermen und Gymnospermen in Wechselwirkung mit Holobasidiomyceten, unitunikaten Askomyceten und selten mit Zygomyceten (Smith & Read, 1997). Die Pilzhyphen der Ektomykorrhiza umgeben die Pflanzenzellen der Wurzelrinde als Hartig Netz, ohne in die Zellen einzudringen. Bei der Endomykorrhiza (endotrophe Mykorrhiza) hingegen verbleiben die Pilzhyphen nicht im interzellulären Raum, sondern dringen auch in den Apoplasten der Zellen ein, wo es dann zur Bildung verschiedener Strukturen kommt. Die Art des Phytobionten, der pflanzliche Partner der Symbiose, ist für eine weitere Einteilung der Endomykorrhiza in orchidoide, ericoide, arbutoide, monotropeide und arbuskuläre Mykorrhiza verantwortlich.

Der häufigste Mykorrhizotyp in dieser Aufzählung ist die arbuskuläre Mykorrhiza, die nahezu in allen terrestrischen Ökosystemen vorkommt. Beschrieben wurden Funde aus Wüstenregionen (Corkidi & Rincón, 1997; Dalpé et al., 2000; Titus et al., 2002), tropischen Regenwäldern (Brundrett et al., 1999; Gaur & Adholeya, 2002; Guadarrama & Alvarez-Sanchez, 1999; Siqueira & Saggin-Junior, 2001; Zhao et al., 2001), aquatischen Habitaten (Khan, 1993) sowie aus extremen Lebensräumen mit zum Beispiel starkem Salz- oder Gipsgehalt (Carvalho et al., 2001; Landwehr et al., 2002; Sengupta & Chaudhuri, 2002). Etwa 80 bis 90% aller Landpflanzen können diese spezielle Art der Mykorrhiza ausbilden, doch Familienmitglieder der Brassicaceen, Caryophyllaceen, Chenopodiaceen, Cyperaceen, Juncaceen und Urticaceen sind dazu nicht befähigt (Fitter & Moyersoen, 1996; Harley & Harley, 1987).

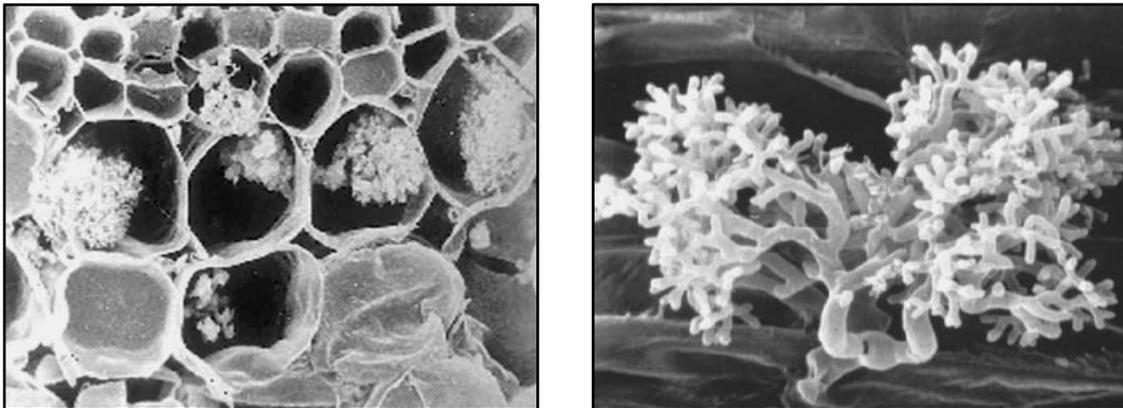
Bei der arbuskulären Mykorrhiza (AM) handelt es sich um eine sehr alte Lebensform. Fossile Funde datieren den Ursprung auf ca. 450-500 Millionen (Ordovizium) Jahre zurück, noch bevor sich die ersten Samenpflanzen entwickelten (Redecker et al., 2000; Remy et al., 1994). Zur gleichen Zeit eroberten die ersten Urformen der Bryophyten terrestrische Habitate. Da noch heutige Vertreter der Pteridophyten und Bryophyten Mykorrhizen ausbilden können, drängt sich der Verdacht auf, dass AM Pilze die Besiedlung des Landes entscheidend unterstützten (Read et al., 2000; Schüßler, 2000).

Seit kurzem werden AM Pilze basierend auf rRNA Sequenzanalysen in einen eigenen monophyletischen Stamm zusammengefasst. Die taxonomische Einordnung der AM Pilze erfolgt daher nicht mehr innerhalb der Zygomycota, sondern im eigenen Phylum der Glomeromycota (Schüßler, 2002; Schüßler et al., 2001). Innerhalb dieses Phylums werden die etwa 150 Arten in die Familie der Acaulosporaceen, Gigasporaceen, Glomeraceen, Paraglomeraceen, Geosiphonaceen, Diversisporaceen oder Archaeosporaceen gegliedert (Schüßler, 2002).

### **1.2 Der Nährstoffaustausch der arbuskulären Mykorrhiza**

Die Entwicklung der AM Symbiose erfordert weitgehende Umstrukturierungen in beiden Partnern, welche durch einen gegenseitigen Signalaustausch eingeleitet werden. So nehmen in der prä-symbiontischen Phase der Mykorrhiza pflanzliche Faktoren, aus den Wurzelexsudaten Einfluss auf die Hyphenentwicklung des Pilzes (Buee et al., 2000). Aber auch pilzliche Faktoren verändern die Genexpression in der Pflanze

(Kosuta et al., 2003). Nach physikalischem Kontakt der Hyphe mit der Epidermis der Wirtswurzeln kommt es zur Ausbildung von Appressorien. Die alleinige Anwesenheit der Wurzeloberfläche ist ausreichend, um diesen Prozess auszulösen (Nagahashi & Douds, 1997). Ausgehend von den Appressorien dringen Penetrationshyphen in die Wurzelrinde ein, beginnen die interzelluläre Besiedlung der Wurzel und enden schließlich mit dem Eindringen in die Kortexzellen. Wie in Abbildung 1-1 gezeigt, kommt es dann in den Zellen zur Ausbildung bäumchenartiger Hyphenstrukturen, den so genannten Arbuskeln (Gianinazzi-Pearson & Gianinazzi, 1988). Diese pilzlichen Strukturen dringen dabei nicht in das Cytoplasma, sondern bleiben stets vom Plasmalemma der Kortexzelle umgeben, die sich zur periarbuskulären Membran formiert. Während die Pflanze an den Arbuskeln Phosphat und andere Nährstoffe vom AM Pilz erhält, stellt sie im Gegenzug Photoassimilate in Form von Kohlenhydraten zur Verfügung (Smith & Smith, 1990).



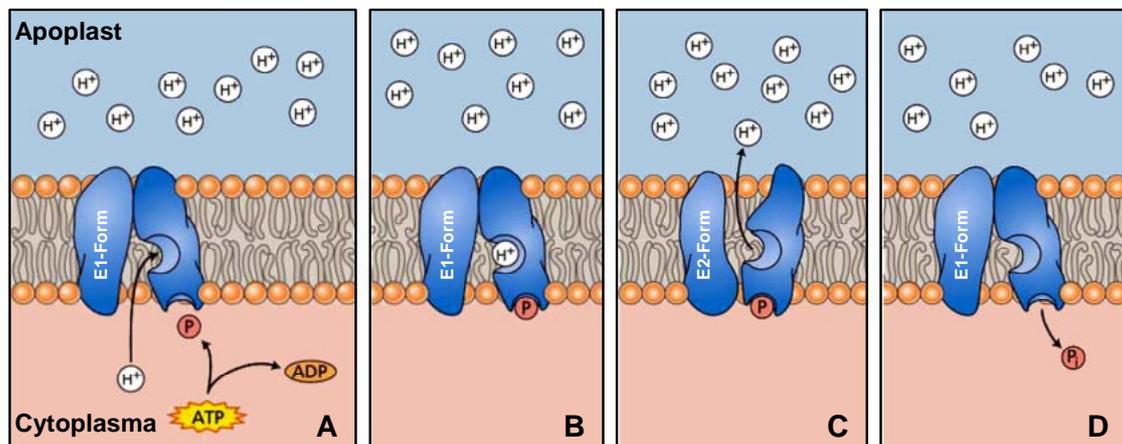
**Abbildung 1-1 Arbuskelstrukturen in Zellen des pflanzlichen Wurzelkortex** (Bildquelle: re. M. Hilber-Bodmer und R. Honegger; li. unbekannt)

Trotz des hohen Phosphatgehalts im Boden, ist aufgrund physikalischer und chemischer Faktoren die Aufnahme über die Wurzelhaare der Pflanze limitiert. 80% des Phosphats werden in organische Moleküle (hauptsächlich Phytinsäure) umgewandelt, präzipitieren als unlösliche Salze oder adsorbieren an Bodenpartikel (Holford, 1997; Richardson, 1994). Eine starke Phosphataufnahme durch die Pflanzen und ein langsames Diffusionsverhalten des löslichen Phosphats im Boden führt zu einer Auslaugung der Rhizosphäre. Als Reaktion auf anhaltenden Phosphatmangel entwickelten die Pflanzen unterschiedliche Mechanismen, um die Mobilisierung und Aufnahme von Phosphat zu steigern. Die Sekretion von Phosphatasen, organischen Säuren

und Protonen (Duff et al., 1991; Dunlop & Gardiner, 1983; Lefebvre et al., 1990; Lipton et al., 1987), Modifizierung der Wurzelmorphologie (Lynch, 1995; Mengel & Kirkby, 1982) sowie die Ausbildung einer Mykorrhiza haben Einfluss auf die Adsorptionsrate von Phosphat. Die Kolonisierung von Wurzeln durch AM Pilze ist mit der Entwicklung feiner extraradikulärer Hyphen verbunden, die der Pflanze eine erhöhte Aufnahme langsam diffundierender Nährstoffe aus dem Boden ermöglichen. Im Labor von Maria Harrison gelang die Klonierung von zwei  $H^+/P_i$ -Symportern aus den AM Pilzen *Glomus versiforme* und *Glomus intraradices*, die vermutlich an der Phosphataufnahme aus dem Boden beteiligt sind (Maldonado-Mendoza et al., 2001; Versaw et al., 2002). Phosphate werden in den Vakuolen der extraradikulären Hyphen als Poly- oder Orthophosphat gespeichert. Anschließend erfolgt der Transport, der innerhalb des Coenocytiums nicht von Septen behindert wird, durch cytoplasmatische Strömungen und bewegliche, röhrenförmige Vakuolen zu den Arbuskeln. Dort wird das anorganische Phosphat wahrscheinlich über ein spezielles Efflux-System in die periarbuskuläre Matrix entlassen (Ashford & Allaway, 2002; Ezawa et al., 2002; Smith et al., 2000; Smith, 2001; Uetake et al., 2002). Die Aufnahme dieser Phosphate in die pflanzlichen Zellen der Wurzelrinde erfordert die Aktivität von spezifischen Transportern. In den vergangenen Jahren konnten einige solcher Phosphattransporter aus Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* (AtPT1 und AtPT2) (Muchhal et al., 1996; Smith et al., 1997), *Oryza sativa* (OsPT11) (Paszkowski et al., 2002), *Lycopersicon esculentum* (LePT1 und LePT2) (Daram et al., 1998; Liu et al., 1998), *Solanum tuberosum* (StPT1, StPT2 und StPT3) (Leggiewie et al., 1997; Rausch et al., 2001) und *Medicago truncatula* (MtPT1, MtPT2 und MtPT4) (Chiou et al., 2001; Harrison et al., 2002; Liu et al., 1998) identifiziert werden. Während Gene, wie *MtPT1*, *MtPT2*, *StPT1* und *StPT2*, durch die Entwicklung der Mykorrhizasymbiose stark reprimiert werden, was eine Beteiligung an der Phosphataufnahme aus dem periarbuskulären Raum ausschließt, konnte für *LePT1*, *StPT3*, *OsPT11* und *MtPT4* eine erhöhte Expression in arbuskelhaltigen Zellen nachgewiesen werden.

Unter natürlichen Bedingungen ist Phosphat in den Zellen der Wurzelrinde gegenüber ihrer Umgebung stärker konzentriert. Die Aufnahme über einen  $H^+/P_i$ -Symporter erfolgt sowohl in den extraradikulären Hyphen als auch in den arbuskelhaltigen Zellen gegen einen Konzentrationsgradienten und ist somit energieverbrauchend. Ein Mechanismus für den aktiven Transport über Zellmembranen ist die Generation eines elektrochemischen Gradienten, der durch Protonen-pumpende ATPasen gene-

riert werden kann (Briskin, 1990; Logan et al., 1997; Morsomme & Boutry, 2000). Der postulierte katalytische Zyklus (Abbildung 1-2) der Zellmembran-gebundenen  $H^+$ -ATPase basiert auf dem Modell für die  $Na^+/K^+$ -ATPase und der  $Ca^{2+}$ -ATPase der Mammalia.

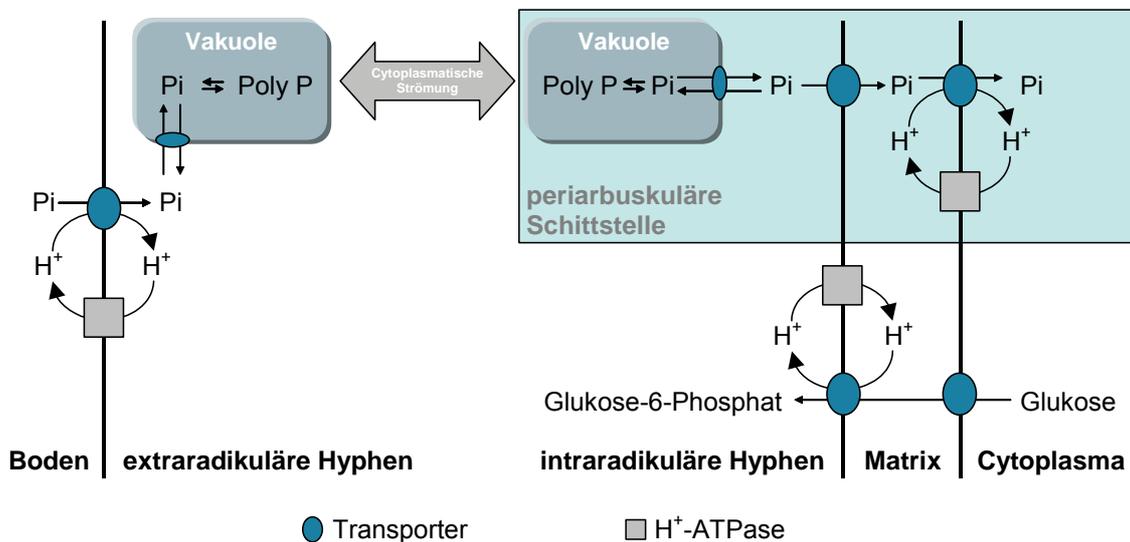


**Abbildung 1-2 Reaktionszyklus einer Plasmamembran-gebundenen  $H^+$ -ATPase.** Zunächst binden Proton und ATP an das Enzym. Die Entstehung eines hochenergetischen Intermediats basiert auf der Hydrolyse von ATP (A und B). Während das Phosphat an die  $H^+$ -ATPase gebunden bleibt, wird ADP freigesetzt. Nach einer Konformationsänderung (E2-Form) wird das Proton in den Apoplasten (C) und das organische Phosphat in das Cytoplasma (D) abgegeben. Der Transporter kehrt dadurch in die E1-Form zurück.

Zwei  $H^+$ -ATPasen (*GmHA5* und *GmPMA1*) aus *G. mosseae* zeigten eine erhöhte Transkriptakkumulation während der Entwicklung intraradikulärer Hyphen. Aber auch in der asymbiontischen Entwicklung wird *GmPMA1* stark exprimiert. Die Genexpression von *GmHA5* hingegen kann in dieser Wachstumsphase durch Phosphat induziert und durch Saccharose reprimiert werden (Requena et al., 2003). Auf der pflanzlichen Seite konnte mit cytochemischen Methoden in der periarbuskulären Membran von mykorrhizierten Tabakpflanzen eine hohe  $H^+$ -ATPase Aktivität nachgewiesen werden, die möglicherweise an der Phosphataufnahme aus der Matrix beteiligt ist (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Expressionsanalysen in Gerste erbrachten erste Hinweise auf einen Transkriptanstieg eines  $H^+$ -ATPase kodierenden Gens in mykorrhizierten Wurzeln (Murphy et al., 1997). Ähnliches konnte auch für die  $H^+$ -ATPase *Mtha1* aus *M. truncatula* beobachtet werden. Während in mykorrhizierten Wurzeln RNA-Akkumulation zu verzeichnen ist, konnte in Kontrollpflanzen keine Expression detektiert werden. *In situ* Hybridisierungen an Transkripte von *Mtha1* zeigten Genexpression nur in arbuskelhaltigen Zellen (Krajinski et al., 2002). In der elektronischen cDNA-Datenbank MtGI (*Medicago truncatula* Gene Index) wurden

*Mtha1* Sequenzen hauptsächlich in Mykorrhiza cDNA-Banken gefunden. Lediglich zwei ESTs wurden auch in cDNA-Banken aus Knöllchensymbiosen detektiert. Durch Fusion des *Mtha1*-Promotors an ein Reporterogen sollte die Aktivität dieser H<sup>+</sup>-ATPase in mykorrhizierten als auch in noduliertem Gewebe lokalisiert werden (Kapitel 3.4).

Mit Hilfe von <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> Markierungsexperimenten wurde gezeigt, dass der AM Pilz von der Pflanze Kohlenhydrate erhält (Bevege et al., 1975). Vermutlich gelangen die Kohlenhydrate in Form von Glukose über ein passives Transportsystem in den interzellulären Raum, wo eine aktive Aufnahme durch den Mykosymbionten erfolgt (Smith & Smith, 1990). Diese Hypothese wird gestützt durch die Beobachtung einer ATPase-Aktivität in der Membran interzellulärer Hyphen, die in der pilzlichen Membran der Arbuskeln nicht nachgewiesen wurde (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Untersuchung des Kohlenhydrattransfers in der Mykorrhiza führte zur Identifizierung eines Hexosetransporters in *M. truncatula* und *Medicago sativa*, der nach Kolonisierung mit *G. versiforme* eine zwei- bis vierfache Expressionssteigerung aufweist (Harrison, 1996). Die Aktivität des Transporters erhöhte sich nur durch einer erfolgreichen Besiedlung mit einem AM Pilz, wie Untersuchungen an einer *M. sativum* Mutante zeigten, die nicht mehr von *G. versiforme* erfolgreich kolonisiert wurde.



**Abbildung 1-3 Mögliches Modell für den Nährstoffaustausch zwischen Pflanze und AM Pilz.** (Modifiziert nach M. Saito)

### 1.3 Die Rolle von Phytohormonen bei der Bildung der arbuskulären Mykorrhiza

Die Etablierung und Funktion einer Mykorrhiza ist ein komplexer Prozess, in dem ein molekularer Dialog zwischen den beiden Symbiosepartnern unumgänglich ist. Die morphologischen und physiologischen Veränderungen in der Pflanze könnten unter anderem durch pflanzliche und pilzliche Phytohormone gesteuert werden (Gogala, 1991) (Tabelle 1-1). Mit *Glomus* sp. kolonisierte Maispflanzen (*Zea mays*) zeigen eine erhöhte Konzentration an Abscisinsäure (ABA) in Spross und Wurzeln. Dieser Anstieg ist möglicherweise auf die verbesserte Phosphatversorgung der Pflanze zurückzuführen (Bothe et al., 1994; Danneberg et al., 1993). Im Gegensatz dazu ist der ABA-Spiegel in Blättern von mykorrhiziertem Moskitogras (*Bouteloua gracilis*) gesenkt (Allen et al., 1980). Dieses Phytohormon wird nicht nur in Pflanzen, sondern auch in AM Pilzen synthetisiert, wo eine Kontrolle des Transports von Wasser und Nährsalzen über pilzliche Plasmamembranen zur Diskussion steht (Esch et al., 1994).

Danneberg et al. untersuchte den Auxingehalt in mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays*, konnte aber gegenüber Kontrollpflanzen keinen signifikanten Unterschied erkennen. Mit sensitiveren Methoden gelang jedoch einige Jahre später der Nachweis eines Konzentrationsanstiegs des Auxinderivats Indol-3-Buttersäure (IBA) in *G. intraradices* kolonisierten Maiswurzeln, wobei der endogene IBA-Gehalt nicht durch den Grad der Mykorrhizierung festgelegt war (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000; Ludwig-Müller et al., 1997). Der Gehalt an Indol-3-Essigsäure (IAA), ein weiteres Derivat des Auxins, blieb hingegen konstant. Einen positiven Effekt auf Kolonisierung und Entwicklung der Mykorrhiza zeigten exogen appliziertes Auxin und Jasmonat (Gunze & Hennessy, 1980; Regvar et al., 1996). Jasmonat und Derivate sind hormonelle Regulatoren, die sowohl in die pflanzliche Entwicklung, als auch in die biotische und abiotische Stressantwort eingreifen. Durch verwundetes Pflanzengewebe steigt die Jasmonat-Konzentration und induziert dadurch als Teil eines komplexen Signaltransduktionweges die Expression pflanzlicher Abwehrgene, wie Proteinase-Inhibitoren, Enzyme der Phytoalexin-Synthese, vegetative Speicherproteine, Thionine und Defensine (Creelman & Mullet, 1997; Farmer et al., 1998; Ryan, 2000). Aber auch mit *G. intraradices* mykorrhizierte Gerstenwurzeln zeigen eine erhöhte Jasmonat-Biosynthese, die möglicherweise mit einem verstärkten Transport von Photoas-

## Einleitung

---

similaten in mykorrhizierte Wurzeln korreliert (Hause et al., 2002). Die Beteiligung von Jasmonat an der Pathogenabwehr könnte der molekulare Hintergrund für die beobachtete Bioprotektion mykorrhizierter Pflanzen sein (Wasternack & Hause, 2002).

**Tabelle 1-1 Eigenschaften von Phytohormonen**

<b>Pflanzliche Bildungsorte</b>	<b>Wirkungen</b>	<b>Mykorrhiza</b>
	<b><u>Abscisinsäure</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Blätter</li><li>• Reife Samen</li><li>• Wurzelspitzen</li><li>• Wachsende Gewebe mit intensiver Proteinbiosynthese</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Förderung von Fruchtfall</li><li>• Auslösung und Erhaltung von Ruhezuständen</li><li>• Steuert Anpassung an Wassermangel (Stomataverschluss), Pathogenbefall, UV-Strahlung, Kälte- und Salzstress</li><li>• Förderung der Blütenbildung bei Kurztagspflanzen und Hemmung bei Langtagspflanzen</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Erhöhung der ABA-Konzentration in Spross und Wurzel von Mais</li><li>• ABA-Synthese in AM Pilzen (<i>Glomus</i> sp.)</li></ul>
	<b><u>Auxine</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Meristem</li><li>• Embryonen</li><li>• Laubblätter</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Förderung von<ul style="list-style-type: none"><li>• Streckungswachstum</li><li>• Kambiumteilungsaktivität</li><li>• Seitenwurzelbildung und Stecklingsbewurzelung</li></ul></li><li>• Apikaldominanz</li><li>• Stimulierung der Ethylenproduktion</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Erhöhung der IBA-Konzentration in Maiswurzeln</li><li>• Keine IBA in <i>G. intraradices</i> Sporen</li></ul>
	<b><u>Jasmonat</u></b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>• Ubiquitär in der Pflanze</li><li>• Hohe Konzentrationen:<ul style="list-style-type: none"><li>• Sprossapex</li><li>• Wurzelspitze</li><li>• Unreife Früchte</li><li>• Junge Blätter</li></ul></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Hemmung des Wurzelwachstums</li><li>• Beschleunigte Seneszenz</li><li>• Blütenentwicklung</li><li>• Induktion der Pflanzenabwehr</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Erhöhung der Jasmonat-Konzentration in mykorrhizierten Gerstenwurzeln</li><li>• Exogene Applikation von Jasmonat<ul style="list-style-type: none"><li>• Stimulierung der Mykorrhizaentwicklung</li><li>• Akkumulierung von Sekundärstoffen in Gerstenwurzeln</li></ul></li></ul>

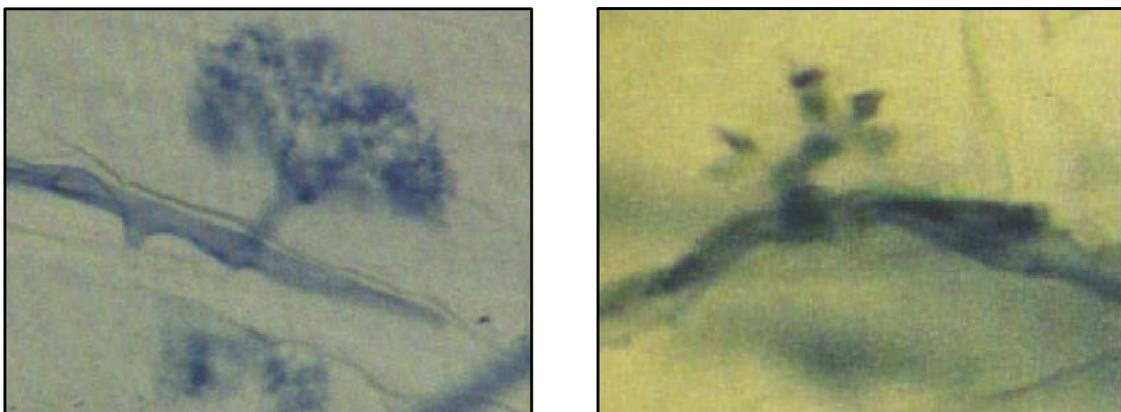
Die Untersuchungen anderer Phytohormone, wie Cytokinine, Gibberellinsäuren und Ethylen, hinsichtlich ihrer Konzentrationsänderung in mykorrhizierten Pflanzen bzw. deren Effekt auf die Mykorrhiza, zeigten ebenfalls eine mögliche Beteiligung an dieser Interaktion (Barker & Tagu, 2000; Geil & Guinel, 2002; Shaul-Keinan et al., 2002).

## 1.4 Die Analyse von Mykorrhizamutanten

Im Jahre 1988 bemerkten Gianinazzi-Pearson und Smith, dass molekulare Analysen die wissenschaftlichen Erkenntnisse über die arbuskuläre Mykorrhiza stark erweitern könnten. Durch zielgerichtete und nicht-zielgerichtete Ansätze gelang bis heute die Identifizierung einer Reihe pflanzlicher und pilzlicher Gene (Franken & Requena, 2001; Harrison, 1999), die eine erhöhte Expression zeigen und daher möglicherweise an den komplexen Vorgängen in der Mykorrhiza beteiligt sind. Um Informationen über die Funktion dieser Genprodukte zu erhalten ist, neben der Lokalisierung, Interaktionen und Regulation, der Zeitpunkt der Aktivität hilfreich. Das synchrone Vorkommen aller Entwicklungsstadien der Mykorrhiza jedoch erschwert die Zuordnungen von genetischen und physiologischen Prozessen zu den unterschiedlichen Phasen der Symbiose. Pflanzliche Mutanten mit abnormen AM Phänotypen ermöglichten die Identifizierung von Genen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Mykorrhizaentwicklung aktiv sind (Albrecht et al., 1998; Roussel et al., 2001). Durch chemische Mutagenese wurden 1989 *Pisum sativum* cv. Frisson Pflanzen generiert, die weder Knöllchen- ( $nod^-$ ) noch Mykorrhizasymbiosen ( $myc^-$ ) ausbildeten (Duc et al., 1989). Ein  $myc^-$  Phänotyp konnte später auch für Mutanten von *Vicia faba*, *L. esculentum*, *Lotus japonicus*, *Phaseolus vulgaris*, *M. truncatula* und *M. sativa* dokumentiert werden (Marsh & Schultze, 2001). V. Gianinazzi-Pearson und ihre Mitarbeiter berichteten über eine *P. sativum* cv. Finale Mutante mit einem  $myc^{-1}$  und einem  $nod^-$  Phänotypen (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). Bei diesen Pflanzen können die AM Pilze zwar ein Appressorium auf der Rhizodermis bilden, zusätzliche Zellwandauflagerungen in diesem Bereich verhindern jedoch eine weitere Kolonisierung. Diese Strukturen enthalten Moleküle zur Wandverstärkung aber auch zur Pathogenabwehr, wie Phenole, Kallose und PR-1 Proteine („Pathogen-related“) (Gollote et al., 1993). Zwei Funktionen können für die Wildtyp-Gene der  $myc^{-1}$ -Mutanten postuliert werden (Gianinazzi-Pearson et al., 1996). Zum einen können sie, ausgelöst durch den pilzlichen Symbionten, an der Produktion eines Faktors beteiligt sein, der die Verteidigungsantwort der Pflanze negativ reguliert. Oder das Genprodukt induziert einen pilzlichen Repressor des pflanzlichen Verteidigungssystems.

Die *P. sativum* Mutante RisNod24 (Engvild, 1987) könnte bei einem Vergleich mit dem entsprechenden Wildtyp zum besseren Verständnis der Genregulation in der späten Phase der arbuskulären Mykorrhiza beitragen. Während der Wildtyp mit ei-

nem  $nod^+$  und einem  $myc^+$  Phänotypen in der Lage ist, Wurzelknöllchen und arbuskuläre Mykorrhiza auszubilden, hat die Mutante ( $myc^{-2}$ -Mutante) die Fähigkeit zur Etablierung einer intakten Mykorrhiza verloren. Abbildung 1-4 zeigt, dass trotz interzellulärer Hyphen und Penetration der Zellen die Formation voll ausgebildeter Arbuskelbäumchen in den Zellen der Wurzelrinde unterbleibt (Gianinazzi-Pearson et al., 1991). L. Lapopin verwendete dieses System während ihrer Doktorarbeit und verglich mit Hilfe der RNA Display-Technik die RNA-Akkumulierung in den Wurzeln der beiden Linien nach Besiedlung mit dem AM Pilz *Glomus mosseae* (Lapopin et al., 1999). Außerdem verwendete sie zum ersten Mal in der AM-Forschung die Methode der subtraktiven suppressiven Hybridisierungen. Eine subtraktive cDNA-Bank konnte von *G. mosseae* kolonisierten Wurzeln des Wildtyps und RisNod24 hergestellt werden und sollte Klone von allen Genen enthalten, die stärker im Wildtyp exprimiert werden als in der Mutante. Sequenzanalysen zufällig ausgewählter Klone zeigten, dass die entsprechenden Genprodukte in die verschiedenen Vorgänge der Zelle eingreifen (Lapopin, 1999). In einer früheren Arbeit wurde die Gene aus der subtraktiven Bank hinsichtlich ihrer Expression im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung analysiert (Grunwald, 2000). Weitere Untersuchungen sollen die differentielle Expression dieser Gene verifizieren sowie auf ihre Akkumulierung in elektronischen cDNA-Banken von *M. truncatula* untersucht werden. Aufgrund des umfangreichen Datenbestandes können mit der so genannten *in silico* Analyse Hinweise über die Genexpression in *M. truncatula* unter verschiedenen Anzuchtbedingungen gewonnen werden (Kapitel 3.3).



**Abbildung 1-4** Arbuskelbildung in *P. sativum* cv. Finale Wildtyp und der Mutante RisNod24. Das linke Bild zeigt die vollständige Ausbildung einer Arbuskel im Wildtyp, während in der Mutante RisNod24 (rechtes Bild) die Zelle zwar penetriert wird, aber die vollständige Arbuskelentwicklung unterbleibt. (Bildquelle: L. Lapopin)

## 1.5 *Medicago truncatula* als Modellorganismus in der Mykorrhizaforschung



**Abbildung 1-5** Die Modell-Leguminose *M. truncatula*. Neben dem natürlichen Habitus sind die Blüten und Hülsenfrüchte der Pflanze dargestellt. (Bildquelle: M. Hahn)

Pflanzenbiologen weltweit schätzen Eigenschaften, wie Generationszeit, Anpruchslosigkeit, Diploidie und kleine Genomgröße, so dass sich *A. thaliana* in den 80er Jahren zum Modellorganismus der Pflanzenwelt entwickelte. Die jedoch fehlende Eigenschaft von *Arabidopsis* mit Mykorrhizapilzen oder Knöllchenbakterien zu interagieren, machte die Suche nach einem neuen Modellorganismus erforderlich. Die Leguminose *M. truncatula* (Abbildung 1-5) besitzt diese und weitere Merkmale, die sie als Modellpflanze interessant erscheinen lässt. Weitere wichtige europäische Vertreter aus der Familie der Leguminosen, die neben den Gräsern zu den ökonomisch wichtigsten Agrarpflanzen zählen, sind *P. sativum* (Gartenerbse), *Trifolium* sp. (Klee), *M. sativa* (Luzerne), *V. faba* (Ackerbohne) und *Cicer arietinum* (Kichererbse). Das diploide Genom von *M. truncatula* ( $500-550 \times 10^8$  bp,  $2n=16$ ) ist zwar viermal größer als das von *Arabidopsis*, verglichen mit anderen Leguminosen jedoch relativ klein. Seit 2001 wird dieses mit Unterstützung der NSF (**N**ational **S**cience **F**oundation), der University of Oklahoma sowie dem 6th E.U. Framework Programme sequenziert und voraussichtlich im Jahre 2004 zu einem Abschluss gebracht. Durch die Bemühungen internationaler Gruppen (Noble Foundation, NSF, Stanford University, INRA-CNRS-Génoscope, MolMyk und MEDICAGO EU Project) existieren für *M. truncatula* zurzeit über 200000 ESTs aus diversen cDNA-Banken. Die Fragestellung zur Generation solcher cDNA-Banken ist dabei sehr variabel. So wurden neben den verschiedenen

Pflanzenorganen auch Reaktionen auf biotische und abiotische Umweltfaktoren betrachtet.

Transformationen bieten die Möglichkeit *in vitro* modifizierte DNA stabil in das Genom zu integrieren und sind daher ein wichtiges Instrument, um Gene hinsichtlich ihrer Funktion genauer zu charakterisieren. Im Laufe der letzten Jahre konnten für Pflanzen Transformationsprotokolle etabliert werden, die in modifizierter Form auch in *M. truncatula* funktionieren (Chabaud et al., 1996). Sie beruhen auf der natürlichen Eigenschaft diverser Agrobakterienstämme Pflanzen zu infizieren und eine Tumorbildung in ihnen zu induzieren. Nach der Infektion wird ein Teil des bakteriellen Ti-Plasmids („Tumor Inducing“), die so genannte Transfer-DNA (T-DNA), in die Pflanzenzelle eingeschleust und in ihrem Genom inkorporiert. Die dadurch transferierten Gene für Cytokinin- (Akiyoshi et al., 1984) und Auxinsynthese (Thomashow et al., 1984) sind unter anderem für die Entstehung des Tumors verantwortlich. Neben der gesteigerten Produktion von Phytohormonen kommt es auch zur Synthese von ungewöhnlichen Aminosäurederivaten, so genannten Opinen. Diese Opine können nicht von der Wirtszelle, wohl aber von dem jeweiligen parasitischen Bakterienstamm als Bausteine und Energiequelle genutzt werden (genetischer Parasitismus). Die Lebensdauer der Bakterien in Pflanzenzellen ist nur recht kurz, der neoplastische Zustand (Tumorzustand) ist stabil und bleibt auch in bakterienfreien Zellen erhalten. Agrobakterien eignen sich daher hervorragend als gentechnisches Werkzeug, indem die T-DNA durch zu transformierende DNA ersetzt und in die Pflanzen eingebracht wird. Die Regeneration komplett transgener Pflanzen erfolgt über somatische Embryogenese (Kamate et al., 2000; Trinh et al., 1998). Alternative Transformationsmethoden sind das „Particle Bombardment“ bei dem DNA-gebundene Gold- oder Wolframpartikel in das Gewebe geschossen werden (Ramaiah & Skinner, 1997) sowie die Aufnahme von DNA durch protoplastierte Zellen (Rose & Nolan, 1995).

Bedingt durch das Repertoire an Methoden gelang nach dem Einzug molekularer Analysen in der Mykorrhizaforschung die Identifizierung beteiligter Gene nur relativ langsam, so dass die Symbiose immer noch unzureichend verstanden ist. Die Entwicklung neuer Techniken, wie zum Beispiel die Array-Technologie, könnte die Untersuchungen entscheidend vorantreiben (Lapopin & Franken, 2000). Diese Methode ermöglicht die simultane Analyse der Expression einer großen Anzahl von Genen.

P.O. Brown und Mitarbeiter dokumentierten 1995 als Erste die Verwendung eines Mikroarrays zur Quantifizierung differentieller Genexpression zwischen Blatt- und Wurzelgewebe von *A. thaliana* (Schena et al., 1995). Seit dieser Zeit wurden auch für andere pflanzliche Organismen, wie *O. sativa*, *Petunia* sp., *Z. mays*, *Phaseolus limensis*, *Fragaria* spp., *Vicia* spp., *Theobroma cacao*, *Glycine max* und *Hordeum vulgare* (Aharoni & Vorst, 2002; Jones et al., 2002; Maguire et al., 2002; Ozturk et al., 2002), solche Experimente durchgeführt. Die Verwendung dieser effizienten Technologie beschränkte sich jedoch nicht nur auf die Pflanzenwelt, sondern erhielt auch Einzug in das Reich der Tiere, Pilze und Prokaryoten. Dank umfangreicher Sequenzierprogramme wurde diese Technologie in Form von cDNA-Arrays auch für *M. truncatula* etabliert (Fedorova et al., 2002; Journet et al., 2002; Wulf et al., 2003). Sie repräsentieren einen großen Teil des Wurzel-Transkriptom und sollen Einblicke in die transkriptionelle Veränderungen während der arbuskulären Mykorrhiza ermöglichen (Küster et al., 2004).

An der Interaktion zwischen Pflanzenwurzeln und AM Pilzen wird die Beteiligung eines komplexen Prozesses von Signalerkennung, Verstärkung und Weiterleitung vermutet. Hochkomplexe Strukturen, die Arbuskeln, formieren sich in den Zellen der Wurzelrinde, außerdem ist die arbuskuläre Mykorrhiza durch spezielle physiologische Bedingungen charakterisiert. Daher ist es wahrscheinlich, dass die Symbiose direkt die pflanzliche Genexpression kontrolliert. Zur Identifizierung pflanzlicher Gene, die direkt unter dem Einfluss der Mykorrhiza stehen wurde die Genexpression von sekundären Effekten, wie verbesserter Phosphatversorgung, erhöhtem Abscisinsäure- oder Auxingehalt, ebenfalls untersucht (Kapitel 3.1 und 3.2).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Organismen

<b>Organismus</b>	<b>Stamm, Kultivar</b>	<b>Referenz</b>
<i>Escherichia coli</i>	TOP 10 F'	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Escherichia coli</i>	DH 5 $\alpha$	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	ARqua1	David Barker INRA/Toulouse, Frankreich
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	Jemalong A17	Andreas Perlick Universität Bielefeld
<i>Pisum sativum</i> L.	Finale	Vivienne Gianinazzi-Pearson INRA/Dijon, Frankreich
<i>Pisum sativum</i> L.	Frisson	Vivienne Gianinazzi-Pearson INRA/Dijon, Frankreich
<i>Glomus intraradices</i> (Schenck & Smith)	MYCORISE <sup>®</sup> ASP	Premier Tech Rivière-du-Loup, Kanada
<i>Glomus intraradices</i> (Schenck & Smith)	BB-E	Banque européenne des Glomales INRA/Dijon, Frankreich
<i>Gigaspora rosea</i> (Nicolson & Schenck)	BEG 9	Banque européenne des Glomales INRA/Dijon, Frankreich
<i>Glomus mosseae</i> (Nicolson & Gerdemann)	BEG 12	Banque européenne des Glomales INRA/Dijon, Frankreich
<i>Aphanomyces euteiches</i> Drechs.	SRSF 502	Institut für Thallophyten Universität Kopenhagen, Dänemark
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	2011	Mathias Keller Universität Bielefeld

### 2.2 Vektoren und Plasmide

<b>Bezeichnung</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
TOPO <sup>™</sup> pCR 2.1	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
pGEM <sup>®</sup> -Teasy	Klonierungsvektor für PCR-Produkte	Promega (Mannheim)
pBI101-1	Fusionierungsvektor für Pflanzentransformation mit <i>A. rhizogenes</i>	BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA)

## 2.3 Oligonukleotide

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

Bezeichnung	Sequenz (5´-3´-Richtung)	T <sub>m</sub>
3´SMART CDS Primer II A*	ATTCTAGAGGCCGAGGCCGCCGACATG-d(T) <sub>30</sub> N <sub>1</sub> -N (N=A, G, C oder T; N <sub>1</sub> =A, G, oder C)	65,0°C
5´PCR Primer II A*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	65,0°C
SMART II A*	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCCATTATGGCCGGG	65,0°C
Gph-fpr	GACAGTGTTACGGACAGTGG	66,0°C
Gph-rev	TCAACAGTCTTCTGGGTGGCG	66,0°C
Eph-for	AGCGTGGTCGCGGCCGAGGTA	70,0°C
Eph-rev	GGCCGCCCGGGCAGGTACAAT	70,0°C
PRP6-for	GGCCGCCCGGGCAGGTTTG	67,0°C
PRP6-rev	CGTGGTCGCGGCCGAGGTACAAG	67,0°C
Drp-for	GCGGCCGAGGTCAAGAAATAG	62,0°C
Drp-rev	CCGGGCAGGTACAAATACTGC	62,0°C
Tub-for	GCGTGGTCGCGGCCGAGGTACA	70,0°C
Tub-rev	CGGCCGCCCGGGCAGGTTT	70,0°C
Trpi-for	ACCTTACAGCGTGAGCCTATAAGA	65,0°C
Trpi-rev	GCGGCCGAGGTACGAAAGGTG	65,0°C
Prp-for	CGCCCGGGCAGGTAAACAGATTAA	70,0°C
Prp-rev	TCGCGGCCGAGGTACAACAACCTTA	70,0°C
Mapk-for	TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGG	69,0°C
Mapk-rev	GGTCGCGGCCGAGGTACTAGG	69,0°C
M13-for	GTA AACGACGGCCAGT	60,0°C
M13-rev	GGAAACAGCTATGACCATG	60,0°C
MtTef1 $\alpha$ -for	TCGTAGTTTGATTAATTGTGG	61,0°C
MtTef1 $\alpha$ -rev	GCAACAATTAGTTGTCCATTA	61,0°C
AJ500060-for	AAGTGGCGAACCCGTTGAGG	61,0°C
AJ500060-rev	AACGTCACAGGCGCTCCAAG	61,0°C
AJ502095-for	AGTTGAGGCCGGTGACGAATAC	63,0°C
AJ502095-rev	CCACTCGTTGCGTCCCTCTC	63,0°C
TC68567-for	GAAGTATTCCTCATCGTCTCAAC	61,0°C
TC68567-rev	GGGGAAAACAACCTACAACCTCTTA	61,0°C
TC69297-for	CTTGGACACAGTCGGAGAACCC	64,5°C
TC69297-rev	CCGCGTCCTAAGCCAGTGAG	64,5°C
TC73512-for	GTAAGTTTGAATGTGGGACTGTTG	58,5°C
TC73512-rev	GTAAGAAAGAATACACGGCCATT	58,5°C

## Material und Methoden

MtBC43E05-for	GTCATGTTATTCAAATAAGAGTTTGC	59,0°C
MtBC43E05-rev	CTAGGTAGACTTTCAATATAATAGCC	59,0°C
TC85312.for	TTGTTCTTTGCTTTTGTTC	58,0°C
TC85312.rev	GTCGATATATGCCAACTCGATGTTGATG	58,0°C
TC85311.for	TCTATTGAAGATAACATCTACCAATC	62,0°C
TC85311.rev	GTCTCACAAGATACATTCTATTTCTTGG	62,0°C
Mtha1-K	ACTGAGGATCCCTTCTCTTTCTTGCAGCTGC	63,0°C
Mtha1-K2	ACTGATCTAGACTAAGGACATGTTTGGCTG	63,0°C
Mtha1.for	TGGAACGAAGAAACAAGG	55,0°C
Mtha1.rev	ATTAGCAGAACAAGGAGG	55,0°C
Mtaoc-for	ATGGCATCCATGAGTTCTTTG	57,0°C
Mtaoc-rev	TGATCAGTTGGTGAAGTTTGG	57,0°C

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

## 2.4 Puffer, Lösungen und Medien

Chemikalien und laboratorische Reagenzien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), AppliChem (Darmstadt) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

<b>TAE</b>	40 mM 1 mM	Tris-Acetat pH 8,0 EDTA
<b>TE</b>	10 mM 1 mM	Tris-Cl pH 8,0 EDTA
<b>20× SSC</b>	0,4 M 4 M	Natrium-Citrat pH 7,0 NaCl
<b>Standard Hybridisierungspuffer</b>	5× 1% 0,1% 0,02%	SSC Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) N-Lauroylsarcosinat SDS
<b>Standard Hybridisierungspuffer + Formamid</b>	50% 5× 2% 0,1% 0,02%	Formamid SSC Blocking Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) N-Lauroylsarcosinat SDS
<b>2× Waschpuffer</b>	2× 0,1%	SSC SDS
<b>0,5× Waschpuffer</b>	0,5× 0,1%	SSC SDS
<b>Färbelösung für Nylonmembranen</b>	0,03% 0,3 M	Methylenblau Natrium-Acetat

## Material und Methoden

<b>Entfärbelösung für Nylonmembranen</b>	1× 1%	SSC SDS
<b>Trypanblau-Lösung</b>	0,1%	Trypanblau in Laktophenol (25% (w/v) Phenol in Wasser/Glycerin/ Milchsäure im Verhältnis 1:1:1)
<b>Säurefuchsin-Lösung</b>	0,1 g 875 ml 63 ml 63 ml	Säurefuchsin Milchsäure Glycerin Wasser
<b>Säurefuchsin-Entfärbelösung</b>	875 ml 63 ml 63 ml	Milchsäure Glycerin Wasser
<b>Tinte/Essigsäure-Lösung</b>	2% 5%	Blaue Tinte (Pelikan) Haushaltssessig (5% Essigsäure)
<b>LB (Luria Bertani)</b>	10 g/l 5 g/l 10 g/l	Trypton Hefeextrakt NaCl
<b>TY</b>	5 g/l 3 g/l 0,9 g/l	Trypton Hefeextrakt CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O
<b>SOC</b>	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 <sub>2</sub> ×7H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O Glukose
<b>L Broth</b>	10 g/l 5 g/l 5 g/l 1 g/l	Bactotrypton Hefeextrakt NaCl Glukose
<b>Tris-Cl/NaCl-Puffer</b>	100 mM 50 mM	Tris-Cl pH 7,0 NaCl
<b>X-Gluc Stammlösung</b>	25 mg 500 µl	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D- Glykosid (Biomol, Hamburg) N,N-Dimethylformamid
<b>K-Ferri/Ferrocyanid-Stammlösung</b>	100 mM 100 mM	K-Ferricyanid K-Ferrocyanid
<b>Natrium-Phosphatpuffer</b>	0,05 M 0,05 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O pH 7,5
<b>Modifiziertes Fahraeus Medium</b>		
Makroelemente (1000×)	0,9 M 0,5 M 0,7 M 0,4 M 20 mM 1 M	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O FeCitrat×3H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>
Mikroelemente (100×)	1 mg/ml 1 mg/ml 1 mg/ml 1 mg/ml 1 mg/ml	MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O ZnCl <sub>2</sub> H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>

## Material und Methoden

---

---

### Long Ashton Lösung

Makroelemente (10×)	8,08 g/l	KNO <sub>3</sub>
	18,88 g/l	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O
	0,208 g/l	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O
	3,68 g/l	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O
	0,22 g/l	Fetrilon
Mikroelemente (100×)	2,23 g/l	MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O
	0,25 g/l	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O
	0,29 g/l	ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O
	3,1 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	5,9 g/l	NaCl
Spurenelemente (1000×)	0,88 g/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ×4H <sub>2</sub> O

### Hoagland Lösung

Makroelemente	236,20 g/l	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O
	101,10 g/l	KNO <sub>3</sub>
	246,48 g/l	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O
	13,62 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	3,68 g/l	NaFeEDTA
Spurenelement	0,48 g/l	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ×2H <sub>2</sub> O
	6,18 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,52 g/l	NiSO <sub>4</sub> ×6H <sub>2</sub> O
	2,88 g/l	ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O
	3,96g/l	MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O
	1,24 g/l	CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O
	0,48 g/l	CoCl <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O

### Nodulationslösung

Stammlösung A (2000×)	294 g/l	CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O
Stammlösung B1 (1000×)	116 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,288 g/l	ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
	0,247 g/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	0,1 g/l	CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O
	0,056 g/l	CoSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O
Stammlösung B+B1 (2000×)	150 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	50 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Stammlösung C (2000×)	6,7 g/l	FeCitrat×3H <sub>2</sub> O
Stammlösung D (2000×)	123 g/l	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O
	87 g/l	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,333 g/l	MnSO <sub>4</sub> ×4H <sub>2</sub> O

---

---

## 2.5 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Medien für die Kultivierung von *E. coli* wurden, wie in Sambrook et al. beschrieben, hergestellt und je nach Bedarf mit Antibiotika (150 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) und Nachweisreagenzien (400 µg/ml IPTG, 40 µg/ml X-Gal) versetzt. Die Anzucht von *E. coli* erfolgte aerob bei 37°C. Flüssigkulturen wurden für eine ausreichende Belüftung auf einem Schütteltisch (150-200 rpm) inkubiert.

