

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung  
von für die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose  
spezifischen Genen in *Medicago truncatula*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades „doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Armin Reinert  
geb. am 24.01.1982 in Kirchheim unter Teck



Kirchheim, September 2012

Dieses Werk ist unter einem Creative Commons Lizenzvertrag lizenziert:  
Namensnennung - Keine kommerzielle Nutzung - Weitergabe unter gleichen  
Bedingungen 3.0 Deutschland

Um die Bedingungen der Lizenz einzusehen, folgen Sie bitte dem Hyperlink:  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URL <http://opus.kobv.de/ubp/volltexte/2013/6380/>

URN [urn:nbn:de:kobv:517-opus-63805](http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63805)

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus-63805>

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
Abkürzungsverzeichnis.....	vi
Abbildungsverzeichnis.....	ix
Tabellenverzeichnis.....	xi
Abstract (deutsch).....	xii
Abstract (english).....	xiv
1. Einleitung.....	1
<b>1.1 Charakteristika der Mykorrhiza.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose</b>	
<b>(AMS).....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Molekulare Charakteristika der frühen Phase der AMS.....	6
1.2.2 Weitere AMS-regulierte Gene.....	9
1.2.3 Molekulare Charakteristika der <i>Glomeromycota</i> .....	10
<b>1.3 Der Modelorganismus <i>Glomus intraradices</i>.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4 Der Modelorganismus <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>12</b>
<b>1.5 Ziel dieser Arbeit.....</b>	<b>14</b>
2. Material.....	15
<b>2.1 Chemikalien.....</b>	<b>15</b>
2.1.1 Enzyme und Reaktionskits.....	15
2.1.2 Selektionsreagenzien.....	16
2.1.3 DNA-Größenstandards.....	16
2.1.4 Weitere Chemikalien.....	16
2.1.5 Puffer und Stammlösungen.....	17
<b>2.2 Synthetische Oligonukleotide.....</b>	<b>19</b>
2.2.1 Oligonukleotide für die quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	19
2.2.2 Oligonukleotidsequenzen für RACE („rapid amplification of cDNA ends “)-PCR-Untersuchungen.....	21

2.2.3 Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation der RNAi-Konstrukte...	22
2.2.4 Sequenzen der Oligonukleotide für Promotor::CFP-Fusionen.....	23
2.2.5 Oligonukleotidsequenzen für das ethanolinduzierbare System.....	23
<b>2.3 Vektoren und Organismen.....</b>	<b>24</b>
2.3.1 Bakterien.....	24
2.3.2 Plasmide.....	24
2.3.3 <i>Medicago truncatula</i> -Ökotypen.....	24
2.3.4 Pilzinokulum.....	24
<b>2.4 Kulturmedien und Dünger.....</b>	<b>25</b>
2.4.1 Kulturmedien für Bakterien.....	25
2.4.2 Medien für <i>Aphanomyces euteiches</i> -Zoosporenproduktion.....	26
2.4.3 <i>In vitro</i> -Pflanzenmedium (Fahraeus-Medium).....	26
2.4.4 Kulturmedium für <i>in vitro</i> -Wurzelkulturen (M-Medium).....	27
2.4.5 Düngerlösung für <i>in vivo</i> -Pflanzen (Hoagland's-Lösung).....	28
2.4.6 Substrate zur <i>in vivo</i> -Kultivierung von <i>M. truncatula</i> .....	28
<b>2.5 Geräte und Programme.....</b>	<b>29</b>
2.5.1 Geräte.....	29
2.5.2 Programme.....	30
<b>2.6 Referenzen.....</b>	<b>31</b>
<b>2.7 Weitere Chemikalien, Verbrauchsstoffe und Glaswaren.....</b>	<b>33</b>
2.7.1 Anbieter von weiteren Chemikalien, Verbrauchsstoffen und Glaswaren.....	33
<b>3. Methoden.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Wachstums- und Kultivierungsbedingungen.....</b>	<b>34</b>
3.1.1 Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen.....	34
3.1.2 Kultivierung anderer Organismen.....	34
3.1.3 Pflanzenkultivierungsbedingungen.....	35
<b>3.2 Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>37</b>
3.2.1 Isolation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	37
3.2.2 Restriktionsverdau.....	37
3.2.3 Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR).....	38
3.2.4 Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel.....	38
3.2.5 Klonierung.....	38

3.2.6	Quantitative-Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	41
<b>3.3</b>	<b>Transformationen.....</b>	<b>42</b>
3.3.1	Transformation von Mikroorganismen.....	42
3.3.2	Pflanzentransformationen.....	43
3.3.3	Mikroskopie.....	44
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>46</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressionsanalyse AMS-induzierter Gene in <i>Medicago</i></b>	
	<b><i>truncatula</i>.....</b>	<b>46</b>
4.1.1	Mess- und Berechnungsverfahren der qRT-PCR-Messungen.....	46
4.1.2	Identifizieren von AMS-regulierten Transkriptionsfaktoren.....	46
4.1.3	Vergleich der TF-Regulation in <i>M. truncatula</i> zwischen mykorrhizierten Wurzeln, Wurzelknöllchen und weiteren Pflanzenorganen.....	53
4.1.4	Identifizierung koregulierter Transkriptionsfaktoren zwischen <i>A. euteiches</i> -infizierten und in <i>G. intraradices</i> -kolonisierten <i>M. truncatula</i> -Wurzeln.....	55
<b>4.2</b>	<b>Mittels qRT-PCR durchgeführte Zeitverlaufsexperimente</b>	
	<b>AMS-regulierter Gene.....</b>	<b>58</b>
4.2.1	Etablierung einer qRT-PCR-Plattform zur parallelen Messung bekannter AMS-relevanter Gene aus <i>M. truncatula</i> .....	58
4.2.2	Untersuchung der Veränderung der Transkription AM-spezifischer TFs in einem Zeitverlaufsexperiment.....	60
4.2.3	Untersuchung des Transkriptionsverlaufes AMS-spezifischer Gene....	61
4.2.4	Untersuchung des zeitlichen Transkriptionsverlaufes von unter Phosphatmangel induzierten Genen in AM-kolonisierten Wurzeln.....	65
4.2.5	Clusteranalyse der 21 dpi Transkriptionsdaten der qRT-PCR- AMS-Plattform.....	66
<b>4.3</b>	<b>Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter Gene.....</b>	<b>68</b>
4.3.1	Auswahl der Gene für Promotor::CFP-Fusionen und Erstellung der Wurzeltransformanden.....	68
4.3.2	Prom::CFP-Vektorkontrollen (35S::CFP; GFPi::CFP).....	69
4.3.3	Promotor::CFP-Fusion der Transkriptionsfaktoren <i>MtNTS</i> , <i>MtDES</i> , <i>MtOFTN</i> .....	70
4.3.4	Prom::CFP-Fusion von <i>MtAmT</i> , <i>MtMDRL</i> und <i>MtPPK</i> .....	73

<b>4.4 „Silencing“ von AMS-regulierten Genen mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi).....</b>	<b>76</b>
4.4.1 Identifizierung der mRNA-Sequenz und Klonierung der RNAi-Konstrukte ausgewählter Kandidatengene.....	76
4.4.2 RNAi <i>in vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Kulturen zur Identifizierung möglicher RNAi-Effekte auf die AMS.....	77
4.4.3 Vergleich zwischen Transkriptionsdaten von <i>in vivo</i> -Topfkulturen und <i>in vitro</i> -Wurzelkulturen.....	82
4.4.4 Veränderungen der Transkription in den RNAi-Linien.....	83
<b>4.5 Induzierbares Promotorsystem zur funktionellen Untersuchung von Transkriptionsfaktoren.....</b>	<b>87</b>
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Transkriptionsanalyse AMS-induzierter TFs in <i>Medicago truncatula</i>.....</b>	<b>88</b>
5.1.1 Während der AMS signifikant regulierte Transkriptionsfaktoren in <i>M. truncatula</i> .....	88
5.1.2 Überproportional vertretene TF-Familien unter den während der AMS signifikant regulierten TFs in <i>M. truncatula</i> .....	89
5.1.3 Untersuchung von Koregulationsereignisse in der Transkription von TFs in mykorrhizierten, nodulierten und <i>A. euteiches</i> -infizierten <i>M. truncatula</i> -Wurzeln.....	90
5.1.4 Transkription der acht TF-Topkandidaten in verschiedenen Pflanzenorganen von <i>M. truncatula</i> .....	93
<b>5.2 Transkriptionsanalyse mykorrhizierter <i>M. truncatula</i> Wurzeln mit Hilfe der qRT-PCR-AM-Plattform.....</b>	<b>93</b>
5.2.1 Anwendung und Nutzen der qRT-PCR-AMS-Plattform.....	93
5.2.2 Analyse der Transkription von unter Phosphatmangel verstärkt transkribierten Genen in mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> Wurzeln.	95
<b>5.3 Funktionelle Analyse AMS-regulierter Gene.....</b>	<b>96</b>
5.3.1 Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter TFs.....	96
5.3.2 Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter Gene.....	97

5.3.3 Funktionelle Charakterisierung zweier AMS-regulierter Transporter mittels RNAi.....	99
<b>5.4. Überblick und Ausblick.....</b>	<b>105</b>
6. Zusammenfassung.....	109
7. Literaturverzeichnis.....	110
8. Danksagung.....	131
Eidesstattliche Erklärung.....	132
Anhang.....	auf CD

# Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
AMS	arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
bp	Basenpaare
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CaMV	<i>Cauliflower Mosaic Virus</i> (Blumenkohlmosaikvirus)
cDNA	komplementäre DNA
CDS	kodierende Sequenz
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CM	Maismehl
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
Ct	Schwellenwert-Zyklus („ <i>cycle treshold</i> “)
DEPC	Diethylpyrocarbonate
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dpi	Tage nach der Infektion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER $\alpha$	Estrogen Rezeptor $\alpha$
<i>et al.</i>	<i>et altera</i> (und andere)
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTPase	Guanintriphosphate-bindendes Protein
HCl	Salzsäure
Hz	Hertz
ID	„ <i>Identifier</i> “ (Identifikator)
IMGAG	International Medicago Genome Annotation Group
k	Tausend

kV	Kilovolt
l	Liter
LB	lysogeny broth
LB	linke Grenze
LCOs	Lipocholeoligosaccharide
LFC	log- fold change
LPC	Lysophosphatidylcholine
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop
M	Molar
mg	Milligramm
Min	Minuten
miRNA	micro RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mRFP	monomerisches rot fluoreszierendes Protein
mRNA	messenger RNA
myk-	nicht mykorrhizierte Wurzeln
myk+	mykorrhizierte Wurzeln
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromolar
$\mu$ m	Mikrometer
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz („ <i>nuclear magnetic resonance</i> “)
PAM	periarbuskuläre Membran
PAS	periarbuskulärer Raum („ <i>periarbuscular space</i> “)
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
Pi	anorganisches Phosphat
PMB	Pepton-Maltose-Broth
PPA	Präpenetrations-Apparat
qRT	quantitative Echtzeit („ <i>quantitative real time</i> “)

RACE	schnelle Amplifikation von cDNA Enden („ <i>rapid amplification of cDNA-ends</i> “)
RB	rechte Grenze
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNS	Wurzelknöllchensymbiose
rRNA	ribosomale RNA
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
sog.	sogenannte
SSH	suppressive subtraktive Hybridisierung
T- DNA	Transfer DNA
Tab	Tabelle
TC	Tentativ Consensus
TF	Transkriptionsfaktor
TNT	<i>Tabacum nicotiana</i> Transposon
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehungen
u. a.	unter anderem
UTR	untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WGA	Weizenkeimlings-Agglutinin („ <i>wheat germ agglutinin</i> “)
WT	Wildtyp
YT	Hefe Tryptone
z. B.	zum Beispiel

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<b>Fossile Arbuskel.</b>	2
Abbildung 2	<b>Auskeimende Sporen und Appresorium von <i>Glomus intraradices</i> an <i>Medicago truncatula</i>.</b>	3
Abbildung 3	<b><i>Glomus intraradices</i> Strukturen innerhalb einer kolonisierten <i>Medicago truncatula</i>-Wurzel.</b>	5
Abbildung 4	<b><i>Medicago truncatula</i>-Pflanze.</b>	12
Abbildung 5	<b>Schematische Darstellung der Klonierung für das ethanolinduzierbare System.</b>	39
Abbildung 6	<b>Schematische Darstellung des pKDSR(I)-Vektors.</b>	40
Abbildung 7	<b>Schematische Darstellung des pGWB443-Vektors.</b>	40
Abbildung 8	<b>Verteilung der TF-Familien in der <i>M. truncatula</i>-qRT-PCR-TF-Plattform</b>	47
Abbildung 9	<b>Anzahl gemessener Transkripte während des TF-Profilings.</b>	48
Abbildung 10	<b>Durchschnittliche Ct-Werte je Messung im TF-Profilings.</b>	48
Abbildung 11	<b>Signifikante Transkriptveränderung (LFC) AM-regulierter TFs nach 21 Infektionstagen.</b>	49
Abbildung 12	<b>Verteilung der TF-Familien für AMS-regulierte TFs.</b>	50
Abbildung 13	<b>Clusteranalyse der 59 signifikant regulierten TFs.</b>	52
Abbildung 14	<b>Änderung der Transkriptmenge von TFs die sowohl in mykorrhizierten Wurzeln als auch in Wurzelknöllchen von <i>M. truncatula</i> signifikant reguliert sind.</b>	53
Abbildung 15	<b>Transkriptregulation der TF-Topkandidaten in weiteren Pflanzenorganen.</b>	54
Abbildung 16	<b><i>Aphamoyces euteiches</i>-Infektion.</b>	56
Abbildung 17	<b>Anzahl gemessener Transkripte während des TF-Profilings mit <i>A. euteiches</i>-infizierten Wurzeln.</b>	56
Abbildung 18	<b>Durchschnittliche Ct-Werte je Messung im TF-Profilings mit <i>A. euteiches</i> infizierten Wurzeln.</b>	57
Abbildung 19	<b>Mittelwerte der Veränderung der Transkriptmenge von signifikant regulierten TFs in <i>A. euteiches</i> infizierten Wurzeln.</b>	57
Abbildung 20	<b>qRT-PCR-Messungen für mykorrhizaspezifische Markergene.</b>	60
Abbildung 21	<b>Transkriptraten der AMS-regulierten TF-Topkandidaten im Zeitverlauf.</b>	61
Abbildung 22	<b>Transkriptrate AMS-regulierter Gene aus Frenzel <i>et al.</i> (2005) im Zeitverlauf.</b>	62
Abbildung 23	<b>Transkriptraten AMS-regulierter Gene mit unbekannter Funktion im Zeitverlauf.</b>	63
Abbildung 24	<b>Veränderung der Transkriptmengen für AMS-regulierte Gene aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.</b>	64

Abbildung 25	<b>Veränderung der Transkriptmengen für AMS-regulierte Lektine im Zeitverlauf.</b>	64
Abbildung 26	<b>Veränderung der Transkriptmengen für Gene des Phosphatmangel-Signalweges aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.</b>	65
Abbildung 27	<b>Mittelwerte der Erhöhung der Transkriptmenge für verschiedene Vorläufermoleküle der <i>miRNA399</i>-Gene aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.</b>	66
Abbildung 28	<b>„Clustering“ der AMS-Plattform-Transkriptionsdaten nach 21 Infektionstagen.</b>	67
Abbildung 29	<b>Mit WGA-Alexa-Fluor® gefärbte mykorrhizierte <i>M. truncatula</i>-Wurzeln aus einer Wurzelkultur.</b>	69
Abbildung 30	<b>Lokalisierung der <i>MtNTS_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtNTS_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	71
Abbildung 31	<b>Lokalisierung der <i>MtNTS_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz im Wurzelquer-schnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtNTS_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	71
Abbildung 32	<b>Lokalisierung der <i>MtDES_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einem Wurzel-querschnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtDES_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	72
Abbildung 33	<b>Lokalisierung der <i>MtOFTN_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einem Wurzel-querschnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtOFTN_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	73
Abbildung 34	<b>Lokalisierung der <i>MtAmT_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtAmT_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	74
Abbildung 35	<b>Lokalisierung der <i>MtMDRL_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtMDRL_Prom::CFP</i>)-Wurzel.</b>	75
Abbildung 36	<b>Lokalisierung der <i>MtPPK_Prom::CFP</i>-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten <i>M. truncatula</i> (<i>MtPPK_Prom::CFP</i>)-Wurzeln.</b>	75
Abbildung 37	<b>Korrelationen der <math>\Delta</math>Ct-Werten (3'CoT_RNAi).</b>	79
Abbildung 38	<b>Korrelationen der <math>\Delta</math>Ct-Werten (5'SuT_RNAi).</b>	80
Abbildung 39	<b>Transkriptionsveränderung in 3'CoT_RNAi-Linien.</b>	81
Abbildung 40	<b>Transkriptionsveränderung in 5'SuT_RNAi-Linien.</b>	82
Abbildung 41	<b>Signifikant regulierte Gene zwischen GFPi_RNAi und den drei AMS-Plattform-Replikaten.</b>	83
Abbildung 42	<b>„Clustering“ und Expressionshöhe („LFCs“; myk+/ myk-) in GFPi_RNAi-Wurzelkulturen.</b>	84
Abbildung 43	<b>LFCs der mit der RNAi Plattform gemessenen Transkripte der RNAi-Linien 5'MtSuT_RNAi #94 und #96 und 3'MtCoT_RNAi #15 und #25.</b>	86

# Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Überblick über die „ <i>sym</i> “-Mutanten und die zugehörigen Phenotypen.	7
Tab. 2	Verwendete Enzyme und Reaktionskits.	15
Tab. 3	Antibiotika	16
Tab. 4	Größenstandards für die Gelelektrophorese.	16
Tab. 5	Weitere Chemikalien und deren Hersteller.	16
Tab. 6	Stammlösungen für die Plasmid-Minipräparation aus <i>E. coli</i> .	17
Tab. 7	Färbelösungen	18
Tab. 8	Citratpuffer	18
Tab. 9	Oligonukleotide, die für die qRT-PCR-Messungen verwendet wurden.	19
Tab. 10	„RACE“-Oligonukleotide	21
Tab. 11	Oligonukleotide, die für die Erzeugung von RNAi-Konstrukten gewählt wurden.	22
Tab. 12	Oligonukleotide für die subzelluläre Aktivitätsstudie verschiedener AMS-spezifischer Promotoren.	23
Tab. 13	Oligonukleotide für die Amplifikation der kodierenden Sequenz (CDS) von AMS-spezifischen Transkriptionsfaktoren und der CDS von mRFP.	23
Tab. 14	Bakterienstämme und deren Herkunft.	24
Tab. 15	Vektoren und deren Herkunft.	24
Tab. 16	Medien für die Bakterienkultivierung.	25
Tab. 17	Medien zur Kultivierung und Zoosporenproduktion von <i>A. euteiches</i> .	25
Tab. 18	Fahraeus-Medium	26
Tab. 19	M-Medium	27
Tab. 20	Hoagland's-Lösung.	28
Tab. 21	Auflistung von Geräten und den jeweiligen Herstellern.	29
Tab. 22	Bioinformatische- und Bildbearbeitungsprogramme.	30
Tab. 23	Untersuchte Gene und deren Referenzen.	31
Tab. 24	LSM-Einstellungen.	45
Tab. 25	AMS-regulierte Transkriptionsfaktoren in <i>M. truncatula</i> .	51
Tab. 26	Zusammensetzung der AM-Plattform.	59

## Abstract (deutsch)

Die Mykorrhiza (griechisch: *mýkēs* für „Pilz“; *rhiza* für „Wurzel“) stellt eine Symbiose zwischen Pilzen und einem Großteil der Landpflanzen dar. Der Pilz verbessert durch die Symbiose die Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen, während die Pflanze den Pilz mit Kohlenhydraten versorgt. Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) stellt dabei einen besondere Form der Mykorrhiza dar. Der AM-Pilz bildet dabei während der Symbiose die namensgebenden Arbuskeln innerhalb der Wurzelzellen als Ort des primären Nährstoffaustausches aus. Die AM-Symbiose (AMS) ist der Forschungsschwerpunkt dieser Arbeit. Als Modellorganismen wurden *Medicago truncatula* und *Glomus intraradices* verwendet.