Die Zelldichte der *E. coli*-Kulturen konnte photometrisch durch Messungen der optischen Dichte bei 600 nm in dem Spektralphotometer Ultrospec III (Pharmaciabio-  
tech, Freiburg) bestimmt werden. Einer optischen Dichte von 1 entspricht etwa  $1 \times 10^4$   
Zellen (Sambrook et al., 1989).

## 2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 2.6.1 Standard-PCR

Alle PCR-Reaktionen zur Amplifizierung definierter DNA-Fragmente erfolgten mit 0,025 U/ $\mu$ l der Taq-Polymerase (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) in dem mitgelieferten Inkubationspuffer und 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>. Als weitere wichtige Komponenten wurden den PCR-Reaktionen 1  $\mu$ M Oligonukleotide und 200  $\mu$ M dNTPs (Amersham Biosciences, Freiburg) hinzugefügt. Als DNA-Vorlage wurde eine Menge von 0,1-1 ng eingesetzt. Bei jedem Versuchsansatz wurde eine Negativkontrolle ohne DNA eingesetzt. Alle PCR-Reaktionen erfolgten in dem Trio Thermoblock™ (Biometra, Göttingen) in Kombination mit dem Trio Heated Lid (Biometra, Göttingen) oder in dem Personal Cycler (Biometra, Göttingen) nach folgendem Standardprogramm: 3 min bei 95°C Denaturierung, 30-35 Amplifizierungszyklen (20 s bei 94°C; 30 s bei 50-68°C je nach Oligonukleotid; pro 1 kb Fragmentgröße 1 min bei 72°C) und eine abschließende Elongationsphase für 3 min bei 72°C.

### 2.6.2 Expand High Fidelity PCR

Zur Amplifizierung besonders großer Fragmente (>1000 bp) wurde das Expand High Fidelity PCR System von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) verwendet. Ein Mix aus den beiden DNA-Polymerasen Taq und Pfu sollte die Fehlerrate beim Einbau der Desoxynukleotide minimieren. Die PCR-Reaktionen wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 2.6.3 Real-Time-PCR

Quantifizierungen von DNA mittels Real-Time-PCR wurden auf dem iCycler IQ Thermocycler (Bio-Rad Laboratories, München) durchgeführt. Minimierung unspezifischer Amplifizierung sollte durch den Einsatz der Hot-Start DNA-Polymerase PLATINUM® Taq (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) gewährleistet werden. Die Reak-

tion wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten der Firma PeqLab (Erlangen) durchgeführt. In die Reaktionsgefäße wurden 5 µl DNA-Lösung vorgelegt, auf 30 µl Reaktionsvolumen (1× PCR-Puffer; 2 µM dNTPs; 2,5-4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,2× SybrGreen I; je 1 pM Oligonukleotide; 0,5 U Taq DNA-Polymerase) aufgefüllt und anschließend mit selbstklebenden optischen Folien der Firma Bio-Rad Laboratories (München) verschlossen. Um die Amplifizierungskinetik der PCR zu visualisieren, wurde dem Reaktionsmix der DNA-Farbstoff SybrGreen I (10000-fach, BioWhittaker Molecular Applications, Verviers, Belgien) nach Verdünnung in TE (1:500), zugefügt. Nach Angabe des Herstellers steigt die Fluoreszenz (Exikation: 490 nm; Emission: 530 nm) des Farbstoffes bei Bindung an die große Furche der doppelsträngigen DNA um den Faktor 10000.

Zur Optimierung der Kameraeinstellungen wurde vor jeder Messung eine 96-Well-Mikrotiterplatte mit 25 µl Fluorescein-Lösung (50 pM Calibrationdye, Bio-Rad Laboratories, München) pro Reaktionsgefäß gefüllt und vom Gerät vermessen. Die Reaktion im iCycler erfolgte mit 8-15 min Denaturierung bei 94°C, 40-50 Amplifizierungszyklen (30 s bei 94°C; 30-45 s bei 58,5-64,5°C; 30-50 s bei 72°C) und 10 min bei 72°C. Durch die Aufnahme einer Schmelzkurve (75°C in 0,2°C Schritten auf 95°C in je 6 s Intervallen) konnte die Qualität der PCR überprüft werden.

Im Verlauf der Real-Time-PCR steigt mit zunehmender Zyklenzahl die Konzentration doppelsträngiger DNA und proportional dazu die Fluoreszenzintensität der Lösung. Diese wurde von einer integrierten Digitalkamera nach jeder Elongationsphase dokumentiert. Aus einer Darstellung der Fluoreszenz jeder Reaktion in Abhängigkeit zur Zyklenzahl wurde der C<sub>T</sub> („Threshold Cycle“) bestimmt. Dieser Wert ist definiert als die Zyklenzahl, bei der die Fluoreszenz der Reaktion eine definierte Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Die gesamte Darstellung und Auswertung der Rohdaten wurden mit der iCycler IQ Optical System Software Version 3.0a (Bio-Rad Laboratories, München) sowie dem Programm Microsoft® Excel durchgeführt.

Die Bestimmung relativer Expressionsverhältnisse erfolgte nach zwei unterschiedlichen Methoden:

### **Absolute Quantifizierung**

Diese Methode basiert auf den Vergleich einer unbekannt Probe mit einer Standardkurve. Zur Herstellung dieser Standardkurve wurde das zu untersuchende Amplikon über PCR amplifiziert, mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) gerei-

nigt, die Konzentration photometrisch bestimmt und die Kopienzahl abgeschätzt. Dieser Standard wurde in verschiedenen Verdünnungen in die Real-Time-PCR eingesetzt und unter den gleichen Bedingungen (Reaktionsansatz, PCR-Programm) und gleicher Reaktionseffizienz (78-98%) wie die unbekannte Probe amplifiziert. Anhand der Standardkurve konnte für jede unbekannte Probe die Kopienzahl zu einem bestimmten  $C_T$ -Wert ermittelt werden. Ein Vergleich der Genexpression unter verschiedenen Bedingungen erfordert eine Normalisierung der Daten. Dazu wurde die Kopienzahl eines Referenzgens ins Verhältnis zur Kopienzahl des zu untersuchenden Gens gesetzt.

### Relative Quantifizierung

Die Quantifizierung nach M. W. Pfaffl (Pfaffl, 2001) kommt ohne die Verwendung von Standards aus, noch müssen die PCR-Effizienzen vergleichbar sein. Obwohl diese Methode auf PCR-Effizienzen basiert, ist nur die Differenz der  $C_T$ -Werte von Probe und Kontrolle essentiell, um das Verhältnis zwischen Genen zu beschreiben. Zur Amplifizierung des untersuchten Genes wurde die DNA-Vorlage in verschiedenen Verdünnungen in die PCR-Reaktion eingesetzt. Aus den relativen Verdünnungsschritten konnte eine Standardkurve ermittelt werden, deren Steigung  $m$  zur Berechnung der PCR-Effizienz  $E$  folgendermaßen verwendet wurde:

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

Zum Vergleich der Genexpression von Probe und Kontrolle wurde die Real-Time-PCR auch für ein Referenzgen durchgeführt und dessen Reaktionseffizienz bestimmt. Die Berechnung des relativen Expressionsverhältnisses  $R$  aus den PCR-Effizienzen  $E$  und  $\Delta C_T$  erfolgte mit der Formel:

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

## 2.7 Extraktion von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mittels alkalischer Hydrolyse (Sambrook et al., 1989), dem Plasmid Mini Kit (Qiagen, Hilden) oder bei geringer Kopienzahl des Plasmids mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die DNA-Konzentration ließ sich durch Absorptionsänderungen bei 260 nm mit dem Spektralphotometer Ultropec III (Phar-

maciabiotech, Freiburg) messen. Einer Absorptionsänderung von  $A_{260}=1$  entspricht einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  (Sambrook et al., 1989).

## **2.8 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen**

Die hydrolytische Spaltung von 1  $\mu\text{g}$  DNA wurde mit 1 U Restriktionsenzym (Amersham Biosciences, Freiburg oder New England Biolabs, Frankfurt/Main) in dem entsprechenden Puffer durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei Plasmid-DNA für eine Stunde und bei genomischer DNA über Nacht bei 37°C.

## **2.9 Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 0,8-2% (w/v) Agarosegelen in 0,5 $\times$  TAE Puffer. Zur Abschätzung der DNA-Länge wurden die 1 kb- und 100 bp-Leiter von Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) oder Fermentas verwendet. Die DNA wurde in einer Ethidiumbromid-Lösung (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) inkubiert, durch UV-Licht (302 nm) visualisiert und mit dem Polaroid GDS-System (INTAS, Göttingen) dokumentiert.

## **2.10 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Zur Extraktion und Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen bis zu einer Länge von 10 kb wurde der Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die Reinigung größerer Fragmente erfolgte über eine Filtereinheit, die von der Firma Millipore (Eschborn) bezogen oder nach Anleitung von Heery et al. hergestellt wurden (Heery et al., 1990). Gelstücke mit der gewünschten DNA wurden auf den Filtern platziert und mit 8000 rpm für 2 min in der Biofuge pico (Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Das Zentrifugat enthielt ca. 70% der DNA, die anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt wurde.

## **2.11 Klonierung von DNA-Fragmenten**

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte in die Vektoren TOPO™ pCR 2.1 (Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe) oder pGEM®-TEasy (Promega, Mannheim), wie vom Hersteller empfohlen.

Aus Restriktionshydrolysen gewonnene DNA-Fragmente wurden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, Frankfurt/Main oder Amersham Biosciences,

Freiburg) bei 16°C über Nacht in den Vektor pBI101-1 ligiert. Die Behandlung mit „Shrimp Alkalischer Phosphatase“ (Amersham Biosciences, Freiburg) sollte nach Anleitung des Herstellers die Religation leerer Vektoren verhindern. Jede für eine Ligation verwendete DNA wurde mit dem PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) oder der „Zentrifugier-Methode“ (siehe Kapitel 2.10) gereinigt.

## **2.12 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen**

Die Herstellung der elektrokompenten *E. coli*-Stämme XL1-Blue und DH5 $\alpha$  sowie die Transformation von Plasmid-DNA in diese Zellen wurde, wie in Sambrook et al. (1989) beschrieben, durchgeführt. In der Elektroporation störende Salze wurde durch eine 20-minütige Dialyse der Plasmid-DNA auf MF-Millipore Membrane Filters (Millipore, Eschborn) entfernt. Transformation in chemokompetente TOP 10 F' Zellen erfolgte nach Anleitung des Herstellers Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe).

## **2.13 Sequenzierungen von DNA-Fragmenten**

Alle Sequenzierungen wurden von Susanne Michel am Institut für Biowissenschaften in Würzburg oder von MWG Biotech (Ebersberg) durchgeführt.

## **2.14 Kultivierung von *Agrobacterium rhizogenes***

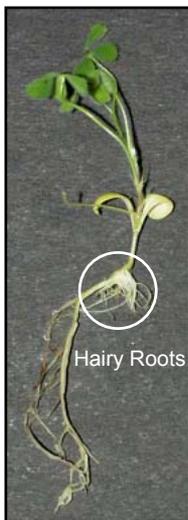
Zur Kultivierung der Agrobakterien wurde TY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Streptomycin 600 mg/l und Kanamycin 50 mg/l) verwendet. Festmedien wurden durch die Zugabe von 1,5% (w/v) Agar hergestellt. Die Inkubation erfolgte für zwei Tage bei 28°C. Flüssigkulturen wurden, wie bei *E. coli*, auf Schüttlern oder Röllern angezogen.

## **2.15 Herstellung und Transformation elektrokompentener *A. rhizogenes*-Zellen**

Zur Herstellung elektrokompentener Zellen wurden 100 ml L Broth + 600 mg/l Streptomycin mit *A. rhizogenes* ARqua1 angeimpft und über Nacht bei 28°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde für 5 min bei 4°C mit 4100×g zentrifugiert und anschließend mit Wasser gewaschen. Nach dreimaliger Wiederholung, wurden die

Zellen zunächst in 50 ml und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml 10% (v/v) eiskaltem Glycerin resuspendiert. Die Zellen wurden in 40 µl Aliquots bei -80°C gelagert. Ca. 50-200 ng Plasmid-DNA wurden in einer eisgekühlten 2 mm-Elektroporationsküvette (EquiBio, Ashford, UK) mit 40 µl elektrokompenten Zellen gemischt und mit dem Gene Pulser (2,5 kV; 25 µF; 400 Ω, Bio-Rad, München) transformiert. Die Zellen wurden sofort in 1 ml LB aufgenommen, 2-4 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika für 2-3 Tage bei 28°C inkubiert.

### 2.16 Wurzeltransformation von *Medicago truncatula* mit *A. rhizogenes*



Die Agrobakterien mit der zu transformierenden Fremd-DNA wurden auf TY-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (Streptomycin 600 mg/l und Kanamycin 50 mg/l) kultiviert. Nach Keimung der sterilisierten Samen (siehe Kapitel 2.17.1) wurde von den ca. 1 cm langen Wurzeln die Spitze mit einem Skalpell abgetrennt und die Schnittstelle mit Agrobakterien inokuliert. Alternativ dazu konnten die Agrobakterien von gut bewachsenen TY-Platten mit sterilem Wasser abgeschwemmt und mit einer Spritze in den hellen Bereich des Hypokotyls dreimal injiziert werden. (Eine Anzucht der Bakterien in Flüssigmedium kann zu Nekrosen an der Injektionsstelle führen.) Die

Keimlinge wurden auf Platten mit modifiziertem Fahraeus-Medium ausgelegt und mit Parafilm® (American National Can., Chicago, IL, USA) verschlossen. Verwundetes Pflanzengewebe hat die Eigenschaft gasförmiges Ethylen zu produzieren, ein Phytohormon, welches das Pflanzenwachstum inhibieren kann. Um einen Gasaustausch zu gewähren, wurden Löcher in den Parafilm® geschnitten. Für eine effektive Transformation wurden die Keimlinge zunächst 4-5 Tage bei 20°C, dann für weitere 14 Tage bei 25°C in einer Phytokammer mit 16 Stunden Photoperiode inkubiert. So genannte „Hairy Roots“ traten nach ca. zwei Wochen an der Infektionsstelle aus und enthielten die zu transformierende DNA (siehe Abbildung). Da nur Teile der Wurzel transgen sind, spricht man auch von einer chimären Pflanze (Boisson-Dernier et al., 2001). Ausreichend entwickelte Pflanzen wurden für weiteres Wachstum und Kolonisierung mit *G. mosseae* in Topfkulturen angezogen (siehe Kapitel 2.17.2).

## 2.17 Anzucht und Inokulierung von *M. truncatula*

### 2.17.1 Sterilisation und Keimung der Samen

Die aus den Schoten gewonnenen Samen wurden zur Stratifizierung mit konzentrierter Schwefelsäure behandelt bis Läsionen in der Testa entstanden (ca. 10 min). Dieser Prozess gewährt eine verstärkte Wasseraufnahme und somit eine verbesserte Keimung der Samen. Nach der vollständigen Entfernung der Schwefelsäure und Waschen mit sterilem



Wasser erfolgte die Oberflächensterilisation der Samen für 2 min in einer 3,5%igen (v/v) Natrium-Hypochlorit-Lösung. Nach erneutem Waschen mit sterilem Wasser wurden die Samen in einer Petrischale auf feuchtem, sterilem Filterpapier oder 0,8%igen (w/v) Wasseragar gleichmäßig verteilt und für drei Tage bei 4°C im Dunkeln vernalisiert. Zur Keimung der Samen folgte eine Inkubation für weitere 2-4 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur.

### 2.17.2 Inokulierung der Keimlinge

#### Mykorrhizierung

Zur weiteren Anzucht wurden die Keimlinge in Pflanzengefäße mit einem 1:1 Gemisch aus Vermiculit und Blähton gesetzt. Für die Kolonisierung mit *Glomus mosseae* (BEG 12), *Glomus intraradices* (BB-E) und *Gigaspora rosea* (BEG 9) wurde 1/10 Volumen des entsprechenden Mykorrhizainokulums (Biorize, Dijon, Frankreich) unter das Substrat gemischt. Alternativ wurden sterile *G. intraradices* Sporen (Mycorise® ASP, Premier Tech, Rivière-du-Loup, Kanada) direkt an die Pflanzenwurzeln pipettiert. Die Fixierung der Pilzsporen in der Rhizosphäre wurde durch eine Seesandschicht in den Pflanzengefäßen gewährleistet. Die entsprechenden Kontrollpflanzen wurden im gleichen Substrat, jedoch ohne Inokulum, angezogen. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte in Phytokammern (Conviron, Winnipeg, Kanada) bei 25°C mit einer 16 stündigen Photoperiode. Alle vier Tage wurden zur Nährsalzversorgung der Pflanzen pro Topf 10 ml Düngelösungen („Long Ashton“ oder „Hoagland“) gegeben. Der 10-fach reduzierte Phosphatanteil sollte zu einer verbesserten Kolonisierung führen.

### **Nodulierung und Wurzeltransformation**

Die stratifizierten und sterilisierten Samen wurden zur Keimung auf Schrägagarplatten mit Nodulationsmedium ausgelegt und bei 24°C für 48 Stunden im Dunkeln inkubiert. Um die Induktion der „Hairy Roots“ durch *A. rhizogenes* zu erhöhen wurden die Platten für drei weitere Tage bei 4°C gelagert. Die Keimlinge wurden dann in ein Gemisch aus Vermiculit und Perlite (1:1) pikiert und *A. rhizogenes* ARqua1 in das Hypokotyl injiziert (siehe Kapitel 2.16). Nach der Nodulation der Wurzeln mit *Sinorhizobium meliloti* 2011 wurden die jungen Pflanzen für zwei Tage unter einer Plastikhaube bei 20°C mit 16 Stunden Photoperiode inkubiert. Zehn Tagen nach der Injektion entwickelte sich an der Einstichstelle eine kleine Verdickung. Diese wurde mit Vermiculit und Sand (1:1) abgedeckt und die Temperatur auf 22°C erhöht. Nach Entwicklung der „Hairy Roots“ (2-4 Wochen) wurde der nicht-transgene Teil des Rhizoms entfernt, die Pflanzen umgetopft und erneut mit *S. meliloti* 2011 inokuliert. Die Anzucht erfolgte in einer Klimakammer bei 22°C und 16 Stunden Photoperiode. Alle zehn Tage wurden die Pflanzen mit Nodulationslösung gedüngt.

### ***Aphanomyces euteiches***

Für die Inokulierung mit *A. euteiches* wurde 1 cm<sup>2</sup> pilzliches Myzel aus CM-Agar (**Corn Meal**) geschnitten und in sterilem Seewasser über Nacht bei 25°C inkubiert. Aus der resultierenden Zoosporensuspension wurde jeder Keimling mit 5 ml infiziert.

#### **2.17.3 Applikation von Indol-3-Buttersäure (IBA)**

Nach der Keimung wurden die Pflanzen in ein Gemisch aus Lecaton und Erde (10:1) bei 23°C und 16 Stunden Photoperiode angezogen. Die Düngung erfolgte einmal pro Woche mit 40 ml Long Ashton pro Topf. Das Natriumsalz der Indol-3-Buttersäure wurde in Wasser gelöst (10 µM Endkonzentration) und zusammen mit der Düngerlösung nach 4 Wochen Wachstum appliziert. Nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden wurden die Wurzeln geerntet und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C eingefroren.

#### **2.17.4 Applikation von Abscisinsäure (ABA)**

Das weitere Wachstum der Keimlinge erfolgte in Pflanzengefäße mit einem 1:1 Gemisch aus Vermiculit und Blähton. Die Düngung der Pflanzen erfolgte jede Woche mit 10 ml Long Ashton pro Topf. Die (+)-cis,trans-Abscisinsäure wurde in 2,5% (v/v) Aceton gelöst und mit Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Nach 4

Wochen in der Phytokammer (Conviron, Winnipeg, Kanada, 25°C, 16 Stunden Photoperiode) wurden die Pflanzen mit 10 ml der Abscisinsäure-Lösung sowie die entsprechenden Kontrollpflanzen mit 10 ml 2,5% (v/v) Aceton für zwei Tage inkubiert. Anschließend wurden die Pflanzen geerntet und bei -80°C gelagert.

### 2.17.5 Applikation von Phosphat

Das Wachstum der Keimlinge erfolgte in einem Gemisch aus Vermiculit und Blähton (1:1). Die Pflanzen wurden alle vier Tage mit 10 ml Long Ashton unter Standard-Phosphatbedingungen gedüngt, während Kontrollpflanzen mit 10-fach reduziertem Phosphatanteil behandelt wurden. Nach vier Wochen Wachstum in einer Phytokammer (Conviron, Winnipeg, Kanada) bei 25°C und 16 Stunden Photoperiode wurden die Pflanzen geerntet und bis zur RNA-Extraktion bei -80°C eingefroren.

## 2.18 Ernte der Wurzeln und Auswertung der Infektion

### 2.18.1 Ernte der Wurzeln

Die Wurzeln wurden mit Wasser vom Substrat befreit und mit Saugpapier getrocknet. Das Frischgewicht der Wurzeln wurde bestimmt und eine Wurzel pro Topf für die Färbung zurückgelegt. Die restlichen Wurzeln wurden in 2-3 cm lange Stücke geschnitten, in Aluminiumfolie verpackt, mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei einer Temperatur von -80°C gelagert.

### 2.18.2 Färbung der Pilzhyphen

Die für die Färbung vorgesehenen Wurzeln wurden mit 10% (w/v) Kaliumhydroxid-Lösung bedeckt und für 45 min bei 90°C im Wasserbad inkubiert. Nach Entfernung des Kaliumhydroxids und Spülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung der Pilzhyphen.

### **Trypanblaufärbung**

Mit einer 0,1%igen (w/v) Trypanblau-Lösung wurden die Wurzelfragmente für 15 min bei 90°C im Wasserbad und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Färbelösung verworfen und die Wurzeln zum Mikroskopieren mit destilliertem Wasser gespült.

### **Tintenfärbung**

Die Wurzeln wurden mehrmals mit Wasser gewaschen und mit einer Tinte/Essigsäuremischung für 10 min im Wasserbad bei 90°C gefärbt. Anschließend wurden die Wurzeln mehrmals gründlich mit angesäuertem Wasser (1% (v/v) Essigsäure) gewaschen (Vierheilig et al., 1998).

### **Säurefuchsinfärbung**

Nach der Kaliumhydroxidbehandlung wurden die Wurzeln 3-4 min mit 1%iger (w/v) Salzsäure überschichtet. Die Lösung wurde abgegossen, die Wurzeln aber nicht gewaschen, sondern direkt mit der 0,01%igen (w/v) Säurefuchsin-Lösung für 10-15 min bei 90°C im Wasserbad inkubiert. Nach Entfernung des Säurefuchsin erfolgte die Behandlung mit einer Entfärbelösung.

### **2.18.3 Abschätzung der Mykorrhizierung**

Von den gefärbten Wurzeln eines Pflanzentopfes wurden 30 zufällig ausgewählte 1 cm lange Fragmente auf einem Objektträger in Glycerin eingebettet. Mit dem Lichtmikroskop konnte die Anzahl mykorrhizierter Wurzelstücke ausgezählt und eine Einteilung in sechs Infektionsklassen (Tabelle 2-1) vorgenommen werden (Trouvelot et al., 1986).

**Tabelle 2-1 Infektionsklassen**

<b>Infektionsklasse</b>	<b>Beschreibung</b>
0	Keine Infektion
1	<1% des Fragments infiziert
2	<10% des Fragments infiziert
3	<50% des Fragments infiziert
4	<90% des Fragments infiziert
5	>90% des Fragments infiziert

Anschließend wurde der Arbuskelgehalt in den infizierten Wurzelabschnitten abgeschätzt und in folgenden Klassen eingeteilt (Tabelle 2-2):

**Tabelle 2-2 Arbuskelgehalt in infizierten Wurzelfragmenten**

Klasse	Beschreibung
A0	keine Arbuskel
A1	wenig Arbuskel
A2	durchschnittlicher Arbuskelgehalt
A3	viele Arbuskel

Aufgrund der Zuordnung konnten die Mykorrhizierungsparameter folgendermaßen berechnet werden (Tabelle 2-3):

**Tabelle 2-3 Formeln zur Berechnung der Mykorrhizierungsparameter**

Bezeichnung	Berechnung
Mykorrhizierungsfrequenz (F)	$F = N_m/N_{ges} \times 100$ $N_{ges}$ = Gesamtzahl der Fragmente $N_m$ = Zahl der mykorrhizierten Fragmente
Mykorrhizierungsintensität (M)	$M = (95n_5 + 70n_4 + 30n_3 + 5n_2 + n_1)/N_{ges}$ $n_x$ = Zahl der Fragmente in Infektionsklasse X
Mykorrhizierungsintensität der infizierten Fragmente (m)	$m = M \times 100/F$
Arbuskelgehalt im infizierten Teil der Wurzel (a)	$a = (100m_{A3} + 50m_{A2} + 10m_{A1})/100$ $m_{Ay} = (95n_{5Ay} + 70n_{4Ay} + 30n_{3Ay} + 5n_{2Ay} + n_{1Ay}) \times F / (N_m \times M)$ $n_{Ay}$ = Anzahl der Fragmente mit einem Arbuskelgehalt der Klasse Ay
Arbuskelgehalt im gesamten Wurzelsystem (A)	$A = a \times M/100$

## 2.19 Qualitativer $\beta$ -Glukuronidase-Test

Knöllchen wurden mit dem Leica VT100S Vibratom (Wetzlar) in Natriumphosphatpuffer (0,05 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 0,05 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; pH 7,5) mit einer Dicke von 70  $\mu\text{m}$  geschnitten. Die Semidünnschnitte sowie Wurzelfragmente von *M. truncatula* wurden in GUS-Puffer (9,6 ml Tris-Cl/NaCl-Puffer, 0,2 ml K-Ferri-Ferrocyanid-Stammlösung und 0,5 ml X-Gluc-Stammlösung) gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Spülen mit Wasser erfolgte die Dokumentation mit Lichtmikroskop und Digitalkamera.

## 2.20 Messung von Abscisinsäure

Abscisinsäure (ABA) wurde aus 100 mg frischem Wurzelmaterial entsprechend dem leicht modifizierten Protokoll von M. K. Walker-Simmons extrahiert (Walker-Simmons et al., 2000). Nach Zugabe von 50 ng deuterierter ABA (Plant Biotechnology Institute, National Research Council of Canada) wurde das Pflanzenmaterial in einem Mörser mit einem Gemisch aus Isopropanol/Eisessig (95:5, v/v) homogenisiert, in einem Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert und anschließend zentrifugiert (1500×g, 10 min). Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und unter einem Stickstoff-Strom getrocknet. Die Probe wurde dann in 100 µl Methanol gelöst, kurz zentrifugiert und der Überstand erneut transferiert. Das Methanol wurde unter Stickstoff entfernt, der Rückstand in 100 µM Ethylacetat aufgenommen und mit 900 µl Diazomethan für 10 min bei Raumtemperatur methyliert (Cohen, 1984). Die Probe wurde mit Stickstoff getrocknet und für die Messung mittels Gaschromatograph-Massenspektrometer (GC-MS) in 20 µl Ethylacetat aufgenommen. Von jeder Probe wurden unabhängig voneinander drei Extraktionen durchgeführt.

Die GC-MS Analyse erfolgte in dem Varian Saturn 2100 „Ion-Trap“ Massenspektrometer und dem Varian CP-3900 Gaschromatographen verbunden mit dem CP-8400 Autosampler (Varian, Walnut Creek, CA, USA). Die Ionisierungsstärke betrug 70 eV. Für die Analyse erfolgte die Injektion von 2,5 µl der methylierten Probe im „Splitless“ Modus (Splitöffnung 1:100 nach 1 min) auf eine Phenomenex ZB-5 Säule (30 m Länge; 0,25 mm Durchmesser; 0,25 µm Schichtdicke). Als Trägergas diente Helium bei einer konstanten Flussrate von 1 ml/min. Die Temperatur des Injektors betrug 250°C. Das Temperaturprogramm der GC-Säule sah folgendermaßen aus: Nach der Injektion wurde die Anfangstemperatur von 70°C für 1 min gehalten, danach erfolgte eine Erhöhung mit einer Rate von 20°C/min auf eine Temperatur von 280°C, die für 5 min konstant gehalten wurde. Der Proben wurden bei einer Temperatur von 280°C vom Gaschromatographen in das Massenspektrometer transferiert. Die Retentionszeit für die ABA im Gaschromatographen unter diesen Bedingungen betrug 12,6 min. Für eine höhere Sensitivität wurde der µSIS-Modus zur Analyse der Ionenmassen 162/166 und 190/194 verwendet. Das Massenspektrometer wurde bei einem Elektron-Multiplier-Offset von 200 V, einem Emissionsstrom von 30 µA und einer Temperatur der Ionenfalle von 200°C betrieben. Die Scangeschwindigkeit betrug 0,6 s/scan.

Zur Bestimmung der Konzentration wurde der ABA-Peak für die Ionenmassen 190 und 194 integriert und die erhaltenen Werte in die Isotopenverdünnungsgleichung zur Berechnung der ABA-Menge in Nanogramm pro Gramm Wurzelfrischgewicht eingesetzt:

$$\frac{\left( \left( \frac{190 + 194}{194} \right) - 1 \right) \times (d_6 - \text{ABA} [\text{ng}])}{\text{Frischgewicht} [\text{g}]} = \text{ABA} [\text{ng}] / \text{Frischgewicht} [\text{g}]$$

## 2.21 Extraktion von RNA aus Pflanzenwurzeln

Vom Substrat gereinigte *M. truncatula* Wurzeln wurden unter Zugabe flüssigen Stickstoffs in einem Mörser gemahlen. Für jede Extraktion wurde ca. 100 mg frisches Wurzelmaterial eingesetzt. Total-RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen (Hilden) nach Anleitung des Herstellers isoliert und mit DNase I von unerwünschter DNA gereinigt. Qualität und Quantität konnten mit dem Lab Chip-System RNA 600 Nano Kit im Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Böblingen) und der entsprechenden Software gemessen werden. Nach Zugabe von 20 U RNasin (Promega, Mannheim) wurde die RNA bei -80°C gelagert.

## 2.22 Northern Hybridisierung

5 µg total-RNA wurden in einem formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt und über Kapillarkräfte auf Hybond™ N<sup>+</sup> Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Nach dem RNA-Transfer wurden die Membranen in Methylenblau gefärbt und in RNase-freiem Wasser gewaschen. Nach Bestätigung gleicher Mengen RNA auf der Membran wurde die Färbung mit 1% (w/v) SDS, 1× SSC wieder entfernt. Mittels PCR wurden die DNA-Fragmente mit Digoxigenin nach Anleitung des Herstellers markiert (Roche Diagnostics, Mannheim) und unter Standardbedingungen an die Membranen hybridisiert (Sambrook et al., 1989).

## 2.23 cDNA-Synthese

Zur Herstellung von cDNA dienen je nach Verwendungszweck zwei unterschiedliche Protokolle. Für die Synthese von cDNA-Sonden wurde der SMART™ PCR cDNA

Synthesis Kit von BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) verwendet, während cDNA-Material für genspezifische PCRs durch „einfache“ reverse Transkription hergestellt wurde.

### 2.23.1 SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit

Wie vom Hersteller empfohlen, wurden 0,2-1 µg RNA in die cDNA-Synthese mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit eingesetzt. Die sscDNA diente als Ausgangsmaterial für die Synthese von Fluoreszenz- und radioaktiv-markierten Sonden.

### 2.23.2 Reverse Transkription mit SuperScript™ II RT

In die Reaktion wurden etwa 1-5 µg RNA eingesetzt und nach Anleitung von Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe) mit der SuperScript™ II RT in sscDNA umgeschrieben.

## 2.24 Herstellung und Bearbeitung von *P. sativum* Makroarrays

### 2.24.1 Herstellung der Makroarrays

Nach der Präparation und Reinigung der Plasmide aus einer subtraktiven Bank wurden die Genfragmente mit M13-Oligonukleotiden amplifiziert und je ~5 ng der erhaltenen PCR-Produkte mit einem Roboter (Flexy Gridder & Replicator, Genomic Solutions, Ann Arbor, MI, USA) an zwei unterschiedlichen Positionen auf Hybond™ N<sup>+</sup> Membranen (Amersham Biosciences, Freiburg) getropft. Durch UV-Strahlen wurde die DNA kovalent auf der Membran gebunden. Die technische Durchführung übernahm Dr. Anke Becker an der Universität Bielefeld.

### 2.24.2 Synthese radioaktiver Sonden

Die von L. Lapopin aus *P. sativum* gereinigte total-RNA bzw. polyA-RNA wurde für die Synthese von dscDNA mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) eingesetzt.

Die Markierung der cDNA mit [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP (50 µCi, Hartmann Analytic, Braunschweig) wurde mit dem Advantage PCR Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) durchgeführt. In die Reaktion wurden 2 µl cDNA, 2 µl 10 µM SMART PCR Primer und 5 µl dNTPs (2 mM dGTP, dCTP, dTTP; 0,2 mM dATP) eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten in dem Personal Cycler von Biometra (Göttingen) unter folgen-

den Bedingungen: Denaturierung für 1 min bei 95°C, 25 Zyklen (15 s bei 94°C, 30 s bei 65°C und 6 min bei 68°C) und einer abschließenden Elongationsphase von 6 min bei 68°C.

Die Entfernung freier Nukleotide erfolgte über S-300 spin columns (Mobitec, Göttingen). Die Einbaurate von [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP wurde mittels des Szintillationszählers LS 5600 Multi Purpose Scintillation Counter (Beckmann, München) ermittelt.

### 2.24.3 Hybridisierung

Die Hybridisierungen sowie die stringenten Waschschrte erfolgten entsprechend dem Protokoll für Digoxigenin-Sonden von Roche Diagnostics (Mannheim).

### 2.24.4 Datenanalyse

Die Signale auf den Membranen wurden mit dem Phosphor Imager Storm™ 860 (Molecular Dynamics/Amersham Biosciences, Freiburg) und der entsprechenden Software Scanner Control Version 4.1 mit einer Auflösung von 50 Micron aufgenommen. Die Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mit dem Programm ImageQuant™ Version 5.2. Nach der Hintergrundkorrektur („Object Average“) wurde mit der „Volume“-Quantifizierungsmethode die Signalintensität für jeden Spot berechnet. Qualitätskontrolle und Normalisierung der Daten wurden in Microsoft® Excel vorgenommen. Berücksichtigt wurden nur die Signale, deren Intensitäten zweifach über dem Hintergrund lagen und in der internen Kontrolle einen maximal 50%igen Unterschied zeigten.

## 2.25 Herstellung und Bearbeitung von *M. truncatula* cDNA-Arrays

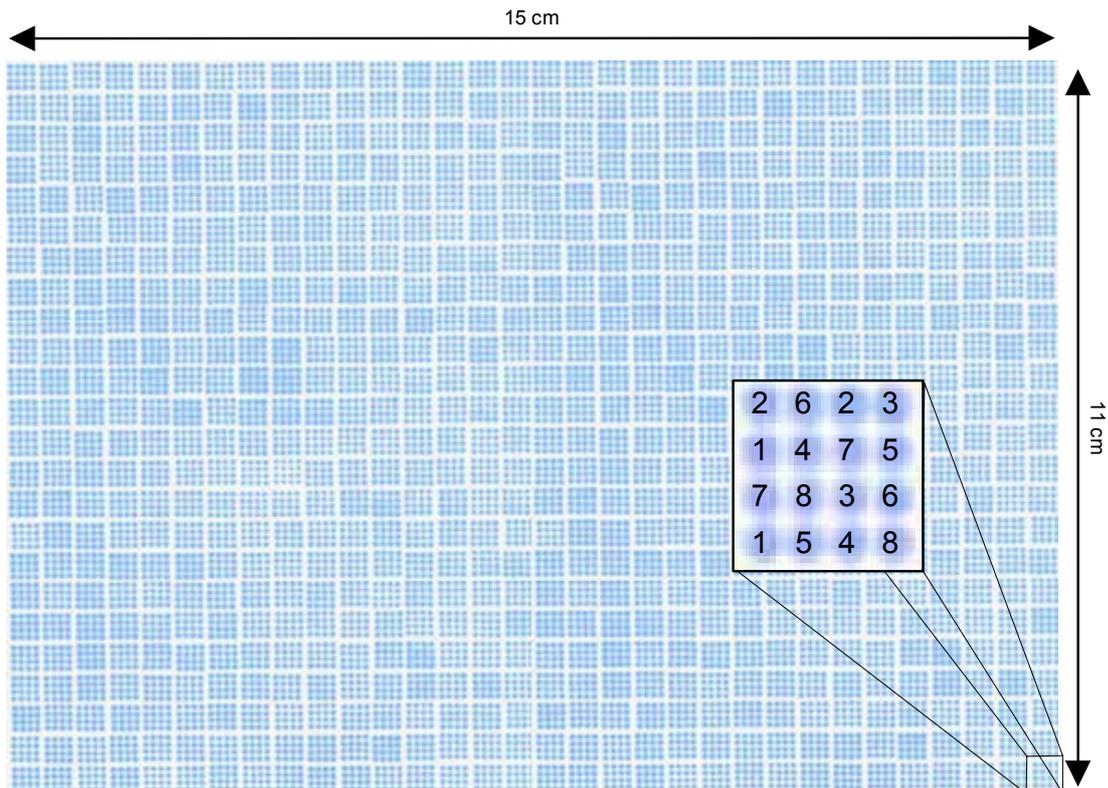
### 2.25.1 Herstellung der cDNA-Arrays

#### **Makroarrays**

Die Mt6k-RIT (*M. truncatula* 6k Root Interaction Transcriptome) Makroarrays enthalten 5648 PCR Fragmente, die eine Auswahl von Wurzel-exprimierten Genen repräsentieren. Diese wurden von Plasmiden aus verschiedenen cDNA-Banken (Journet et al., 2002) mit M13-Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend gereinigt. PCR-Produkte (100-200 ng/ $\mu$ l) und Oligonukleotide (25  $\mu$ M) wurden in 50% (v/v) DMSO gelöst, mit dem MicroGrid II 600 (384 Spitzen, BioRobotics, Huntingdon, UK) auf Ny-

Ion Membranen (Macherey & Nagel, Düren) getropft und für zwei Stunden bei 80°C auf der Oberfläche fixiert. Zur Kontrolle der Membranen wurde die Probe mit Bromphenolblau (1 mg/l) visualisiert. Dem Auftropfschema (Abbildung 2-1) kann man entnehmen, dass jeder Klon als interne Kontrolle zweimal auf dem Array vorhanden ist.

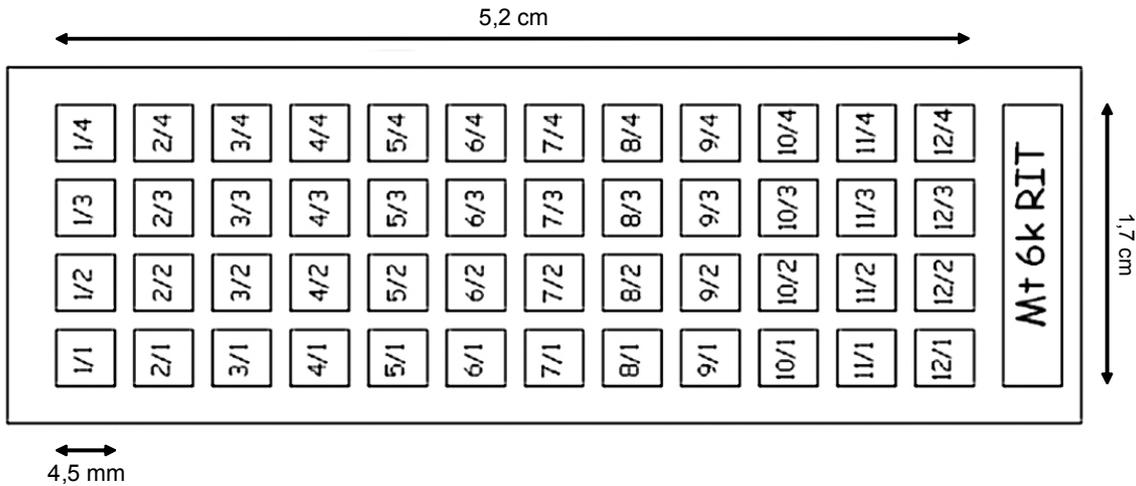
**Abbildung 2-1 Layout des Makroarrays.** Der Makroarray besteht aus 24×32 Blöcken mit jeweils zwei Replikaten von acht unterschiedlichen DNA-Fragmenten. Die Nummerierung gibt die Position der Fragmente innerhalb eines Blocks an.



### Mikroarrays

Der 6k-RIT Mikroarray enthält dieselben 5648 PCR Fragmente wie der Makroarray. Jedes cDNA-Fragment (ca. 250 pg) wurde in drei Replikaten auf einen 3-Aminopropyltrimethoxysilan-beschichteten Glasträger mit dem MicroGrid II 6000 (BioRobotics, Huntingdon, UK) aufgebracht. Die DNA wurde durch eine 3-stündige Inkubation bei 80°C kovalent auf dem Glasträger fixiert. Ungebundene DNA wurde durch Waschen in 0,1% (w/v) SDS (42°C, 2 min) und zweimal in destilliertem Wasser (20°C, 2 min) entfernt. Nach einer 3-minütigen Denaturierung der DNA in kochendem Wasser wurden die Glasträger für 10 s in Ethanol getaucht und durch Zentrifugation (3 min, 185×g, 20°C) getrocknet. Die Lagerung erfolgte im Trockenen bei 4°C.

**Abbildung 2-2 Layout des Mikroarrays.** Der Mikroarray besteht aus 48 Blöcken mit jeweils 24×24 Spots (insgesamt 576 Spots pro Block). Da jedes PCR-Fragment als Triplikat vorhanden ist, beträgt die Summe aller Spots 27.684.



## 2.25.2 Synthese der cDNA-Sonden

### Radioaktiv-markierte Sonden

Die Erststrangsynthese der cDNA erfolgte mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA). In die radioaktive Markierungsreaktion wurden 2 µl sscDNA, 1 µl 10 µM SMART PCR Primer, 5 µl dNTPs (2 mM dGTP, dCTP und dTTP; 0,2 mM dATP) und 50 µCi [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP (Hartmann Analytic, Braunschweig) in einem Gesamtvolumen von 50 µl zusammen mit dem Advantage 2 PCR Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) verwendet. Die PCR wurde im Personal Cycler (Biometra, Göttingen) mit dem folgenden Programm durchgeführt: Denaturierung für 1 min bei 95°C, 35 Zyklen (15 s bei 94°C, 30 s bei 65°C und 6 min bei 68°C) und einer abschließenden Elongationsphase von 6 min bei 68°C. Nach der Entfernung freier Nukleotide über S-300 spin columns (Mobitec, Göttingen) wurde die Einbaurrate von [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP mit dem Szintillationszähler LS 5600 Multi Purpose Scintillation Counter (Beckmann, München) bestimmt.

### Fluoreszenz-markierte Sonden

Die PCR-Amplifizierung zur Herstellung Fluoreszenz-markierter cDNA-Sonden wurde analog zur radioaktiven Sondenmarkierung durchgeführt. Statt des  $\beta$ -Strahlers [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATPs wurden jedoch Aminoallyl-dUTPs (aa-dUTP, Sigma, Taufkirchen) in die Reaktion eingesetzt, an deren Aminogruppen durch eine Veresterung die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt wurden. Die Reaktion erfolgte mit 0,7 µl dNTPs (25 mM

dATP, dCTP und dGTP; 8 mM dTTP; 17 mM aa-dUTP), 2 µl sscDNA, 1 µl 10 µM SMART PCR Primer, dem Advantage 2 PCR Kit (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) und den entsprechenden PCR-Bedingungen (16 oder 35 Zyklen). 45 µl PCR-Produkt wurden mit 465 µl Wasser gemischt und mit Microcon-30 Filter von der Firma Millipore (Eschborn) gereinigt. Der komplette Ansatz wurde durch Zentrifugation (12000 rpm, 8 min, 20°C) in einer Biofuge pico (Heraeus, Hanau) und zweimal Waschen mit 450 µl Wasser über die Microcon-30 Filter gereinigt. Die DNA wurde in einem 20 µl Volumen von den Filtern eluiert, für 1 min im kochenden Wasserbad denaturiert, auf Eis abgekühlt und kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA vorsichtig mit 1 µl 1 M Natriumbikarbonat (pH 9,0) gemischt und an Cy3- und Cy5-NHS Moleküle gekoppelt. Zur Vorbereitung der Fluoreszenzfarbstoffe wurden Cy<sup>TM</sup>3 Monofunctional Reactive Dye und Cy<sup>TM</sup>5 Monofunctional Reactive Dye (Amersham Biosciences, Freiburg) in 20 µl Atlas Glass Approved DMSO (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA) resuspendiert, in 2 µl aliquotiert und in einer Speed Vac (Heto, Allerød, Dänemark) wieder einrotiert. Zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe wurde die Aliquotierung sowie alle nachfolgenden Arbeiten bei verminderter Lichtintensität durchgeführt. Die Sonden wurden mit den entsprechenden Farbstoffen gemischt und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Freie Aminogruppen wurden durch die Zugabe von 4,5 µl 4 M Hydroxylamins und einer Inkubationszeit von 15 min im Dunkeln geblockt.

Vor der Reinigung der Fluoreszenz-gekoppelten Sonden mit dem Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) wurden die Cy3-Sonden mit 49 µl Wasser und den entsprechenden Cy5-Sonden gemischt. Die Sonden wurden mit 2× 30 µl Wasser von den Säulen eluiert. Die Überprüfung des Einbaus beider Fluoreszenzfarbstoffe in die cDNA erfolgte durch die Auftrennung von 2 µl jeder Probe im 0,8%igen (w/v) Agarosegel und dem Scannen im Typhoon<sup>TM</sup> 9400 Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Freiburg) bei 633 nm für Cy5 und 532 nm bei Cy3. Um während des Scannvorganges den störenden Einfluss des Bromphenolblaus zu vermeiden, wurden die Proben mit 4 µl 44%igen (v/v) Glycerin ohne Farbstoff elektrophoretisch aufgetrennt.

### 2.25.3 Hybridisierung

#### **Mikroarrays**

Die Prähybridisierung der Mikroarrays erfolgte für eine Stunde in 42°C warmen Easy-Hyb™ Hybridisierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) und 5 µg/ml Ultraschall-behandeltes Salmon Sperm DNA. Anschließend wurden die Mikroarrays mit MilliQ Wasser (20°C, 1 min) gewaschen, in Ethanol (20°C, 10 s) getaucht und durch Zentrifugation (185×g, 20°C, 3 min) getrocknet. Die Hybridisierung erfolgte in der ASP Hybridisierungsstation (Amersham Biosciences, Freiburg). Nach der Reduktion des Probenvolumens in einer Speed Vac von 58 µl auf 20-25 µl wurde die Sonde mit 250 µl EasyHyb™ Hybridisierungslösung (Roche Diagnostics, Mannheim) sowie 15 µg Ultraschall-behandelte Salmon Sperm DNA gemischt und kurz vor der Injektion in die Hybridisierungskammer 5 min bei 65°C denaturiert. Nach der Hybridisierung (42°C, 15 Stunden) erfolgte eine Waschung einmal in 2× SSC, 0,2% (w/v) SDS (42°C, 1 min), zweimal in 0,2× SSC, 0,1% (w/v) SDS (20°C, 1 min), zweimal in 0,2× SSC (20°C, 1 min) und einmal in 0,1× SSC (20°C, 1 min). Die Glassträger wurden durch Zentrifugation (20°C, 185×g, 3 min) getrocknet und mit dem ScanArray 4000 (Perkin Elmer, Fremont, CA, USA) mit einer Pixelgröße von 10 µm im Cy3- und Cy5-Kanal gescannt. Cy5-Moleküle besitzen eine größere Sensitivität gegenüber den Lasern des ScanArray 4000, als Cy3-Moleküle. Um ein vorzeitiges Ausbleichen des Farbstoffes durch Scannen der Cy3-Sonden vorzubeugen, wurden die Arrays zuerst im Cy5-Kanal gescannt.

#### **Makroarrays**

Die Hybridisierungen sowie die stringenten Waschschrte erfolgten entsprechend dem Protokoll für Digoxigenin-Sonden von Roche Diagnostics (Mannheim).

### 2.25.4 Datenanalyse

#### **Mikroarrays**

Spotdetektion, Bildsegmentierung und die Bildquantifikation erfolgte mit der Software ImaGene 5.0 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA). Die mittlere Pixelintensität der Signale und der lokalen Hintergründe wurden im Cy3- und dem Cy5-Kanal für jeden Spot auf dem Mikroarray berechnet. Während der Bildbearbeitung wurden die

Spots, die in beiden Kanälen einen R-Wert von  $R \leq 1,0$  besaßen, herausgefiltert. Dabei ist R definiert als die Differenz zwischen der mittleren Intensität der Signalpixel und der mittleren Intensität der lokalen Hintergrundpixel dividiert durch die Standardabweichung der lokalen Hintergrundpixel. Zusätzlich blieben die Spots unberücksichtigt, deren Qualität durch Scan- oder Hybridisierungsartefakte beeinträchtigt wurde. Anschließend erfolgte die Importierung der Daten in die Mikroarray-Analyse-Software EMMA 1.0 (<http://www.genetik.uni-bielefeld.de/EMMA>). Mit diesem Computerprogramm wurde die Normalisierung der Daten sowie die Berechnung der M-Werte (Expressionsverhältnisse) und der A-Werte (durchschnittliche Signalintensität) vorgenommen (Dondrup et al., 2003).

Die Signalintensität ( $I_{Cy5_i}$  und  $I_{Cy3_i}$ ) und die Intensität des lokalen Hintergrundes ( $Bg_{Cy5_i}$  oder  $Bg_{Cy3_i}$ ) wurden von jedem Spot im Cy3- sowie im Cy5-Kanal gemessen und voneinander subtrahiert:

$$R_i = I_{Cy5_i} - Bg_{Cy5_i} \quad \text{und} \quad G_i = I_{Cy3_i} - Bg_{Cy3_i}$$

Anschließend wurde für jeden Spot das logarithmische Verhältnis zur Basis 2 der Intensitätsverhältnisse berechnet:

$$M_i = \log_2 \frac{R_i}{G_i}$$

Die Berechnung der mittleren Signalintensität eines Spots erfolgte durch die Formel:

$$A_i = \log_2 \sqrt{R_i \times G_i}$$

Zur Normalisierung der Daten wurde die Lowess-Funktion verwendet (Yang et al., 2002). Dieser Algorithmus ist eine lokal gewichtete Regressionsfunktion aus der Programmiersprache R, die lokal lineare Approximationen eines Scatter-Plots erzeugt. Dadurch werden intensitätsabhängige Verzerrungen der M-Werte kompensiert, die durch die Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe entstehen. Die normalisierten M-Werte für den i-ten Klon wurden folgendermaßen berechnet:

$$M_i = \log_2 \frac{R_i}{G_i} \rightarrow \log_2 \frac{R_i}{G_i} - c(A) = \log_2 \frac{R_i}{kG_i}$$

wobei  $c(A)$  die Lowess-Funktion ist, deren Parameter aus der Verteilung der M- und A-Werte aller Messungen des Experiments bestimmt wurden.

Um Berechnungen im Falle negativer  $R_i$ - oder  $G_i$ -Werte mit dem Logarithmus zur Basis 2 zu ermöglichen und um Schwankungen zu reduzieren, die durch eine niedrige Signalintensität bedingt sein können, wurde ein Schwellenwert („Floor Value“) von 20 vor der Datennormalisierung eingeführt. Dies hatte zur Folge, dass alle Werte unterhalb des Schwellenwertes gleich 20 gesetzt wurden.

Nach der Normalisierung wurden signifikant hoch- oder herunterregulierte Gene durch einen t-Test identifiziert (Dudoit et al., 2002). Mindestens 50% der technischen Replikate eines Klons mussten hier ein Signal zeigen und wurden als differentiell exprimiert angesehen, wenn  $p \leq 0,05$  und  $M \geq 0,9$  bzw.  $M \leq -0,9$  war. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls in EMMA 1.0, alle weiteren Arbeiten wurden in Microsoft® Excel durchgeführt.

### **Makroarrays**

Nach der Exposition (Molecular Dynamics Storage Phosphor Screen) wurden die Membranen mit dem Phosphor Imager Storm™ 860 (Molecular Dynamics/Amersham Biosciences, Freiburg) sowie der entsprechenden Software Scanner Control Version 4.1 mit einer Auflösung von 50 Micron eingescannt. Im Gegensatz zur Bearbeitung der Mikroarrays wurden in ImaGene 5.0 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA) die Spots mit Signalintensität  $R \leq 1,0$  und qualitativ minderwertige Spots nicht markiert, so dass sie nach der Normalisierung mit EMMA 1.0 (Dondrup et al., 2003) manuell entfernt werden mussten. Aus technischen Gründen ist eine Hintergrund- und eine „Floor“-Korrektur mit EMMA 1.0 nicht möglich. Nach der Lowess-Normalisierung erfolgte die statistische Auswertung, wie bereits für die Mikroarrays beschrieben. Allerdings wurden nur die Gene berücksichtigt, die ein Signal in allen technischen Replikaten hatten.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Transkriptom-Analysen in *Medicago truncatula*

Um transkriptionelle Veränderungen unter verschiedenen Bedingungen in Wurzeln von *M. truncatula* zu untersuchen, wurden an der Universität Bielefeld unter der Leitung von Dr. Helge Küster und Dr. Anke Becker cDNA-Arrays entwickelt, die ein umfangreiches Transkriptom der Wurzel repräsentieren. Die Entwicklung dieser so genannten Mt6k-RIT Arrays basiert auf einer Sammlung von 6359 EST Cluster (MtC), welche aus 21473 5' und 3' ESTs zusammengesetzt wurden und deren Sequenzen mit den entsprechenden Annotierungen im Internet zur Verfügung stehen (<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/EST>). Die ESTs stammen aus cDNA-Banken, zu deren Generation *M. truncatula* unter stickstofflimitierten Bedingungen (MtBA), mit Knöllchenbakterien (MtBB) sowie mit Mykorrhizapilzen (MtBC) angezogen wurde (Journet et al., 2002). Von Teilnehmern des European Union Genome Project MEDICAGO (<http://medicago.toulouse.inra.fr/EU>) sind zusätzlich einige cDNA-Fragmente auf dem Array enthalten, die ebenfalls aus *M. truncatula* Wurzelinteraktionen stammen. Aus Klonen dieser cDNA-Banken konnten 5648 unterschiedliche Fragmente über PCR amplifiziert und auf Nylonmembranen als Makroarrays oder auf Glasträgern als Mikroarrays zur Verfügung gestellt werden. Jedes PCR-Fragment liegt auf dem Makroarray als Duplikat bzw. auf dem Mikroarray als Triplikat vor.

Zur Identifizierung Mykorrhiza-spezifisch regulierter Gene wurde die Leguminose *M. truncatula* mit den AM Pilzen *Glomus mosseae*, *Glomus intraradices* oder *Gigaspora rosea* inokuliert und unter Phosphat-limitierten Bedingungen angezogen. Aufgrund einer Kontamination des *G. rosea* Inokulums mit Knöllchenbakterien wurden die mykorrhizierten Pflanzen sowie die entsprechenden Kontrollen zusätzlich mit den Knöllchen-induzierenden Bakterium *Sinorhizobium meliloti* infiziert, um differentielle Genexpression, bedingt durch die Mykorrhizasymbiose, eindeutig zuzuordnen. Nach mehrwöchigem Wachstum wurden die Wurzeln geerntet und der Grad der Mykorrhizierung durch Trypanblaufärbung des pilzlichen Gewebes abgeschätzt (Tabelle 3-1). Die unterschiedlichen Wachstumsperioden begründen sich durch die Aggressivität mit der Mykorrhizapilze die Wirtspflanze besiedeln. *G. rosea* zum Beispiel benötigt für einen vergleichbaren Mykorrhizierungsgrad länger als *G. intraradices*. Zur Si-

mulation indirekter Mykorrhizaeffekte im pflanzlichen Symbiosepartner bedingt durch verbesserte Phosphatversorgung und durch erhöhte Phytohormonkonzentrationen während der Wechselwirkung wurden in weiteren Ansätzen nach vierwöchigem Wachstum die *Medicago*-Pflanzen für zwei Tage mit Abscisinsäure (ABA) bzw. für vier Stunden mit Indol-3-Buttersäure (IBA) behandelt oder unter verschiedenen Phosphatbedingungen kultiviert. Mit Ausnahme von *G. mosseae* wurden die Inokulierungen sowie die Behandlungen der Pflanzen in unabhängigen Ansätzen (biologische Replikate) wiederholt.

**Tabelle 3-1 Mykorrhizierungsparameter.**

	Alter (Wochen)	F (%)	M (%)	m (%)	A (%)	a (%)
<i>G. mosseae</i>	5	52	-	-	-	-
<i>G. intraradices</i>	3	100	81	81	66	81
	4	30	-	-	-	-
<i>G. rosea</i>	6	70	37	53	30	80
	6	68	41	60	34	82

Aus allen Ansätzen wurde total-RNA extrahiert, die der Synthese radioaktiv- oder Fluoreszenz-markierte Sonden diente (Tabelle 3-2). Aus jedem biologischen Ansatz wurden zwei cDNA-Sonden als technische Replikate zur Hybridisierung der Arrays synthetisiert. Für die Mikroarrays wurde die cDNA des eigentlichen Experiments an den gelb-fluoreszierenden Cy3-Farbstoff und die entsprechende cDNA der Kontrolle an den orange-fluoreszierenden Cy5-Farbstoff gekoppelt. Experiment- und Kontroll-Sonden wurden miteinander kombiniert, an einen 6k-RIT Mikroarray hybridisiert und die Signale anschließend mit einem Scanner aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit dem von der Universität Bielefeld entworfenen Programm EMMA 1.0 (**EST Meets Microarray**). Für die Hybridisierung von Makroarrays wurde zur Minimierung störender Interferenzen benachbarter Signale das schwächer strahlende [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP statt des [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP in die Sonden eingebaut. Radioaktive Sonden wurden jeweils mit einem 6k-RIT Makroarray hybridisiert. Die gescannten Bilder der Array-Hybridisierungen wurden mit dem Bilderkennungsprogramm ImaGene 5.0 sowie mit dem Programm EMMA 1.0 bearbeitet. Im Prozess dieser Bearbeitung wurden die Daten der technischen Replikate miteinander kombiniert, während die biologischen Replikate aufgrund ihrer relativ starken Unterschiede im Transkriptionsprofil getrennt betrachtet werden mussten.

**Tabelle 3-2 Fluoreszenz- und radioaktiv-markierte cDNA-Sonden zur Hybridisierung an 6k-RIT Mikro- bzw. Makroarrays.** In verschiedenen Ansätzen wurden *M. truncatula* mit den drei Mykorrhizapilzen *G. mosseae*, *G. intraradices* oder *G. rosea* inokuliert sowie mit Phytohormonen (ABA bzw. IBA) oder Phosphat behandelt. Total-RNA aus den Wurzeln dieser Pflanzen wurde zur Synthese von cDNA-Sonden verwendet. Für jeden biologischen Ansatz ist die Anzahl der durchgeführten Hybridisierungen angegeben.

Radioaktive Sonden		Replikate	
		biologische	technische
<i>G. mosseae</i>	Kontrolle	1	1
<i>G. intraradices</i>	Kontrolle	1	1

Fluoreszenz-Sonden		Replikate	
Cy3-Farbstoff	Cy5-Farbstoff	biologische	technische
<i>G. mosseae</i>	Kontrolle	1	2
<i>G. intraradices</i>	Kontrolle	2	je 2
<i>G. rosea</i> *	Kontrolle*	2	je 2
Phosphat	Kontrolle	2	2 und 1
ABA	Kontrolle	2	je 2
IBA	Kontrolle	2	je 2

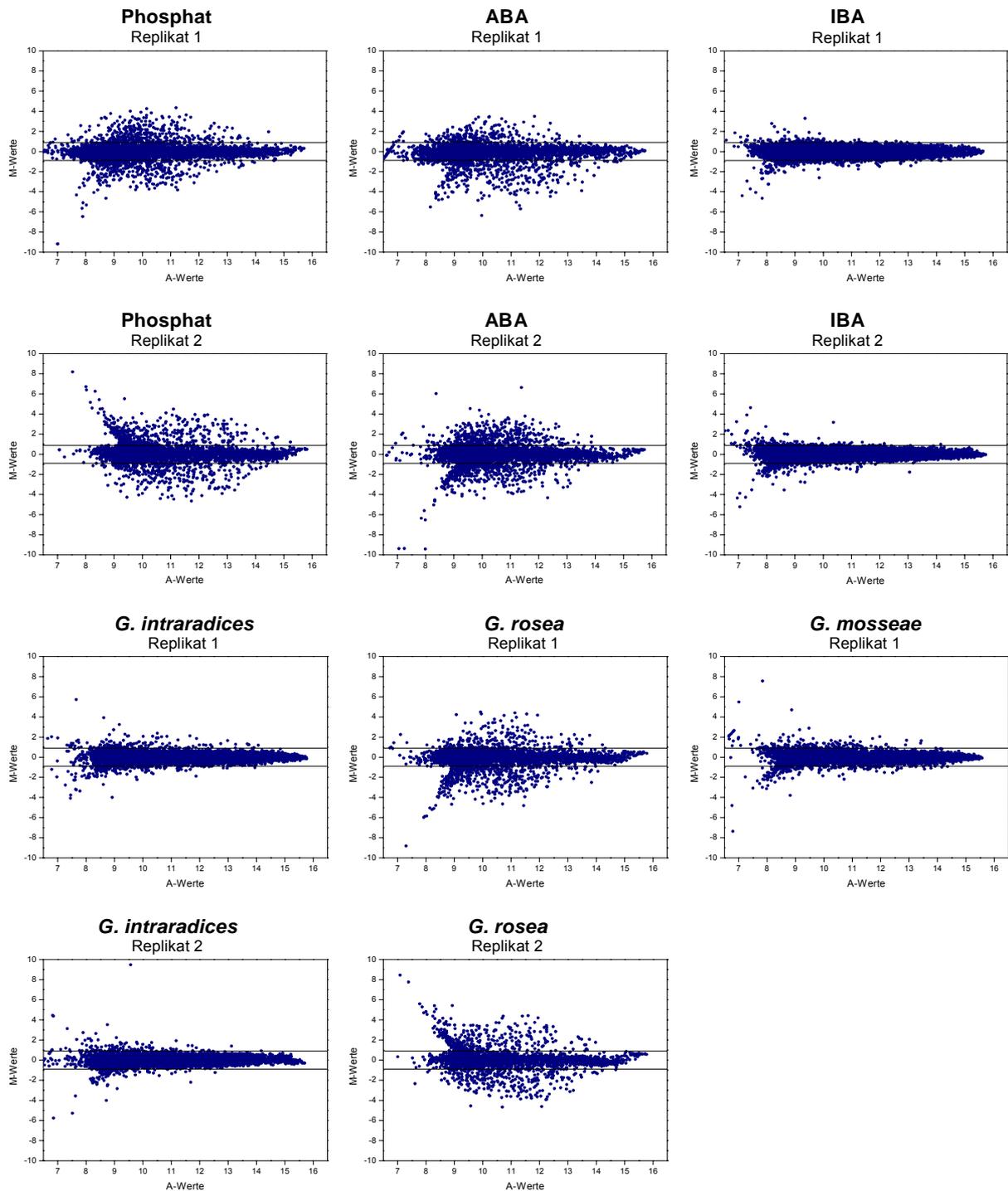
\* Pflanzen mit Knöllchenbildung

Eine häufig beobachtete Eigenschaft von Array-Daten ist die durchgehende Abhängigkeit der  $\log_2$ -Intensitätsverhältnisse (M) zur mittleren Spotintensität (A) beider Fluoreszenzen innerhalb eines Experiments. Diese Abhängigkeit kann in einem Scatter-Plot (M/A-Plot) graphisch dargestellt werden. Unter der Annahme, dass die meisten Gene nicht differentiell exprimiert werden und eine Regulation der Gene symmetrisch erfolgt (d.h. es gibt ungefähr eine gleiche Anzahl hoch- und runterregulierter Gene), sollte die Signalintensität der meisten Gene in einer horizontalen Linie akkumulieren. Aufgrund des systemischen Effekts zeigt die Verteilung der Datenpunkte jedoch eine Verzerrung. Eine Normalisierung der Daten ist daher zwingend notwendig und erfolgt mit der Lowess-Funktion, die systemische Abweichungen detektiert und korrigiert (Abbildung 3-1).

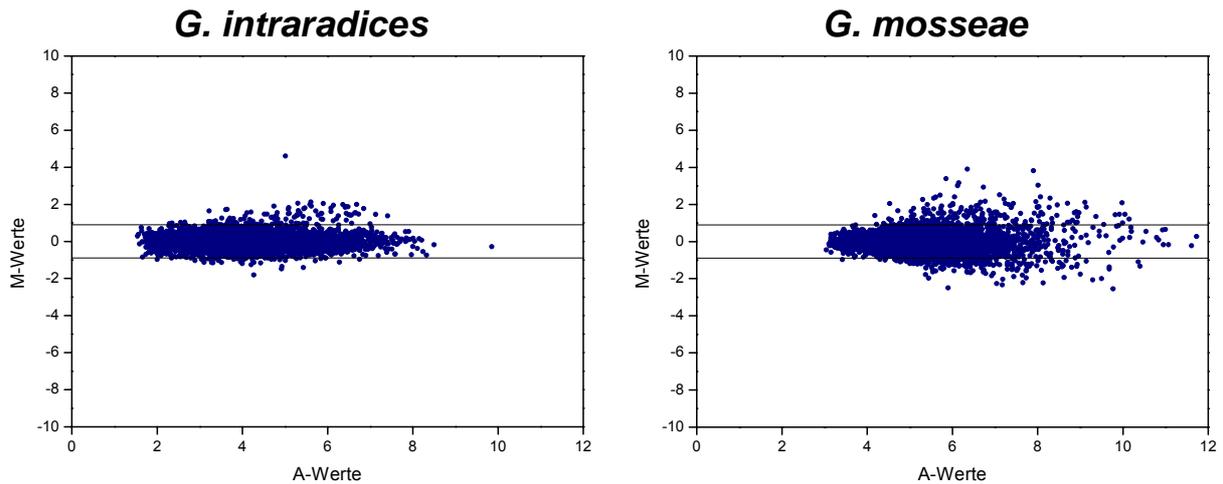
Zur Identifizierung signifikanter Signale wurden t-Tests (Dudoit et al., 2002) durchgeführt, um die Spots mit einem p-Wert  $p \leq 0,05$  auszuwählen. Zusätzlich mussten in jedem biologischen Replikat 50% der Spots pro Gen ein Signal zeigen. Für Makroarrays erhöhte sich dieser Wert sogar auf 100%. Gene mit einem mindestens 1,9-

## Ergebnisse

fachen ( $M \geq 0,9$  oder  $M \leq -0,9$ ) Expressionsunterschied wurden als reguliert betrachtet.



**Abbildung 3-1 M/A-Plot der Mikroarray-Daten.** Nach Hybridisierung der Sonden an die cDNA-Mikroarrays erfolgte die Auswertung mit dem Programm EMMA 1.0. Alle Daten wurden nach Hintergrund- und „Floor“-Korrektur, Kombination der technischen Replikate, Lowess-Normalisierung und statistischer Auswertung ( $p \leq 0,05$ ) für jeden Ansatz in einem Diagramm zusammengefasst. Die Scatter-Plots zeigen  $\log_2$ -Intensitätsverhältnisse (M) aufgetragen gegen die mittlere Spotintensität (A). Differenziell exprimierte Gene werden durch Linien bei  $M \geq 0,9$  und  $M \leq -0,9$  von den unregulierten Genen abgegrenzt.



**Abbildung 3-2 M/A-Plot der Makroarrays.** Entsprechend der Bearbeitung der Mikroarrays erfolgte die der Makroarrays. Aus technischen Gründen musste hier auf eine Hintergrund- und „Floor“-Korrektur verzichtet werden. Die Scatter-Plots zeigen  $\log_2$ -Intensitätsverhältnisse (M) aufgetragen gegen die mittlere Spotintensität (A). Differenziell exprimierte Gene werden durch Linien bei  $M \geq 0,9$  und  $M \leq -0,9$  von den unregulierten Genen abgegrenzt.

M/A-Scatter-Plots sind eine nützliche Darstellungsweise der Hybridisierungsdaten, um Aussagen über die Qualität der Array-Experimente treffen zu können. Die Mehrheit der Gene liegt in einer horizontalen Linie und erscheinen somit als nicht differentiell exprimiert. Dem gegenüber steht ein sehr geringer Anteil regulierter Gene, der aus dieser Punkte-Wolke streut (Abbildung 3-1). Auffällig ist der Unterschied in der Datenverteilung der ‚*G. rosea*‘-, ‚Phosphat‘- und ‚ABA‘-Experimente gegenüber der von ‚*G. intraradices*‘, ‚*G. mosseae*‘ und ‚IBA‘. In den zuletzt genannten Experimenten ist die Menge regulierter Gene und die Regulationsstärke gegenüber den erst genannten wesentlich niedriger. Dennoch ist die Qualität ausreichend, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren (Tabelle 3-3). Die Gesamtzahl regulierter Gene für jedes Experiment summiert sich aus den biologischen Ansätzen, die sich wiederum aus den entsprechenden technischen Replikaten zusammensetzen. Die Summe der differentiell exprimierten Gene aus den biologischen Replikaten übersteigt die Gesamtzahl nur geringfügig, was bedeutet, dass die Transkriptionsprofile der biologischen Replikate relativ wenige Gemeinsamkeiten besitzen.

**Tabelle 3-3 Anzahl regulierter Gene aus Mikro- und Makroarray-Experimenten.** Für jedes biologische Replikat sowie für das jeweilige Experiment ist die Anzahl der differentiell exprimierten Gene angegeben.

Experiment	einzelne biol. Replikate	nicht redundante Summe
<i>G. mosseae</i>	141/265*	390
<i>G. rosea</i>	424/431	695
<i>G. intraradices</i>	99/66/46*	165
Phosphat	412/504	852
ABA	392/517	790
IBA	112/86	186

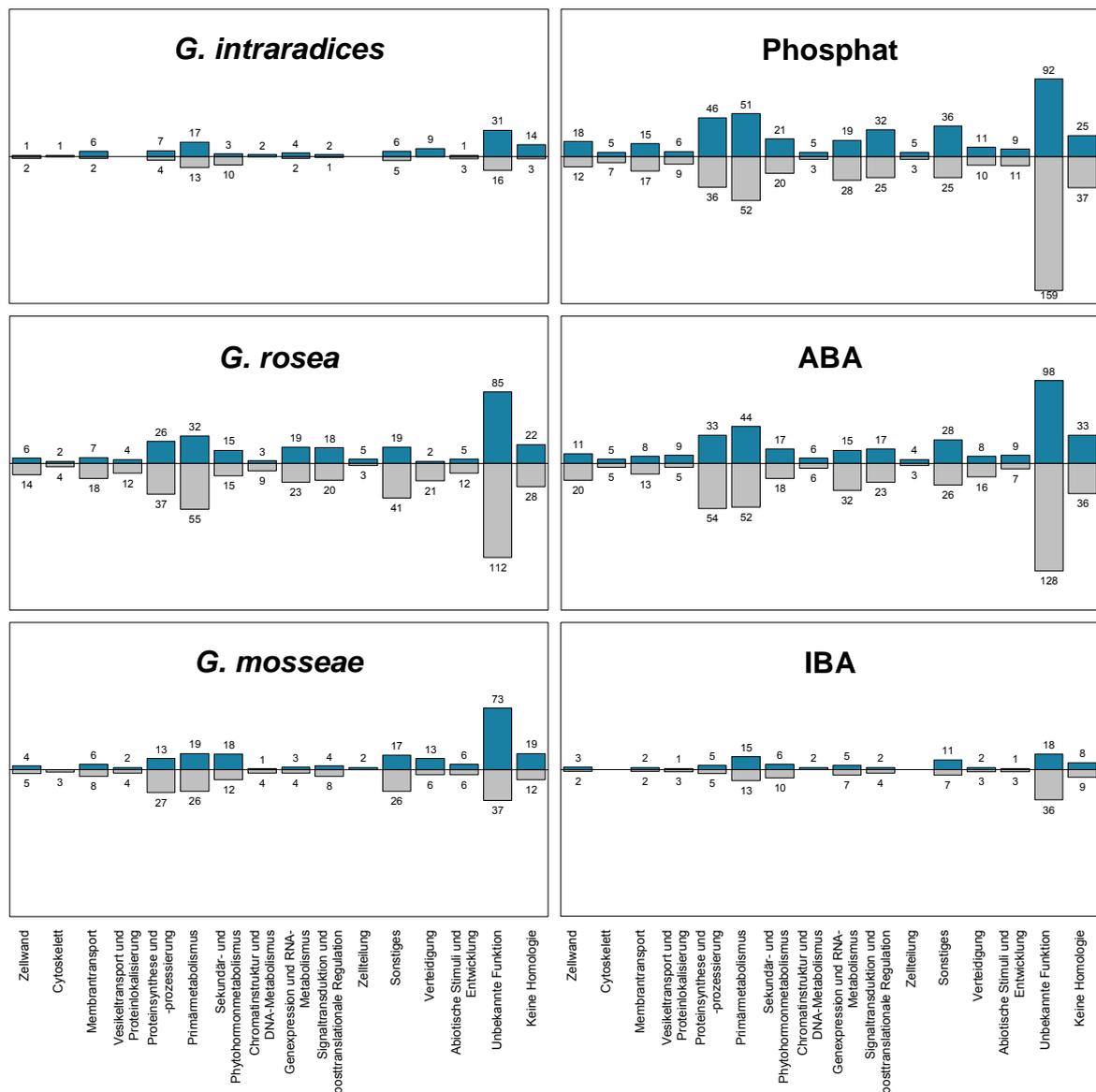
\* Anzahl regulierter Gene aus den Makroarray-Hybridisierungen

In Folge der funktionalen Annotation der möglicherweise kodierten Proteine wurden die Gen-Cluster des 6k-RIT Arrays in 16 Funktionsklassen eingeteilt (Journet et al., 2002). Zu den umfangreichen Kategorien zählen Primärmetabolismus, Proteinsynthese und -prozessierung sowie Gene ohne Homologie. Die jedoch größte Klasse bilden die cDNA-Cluster mit Sequenzhomologien zu Genen unbekannter Funktion. Diese Verteilung korreliert mit der Beobachtung, dass die meisten regulierten Gene aus den Array-Experimenten genau in diese Funktionsklassen fallen (Abbildung 3-3). Aussagekräftiger in Hinblick auf eine Beteiligung bestimmter Prozesse in der Mykorrhiza ist der prozentuale Anteil regulierter Gene pro Funktionsklasse (Abbildung 3-4). Auffällig ist in den Wechselwirkungen mit den beiden *Glomus*-Spezies die starke Induktion von Genen, die an pflanzlichen Abwehrprozessen (‚Verteidigung‘) beteiligt sind, während diese durch *G. rosea* eher reprimiert scheinen.

Ein effizientes Werkzeug zur Identifizierung von Genen, deren Expression direkt durch die Mykorrhiza, nicht aber durch sekundäre Effekte, wie erhöhte Phosphat-, ABA- oder IBA-Konzentration, beeinflusst werden, ist die Pivot-Tabelle aus dem Programm Microsoft® Excel. Diese Funktion bietet die Möglichkeit die Expression eines Gens in allen Array-Experimenten gleichzeitig zu betrachten und so Mykorrhiza-regulierte Gene, die in den Behandlungen mit ABA, IBA oder Phosphat ebenfalls reguliert werden, herauszufiltern (Abbildung 3-5). Insgesamt wurden von 743 Mykorrhiza-regulierten Genen 568 identifiziert, die keine regulatorischen Gemeinsamkeiten mit den ABA-, IBA- oder Phosphatbehandlung zeigten. Die Verteilung dieser Gene auf die unterschiedlichen Mykorrhizasymbiosen zeigt Abbildung 3-6. Differentielle Expression in mehr als einer Interaktion zeigten nur wenige Gene. Einen Expres-

## Ergebnisse

sionsunterschied in allen drei Symbiosen konnte hier nur für vier Gene ermittelt werden (Tabelle 3-4). Im Anhang dieser Arbeit befindet sich eine Liste dieser Gene mit einer Mykorrhiza-spezifischen Regulation, der Abbildung 3-6 entsprechend unterteilt. Der relative Expressionsunterschied ist für jedes biologische Replikat als  $\log_2$ -Intensitätsverhältnis angegeben. Da ein Drittel der cDNA-Fragmente auf dem Mt6k-RIT-Array aus einer Mykorrhiza cDNA-Bank (MtBC) stammen, ist es nicht überraschend, dass die meisten Mykorrhiza-regulierten Gene ebenfalls in dieser Bank zu finden sind.



**Abbildung 3-3 Anzahl regulierter Gene pro Funktionsklasse.** Nach Kombination der biologischen Replikate wurden hoch- und herunterregulierter Gene ( $M \geq 0,9$  und  $M \leq -0,9$ ) in Funktionsklassen eingeteilt.

# Ergebnisse

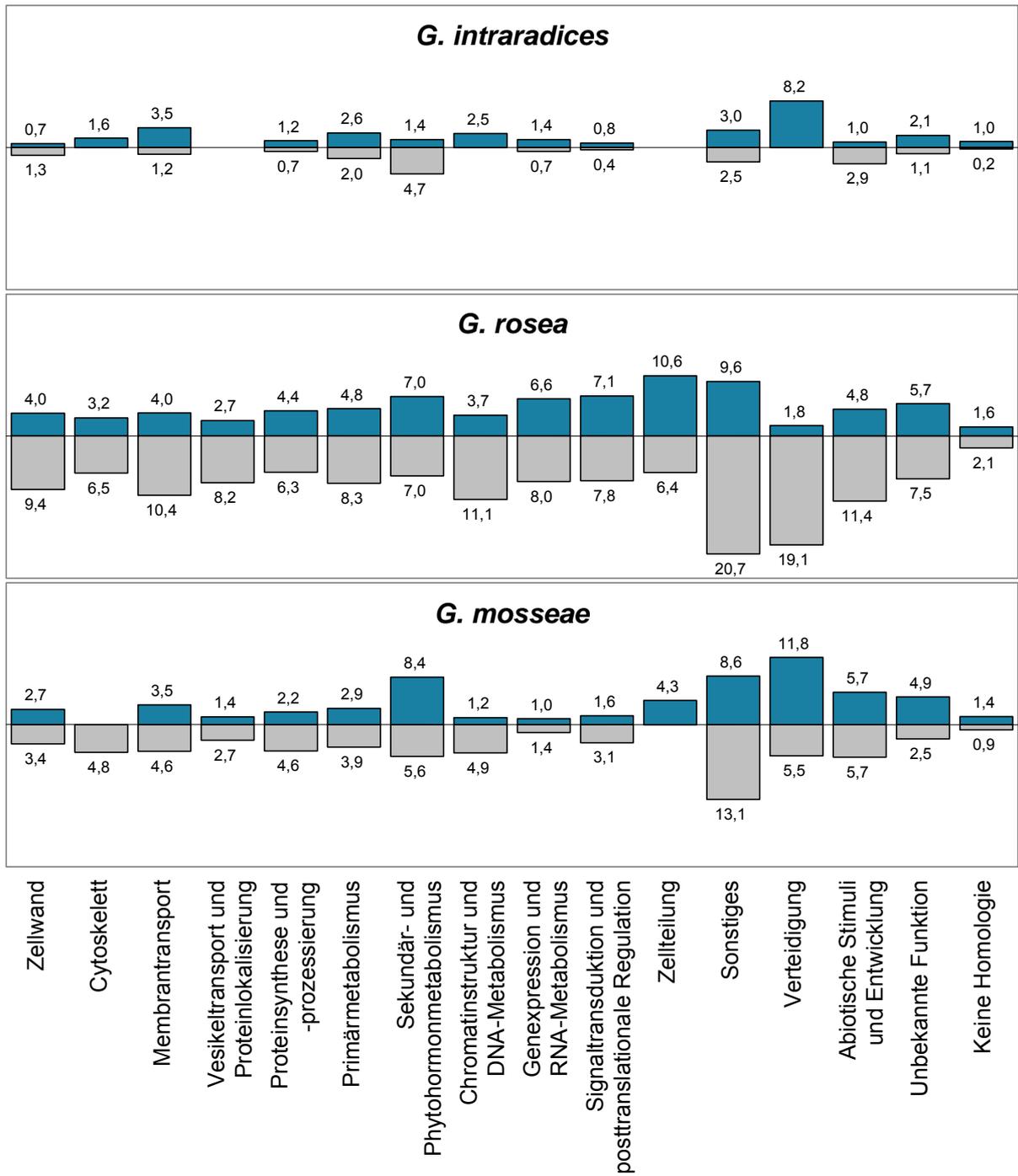
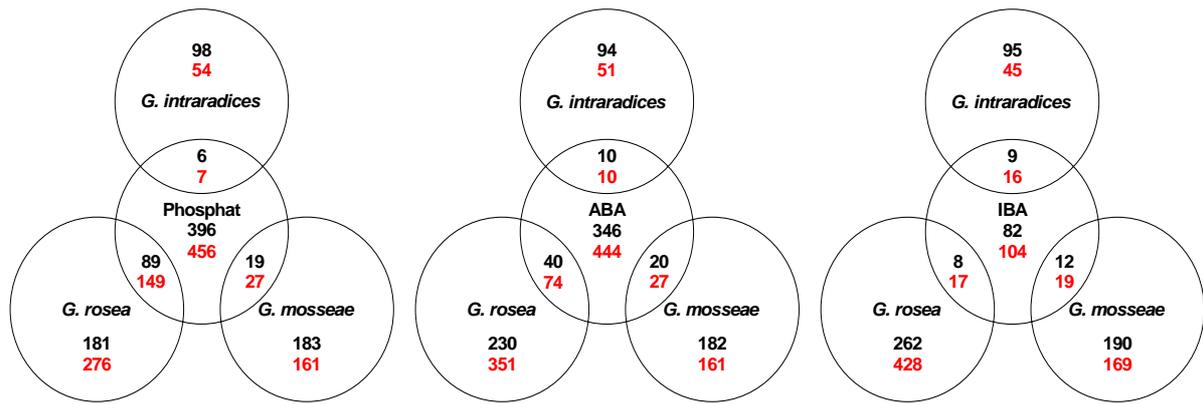


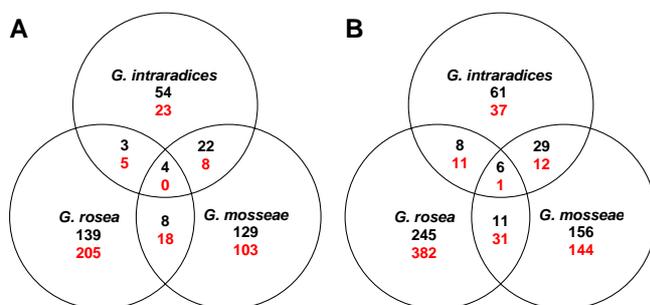
Abbildung 3-4 Prozentuale Anteil regulierter Gene pro Funktionsklasse.