Es wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt um u.a. AMS regulierte Transkriptionsfaktoren (TFs) zu identifizieren. Die Aktivität der Promotoren von drei der so identifizierten AMS-regulierten TFs (*MtOFTN*, *MtNTS*, *MtDES*) wurde mit Hilfe eine Reportergens visualisiert. Der Bereich der größten Promotoraktivität waren in einem Fall nur die arbuskelhaltigen Zellen (*MtOFTN*). Im zweiten Fall war der Promotor auch aktiv in nicht arbuskelhaltigen Zellen, jedoch am stärksten aktiv in den arbuskelhaltigen Zellen (*MtNTS*). Ein weiterer Promotor war in arbuskelhaltigen Zellen und den diesen benachbarten Zellen gleich aktiv (*MtDES*).

Zusätzlich wurden weitere Gene als AMS-reguliert identifiziert und es wurde für drei dieser Gene (*MtPPK*, *MtAmT*, *MtMDRL*) ebenfalls eine Promotor::Reporter-Aktivitätsstudie durchgeführt. Die Promotoren der Kinase (*MtPPK*) und des Ammoniumtransporters (*MtAmT*) waren dabei ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen aktiv, während die Aktivität des ABC-Transporters (*MtMDRL*) keinem bestimmten Zelltyp zuzuordnen war.

Für zwei weitere identifizierte Gene, ein Kupfertransporter (*MtCoT*) und ein Zucker bzw. Inositoltransporter (*MtSuT*), wurden RNA-Interferenz (RNAi)-Untersuchungen durchgeführt. Dabei stellte sich in beiden Fällen heraus, dass, sobald ein RNAi-Effekt in den transformierten Wurzeln vorlag, diese in einem deutlich geringeren Ausmaß wie in der Wurzelkontrolle von *G. intraradices* kolonisiert worden sind. Im Falle von *MtCoT* könnte das aus dem selben Grund geschehen, wie im Falle von *MtPt4*. Welche Rolle *MtSuT* genau in der Ausbildung der AMS spielt und welche Rolle Inositol in der Ausbildung der AMS spielt müsste durch weitere Untersuchungen am Protein untersucht werden.

Weitere Untersuchungen an den in dieser Arbeit als spezifisch für arbuskelhaltige Zellen gezeigten Genen *MtAmT*, *MtPPK* und *MtOFTN* könnten ebenfalls aufschlussreich für das weitere Verständnis der AMS sein. Dies trifft auch auf die TFs *MtNTS* und *MtDES* zu, die zwar nicht ausschließlich arbuskelspezifisch transkribiert werden, aber auch eine Rolle in der Regulation der AMS innerhalb von *M. truncatula* Wurzeln zu spielen scheinen.

## Abstract (english)

The mycorrhiza (Greek: *mýkēs* for "mushroom"; *rhiza* for "root") is a symbiosis between fungi and the vast majority of land plants. The fungus improves the nutrient supply of the plant, while the plant provides the fungus with carbohydrates. The arbuscular mycorrhiza (AM) represents a special type of mycorrhiza. The AM forms during the symbiosis eponymous arbuscules within the root cells as the supposed site of the major nutrient exchange. The AM symbiosis (AMS) is the research focus of this work. *Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* were used as model organisms.

During the project several transcription analysis were performed to identify AMS regulated transcription factors (TFs). The activity of the promoters of three of the identified AMS regulated TFs (*MtOFTN*, *MtNTS*, *MtDES*) were visualised using a reporter gene. Cells with promoter activity were in one case the arbuscle containing cells (*MtOFTN*). In the another case, the promoter was also weakly active in non arbuscle containing cells, however the major site of activity were the arbuscle containing cells (*MtNTS*). Another promoter was active in arbuscle containing and adjacent cells (*MtDES*).

In addition, other genes were identified as AMS regulated and for three of these genes (*MtPPK*, *MtAmT*, *MtMDRL*) a promoter::reporter activity study was conducted, too. The promoters of the kinase (*MtPPK*) and the ammonium transporter (*MtAmT*) were active exclusively in arbuscle containing cells, whereas the activity of the ABC-transporter (*MtMDRL*) could not be assigned to a specific cell type.

For two other identified genes (a copper transporter (*MtCoT*) and a sugar/ inositol transporter (*MtSuT*)) RNA-interference (RNAi) studies were carried out. The studies revealed in both cases that, once an RNAi effect was present in the transformed roots, the roots were colonised by *G. intraradices* in a much lesser extent as in the vector-control. In the case of *MtCoT* it maybe has the same basic principle as in the case of the phosphate transporter *MtPt4*. Which role *MtSuT* and inositol plays during the formation of the AMS has to be reviewed.

Further examinations on the genes *MtAmT*, *MtPPK* and *MtOFTN* could also be revealing for the understanding of the AMS, as their promoters, as shown in this thesis, are exclusively active in arbuscle containing cells. The same can be said for the TFs *MtNFTS* and *MtDES*. They are not exclusively transcribed in arbuscle containing cells, but nevertheless seem to play a role in the formation of the AMS within *M. truncatula* roots.

# 1. Einleitung

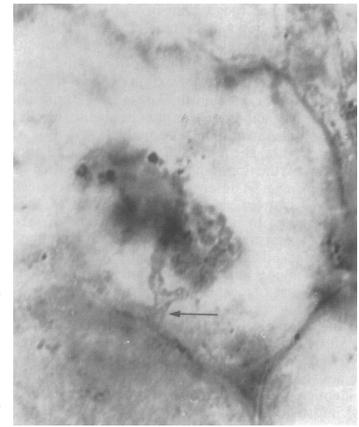
## 1.1. Charakteristika der Mykorrhiza

Die Mykorrhiza (griechisch: *mýkēs* für „Pilz“; *rhiza* für „Wurzel“) stellt eine Symbiose zwischen Pilzen und einem Großteil der Landpflanzen dar. Diese Symbiose beruht auf einem Nährstoffaustausch zwischen dem Pilz und der Wirtspflanze (Smith und Smith, 1990). Der pilzliche Symbiosepartner sorgt dabei für eine verbesserte Mineralstoff- (u. a. Phosphor, Stickstoff, Zink und Kupfer) und Wasserversorgung der Pflanze, während die Wirtspflanze von der vergrößerten Oberfläche durch das weitverzweigte Myzel profitiert. Es reicht dabei tief in die Bodenmatrix und sorgt für den Nährstofftransport zu den Wirtspflanzen. Die Pflanze versorgt die Mykorrhizapilze mit Kohlenstoffverbindungen (Marschner, 1994; Clark und Zeto, 2000; Azcón-Aguilar *et al.*, 1997) und liefert während der Symbiose bis zu 25 % ihrer Photoassimilate an den Pilz. Es gibt verschiedene Arten der Mykorrhizasymbiosen. Diese reichen von mutualistischen Interaktionen bis hin zu antagonistischen Mykorrhizen (Smith und Read 1997). Zu den mutualistischen Mykorrhizen zählen die Ekto- und die Endomykorrhiza. Beispiele für die Ausbildung antagonistischer Mykorrhizen sind die Orchideen und monotroipode Mykorrhizen.

Die Ektomykorrhiza kommt besonders häufig in mitteleuropäischen Wäldern vor. Bei dieser bedeckt das Myzel die Wurzeloberfläche des Wirtes, wobei Hyphen auch in die Wurzelrinde, aber nicht in die Zellen eindringen. Vielmehr bilden die Hyphen innerhalb der Extrazellularräume ein Netzwerk (Hartigisches Netz), in dem der Nährstoffaustausch stattfindet (Strack *et al.*, 2001).

Bei der Endomykorrhiza dringt ein Teil der Hyphen in die Zellen der Wurzelrinde der Wirtspflanze ein. Es wird kein Hyphennetzwerk wie bei der Ektomykorrhiza um die Wirtswurzel herum gebildet. Es bilden sich stattdessen innerhalb der Zellen Haustorien aus, die den Nährstoffaustausch ermöglichen. Eine besondere Form der Endomykorrhiza ist die arbuskuläre Mykorrhiza (AM). Typisch für diese Form der Mykorrhiza sind die namensgebenden Arbuskeln. Diese Strukturen vermitteln dabei den Nährstoffaustausch zwischen den Symbiosepartnern (Harrison, 1997; Hause und Fester, 2005; Smith und Read, 2008). Die AM-Symbiose (AMS) ist die am weitesten verbreitete Endosymbiose. Zwei Drittel aller Blütenpflanzen (Read *et al.*, 2000; Schüßler, 2002; Parniske, 2008) formen mit Pilzen aus dem Phylum *Glomeromycota* diese Symbiose.

Die AM-Pilze sind obligat biotroph, das heißt, ohne einen passenden Symbiosepartner können diese nicht überleben (Leake, 2004; Imhof, 2009). Die AMS ist möglicherweise das Resultat einer 450 Millionen Jahre langen Koevolution (Remy *et al.*, 1994; Abb. 1). Es kann angenommen werden, dass das Aufkommen der Landpflanzen und der Übergang vom Wasser zum Land erst durch diese ermöglicht wurde (Brundrett, 2002; Strack *et al.* 2001). Auch scheint die AM selbst der Vorfahr aller anderen Arten der Mykorrhiza zu sein (Wang und Qiu, 2006).



**Abb. 1: Fossile Arbuskel.** Arbuskelhaltige Struktur in der Zelle eines 400 Millionen Jahre alten Fossils von *Aglaophyton major* (Remy *et al.*, 2004).

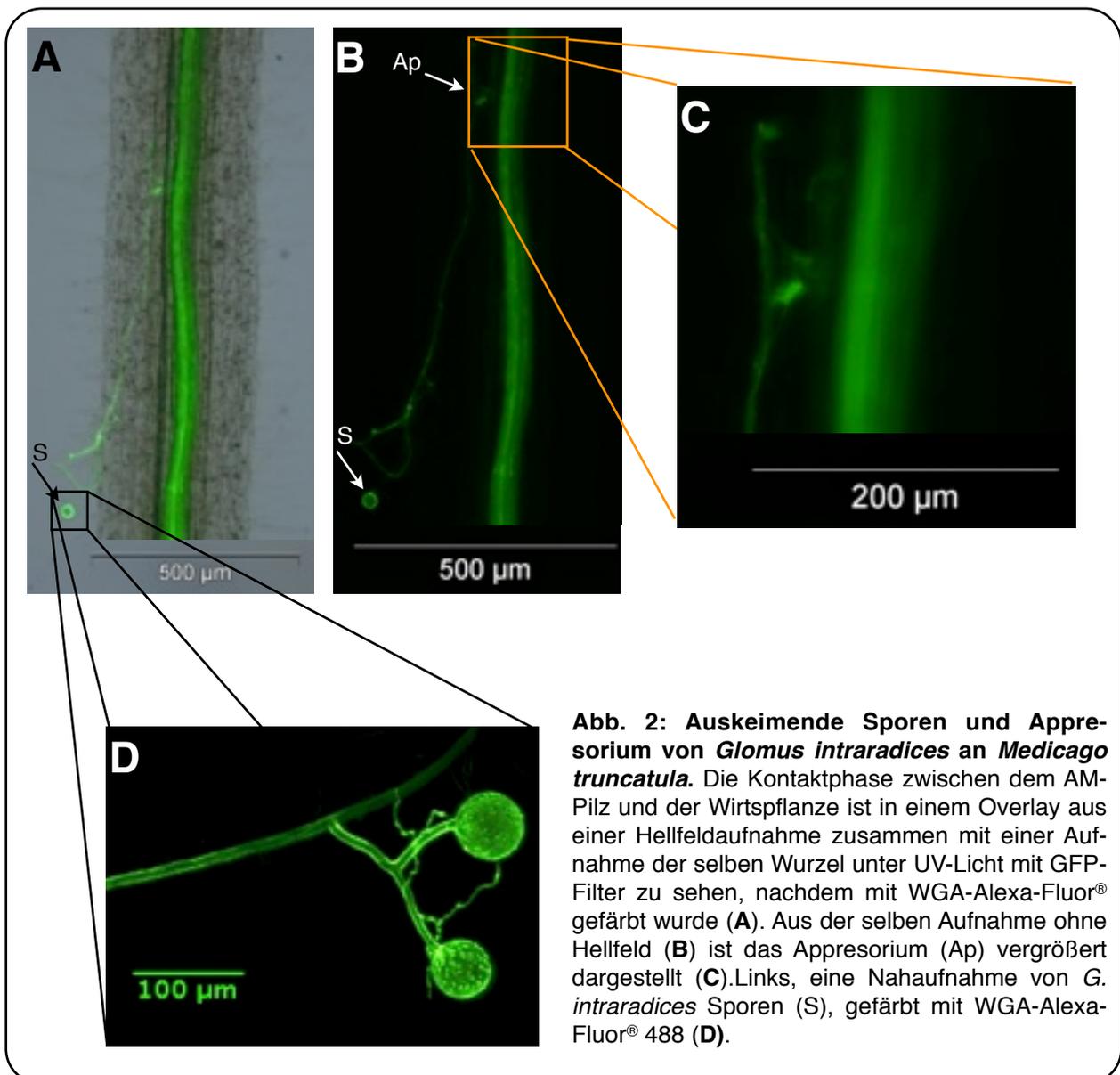
Ein wichtiger ökologischer Aspekt der AMS ist die Stabilisation vieler Ökosysteme (Rillig, 2004). Durch die AMS werden große

Mengen an Phosphat in das Ökosystem eingebracht. Diese Assoziation ist daher essentiell für die weltweite Phosphatversorgung der Pflanzen. Kolonisierte Pflanzen besitzen gegenüber nicht kolonisierten Pflanzen meist eine größere Biomasse, sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber biotischem als auch abiotischem Stress (Azcon-Aguilar und Barea, 1997; Larsen *et al.*, 2007; Pozo *et al.*, 2009; Augé, 2001). Dieser Effekt ist bis zu einem gewissen Maß um so größer, desto geringer die Nährstoffverfügbarkeit im Boden ist. Verschiedene Faktoren können bei dieser Symbiose aber auch dazu führen, dass es zu einer parasitären Verbindung kommt (Johnson *et al.*, 1997; Klironomos, 2003). Bei einer hohen Verfügbarkeit anorganischen Phosphates kann die Ausbildung der AMS von der Wirtspflanze aber auch verhindert, oder falls der Phosphatgehalt im Boden im Nachhinein erhöht wird, sogar beendet werden (Ryan und Graham, 2002; Javot *et al.*, 2007b). Die Verfügbarkeit von anorganischem Phosphat scheint dabei von der Pflanze wahrgenommen zu werden (Rubio *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2006), die daraufhin die Vor- und Nachteile der Symbiose „abwägt“. Ob andere Mineralstoffe wie Stickstoff, Kupfer oder Zink eine ebenso große Rolle für die Aufrechterhaltung der AMS spielen ist noch nicht sicher (Ferrol und Perez-Tienda, 2009).

Kommerzielle Dünger für die moderne Landwirtschaft sind nicht auf Dauer verfügbar, da geologische Formationen mit einem hohen Phosphatgehalt in naher Zukunft aufgebraucht sein werden (Vance *et al.*, 2003). Durch das Verständnis der AMS könnte also nachhaltiges Düngen durch diesen „lebenden Dünger“ erreicht werden.

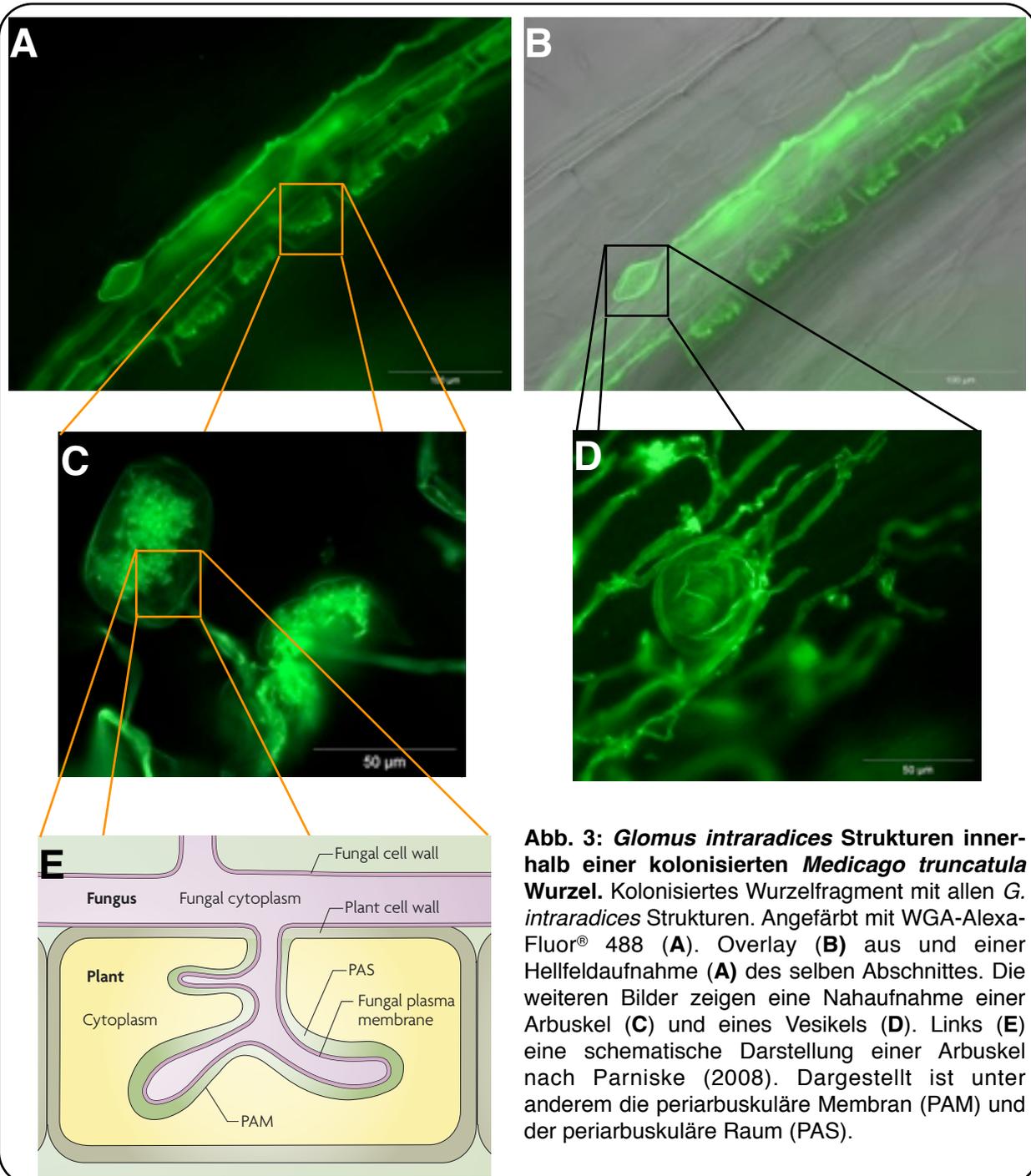
## 1.2. Ausbildung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose (AMS)