## Ergebnisse



**Abbildung 3-5 Gemeinsam regulierte Gene.** Für die Experimente ‚Phosphat‘, ‚ABA‘ und ‚IBA‘ ist die Anzahl der Gene vermerkt, die nur in dieser Behandlung oder zusammen mit einer der drei Mykorrhizasymbiosen hoch- (schwarz) oder herunterreguliert (rot) werden.

cDNA-Arrays haben den Vorteil mit einem relativ einfachen experimentellen Aufwand zahlreiche Gene zu identifizieren, die für weitere Untersuchungen interessant erscheinen. Trotz verbesserter Techniken zur Herstellung, Bearbeitung und Auswertung der Arrays können in solchen Hochdurchsatzverfahren systembedingte Fehler auftreten, die aufgrund der großen Datenmenge unbemerkt bleiben. Beispielsweise können cDNA-Fragmente an mehrere Mitglieder einer Genfamilie oder an konservierte Sequenzbereiche anderer Gene hybridieren und so zu einem falschen Expressionsmuster führen. Diese so genannten Kreuzhybridisierungen können auch dann auftreten, wenn durch die RNA-Präparation aus Pflanzenwurzeln pilzliche RNAs mit einer hohen Sequenzhomologie zu pflanzlichen cDNAs, extrahiert werden. Daher ist eine Verifizierung interessanter Gene auf differentielle Genexpression mit alternativen Methoden, wie der Real-Time-PCR oder Northern Blot Hybridisierung, notwendig.



**Abbildung 3-6 Anzahl Mykorrhiza-regulierter Gene in Wurzeln von *M. truncatula*.** Gezeigt wird für die Interaktionen mit den AM Pilzen *G. intraradices*, *G. mosseae* oder *G. rosea* die Anzahl induzierter (schwarz) und reprimierter (rot) Gene exklusive (A) und inklusive (B) der Gene, die auch durch ABA, IBA oder Phosphat reguliert werden. Die einzelnen Mengen enthalten die Anzahl der Gene, die sich in ihrer Regulation von den anderen Interaktionen unterscheiden, während die Schnittmengen die Anzahl gemeinsam regulierten Gene präsentieren.

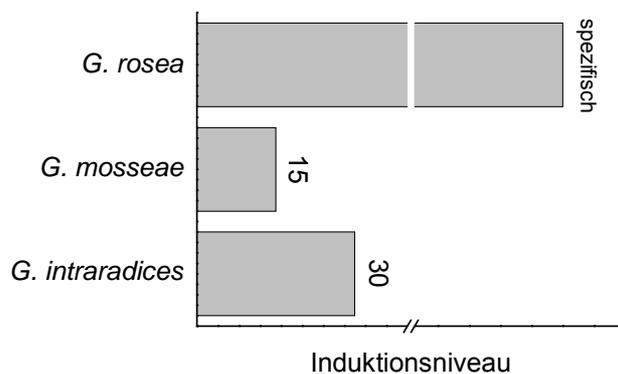
**Tabelle 3-4 Regulierte Gene in allen drei Mykorrhizasymbiosen.**

Cluster	Annotation	Funktionsklasse
00311MtBC	—	Unbekannte Funktion
30378MtBC	BLUE COPPER PROTEIN	Sonstiges
91940MtBC	BLUE COPPER PROTEIN PRECURSOR	Membrantransport
93285MtBC	—	Unbekannte Funktion

In einem Beispiel konnte über Real-Time-PCR der Expressionsanstieg des ‚blue copper protein precursor‘ (91940MtBC) bestätigt werden. Dieses Gen ist einer der vier Kandidaten, die ausschließlich in der Mykorrhiza reguliert werden (Tabelle 3-4). Das für die Array-Experimente ‚*G. rosea*‘, ‚*G. mosseae*‘ und ‚*G. intraradices*‘ verwendete cDNA-Material wurde in die PCR eingesetzt und ein 165 bp Fragment mit den Gen-spezifischen Oligonukleotiden MtBC43E05-for und MtBC43E05-rev amplifiziert. Als Referenz wurde das konstitutiv exprimierte Gen *MtTef-1 $\alpha$*  (Translation Elongation Factor 1 $\alpha$ , 158 bp Fragment) mit den Oligonukleotiden MtTef1 $\alpha$ -for und MtTef1 $\alpha$ -rev amplifiziert. Die nach der Methode von Pfaffl berechneten Induktionsniveaus zeigten, wie die Array-Experimente, einen Expressionsanstieg, der allerdings um ein vielfaches höher liegt.

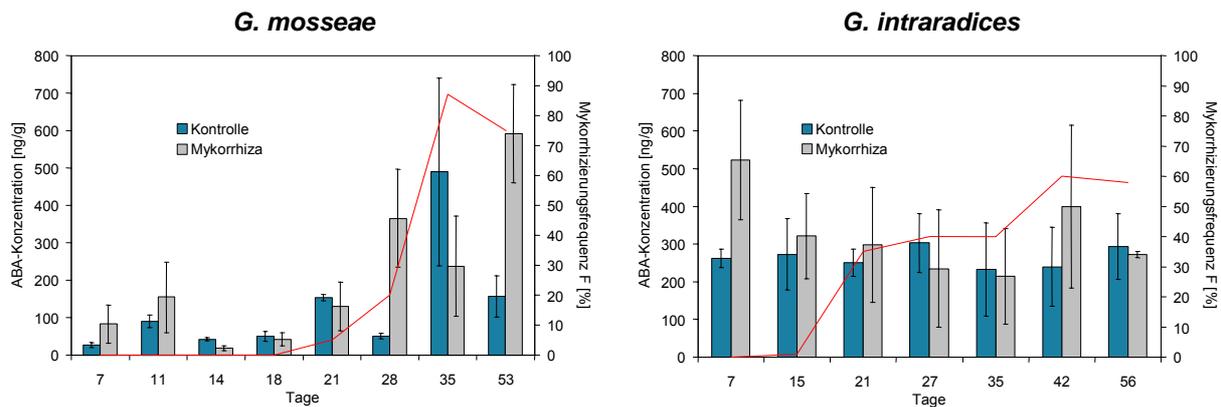
**Abbildung 3-7 Transkriptakkumulierung des ‚blue copper protein precursor‘ in verschiedenen Mykorrhizasymbiosen.**

cDNAs aus Wurzeln von *M. truncatula* inokuliert mit den drei AM Pilzen *G. mosseae*, *G. intraradices* oder *G. rosea* sowie entsprechenden Kontrollen wurden zur Amplifizierung des ‚blue copper protein precursor‘ in die Real-Time-PCR eingesetzt. Außerdem diente dieses cDNA-Material auch zur Amplifizierung des Referenzgens *MtTef-1 $\alpha$* . Die Berechnung der Induktionsniveaus erfolgte nach Pfaffl. Für das Experiment ‚*G. rosea*‘ konnte kein relativer Induktionswert bestimmt werden, da eine Amplifizierung des ‚blue copper protein precursor‘ aus der nicht mykorrhizierten Kontrolle unmöglich war.



### 3.2 Phytohormone in Wurzeln von *M. truncatula*

Wie in *Zea mays* gezeigt wurde, kann die Konzentration der Abscisinsäure (ABA), als Folge einer Kolonisierung der Wurzeln mit AM Pilzen ansteigen (Danneberg et al., 1993). Zum Nachweis eines Anstiegs in Wurzeln von *M. truncatula* erfolgte eine Kultivierung mit *G. intraradices* und *G. mosseae* sowie ohne einen Interaktionspartner. Die Wurzeln dieser Pflanzen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten geerntet, durch Färbung der Hyphen die Mykorrhizierungsfrequenz ermittelt und aus drei unabhängigen Proben ABA extrahiert. Die 35 Tage alten Pflanzen wurden in einem getrennten Ansatz kultiviert und zeigten eine Kontamination mit Knöllchenbakterien. Nach Extraktion und Präparation der ABA erfolgte die Messung in einem Gaschromatograph und Massenspektrometer (Abbildung 3-8).



**Abbildung 3-8 ABA-Konzentrationen in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln.** Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Wurzeln kolonisiert mit *G. mosseae* oder *G. intraradices* sowie entsprechende Kontrollen geerntet, Mykorrhizierungsfrequenz F (—) bestimmt und der Gehalt an ABA gemessen.

Eine Kolonisierung der Wurzeln durch die beiden AM Pilze konnte ca. drei Wochen nach der Inokulierung beobachtet werden. Ein Anstieg der ABA-Konzentration wurde in 28 und 53 Tage alten Wurzeln gemessen, die mit *G. mosseae* besiedelt waren. In den entsprechenden Kontrollen unterliegt der ABA-Spiegel relativ starken Schwankungen. In Folge einer Mykorrhizierung mit *G. intraradices* wurde kein signifikant erhöhter Phytohormonspiegel festgestellt. Nur in der präsymbiotischen Phase (7 Tage), ohne pilzliche Strukturen in der Wurzel, war ein relativ starker Anstieg zu verzeichnen. Auffallend ist der starke Unterschied zwischen den Kontrollen beider Experimente.

### 3.3 RNA-Akkumulierung im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung

Unter Verwendung eines besonderen Modellsystems wurden die molekularen Grundlagen im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung untersucht. Dazu wurden die Wurzeltranskriptome von *Pisum sativum* cv. Finale und der Mutante RisNod24 miteinander verglichen. Während der Wildtyp mit einem  $\text{nod}^+$  und einem  $\text{myc}^+$  Phänotyp Wurzelknöllchen und arbuskuläre Mykorrhiza ausbilden kann, hat die Mutante RisNod24 ( $\text{myc}^{2-}$ ,  $\text{nod}^+$ ,  $\text{fix}^-$ ) diese Fähigkeit verloren. Trotz erfolgreicher Besiedelung der mutierten Pflanzen kann in den Wurzelknöllchen weder Stickstoff fixiert noch in der Mykorrhiza funktionstüchtige Arbuskelstrukturen ausgebildet werden. Die Herstellung einer subtraktiven Bank (PsSSHarb<sup>-</sup>) von L. Lapopin erlaubte die Identifizierung von Genen mit einer erhöhten RNA-Akkumulierung während der Arbuskelentwicklung. 600 Klone waren in der Bank enthalten, von denen einige sequenziert und durch Homologiesuche in der EMBL-Datenbank (<http://www.ebi.ac.uk>) bereits identifizierten Genen zugeordnet werden konnten.

In einer früheren Arbeit wurden aus der subtraktiven Bank PsSSHarb<sup>-</sup> 81 Klone zur weiteren Analyse ausgewählt. Diese enthielten cDNA-Fragmente mit einer Länge von mindestens 300 bp. Die cDNA-Fragmente wurden PCR amplifiziert, auf Membranen fixiert und mit radioaktiv-markierter cDNA hybridisiert. Die entsprechende polyA-RNA für die Synthese der cDNA-Sonden wurde zuvor aus Kontrollwurzeln von *P. sativum* Wildtyp und der Mutante RisNod24 sowie aus Wurzeln dieser Linien, die mit dem AM Pilz *G. mosseae* inokuliert waren, extrahiert. Der Wildtyp (F=42%; A=19%) und die Mutante (F=23%; A=4%) wurden fünf Wochen nach Inokulierung geerntet. Nach dem Einbau von [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-dATP in die cDNA und Hybridisierung an die Membranen erfolgte die Auswertung mit dem Phosphor Imager und der Software ImageQuant™.

Neben der Untersuchung auf Mykorrhiza-regulierte Genexpression, wurde die Regulation auch in anderen pflanzlichen Interaktionen ermittelt. Dazu wurden der Wildtyp und die Mutante jeweils mit dem stickstofffixierenden Symbionten *Rhizobium leguminosarum* oder dem biotrophen Pathogen *Aphanomyces euteiches* inokuliert, die Wurzeln nach fünf Wochen Wachstum geerntet und die daraus extrahierte total-RNA zur Synthese von radioaktiven cDNA-Sonden verwendet (Grunwald, 2000).

## Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweite Hybridisierung mit cDNA-Sonden aus mykorrhizierten Wildtypwurzeln sowie der entsprechenden Kontrolle durchgeführt. Nach Subtraktion des Hintergrundes und Berechnung des arithmetischen Mittels erfolgte die Datennormalisierung. Im Gegensatz zu den Mt6k-RIT-Arrays erfolgte hier die Normalisierung mit dem Gen für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Klon 94), dessen konstitutive Genexpression gezeigt wurde (Abbildung 3-9). Nach einer stringenteren Auswertung der Daten konnten die Ergebnisse aus der ersten Hybridisierung weitestgehend bestätigt werden. Anschließend erfolgte die Kombination beider technischen Replikate. Für weitere Analysen und Diskussionen wurden nur die Klone berücksichtigt, die in der Mykorrhiza des Wildtyps ein mindestens 4,5-mal stärkeres Hybridisierungssignal zeigten als in der entsprechenden Wildtyp-Kontrolle (Tabelle 3-5).

**Tabelle 3-5 Mykorrhiza-regulierte Gene in *P. sativum*.** *P. sativum* Wildtyp und die Mutante RisNod24 wurden mit dem AM Pilz *G. mosseae* (Gm) und in einem weiteren Versuchsansatz mit *R. leguminosarum* (RI) bzw. *A. euteiches* (Ae) inokuliert. RNA aus Wurzeln dieser Ansätze sowie aus den entsprechenden Kontrollen diente zur Herstellung von cDNA-Sonden. Die Hybridisierungen dieser Sonden zeigten nach der Auswertung für 17 von 81 Klonen einen mindestens 4,5-fachen Expressionsunterschied zwischen dem mykorrhizierten Wildtyp und der Kontrolle.

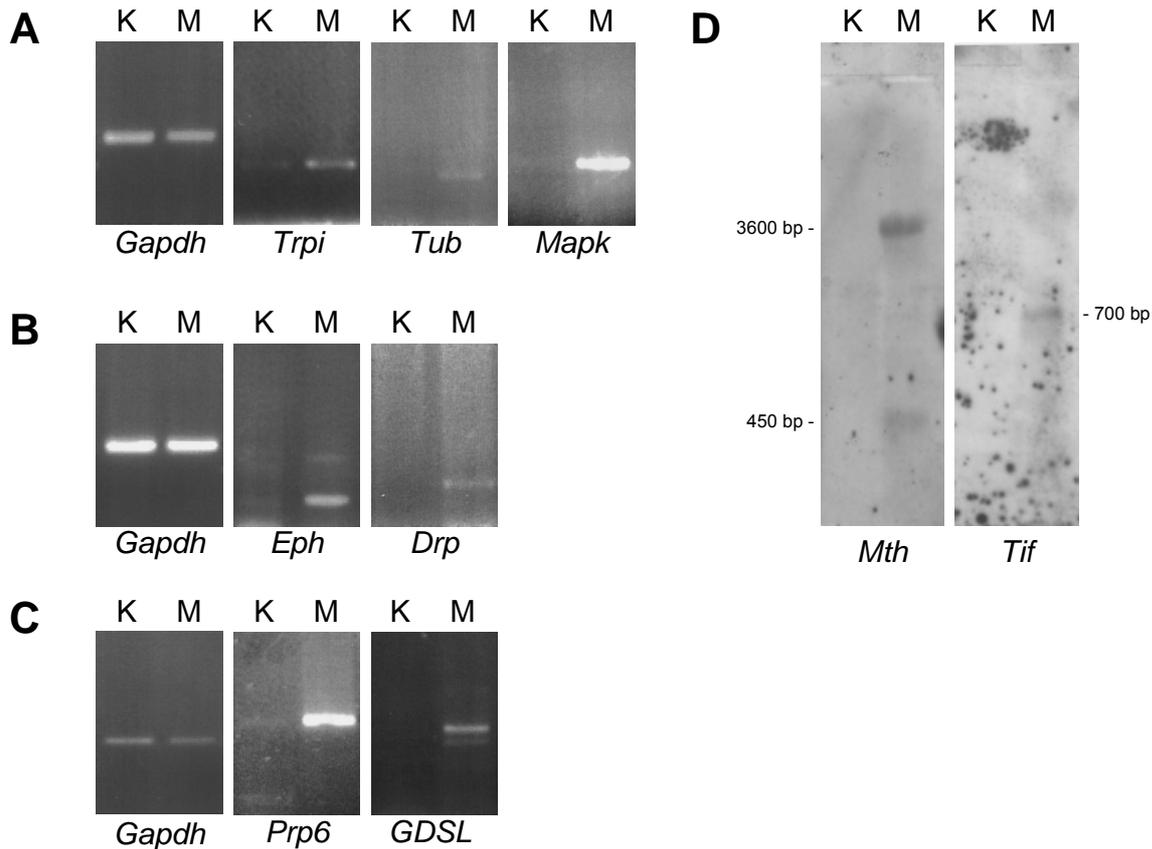
Klon	Homologie zu	<i>P. sativum</i> cv. Finale			<i>P. sativum</i> RisNod24		
		Gm	Ae	RI	Gm	Ae	RI
22	Metallothionein-like-protein <sup>4</sup>	<b>7,24</b>	1,44	0,83	0,79	7,40	0,39
33	No homology	<b>6,09</b>	1,16	1,07	0,83	1,15	1,41
73	NADH-ubiquinone-oxidoreductase <sup>3</sup>	<b>5,05</b>	1,00	1,05	1,19	0,94	1,13
81	GDSL-motif lipase	<b>8,28</b>	0,68	0,90	0,45	1,71	0,57
82	MAP kinase <sup>2</sup>	<b>10,22</b>	0,91	1,05	0,65	0,80	0,27
91	Disease resistance protein <sup>4</sup>	<b>15,42</b>	1,19	1,07	1,11	0,59	0,72
92	Translation initiation factor <sup>5</sup>	<b>5,86</b>	0,93	1,47	0,48	1,29	0,80
95	No homology	<b>5,25</b>	0,82	0,81	0,57	1,41	0,69
104	Trypsin inhibitor <sup>4</sup>	<b>5,08</b>	0,79	0,77	1,08	0,99	1,32
106	Putative protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<b>7,23</b>	1,97	3,34	0,97	0,64	0,60
112	$\beta$ -Tubulin <sup>1</sup>	<b>6,89</b>	1,15	-	0,49	1,42	0,86
117	Polyphosphate inositide bdg. protein	<b>10,63</b>	0,79	0,90	0,94	1,45	1,14
125	Deoxycytidilate deaminase <sup>3</sup>	<b>6,63</b>	1,80	-	1,19	1,96	3,02
126	Epoxide hydrolase <sup>4</sup>	<b>22,39</b>	0,77	0,80	1,07	2,38	1,14
128	PRP6, proteinase inhibitor <sup>4</sup>	<b>4,85</b>	1,57	1,39	<b>4,69</b>	2,18	1,87
171	Putative protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	<b>4,73</b>	0,87	0,43	0,12	3,30	2,17
190	No homology	<b>4,98</b>	0,71	1,50	4,02	1,03	2,66

<sup>1</sup> Cytoskelett, <sup>2</sup> Signaltransduktion, <sup>3</sup> Primärmetabolismus, <sup>4</sup> Stressantwort, <sup>5</sup> Translation

Von 81 untersuchten Genen zeigen 17 eine Transkriptakkumulierung in mykorrhizierten Wurzeln des *P. sativum* Wildtyps. Bis auf eine Ausnahme (PRP6, proteinase inhibitor) konnte in der Mutante RisNod24 kein Anstieg in der Genexpression ermittelt werden. Die Einteilung in Funktionsklassen verdeutlicht, dass der größte Teil der re-

gulierten Gene in der Stressantwort involviert ist. Das Metallothionein (Klon 22), als Mitglied dieser funktionellen Gruppe, zeigt zudem eine Expressionszunahme in der Mutante besiedelt mit dem Wurzelpathogen.

Entsprechend der *M. truncatula* 6k-RIT-Arrays besteht aus besagten Gründen auch bei dieser Hybridisierung die Möglichkeit falsche Induktionswerte zu erhalten. Daher sollte in einem weiteren Experiment die differentielle Expression einiger der Mykorrhiza-regulierten Gene, die gegenüber der Wildtypkontrolle eine 4,5-fache Induktion zeigten, bestätigt werden. Um Ergebnisse zu erhalten, die unabhängig vom Genotypen der Pflanzenlinie sind, wurde *P. sativum* cv. Frisson verwendet, eine Linie, die effektiver mit *G. mosseae* mykorrhiziert wird als das Kultivar Finale. Nach drei Wochen Wachstum wurde für Expressionsstudien total-RNA aus mykorrhizierten und Kontrollwurzeln (F=79%; A=52%) extrahiert. Durch Northern Blot Analysen konnten für das Metallothionein und den Translationinitiationsfaktor 1 $\alpha$  eine Mykorrhiza-induzierte Expression gezeigt werden (Abbildung 3-9 D). Die Gene, die im Northern Blot keine Signale zeigten, wurden durch RT-PCR mit variabler Zyklenzahl und zwei unterschiedlichen cDNA-Synthesetechniken amplifiziert (Abbildung 3-9 A-C). Auf diese Weise konnten für die meisten Gene eine erhöhte RNA-Akkumulierung in der Mykorrhiza bestätigt werden. Für das Gen des Polyphosphat-Inosit-bindenden Proteins konnte kein PCR-Produkt synthetisiert werden.



**Abbildung 3-9 RNA-Akkumulierung in *P. sativum* cv. Frisson.** RNA wurde sowohl aus mykorrhizierten (M) als auch aus Kontrollwurzeln (K) von *P. sativum* cv. Frisson extrahiert. 100 ng total-RNA wurde für die cDNA-Synthese mit dem SMART-System verwendet. Es erfolgte eine Amplifizierung mit 24 Zyklen (A) bzw. mit 27 Zyklen (B), die dann als Vorlage für genspezifische PCR eingesetzt wurde: 20 Zyklen (*Gapdh*), 30 Zyklen (*Trpi*: trypsin-inhibitor), 33 Zyklen (*Tub*:  $\beta$ -tubulin), 40 Zyklen (*Mapk*: MAP-kinase), 40 Zyklen (*Eph*: epoxide hydrolase; *Drp*: disease resistance protein). (C) Für die cDNA-Synthese mit der SuperScript™ II RT wurde 1  $\mu$ g total-RNA eingesetzt. Anschließend erfolgte eine genspezifische PCR mit 20 Zyklen (*Gapdh*: glycerinaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) und 40 Zyklen (*Prp6*: proteinase inhibitor; *GDSL*: GDSL-motif lipase). (D) In einer Northern Blot Analyse wurden die Digoxigenin-markierten cDNA-Fragmente von Klon 22 (*Mth*: metallothionein-like protein) und Klon 92 (*Tif*: translation initiation factor) an 5  $\mu$ g total-RNA hybridisiert.

Das Expressionsprofil ergab für 17 Gene aus *P. sativum* eine RNA-Akkumulierung im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung. Zur Untersuchung einer Mykorrhiza-abhängigen Regulation der entsprechenden Gene in *M. truncatula* wurde aus 35 Tage alten Wurzeln mit und ohne *G. mosseae* besiedelt (F=52%) RNA extrahiert, radioaktive cDNA-Sonden synthetisiert und an die Makroarrays hybridisiert. Nach zwei unabhängigen Hybridisierungen und Datenauswertung entsprechend der vorherigen Experimente zeigten nur der Trypsin-Inhibitor und das  $\beta$ -Tubulin einen signifikanten Expressionsanstieg (8,39 und 8,19). Außerdem wurde ein weiteres Metallothionein (Klon 13) identifiziert mit Regulation (11,78) in *M. truncatula*, aber nicht in *P. sativum*. Nach diesem relativ erfolglosen Versuch wurden Homologiesuchen in cDNA-

Datenbanken von *M. truncatula* durchgeführt, um weitere Hinweise auf eine Mykorrhiza-abhängige Regulation zu erhalten. Dazu wurden die Sequenzen der differentiell exprimierten Gene aus *P. sativum* mit WU-BLAST 2.0 gegen die Datenbanken TIGR MtGI – *Medicago truncatula* Gene Index (<http://www.tigr.org/tdb/tgi/MtGI/>) und MENS – *Medicago* EST Navigation System (<http://medicago.toulouse.inra.fr/Mt/EST/>) verglichen. Die ESTs in den beiden Datenbanken stammen aus cDNA-Banken, zu deren Herstellung *Medicago*-Pflanzen mit diversen Interaktionen und Behandlungen kultiviert wurden. Neben einzelnen ESTs enthalten MtGI und MENS Sequenz-Cluster (MtC, MtD oder TC), in denen mehrere ESTs zu einer Konsensussequenz zusammengesetzt wurden. Cluster, mit einer relativ hohen Sequenzhomologie (E-Wert  $< 5 \times 10^{-5}$ ) zu Mykorrhiza-regulierten Erbsengenen sind in Tabelle 3-6 aufgeführt. Bis auf zwei Ausnahmen (Klon 91 und 128) konnten für alle Erbsengene sowohl in MtGI als auch in MENS Sequenzen mit signifikanten Homologien in *M. truncatula* gefunden werden. Im so genannten „Electronic Northern“ wurden die ESTs, aus denen die einzelnen Cluster bestehen, hinsichtlich ihrer Herkunft aus den cDNA-Banken untersucht. Die Verteilung und Häufigkeit mit der ESTs eines Clusters in bestimmten cDNA-Banken zu finden sind, lieferten erste Hinweise auf eine Regulation der entsprechenden Gene.

Die meisten Erbsengene besitzen homologe Cluster in MtGI oder MENS mit mindestens einem EST aus einer Mykorrhiza cDNA-Bank. In einigen Fällen existieren außerdem homologe Sequenzen, die nicht Teil eines Clusters sind. Außer den Genen für die NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase und das Polyphosphat-Inosit-bindende Protein konnten für alle Erbsengene homologe Sequenzen identifiziert werden, die verglichen mit der entsprechenden Kontrolle eine erhöhte Anzahl ESTs in Mykorrhiza cDNA-Banken aufweisen. Tabelle 3-7 zeigt für die regulierten und die konstitutiven Gene aus der Erbse homologe *Medicago*-Sequenzen, die nur in der Mykorrhiza aber nicht in Kontrollen gefunden wurden.

## Ergebnisse

**Tabelle 3-6 Sequenzhomologien zwischen cDNAs aus *P. sativum* und *M. truncatula*.** Durch den Vergleich von ESTs Mykorrhiza-regulierter Erbsengene mit den Sequenzen in den cDNA-Datenbanken MtGI und MENS wurden in *Medicago* homologe Gene (E-Wert <  $5 \times 10^{-5}$ ) identifiziert. Die Anzahl (#) und der Anteil (‰) der ESTs für ein bestimmtes Gen aus Mykorrhiza (Myk) sowie aus Kontrollwurzel (Control) cDNA-Banken reflektiert mögliche Expressionsunterschiede. Die untersuchten cDNA-Banken enthalten Sequenzen aus *Medicago*-Wurzeln (MtRHE und MtNF-RT) sowie aus Interaktionen mit den AM Pilzen *Glomus versiforme* (MtMHAM) oder *G. intraradices* (MtAMP und MtBC). Bis auf zwei Ausnahmen bleibt die SSH-Bank *M. truncatula*/*G. intraradices* (MtGIM) unberücksichtigt, da durch die Technik der Subtraktion hier cDNAs Mykorrhiza-regulierter Gene überrepräsentiert sind.

Klon	Homologie zu	MtGI						MENS					
		ID	E-Wert	Myk		Control		ID	E-Wert	Myk		Control	
				#	‰	#	‰			#	‰	#	‰
22	Metallothionein	TC85312	5,5E-34	49	2,33	1	0,27	MtC00026	3,0E-38	36	2,29	0	0,00
		TC85314	2,4E-33	1	0,05	0	0,00	MtC00041.2	1,8E-34	7	0,45	0	0,00
		BQ143785	3,4E-27	0	0,00	0	0,00	MtC00041.1	3,4E-34				
		BQ144242	9,1E-27	0	0,00	0	0,00						
		TC85311	9,8E-27	55	2,61	0	0,00						
		BG450937	9,9E-27	0	0,00	0	0,00						
		AW774376	1,0E-26	0	0,00	0	0,00						
		BQ137654	1,4E-26	0	0,00	0	0,00						
		BQ157359	2,3E-21	0	0,00	0	0,00						
		33	Put. protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	TC79075	4,0E-23	0	0,00	0	0,00	MtD19366	1,7E-22	0	0,00
73	NADH-ubiquinone-oxidoreductase	TC87934	6,5E-61	1	0,05	1	0,27	MtC60711	6,6E-61	1	0,06	1	0,25
81	GDSL-motif lipase/acylhydrolase	BQ147594	1,2E-08	0	0,00	0	0,00	MtD26033	1,4E-08	0	0,00	0	0,00
		TC93514	2,3E-08	2	0,10	0	0,00	MtD22883	1,3E-05	0	0,00	0	0,00
82	MAP kinase	AJ498708	4,3E-06	0	0,00	0	0,00						
		TC78102	4,8E-42	0	0,00	1	0,27	MtC20049	2,7E-42	1	0,06	1	0,25
		CA918754	2,8E-15	0	0,00	0	0,00	MtD27467	2,9E-15	0	0,00	0	0,00
		AW687083	2,9E-15	0	0,00	1	0,27	MtC62884	3,0E-15	0	0,00	0	0,00
BG587296	1,9E-05	1	0,05	0	0,00	MtC63213	2,0E-05	1	0,06	0	0,00		
91	Disease resistance protein												
92	Translation initiation factor	TC90686	9,6E-37	1	0,05	0	0,00	MtC91383	1,9E-37	1	0,06	0	0,00
95	Ser/Thr protein phosphatase	TC87076	1,6E-32	3	0,14	0	0,00	MtC45669	7,1E-24	3	0,19	0	0,00
		TC87167	9,0E-16	0	0,00	0	0,00	MtC10421	7,0E-16	0	0,00	0	0,00
104	Trypsin inhibitor	TC86085	1,4E-28	11	0,52	0	0,00	MtC00162	1,5E-28	6	0,38	0	0,00
		TC86086	3,4E-27	10	0,48	0	0,00	MtC00422.3	2,5E-27	3	0,19	0	0,00
		AJ500060*	6,2E-27	1	0,59	0	0,00	MtC00422.1	2,5E-27	4	0,25	0	0,00
		TC91524	4,0E-21	3	0,14	0	0,00	MtC00422.2	2,6E-27	4	0,25	0	0,00
		AJ502095	5,5E-19	1	0,05	0	0,00	MtC91610	4,1E-21	2	0,13	0	0,00
		TC78015	6,9E-19	2	0,10	0	0,00	MtD23117	5,7E-19	1	0,06	0	0,00
								MtD06498	8,7E-19	2	0,13	0	0,00
106	Put. protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	TC82968*	1,3E-26	2	1,19	0	0,00	MtC92041	3,7E-18	1	0,06	0	0,00
		TC79755	4,4E-24	5	0,24	0	0,00	MtC30403	4,5E-24	3	0,19	0	0,00
112	$\beta$ -Tubulin	TC85408	8,9E-27	12	0,57	3	0,80	MtC00356.2	6,8E-27	7	0,45	3	0,76
117	Polyphosphate inosite-bdg. protein	TC88628	7,1E-51	0	0,00	0	0,00	MtC00356.1	7,5E-27	4	0,25	1	0,25
		TC92633	1,4E-09	0	0,00	0	0,00	MtD02011	7,0E-51	0	0,00	0	0,00
125	Deoxycytidilate deaminase							MtD27038	5,2E-43	0	0,00	0	0,00
		TC85919	1,8E-27	2	0,10	0	0,00	MtD19789	2,2E-09	0	0,00	0	0,00
		TC87887	9,3E-12	3	0,14	0	0,00	MtD00090	1,9E-27	2	0,13	0	0,00
								MtC90584	5,2E-27				
126	Epoxide hydrolase	AL388370	2,6E-31	1	0,05	0	0,00	MtC91189	9,7E-12	2	0,13	0	0,00
		TC88153	1,4E-30	1	0,05	0	0,00	MtC60727	1,5E-30	1	0,06	0	0,00
128	Proteinase inhibitor (PRP6)												
171	Put. protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	TC77032	2,1E-52	2	0,10	0	0,00	MtC10028	8,5E-53	2	0,13	0	0,00
		BE202624	1,2E-36	0	0,00	0	0,00						
190	No homology	TC76697	3,0E-15	25	1,19	1	0,27	MtC00044.1	3,0E-15				

\* ESTs nur in *M. truncatula*/*G. intraradices* SSH-Bank (MtGIM) vertreten

## Ergebnisse

**Tabelle 3-7 Sequenzen ausschließlich aus Mykorrhiza cDNA-Banken.** Die ESTs regulierter und konstitutiver Erbsengene wurden mit der MtGI und MENS Datenbank verglichen. Gezeigt sind homologe Gene aus *M. truncatula* mit ESTs ausschließlich aus den cDNA-Banken MtMHAM, MtAMP und MtBC.

Klon	Homologie zu	MtGI				MENS			
		ID	E-Wert	#	‰	ID	E-Wert	#	‰
39	No homology					MtBC18H09F1	3,5E-13	1	0,06
46	No homology					MtC92241	4,4E-11	1	0,06
77	Lectin precursor	TC87043	1,1E-07	3	0,14				
81	GDSL-motif lipase	TC93514	2,3E-08	2	0,10				
82	MAP kinase					MtC63213	2,0E-05	1	0,06
86	Auxin-repressed protein					MtC30279	2,0E-12	2	0,13
104	Trypsin inhibitor	TC86085	1,4E-28	11	0,52	MtC00162	1,5E-28	6	0,38
		TC91524	4,0E-21	3	0,14	MtC00422.3	2,5E-27	3	0,19
		TC78015	6,9E-19	2	0,10	MtC00422.2	2,6E-27	4	0,25
						MtC00422.1	2,5E-27	4	0,25
					MtC91610	4,1E-21	2	0,13	
					MtD23117	5,7E-19	1	0,06	
					MtD06498	8,7E-19	2	0,13	
					MtC92041	3,7E-18	1	0,06	
106	Putative protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	TC79755	4,4E-24	6	0,29	MtC30403	4,5E-24	3	0,19
115	No homology	TC81166	1,0E-36	1	0,05	MtD23310	1,7E-48	1	0,06
173	No homology	TC77276	6,7E-13	14	0,67	MtC00157	7,4E-13	5	0,32
199	No homology					MtC60852	5,0e-08	2	0,13
177	Histon H2A	TC83516	9,2E-32	2	0,10	MtC92211	8,8E-32	1	0,06
						MtC91531	1,2E-31	1	0,06
202	Putative protein ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )					MtC20272.1	2,1E-43	2	0,13

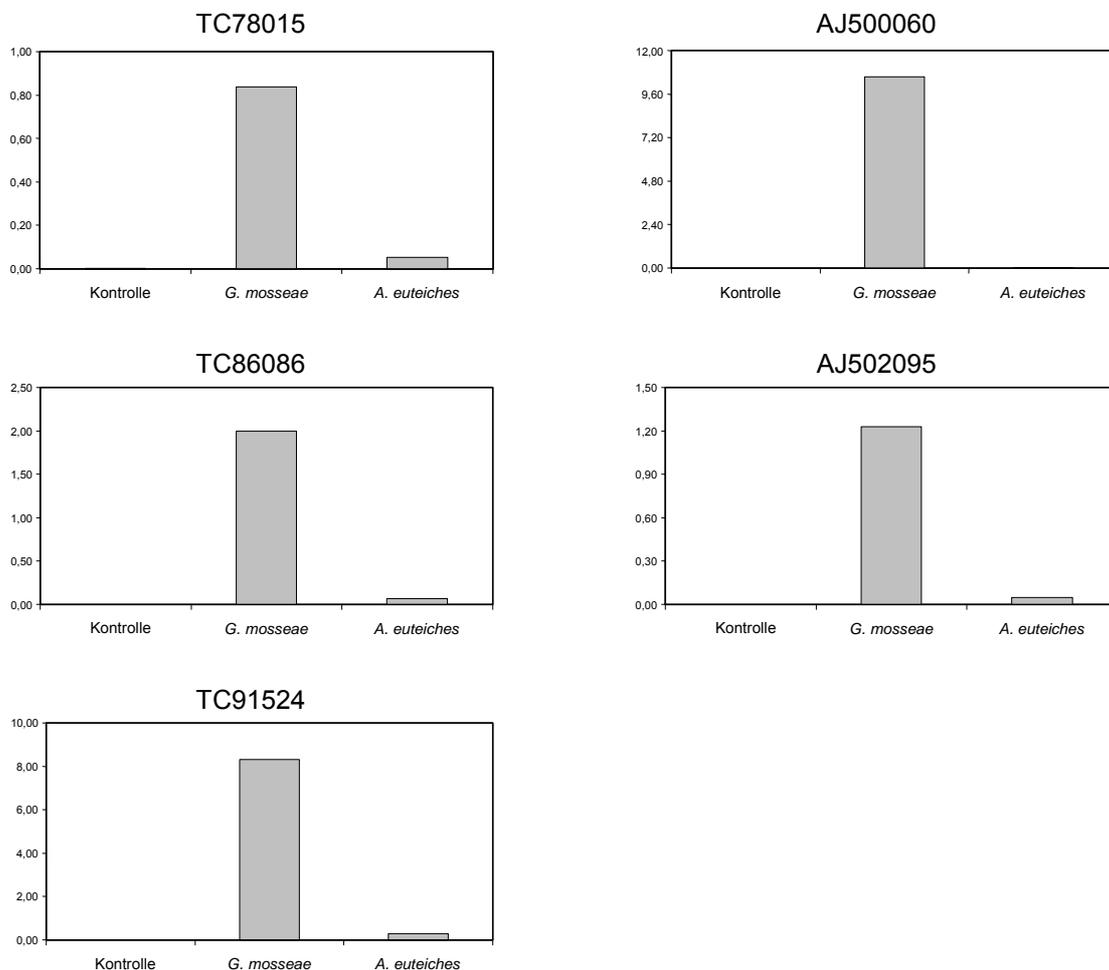
Die cDNA-Sequenzen, die der Entwicklung des Mt6k-RIT Arrays zu Grunde liegen sind auch in der MENS-Datenbank vertreten. Um weitere Hinweise auf differentielle Genexpression zu erhalten, wurden die Cluster mit Homologie zu den konstitutiven oder regulierten Genen der Erbse (Tabelle 3-6 und Tabelle 3-7) auf eine Regulation in den Array-Experimenten überprüft (Tabelle 3-8).

**Tabelle 3-8 Differentiell exprimierte Gene aus den Mt6k-RIT Array-Experimenten mit Homologie zu Mykorrhiza-regulierten Erbsengenen.** Die zu den Erbsengenen homologen Gene aus *M. truncatula* wurden nur in Mykorrhiza cDNA-Banken gefunden. Für jedes biologische Replikat ist die relative Expressionsänderung in log<sub>2</sub>-Intensitätsverhältnissen angegeben, die aufgrund von Array-Hybridisierungen ermittelt wurden.

Cluster	Annotation	<i>G. intraradices</i>	<i>G. mosseae</i>	<i>G. rosea</i>	Phosphat	ABA	IBA
00026MtBC	METALLOTHIONEIN			-1,13/-1,45	-0,99		
00041.2MtBC	METALLOTHIONEIN			-1,16/-1,14			
00157MtBC	NO HOMOLOGY	1,54					
00162MtBC	TRYPSIN INHIBITOR KUNITZ	1,33/1,77/1,65					
00422.1MtBC	PROTEASE INHIBITOR		3,01				
10028MtBA	UNKNOWN FUNCTION		-0,94			2,65	
30279MtBC	PUT. AUXIN-REPPRESSED PROTEIN						-0,91
91610MtBC	SUBTILISIN INHIBITOR	1,85/1,39	0,97				
92041MtBC	NO HOMOLOGY	1,50					

## Ergebnisse

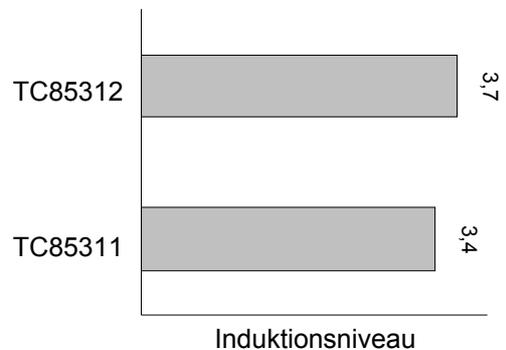
Interessanterweise wurden für Klon 104 (‘trypsin inhibitor’) in beiden Datenbanken eine relativ hohe Anzahl homologer Gene gefunden, deren ESTs vorwiegend aus Mykorrhiza cDNA-Banken stammen (Abbildung 3-9). Zur Bestätigung der vermuteten Genregulation in *M. truncatula* wurden, basierend auf den Sequenzen der MtGI Datenbank, spezifische Oligonukleotide abgeleitet und in einer Real-Time-PCR verwendet. Als Vorlage diente cDNA aus Wurzeln sowie aus Interaktionen mit *G. mosseae* (F=60%) oder *A. euteiches*. Durch die Methode der absoluten Quantifizierung wurden in jedem Experiment die Kopienzahlen für das Trypsin-Inhibitor-Gen und das Referenzgen *MtTef-1 $\alpha$*  bestimmt. Das relative Expressionsniveau wurde durch das Verhältnis der Kopienzahlen von Trypsin-Inhibitoren und Referenzgen berechnet (Abbildung 3-10).



**Abbildung 3-10 Graphische Darstellung relativer Expressionsniveaus von Trypsin-Inhibitor-Genen aus *M. truncatula*.** Ausgehend von Sequenzen der MtGI Datenbank wurden spezifische Oligonukleotide für fünf verschiedene Trypsin-Inhibitoren hergestellt. Aus *M. truncatula* Wurzeln sowie aus Interaktionen mit *G. mosseae* oder *A. euteiches* wurde RNA extrahiert, daraus cDNA synthetisiert und als Vorlage in eine Real-Time-PCR eingesetzt. Mit der absoluten Quantifizierungsmethode und unter Berücksichtigung des Referenzgen *MtTef-1 $\alpha$*  wurden relative Expressionslevels berechnet.

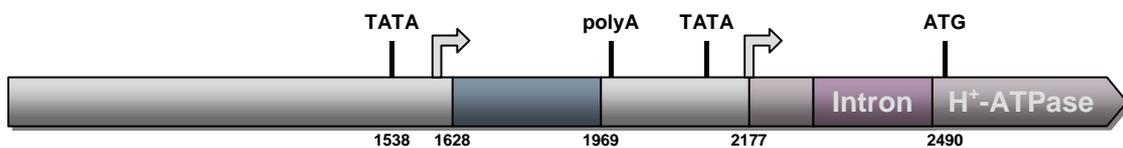
Das Mykorrhiza-regulierte Metallothionein-Gen (Klon 22) aus der Erbse zeigt für zwei homologe Sequenz-Cluster (TC85312 und TC85311) aus *M. truncatula* einen auffallend hohen EST-Anteil aus Mykorrhiza cDNA-Banken (Tabelle 3-6). Wie für die Trypsin-Inhibitor-Gene sollte auch hier differentielle Genexpression über Real-Time-PCR nachgewiesen werden. Zur Amplifizierung beider Metallothioneine sowie des Referenzgens *MtTef-1 $\alpha$*  wurden Sequenz-spezifische Oligonukleotide verwendet. Als Vorlage wurde cDNA aus *M. truncatula*/*G. mosseae* und der entsprechenden Kontrolle eingesetzt (Tabelle 3-1). Durch die relative Quantifizierung nach Pfaffl wurde der Expressionsanstieg zwischen Mykorrhiza- und Kontrollwurzeln berechnet (Abbildung 3-11).

**Abbildung 3-11 RNA-Akkumulierung von zwei Metallothionein-Genen in mykorrhizierten Wurzeln.** cDNAs aus Wurzeln von *M. truncatula* inokuliert mit dem AM Pilz *G. mosseae* sowie der entsprechenden Kontrollen wurden zur Amplifizierung der beiden Metallothioneine in die Real-Time-PCR eingesetzt. Außerdem diente dieses cDNA-Material auch zur Amplifizierung des Referenzgens *MtTef-1 $\alpha$* . Die Berechnung der Induktionsniveaus erfolgte nach Pfaffl.



### 3.4 Untersuchungen zur H<sup>+</sup>-ATPase *Mtha1*

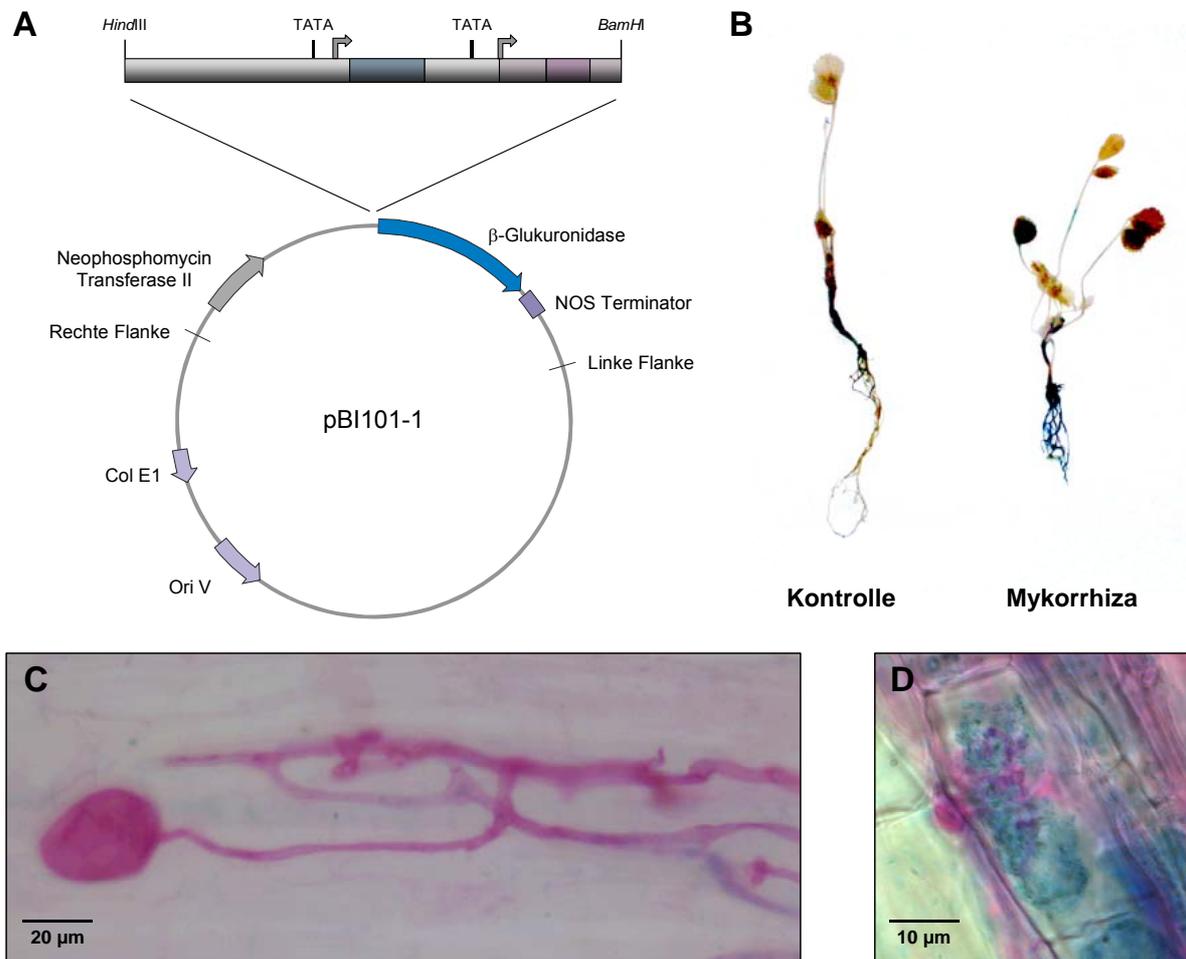
Die identifizierte 5´nicht-translatierte Region des *Mtha1*-Gens besitzt eine Länge von 2489 bp. In diesem Bereich wird 639 bp vor dem Transkriptionsstart der H<sup>+</sup>-ATPase eine zweite TATA-Box vermutet, von der ausgehend ein weiteres Transkript erstellt wird (Krajinski, 1999). Eine weiteres besondere Eigenschaft ist die Existenz eines Intron im 5´nicht-translatierten Region des H<sup>+</sup>-ATPase-Transkripts. Diese beiden Strukturen spielen möglicherweise eine wichtige Rolle für die Expression des *Mtha1*-Gens (Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-12 Schematische Darstellung der Promotor-Region des Gens *Mtha1*.** 66 bp hinter dem Transkriptionsstart der H<sup>+</sup>-ATPase befindet sich im nicht-translatierten Bereich ein 187 bp langes Intron. Im 5´-Bereich des Promotors wird von einer zweiten TATA-Box (1538) ausgehend ein weiteres Transkript synthetisiert. Dies besitzt einen homologen Bereich (1628-1969) zu dem *Po22*-Gen aus *Medicago sativa*. Eine mögliche Poly-Adenylierungsstelle (polyA) wurde ebenfalls identifiziert.

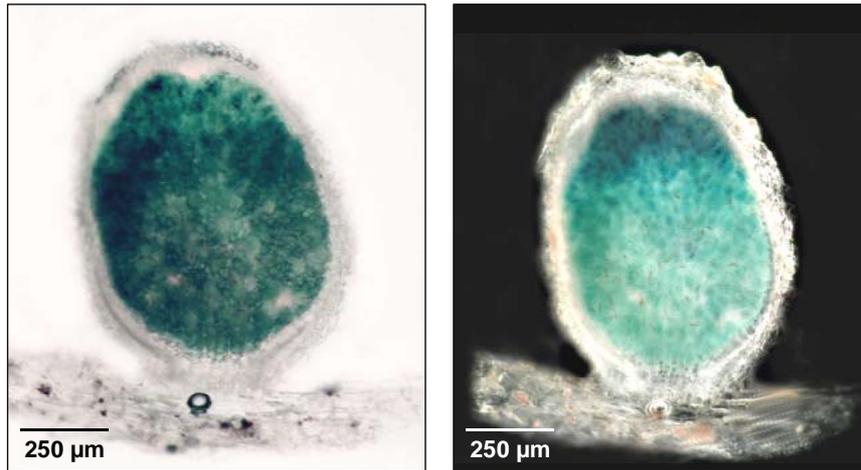
Zur Lokalisierung der Promotoraktivität der H<sup>+</sup>-ATPase *Mtha1* aus *M. truncatula* wurde ein 2283 bp (Position 197-2480) langes Fragment aus genomischer DNA (NCBI Accessionnr. AJ132891) mit den Oligonukleotiden *Mtha1*-K und *Mtha1*-K2 amplifiziert und in den Vektor TOPO™ pCR 2.1 kloniert. Anschließend wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Hind*III wieder herausgeschnitten und in den binären Transformationsvektor pBI101-1 vor ein promotorloses  $\beta$ -Glukuronidase-Gen (GUS) und an die Terminatorregion einer Nopalin-Synthase (NOS) fusioniert (Abbildung 3-13 A). Nachdem das Konstrukt in den Stamm *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 gebracht wurde, erfolgte die Transformation von *M. truncatula* Wurzeln. Die Wurzeln wurden mit dem AM Pilz *G. intraradices* inokuliert. Drei Wochen nach der Inokulierung wurden die Pflanzen geerntet und zum Nachweis der Reportergenaktivität das farblose 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Glykosid enzymatisch gespalten (Abbildung 3-13 B). Es werden Glukuronsäure und ein lösliches Zwischenprodukt frei, das oxidativ zu einem unlöslichen blauen Indigo-farbstoff dimerisiert. Anschließend wurden die Pilzhyphen mit saurem Fuchsin rötlich angefärbt (Abbildung 3-13 C und D). Eine GUS-Färbung wurde nur im Zusammen-

hang mit arbuskelhaltigen Zellen beobachtet. In der Nähe der interzellulären Hyphen sowie in Wurzeln ohne Mykorrhiza war keine Aktivität zu detektieren.



**Abbildung 3-13 *Mtha1*-Promotoraktivität in arbuskelhaltigen Zellen.** (A) Der *Mtha1*-Promotor fusioniert an eine  $\beta$ -Glukuronidase wurde in *M. truncatula* transformiert. (B) Während mykorrhizierte Wurzeln sich in einen GUS-Test blau färbten, blieben Kontroll-Wurzeln farblos. (C) Intraradikuläres Myzel und Vesikel zeigten keine Reporteragenaktivität in benachbarten Kortezellen. (D) In Zellen mit Arbuskelstrukturen war jedoch eine GUS-Färbung nachweisbar.

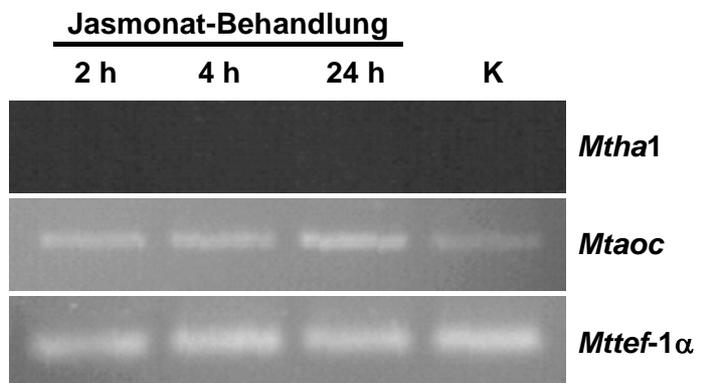
Jüngsten Untersuchungen zur Folge zeigt *Mtha1* nicht nur in mykorrhizierten Wurzeln, sondern auch in der Knöllchensymbiose eine Transkriptakkumulierung (persönliche Mitteilung von K. Manthey und H. Küster, Universität Bielefeld). Um die Promotoraktivität von *Mtha1* in nodulierten Wurzeln zu lokalisieren, erfolgte Kultivierung von *Medicago*-Pflanzen mit *Sinorhizobium meliloti*. Die Pflanzen wurden 5-6 Wochen nach Inokulierung geerntet und auf  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität untersucht. Neben einer Färbung im stickstofffixierenden Gewebe (Fixierungszone) wurde die stärkste Aktivität in meristematischen Geweben der Wurzelknöllchen beobachtet (Abbildung 3-14).



**Abbildung 3-14 *Mtha1*-Promotoraktivität in Wurzelknöllchen.** Die  $\beta$ -Glukuronidase-Färbung beschränkt sich auf das zentrale symbiontische Gewebe der 3-4 Wochen alten Knöllchen. Das übrige Wurzelgewebe zeigte keine Färbungen.

Die  $H^+$ -ATPase zeigte in den Transkriptom-Analysen von *M. truncatula* keine RNA-Akkumulierung in ABA- oder IBA-behandelten Wurzeln. Zur Überprüfung einer differentiellen Genexpression in Jasmonat-behandelten Wurzeln wurde *M. truncatula* nach 5 Wochen für zwei, vier und 24 Stunden mit 45  $\mu$ M Methyljasmonat behandelt (Material von S. Isayenko, Leibnitz Institut für Pflanzenbiochemie, Halle/Saale). Nach der Ernte wurde total-RNA extrahiert und zur Synthese von sscDNA verwendet. Mit spezifischen Oligonukleotiden wurde das Transkript der  $H^+$ -ATPase nachgewiesen. Um die transkriptionelle Veränderungen in den Wurzeln durch appliziertes Jasmonat zu zeigen, erfolgte eine Amplifizierung der Jasmonat-induzierten Allenoxid-Cyclase *Mtaoc* (Abbildung 3-15). Obwohl die Allenoxid-Cyclase mit andauernder Jasmonat-Behandlung eine Transkriptakkumulierung zeigte, konnte für die  $H^+$ -ATPase keine Induktion nachgewiesen werden.

**Abbildung 3-15 Keine Transkriptakkumulierung von *Mtha1* durch erhöhte Jasmonat-Konzentration in Wurzeln von *M. truncatula*.** Total-RNA aus Jasmonat-behandelten und Kontroll-Wurzeln (K) wurde zur Synthese von sscDNA eingesetzt. Zur Amplifizierung von *Mtha1* (30 Zyklen) mit den Oligonukleotiden *Mtha1*-for und *Mtha1*-rev sowie von *Mtaoc* und dem konstitutiven Gen *Mttef-1 $\alpha$*  (beide 23 Zyklen) wurde 1  $\mu$ l sscDNA verwendet.

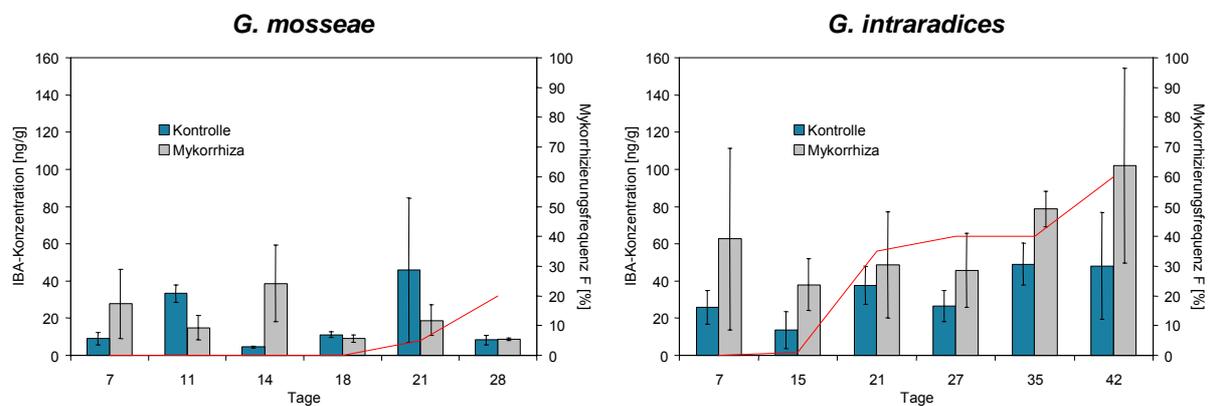


## 4 Diskussion

### 4.1 Mykorrhiza-regulierte Gene in *Medicago truncatula*

Die Regulation von Wachstums-, Differenzierungs- und Entwicklungsvorgängen in höheren Pflanzen, wie zum Beispiel Blühinduktion, Fruchtreifung, pflanzliche Stoffspeicherung, Teilungs- und Streckungswachstum, erfolgt durch Pflanzenwuchsstoffe. Sie dienen bereits in kleinsten Konzentrationen als Botenstoffe, wobei der Bildungsort in der Pflanze häufig räumlich vom Wirkungsort getrennt ist. Mit derartigen Wirkungscharakteristiken erinnern die Pflanzenwuchsstoffe an tierische Hormone und werden daher auch als Phytohormone bezeichnet. Als Mediatoren erlauben sie dem pflanzlichen Organismus, der permanent unter dem Einfluss seiner Umgebung steht, adäquat auf Umweltfaktoren, wie Wassergehalt, Licht, Nährstoffangebot, Temperatur etc., zu reagieren. Durch spezifische Erkennungsprozesse werden Umweltsignale in komplexen biochemischen Informationsnetzwerken von der Oberfläche innerhalb der Zelle weitergeleitet und verändern häufig die Muster pflanzlicher Genexpression. Neben abiotischen können auch biotische Umweltfaktoren den Gehalt an Phytohormonen in der Pflanze beeinflussen. Mikroorganismen, wie Pseudomonaden, Agrobakterien und Knöllchenbakterien, können beispielsweise die Konzentrationen von Cytokinin und Auxinen in Pflanzen verändern und zum Teil sogar selbst produzieren (Costacurta & Vanderleyden, 1995). Aber auch ein Befall von Herbivoren kann sich auf Ethylen-, Jasmonat- und Auxinmengen auswirken (Kahl et al., 2000; Schmelz et al., 2003; Stotz et al., 2002). Einige physiologische und morphologische Veränderungen, wie zum Beispiel Blühinduktion, Seitenwurzelbildung und Stomataöffnung, können nicht nur durch Phytohormone, sondern auch durch die Kolonisierung mit arbuskulären Mykorrhizapilzen hervorgerufen werden (Augé, 2000; Lu & Koide, 1994; Tisserant et al., 1996; Yano et al., 1996). Erste Untersuchungen der Phytohormonkonzentrationen in dieser symbiontischen Interaktion zeigten einen Anstieg von Abscisinsäure (ABA), Cytokinin und Gibberellin-ähnlichen Substanzen (Allen et al., 1980; Allen et al., 1982). Später wurden dann auch erhöhte Konzentration der ABA und Indol-3-Buttersäure (IBA) in *Glomus* sp. kolonisierten Maiswurzeln beobachtet (Danneberg et al., 1993). In dieser Arbeit zeigten Untersuchungen der ABA-Konzentration in der Leguminose *Medicago truncatula* eine Erhöhung in *G. mosseae* kolonisierten Wurzeln. Dieser Anstieg scheint mit dem Grad der Kolonisierung zu

korrelieren. Pflanzenwurzeln, 35 Tagen nach Inokulierung geerntet, zeigten neben der Mykorrhizierung eine Besiedlung mit Knöllchenbakterien. Diese Kontamination könnte Ursache für eine Abnahme der Konzentration in mykorrhizierten Wurzeln sein. Allerdings wurden durch die Knöllchensymbiosen veränderte ABA-Konzentrationen bisher nicht in der Literatur beschrieben. Bereits zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Interaktion zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices* wurde ein Konzentrationsanstieg der ABA in Pflanzenwurzeln detektiert, was auf eine Beteiligung in der präsymbiotischen Phase hinweisen könnte. Eine zunehmende Kolonisierung durch den AM Pilz wirkt sich jedoch nicht auf den ABA-Gehalt aus. Die Biosynthese der ABA wird vermutlich schon während der präsymbiotischen Phase, der Appressorienbildung oder des interzellulären Wachstums angeregt und kommt bei einer Kolonisierung wieder zum Erliegen. Im Gegensatz zu den Kontrollen der *G. mosseae* besiedelten Pflanzen zeigten die Kontrollen zu den *G. intraradices* kolonisierten Wurzeln über die gesamte Wachstumsdauer einen relativ konstanten Gehalt an ABA. Diese starke Variation deutet darauf hin, dass weitere biotische oder abiotische Faktoren die ABA-Konzentration beeinflusst haben. Daher sollte die Veränderung des ABA-Spiegels in *Medicago*-Wurzeln unbedingt durch weitere Messungen bestätigt werden.



**Abbildung 4-1 IBA-Konzentration zu unterschiedlichen Zeitpunkten in *M. truncatula* Wurzeln kolonisiert mit den AM Pilzen *G. mosseae* oder *G. intraradices*.** Neben Messung der IBA-Konzentration in mykorrhizierten Wurzeln sowie in entsprechenden Kontrollen wurde die Mykorrhizierungsfrequenz F (—) bestimmt. (von J. Ludwig-Müller, Technische Universität Dresden)

In den Wurzeln von *M. truncatula* wurde ein Anstieg der IBA-Konzentration durch Kolonisierung mit *G. intraradices* beobachtet. Die Erhöhung gegenüber den Kontrollen ist über das gesamte Wachstum relativ konstant, sollte aber aufgrund der hohen Standardabweichungen kritisch betrachtet werden. Bestätigt wird diese Messung

durch einen Konzentrationsanstieg von IBA in *G. intraradices* besiedelten Maiswurzeln, der vermutlich mit einem erhöhten Seitenwurzelanteil im Zusammenhang steht (Kaldorf & Ludwig-Müller, 2000). Messungen in Wurzeln inokuliert mit *G. mosseae* ergaben für IBA keinen Mykorrhiza-bedingten Konzentrationsanstieg (Abbildung 4-1, persönliche Mitteilung von J. Ludwig-Müller). Ähnlich der ABA-Messungen unterliegen auch hier die entsprechenden Kontrollen relativ starken Schwankungen.

Neben der Konzentration der Phytohormone wird auch die Phosphatversorgung der Pflanze durch die Mykorrhizasymbiose beeinflusst. Phosphat, essentiell für Wachstum und Entwicklung der Pflanzen, kann von den Wurzeln nur in limitierten Mengen aufgenommen werden. Die symbiontische Interaktion mit AM Pilzen versorgt die Pflanze mit zusätzlichem Phosphat und verändert durch die verbesserte Versorgung das Transkriptionsprofil pflanzlicher Zellen (Liu et al., 2003, Wasaki, 2003 #368).

Die Verwendung der Array-Technologie zur Herstellung umfangreicher Transkriptionsprofile soll die Identifizierung pflanzlicher Gene vereinfachen, die direkt durch die Mykorrhizasymbiose und nicht durch sekundäre Effekte, wie variierende Phytohormon- und Phosphatkonzentrationen, reguliert werden. Die Quantifizierung von Genexpressionsmustern ist derzeit die häufigste Anwendung von Mikro- oder Makroarrays. Integriert in die funktionelle Genomanalyse unterstützen sie die Charakterisierung von bereits identifizierten Genen sowie Organisation und Kontrolle von Stoffwechselwegen (Aharoni & Vorst, 2002). Diverse nicht biologische Einflüsse bei Mikroarray-Experimenten können zu systemischen Abweichungen führen und die Identifizierung regulierter Gene erschweren. Quellen dieser systemischen Abweichungen sind physikalische Eigenschaften der Fluoreszenzfarbstoffe (Halbwertszeit, Lichtempfindlichkeit, Inkorporationsrate), abweichende Bedingungen während der Hybridisierung oder unterschiedliche Scannereinstellungen. Ausreichend gute Ergebnisse konnten durch die Verwendung der Normalisierungsfunktion Lowess erzielt werden (Dondrup et al., 2003).

Von 5648 Wurzel-exprimierten Genen aus *M. truncatula* zeigten 7%, 3% bzw. 12% signifikant einen mindestens 1,9-fachen Expressionsunterschied als Reaktion auf eine erfolgreiche Mykorrhizierung mit *G. mosseae*, *G. intraradices* oder *Gigaspora rosea*. Insgesamt wurden 743 unterschiedliche Gene (13%) identifiziert, die in mindestens einer Interaktion als reguliert gefunden wurden. Darunter befinden sich Gene, denen bereits in früheren Untersuchungen eine Regulation in der arbuskulären Mykorrhizasymbiose nachgewiesen wurde. Zum Beispiel wird der pflanzliche Phosphat-

transporter *MtPT4* durch Interaktionen mit *Glomus versiforme* und *Gigaspora gigantea* sowie in *G. intraradices* kolonisierten *Medicago*-Wurzeln induziert, während der Phosphattransporter *MtPT2* reprimiert wird (Harrison et al., 2002; Liu et al., 1998). Mit einem Arabinogalaktan-Protein, Gluthation-S-Transferase und der H<sup>+</sup>-ATPase *Mtha1* wurden weitere Gene als Mykorrhiza-reguliert bestätigt (Krajinski et al., 2002; Strittmatter et al., 1996; van Buuren et al., 1999; Wulf et al., 2003).

Die Gliederung in Funktionsklassen verdeutlicht eine Beteiligung der regulierten Gene an unterschiedlichen Prozessen in der arbuskulären Mykorrhiza. Beispielsweise sorgen Sekretion, Rezeption sowie Transduktion für einen gegenseitigen Signalaustausch und leiten dadurch die Entwicklung der Symbiose ein (Kistner & Parniske, 2002). Nach Penetration der Epidermis über ein Appressorium sowie inter- und intrazelluläres Hyphenwachstum des AM Pilzes kommt es zur Entwicklung von Arbuskeln mit morphologischen Umstrukturierungen in der Wirtszelle, wie Fragmentierung der zentralen Vakuole, Volumenzunahme des Cytoplasmas, Vermehrung von Organellen und Migration des Nukleus in eine zentrale Position innerhalb der Zelle (Balestrini et al., 1992; Balestrini et al., 1994; Bonfante & Perotto, 1995). Dies alles sind Modifizierungen, die Elemente des Cytoskeletts involvieren. Hypertrophie des Zellkerns und Dispersion der Chromatinstruktur in arbuskelhaltigen Zellen weisen auf eine verstärkte transkriptionelle Aktivität im Genom hin, an die eine erhöhte Proteinbiosynthese und Prozessierung gekoppelt ist. So wurde eine erhöhte mitotische Aktivität im Apex von mykorrhizierten Wurzeln gemessen (Berta et al., 1991), die in morphologische Veränderungen des Wurzelsystems resultieren. Die verstärkte Bildung von Seitenwurzeln mit relativ kurzen Verzweigungen endet in einem kompakten Wurzelgeflecht. Zur Ausbildung der periarbuskulären Schnittstelle wird die Plasmamembran vergrößert und neusynthetisierte Zellwandproteine formieren unter anderem die Matrix. Zum Austausch von Nährstoffen mit dem AM Pilz werden Membranproteine und molekulare Transporter benötigt. Die Zunahme der physiologischen Aktivitäten in den kolonisierten Zellen der Wurzelrinde ist mit einem erhöhten Primärmetabolismus zur Deckung des Energiebedarfs verbunden (Harrison, 1999).

Pilzliche Strukturen, die in pflanzliches Gewebe eindringen, lösen für gewöhnlich eine Reaktion der Pflanzenabwehr aus. Diese kann je nach Art der beteiligten Organismen stärker oder schwächer ausfallen. Auch die Kolonisierung der Wurzel durch AM Pilze aktiviert eine große Anzahl pflanzlicher Abwehrgene, die vermutlich das Hyphenwachstum im Kortex kontrollieren. Dem zur Folge ist der hohe prozentuale

Anteil induzierter Gene der Verteidigungsantwort in *Medicago*-Wurzeln bei Interaktionen mit den beiden *Glomus*-Spezies nicht überraschend. Möglicherweise führt diese Zunahme der Genexpression zu einer Verstärkung des Abwehrsystems gegenüber Pathogenen, obgleich für *G. intraradices* kolonisierte Tomatenwurzeln gegenläufige Beobachtungen gemacht wurden (Pozo et al., 2002). Wie sehr sich die Mykorrhizen eines Pilzes mit Tomate und *M. truncatula* unterscheiden können, wurde vor kurzem gezeigt (Smith et al., 2003). Weitere Untersuchungen offenbarten, dass je nach Art der Interaktionspartner und abiotischen Umweltbedingungen AM Pilze die Krankheitsresistenz der Pflanzen positiv oder negativ beeinflussen können (Azcon-Aguilar & Barea, 1996; Gernns et al., 2001). Einer Erhöhung der Bioprotektion war sehr häufig in *G. mosseae* kolonisierten Pflanzen zu beobachten (Lingua et al., 2002; Pozo et al., 2002; Slezack et al., 1999). Eine Stimulierung des pflanzlichen Abwehrsystems durch *G. rosea* hingegen wurde nicht beobachtet, vielmehr kam es zu einer Repression solcher Gene. Aufgrund dieser Tatsache besteht die Vermutung, dass sich *G. rosea* negativ auf die pflanzliche Resistenz gegenüber Pathogenen auswirken könnte.

Eine Gruppe von Genen, die durch Verdopplung und Modifikation aus einem Vorläufer hervorgegangen sind, nennt man Genfamilie. Die einzelnen Mitglieder liegen entweder in einem Cluster oder verstreut im Genom und haben im allgemeinen verwandte oder sogar identischen Funktionen. Möglicherweise werden sie jedoch unter verschiedenen Bedingungen exprimiert, wie Zeitpunkt, Zelltyp und Art der Stimuli. Auch im Genom von *M. truncatula* existieren eine Reihe solcher Genfamilien, die teilweise, wie beispielsweise die MIPs (**M**embrane **I**ntrinsic **P**roteins), auf den cDNA-Array repräsentiert sind. MIPs sind Transmembranproteine des Plasmalemmas oder Tonoplasten, die für einen passiven Transport von Wasser (Aquaporin), aber auch von Glycerol, Harnstoff, Aminosäuren und kleinen Peptiden sorgen. In *M. truncatula* wurde bereits ein Aquaporin des Tonoplasten identifiziert, der durch Mykorrhizierung mit *G. mosseae* induziert wurde (Krajinski et al., 2000). Ein erhöhter Wassertransport über den Tonoplasten könnte die osmotischen Veränderungen im Cytoplasma ausgleichen. Diese osmotische Fluktuation entsteht möglicherweise durch das wechselnde Volumenverhältnis zwischen Cytoplasma und Vakuole in arbuskelhaltigen Zellen. In dieser Arbeit zeigten von insgesamt neun MIP-Genen sieben eine Regulation durch AM Pilze. Während es in jeder Interaktion nur ein induziertes MIP existierte, wurden durch *G. mosseae* und *G. rosea* vier bzw. zwei Gene reprimiert. Dieses

Bespiel zeigt, dass Gene mit scheinbar gleicher Funktion unterschiedliche Aufgaben in der Mykorrhiza erfüllen. Außerdem nehmen die drei AM Pilze auf unterschiedliche Mitglieder einer Genfamilie Einfluss, was auf verschiedene Regulationsmechanismen hindeutet.

Durch die Applikation der Phytohormone ABA und IBA auf *M. truncatula* Wurzeln zeigten 14% bzw. 3% der untersuchten Gene eine Regulation, während eine Düngung mit zusätzlichem Phosphat bei 15% zu einer Veränderung der Genexpression führte.

Die Mikroarray-Experimente ‚*G. mosseae*‘, ‚*G. intraradices*‘ und ‚IBA‘ ergaben im Gegensatz zu ‚*G. rosea*‘, ‚ABA‘ und ‚Phosphat‘ eine deutlich minimierte Anzahl differentiell exprimierter Gene. Mögliche Ursachen dieser quantitativen Unterschiede könnten die zeitliche Trennung der Experimente und die Verwendung einer neu produzierten Serie von Mikroarrays sein. Dies und die abweichende Anzahl durchgeführter Hybridisierungen pro Interaktion erschweren den direkten Vergleich der Transkriptionsprofile der drei Mykorrhizasymbiosen. Unter der Berücksichtigung, dass die Konzentrationen der Phytohormone ABA und IBA sowie des Nährstoffes Phosphat in mykorrhizierten Wurzeln scheinbar ansteigen und sich dadurch auf die pflanzliche Genexpression auswirken könnten, zeigten 568 Gene eine Regulation ausschließlich durch Interaktion mit einem AM Pilz. Darunter befinden sich Gene, deren Expression in zwei oder sogar allen drei Symbiosen beeinflusst wurde. Dieser Anteil ist jedoch sehr gering. Die AM Pilze *G. mosseae*, *G. intraradices* und *G. rosea* wirken sich demnach sehr unterschiedlich auf die pflanzliche Genexpression aus und könnten dem zur Folge die phylogenetische Distanz zwischen den drei Arten widerspiegeln. In der Literatur wurde bereits die Diversität einiger AM Pilze hinsichtlich ihrer physiologischen Eigenschaften beschrieben. So ist zum Beispiel der bidirektionale Nährstoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern abhängig von der Art des AM Pilzes, wie die unterschiedliche Phosphatversorgung von *M. truncatula* kolonisiert mit *Glomus caledonium* oder *Scutellospora calospora* zeigte (Smith et al., 2000). Die Bestätigung dieser Beobachtung erfolgte durch weitere Analysen des Phosphattransports in *Linum usitatissimum*; *Lycopersicon esculentum* und *M. truncatula* jeweils mykorrhiziert mit den AM Pilzen *G. intraradices*, *G. caledonium* oder *G. rosea*. Neben Wachstumseffekten und Kolonisierungsfrequenzen unterschied sich je nach Art der beiden Symbiosepartner auch der Phosphatgehalt im Phytobionten. Während Phosphat in *G. intraradices* kolonisierten Wurzeln ausschließlich über die Pilzhyphen

zur Pflanze gelangt, transportiert *G. rosea* nur einen geringen Phosphatanteil. Sofern ein erhöhter Phosphatgehalt in der Pflanze vorliegt, erfolgt die Aufnahme vermutlich direkt über eine Mykorrhiza-abhängige Aktivierung von Transportern in der Wurzel-epidermis (Smith et al., 2003). Untersuchungen an Weizen und Zuckerahorn verdeutlicht, dass der Kohlenhydrattransfer sich sowohl durch die Art des pilzlichen, als auch durch den pflanzlichen Symbionten verändert. Während *G. rosea* durch ein dichtes Hyphennetzwerk von beiden Pflanzenarten relativ große Mengen an Photoassimilaten aufnimmt, erhält *G. intraradices* nur von Weizen und *G. mosseae* von keinen der beiden Wirtspflanzen Kohlenhydratverbindungen (Lerat et al., 2003). Analog zum Nährstoffaustausch hängen auch die bioprotektorisches Eigenschaften der Mykorrhiza von der Art der Symbionten ab. So wiesen Tomatenwurzeln infiziert mit dem Pathogen *Phytophthora parasitica* deutlich weniger Krankheitssymptome auf, wenn sie gleichzeitig mit *G. mosseae* kolonisiert waren. Im Gegensatz dazu vermochte *G. intraradices* seine Wirtspflanze nicht vor Pathogenbefall zu schützen (Pozo et al., 2002). *L. esculentum* Wildtyp zeigt im Vergleich zur einer Mykorrhiza-defekten Mutante bei Interaktion mit unterschiedlichen AM Pilzen normale Mykorrhizierungsmuster. Kolonisierung der Mutante mit *G. intraradices* endet bereits auf der Epidermis, während *G. mosseae* diese noch erfolgreich penetriert, aber nur schwaches interzelluläres Hyphenwachstum aufweist. *Glomus versiforme* vermag es sogar die Wurzeln der Mutante relativ normal zu besiedeln (Barker et al., 1998; Gao et al., 2001).

In der Vergangenheit wurde über eine Konzentrationsabnahme des gasförmigen Phytohormons Ethylen in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln berichtet (McArthur & Knowles, 1992). Eine Bestätigung dieses Ergebnisses deutet sich in der Interaktion zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices* durch die Repression einer 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure-Oxidase (ACC-Oxidase) an, die aus 1-Aminocyclopropan-1-Carbonsäure unter Beteiligung von Ascorbat, Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) und molekularem Sauerstoff Ethylen katalysiert {Varner, 2000 #422}. In *M. truncatula* existiert scheinbar eine Genfamilie von mindestens vier ACC-Oxidasen. Neben der Repression eines Mitglieds, werden zwei weitere durch die Interaktion mit *G. mosseae* bzw. *G. rosea* induziert. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den bisherigen Erkenntnissen, könnte aber durch die Verwendung eines anderen Modellsystems (unterschiedliche Myko- und Phytobionten) erklärt werden. Ethylen fördert Blattfall, Fruchtreife sowie Seneszenz, jedoch bleibt die Rolle in der Mykorrhiza unklar. Ein

Anstieg von Ethylen ist auch charakteristisch für eine Infektion mit Pathogenen, wodurch die Expression von Genen der Verteidigungsantwort beeinflusst wird (Boller, 1991; Mauch et al., 1988). Die Induktion der Ethylensynthese kann aber auch durch reaktive Sauerstoffspezies erfolgen (Watanabe et al., 2001), die zum Beispiel durch ‚germin-like-proteins‘ produziert werden. ‚Germin-like proteins‘ wurden ursprünglich in Samen von Weizen (*Triticum aestivum*) gefunden (Lane, 1991). Heute ist bekannt, dass diese Proteine in unterschiedlichen Pflanzenarten vorkommen und neben der Keimung noch an weiteren Prozessen beteiligt sind. So besitzen zum Beispiel einige von ihnen eine Oxalat-Oxidase Aktivität (Berna & Bernier, 1999). Eine Induktion der Oxalat-Oxidasen erfolgt durch Salzstress (Hurkman & Tanaka, 1996), Auxine (Berna & Bernier, 1997), zirkadiane Rhythmik (Membre et al., 1997) und pilzliche Infektion (Zhang et al., 1995), die eine Kolonisierung durch AM Pilze einschließt. In Wurzeln von *M. truncatula* kolonisiert mit *G. intraradices* konnte die verstärkte Expression eines ‚germin-like protein‘, möglicherweise mit Oxalat-Oxidase Aktivität, in arbuskelhaltigen Zellen gezeigt werden (Doll et al., 2003). Durch die Array-Experimente wurden je zwei weitere Oxalat-Oxidasen in *M. truncatula* kolonisiert mit *G. mosseae* oder *G. intraradices* Mykorrhiza-spezifisch hochreguliert. Lokalisiert in der pflanzlichen Zellwand katalysieren diese Enzyme aus Oxalsäure Wasserstoffperoxid ( $C_2H_2O_4 + O_2 \rightarrow 2 CO_2 + H_2O_2$ ). Diese reaktive Sauerstoffspezies wird in Folge eines Pathogenbefalls, einer Gewebsverletzung („Oxidative Burst“) sowie einer Mykorrhizierung produziert (Salzer et al., 1999). Wasserstoffperoxid besitzt eine antimikrobielle Wirkung, induziert die Verteidigungsantwort der Pflanzen und führt zu einer Vernetzung und Stabilisierung der Zellwand (z.B. Lignifizierung), die eine weitere Penetration von Pathogenen verhindert (Bradley et al., 1992; Levine et al., 1994; Thordal-Christensen et al., 1997). Oxidativer Stress durch Verwundung pflanzlichen Gewebes führte in *Arabidopsis* zu einer erhöhten Promotoraktivität eines blauen Kupferproteins (Yang et al., 2002). Die Induktion eines weiteren Proteins dieser Familie erfolgte durch Behandlung mit Ozon oder Aluminium sowie durch eine verlängerte Dunkelphase, wodurch ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies entstehen (Miller et al., 1999; Richards et al., 1998; van Gysel et al., 1993). Zwei Gene, kodierend für ein ‚blue copper protein‘ und ein ‚blue copper protein precursor‘ sowie zwei Gene mit unbekannter Funktion, zeigten in *M. truncatula* eine regulierte Expression durch allen drei Mykorrhizasymbiosen, aber nicht durch die beiden Phytohormone oder Phosphat. Zu den Proteinen, die ein Kupfer-Atom (Typ 1) gebunden haben, zählen die Plastocyanine und Phyto-

cyanine. Als Teil der Photosynthese sind Plastocyanine in den Thylakoidmembranen der Chloroplasten aktiv und transportieren Elektronen zwischen dem Photosystem I und dem Cytochrom  $b_6/f$ -Komplex. Da photosynthetisches Gewebe nicht in den Untersuchungen berücksichtigt wurde, handelt es sich vermutlich um ein Phytocyanin, für das eine Beteiligung an Redox-Reaktionen in der Verteidigungsantwort der Pflanzen diskutiert wird (Nersissian et al., 1998). Wie ein blaues Kupferprotein aus der Erbse zeigte, wirken Phytocyanine möglicherweise auch an der Synthese von Ligninen mit (Drew & Gatehouse, 1994). Produktion und Lagerung von Ligninen in peripheren Geweben sind, wie bereits beschrieben, Teil der pflanzlichen Stressantwort. Möglicherweise sind blaue Kupferproteine, die in der Vergangenheit schon als Mykorrhiza-induziert beschrieben wurden (Küster et al., 2004; Wulf et al., 2003), an der Kontrolle des pilzlichen Hyphenwachstum in der Wurzelrinde beteiligt.

Die differentielle Genexpression des ‚blue copper protein precursor‘ konnte in allen drei Mykorrhizasymbiosen mit Hilfe der Real-Time-PCR gemessen werden. Die erzielten Induktionslevels waren gegenüber den Array-Hybridisierungen signifikant höher. Eine Unterschätzung der Regulationsstärke kann als Folge von Kreuzhybridisierungen auftreten. Ursache können repetitive Sequenzelemente oder stark homologe Sequenzen von Mitgliedern einer Genfamilie sein. Bedingt durch die Präparationstechnik erfolgt keine Trennung pilzlicher von pflanzlicher RNA. Kreuzhybridisierungen mit pilzlichen Transkripten sind daher ebenfalls denkbar, haben jedoch aufgrund des geringen Pilzanteils meistens keinen starken Einfluss. Alle diese Möglichkeiten können zu artifiziellen Signalen auf den Arrays und somit zu einer falschen Interpretation der Expressionsdaten führen. Zur Bestätigung der Ergebnisse eignet sich die Methode der Real-Time-PCR, da durch die Auswahl genspezifischer Oligonukleotide eine Kreuzhybridisierung mit anderen Transkripten stark minimiert werden kann. Daher entsprechen die Ergebnisse aus der Real-Time-PCR eher der tatsächlichen Transkriptakkumulierung in den untersuchten Geweben. In der Regel fallen die Expressionsunterschiede im Vergleich zu den Array-Experimenten viel höher aus. Durch die Unterschätzung der Expressionslevels in den Array-Experimenten können schwach differentiell exprimierte Gene teilweise nicht als solche identifiziert werden. Es ist nicht auszuschließen, dass weitere sekundäre Effekte der Mykorrhiza Einfluss auf die Genexpression nehmen können. Der Anstieg der Jasmonat-Konzentration in Wurzeln durch eine Mykorrhizierung konnte bereits gezeigt werden (Hause et al., 2002). Die Auswirkung auf das Transkriptionsprofil durch die erhöhte Konzentration

in mykorrhizierten Wurzeln wird von einer Kooperationsgruppe am Institut für Pflanzenbiochemie in Halle genauer untersucht. Des Weiteren stehen an der Universität Bielefeld Daten zur Verfügung, die differentiell exprimierte Gene aus einer *Medicago/Sinorhizobium* Interaktion enthalten. Die Mykorrhiza und die Knöllchensymbiose besitzen einige physiologische Gemeinsamkeiten, die durch einen Vergleich der Hybridisierungsdaten genauer charakterisiert werden können.

Die Kriterien zur Identifizierung regulierter Gene durch die Array-Experimente wurden relativ stringent gewählt, so dass Gene mit einem schwachen Expressionsunterschied unberücksichtigt bleiben. Geringe Schwankungen in der Expression entscheiden darüber, ob ein Gen noch als differentiell exprimiert betrachtet wird. Dieses trägt unter anderem dazu bei, dass die Transkriptionsprofile, sowohl der technischen als auch der biologischen Replikate, nicht identisch sind. Das die erstellten Listen keinen Anspruch auf Vollständigkeit haben wird deutlich durch fehlende Gene, die bereits in der Vergangenheit als reguliert gefunden wurden. Beispielsweise berichtet F. Krajinski über ein induziertes Aquaporin in *G. mosseae* kolonisierten Wurzeln (Krajinski et al., 2000), welches in den Hybridisierungsexperiment lediglich eine Repression durch *G. rosea* zeigte. *Mt4*, ein Gen mit unbekannter Funktion, wird durch verschiedene AM Pilze (u.a. *G. intraradices*, *G. mosseae* und *G. rosea*) sowie Phosphat negativ reguliert (Burleigh et al., 2002). Aufgrund der Ergebnisse aus dieser Arbeit zählt *Mt4* zu den Mykorrhiza-spezifischen Genen, da eine Repression nur in *G. intraradices* und *G. rosea* kolonisierten Wurzeln, aber nicht durch Phosphatapplikation beobachtet wurde.