Bevor die AM-Pilze zu ihrer obligat biotrophen Lebensweise übergehen, kommt es durch ausreichende Feuchtigkeit und Temperatur zur Keimung der Pilzsporen (Koltai *et al.*, 2010; Abb. 2). Ist innerhalb von ein bis zwei Wochen nach der Keimung keine passende Wirtspflanze verfügbar, wird das Auswachsen der Hyphen eingestellt und die bereits gewachsenen Hyphen wieder in die Spore „zurückgezogen“. Dies kann bis zu zehnmal geschehen (Koske, 1981). Diese Kontaktaufnahme findet mutmaßlich bereits vor dem ersten direkten physischen Kontakt der beiden Organismen statt. Der AM-Pilz reagiert dabei auf von der Pflanze sekretierte Strigolaktone (Parniske, 2005). Durch diese Moleküle kommt es zu einem verstärkten Wachstum und einer Verzweigung der Hyphen (Akiyama *et al.*, 2005; Mosse, 1988; Requena *et al.*, 2007). Die Pflanze be-



reitet sich auf die Symbiose durch das Ausformen des sogenannten Präpenetrationsapparates (PPA) vor (Genre *et al.*, 2005). Dieser wird durch die Reorganisation des Zytoskeletts und des endoplasmatischen Retikulums als dicke cytoplasmatische Säule gebildet. Es wird angenommen, dass es spezifisch pilzliche Signalmoleküle gibt, die von der Wirtspflanze erkannt werden. Diese „Myk-Faktoren“, führen zur Aktivierung von symbiosespezifischen Promotoren in den Wirtszellen. Das führt wiederum zu einer Veränderung der Transkription in den Wurzelzellen (Kosuta *et al.*, 2003; Weidmann *et al.*, 2004; Navazio *et al.*, 2007) und induziert in der Pflanze zu einem geringen Maße auch die Ausbildung von lateralen Wurzeln (Oláh *et al.*, 2005). In einer jüngst veröffentlichten Studie wurden einige Kandidaten für den „Myk-Faktor“ vorgestellt (Maillet *et al.*, 2011). Dabei handelt es sich um Lipo-chitooligosaccharide (LCOs), zu denen auch die „Nod-Faktoren“ zählen. Allerdings sind die AMS-spezifischen LCOs einfacher aufgebaut als die der „Nod-Faktoren“. Nach der Kontaktaufnahme kommt es zu der sogenannten rhythmischen  $Ca^{2+}$ -Oszillation (Kosuta *et al.*, 2008), dem Ausformen der cytoplasmatischen Brücke des PPA und der Reorganisation des gesamten Zytoskeletts. Unter anderem wandert der Zellkern dabei zum PPA (Gus-Mayer *et al.*, 1998; Kwon *et al.*, 2008; Parniske, 2008). Die  $Ca^{2+}$ -Oszillation tritt in und um den Zellkern von Wurzelhaarzellen auf und unterscheidet sich in Frequenz und Amplitude von den durch die „Nod-Faktoren“ induzierten Oszillationen (Kosuta *et al.*, 2008; McAinsh und Pittman, 2009). Die dem zugrunde liegenden Signalkaskaden sind jedoch nicht bekannt.

Nach dem Kontakt des Pilzes mit der Wurzelepidermis, formen die Hyphen auf der Wurzelepidermis Appressorien aus (Abb. 2). Sobald die Pilzhyphen die epidermalen Zellschichten überwunden haben, beginnen sich die Hyphen innerhalb der Wurzelrindenzellen inter- oder intrazellulär auszubreiten. Dabei folgen sie stets dem PPA. In den Kortezellen der Wurzel werden die Arbuskeln als Hauptstruktur des Nährstoffaustausches vom Pilz zur Pflanze und Vesikel als Speicherorte für Lipide ausgebildet (Abb. 3). In arbuskelhaltigen Zellen positioniert sich der Nukleus zentral innerhalb der Zelle und es kommt zu einer Chromatinkondensation (Hause und Fester, 2005). Ebenso nimmt die Anzahl der Zellorganellen zu, wobei sich deren Form drastisch verändert. Die Fragmentierung der zentralen Vakuole wird möglicherweise durch das AM-spezifische Aquaporin MtAQP1 vermittelt (Krajinski *et al.*, 2000). Plastiden, Mitochondrien und das ER organisieren sich in einem Netzwerk um die Arbuskeln herum (Bonfante und Perotto, 1995; Fester *et al.*, 2001). Die Entwicklung der Arbuskeln ist das Resultat einer koordinierten Antwort der Wirtspflanze und des Pilzes. Die Hyphen des AM-Pilzes verzweigen sich verstärkt und bilden dadurch eine baum-



**Abb. 3: *Glomus intraradices* Strukturen innerhalb einer kolonisierten *Medicago truncatula* Wurzel.** Kolonisiertes Wurzelfragment mit allen *G. intraradices* Strukturen. Angefärbt mit WGA-Alexa-Fluor® 488 (A). Overlay (B) aus und einer Hellfeldaufnahme (A) des selben Abschnittes. Die weiteren Bilder zeigen eine Nahaufnahme einer Arbuskel (C) und eines Vesikels (D). Links (E) eine schematische Darstellung einer Arbuskel nach Parniske (2008). Dargestellt ist unter anderem die periarbuskuläre Membran (PAM) und der periarbuskuläre Raum (PAS).

artige Struktur innerhalb der Wirtszelle aus. Der Pilz und die Pflanzenzelle sind auf der Pflanzenseite durch die periarbuskuläre Membran (PAM) von der Pilzmembran getrennt. Zwischen beiden Membranen liegt der periarbuskuläre Raum. Dieser Zwischenraum dient zum Austausch von Nährstoffen und Signalen (Harrison *et al.*, 2005). Die PAM zeigt einen deutlichen Unterschied in der Morphologie und in der Physiologie im Vergleich zur Plasmamembran der Pflanzenzelle (Hause und Fester, 2005; Pumplin und Harrison, 2009), besonders im Hinblick auf das Vorkommen von Transportproteinen (Benedito *et al.*, 2008; Javot *et al.*, 2007b). Die Aktivität der Transporter in der PAM wird durch einen Protonengradienten zwischen PAS und Pflanzenzytoplasma angetrieben

(Mitchell, 1972; Smith und Read, 2008). Dieser Gradient kommt durch pflanzliche und pilzliche H<sup>+</sup>-ATPasen entlang den jeweiligen Membranen des Pflanzen-Pilz-Kontinuums zustande (Hause und Fester, 2005, Requena *et al.*, 2003). Gene dieser Protonenpumpen konnten in *Hordeum vulgare* (Murphy *et al.*, 1997), *Nicotiana tabacum* (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000) und in *M. truncatula* (Krajinski *et al.*, 2002) nachgewiesen werden. Die Lebensdauer der Arbuskeln ist sehr begrenzt und beträgt möglicherweise nur sechs Tage (Alexander *et al.*, 1989). Bisher wurde erst der Phosphattransporter PT4 erfolgreich und ausschließlich in der PAM lokalisiert. (Harrison *et al.*, 2002). *M. truncatula pt4*-Mutanten können keine Symbiose mehr ausbilden (Javot *et al.*, 2007a). Neben PT4 wurde noch ein weiterer Phosphattransporter (PT3) identifiziert, der die Lebensspanne der Arbuskeln beeinflusst (Drissner *et al.*, 2007; Javot *et al.*, 2007b). In PT4 defizienten Pflanzen kommt es nicht zur Ausbildung voll entwickelter Arbuskeln. Stattdessen wird die Ausbildung in einem frühen Stadium unterbrochen (Javot *et al.*, 2007a). Die Entwicklung von Arbuskeln ist also von der Phosphatversorgung und möglicherweise auch von der Versorgung der Pflanze mit anderen Nährstoffen durch den Pilz abhängig. Auf diese Weise ist es der Pflanze möglich, zwischen Arbuskeln und damit auch Pilzen, welche die Pflanze effizient mit Nährstoffen versorgen können zu unterscheiden. Ein pflanzliches Molekül, Lysophosphatidylcholin (LPC) ist für die Aktivierung der Transkription der AMS-spezifischen Phosphattransporter und damit auch für die Entwicklung von Arbuskeln verantwortlich (Drissner *et al.*, 2007, Javot *et al.*, 2007b). Damit scheint LPC den lokalen Phosphatgehalt zu messen (Parniske, 2008). Die Kontrolle über die Lebensdauer der Arbuskeln liegt sehr wahrscheinlich bei der Wirtspflanze. Damit würde die Pflanze die Kontrolle über die Stärke der Symbiose behalten (Alexander *et al.*, 1989; Smith und Read, 2008).

Nachdem der Pilz die Pflanze kolonisiert hat und der Nährstoffaustausch etabliert ist, bildet der Pilz ein Myzel außerhalb der Wurzel aus. Dort werden neue Sporen gebildet.

### **1.2.1. Molekulare Charakteristika der frühen Phase der AMS**

Trotz der weiten Verbreitung der AMS bei mehr als zwei Drittel der Blütenpflanzen ist sehr wenig über die Regulierung dieser Symbiose bekannt. Dies betrifft sowohl deren Etablierung, als auch spätere Phasen der Symbiose. Es gibt jedoch Eigenschaften und Infektionswege der AMS, die diese gemeinsam mit der Wurzelknöllchensymbiose („*root nodule symbiosis*“, RNS), einer evolutionär jüngeren, mutualistischen Vergesellschaftung hat. Bisher sind sieben Gene bekannt (gemeinsamer SYM-Signalweg, Tab. 1), die

sowohl in der Ausbildung der AMS, also auch bei der Wurzelknöllchensymbiose eine zentrale Rolle spielen (Kistner *et al.*, 2005). Diese Gene sind wichtig für die Anpassung der Pflanzenzellen an den AM-Pilz bzw. an Rhizobien. In Pflanzen, die in einem dieser Gene mutiert sind, wird die Ausbildung der Symbiose zu einem frühen Zeitpunkt geblockt (Kistner *et al.*, 2005).

*SYMRK* kodiert für eine Rezeptorähnliche Kinase (Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002) und gilt als Startpunkt für den gemeinsamen SYM-Signalweg. Dabei überträgt *SYMRK* extrazelluläre Signale mittels einer Kinaseaktivität. Zur Unterscheidung der verschiedenen Symbiosesignale scheint *SYMRK* verschiedene Domänen zu besitzen (Markmann *et al.*, 2008). *SYMRK* ist zusammen mit *CCaMK* für die Ausbildung des PPA wichtig (Genre *et al.*, 2005). *CCaMK* („*calcium/calmodulin-dependent protein kinase*“) ist eine für die Etablierung der AMS, essentielle  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Proteinkinase. Die aktiven Domänen von *CCaMK* erlauben es, die  $Ca^{2+}$ -Konzentration innerhalb der Zelle zu messen (Levy *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2004). *CCaMK* scheint daher ein essentieller Teil in der Antwort auf die vorangegangene  $Ca^{2+}$ -Oszillation zu sein. Diese *CCaMK*-abhängige Antwort auf die  $Ca^{2+}$ -Oszillation konnte sowohl nach Kontakt/ Penetration durch die AM als auch durch Rhizobien nachgewiesen werden

**Tab. 1: Überblick über die „*sym*“-Mutanten und die zugehörigen Phentypen.** Die Phentypen der Mutanten sind charakterisiert durch verminderte epidermale Penetration durch AM-Pilze (Typ I), schlechteres intrazelluläres Wachstum des AM-Pilzes durch die äußeren Zellschichten (Typ II) oder die Ausformung der Arbuskeln ist gestört (Typ III). Tabelle verändert nach Parniske (2008).