Die Simulation der indirekten Mykorrhizierungseffekte, wie erhöhte ABA-, IBA- und Phosphatkonzentration in den Wurzeln, entspricht möglicherweise nicht der natürlichen Situation. Die Nährstoffversorgung der Pflanze sowie die Veränderung des Phytohormonspiegels hängt vermutlich mit dem Kolonisierungsgrad der AM Pilze zusammen. Eine exakte Konzentrationsberechnung der zu applizierenden Substanzen wird durch weitere Faktoren, wie Aufnahme und Transportgeschwindigkeit im pflanzlichen Gewebe, erschwert. Die eingesetzten Mengen wurden daher so gewählt, dass eine Veränderung der Genexpression zu erwarten war. Ob diese Transkriptionsveränderungen auch in mykorrhizierten Wurzeln auftreten, muss kritisch betrachtet werden. Denn ausgehend von der Idee der indirekten Regulierung, müssten alle ABA-, IBA- und Phosphat-regulierten Gene auch durch die AM Pilze reguliert werden. Dieses konnte durch die Hybridisierungsexperimente jedoch nicht gezeigt werden.

den. Ähnliche Diskrepanzen wurden auch von Liu et al. (2003) beobachtet, die mit Hilfe der Array-Technologie die Expressionsmuster in *M. truncatula* während der Mykorrhizabildung und nach Applikation von Phosphat untersuchten. Eine mögliche Erklärung wäre die bereits beschriebene Problematik regulierter Gene umfassend zu identifizieren. Außerdem könnte die Genexpression durch Faktoren mit unterschiedlicher Priorität kontrolliert werden und so zum Beispiel Mykorrhizierung die Regulation eines Gens gegenüber veränderter Phosphatversorgung dominieren.

Die Mikroarray-Technologie bietet zukünftig noch einiges an Potential. Für immer mehr Organismen werden in absehbarer Zeit umfangreiche Genomsequenzen mit den entsprechenden Annotationen zu Verfügung stehen. Aufgrund dieser Informationen können Wissenschaftler genomweite Mikroarrays produzieren, mit deren Hilfe der physiologische Zustand einer Zelle durch die Regulation einzelner Stoffwechselwege genau charakterisiert werden kann. Nach Abschluss der Genomsequenzierung von *M. truncatula* könnten genomweite Arrays für diesen Modellorganismus hergestellt werden. Ein erster Schritt in diese Richtung ist ein seit kurzem verfügbarer Mikroarray mit 16000 Genen, die durch synthetische Oligonukleotide (70mere) repräsentiert werden. Durch die Verwendung von Oligonukleotiden kann auf einige fehleranfällige Prozesse (z.B. PCR) in der Mikroarray-Produktion verzichtet werden und trägt so zu einer Qualitätsverbesserung bei. Ein weiterer Vorteil dieser Art von Mikroarrays ist die Minimierung von Kreuzhybridisierungen, durch die Selektion Gen-spezifischer Sequenzabschnitte.

### **4.2 Arbuskel-assoziierte Genexpression in *Pisum sativum***

Die Array-Technologie ist ein effizientes Werkzeug zur Untersuchung von Transkriptionsprofilen, aber vorläufig nur für eine geringe Auswahl von Modellorganismen etabliert. Wissenschaftler, denen diese Technologie nicht zur Verfügung steht, müssen sich alternativer Methoden zur Analyse differentieller Genexpression bedienen. Die Methode der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) ist eine Möglichkeit und wird schon seit einiger Zeit erfolgreich für molekularbiologische Untersuchungen in pilzlichen und pflanzlichen Organismen verwendet, aber auch in der Mykorrhizaforschung (Brechenmacher et al., 2004; Requena et al., 2002; Tamasloukht et al., 2003; van Buuren et al., 1999; Voiblet et al., 2001; Wulf et al., 2003). Mittels der SSH-Technik kann mit einem geringen experimentellen Aufwand eine cDNA-Bank

hergestellt werden, die eine relativ große Anzahl differentiell exprimierter Gene enthält. Im Vergleich zur Array-Technologie repräsentieren die SSH-Banken keine natürlichen Transkriptionsmuster, aber eignen sich in Kombination mit cDNA-Array-Analysen zur Identifizierung neuer regulierter Gene.

Um Gene mit einer Arbuskel-assoziierten RNA-Akkumulierung zu identifizieren, wurden die beiden mit *G. mosseae* kolonisierten Pflanzenlinien *Pisum sativum* Finale Wildtyp und die isogene Arbuskel-defekte Mutante RisNod24 zur Herstellung einer SSH-Bank verwendet. Nach Sequenzanalysen wurden 81 Klone für Hybridisierungsexperimente ausgewählt. Davon zeigten 17 Gene eine signifikante Induktion (4,5-fach) in mykorrhizierten Wurzeln von *P. sativum*. Nicht-zielgerichtete Ansätze zur Untersuchung arbuskulären Mykorrhiza resultierten häufig in der Identifizierung pilzlicher Gene (Brechenmacher et al., 2004; Delp et al., 2000; Lapopin et al., 1999). Alle induzierten Gene stammen aus dem pflanzlichen Genom, da cDNAs aus Kontrollpflanzen ebenfalls Hybridisierungssignale lieferten.

Zwei Gene wurden schon in früheren Arbeiten im Zusammenhang mit der arbuskulären Mykorrhiza beschrieben. Ein Trypsin-Inhibitor und zwei MAP-Kinasen zeigen eine verstärkte Genexpression in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* (Liu et al., 2003; Wulf et al., 2003).

Für einige Gene aus der SSH-Bank, wie zum Beispiel die für ein Metallothionein und für eine ‚GDSL-motif lipase‘ kodieren, wurden mehrere Mitglieder einer Genfamilie gefunden. Aus besagten Gründen kann dies zu einer Unterschätzung von Hybridisierungssignalen führen und ist eine mögliche Erklärung für höhere Induktionen im Northern Blot und der RT-PCR. Alternativ könnte die intensiviere Kolonisierung und Arbuskelbildung in dem Kultivar Frisson Ursache einer verstärkten RNA-Akkumulierung sein.

Mit einer Ausnahme korreliert die Expressionszunahme der Gene mit der Entwicklung funktionierender Arbuskeln. Das Gen *Prp6* (Proteinase-Inhibitor) zeigt einen Transkriptanstieg in der Entwicklungsmutante RisNod24 und wird daher vermutlich bereits durch Kolonisierung der Wurzelrinde induziert. Die ‚pathogenesis-related proteins‘ (PRP), die vor 30 Jahren zum ersten Mal beschrieben wurden (van Loon & van Kammen, 1970), bilden einen Teil der pflanzlichen Abwehrreaktion. Inzwischen sind einige PRPs charakterisiert und in 11 Familien (PRP1 bis PRP11) gruppiert. Während einige eine  $\beta$ -1,3-Glucanase- oder Chitinase-Aktivität besitzen, wirkt das PRP6 als Proteinase-Inhibitor und könnte pilzliche Proteinase inaktivieren. Bei Interaktion

mit dem Symbionten *Rhizobium leguminosarum* oder dem Pathogen *Aphanomyces euteiches* wurde keine Transkriptakkumulierung detektiert, was Hinweise auf eine Mykorrhiza-spezifische Beteiligung gibt.

Neben dem *Prp6* sind noch vier weitere Gene in die biotische und abiotische Stressantwort der Pflanzen involviert. Neben *M. truncatula* (siehe oben) werden auch in *P. sativum* auffallend viele Gene der Pflanzenverteidigung durch eine Kolonisierung mit *G. mosseae* aktiviert.

Krankheitsresistenz-Proteine, Trypsin-Inhibitoren und die Epoxid-Hydrolasen sind Proteine mit anti-pilzlicher Wirkung (Blee, 1998; Chiang & Hadwiger, 1991; Giudici et al., 2000). In der arbuskulären Mykorrhiza kontrollieren sie möglicherweise das Hyphenwachstum in der Wurzelrinde.

Die stärkste Geninduktion im späten Stadium der Mykorrhizaentwicklung zeigte eine Epoxid-Hydrolase. Diese Proteine wurden nicht nur in Eukaryoten, sondern auch in Prokaryoten gefunden, wo sie die Hydrolyse von Epoxiden zu den entsprechenden Diolen katalysieren (Visser et al., 1999). Ein Substrat der Epoxid-Hydrolasen sind die Fettsäuren-Epoxide und ihre korrespondierenden Diole, die beide pilzliches Wachstum inhibieren können (Blee, 1998; Weijers & de Bont, 1999).

Ein weiteres Gen besitzt eine starke Homologie zu dem *pI230*, ein mögliches Krankheitsresistenzgen aus der Erbse. Interaktion mit dem Pathogen *Fusarium solani* führte zu einer verstärkten Expression dieses Gens und inhibiert dadurch pilzliches Wachstum (Chiang & Hadwiger, 1991). Weitere Gene aus dieser Gruppe, wie *pI49*, *pI176* und *pI206*, zeigten eine Expressionszunahme in mykorrhizierter Erbse (Ruiz-Lozano et al., 1999). Wie Untersuchungen an einer frühen Mykorrhizamutante zeigten ist Expression des *pI206* stark an die Appressorienbildung gekoppelt.

In Wurzeln von *P. sativum* wurde eine Trypsin-Protease identifiziert, die durch Interaktion mit *G. mosseae* und *A. euteiches* eine Induktion zeigte (Slezack et al., 1999). Trypsin zählt aufgrund seines katalytischen Mechanismus zur Familie der Serin-Proteasen. Im Reaktionszentrum dieser Enzyme befinden sich die drei Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat zu einer so genannten katalytischen Triade angeordnet, die über ein tetraedisches Zwischenprodukt die Spaltung von Peptidketten bewirken. In dieser Arbeit wurde ein entsprechender Trypsin-Inhibitor gefunden, der wegen seiner Substrat-Homologie die Bindungstasche des Enzyms besetzt, jedoch nicht gespalten werden kann und somit zur Inaktivierung des Trypsins führt. Durch ein

mögliches Wechselspiel des Inhibitors mit der Protease könnte die Entwicklung der Arbuskeln kontrolliert werden.

Andere Gene, wie das für ein Metallothionein, beteiligen sich an der Detoxifizierung und Entfernung pilzlichen Materials während der Arbuskeldegradation. Sie werden nach Komplexierung toxischer Metalle in der Zellvakuole gelagert (Evans et al., 1992). Eine verstärkte Expression wurde auch während Seneszenz und Pathogenbefall festgestellt (Butt et al., 1998). Entsprechend dieser Beobachtung zeigte das Metallothionein-kodierende Gen durch Infektion mit dem Pathogen *A. euteiches* ebenfalls eine Induktion in der Mutante RisNod24. Phänotypisch zeigte die Interaktion keinen Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp. Dennoch scheint der veränderte Genotyp der Mutante die Expression des Gens zu beeinflussen.

Neben einer erhöhten Aktivität der Stressantwort wurden auch Gene mit eher grundlegenden Aufgaben, wie zum Beispiel der Umstrukturierung des Cytoskeletts, induziert. Eine Beteiligung in der Mykorrhiza wurde bereits diskutiert (Genre & Bonfante, 1997; Genre & Bonfante, 1998). Mikrotubuli als Teil des Cytoskeletts bestehen hauptsächlich aus dem heterodimeren Protein Tubulin, das sich aus einer nicht-kovalenten Bindung zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin zusammensetzt (Gunning & Hardham, 1982). Daher ist die Expressionszunahme eines  $\beta$ -Tubulin neben der Induktion eines  $\alpha$ -Tubulin Promotors in arbuskelhaltigen Zellen (Bonfante et al., 1996) nicht überraschend. In *M. truncatula* existiert sowohl für  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Tubulin eine Genfamilie, deren Mitglieder unter verschiedenen Bedingungen reguliert werden. In dieser Arbeit wurden drei reprimierte  $\alpha$ -Tubuline und ein induziertes  $\beta$ -Tubulin in Folge einer Mykorrhizierung identifiziert. Die Induktion eines  $\alpha$ -Tubulin-Gens durch ABA und die Repression durch *G. rosea* deutet auf unterschiedliche Regulationsmechanismen für den Promotor hin.

Strukturelle und physiologische Veränderungen in der Zelle sind an eine erhöhte metabolische Aktivität gekoppelt. Als Teil der Atmungskette sorgt die NADH-Ubiquinone-Oxidoreduktase (Komplex III) durch den Transport von Elektronen und Protonen für ausreichend Energie in Form von ATP, während die Desoxycytidilat-Deaminase an der Nukleotidsynthese beteiligt ist. In Folge der erhöhten Transkriptionsaktivität steigt auch der Proteingehalt in mykorrhizierten Wurzeln (Arines et al., 1993; Franken & Gnädinger, 1994). An die verstärkte Proteinbiosynthese ist vermutlich die Expressionszunahme des eukaryotischen Initiationsfaktor  $1\alpha$  (eIF1 $\alpha$ ) gekop-

pelt. Bereits in *M. truncatula* konnte während der Mykorrhizierung eine Expressionszunahme des Initiationsfaktor 3 (eIF3) gezeigt werden (van Buuren et al., 1999). Zusammen aktivieren eIF1 $\alpha$  und eIF3 die 40S-Ribosomen-Untereinheit und bilden so den ersten Schritt der Translation. Die Regulation der Proteinbiosynthese während der Mykorrhizaentwicklung erfolgt vermutlich sowohl über Transkription als auch über Translation.

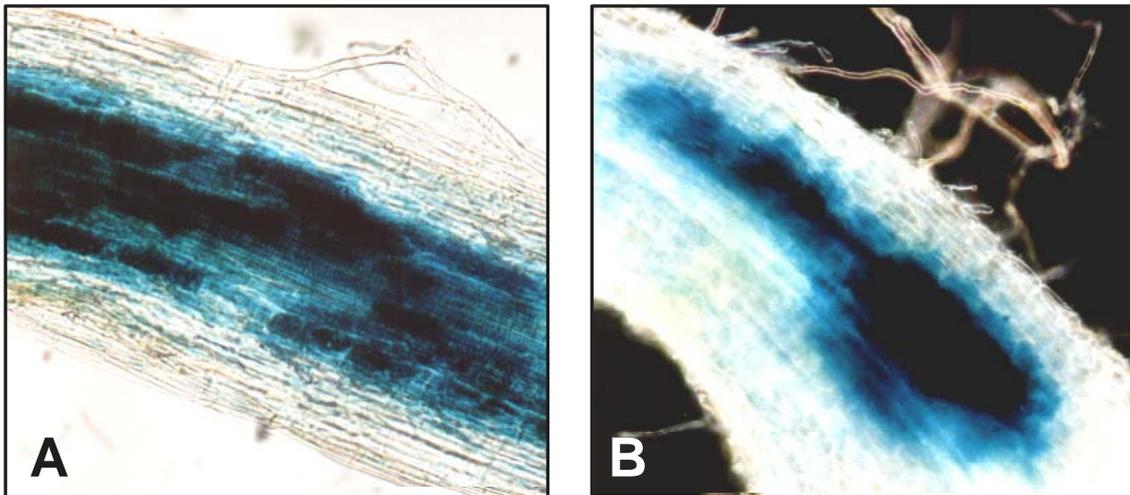
Die Nukleinsäuresequenz eines gefundenen cDNA-Fragments ist zu 100% identisch mit einer MAP-Kinase, die in allen Geweben von *P. sativum* detektiert wurde (Stafstrom et al., 1993). MAP-Kinasen (‘Mitogen-activated Protein Kinase’) sind Teil einer großen Familie von Serin/Threonin Protein-Kinasen und an der Transduktion von extrazellulären Signalen in allen Eukaryoten beteiligt (Jonak et al., 1999; Widmann et al., 1999). In Petersilie und Tabak konnten MAP-Kinasen durch Applikation mit Elicitoren von pilzlichen Pathogenen aktiviert werden (Ligterink et al., 1997; Suzuki & Shinshi, 1995). Die Mykorrhiza-induzierte MAP-Kinase aus *P. sativum* zeigten jedoch keinen Transkriptionsanstieg bei Befall mit dem Pathogen *A. euteiches*, so dass statt einer Beteiligung an der Stressantwort eine regulatorische Funktion im Zellzyklus wahrscheinlicher ist (Jonak et al., 1993; Meskiene & Hirt, 2000).

Ermöglichen die Ergebnisse aus *P. sativum* die Identifizierung Arbuskel-spezifischer Gene in *M. truncatula*? Zur Beantwortung dieser Frage wurden die Makroarrays mit komplexen cDNA-Sonden aus *M. truncatula* Mykorrhiza und Kontrolle hybridisiert. Da lediglich die Fragmente der Gene für den Trypsin-Inhibitor, das  $\beta$ -Tubulin und für ein weiteres Metallothionein (Klon 13) ein Mykorrhiza-abhängiges Hybridisierungsmuster zeigten, wurden die ESTs der Erbsengene gegen die *Medicago*-Datenbanken TIGR MtGI und MENS verglichen. Qualität und Quantität der orthologen Sequenz-Cluster unterscheiden sich zwischen den beiden Datenbanken, obwohl sie auf identische cDNA-Banken zurückgreifen und die ESTs mit demselben Programm (CAP3) zu Sequenz-Cluster zusammengesetzt werden. Während MtGI ESTs auch aus anderen öffentlichen Datenbanken verwendet und schon ab einer Sequenzähnlichkeit Cluster bildet, sind in MENS ESTs nur aufgrund mehrerer Sequenzhomologien Teil eines Clusters. In MENS werden ESTs aus öffentlichen Datenbanken lediglich zur Kontrolle der Cluster herangezogen (Journet et al., 2002). Beide Systeme ergänzen sich und sollten daher parallel verwendet werden.

Die meisten der regulierten Gene aus *P. sativum* besitzen orthologe Sequenzen in *M. truncatula* und sind hier scheinbar Mitglieder von Genfamilien. Die Expression ein-

einzelner Mitglieder kann durch unterschiedliche Faktoren reguliert werden, wie die Identifizierung von acht Chitinasen aus *M. truncatula* verdeutlicht. Einige dieser Chitinasen werden durch Pathogenbefall oder Knöllchensymbiose andere ausschließlich in der Mykorrhiza aktiviert (Salzer et al., 2000).

Für das Trypsin-Inhibitor Gen aus der Erbse wurden sechs homologe Sequenzen in der MtGI Datenbank gefunden, die alle ausschließlich aus Mykorrhiza cDNA-Banken stammen. Diese „Electronic Northern“ Analyse gibt Hinweise auf eine Mykorrhiza-abhängige Regulation, die mit Hilfe der Real-Time-PCR für fünf Mitglieder in *G. mosseae* kolonisierten Wurzeln bestätigt wurde. Die Beteiligung mehrerer Mitglieder einer Genfamilie deutet darauf hin, dass Trypsin-Inhibitoren unterschiedliche Aufgaben in der Mykorrhizaentwicklung besitzen. Denkbar sind Unterschiede in ihren Enzymeigenschaften sowie eine zeitliche oder räumliche Trennung ihrer Aktivität. In einer Interaktion zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices* konnte die für einen dieser Trypsin-Inhibitoren (TC69297) mit arbuskelhaltigen Zellen korreliert werden (Abbildung 4-2). Der Expressionsanstieg bei Interaktionen mit dem Wurzelpathogenen *A. euteiches* war nur sehr schwach im Vergleich zur Mykorrhiza.



**Abbildung 4-2 Lokalisierung der Genaktivität eines Trypsin-Inhibitors (TC69297).** Das  $\beta$ -Glukuronidase-Gen wurde unter die Kontrolle des Trypsin-Inhibitor Promotors gebracht. Nach Transformation in *M. truncatula* und Inokulierung mit dem AM Pilz *G. intraradices* wurden nach vier Wochen die Wurzeln geerntet und hinsichtlich der  $\beta$ -Glukuronidase-Aktivität angefärbt. (Bilder von F. Krajinski, Universität Hannover)

Bedingt durch die stringenten Auswertungskriterien bleiben einige differentielle exprimierte Gene möglicherweise unberücksichtigt, wie es zum Beispiel für ein weiteres Metallothionein (Klon 13) zutrifft. Das Gen aus der Erbse zeigte bei Hybridisie-

rungen mit den heterologen Sonden aus *M. truncatula* eine erhöhte Expression in der Mykorrhiza. Aufgrund des relativ niedrigen Induktionslevels von 3,06 wurde dieses Gen in der Erbse nicht als differentiell exprimiert identifiziert. Die Veränderung der Genexpression könnte vermutlich mit einer alternativen Methode, wie der Real-Time-PCR, nachgewiesen werden. Einige transkriptionelle Veränderungen, die durch Hybridisierungen oder „Electronic Northern“ Analysen beobachtet wurden, konnten dadurch bestätigt werden. Die Expressionshöhen Mykorrhiza-regulierter Pflanzengene wurde relativ zu denen des *MtTef-1 $\alpha$*  bestimmt. Das Gen *MtTef-1 $\alpha$*  zeigt unter verschiedenen Bedingungen eine konstitutive Expression und eignet sich daher als interner Standard (Wulf et al., 2003). Das Protein TEF-1 $\alpha$  ist sehr zahlreich in eukaryotischen Zellen enthalten und katalysiert die Bindung von tRNA-Molekülen an die Ribosomen (Slobin, 1980).

Obwohl das Genom der Erbse zehnmal größer als das von *Medicago* ist, zeigen vergleichende Analysen eine hohe Syntenie zwischen den beiden Leguminosen. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit konnten auch auf transkriptioneller Ebene eine große Ähnlichkeit der beiden Arten bestätigen. *M. truncatula* ist daher als Modellorganismus geeignet, um wichtige Agrarpflanzen in Hinblick auf Ertrag, Saatqualität, Produktion von Sekundärmetaboliten, symbiontische Interaktionen und Krankheitsresistenzen genauer zu charakterisieren (Journet et al., 2001). Die proteinreichen Samen von Körnerleguminosen, wie der Erbse oder der Ackerbohne sowie die ölreichen Samen der Sojabohne, bilden einen wichtigen Bestandteil der menschlichen Ernährung und werden darüber hinaus auch in der Tierzucht als Futtermittel verwendet. Daneben werden auch kleinsämige Leguminosen, wie *Medicago sativa* und *M. truncatula*, unter anderem aufgrund ihrer proteinreichen Blätter, als Tierfutter eingesetzt.

### **4.3 Induktion von *Mtha1* in symbiontischen Geweben**

H<sup>+</sup>-ATPase sind Membran-gebundene Proteine, die durch ATP-Hydrolyse angetriebenen Protonen in den extrazellulären Raum transportieren. H<sup>+</sup>-ATPasen vom P-Typ unterscheiden sich sehr deutlich hinsichtlich ihrer Biochemie, molekularen Aufbaus, Reaktionsmechanismus und evolutionären Ursprungs sehr deutlich von den mitochondrialen (F-Typ) und den vakuolaren H<sup>+</sup>-ATPasen (V-Typ). Sie wurden ausschließlich in Plasmamembranen von Pflanzen und Pilzen entdeckt und bestehen

aus einer Peptidkette mit vermutlich 10 Transmembrandomänen. P-Typ ATPasen sind eine große Familie, die während des katalytischen Zyklus ein Aspartyl-Phosphat-Intermediat bilden, Vanadat sensitiv sind und ähnlichen Domänenstrukturen besitzen. Nach Abschluss des *Arabidopsis* Genom Sequenzierungsprojekts wurden in *Arabidopsis thaliana* 12 unterschiedliche H<sup>+</sup>-ATPasen gefunden (Palmgren, 2001), während in *M. truncatula* mindestens neun existieren (Krajinski et al., 2002). Die einzelnen H<sup>+</sup>-ATPase Gene besitzen vermutlich spezifische Funktionen in der Pflanze und ihre Transkription könnte daher über physiologische Faktoren und Umweltreize reguliert werden. Expressionsanalysen zeigten eine Transkriptakkumulierung der Gene *Lha2* und *Lha3* aus Tomate durch Applikation von Zuckern (Mito et al., 1996), während *Lha8* (Kalampanayil & Wimmers, 2001) und *Osa3* (Zhang et al., 1999) aus Reis durch Salzstress induziert wurden. *Mtha1* ist eine von drei untersuchten H<sup>+</sup>-ATPase-Genen aus *M. truncatula* und zeigte als einzige eine Induktion durch Mykorrhizierung mit dem AM Pilz *G. mosseae*. Im Gegensatz zu einer Mykorrhiza-induzierten H<sup>+</sup>-ATPase aus Gerste kann durch eine erhöhte Phosphatversorgung keine verstärkte Genexpression von *Mtha1* beobachtet werden (Krajinski et al., 2002; Murphy et al., 1997). Außerdem wurden in Kontrollwurzeln keine Transkripte detektiert, während Mykorrhiza-regulierte H<sup>+</sup>-ATPase Gene aus Tabak, Gerste und Tomate (Ferrol et al., 2002; Gianinazzi-Pearson et al., 2000; Murphy et al., 1997) auch hier exprimiert wurden. Im Falle von Tabak ist dies vermutlich auf eine Aktivität in Wurzelspitzen zurückzuführen.

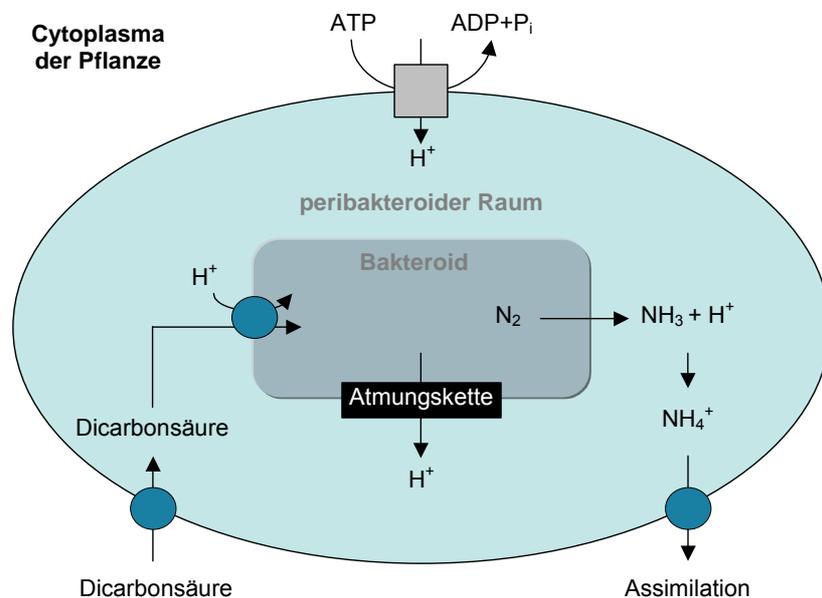
Aktivitätszunahmen von H<sup>+</sup>-ATPasen wurden in spezifischen pflanzlichen Geweben oder Zellen gefunden, wie beispielsweise in Wurzelspitzen, Wurzelhaaren und Epidermis sowie Schließ- und Transferzellen. Durch *in situ* Hybridisierung konnte in mykorrhizierten Wurzeln eine Transkriptakkumulierung von *Mtha1* ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen gezeigt werden (Krajinski et al., 2002). Eine Lokalisierung der Genexpression kann auch mittels Reportergenfusionen erfolgen, wie Untersuchungen der *Arabidopsis*-Gene *aha2*, *aha3* und *aha10* zeigten (DeWitt et al., 1991; Harper et al., 1994; Sussman, 1994). Die 5' nicht-translatierte Region von *Mtha1* trägt einige interessante Strukturen, wie ein Intron vor dem Translationsstart sowie ein weiterer offener Leserahmen stromaufwärts vom Transkriptionsstart der ATPase. Ein 5' nicht-translatierter Bereich, der beide Strukturen enthält, wurde an eine  $\beta$ -Glukuronidase fusioniert und zeigte nach Transformation in Wurzeln von *M. truncatula* eine spezifische Aktivität in arbuskelhaltigen Zellen.

Die Funktion der H<sup>+</sup>-ATPase ist der energieverbrauchende Protonentransport über eine Plasmamembran in den Apoplasten pflanzlicher Zellen. Die Arbuskelkorrelierende Expression solcher Gene, wie *Mtha1*, *Npha2* und *Npha4* führt zu einer Ansäuerung der Schnittstelle zwischen Pflanze und Pilz. Es existieren Hinweise, dass dieser elektrochemische Gradient am Nährstoffaustausch zwischen Pflanzen und Mikroorganismen beteiligt ist. Entsprechende H<sup>+</sup>/P<sub>i</sub> Symporter wurden bereits in arbuskelhaltigen Zellen von *M. truncatula* (Harrison et al., 2002), *S. tuberosum* (Rausch et al., 2001) und in *Oryza sativa* (Paszkowski et al., 2002) detektiert.

Eine alternative Funktion ist die Involvierung an einem spezifischen Signalprozess in arbuskelhaltigen Kortexzellen, wie es in der Tomate als Antwort auf Gewebsverletzung oder eines Pathogenbefalls beobachtet wurde (Schaller & Oecking, 1999). Außerdem könnte die Ansäuerung der Matrix das Wachstum des Mykobionten regulieren, da Hyphenwachstum von einem pH-Gradienten abhängig ist (Robson et al., 1996).

Neben den arbuskelhaltigen Zellen konnte eine verstärkte Aktivität des *Mtha1*-Promotors auch im symbiontischen Gewebe von Wurzelknöllchen in *M. truncatula* nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur arbuskulären Mykorrhiza beschränkt sich die Endosymbiose mit stickstofffixierenden Bakterien nur auf wenige Pflanzenfamilien. Dennoch zeigen beide Endosymbiosen Ähnlichkeiten in Bezug auf Morphologie und Physiologie. Der Entstehung stickstofffixierender Knöllchen an den Wurzeln von Leguminosen geht ein gegenseitiger Signalaustausch zwischen Pflanze und Mikroorganismus voraus. Nach Kontakt mit der Epidermis dringen die Bakterien über die Wurzelhaare durch einen Infektionsschlauch, der seitens der Wirtspflanze durch Cellulose abgekapselt wird, in das Rindengewebe ein. Die Wirtszellen vermehren und vergrößern sich unter der Wirkung der Infektion (Ausscheidung von Indol-3-Essigsäure) und es kommt zur Entstehung der Wurzelknöllchen, deren innere Zellen dicht von den jetzt aus den Infektionsschläuchen austretenden Bakterien erfüllt sind. Ähnlich wie die Arbuskeln der AM Pilze werden die Bakterien in den Knöllchen von einer pflanzlichen Plasmamembran, der so genannten Peribakteroidmembran, umgeben, über die der gegenseitige Nährstoffaustausch erfolgt. Die Bakterien verändern bald ihre Gestalt in Bakterioide und erhalten vom Wirt vor allem Kohlenstoffverbindungen, in der Regel Dicarbonsäuren, und geben die Produkte ihrer N<sub>2</sub>-Fixierung überwiegend als NH<sub>4</sub><sup>+</sup> an diesen ab (Strasburger et al., 1999). Der Transfer dieser Nährstoffe ist an einen Protonengradient gekoppelt, der durch P-Typ ATPasen gene-

riert wird. Pflanzliche  $H^+$ -ATPase pumpen Protonen über die Peribakteroidmembran aus dem Cytoplasma. Der pH-Wert im peribakteroiden Raum wird zusätzlich durch den Protonentransport der bakteriellen Atmungskette erniedrigt. Dieser elektrochemische Gradient wird einerseits genutzt zur Versorgung der Bakterien mit Dicarbonsäuren andererseits zur Reduktion von Ammoniak ( $NH_3$ ) zu Ammonium ( $NH_4^+$ ). Ammonium wird dann über einen  $NH_4^+$ -Kanal von der Pflanze aufgenommen (Fedorova et al., 1999; Udvardi & Day, 1997) (Abbildung 4-3). Campos et al. isolierten ein cDNA-Fragment kodierend für eine P-Typ ATPase aus *Phaseolus*-Knöllchen. Durch eine Immunlokalisierung konnte dieses Protein nur in nicht-infizierten Zellen des Knöllchens gefunden werden (Campos et al., 1996). Ob *Mtha1* in der Peribakteroidmembran lokalisiert ist, konnte nicht genau geklärt werden.



**Abbildung 4-3 Schematische Darstellung des Nährstoffaustausch in der Knöllchensymbiose.** (Modifiziert nach M. Udvardi)

Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Aktivierung von  $H^+$ -ATPasen durch das Auxinderivat Indol-3-Essigsäure. Es wird vermutet, dass die Regulation der  $H^+$ -ATPasen über ein 14-3-3-Protein erfolgt, welches Phosphorylierungsreaktionen erleichtert. Dieses Protein dient als Rezeptor für das Fusicoccin, einem Toxin aus dem Pathogen *Fusicoccum amygdali*. Aufgrund der starken Ähnlichkeit zu Fusicoccin wird Auxin ebenfalls als Bindungspartner eines 14-3-3-Proteins vermutet (Varner, 2000). Möglicherweise reguliert auch der AM Pilz *G. rosea* die Aktivität von  $H^+$ -ATPasen über ein 14-3-3-Protein, da es in kolonisierten *Medicago*-Wurzeln verstärkt exprimiert wird. Die

Ansäuerung der Zellwand, bedingt durch eine H<sup>+</sup>-ATPase-Aktivität, ist eine wichtige Komponente des zellulären Streckungswachstums (Evans, 1985; Rayle & Cleland, 1992; Serrano, 1989). Die Erhöhung von Indol-3-Essigsäure in nodulierten Pflanzen (Thimann, 1936) sowie die Vergrößerung infizierter Zellen (Fedorova et al., 1999) in den Knöllchen spricht für eine Beteiligung von *Mtha1*. Weiter Untersuchungen von P-Typ ATPasen und deren Induktion durch Phytohormone, zeigte das lediglich ABA eine H<sup>+</sup>-ATPase in Früchten von Apfelbäumen aktivieren kann (Peng et al., 2003). Auch die Transkriptom-Analysen in *M. truncatula* zeigten keine Induktion von *Mtha1* oder anderen ATPasen durch IBA oder ABA. Eine Induktion von *Mtha1* durch Jasmonat konnte ebenfalls nicht gezeigt werden.

Nach den bisherigen Kenntnissen wird das Gen *Mtha1* nur durch die Interaktion mit AM Pilzen und Knöllchenbakterien induziert. Die Frage, welcher Bereich des Promotors regulatorische Funktion besitzt und ob beide Symbionten den gleichen Mechanismus zur Aktivierung des Promotors verwenden, soll durch Deletionen der 5' nicht-translatierten Region des H<sup>+</sup>-ATPase-Gens geklärt werden. Verschiedene Promotorkonstrukte wurden bereits mit einem Reporter gen fusioniert und werden zurzeit auf deren Aktivität in mykorrhizierten und nodulierten Pflanzen untersucht.

In dieser Arbeit wurden durch cDNA-Array-Hybridisierungen Transkriptionsprofile der Modellpflanzen *M. truncatula* und *P. sativum* erstellt. Innerhalb dieser Analysen eröffnet die Identifizierung von Mykorrhiza-regulierten Genen neue Einblicke in die molekularen Vorgänge der arbuskulären Mykorrhizasymbiose. Neben einer Bestätigung der differentiellen Genexpression mit alternativen Methoden können diese Gene für weitere Untersuchungen hinsichtlich einer Expression im Zeitverlauf, Lokalisierung im Organismus und Charakterisierung der Genprodukte dienen. Gene aus *M. truncatula* Transkriptionsprofilen werden zum Aufbau einer Internet-Datenbank verwendet und stehen zunächst Mitgliedern des DFG-Schwerpunktes „Molekulare Grundlagen der Mykorrhizasymbiosen“ zur Verfügung.

## 5 Literatur

Aharoni, A. & Vorst, O. (2002). DNA microarrays for functional plant genomics. *Plant Molecular Biology* **48**, 99-118.

Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. & Gordon, M. P. (1984). T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 5994-5998.

Albrecht, C., Geurts, R., Lapeyrie, F. & Bisseling, T. (1998). Endomycorrhizae and rhizobial Nod factors both require SYM8 to induce the expression of the early nodulin genes *PsENOD5* and *PsENOD12A*. *Plant Journal* **15**, 605-614.

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, J. T. S. & Christensen, M. (1982). Phytohormone changes in *Bouteloua gracilis* infected by vesicular-arbuscular mycorrhizae. II Altered levels of gibberillin-like substances and abscisic acid in the host plant. *Canadian Journal of Botany* **60**, 468-471.

Arines, J., Palma, J. M. & Vilarino, A. (1993). Comparison of protein patterns in non-mycorrhizal and vesicular-arbuscular mycorrhizal roots of red clover. *New Phytologist* **123**, 763-768.

Ashford, A. E. & Allaway, W. G. (2002). The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **244**, 177-187.

Augé, R. M. (2000). Stomatal behavior of arbuscular mycorrhizal plants. In *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*, pp. 201-237. Edited by Y. Kapulnik & D. D. Douds Jr. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.

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.

Balestrini, R., Berta, G. & Bonfante, P. (1992). The plant nucleus in mycorrhizal roots: Positional and structural modifications. *Biology of the Cell* **75**, 235-243.

Balestrini, R., Romera, C., Puigdomenech, P. & Bonfante, P. (1994). Location of a cell-wall hydroxyproline-rich glycoprotein, cellulose and  $\beta$ -1,3-glucans in apical and differentiated regions of maize mycorrhizal roots. *Planta* **195**, 201-209.

Barker, S. J., Stummer, B., Gao, L., Dispain, I., Oconnor, P. J. & Smith, S. E. (1998). A mutant in *Lycopersicon esculentum* Mill. with highly reduced VA mycorrhizal colonization - isolation and preliminary characterisation. *Plant Journal* **15**, 791-797.

Barker, S. J. & Tagu, D. (2000). The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 144-154.

Berna, A. & Bernier, F. (1997). Regulated expression of a wheat germin gene in tobacco - oxalate oxidase activity and apoplastic localization of the heterologous protein. *Plant Molecular Biology* **33**, 417-429.

Berna, A. & Bernier, F. (1999). Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme. *Plant Molecular Biology* **39**, 539-549.

Berta, G., Tagliasacchi, A. M., Fusconi, A., Gerlero, D., Trotta, A. & Scannerini, S. (1991). The mitotic-cycle in root apical meristems of *Allium porrum* L. is controlled by the endomycorrhizal fungus *Glomus* sp. strain E3. *Protoplasma* **161**, 12-16.

- Bevege, D. I., Bowen, G. D. & Skinner, M. E. (1975).** Comparative carbohydrate physiology of ecto- and endomycorrhizas. In *Endomycorrhizas*, pp. 149-174. Edited by F. E. Sanders, B. Mosse & P. B. Tinker. London: Academic Press.
- Blee, E. (1998).** Biosynthesis of phytooxylipins - the peroxygenase pathway. *Lipid* **100**, 121-127.
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Becard, G., Rosenberg, C. & Barker, D. G. (2001).** *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 695-700.
- Boller, T. (1991).** Ethylene in pathogenesis and disease resistance. In *The plant hormone ethylene*, pp. 293-314. Edited by A. K. Mattoo & J. C. Suttle. Boca Raton: CRC Press.
- Bonfante, P., Bergero, R., Uribe, X., Romera, C., Rigau, J. & Puigdomenech, P. (1996).** Transcriptional activation of a maize  $\alpha$ -tubulin gene in mycorrhizal maize and transgenic tobacco plants. *Plant Journal* **9**, 737-743.
- Bonfante, P. & Perotto, S. (1995).** Transley review No. 82 Strategies of arbuscular mycorrhizal fungi when infecting host plants. *New Phytologist* **130**, 3-21.
- Bothe, H., Klingner, A., Kaldorf, M., Schmitz, O., Esch, H., Hundeshagen, B. & Kernebeck, H. (1994).** Biochemical approaches to the study of plant-fungal interactions in arbuscular mycorrhiza. *Experientia* **50**, 919-925.
- Bradley, D. J., Kjellbom, P. & 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.
- Brechenmacher, L., Weidmann, S., van Tuinen, D., Chatagnier, O., Gianinazzi, S., Franken, P. & Gianinazzi-Pearson, V. (2004).** Expression profiling of up-regulated plant and fungal genes in early and late stage of *Medicago truncatula*-*Glomus mosseae* interactions. *Mycorrhiza: in press*.
- Briskin, D. P. (1990).** The plasma membrane  $H^+$ -ATPase of higher plant cells: Biochemistry and transport function. *Biochimica et Biophysica Acta* **1019**, 95-109.
- Brundrett, M. C., Abbott, L. K. & Jasper, D. A. (1999).** Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia I. Comparison of the effectiveness and specificity of different isolation procedures. *Mycorrhiza* **8**, 305-314.
- Buee, M., Rossignol, M., Jauneau, A., Ranjeva, R. & Becard, G. (2000).** The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 693-698.
- Burleigh, S. H., Cavagnaro, T. & Jakobsen, I. (2002).** Functional diversity of arbuscular mycorrhizas extends to the expression of plant genes involved in P nutrition. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1593-1601.
- Butt, A., Mousley, C., Morris, K., Beynon, J., Can, C., Holub, E., Greenberg, J. T. & Buchanan-wollaston, V. (1998).** Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Journal* **16**, 209-221.
- Campos, F., Perezcastineira, J. R., Villalba, J. M., Culiandezmarcia, F. A., Sanchez, F. & Serrano, R. (1996).** Localization of plasma membrane  $H^+$ -ATPase in nodules of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Molecular Biology* **32**, 1043-1053.
- Carvalho, L. M., Cacador, I. & Martins-Loucao, M. A. (2001).** Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza* **11**, 303-309.

- Chabaud, M., Larsonneau, C., Marmouget, C. & Huguet, T. (1996).** Transformation of barrel medic (*Medicago truncatula* Gaertn.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration via somatic embryogenesis of transgenic plants with the MtENOD12 nodulin promote fused to the GUS reporter gene. *Plant Cell Reports* **15**, 305-310.
- Chiang, C. C. & Hadwiger, L. A. (1991).** The *Fusarium solani*-induced expression of a pea gene family encoding high cysteine content proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **4**, 324-31.
- Chiou, T. J., Liu, H. & Harrison, M. J. (2001).** The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role in phosphate transport at the root/soil interface. *Plant Journal* **25**, 281-293.
- Cohen, J. D. (1984).** Convenient apparatus for the generation of small amounts of diazomethane. *Journal of Chromatography* **303**, 193-196.
- Corkidi, L. & Rincón, E. (1997).** Arbuscular mycorrhizae in a tropical sand dune ecosystem on the Gulf of Mexico. I. Mycorrhizal status and inoculum potential along a successional gradient. *Mycorrhiza* **7**, 9-15.
- Costacurta, A. & Vanderleyden, J. (1995).** Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria [Review]. *Critical Reviews in Microbiology* **21**, 1-18.
- Creelman, R. A. & Mullet, J. E. (1997).** Biosynthesis and action of jasmonates in plants [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **48**, 355-381.
- Dalpé, Y., Diop, T. A., Plenchette, C. & Gueye, M. (2000).** Glomales species associated with surface and deep rhizosphere of *Faidherbia albida* in Senegal. *Mycorrhiza* **10**, 125-129.
- Danneberg, G., Latus, C., Zimmer, W., Hundeshagen, B., Schneider-Poetsch, H. & Bothe, H. (1993).** Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on phytohormone balances in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Physiology* **141**, 33-39.
- Daram, P., Brunner, S., Persson, B. L., Amrhein, N. & Bucher, M. (1998).** Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. *Planta* **206**, 225-233.
- Delp, G., Smith, S. E. & Barker, S. J. (2000).** Isolation by differential display of three partial cDNAs potentially coding for proteins from the VA mycorrhizal *Glomus intraradices*. *Mycological Research* **104**, 293-300.
- DeWitt, N. D., Harper, J. F. & Sussman, M. R. (1991).** Expression of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in phloem cells. *Plant Journal* **1**, 121-128.
- Doll, J., Hause, B., Demchenko, K., Pawlowski, K. & Krajinski, F. (2003).** A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. *Plant & Cell Physiology* **44**, 1208-1214.
- Dondrup, M., Goesmann, A., Bartels, D., Kalinowski, J., Krause, L., Linke, B., Rupp, O., Sczyrba, A., Puhler, A. & Meyer, F. (2003).** EMMA: A platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *Journal of Biotechnology* **106**, 135-146.
- Drew, J. E. & Gatehouse, J. A. (1994).** Isolation and characterization of a pea pod cDNA encoding a putative blue copper protein correlated with lignin deposition. *Journal of Experimental Botany* **45**, 1873-1884.
- Duc, G., Trouvelot, A., Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (1989).** First report of non-mycorrhizal mutants (myc<sup>-</sup>) obtained in pea (*Pisum sativum* L.) and fababean (*Vicia faba* L.). *Plant Science* **60**, 215-222.
- Dudoit, S., Yang, Y. H., Callow, M. J. & Speed, T. P. (2002).** Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. *Statistica Sinica* **12**, 111-139.

- Duff, S. M., Plaxton, W. C. & Lefebvre, D. D. (1991).** Phosphate-starvation response in plant cells: *De novo* synthesis and degradation of acid phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 9538-9542.
- Dunlop, J. & Gardiner, S. (1983).** Phosphate uptake, proton extrusion and membrane electropotentials of phosphorous deficient *Trifolium repens*. *Journal of Experimental Botany* **44**, 1801-1808.
- Engvild, K. C. (1987).** Nodulation and nitrogen fixation mutants of pea, *Pisum sativum* L. *Theoretical and Applied Genetics* **74**, 711-713.
- Esch, H., Hundeshagen, B., Schneider-Poetsch, H. & Bothe, H. (1994).** Demonstration of abscisic acid in spores and hyphae of the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus* and in the N<sub>2</sub>-fixing cyanobacterium *Anabena variabilis*. *Plant Science* **99**, 9-16.
- Evans, K. M., Gatehouse, J. A., Lindsay, W. P., Shi, J., Tommey, A. M. & Robinson, N. J. (1992).** Expression of the pea metallothionein-like gene *PsMTA* in *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace metal ion accumulation: implications for *PsMTA* function. *Plant Molecular Biology* **20**, 1019-28.
- Evans, M. L. (1985).** The action of auxin on plant cell elongation. *Critical Review in Plant Science* **2**, 317-365.
- Ezawa, T., Smith, S. E. & Smith, F. A. (2002).** P metabolism and transport in AM fungi. *Plant & Soil* **244**, 221-230.
- Farmer, E. E., Weber, H. & Vollenweider, S. (1998).** Fatty acid signalling in *Arabidopsis* [Review]. *Planta* **206**, 167-174.
- Fedorova, E., Thomson, R., Whitehead, L. F., Maudoux, O., Udvardi, M. K. & Day, D. A. (1999).** Localization of H<sup>+</sup>-ATPase in soybean root nodules. *Planta* **209**, 25-32.
- Fedorova, M., van de Mortel, J., Matsumoto, P. A., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A., Gantt, J. S. & Vance, C. P. (2002).** Genome-wide identification of nodule-specific transcripts in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **130**, 519-537.
- Ferrol, N., Pozo, M. J., Antelo, M. & Azcon-Aguilar, C. (2002).** Arbuscular mycorrhizal symbiosis regulates plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene expression in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1683-1687.
- Fitter, A. H. & Moyersoen, B. (1996).** Evolutionary trends in root-microbe symbioses. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* **351**, 1367-1375.
- Frank, B. (1885).** Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft* **3**, 128-148.
- Franken, P. & Gnädinger, F. (1994).** Analysis of parsley arbuscular endomycorrhiza: Infection development and mRNA levels of defense-related genes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 612-620.
- Franken, P. & Requena, N. (2001).** Molecular approaches to arbuscular mycorrhiza functioning. In *The Mycota IX: Fungal associations*, pp. 19-28. Edited by B. Hock. Heidelberg: Springer Verlag.
- Gao, L. L., Delp, G. & Smith, S. E. (2001).** Colonization patterns in a mycorrhiza-defective mutant tomato vary with different arbuscular-mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **151**, 477-491.
- Gaur, A. & Adholeya, A. (2002).** Arbuscular-mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. *Biology & Fertility of Soils* **35**, 214-218.

- Geil, R. D. & Guinel, F. C. (2002).** Effects of elevated substrate-ethylene on colonization of leek (*Allium porrum*) by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus aggregatum*. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne de Botanique* **80**, 114-119.
- Genre, A. & Bonfante, P. (1997).** A mycorrhizal fungus changes microtubule orientation in tobacco root cells. *Protoplasma* **199**, 30-38.
- Genre, A. & Bonfante, P. (1998).** Actin versus tubulin configuration in arbuscule-containing cells from mycorrhizal tobacco roots. *New Phytologist* **140**, 745-752.
- 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-Pearson, V., Arnould, C., Oufattole, M., Arango, M. & Gianinazzi, S. (2000).** Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* **211**, 609-613.
- Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahhiri-Alaoui, A. & Gianinazzi, S. (1996).** Cellular and molecular defence-related root response to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **133**, 45-57.
- Gianinazzi-Pearson, V. & Gianinazzi, S. (1988).** Morphological interactions and functional compatibility between symbionts in vesicular arbuscular endomycorrhizal associations. In *Cell to Cell Signals in Plant, Animal and Microbial Symbiosis*, pp. 73-84. Edited by S. Scannerini. Berlin: Springer-Verlag.
- Gianinazzi-Pearson, V., Gianinazzi, S., Guillemin, J. P., Trouvelot, A. & Duc, G. (1991).** Genetic and cellular analysis of resistance to vesicular arbuscular (VA) mycorrhizal fungi in pea mutants. In *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*, pp. 336-342. Edited by H. Hennecke & D. P. S. Verma. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Gianinazzi-Pearson, V., Smith, S. E., Gianinazzi, S. & Smith, F. A. (1991).** Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas V. Is H<sup>+</sup>-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interfaces? *New Phytologist* **117**, 61-74.
- Giudici, A. M., Regente, M. C. & de la Canal, L. (2000).** A potent antifungal protein from *Helianthus annuus* flowers is a trypsin inhibitor. *Plant Physiology & Biochemistry* **38**, 881-888.
- Gogala, N. (1991).** Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia* **47**, 331-340.
- Gollote, A., Gianinazzi-Pearson, V., Giovannetti, M., Sbrana, C., Avio, L. & Gianinazzi, S. (1993).** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi and locus 'a' myc<sup>-</sup> mutant of *Pisum sativum*. *Planta* **191**, 112-122.
- Grunwald, U. (2000).** Identifizierung Mykorrhiza-regulierter Gene in *Medicago truncatula* und *Pisum sativum*. In *Fachbereich Biologie*, pp. 70. Marburg: Philipps-Universität-Marburg.
- Guadarrama, P. & Alvarez-Sanchez, F. J. (1999).** Abundance of arbuscular mycorrhizal fungi spores in different environments in a tropical rain forest, Veracruz, Mexico. *Mycorrhiza* **8**, 267-270.
- Gunning, B. E. S. & Hardham, A. R. (1982).** Microtubules. *Annual Review of Plant Physiology* **33**, 651-698.
- Gunze, C. M. B. & Hennessy, C. M. R. (1980).** Effect of host-applied auxin on development of endomycorrhiza in cowpeas. *Transactions of the British Mycological Society* **74**, 247-251.
- Harley, J. L. & Harley, E. L. (1987).** A check list of mycorrhiza in the British flora. *New Phytologist* **105**, 1-102.

- Harper, J. F., Manney, L. & Sussman, M. R. (1994).** The plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene family in *Arabidopsis*: genomic sequence of AHA10 which is expressed primarily in developing seeds. *Molecular and General Genetics* **244**, 572-587.
- Harrison, M. J. (1996).** A sugar transporter from *Medicago truncatula* - Altered expression pattern in roots during vesicular-arbuscular (VA) mycorrhizal associations. *Plant Journal* **9**, 491-503.
- Harrison, M. J. (1999).** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50**, 361-389.
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R. & Liu, J. Y. (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., Maier, W., Miersch, O., Kramell, R. & Strack, D. (2002).** Induction of jasmonate biosynthesis in arbuscular mycorrhizal barley roots. *Plant Physiology* **130**, 1213-1220.
- Heery, D. M., Gannon, F. & Powell, R. (1990).** A simple method for subcloning DNA fragments from gel slices. *Trends in Genetics* **6**, 173.
- Holford, I. C. R. (1997).** Soil phosphorus - its measurement, and its uptake by plants. *Australian Journal of Soil Research* **35**, 227-239.
- Hurkman, W. J. & Tanaka, C. K. (1996).** Effect of salt stress on germin gene expression in barley roots. *Plant Physiology* **110**, 971-977.
- Jonak, C., Ligterink, W. & Hirt, H. (1999).** MAP kinases in plant signal transduction [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **55**, 204-213.
- Jonak, C., Pay, A., Bogre, L., Hirt, H. & Heberle-Bors, E. (1993).** The plant homologue of MAP kinase is expressed in a cell cycle-dependent and organ specific manner. *Plant Journal* **3**, 611-617.
- Jones, P. G., Allaway, D., Gilmour, D. M., Harris, C., Rankin, D., Retzel, E. R. & Jones, C. A. (2002).** Gene discovery and microarray analysis of cacao (*Theobroma cacao* L.) varieties. *Planta* **216**, 255-264.
- Journet, E. P., Carreau, V., Gouzy, J., Thoquet, P., Rosenberg, C., Barker, D., Huguet, T., Denarie, J. & Gamas, P. (2001).** The model legume *Medicago truncatula*: recent advances and perspectives in genomics [French]. *Ocl-Oleagineux Corps Gras Lipides* **8**, 478-484.
- Journet, E. P., van Tuinen, D., Gouzy, J., Crespeau, H., Carreau, V., Farmer, M. J., Niebel, A., Schiex, T., Jaillon, O., Chatagnier, O., Godiard, L., Micheli, F., Kahn, D., Gianinazzi-Pearson, V. & Gamas, P. (2002).** Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research* **30**, 5579-5592.
- Kahl, J., Siemens, D. H., Aerts, R. J., Gabler, R., Kuhnemann, F., Preston, C. A. & Baldwin, I. T. (2000).** Herbivore-induced ethylene suppresses a direct defense but not a putative indirect defense against an adapted herbivore. *Planta* **210**, 336-342.
- Kalampanayil, B. D. & Wimmers, L. E. (2001).** Identification and characterization of a salt-stress-induced plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in tomato. *Plant, Cell & Environment* **24**, 999-1005.
- Kaldorf, M. & Ludwig-Müller, J. (2000).** AM fungi might affect the root morphology of maize by increasing indole-3-butyric acid biosynthesis. *Physiologia Plantarum* **109**, 58-67.
- Kamate, K., Rodriguez-Llorente, I. D., Scholte, M., Durand, P., Ratet, P., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Trinh, T. H. (2000).** Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*. *Plant Cell Reports* **19**, 647-653.

- Khan, A. G. (1993).** Occurrence and importance of mycorrhizae in aquatic trees of New South Wales, Australia. *Mycorrhiza* **3**, 31-38.
- Kistner, C. & Parniske, M. (2002).** Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis [Review]. *Trends in Plant Science* **7**, 511-518.
- Kosuta, S., Chabaud, M., Lougnon, G., Gough, C., Denarie, J., Barker, D. G. & Becard, G. (2003).** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **131**, 952-962.
- Krajinski, F. (1999).** Molecular analysis of mycorrhiza-regulated genes in *Medicago truncatula*. In *Fachbereich Biologie*, pp. 71. Marburg: Philipps-Universität-Marburg.
- Krajinski, F., Biela, A., Schubert, D., Gianinazzi-Pearson, V., Kaldenhoff, R. & Franken, P. (2000).** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of *Mtaqp1* encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* **211**, 85-90.
- Krajinski, F., Hause, B., Gianinazzi-Pearson, V. & Franken, P. (2002).** *Mtha1*, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biology* **4**, 754-761.
- Küster, H., Hohnjec, N., Krajinski, F., El Yahyaoui, F., Manthey, K., Gouzy, J., Dondrup, M., Meyer, F., Kalinowski, J., Brechenmacher, L., van Tuinen, D., Gianinazzi-Pearson, V., Puhler, A., Gamas, P. & Becker, A. (2004).** Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Biotechnology* **108**, 95-113.
- Landwehr, M., Hildebrandt, U., Wilde, P., Nawrath, K., Toth, T., Biro, B. & Bothe, H. (2002).** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza* **12**, 199-211.
- Lane, B. G. (1991).** Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and maturation and germination of seed embryos. *FASEB Journal* **5**, 2893-2901.
- Lapopin, L. (1999).** Investigation of plant and fungal gene expression associated with arbuscule differentiation in arbuscular mycorrhiza: comparison of wild type and an arbuscule-defective mutant pea. Dijon: Université de Bourgogne.
- Lapopin, L. & Franken, P. (2000).** Modification of plant gene expression. In *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*, pp. 69-84. Edited by Y. Kapulnik & D. D. Douds Jr. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Lapopin, L., Gianinazzi-Pearson, V. & Franken, P. (1999).** Comparative differential RNA display analysis of arbuscular mycorrhiza in *Pisum sativum* wild type and a mutant defective in late stage development. *Plant Molecular Biology* **41**, 669-677.
- Lefebvre, D. D., Duff, S. M., Fife, C. A., Julien-Inalsingh, C. & Plaxton, W. C. (1990).** Response to phosphate deprivation on *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiology* **85**, 315-317.
- Leggewie, G., Willmitzer, L. & Riesmeier, J. W. (1997).** Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant - Identification of phosphate transporters from higher plants. *Plant Cell* **9**, 381-392.
- Lerat, S., Lapointe, L., Gutjahr, S., Piche, Y. & Vierheilig, H. (2003).** Carbon partitioning in a split-root system of arbuscular mycorrhizal plants is fungal and plant species dependent. *New Phytologist* **157**, 589-595.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R. & Lamb, C. J. (1994).** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**, 583-593.

- Ligterink, W., Kroj, T., Zurnieden, U., Hirt, H. & Scheel, D. (1997).** Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**, 2054-2057.
- Lingua, G., D'Agostino, G., Massa, N., Antosiano, M. & Berta, G. (2002).** Mycorrhiza-induced differential response to a yellows disease in tomato. *Mycorrhiza* **12**, 191-198.
- Lipton, D. S., Blanchar, R. W. & Blevins, D. G. (1987).** Citrate, malate and succinate concentration in exudates from P-sufficient and P-stressed *Medicago sativa* L. seedlings. *Plant Physiology* **85**, 315-317.
- Liu, C. M., Muchhal, U. S., Uthappa, M., Kononowicz, A. K. & Raghothama, K. G. (1998).** Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus. *Plant Physiology* **116**, 91-99.
- Liu, H., Trieu, A. T., Blaylock, L. A. & Harrison, M. J. (1998).** Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots - Regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 14-22.
- Liu, J. Y., Blaylock, L. A., Endre, G., Cho, J., Town, C. D., VandenBosch, K. A. & Harrison, M. J. (2003).** Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **15**, 2106-2123.
- Logan, H., Basset, M., Very, A. A. & Sentenac, H. (1997).** Plasma membrane transport systems in higher plants - From black boxes to molecular physiology [Review]. *Physiologia Plantarum* **100**, 1-15.
- Lu, X. & Koide, R. T. (1994).** The effects of mycorrhizal infection on components of plant growth and reproduction. *New Phytologist* **128**, 211-218.
- Ludwig-Müller, J., Kaldorf, M., Sutter, E. G. & Epstein, E. (1997).** Indole-3-butyric acid (IBA) is enhanced in young maize (*Zea mays* L.) roots colonized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Plant Science* **125**, 153-162.
- Lynch, J. (1995).** Root architecture and plant productivity. *Plant Physiology* **109**, 7-13.
- Maguire, T. L., Grimmond, S., Forrest, A., Iturbe-Ormaetxe, I., Meksem, K. & Gresshoff, P. (2002).** Tissue-specific gene expression in soybean (*Glycine max*) detected by cDNA microarray analysis. *Journal of Plant Physiology* **159**, 1361-1374.
- Maldonado-Mendoza, I. E., Dewbre, G. R. & Harrison, M. J. (2001).** A phosphate transporter gene from the extra-radical mycelium of an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is regulated in response to phosphate in the environment. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 1140-1148.
- Marsh, J. F. & Schultze, M. (2001).** Analysis of arbuscular mycorrhizas using symbiosis-defective plant mutants [Review]. *New Phytologist* **150**, 525-532.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. & Boller, T. (1988).** Antifungal hydrolases in pea tissue. II Inhibition in fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase. *Plant Physiology* **88**, 936-942.
- McArthur, D. A. & Knowles, N. R. (1992).** Resistance responses of potato to vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under varying abiotic phosphorous levels. *Plant Physiology* **100**, 341-351.
- Membre, N., Berna, A., Neutelings, G., David, A., David, H., Staiger, D., Vasquez, J. S., Raynal, M., Delseny, M. & Bernier, F. (1997).** cDNA sequence, genomic organization and differential expression of three *Arabidopsis* genes for germin oxalate oxidase-like proteins. *Plant Molecular Biology* **35**, 459-469.
- Mengel, K. & Kirkby, E. A. (1982).** Principles of plant nutrition. Bern: International Potash Institute.
- Meskiene, I. & Hirt, H. (2000).** MAP kinase pathways: molecular plug-and-play chips for the cell [Review]. *Plant Molecular Biology* **42**, 791-806.

- Miller, J. D., Arteca, R. N. & Pell, E. J. (1999).** Senescence-associated gene expression during ozone-induced leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **120**, 1015-1023.
- Mito, N., Wimmers, L. E. & Bennett, A. B. (1996).** Sugar regulates mRNA abundance of H<sup>+</sup>-ATPase gene family members in tomato. *Plant Physiology* **112**, 1229-1236.
- Molina, R., Massicotte, H. & Trappe, J. M. (1992).** Specificity phenomena in mycorrhizal symbiosis: Community-ecological consequences and practical implications. In *Mycorrhizal functioning: An integrative plant-fungal process*, pp. 357-423. Edited by M. F. Allen. New York, London: Chapman & Hall.
- Morsomme, P. & Boutry, M. (2000).** The plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 1-16.
- Muchhal, U. S., Pardo, J. M. & Raghothama, K. G. (1996).** Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 10519-10523.
- Murphy, P. J., Langride, P. & Smith, S. E. (1997).** Cloning plant genes differentially expressed during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **135**, 291-301.
- Nagahashi, G. & Douds, D. D. (1997).** Appressorium formation by AM fungi on isolated cell walls of carrot roots. *New Phytologist* **136**, 299-304.
- Nersissian, A. M., Immoos, C., Hill, M. G., Hart, P. J., Williams, G., Herrmann, R. G. & Valentine, J. S. (1998).** Uclacyanins, stellacyanins, and plantacyanins are distinct subfamilies of phytoeyanins - plant-specific mononuclear blue copper proteins. *Protein Science* **7**, 1915-1929.
- Ozturk, Z. N., Talame, V., Deyholos, M., Michalowski, C. B., Galbraith, D. W., Gozukirmizi, N., Tuberosa, R. & Bohnert, H. J. (2002).** Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley. *Plant Molecular Biology* **48**, 551-573.
- Palmgren, M. G. (2001).** Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for nutrient uptake [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **52**, 817-845.
- Paszkowski, U., Kroken, S., Roux, C. & Briggs, S. P. (2002).** Rice phosphate transporters include an evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 13324-13329.
- Pawlowski, K. & Bisseling, T. (1996).** Rhizobial and actinorhizal symbioses - What are the shared features [Review]. *Plant Cell* **8**, 1899-1913.
- Peng, Y. B., Lu, Y. F. & Zhang, D. P. (2003).** Abscisic acid activates ATPase in developing apple fruit especially in fruit phloem cells. *Plant, Cell & Environment* **26**, 1329-1342.
- Pfaffl, M. W. (2001).** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- 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.
- Ramaiah, S. M. & Skinner, D. Z. (1997).** Particle bombardment - a simple and efficient method of alfalfa (*Medicago sativa* L.) pollen transformation. *Current Science* **73**, 674-682.
- Rausch, C., Daram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., Amrhein, N. & Bucher, M. (2001).** A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. *Nature* **414**, 462-466.

- Rayle, D. L. & Cleland, R. E. (1992).** The acid growth theory of auxin-induced cell elongation is alive and well. *Plant Physiology* **99**, 1271-1274.
- Read, D. J., Duckett, J. G., Francis, R., Ligrone, R. & Russell, A. (2000).** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* **355**, 815-830.
- Redecker, D., Kodner, R. & Graham, L. E. (2000).** Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**, 1920-1921.
- Regvar, M., Gogala, N. & Zalar, P. (1996).** Effects of jasmonic acid on mycorrhizal *Allium sativum*. *New Phytologist* **134**, 703-707.
- Remy, W., Taylor, T. N., Hass, H. & Kerp, H. (1994).** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **91**, 11841-11843.
- Requena, N., Breuninger, M., Franken, P. & Ocon, A. (2003).** Symbiotic status, phosphate, and sucrose regulate the expression of two plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase genes from the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Plant Physiology* **132**, 1540-1549.
- Requena, N., Mann, P., Hampp, R. & Franken, P. (2002).** Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: Identification of *GmGIN1*, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant & Soil* **244**, 129-139.
- Richards, K. D., Schott, E. J., Sharma, Y. K., Davis, K. R. & Gardner, R. C. (1998).** Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 409-418.
- Richardson, A. E. (1994).** Soil microorganisms and phosphorous availability. *Soil Biota*, 50-62.
- Robson, G. D., Prebble, E., Rickers, A., Hosking, S., Denning, D. W., Trinci, A. P. J. & Robertson, W. (1996).** Polarized growth of fungal hyphae is defined by an alkaline pH gradient. *Fungal Genetics & Biology* **20**, 289-298.
- Rose, R. J. & Nolan, K. E. (1995).** Regeneration of *Medicago truncatula* from protoplasts isolated from kanamycin-sensitive and kanamycin-resistant plants. *Plant Cell Reports* **14**, 349-353.
- Roussel, H., van Tuinen, D., Franken, P., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (2001).** Signaling between arbuscular mycorrhizal fungi and plants: identification of a gene expressed during early interactions by differential RNA display analysis. *Plant & Soil* **232**, 13-19.
- Ruiz-Lozano, J. M., Roussel, H., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (1999).** Defense genes are differentially induced by a mycorrhizal fungus and *Rhizobium* sp. in wild-type and symbiosis-defective pea genotypes. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 976-984.
- Ryan, C. A. (2000).** The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes [Review]. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure & Molecular Enzymology* **1477**, 112-121.
- Salzer, P., Bonanomi, A., Beyer, K., Vogeli-Lange, R., Aeschbacher, R. A., Lange, J., Wiemken, A., Kim, D., Cook, D. R. & Boller, T. (2000).** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **13**, 763-777.
- Salzer, P., Corbiere, H. & Boller, T. (1999).** Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**, 319-325.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.

- Schaller, A. & Oecking, C. (1999).** Modulation of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity differentially activates wound and pathogen defense responses in tomato plants. *Plant Cell* **11**, 263-272.
- 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.
- Schmelz, E. A., Engelberth, J., Alborn, H. T., O'Donnell, P., Sammons, M., Toshima, H. & Tumlinson, J. H. (2003).** Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10552-10557.
- Schüßler, A. (2000).** *Glomus claroideum* forms an arbuscular mycorrhiza-like symbiosis with the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Mycorrhiza* **10**, 15-21.
- 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.
- Sengupta, A. & Chaudhuri, S. (2002).** Arbuscular mycorrhizal relations of mangrove plant community at the Ganges river estuary in India. *Mycorrhiza* **12**, 169-174.
- Serrano, R. (1989).** Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **40**, 61-94.
- Shaul-Keinan, O., Gadkar, V., Ginzberg, I., Grunzweig, J. M., Chet, I., Elad, Y., Wininger, S., Belausov, E., Eshed, Y., Arzmon, N., Ben-Tal, Y. & Kapulnik, Y. (2002).** Hormone concentrations in tobacco roots change during arbuscular mycorrhizal colonization with *Glomus intraradices*. *New Phytologist* **154**, 501-507.
- Siqueira, J. O. & Saggin-Junior, O. J. (2001).** Dependency on arbuscular mycorrhizal fungi and responsiveness of some Brazilian native woody species. *Mycorrhiza* **11**, 245-255.
- Slezack, S., Dumas-Gaudot, E., Rosendahl, S., Kjoller, R., Paynot, M., Negrel, J. & Gianinazzi, S. (1999).** Endoproteolytic activities in pea roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and/or *Aphanomyces euteiches* in relation to bioprotection. *New Phytologist* **142**, 517-529.
- Slobin, L. I. (1980).** The role of eucaryotic elongation factor Tu in protein biosynthesis. *European Journal of Biochemistry* **110**, 555-563.
- Smith, F. A., Jakobsen, I. & Smith, S. E. (2000).** Spatial differences in acquisition of soil phosphate between two arbuscular mycorrhizal fungi in symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **147**, 357-366.
- Smith, F. W. (2001).** Sulphur and phosphorus transport systems in plants. *Plant & Soil* **232**, 109-118.
- Smith, F. W., Ealing, P. M., Dong, B. & Delhaize, E. (1997).** The cloning of two *Arabidopsis* genes belonging to a phosphate transporter family. *Plant Journal* **11**, 83-92.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (1997).** *Mycorrhizal symbiosis*. London: Academic Press.
- Smith, S. E. & Smith, F. A. (1990).** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbiosis as they relate to nutrient transport. *New Phytologist* **114**, 1-38.
- Smith, S. E., Smith, F. A. & Jakobsen, I. (2003).** Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiology* **133**, 16-20.

- Stafstrom, J. P., Altschuler, M. & Anderson, D. H. (1993).** Molecular cloning and expression of a MAP kinase homologue from pea. *Plant Molecular Biology* **22**, 83-90.
- Stotz, H. U., Koch, T., Biedermann, A., Weniger, K., Boland, W. & Mitchell-Olds, T. (2002).** Evidence for regulation of resistance in Arabidopsis to Egyptian cotton worm by salicylic and jasmonic acid signaling pathways. *Planta* **214**, 648-652.
- Strasburger, E., Noll, F., Schenk, H. & Schimper, A. F. W. (1999).** *Strasburger - Lehrbuch der Botanik*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag mbH.
- Strittmatter, G., Gheysen, G., Gianinazzipearson, V., Hahn, K., Niebel, A., Rohde, W. & Tacke, E. (1996).** Infections with various types of organisms stimulate transcription from a short promoter fragment of the potato *Gst1* gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**, 68-73.
- Sussman, M. R. (1994).** Molecular analyses of proteins in the plasma membrane. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 211-234.
- Suzuki, K. & Shinshi, H. (1995).** Transient activation and tyrosine phosphorylation of a protein kinase in tobacco cells treated with a fungal elicitor. *Plant Cell* **7**, 639-647.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Becard, G. & Franken, P. (2003).** Root factors induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* **131**, 1468-1478.
- Thimann, K. V. (1936).** On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **22**, 511-513.
- Thomashow, L.-S., Reeves, S. & Thomashow, M. F. (1984).** Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 5071-5075.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z. G., Wei, Y. D. & Collinge, D. B. (1997).** Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants - H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant Journal* **11**, 1187-1194.
- Tisserant, B., Gianinazzi, S. & Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Relationships between lateral root order, arbuscular mycorrhiza development, and the physiological state of the symbiotic fungus in *Platanus acerifolia*. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **74**, 1947-1955.
- Titus, J. H., Titus, P. J., Nowak, R. S. & Smith, S. D. (2002).** Arbuscular mycorrhizae of Mojave Desert plants. *Western North American Naturalist* **62**, 327-334.
- Trinh, T. H., Ratet, P., Kondorosi, E., Durand, P., Kamate, K., Bauer, P. & Kondorosi, A. (1998).** Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp *falcata* lines improved in somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports* **17**, 345-355.
- Trouvelot, A., Kough, J. L. & Gianinazzi-Pearson, V. (1986).** Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherche des méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In *The Mycorrhizae : Physiology and Genetic*, pp. 217-221. Edited by V. Gianinazzi-Pearson & S. Gianinazzi. Paris: INRA Presse.
- Udvardi, M. K. & Day, D. A. (1997).** Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **48**, 493-523.
- Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T. & Saito, M. (2002).** Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **154**, 761-768.

- van Buuren, M. L., Maldonado-Mendoza, I. E., Trieu, A. T., Blaylock, L. A. & Harrison, M. J. (1999).** Novel genes induced during an arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis formed between *Medicago truncatula* and *Glomus versiforme*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 171-181.
- van Gysel, A., van Montagu, M. & Inze, D. (1993).** A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene* **136**, 79-85.
- van Loon, L. C. & van Kammen, A. (1970).** Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf protein from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN'. II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* **40**, 199-211.
- Varner, J. (2000).** *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD, USA: American society of plant physiologists.
- Versaw, W. K., Chiou, T. J. & Harrison, M. J. (2002).** Phosphate transporters of *Medicago truncatula* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **244**, 239-245.
- Vierheilig, H., Coughlan, A. P., Wyss, U. & Piche, Y. (1998).** Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Applied & Environmental Microbiology* **64**, 5004-5007.
- Visser, H., De Bont, J. A. M. & Verdoes, J. C. (1999).** Isolation and characterization of the epoxide hydrolase-encoding gene from *Xanthophyllomyces dendrorhous*. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 5459-5463.
- Voiblet, C., Duplessis, S., Encelot, N. & Martin, F. (2001).** Identification of symbiosis-regulated genes in *Eucalyptus globulus-Pisolithus tinctorius* ectomycorrhiza by differential hybridization of arrayed cDNAs. *Plant Journal* **25**, 181-191.
- Walker-Simmons, M. K., Rose, P. A., Hogge, L. R. & Abrams, S. R. (2000).** Abscisic acid. ABA immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry verification. In *Methods in molecular biology Vol. 141: Plant Hormone Protocols*, pp. 33-47. Edited by G. A. Tucker & J. A. Roberts. Totowa, NJ: Human press Inc.
- Wasternack, C. & Hause, B. (2002).** Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **72**, 165-221.
- Watanabe, T., Seo, S. & Sakai, S. (2001).** Wound-induced expression of a gene for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and ethylene production are regulated by both reactive oxygen species and jasmonic acid in *Cucurbita maxima*. *Plant Physiology & Biochemistry* **39**, 121-127.
- Weijers, C. & de Bont, J. A. M. (1999).** Epoxide hydrolases from yeasts and other sources: Versatile tools in biocatalysis [Review]. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* **6**, 199-214.
- Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B. & Johnson, G. L. (1999).** Mitogen-activated protein kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological Reviews* **79**, 143-180.
- 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.
- Yang, K. Y., Im, Y. J., Chung, G. C. & Cho, B. H. (2002).** Activity of the *Arabidopsis* blue copper-binding protein gene promoter in transgenic tobacco plants upon wounding. *Plant Cell Reports* **20**, 987-991.
- Yang, Y. H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D. M., Peng, V., Ngai, J. & Speed, T. P. (2002).** Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation - art. no. e15. *Nucleic Acids Research* **30**, E15.

**Yano, K., Yamauchi, A. & Kono, Y. (1996).** Localized alteration in lateral root development in roots colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *Mycorrhiza* **6**, 409-415.

**Zhang, J. S., Xie, C., Li, Z. Y. & Chen, S. Y. (1999).** Expression of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene in response to salt stress in a rice salt-tolerant mutant and its original variety. *Theoretical & Applied Genetics* **99**, 1006-1011.

**Zhang, Z. G., Collinge, D. B. & Thordal-Christensen, H. (1995).** Germin-like oxalate oxidase, a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *Plant Journal* **8**, 139-145.

**Zhao, Z. W., Xia, Y. M., Qin, X. Z., Li, X. W., Cheng, L. Z., Sha, T. & Wang, G. H. (2001).** Arbuscular mycorrhizal status of plants and the spore density of arbuscular mycorrhizal fungi in the tropical rain forest of Xishuangbanna, southwest China. *Mycorrhiza* **11**, 159-162.

## 6 Anhang

**Mykorrhiza-regulierte Gene in *Medicago truncatula*.** Alle Gene besitzen ein relatives  $\log_2$ -Intensitätsverhältnis (M) von  $M \geq 0,9$  oder  $M \leq -0,9$  in mindestens einer der drei Mykorrhizasymbiosen. Eine Regulation durch die Phytohormone ABA oder IBA bzw Phosphat konnte für diese Gene nicht beobachtet werden. Neben der Cluster-ID und der Annotation sind die  $\log_2$ -Intensitätsverhältnisse für jedes biologische Replikat der Mikroarrays und der Makroarrays angegeben. Gene der Funktionsklasse ‚Ohne Homologie‘ wurden in diesen Listen nicht berücksichtigt.

### ***Glomus intraradices***

<b>Cluster</b>	<b>Annotation</b>	<b>Induktion</b>	
<b><u>Zellwand</u></b>			
00316MtBC	ARABINO GALACTAN-PROTEIN PRECURSOR	1,10	
<b><u>Cytoskelett</u></b>			
30580MtBC	CYLICIN I-LIKE PROTEIN	1,93	
<b><u>Membrantransport</u></b>			
00638MtBC	INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER	1,19	1,01
MtAMLs494	NODULIN 26	1,66	
<b><u>Proteinsynthese und -prozessierung</u></b>			
00626MtBC	PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE (CYCLOPHILIN)	1,29	
10817MtBC	EUKARYOTIC INITIATION FACTOR 4A		-1,20
20306MtBC	60S RIBOSOMAL PROTEIN L17	1,17	
30509MtBC	TUBULIN-SPECIFIC CHAPERONE A (TUBULIN-FOLDING COFACTOR A)	1,24	1,11
50087MtBA	ZINC-DEPENDENT PEPTIDASE		-1,04
91337MtBC	SERINE PROTEASE	2,12	
<b><u>Primärmetabolismus</u></b>			
00016MtBB	NUCLEOSIDE DIPHOSPHATE KINASE		1,22
00599MtBC	GLUTAREDOXIN	0,97	
00605MtBC	BASIC BLUE PROTEIN	1,51	
10266MtBC	IRON/ASCORBATE-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE		-1,20
10290MtBC	MTHA1 PLASMA MEMBRANE ATPASE	1,34	
30062MtBC	METHYLENETETRAHYDROFOLATE REDUCTASE		-1,13
40046MtBB	VACUOLAR PROTON ATPASE SUBUNIT		-1,03
50754MtBC	GLYCOSYLTRANSFERASE		-1,07
91345MtBC	STEAROYL-COA DESATURASE	1,30	0,95
91490MtBC	ZINC-CONTAINING ALCOHOL DEHYDROGENASE	1,43	1,17
92006MtBC	PHYTOENE SYNTHASE		0,90
92126MtBC	ACYL-ACP THIOESTERASE		0,95
93250MtBA	DIHYDROLIPOAMIDE ACETYLTRANSFERASE COMPONENT OF PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX	0,96	
<b><u>Sekundär- und Phytohormonmetabolismus</u></b>			
00512MtBC	CYTOCHROME P450	1,26	
10505MtBC	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE		-0,98

## Anhang

11005MtBA	NARBONINE	-1,35		
30350MtBA	ISOLIQURITIGENIN 2'-O-METHYLTRANSFERASE	-1,20		
45255MtBA	CYTOCHROME P450		-1,02	
50893MtBC	RETICULINE OXIDASE PRECURSOR (BERBERINE-BRIDGE-FORMING ENZYME)			-1,20
MtAMLS618	GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE	1,76	0,94	
<b><u>Chromatinstruktur und DNA-Metabolismus</u></b>				
91970MtBC	HISTONE H3		1,01	
<b><u>Genexpression und RNA-Metabolismus</u></b>				
00467MtBA	TRANSCRIPTIONAL ADAPTOR ZINC FINGER CONTAINING PROTEIN		1,05	
00651MtBC	ZINC FINGER PROTEIN		1,09	
90017MtBA	HOMEODOMAIN PROTEIN JUBEL1-LIKE			0,98
<b><u>Signaltransduktion und posttranslationale Regulation</u></b>				
10965MtBC	SER/THR PROTEIN KINASE			-1,21
20218MtBB	[NODULIN] MTANN1 ANNEXIN	0,95		
30427MtBA	CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE			0,92
<b><u>Sonstiges</u></b>				
10607MtBC	CAFFEIC ACID O-METHYLTRANSFERASE	-1,41		
10675MtBC	RAC-LIKE GTP BINDING PROTEIN RHO1			-0,98
91267MtBC	LEGUME LECTIN BETA DOMAIN, LEGUME LECTIN ALPHA DOMAIN	1,22	1,55	
<b><u>Verteidigung</u></b>				
10736MtBC	PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN			1,09
50987MtBC	PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN			0,92
93362MtBC	DISTANTLY RELATED TO WOUND-INDUCIBLE POTATO GENE WUN1			1,36
<b><u>Abiotische Stimuli und Entwicklung</u></b>				
90603MtBB	LIGHT-INDUCIBLE PROTEIN-LIKE PROTEIN			-0,98
92175MtBC	GERMIN-LIKE PROTEIN (OXALATE OXIDASE)		1,35	
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>				
00162MtBC	TRYPSIN INHIBITOR KUNITZ	1,65	1,33	1,77
00387MtBC	TRANSMEMBRANE PROTEIN			-1,03
00507MtBC	-		0,96	
00704MtBC	BETA-IG-H3/FASCICLIN DOMAIN PROLINE-RICH REGION			0,98
10203MtBB	PHOSPHATE-INDUCED PROTEIN-LIKE PROTEIN			1,22
10224MtBB	-	-0,96		
10326MtBB	CWF15/CWC15 CELL CYCLE CONTROL PROTEIN			-1,12
10539MtBC	-	1,47	1,23	1,44
10892MtBC	PROTEIN KINASE	-1,17		
10916MtBC	-			1,09
30298MtBB	PYRROLIDONE-CARBOXYLATE/PYROGLUTAMYL PEPTIDASE I (C15)			-1,58
40001MtBB	PRO-RICH PROTEIN			1,06
40091MtBA	HALOACID DEHALOGENASE-LIKE HYDROLASE DOMAIN CONTAINING PROTEIN		0,97	
40133MtBA	DNA-DAMAGE-REPAIR/TOLERATION LEU RICH REPEAT PROTEIN DRT100-LIKE		0,92	0,92
50814MtBC	UNKNOWN FUNCTION			0,93

## Anhang

50889MtBC	MITOCHONDRIAL IMPORT INNER MEMBRANE TRANSLOCASE SUBUNIT TIM17/22		0,98
90522MtBA	-		-0,93
91398MtBC	GAMMA THIONIN KNOTTIN	1,47	
91444MtBC	-		0,93
91737MtBC	-		1,36
92162MtBC	-		1,39

### *Glomus mosseae*

Cluster	Annotation	Induktion	
<b><u>Zellwand</u></b>			
00320MtBC	CAFFEIC ACID 3-O-METHYLTRANSFERASE		-1,27
00367MtBB	ENDO-1,3-1,4-BETA-D-GLUCANASE PRECURSOR		-1,68
00611MtBB	EXTENSIN		-1,59
40031MtBA	PECTIN METHYLESTERASE		1,28
50095MtBA	O-METHYLTRANSFERASE		1,12
90224MtBA	REVERSIBLY GLYCOSYLATED POLYPEPTIDE	1,01	
90553MtBA	EXPANSIN		-1,53
93335MtBA	CELLULOSE SYNTHASE	1,86	
<b><u>Cytoskelett</u></b>			
00575MtBC	DYNEIN LIGHT CHAIN		-1,00
40015MtBA	TUBULIN BETA CHAIN		-1,42
<b><u>Membrantransport</u></b>			
00072MtBC	MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN		-2,22
10445MtBA	MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN	-1,96	-1,08
90240MtBA	H <sup>+</sup> /MONOSACCHARIDE COTRAPORTER	2,17	
90846MtBB	MITOCHONDRIAL IMPORT INNER MEMBRANE TRANSLOCASE SUBUNIT	1,22	
91857MtBC	NITRATE/CHLORATE TRANSPORTER		-1,55
93151MtBA	ATP SYNTHASE GAMMA CHAIN MITOCHONDRIAL PRECURSOR	1,83	
JVCPG19	TM PROTEIN		-1,09
<b><u>Vesikeltransport und Proteinlokalisierung</u></b>			
00146MtBC	RAB1 SMALL GTP-BINDING PROTEIN		-1,29
30422MtBC	VACUOLAR ASSEMBLY PROTEIN VPS41 HOMOLOG		-0,94
90844MtBB	TSNARE/SYNTAXIN		1,23
93295MtBA	RAB1 SMALL GTP-BINDING PROTEIN	1,61	
<b><u>Proteinsynthese und -prozessierung</u></b>			
00029MtBB	UBIQUITIN EXTENSION PROTEIN		1,40
00049MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L10		-1,55
00092MtBC	CYSTEINE PROTEINASE PRECURSOR		-1,26
00096MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S6		-1,03
00117MtBB	POLYUBIQUITIN		-1,13
00143MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S27		1,84
00148MtBC	40S RIBOSOMAL PROTEIN S7		-0,91
00155.1MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6		2,11

## Anhang

00225MtBC	60S RIBOSOMAL PROTEIN L23	-1,22	
00286MtBA	60S RIBOSOMAL PROTEIN L10	-1,23	
00435MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S18	-0,90	
00516MtBA	40S RIBOSOMAL PROTEIN S13	-0,98	
00773MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S18	-1,11	
01542MtBC	60S RIBOSOMAL PROTEIN L3	-1,10	
10050MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S15	-1,36	
10104MtBA	PROTEASOME EPSILON CHAIN PRECURSOR	-0,96	
10474MtBC	EUKARYOTIC INITIATION FACTOR (ISO)4F		-0,95
10536MtBC	40S RIBOSOMAL PROTEIN S16	-0,94	
20220MtBB	26S PROTEASOME REGULATORY SUBUNIT S12	-0,91	
20315MtBA	ENDOPLASMIC RETICULUM HSC70-COGNATE BINDING PROTEIN PRECURSOR (BIP)	-1,26	
20326MtBB	UBIQUITIN	-1,07	
20369MtBA	N-CARBAMOYL-L-AMINO ACID AMIDOHYDROLASE	-2,55	
45604MtBC	SERINE PROTEASE PRECURSOR	-0,92	
50070MtBA	ASPARTYL PROTEASES ACTIVE SITE CONTAINING PROTEIN	1,54	
90493MtBA	N-TERMINAL ACETYLTRANSFERASE	2,40	
90516MtBA	RIBOSOMAL PROTEIN L7A	1,51	
90685MtBB	PROTEASOME 27 KD SUBUNIT	1,40	
91653MtBC	40S RIBOSOMAL PROTEIN	1,55	
93165MtBA	LYSYL-TRNA SYNTHETASE	0,92	
93203MtBA	AMINOPEPTIDASE	1,15	
KV0-1B7	EFC3	-2,06	

### Primärmetabolismus

00156MtBB	[NODULIN] CARBONIC ANHYDRASE		1,12
00338MtBA	TRANSALDOLASE	-1,23	-0,91
00571MtBC	6-PHOSPHOGLUCONATE DEHYDROGENASE		-1,24
00680MtBC	NARBONIN	-1,97	-1,88
10123MtBB	ESTERASE/LIPASE/THIOESTERASE ACTIVE SITE SERINE CONTAINING PROTEIN	1,17	
10381MtBC	BETA-KETOACYL-COA SYNTHASE	-1,07	
20114MtBA	MTGSA GLUTAMINE SYNTHETASE	1,57	
20253MtBC	NITRATE REDUCTASE		-1,06
30103MtBC	FERREDOXIN-NITRITE REDUCTASE		-0,98
30360MtBC	OXIDOREDUCTASE	-0,90	
30399MtBC	ATP SYNTHASE	-0,96	
45384MtBC	GRR1 GLUCOSE REPRESSION	1,97	
50819MtBC	GTP CYCLOHYDROLASE	-1,15	
50986MtBC	NARBONIN	-1,63	
90051MtBA	ACETOHYDROXYACID SYNTHASE	1,88	
91304MtBC	DIHYDROFLAVONOL 4-REDUCTASE	1,12	
91519MtBC	ALCOHOL DEHYDROGENASE		1,14
91765MtBC	GLUCOSE-6-PHOSPHATE 1-DEHYDROGENASE		-0,94
92020MtBC	IRON/ASCORBATE-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE	-1,23	
93020MtBC	PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT ALPHA SUBUNIT		-0,99
93051MtBC	CARBOXYPEPTIDASE		1,06
93242MtBA	METHYLTRANSFERASE	2,33	
93311MtBB	UDP OR UTP-GLUCOSE GLUCOSYLTRANSFERASE	1,35	
MtAMLs31	OXALATE OXIDASE		1,28