Gen	Mutanten			Phentyp in <i>Lotus japonicus</i> -Mutanten	Ca <sup>2+</sup> -Oszillation	Vorhergesagte Funktion des Proteins
	<i>Lotus japonicus</i>	<i>Medicago truncatula</i>	<i>Pisum sativum</i>			
<b><i>SYMRK</i></b>	<i>symrk</i>	<i>dmi2</i>	<i>sym19</i>	Typ II	✗	„Leucine Rich Repeat“ Rezeptor-Kinase
<b><i>CASTOR</i></b>	<i>castor</i>	unbekannt	unbekannt	Typ II + III	✗	Kationen-Kanal
<b><i>POLLUX</i></b>	<i>pollux</i>	<i>dmi1</i>	<i>sym8</i>	Typ II	✗	Kationen-Kanal
<b><i>NUP85</i></b>	<i>nup85</i>	unbekannt	unbekannt	Typ II	✗	mögliche Kernporen-Komponente
<b><i>NUP133</i></b>	<i>nup133</i>	unbekannt	unbekannt	Typ II	✗	mögliche Kernporen-Komponente
<b><i>CCaMK</i></b>	<i>ccamk</i>	<i>dmi3</i>	<i>sym9</i>	Typ I + II + III	✓	Ca <sup>2+</sup> und Calmodulin abhängige Protein-Kinase
<b><i>CYCLOPS</i></b>	<i>cyclops</i>	<i>ipd3</i>	unbekannt	Typ II + III	✓	unbekanntes Protein mit nukleärem Lokalisierungssignal und einer Carboxy-terminalen „ <i>Coiled-Coil</i> “ Domäne

(Kosuta *et al.*, 2008). Die unterschiedlichen Mechanismen der verschiedenen Symbiosen sind noch unbekannt (Gleason *et al.*, 2006; Parniske, 2008; Tirichine *et al.*, 2006). Die *ccamk*-Mutanten sind nicht in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation betroffen, können jedoch keine funktionsfähige RNS und AMS (Parniske, 2008).

Zwei weitere Proteine, CASTOR und POLLUX, zeigen große Sequenz- und Domänenähnlichkeiten untereinander (Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005). Untersuchungen zeigten, dass diese Proteine  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in der Membran ausbilden. Durch Mutationen in diesen beiden Genen, ist die Nod-Faktor induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation gestört (Ané *et al.*, 2004; Peiter *et al.*, 2007; Oldroyd *et al.*, 2008; Imaizumi-Anraku *et al.*, 2005). Diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle scheinen aber nur eine geringe Durchgängigkeit für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu haben und sind daher wahrscheinlich nur für den Ladungsausgleich nach der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation verantwortlich (Parniske, 2008).

Mutationen in *CYCLOPS* führen zur generellen Beeinträchtigung der Infektion durch Rhizobien und auch durch AM-Pilze. Die genaue Funktion von *CYCLOPS* ist noch unbekannt. Die Proteinsequenz beinhaltet aber ein nukleäres Lokalisierungssignal und interagiert mit CCaMK durch welches *CYCLOPS* phosphoryliert wird (Parniske, 2008).

Die Nukleoporene NUP85 und NUP133 sind nötig für den temperaturabhängigen Start der Symbiose (Kanamori *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2007) und in *Lotus japonicus* der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation vorgeschaltet (Parniske, 2008). Dabei sind sie möglicherweise in den Transport von CASTOR und POLLUX involviert (Parniske, 2008).

Analysen von *symrk*, *castor*, *pollux*, *nup85* und *nup133* Mutanten in *L. japonicus* zeigten eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation. Diese sind der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillation offensichtlich vorgeschaltet, während CCaMK und *CYCLOPS* der Oszillation nachgeschaltet sind (Mitra *et al.*, 2006; Harris *et al.*, 2003). Die AM-spezifischen LCOs („Myk-Faktor“) aktivieren dabei den *Sym*-Signalweg AM-spezifisch. Zusätzlich werden weitere frühe Gene, wie zum Beispiel *ENOD11* („*early nodulin 11*“, Oláh *et al.*, 2005; Kosuta *et al.*, 2003; Maillet *et al.*, 2011), induziert.

Des Weiteren scheint es dazu noch einen weiteren, *SYM*-unabhängigen, Signalweg zu geben (Kosuta *et al.*, 2003; Siciliano *et al.*, 2007).

### 1.2.2. Weitere AMS-regulierte Gene

In älteren Studien konnten weitere Gene der Wirtspflanzen identifiziert werden, die während der AMS-reguliert werden (Frenzel *et al.*, 2005; Hohnjec *et al.*, 2005; Krajinski *et al.*, 2000, 2002; Salzer *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2003; Küster *et al.*, 2004; Hohnjec *et al.*, 2006; Krajinski und Frenzel, 2007; Küster *et al.*, 2007; Wulf *et al.*, 2003; Manthey *et al.*, 2004; Gutjahr *et al.*, 2008). Die meisten der in die AMS involvierten Pflanzengene werden verstärkt exprimiert. Nur wenige Transkripte sind während der AMS reprimiert (Smith und Read, 2008). Darunter solche, die in der Ausbildung von Schutzfunktionen vor Umwelteinflüssen verantwortlich sind (Harrison und Dixon, 1994; Benedito *et al.*, 2008). Als Methoden wurden unter anderem „Mikroarrays“ und auf suppressiver, subtraktiver Hybridisierung (SSH) basierende Bibliotheken verwendet. Wie diese Veränderungen in der Protein- und Gentranskription aber vermittelt werden, ist bis jetzt noch zu einem großen Teil unbekannt.

Ein wichtiger Bereich der Genregulierung sind Transkriptionsfaktoren (TFs). TFs, die ungefähr 7 % der kodierenden Sequenz von Pflanzen ausmachen (Udvardi *et al.*, 2007), werden als die wichtigsten Regulationsproteine in der Transkription angesehen (Riechmann *et al.*, 2000). Bisher ist jedoch sehr wenig über AMS-spezifische Transkriptionsfaktoren bekannt. TFs kontrollieren unter anderem die Differenzierung von Zellen und das Ausbilden neuer Strukturen innerhalb der Zelle. Die Identifizierung von TFs, welche die AMS-regulieren, könnte einen Anhaltspunkt für die Entschlüsselung von Signalwegen während der Etablierung der Symbiose bilden. Über die transkriptionelle Kontrolle der Wurzelknöllchensymbiose auf der Pflanzenseite ist bereits einiges bekannt. Dazu zählt zum Beispiel das knöllcheninduzierende Protein NIN („*nodule inception*“) aus *L. japonicus* (Schauser *et al.*, 1999; Marsh *et al.*, 2007), das in der Entwicklung von Knöllchen eine Rolle spielt (Schauser *et al.*, 1999; Marsh *et al.*, 2007). Die Nod-Faktor-Signalkaskade ist von TFs der GRAS-TF-Familie (Kalo *et al.*, 2005; Smit *et al.*, 2005) und AP2-EREBP-TFs (z. B. *MtERN1*; Middleton *et al.*, 2007) reguliert. Zwei andere AP2-EREBP-TFs binden an den Promotor von *ENOD11* (Andriankaja *et al.*, 2007), einem frühen Nod-Faktor-induzierten Gen, und regulieren damit dessen Transkription. TFs initiieren die RNA-Polymerase, können an DNA binden und Promotoren aktivieren oder reprimieren. Durch die Bindung der RNA-Polymerase an einen TF und einen Promotor wird die Transkription initiiert. TFs können auch andere DNA-bindende Proteine binden, zusätzliche Bindestellen für Regulatoren besitzen und eine Proteinkinase- oder Helikaseaktivität besitzen. Bestimmte DNA-Bereiche haben eine

spezifische Sequenz (sogenannte *cis*-Elemente), die von dem entsprechenden Transkriptionsfaktor erkannt und gebunden wird. Die TFs werden meistens durch Proteinkinasen aktiviert. Die Aktivierung der TFs ist dabei das Ende einer Signalkaskade, an deren Beginn ein Rezeptor steht. TFs können nach zwei Prinzipien die Transkription aktivieren. Eines ist die Erhöhung der Bindungsaffinität der RNA-Polymerase und dadurch die verstärkte Transkription der dem Promotor nachfolgenden Sequenz. Die zweite Möglichkeit ist es, durch die Verbesserung des Zugangs der RNA-Polymerase zu der DNA, die Transkription dieses Abschnittes zu erhöhen. Die Repression läuft nach dem umgekehrten Prinzip.

### **1.2.3. Molekulare Charakteristika der *Glomeromycota***

Nahezu alle bisher bekannten AM-regulierten Gene sind pflanzlichen Ursprungs. Symbiose-induzierte Gene in AM-Pilzen zu identifizieren ist vergleichsweise schwerer. Ein Transformationssystem für den Pilz oder entsprechende „*knock-out*“-Linien sind nicht etabliert (Sanders und Croll, 2010). Eine Möglichkeit trotz dieses Problems symbiose-regulierte Gene zu identifizieren, ist die Durchführung von Komplementationstudien in pathogenen Pilzen wie *Magnaporthe oryzae* und *Coletotrichum linemuthianum*. *STE12*, ein Mitglied der stark konservierten pilzlichen *STE12* TF-Familie, und eine *Era*-ähnliche GTPase konnten auf diese Art und Weise identifiziert werden (Heupel *et al.*, 2010; Tollot *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte ein Phosphattransporter pilzlichen Ursprungs in Arbuskeln lokalisiert werden (Balestrini *et al.*, 2007). Durch NMR („*nuclear magnetic resonance*“)-Untersuchungen konnte herausgefunden werden, dass Kohlenhydrate in Form von Hexose von der Pflanze zum Pilz transportiert werden (Bago *et al.*, 2002). Ein Hexosetransporter konnte in *Geosiphon pyriformis* nachgewiesen werden (Schüssler *et al.*, 2006). Dieser Pilz formt keine AMS, gehört jedoch zu den *Glomeromycota*. Ein weiteres bekanntes Gen kodiert für die Superoxiddismutase Gmar-CuZNSOD. Es wird vermutet, dass Gmar-CuZNSOD eine Rolle in der Deaktivierung der lokalen Wirtsverteidigung in arbuskelhaltigen Zellen spielt (Lanfranco *et al.*, 2005). Außerdem konnten Phosphattransporter in den extraradikalen Hyphen identifiziert werden (Harrison *et al.*, 1995; Maldonado-Mendoza *et al.*, 2001).