## Anhang

### Sekundär- und Phytohormonmetabolismus

00193MtBC	FLAVANONE SYNTHASE	-1,21	
10502MtBB	PHENYLCOUMARAN BENZYLIC ETHER REDUCTASE (=ISOFLAVONE REDUCTASE HOMOLOG)	1,66	
10756MtBA	PROFUCOSIDASE PRECURSOR	-1,10	
20288MtBB	ISOLIQUIRITIGENIN 2'-O-METHYLTRANSFERASE	3,04	
20385MtBB	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE	-1,18	
30010MtBA	1-AMINOCYCLOPROPANE-1-CARBOXYLATE OXIDASE	1,51	0,95
30184MtBB	S-ADENOSYL-METHIONINE-STEROL-C- METHYLTRANSFERASE		-0,93
30235MtBC	NARBONIN		-1,23
40004MtBA	CYTOCHROME P450		1,28
45179MtBA	CYTOCHROME P450 + 26S RRNA		1,12
93164MtBA	COPROPORPHYRINOGEN III OXIDASE PRECURSOR	1,75	
93419MtBB	CYTOCHROME P450 + 26S RRNA	1,29	

### Chromatinstruktur und DNA-Metabolismus

10713MtBB	HISTONE H4	-1,54	
50566MtBB	HISTONE H1	-1,06	
91063MtBB	HISTONE H4	-1,81	
91751MtBC	HISTONE H2B	-1,52	

### Genexpression und RNA-Metabolismus

00115MtBA	GLYCINE-RICH RNA BINDING PROTEIN	0,92	
30329MtBC	PHD FINGER MOTIF DNA BINDING		-1,01
93100MtBA	RNA-BINDING DOMAIN CONTAINING PROTEIN	1,61	
93417MtBA	AP2 DOMAIN CONTAINING PROTEIN	0,93	

### Signaltransduktion und posttranslationale Regulation

10419MtBA	ANNEXIN		-1,16
10495MtBB	PROTEIN PHOSPHATASE-2C		0,95
10715MtBA	RAC-LIKE GTP BINDING PROTEIN RHO1	-1,15	
20086MtBA	RAS-RELATED PROTEIN RAB11		-1,04
90228MtBA	SR-PROTEIN-SPECIFIC KINASE	1,53	
90849MtBB	GLUTAMATE-/ASPARTATE-BINDING PEPTIDE	-0,97	
91680MtBC	PROTEASE INHIBITOR	1,31	

### Zellteilung

00787MtBC	UBIQUITIN-LIKE PROTEIN SMT3	0,99	
90425MtBA	KINESIN-LIKE PROTEIN	2,05	

### Sonstiges

00030MtBC	GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE	1,07	
00101MtBA	40S RIBOSOMAL PROTEIN S15	-0,92	
00207MtBA	RAS-RELATED PROTEIN RAB7	-0,98	
00221MtBB	GTP-BINDING PROTEIN SAR1	1,45	
00241MtBC	ASPARAGINE SYNTHETASE [GLUTAMINE-HYDROLYZING]	-1,39	
00359MtBC	PEROXIDASE		-1,70
00399MtBC	GAMMA THIONIN	1,07	
00437MtBB	NON-SPECIFIC LIPID TRANSFER-LIKE PROTEIN	1,68	
00493MtBC	THIOREDOXIN H-TYPE	1,18	

## Anhang

00543MtBB	HISTONE H3	-1,19	
10122MtBA	PROLINE-RICH PROTEIN		-1,13
10163MtBC	[NODULIN] LEGHEMOGLOBIN	1,00	
10567MtBA	PEROXIDASE PRECURSOR		-1,36
10714MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S23	-0,95	
10911MtBC	PEROXIDASE	-1,13	
30060MtBB	PRO RICH PROTEIN	1,03	
30355MtBC	HYDROXYPROLINE-RICH PROTEIN (3'UTR)		-0,97
45279MtBA	PEROXIDASE		-0,97
45474MtBA	PEROXIDASE	1,26	
45501MtBA	18S RIBOSOMAL RNA	0,97	
50161MtBA	PECTINESTERASE/ASCORBATE OXIDASE		-1,28
50279MtBA	PEROXIDASE	1,60	
50384MtBA	BASIC 7S GLOBULIN /EXTRACELLULAR DERMAL GLYCOPROTEIN	-1,21	
90044MtBA	CURCULIN-LIKE (MANNANOSE-BINDING) LECTIN		-1,34
93168MtBB	SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN, SM D2	1,47	
93183MtBA	4-NITROPHENYLPHOSPHATASE	0,95	
<b><u>Verteidigung</u></b>			
00382MtBA	SERINE PROTEINASE INHIBITOR	1,16	
00422MtBC	TRYPSIN INHIBITOR KUNITZ	3,01	
10354MtBC	TYPE II PROTEASE INHIBITOR		1,19
40027MtBA	S-ADENOSYL-L-METHIONINE:SALICYLIC ACID CARBOXYL METHYLTRANSFERASE		-0,99
40037MtBA	EPOXIDE HYDROLASE	-0,96	
90706MtBB	BETA-GLUCAN-ELICITOR RECEPTOR	1,84	
91700MtBC	BETA-HEXOSAMINIDASE PRECURSOR	0,94	
93191MtBB	MONODEHYDROASCORBATE REDUCTASE		-1,38
MtAMLS204	PR1		1,08
<b><u>Abiotische Stimuli und Entwicklung</u></b>			
00182MtBC	ALUMINUM-INDUCED AUXIN-REPRESSED PROTEIN		-1,16
00796MtBC	GALACTINOL-RAFFINOSE GALACTOSYLTRANSFERASE/SEED IMBIBITION PROTEIN-LIKE	1,53	
10438MtBA	AUXIN-INDUCED PROTEIN	-1,26	-1,03
10725MtBC	WOUND-INDUCED AND VEGETATIVE STORAGE PROTEIN-LIKE		1,06
30257MtBC	MOB-LIKE PROTEIN		-1,21
90167MtBA	GIBBERELLIN-REGULATED PROTEIN -LIKE	2,05	
90614MtBB	STORAGE PROTEIN PRECURSOR (PD000688)	2,52	
93317MtBA	CONTROL OF PLASTID DEVELOPMENT	1,55	
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>			
00013MtBC	ALBUMIN/LEGINSULIN PRECURSOR	-1,24	
00022MtBC	-	-1,25	
00062MtBB	-	-1,22	
00120MtBB	[NODULIN] MTN29		1,11
00130MtBC	GLU RICH PROTEIN	-1,43	
00152MtBB	UNKNOWN FUNCTION	1,24	
00174MtBA	4F5REL-LIKE PROTEIN	-1,33	
00281MtBB	[NODULIN] MTN22		1,22
00378MtBC	LEGINSULIN/ALBUMIN	-1,84	

## Anhang

00741MtBA	PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION UPF0185	0,92	
10026MtBB	-		0,92
10028MtBA	UNKNOWN FUNCTION		-0,94
10222MtBB	-	0,94	
10313MtBC	-		0,98
10365MtBA	TRANSMEMBRANE PROTEIN	1,15	
10485MtBC	UNKNOWN FUNCTION		1,19
10615MtBB	ESTERASE/LIPASE/THIOESTERASE ACTIVE SITE SERINE CONTAINING PROTEIN	-0,95	
10729MtBC	-	0,91	
10873MtBC	-	-1,10	
10950MtBB	THREE RANBP ZINC FINGER CONTAINING PROTEIN		-1,14
20244MtBC	GLYCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8	-1,06	
30081MtBC	GLYCEROPHOSPHORYL DIESTER PHOSPHODIESTERASE		1,22
30108MtBA	IQ CALMODULIN-BINDING MOTIF CONTAINING PROTEIN	0,97	
30395MtBC	LEGINSULIN/ALBUMIN	-1,19	
30447MtBC	-	1,42	
45044MtBA	-		0,97
45140MtBA	-		-0,91
45306MtBC	-		0,94
45658MtBB	TRANSMEMBRANE PROTEIN		1,14
50010MtBA	ZINC-FINGER PROTEIN C-X8-C-X5-C-X3-H TYPE	1,27	
50020MtBA	-	1,21	
50192MtBA	-	1,04	
50467MtBB	UBIA PRENYLTRANSFERASE	1,31	
50606MtBB	PROTEIN OF UNKNOWN FUNCTION DUF652	0,97	
50657MtBC	UNCHARACTERIZED PLANT-SPECIFIC DOMAIN 01615		1,03
50863MtBC	-		1,20
90021MtBA	-	1,47	
90029MtBA	-	2,15	
90145MtBA	-	-1,24	
90230MtBA	-	1,46	
90286MtBA	-	1,35	
90369MtBA	-	1,48	
90384MtBA	-	1,43	
90385MtBA	PROLINE-RICH REGION	1,31	
90483MtBA	-	2,09	
90508MtBA	CONSERVED PROTEIN	0,92	
90543MtBA	UNKNOWN FUNCTION	1,10	
90638MtBB	-	2,29	
90644MtBB	PD014254	-0,93	-1,24
90914MtBB	-	1,95	
91195MtBC	TRANSMEMBRANE CAMP INDUCIBLE 2 PROTEIN - LIKE		0,94
91428MtBC	-	1,92	
91525MtBC	-		1,11
91715MtBC	-		-1,38
92165MtBC	-	1,03	
93028MtBA	LEUCINE-RICH REPEAT LEUCINE-RICH REPEAT PLANT SPECIFIC	-1,14	
93096MtBA	DUF25	2,07	
93129MtBB	UPF0136	1,93	

## Anhang

93159MtBA	-	1,99
93163MtBC	RNA-BINDING REGION RNP-1 (RNA RECOGNITION MOTIF )	1,02
93189MtBA	-	1,34
93234MtBA	-	1,38
93354MtBB	-	1,00
93368MtBA	-	1,25
KV3-21B21	[NODULIN] MTN21-LIKE	1,32

### *Gigaspora rosea*

Cluster	Annotation	Induktion
<b><u>Zellwand</u></b>		
00548MtBC	ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE	-1,10
11007MtBC	ARABINOGALACTAN PROTEIN	-2,45
20046MtBB	ENDO-1,4-BETA-GLUCANASE	1,70
20266MtBB	BETA-XYLOSIDASE/BETA-GLUCOSIDASE	-1,00
30124MtBA	ENDOXYLOGLUCAN TRANSFERASE	-3,00
30264MtBC	CELLULOSE SYNTHASE CATALYTIC SUBUNIT	-1,01
45398MtBA	ENDO-BETA-1 4-D-GLUCANASE	-1,63
91344MtBC	INVERTASE GLYCOSIDASE	-4,18
93407MtBA	PROLINE-RICH PROTEIN	-1,89
<b><u>Cytoskelett</u></b>		
50124MtBA	KINESIN-LIKE PROTEIN	0,94
90390MtBA	MYOSIN HEAVY CHAIN	0,96
<b><u>Membrantransport</u></b>		
00748MtBB	VACUOLAR ATP SYNTHASE 16 KDA PROTEOLIPID SUBUNIT	-2,82
10093MtBA	VACUOLAR ATP SYNTHASE 22 KDA PROTEOLIPID SUBUNIT	1,37
10835MtBB	TRANSMEMBRANE UREASE ACCESSORY PROTEIN UREH-LIKE	-3,13
20051MtBA	ENVELOPE CALCIUM ATPASE	-2,51 -2,07
20195MtBB	SUGAR TRANSPORTER	-1,72
30299MtBB	H <sup>+</sup> /HEXOSE COTRANSPORTER	-1,84
40126MtBA	TRIOSE PHOSPHATE/PHOSPHATE TRANSLOCATOR	-0,93
90689MtBB	CATIONIC AMINO ACID TRANSPORTER	3,43
93205MtBA	INORGANIC PHOSPHATE TRANSPORTER	1,57
93235MtBC	PLASMA MEMBRANE H <sup>+</sup> -ATPASE	-3,42
<b><u>Vesikeltransport und Proteinlokalisierung</u></b>		
00216MtBC	SYNAPTOBREVIN-LIKE/VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN	-1,58
00371MtBC	COATOMER BETA SUBUNIT	-1,33
00581MtBC	RAB5 SMALL GTP-BINDING PROTEIN	2,22
00597MtBA	SECRETORY CARRIER-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN	-1,14
10414MtBB	BP-80 VACUOLAR SORTING RECEPTOR-LIKE PROTEIN	-2,67 -2,60
10465MtBB	PROTEIN TRANSPORT PROTEIN SEC61 GAMMA SUBUNIT	-1,62
20377MtBC	SYNAPTOBREVIN-LIKE/VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN	-1,93
30345MtBA	T-SNARE/SYNTAXIN 5	2,96
50937MtBC	SIGNAL RECOGNITION PARTICLE 54 KDA PROTEIN	-1,57

## Anhang

---

93021MtBA	IMPORTIN ALPHA SUBUNIT (NLS RECEPTOR)	1,92	
93099MtBB	VACUOLAR SORTING RECEPTOR PROTEIN	-1,71	

### **Proteinsynthese und -prozessierung**

00024MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S11	1,72	4,15
00097MtBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2-17 KDA	-1,66	-1,37
00124MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S16		4,30
00150MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L32	-1,91	
00166MtBC	ELONGATION FACTOR 2	-1,83	-0,96
00167MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S11	1,98	3,10
00214MtBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2	2,17	
00400MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L32	-1,31	-0,96
00447MtBB	40S RIBOSOMAL PROTEIN S11	1,93	1,86
00545MtBC	T-COMPLEX PROTEIN 1 BETA SUBUNIT TCP-1-BETA CCT-BETA CHAPERONE	-1,36	
00722MtBC	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 6	-0,92	
00760MtBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2	-1,53	-1,77
10052MtBA	NASCENT POLYPEPTIDE-ASSOCIATED COMPLEX ALPHA POLYPEPTIDE	-1,04	
10071MtBC	40S RIBOSOMAL PROTEIN S3A		2,30
10267MtBC	PROTEASOME SUBUNIT		-1,13
10373MtBC	MULTICATALYTIC ENDOPEPTIDASE COMPLEX SUBUNIT C5	2,94	
10460MtBB	PROTEASOME SUBUNIT ALPHA TYPE 6	-1,14	
10555MtBA	EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 3 SUBUNIT 10		2,50
10752MtBC	ASPARTIC PROTEINASE		-1,46
10876MtBB	ELONGATION FACTOR TS		-2,32
20024MtBB	ELONGATION FACTOR EF-2	-1,16	
20146MtBA	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA	-1,26	
20228MtBB	PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE	-2,73	
20307MtBC	GTP-BINDING ELONGATION FACTOR 2	-1,40	-0,99
20369MtBA	N-CARBAMOYL-L-AMINO ACID AMIDOHYDROLASE		1,46
30158MtBB	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME		-2,96
30310MtBA	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2	2,71	
30585MtBC	UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME E2 (UTR)		-1,12
40141MtBA	SERINE CARBOXYPEPTIDASE II PRECURSOR		-1,97
40177MtBB	SERINE PROTEASE	-2,44	
45014MtBA	60S RIBOSOMAL PROTEIN L32 RP49		-1,06
45590MtBA	PHENYLALANYL TRNA SYNTHETASE	-0,94	
90407MtBA	SERINE CARBOXYPEPTIDASE I		-2,18
90497MtBA	T-COMPLEX PROTEIN 1 BETA SUBUNIT TCP-1-BETA CCT-BETA CHAPERONE	-2,33	
90590MtBB	ELONGATION FACTOR 1-ALPHA		1,01
90764MtBB	50S RIBOSOMAL PROTEIN L19		-3,18
93210MtBA	PEPTIDASE	1,69	
KV0-1B7	EFC3		1,04

### **Primärmetabolismus**

00287MtBB	ESTERASE D		0,92
00606MtBB	EPIMERASE/DEHYDRATASE		-2,43
00737MtBB	ENOYL-COA HYDRATASE	-2,76	
10064MtBB	ADENOSINE KINASE	-2,61	
10184MtBB	NADH-CYTOCHROME B5 REDUCTASE	-2,30	

---

## Anhang

10233MtBC	ALDEHYDE DEHYDROGENASE	2,81	
10238MtBC	FERREDOXIN PRECURSOR		3,96
10286MtBA	3-PHOSPHOSHIKIMATE 1-CARBOXYVINYLTRANSFERASE		-4,81
10334MtBC	NADP-DEPENDENT MALIC ENZYME		-1,28
10614MtBA	HEXOKINASE	-1,55	-2,65
10912MtBB	MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE	-2,60	-2,43
20040MtBA	VACUOLAR H <sup>+</sup> -ATPASE SUBUNIT		3,05
20115MtBA	DIHYDROLIPOAMIDE DEHYDROGENASE/FERRIC LEGHEMOGLOBIN REDUCTASE		-2,71
20121MtBB	MONOGALACTOSYLDIACYLGLYCEROL SYNTHASE PRECURSOR		1,18
20166MtBB	3-HYDROXY-3-METHYLGLUTARYL COENZYME A REDUCTASE	-1,76	
20176MtBB	GLUCOSE-6-PHOSPHATE 1-DEHYDROGENASE	-1,95	-2,40
20213MtBB	TREHALOSE-PHOSPHATASE		1,15
30022MtBA	NADP-DEPENDENT MALIC ENZYME	-2,78	
30029MtBC	DTDP-D-GLUCOSE 4 6-DEHYDRATASE	-2,77	-3,15
30073MtBC	AMINOMETHYLTRANSFERASE PRECURSOR (GLYCINE CLEAVAGE SYSTEM T PROTEIN)		-2,69
30278MtBA	PYRUVATE DEHYDROGENASE E1 COMPONENT ALPHA SUBUNIT MITOCHON- DRIAL PRECURSOR	-1,32	
30493MtBB	DEHYDROQUINATE DEHYDRATASE/SHIKIMATE DEHYDROGENASE	1,79	
40013MtBB	DTDP-D-GLUCOSE 4 6-DEHYDRATASE	-2,84	-2,56
45203MtBA	CTP SYNTHASE		-3,48
45280MtBC	SERINE-TYPE CARBOXYPEPTIDASE		-2,29
45568MtBA	FATTY ACYL-COA SYNTHETASE	-3,61	
50035MtBA	PHOSPHOENOLPYRUVATE CARBOXYLASE	2,98	
50228MtBA	ALDEHYDE REDUCTASE		-3,55
50474MtBA	DTDP-D-GLUCOSE 4 6-DEHYDRATASE	-2,09	-1,21
91347MtBC	CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE		1,95
92020MtBC	IRON/ASCORBATE-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE	2,87	
92130MtBC	IRON/ASCORBATE-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE		-1,09
93058MtBC	TARTRATE-RESISTANT ACID PHOSPHATASE	-2,26	
93139MtBA	ASPARTATE KINASE PRECURSOR	-2,73	-1,38
93162MtBC	THIAMINE PYROPHOSPHOKINASE	-3,04	
93342MtBA	URIDINE 5'-MONOPHOSPHATE SYNTHASE	2,78	
93399MtBA	GLUCOSE-6-PHOSPHATE 1-DEHYDROGENASE	-2,90	-2,94
MsPEPC	PEP CARBOXYLASE	1,76	

### Sekundär- und Phytohormonmetabolismus

00193MtBC	FLAVANONE SYNTHASE	1,77	
00234MtBA	NADPH:ISOFLAVONE OXIDOREDUCTASE	-1,09	
00296MtBC	FLAVONOL 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE	2,97	
00734MtBB	CYTOCHROME P450		-1,40
10441MtBB	LIPOXYGENASE LIPOXIDASE CAROTENE OXIDASE	2,70	
20397.2MtBA	CHALCONE SYNTHASE	-1,14	
30053MtBB	FLAVONOL 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE	3,43	
30065MtBA	CYTOCHROME P450	1,94	
30407MtBA	POLYNEURIDINE ALDEHYDE ESTERASE/S-ACETONE-CYANOHYDRIN LYASE	1,09	
30435MtBB	PROFUCOSIDASE PRECURSOR		-0,98
45271MtBA	FLAVONOL 3-O-GLUCOSYLTRANSFERASE	1,34	
45591MtBB	ISOFLAVONE-O-METHYTRANSFERASE	1,35	1,16
50990MtBC	CYTOCHROME P450		-2,03

## Anhang

93150MtBA	CYTOCHROME P450 72A1	4,13	
93179MtBA	GLUCOSYLTRANSFERASE	3,47	
<b><u>Chromatinstruktur und DNA-Metabolismus</u></b>			
00621MtBB	HISTONE H2A.Z	1,86	
10408MtBB	HISTONE H2B	-1,56	
50201MtBA	NUCLEOSOME ASSEMBLY PROTEIN		-1,04
50537MtBB	RIBONUCLEOSIDE-DIPHOSPHATE REDUCTASE	-1,79	
50869MtBC	TRANSPOSASE		-2,74
93291MtBA	REPLICATION FACTOR-A PROTEIN	-1,00	
<b><u>Genexpression und RNA-Metabolismus</u></b>			
00420MtBB	RNA-RECOGNITION MOTIF (RRM) CONTAINING PROTEIN		2,27
10102MtBA	HIGH MOBILITY GROUP PROTEIN	-2,07	
10459MtBB	RIBONUCLEASE 2 PRECURSOR		0,93
10466MtBC	MYB-RELATED PROTEIN TRANSCRIPTION FACTOR	3,16	
10503MtBB	HOMEBOX-LEUCINE ZIPPER PROTEIN		2,26
10687MtBC	ETHYLENE RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN	-2,04	
10765MtBB	SM-LIKE GLYCINE-RICH PROTEIN		-0,91
20194MtBB	TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR IIB (TFIIB)		-2,40
20404MtBA	CLEAVAGE AND POLYADENYLATION SPECIFICITY FACTOR		-1,14
30106MtBB	NUCLEOLAR PROTEIN	-3,29	
30151MtBC	WRKY-TYPE DNA BINDING PROTEIN	-2,71	-5,05
40131MtBA	RESPONSE REGULATOR	1,72	
40194MtBA	RESPONSE REGULATOR	1,62	
45190MtBA	PCF1-LIKE REGION		0,90
50804MtBC	HELIX-LOOP-HELIX MOTIF CONTAINING PROTEIN	2,19	
90310MtBA	MYB TRANSCRIPTION FACTOR	0,92	
90449MtBA	BZIP TRANSCRIPTION FACTOR	1,11	
90949MtBB	RGA/SCARECROW-LIKE PROTEIN		3,41
91503MtBC	TRANSCRIPTION REGULATOR HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR	-1,83	-2,01
92007MtBC	BZIP TRANSCRIPTIONAL REPRESSOR	2,70	
<b><u>Signaltransduktion und posttranslationale Regulation</u></b>			
00050MtBC	HIS-CONTAINING PHOSPHOTRANSFER PROTEIN	-0,93	
00409MtBC	PROTEIN KINASE	2,15	
10758MtBC	SER/THR PROTEIN KINASE		-1,15
20393MtBA	PHOSPHOINOSITIDE-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C	-2,56	
30122MtBA	SER/THR PROTEIN KINASE		1,44
30202MtBA	PHOSPHATIDYLINOSITOL PHOSPHATE PHOSPHATASE		2,04
30342MtBB	PROTEIN PHOSPHATASE TYPE 2C		1,77
40061MtBA	CALCIUM DEPENDENT PROTEIN KINASE	-2,44	
40109MtBA	SPINDLY (GIBBERELLIN ACTION NEGATIVE REGULATOR)-LIKE PROTEIN	-1,31	
45165MtBA	PURPLE ACID PHOSPHATASE	2,13	
45186MtBA	MAP KINASE KINASE	-2,65	
45533MtBA	SER PROTEIN KINASE	-1,82	
50221MtBA	RECEPTOR PROTEIN KINASE		-2,53
90127MtBA	SER/THR PROTEIN PHOSPHATASE PP2A CATALYTIC SUBUNIT		0,93
90275MtBA	RAB		-3,47

## Anhang

---

90295MtBA	CA-BINDING EF-HAND MOTIF CONTAINING PROTEIN	-1,63	
92154MtBC	PHOSPHOLIPASE D		-3,40
93064MtBB	TYROSINE SPECIFIC PROTEIN PHOSPHATASES SIGNATURE CONTAINING PROTEIN	-2,36	
93215MtBA	SHAGGY-RELATED PROTEIN KINASE		1,67
93390MtBC	KINASE PROTEIN TRANSFERASE	-3,57	

### Zellteilung

50008MtBA	CYCLIN-DEPENDENT PROTEIN KINASE (PITSLRE)		-2,55
90179MtBA	DNA REPLICATION LICENSING FACTOR (MCM4)-LIKE PROTEIN		0,94
91820MtBC	MEI2-LIKE PROTEIN	2,97	
93175MtBC	SHK1 KINASE-BINDING PROTEIN	-0,92	

### Sonstiges

00018MtBB	5-METHYLTETRAHYDROPTEROYLTRIGLUTAMATE-HOMOCYSTEINE METHYLTRANSFERASE (VITAMIN-B12-INDEPENDENT METHIONINE SYNTHASE ISOZYME)	-3,38	
00039MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L14	3,73	
00161MtBC	CYTOCHROME B561-LIKE	-1,80	
00192MtBB	60S RIBOSOMAL PROTEIN L6		-1,75
00776MtBB	ARGONAUTE/EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 2C	-2,22	
10022MtBA	14-3-3 PROTEIN	-1,29	
10033MtBA	PEROXIDASE	-1,98	-1,28
10298MtBC	1,4-BENZOQUINONE REDUCTASE/TRP REPRESSOR BINDING PROTEIN	-1,35	
10656MtBA	PEROXIDASE PRECURSOR	-2,36	-2,60
20045MtBC	DNAJ PROTEIN	-3,03	-1,77
20206MtBB	PEROXIDASE PRECURSOR		-1,27
20305MtBC	VACUOLAR SORTING RECEPTOR	-2,89	
30152MtBA	SCARECROW-LIKE/PHYTOCHROME A SIGNAL TRANSDUCTION PROTEIN		-1,60
30527MtBC	PEROXIDASE		-1,45
40010MtBB	MANNOSE-1-PHOSPHATE GUANYLTRANSFERASE	3,40	
45523MtBA	PEROXIDASE	-2,07	-2,72
50149MtBA	RING-H2 ZINC FINGER PROTEIN		-1,28
50230MtBA	URIDINE 5'-MONOPHOSPHATE SYNTHASE	2,48	
50725MtBC	ZINC FINGER	-1,63	
50862MtBC	CARBOXYLASE BIOTIN LIGASE	-1,83	
90304MtBA	PROTEIN KINASE	-0,92	
90904MtBB	GDSL LIPASE/ACYLHYDROLASE LIKE	-1,99	
90945MtBB	THIOREDOXIN FAMILY		2,02
91429MtBC	CHIMERE CYTOCHROME P450 MONOOXYGENASE/TRANSPORTER TRANSPORT NITRATE	1,77	
91891MtBC	OXIDOREDUCTASE DEHYDROGENASE SUBUNIT	-0,90	
93024MtBC	EUKARYOTIC INITIATION FACTOR ISO4F SUBUNIT		-2,21

### Verteidigung

00041MtBC	METALLOTHIONEIN	-1,16	-1,14
00227MtBC	PR10	-1,05	-1,97
00308MtBA	GLUTATHIONE PEROXIDASE	-4,68	
10246MtBB	SUPEROXIDE DISMUTASE (CU-ZN) PRECURSOR		-2,09
10312MtBC	CHITINASE	-2,37	-2,83
10368MtBC	RESISTANCE PROTEIN	-3,80	-2,38
10717MtBA	PEROXIDASE PRECURSOR		-1,89

---

## Anhang

10834MtBC	DISEASE RESISTANCE RESPONSE PROTEIN 206-LIKE	-3,72	
20143MtBA	PEROXIDASE PRECURSOR		-0,92
50001MtBA	ABC TRANSPORTER	-0,97	
50303MtBA	THAUMATIN-LIKE PROTEIN	-0,95	
<b><u>Abiotische Stimuli und Entwicklung</u></b>			
00738MtBC	NITRATE-INDUCED PROTEIN-LIKE	2,52	
10361MtBB	LOW-TEMPERATURE INDUCED PROTEIN-LIKE PROTEIN		-1,28
10595MtBC	DNAJ PROTEIN		-1,44
45619MtBA	DEVELOPMENT PROTEIN		-2,97
90593MtBB	NO APICAL MERISTEM PROTEIN-LIKE PROTEIN	-2,14	-2,75
91156MtBB	NO APICAL MERISTEM PROTEIN-LIKE PROTEIN	-1,05	
91472MtBC	RIPENING-RELATED PROTEIN		-1,00
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>			
00211MtBB	-	-1,50	
00381MtBC	-		1,57
00389MtBC	MT4 GENE PRODUCT		-0,95
00499MtBC	-		-2,03
00522MtBC	PHOSPHATIDYLINOSITOL 3- AND 4-KINASE	-1,26	
00686MtBB	ASP/GLU RICH PROTEIN	-3,13	-1,08
00726MtBB	UNCHARACTERIZED CYS-RICH DOMAIN	1,42	
10254MtBC	-	-2,36	
10363MtBC	-	1,62	
10434MtBC	-	2,31	
10475MtBC	-		-0,91
10512MtBB	-		1,96
10522MtBC	G-PROTEIN BETA WD-40 REPEAT	3,71	2,22
10553MtBC	UNKNOWN FUNCTION	-2,43	
10609MtBC	SENESCENCE-ASSOCIATED GENE SAG101-LIKE		-1,03
10650MtBA	CALCIUM-BINDING EF-HAND RAS SMALL GTPASE RAB TYPE RAS SMALL GTPASE RHO TYPE SMALL GTP-BINDING PROTEIN DOMAIN	0,91	
10726MtBB	-		3,39
10741MtBB	STERILE ALPHA MOTIF SAM	1,15	
10759MtBA	SER-RICH PROTEIN	-2,03	
10778MtBB	CYCLASE-ASSOCIATED PROTEIN		-0,94
20076MtBA	HLY-III RELATED PROTEINS		-2,51
20096MtBA	-		-3,68
20280MtBB	TUB FAMILY SIGNATURE 1 CONTAINING PROTEIN		0,98
20303MtBC	PHOSPHATIDYLINOSITOL-SPECIFIC PHOSPHOLIPASE C DOMAIN CONTAINING PROTEIN	-4,56	
30175MtBA	BURP DOMAIN	2,19	
30218MtBC	CONSERVED PROTEIN		1,70
30248MtBB	-	3,12	1,69
30352MtBC	UNCHARACTERIZED PLANT-SPECIFIC DOMAIN 01589	2,49	
30391MtBC	TPR REPEAT CONTAINING PROTEIN		-3,42
30423MtBC	CELLULAR RETINALDEHYDE-BINDING (CRAL)/TRIPLE FUNCTION DOMAIN (TRIO)		1,04
30454MtBB	-		-2,17
30513MtBC	INOSINE/URIDINE-PREFERRING NUCLEOSIDE HYDROLASE	-0,96	-1,89
40052MtBA	BASIC-LEUCINE ZIPPER (BZIP) TRANSCRIPTION FACTOR		4,41

## Anhang

40155MtBB	-		3,10
45036MtBA	UBX DOMAIN AUS	1,07	
45077MtBA	-		-2,26
45131MtBA	DNA J-LIKE DOMAIN CONTAINING PROTEIN		0,95
45232MtBA	-	1,38	
45236MtBA	-	1,37	2,67
45256MtBA	-	1,41	
45525MtBA	-		0,99
45563MtBB	RNA-BINDING PROTEIN	-1,40	
45577MtBB	-	1,77	
45598MtBC	MULTISPANNING MEMBRANE PROTEIN	-1,42	-1,76
45607MtBB	BASIC HELIX-LOOP-HELIX DIMERIZATION DOMAIN BHLH		3,42
50021MtBA	CONSERVED HYPOTHETICAL ATP BINDING PROTEIN ATP/GTP-BINDING SITE MOTIF A (P-LOOP)	1,19	
50033MtBA	RNA-BINDING REGION RNP-1 (RNA RECOGNITION MOTIF)	-0,91	
50116MtBA	-		2,46
50160MtBA	TPR REPEAT CONTAINING PROTEIN		-2,14
50244MtBA	-	2,55	3,45
50686MtBC	-		2,63
50695MtBC	-		-3,70
50834MtBC	RIBOSOMAL PROTEIN S8E		-1,74
90123MtBA	-		0,92
90145MtBA	-		1,48
90244MtBA	-	2,51	
90247MtBA	GLU/GLN RICH PROTEIN	-1,47	
90253MtBA	SER/LYS RICH PROTEIN	1,03	
90276MtBA	TYROSINE SPECIFIC PROTEIN PHOSPHATASE AND DUAL SPECIFICITY PROTEIN PHOSPHATASE		-1,47
90309MtBA	-		-2,87
90343MtBA	GLUTAMINE-RICH PROTEIN		1,00
90451MtBA	-	-0,90	
90545MtBA	-	1,81	
90570MtBB	-		3,45
90571MtBB	[NODULIN] MTN19	-1,07	
90580MtBB	AP2 (APETALA2) DOMAIN CONTAINING PROTEIN	-1,68	
90597MtBB	-	2,73	
90604MtBB	-		1,32
90752MtBB	LATE NODULIN NOD-CCP5 - LIKE	2,00	
90786MtBB	-		-1,05
90951MtBB	-		-2,91
90968MtBB	-	1,33	
90989MtBB	PROLINE-RICH REGION	1,05	
91071MtBB	-	-1,12	
91197MtBC	-	2,33	
91218MtBC	-	-1,29	
91388MtBC	-		1,92
91470MtBC	-		2,59
91480MtBC	-	-3,03	
91556MtBC	-	1,48	1,08
91586MtBC	-		-1,09

## Anhang

91847MtBC	GTP-BINDING LIPOPROTEIN	-2,13	
91895MtBC	ZN-FINGER C2H2 TYPE	0,93	
91916MtBC	-		0,91
92164MtBC	-	-3,65	
93004MtBB	LEUCINE-RICH REPEAT PROLINE-RICH REGION PLANT SPECIFIC	4,41	
93022MtBC	DNAJ DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	2,83	
93112MtBC	-	-1,81	-1,07
93148MtBA	-		-1,44
93188MtBB	-		-1,20
93220MtBB	LEUCINE-RICH REPEAT CYSTEINE-CONTAINING TYPE LEUCINE-RICH REPEAT TYPICAL SUBTYPE LEUCINE-RICH REPEAT SDS22+-LIKE	3,45	
93268MtBA	UNKNOWN FUNCTION		-2,15
93316MtBC	-		3,63
GVN-55E6	[NODULIN] NODULIN 25	-0,97	
GVN-74I6	[NODULIN] MTN21		1,51
GVN-74J10	[NODULIN] MTN21-LIKE	2,60	
MHAM-47P10	[NODULIN] MTN93	-0,96	
MtAe5	-	1,40	1,62

### ***G. intraradices* & *G. rosea***

Cluster	Annotation	Induktion	
		<i>G. intraradices</i>	<i>G. rosea</i>
<b><u>Zellwand</u></b>			
10353MtBB	ARABINO GALACTAN PROTEIN	-0,98	-1,46
<b><u>Membrantransport</u></b>			
20134MtBA	MTPT2 PHOSPHATE TRANSPORTER	-0,95	-1,24
<b><u>Proteinsynthese und -prozessierung</u></b>			
30164MtBC	AMINOPEPTIDASE	-0,93	-2,04
<b><u>Primärmetabolismus</u></b>			
00463MtBC	PYRUVATE KINASE, CYTOSOLIC ISOZYME	-0,94	-3,27
10491MtBB	2OG-FE (II) OXYGENASE SUPERFAMILY	0,99	1,56
50697MtBC	BLUE COPPER PROTEIN	2,06	3,61
<b><u>Genexpression und RNA-Metabolismus</u></b>			
45283MtBC	ZINC-FINGER TYPE TRANSCRIPTION FACTOR WRKY	-0,99	-3,59
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>			
MtAe14	-	0,97	1,24

***G. intraradices* & *G. mosseae***

Cluster	Annotation	Induktion			
		<i>G. intraradices</i>		<i>G. mosseae</i>	
<b><u>Membrantransport</u></b>					
10430MtBC	MAJOR INTRINSIC PROTEIN (NODULIN26-LIKE)	2,05	1,28	1,76	0,98
GVN-71A1	NODULIN 26	1,18	1,72	1,56	1,67
<b><u>Proteinsynthese und -prozessierung</u></b>					
50766MtBC	SERINE CARBOXYPEPTIDASE	1,92	1,92	0,97	
91610MtBC	SUBTILISIN INHIBITOR	1,85	1,39		0,97
93225MtBB	OLIGOSACCHARYL TRANSFERASE	-1,05			-1,02
<b><u>Primärmetabolismus</u></b>					
00238MtBC	FERREDOXIN PRECURSOR		-1,17		-1,00
30578MtBB	BLUE COPPER-BINDING PROTEIN	-1,06	-1,05		-1,08
MtAMLS393	OXALATE OXIDASE	1,77		1,53	
<b><u>Sekundär- und Phytohormonmetabolismus</u></b>					
90560MtBA	TERPENE SYNTHASE	1,11		1,31	
<b><u>Chromatinstruktur und DNA-Metabolismus</u></b>					
92000MtBC	HISTONE H2B	1,37		1,48	
<b><u>Sonstiges</u></b>					
10199MtBC	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEIN		-0,99		-1,18
45121MtBA	BASIC 7S GLOBULIN/EXTRACELLULAR DERMAL GLYCOPROTEIN	-1,12			-2,19
<b><u>Verteidigung</u></b>					
00285MtBC	CYSTEINE-RICH ANTIFUNGAL PROTEIN-LIKE	1,01	1,09	1,99	
00300MtBC	PROTEASE INHIBITOR		0,98		1,39
40051MtBC	GLUTATHIONE S-TRANSFERASE	0,92		1,91	
91818MtBC	PROTEINASE INHIBITOR	1,37	1,66	1,64	1,04
<b><u>Abiotische Stimuli und Entwicklung</u></b>					
00329MtBA	GERMIN-LIKE PROTEIN (OXALATE OXIDASE)		-1,22		-1,51
20245MtBC	AUXIN-RESPONSIVE PROTEIN-LIKE PROTEIN		-0,99	-1,10	
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>					
00603MtBC	BURP DOMAIN	1,42	1,06	1,09	1,41
30464MtBC	MYB-LIKE DNA-BINDING DOMAIN SHAQKYF CLASS		1,22	1,24	2,26
40121MtBC	UNKNOWN FUNCTION		-1,32		-1,23
51010MtBC	TRYPSIN INHIBITOR KUNITZ	1,87	0,95	1,23	3,39
91754MtBC	-	1,31	0,90	1,75	1,22
MtAMLS11	HYPOTHETICAL PROTEIN	1,88			2,41
MtAMLS232	-	1,38			1,60
MtAMLS245	HYPOTHETICAL PROTEIN	1,98			2,50

***G. mosseae* & *G. rosea***

Cluster	Annotation	Induktion		
		<i>G. mosseae</i>	<i>G. rosea</i>	
<b><u>Membrantransport</u></b>				
00007MtBC	MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN (AQUAPORIN PIP1)	-1,38		-0,92
<b><u>Vesikeltransport und Proteinlokalisierung</u></b>				
10629MtBB	SYNAPTObREVIN-LIKE/VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN	-1,04	-2,88	-2,76
<b><u>Primärmetabolismus</u></b>				
00758MtBB	6 7-DIMETHYL-8-RIBITYLLUMAZINE SYNTHASE PRECURSOR	-0,91		-1,96
10646MtBC	PLASMA MEMBRANE H <sup>+</sup> -ATPASE	-0,92		-2,50
20390MtBA	VACUOLAR ATP SYNTHASE SUBUNIT B	-1,05	-1,49	
30223MtBC	IRON/ASCORBATE-DEPENDENT OXIDOREDUCTASE	0,99	2,79	1,87
90582MtBB	ALBUMIN 2	-1,01		-2,31
93076MtBA	PYRUVATE KINASE	1,43		1,94
MsCA	CARBONIC ANHYDRASE		0,92	2,06
<b><u>Sekundär- und Phytohormonmetabolismus</u></b>				
00294MtBC	NAD(P)H DEPENDENT 6'-DEOXYCHALCONE SYNTHASE (CHALCONE REDUCTASE)		1,12	3,89
00509MtBC	O-METHYLTRANSFERASE		1,08	3,62
50576MtBB	DESACETOXYVINDOLINE-4-HYDROXYLASE	-0,99		-1,88
<b><u>Genexpression und RNA-Metabolismus</u></b>				
93106MtBC	RIBONUCLEASE PRECURSOR	-1,40	-2,82	-1,67
<b><u>Signaltransduktion und posttranslationale Regulation</u></b>				
40113MtBA	SER/THR PROTEIN KINASE	-1,00		-2,15
<b><u>Sonstiges</u></b>				
00020MtBB	14-3-3 PROTEIN	-0,99	-1,02	-3,87
00067MtBB	1,4-BENZOQUINONE REDUCTASE/TRP REPRESSOR BINDING PROTEIN	-1,65		-1,52
00341MtBC	HISTONE H2B	-1,21		-1,10
mt-aac120001a01	[NODULIN] LEGHEMOGLOBIN, TC10534-HOMOLOG		1,54	1,67
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>				
10362MtBB	-		1,25	1,44
91894MtBC	-	-0,97	-3,89	-2,38
93302MtBB	RING FINGER CONTAINING PROTEIN	-1,13		-1,55

***G. intraradices, G. mosseae & G. rosea***

Cluster	Annotation	Induktion					
		<i>G. intraradices</i>		<i>G. mosseae</i>	<i>G. rosea</i>		
<b><u>Membrantransport</u></b>							
91940MtBC	BLUE COPPER PROTEIN PRECURSOR	1,52	1,51	0,96	2,93		
<b><u>Sonstiges</u></b>							
30378MtBC	BLUE COPPER PROTEIN		2,09	1,79	4,37		
<b><u>Unbekannte Funktion</u></b>							
00311MtBC	-	1,44	1,24	1,43	2,93	2,40	
93285MtBC	GROWTH-RELATED PROTEINS-LIKE	1,47	1,19	1,39	2,39	1,42	2,55

---

---

## Danksagung

In den Jahren der Promotion wurden viele Diskussionen geführt, viele Experimente gestaltet und viele Späße gemacht, für die ich mich bei folgenden Personen herzlich bedanken möchte:

	Unterstützung		
	Theoretische	Praktische	Moralische
Philipp Franken	X		(X)
Petra Mann		X	X
Natascha Bomanskie		X	
M'Barek Tamasloukht	X	X	X
Philippe Rech	X		
Franziska Krajinski & Co		X	
Jutta Ludwig-Müller & Co	X	X	
Helge Küster & Co	X	X	
Vera Fehlberg		X	
allen Mitarbeitern von A2	X	X	X

Außerdem gilt mein Dank all denen, die in irgendeiner Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben und nicht mit Namen erwähnt wurden. Besonders möchte ich mich jedoch bei meiner Freundin Anja bedanken, die mir immer hilfreich zur Seite stand.



Finanziell unterstützt wurde diese Arbeit durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen“.

---

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Ulf Grunwald  
Geburtsdatum: 17.07.1974  
Geburtsort: Husum

## Schulbildung

1981 – 1985 Grundschule West/Brunsbüttel  
1985 – 1994 Gymnasium Brunsbüttel  
  
1994 – 1995 Zivildienst in einer Kindertagesstätte

## Biologie-Studium

1995 – 1997 Grundstudium  
1997 Vordiplom  
1997 – 1999 Hauptstudium  
1999 Diplomprüfung in Mikrobiologie, Genetik und Biochemie  
1999 – 2000 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie  
in der Arbeitsgruppe von P. Franken  
„Identifizierung Mykorrhiza-regulierter Gene in *Medicago truncatula* und  
*Pisum sativum*“  
2000 – 2004 Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in  
der Arbeitsgruppe von P. Franken  
„Analyse der Genregulation in *Medicago truncatula* und *Pisum sativum*  
während der Entwicklung arbuskulärer Mykorrhiza“