### 1.3. Der Modellorganismus *Glomus intraradices*

Ein tieferes Verständnis der Genetik von Pilzen ist nur für die beiden Stämme *Ascomycota* und *Basidiomycota* vorhanden. Das Wissen über diese beiden Stämme kann nur in sehr geringem Umfang auf die *Glomeromycota* angewendet werden, da die Entwicklungslinien seit mehreren hundert Millionen Jahren getrennt sind (Heckman *et al.*, 2001; James *et al.*, 2006). Der 1982 entdeckte AM-Pilz *Glomus intraradices* wird in den meisten Untersuchungen als Modellorganismus verwendet. Er kommt auf natürliche Weise im Boden der gemäßigten und tropischen Regionen vor und hat ein sehr breites Wirtsspektrum. Unter anderem kann die Modellpflanze *Medicago truncatula* kolonisiert werden und er bildet mit dieser eine sehr effiziente AMS aus (Govindarajulu *et al.*, 2005). Es ist jedoch schwierig, Material für molekulare Studien zu erhalten, da der AM-Pilz nicht ohne eine Wirtspflanze wachsen kann (Sanders und Croll, 2010). Mittels Kokultivierung mit Wurzelkulturen ist es jedoch möglich, den Pilz *in vitro* zu kultivieren. Außer *Glomus intraradices* können nicht viele weitere AM-Pilze auf diese Weise kultiviert werden. AM-Pilze vermehren sich durch Klonen und besitzen keine sexuellen Fortpflanzungsstadien. Daher kann deren Transkriptom nicht mit Hilfe klassischer genetischer Untersuchungsmethoden analysiert werden. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde versucht, die DNA-Menge für verschiedene AM-Pilze je Zellkern zu messen (Bianciotto *et al.*, 1992; Hijri und Sanders, 2004; Hijri und Sanders, 2005; Hosny *et al.*, 1998). Auf die Größe des Genoms kann aber nur geschlossen werden, wenn die Polyploidie des Zellkerns bekannt ist. Im Fall von AM-Pilzen ist dies nicht der Fall. Die geschätzte Größe des Genoms reicht daher von 15 Mbp bis zu 1058 Mbp (Hijri und Sanders, 2004; Hosny *et al.*, 1998). AM-Pilze scheinen ein hohes Maß an Polymorphismus zu besitzen (Sanders und Croll, 2010). Dieser Polymorphismus erklärt sich aus der klonalen Vermehrung der AM-Pilze. Die Hyphen sind coenocytisch und die Zellkerne können sich so durch das gesamte Mycel bewegen. Die Sporen bilden sich an einzelnen extraradikalen Hyphen und können tausende von verschiedenen Kernen beinhalten (Jany *et al.*, 2010), wobei deren Auswahl zufällig zu sein scheint (Sanders und Croll, 2010). Somatische Mutationen ermöglichen Unterschiede innerhalb der Zellkerne des Hyphennetzwerkes. So kommen innerhalb des Netzwerkes Zellkerne mit unterschiedlicher genetischer Ausstattung vor (Sanders und Croll, 2010). Eine Vielzahl von Untersuchungen hinsichtlich der Genomgröße und der Polyploidie wurden bisher an *G. intraradices* durchgeführt (Hijri und Sanders, 2004). Anhand dieser

Untersuchungen wird vermutet, dass *G. intraradices* haploid ist und die Chromosomenzahl bei mindestens vier liegt (Sanders und Croll, 2010). *G. intraradices* wurde für eine vollständige Sequenzierung ausgewählt (Lammers *et al.*, 2004). Durch den großen Polymorphismus ist es jedoch schwer, die Daten zu assemblieren (Martin *et al.*, 2008). Pilze haben die Fähigkeit zur Anastomose. Sie können ihr Myzelium untereinander verbinden und gemeinsame Strukturen ausbilden (Glass *et al.*, 2004). Es kann so zum Austausch von Zellkernen und zur Fusion von auskeimenden Sporen kommen (Roca *et al.*, 2005a; Roca *et al.*, 2004; Roca *et al.*, 2005b). Durch AM-Pilze, die auf diese Art und Weise miteinander verbunden sind, können Nährstoffe zwischen Pflanzen ausgetauscht werden (Mikkelsen *et al.*, 2008). Durch die Fusion von Hyphen unterschiedlicher AM-Individuen ist die Möglichkeit zum Austausch von genetisch unterschiedlichen Kernen zwischen diesen gegeben (Sanders und Croll, 2010). Welche Gene in diesem Vorgang involviert sind, ist zur Zeit unbekannt. Es gibt vier Formen der Interaktion zwischen Hyphen verschiedener Individuen, was einen komplexen Mechanismus nahe legt (Sanders und Croll, 2010). Bei der vollständigen Fusion von Hyphen kommt es zu einem Austausch des Zytoplasmas, durch beidseitige zytoplasmatische Strömungen und zu einer Vermischung zweier Individuen (Sanders und Croll, 2010). Dabei kann es entweder zum Austausch verschiedener Zellkerne oder zur Fusion unterschiedlicher Zellkerne und darauf folgende Rekombination des Genoms kommen (Croll *et al.*, 2009). Solche genetischen Veränderungen können die Effekte der Symbiose verändern, sind jedoch je nach Pflanzenart unterschiedlich (Sanders und Croll, 2010).

#### 1.4. Der Modellorganismus *Medicago truncatula*

Typische Modellpflanzen, die in der Mykorrhizaforschung Verwendung finden, sind *Medicago truncatula* (Abb. 4) und *Lotus japonicus*. Deren Vorteil gegenüber der weit verbreiteten Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* ist die Fähigkeit zur Ausformung einer Wurzelknöllchensymbiose und der AMS. Im Vergleich zu anderen Leguminosen (z. B. Erbse), ist das dip-loide ( $2n=16$ ) Genom von *M. truncatula* mit einer Größe von ungefähr 500 Mbp (Sato *et al.*, 2007) relativ klein und nahezu vollständig sequenziert (Barker *et al.*, 1990; The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Town, 2006; Macas *et*

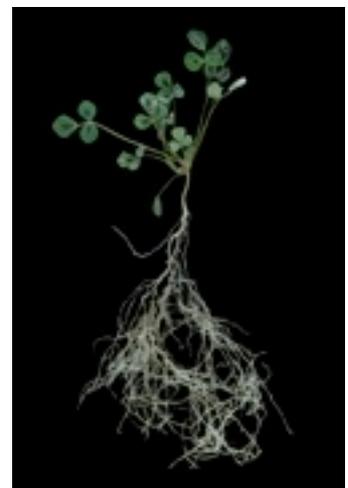


Abb. 4: *Medicago truncatula*-Pflanze

al., 2007; Young und Udvardi, 2009). Durch die Zugehörigkeit von *M. truncatula* und *L. japonicus* zu den Leguminosen, können die Forschungsergebnisse stellvertretend für diese öko-nomisch wichtige Pflanzenfamilie stehen. Zu den wirtschaftlich verwendeten Vertretern zählen unter anderem *Pisum sativum* (Gartenerbse), *Trifolium spec.* (Klee), *Medicago sativa* (Luzerne), *Vicia faba* (Ackerbohne) und *Cicer arietinum* (Kichererbse). Weitere Vorteile von *M. truncatula* sind ihre kurze Generationenfolge, große Samenanzahl und die kompakte Wuchsform. Für die Forschung stehen eine Vielzahl genetischer und genomischer Werkzeuge zur Verfügung, zum Beispiel ca. 9000 TNT1-Insertionslinien (Tadege, et al., 2008), ein 64K-Mikroarray, eine ca. 1000 Transkriptionsfaktoren (TFs) umfassende qRT-PCR-TF-Plattform (Kakar et al., 2008), Metabolomplattformen und etablierte Transformationsprotokolle (<http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>). Die Transformationsprotokolle beruhen auf einem durch Agrobakterium vermittelten Verfahren. Dabei wird sowohl *Agrobacterium tumefaciens* für ganze Pflanzentransformationen, als auch *Agrobacterium rhizogenes* für Wurzeltransformationen eingesetzt (Chabaud et al., 2006; Chabaud et al., 2007).

*M. truncatula*, wie auch *L. japonicus* können eine AMS mit vielen verschiedenen Arten von AM-Pilzen formen. Dazu zählen unter anderem Arten aus den Familien *Glomus*, *Gigaspora*, *Scutellospora* und *Acaulospora* (Smith et al., 2000; Kosuta et al., 2003; Massoumou et al., 2007; Feddermann et al., 2008). *M. truncatula* formt eine sehr effiziente AMS aus und es kommt durch diese Symbiose u. a. zu einer signifikanten Erhöhung der Biomasse (Gianinazzi-Pearson et al., 2006). Eine Wurzelknöllchensymbiose können diese Pflanzen nur mit jeweils einer Rhizobienart eingehen. Im Falle von *M. truncatula* ist dies *Sinorhizobium meliloti* und im Falle von *L. japonicus* erfolgt die Infektion mit *Mesorhizobium loti*. In dieser Arbeit wurde nur *M. truncatula* verwendet, deren Ursprungsort der Mittelmeerraum ist. Sie besitzt eine große Trocken- und Salztoleranz, kann auf einer großen Bandbreite von Böden wachsen und eignet sich hervorragend zur Kultivierung in Gewächshäusern. Bisher werden zwei Ökotypen (Jemalong und R108) in der Forschung eingesetzt. Die Transformationsprotokolle sind zumeist für Jemalong etabliert. Das Sequenzierungsprojekt wird durch das Medicago-Genom-Sequenzierungskonsortium ebenso am Jemalong-Ökotyp durchgeführt. Der Ökotyp R108 wurde für die Herstellung der TNT1-Insertionslinien verwendet (Tadege et al., 2008). In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit dem Ökotyp Jemalong-Linie A17 gearbeitet.

## 1.5. Ziel dieser Arbeit

Bisher ist sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der AMS bekannt. Die Entwicklungsphasen der Pflanze oder die Ausbildung der Wurzelknöllchensymbiose in *M. truncatula* ist im Vergleich dazu weit besser untersucht (Libault *et al.*, 2009).

Durch die AMS kommt es zu massiven Veränderungen des Transkriptoms in kolonisierten Pflanzen (Kapitel 1.2). Diese Veränderungen werden durch TFs reguliert, und die Entschlüsselung dieser Regulationsmechanismen ist essentiell um die transkriptionelle Regulation der Symbiose durch die Pflanze zu verstehen. Kürzlich erfolgte die Etablierung einer „quantitativen-Real-Time“ (qRT)-PCR-TF-Plattform (Kakar *et al.*, 2008). Diese kann als Werkzeug verwendet werden, um die Veränderung der Transkriptmenge von TFs in einem weit sensibleren Maßstab zu detektieren, als es zuvor mit den vorhandenen „Microarrays“ möglich war. Diese qRT-PCR-TF-Plattform wird in dieser Arbeit genutzt um TFs zu identifizieren, die in der Ausbildung der AMS eine Rolle spielen. Es wird sich hierbei auf solche TFs konzentriert, die in der späteren Phase (nach drei Wochen) der Symbiose aktiv sind.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den zeitlichen Ablauf der Veränderung der Transkriptmengen von bekannten und unbestätigten AMS-regulierten Genen (z. B. Transporter und Rezeptoren) zu untersuchen. So soll festgestellt werden, ob zwischen den gemessenen Genen Koregulationen bestehen, und ab welchem Zeitpunkt der Symbiose diese Gene transkribiert werden oder detektierbar sind. Zusätzlich wird das Transkriptom von, mit *Aphamoyces euteiches* infizierten, *M. truncatula* Wurzeln mittels der qRT-PCR-TF-Plattform gemessen. Die gewonnenen Daten aus dieser Pathogeninfektion sollen mit denen der AMS verglichen werden.

Die so gefundenen Kandidatengene sollen daraufhin funktionell mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi), durch Lokalisation der Promotoraktivität und durch ein ethanol-induzierbares Expressionssystem untersucht werden. Durch die dabei erlangten Erkenntnisse soll ein tieferer Einblick in die Regulation der AMS durch die Pflanze erlangt werden.

## 2. Material

### 2.1. Chemikalien

#### 2.1.1. Enzyme und Reaktionskits

**Tab. 2: Verwendete Enzyme und Reaktionskits**

Auflistung aller Enzyme und Reaktionskits sowie deren Hersteller die im Rahmen dieser Arbeit genutzt wurden.

Enzym	Hersteller
Advantage® 2 DNA Polymerase	Clontech (Saint Germainen Laye, Frankreich)
Antarctic Phosphatase	NEB (Frankfurt a.M., Deutschland)
FastDigest® Restriction Enzyme (EcoR1, EcoRV, Pst1, HindIII, Not1)	NEB (Frankfurt a.M., Deutschland)
Gateway® LR Clonase® II Enzyme Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
GoTaq® Flexi DNA Polymerase Kit	Promega (Mannheim, Deutschland)
InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit	Invitek (Berlin, Deutschland)
pENTR™ /DTOPO® Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Power SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Restriction Enzyme Asc1	Roche (Mannheim, Deutschland)
RNAse A	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
RNaseOut	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
SMART™ RACE cDNA Amplification	Clontech (Saint Germainen Laye, Frankreich)
SuperScript™ III Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
T4 DNA Ligase	Promega (Mannheim, Deutschland)
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Turbo DNase	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Wizard® SV Gel und PCR Cleanup System	Promega (Mannheim, Deutschland)

## 2.1.2. Selektionsreagenzien

Tab. 3: Antibiotika. Alle Antibiotika stammen von Duchefa Biochemie B.V. (Haarlem, Niederlande).

Antibiotika	Stammkonzentration mg/ml	Endkonzentration $\mu\text{g/ml}$	Zielorganismus
Ampicillin	50	50	<i>E.coli</i>
Kanamycin	50	25	<i>M. truncatula (in vitro)</i>
Kanamycin	50	50	<i>E. coli</i>
Spectinomycin	50	50	<i>E.coli</i> <i>A. rhizogenes</i>
Streptomycin	150	600	<i>A. rhizogenes</i>

## 2.1.3. DNA-Größenstandards

Tab. 4: Größenstandards für die Gelelektrophorese

Standart	Hersteller
GeneRuler 100bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)
GeneRuler 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland)

## 2.1.4. Weitere Chemikalien

Tab. 5: Weitere Chemikalien und deren Hersteller

Name	Hersteller
Bacto™ Agar	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Bacto™ Beef Extract, getrocknet	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Bacto™ Peptone	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Bacto™ Tryptone	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Biozym LE Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf, Deutschland)

Name	Hersteller
Corn Meal Agar	Fluka (Buchs, Schweiz)
DEPC	SigmaAldrich (Steinheim, Deutschland)
Ethidiumbromid	SigmaAldrich (Steinheim, Deutschland)
Guanidiniumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
MES	Fluka (Buchs, Schweiz)
Phytigel	SigmaAldrich (Steinheim, Deutschland)
Roti® Phenol/ C/I	Carl Roth GmbH & CO. KG (Karlsruhe, Deutschland)
WGA-Alexa-Fluor® 488	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
WGA-Alexa-Fluor® 594	
Yeast extract	Duchefa (Haarlem, Niederlande)

### 2.1.5. Puffer und Stammlösungen

*Stammlösungen für die Plasmid-Minipräparation*

**Tab. 6: Stammlösungen für die Plasmid-Minipräparation aus *E. coli*.**

Lösung	Molarität / Menge	Chemikalie
Lösung 1	50 mM	Glukose
	25 mM	TrisHCl (pH 8.0)
	10 mM	EDTA
Lösung 2	200 mM	NaOH
	1% (w/v)	SDS
Lösung 3	60 ml of 5 M	Kaliumacetat
	11,5 ml	Eisessig
	28,5 ml	Wasser

## Lösungen zum Anfärben von Pilzstrukturen

**Tab. 7: Färbelösungen.** Stammlösung zum Anfärben pilzlicher Strukturen mit WGA-Alexa-Fluor® 488 und 594 in *M. truncatula*

Lösung	Menge	Chemikalie
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,4)	8 g/l	NaCl
	0,3 g/l	KCl
	1,44 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,24 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
KOH	10 % w/v	KOH
WGA-Alexa-Fluor®-Stammlösung	1 mg/ml	WGA-Alexa-Fluor® 488 oder WGA-Alexa-Fluor® 594
WGA-Alexa-Fluor®-Färbelösung	100 µl Stammlösung in 20 µl PBS	WGA-Alexa-Fluor® Stammlösung

## Sonstige Lösungen

**Tab. 8: Citratpuffer.** Zusammensetzung des Citratpuffers und Konzentrationen

Chemikalie	Konzentration	Menge
Citronensäure	0,1 mM	9 ml
Natriumcitrat	0,1 mM	41 ml
H <sub>2</sub> O		450 ml
-----		
Citratpuffer	10 mM	500 ml
pH-Wert einstellen	mit NaOH auf pH 6.0	

## TE-Puffer

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0

## 2.2. Synthetische Oligonukleotide

Die aufgelisteten Oligonukleotide wurden von Eurogentec S. A. (Seraing, Belgien) oder von MWG Biotech GmbH (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

### 2.2.1. Oligonukleotide für die quantitative „Real-Time“-PCR (qRT-PCR)

Für das „TF-Profilings“ verwendete Oligonukleotide sind im Anhang aufgeführt.

Tab. 9: Oligonukleotide, die für die qRT-PCR-Messungen verwendet wurden.

Bezeichnung	3'-Oligonukleotid	5'-Oligonukleotid
<i>MtCoT</i>	CTCGAAAGACACACATGACAGCA	GAGAGAGTGGAGGTGCAATGAAC
<i>MtLLK</i>	CGATGAGGTTCAAGAAGATGCAT	TCTTGGGAGCCATAGACGAGTGT
<i>MtMDRL</i>	GATTAGCCTCTGAAGCCAACCTTG	GATTGCTTGAGCCAGAAGAGACA
<i>MtMLO2</i>	AACAGAAACATCATCCGTGGAGT	TAGTTTGATGCGCAAACCTGAAC
<i>MtNBS</i>	CGGAACAGAAGTTGTCCGAGTA	ACCAGAATCTTGGCTTGAAAGAA
<i>MtPPK</i>	TGTCCTTCAAAAATGCCACG	GAAATAGCGATTGTCTCCCTT
<i>MtRLP</i>	GTTGGCTCAAACCTTCTCTGGAAA	TGATAGTTCCACATGATCGATGC
<i>MtSPK</i>	CAATTCTAACAAGCCCGTAGTCTAAA	TCCAGGAAGAGTAGAATACCTTGATTT
<i>MtSuT</i>	ACTGTTGTGTTCCATGAGAGTTTCG	TTGTTGAAGTGGGAGGTTTTCGAT
<i>MtZiT</i>	TTTTCTTGGAGCTGGGTTA	ATTGGAAGAAAGGCTCATGC
<i>TC63455</i>	TTGTCGCCCTCCTCATAGTTG	TTGCGTCACCTGATGGTGT
<i>TC71536</i>	GCCTGCGATGACTTGTCTTTTA	TCCACCGCAATCTAATGGAATT
<i>TC71585</i>	GGAAGGAATTCTTCGAATGAGGAT	CCCCATGTCTTGTGTTAATGAG
<i>TC71978</i>	TCCACGAAGCCTTAGCTATCCTA	GGCTGCAAGAAAAGTAAGCACAA
<i>TC72388</i>	GTTTGTAGGGATTCCGGTACGAT	CTCTTTCGTAGGACCAATACGTCAT
<i>TC72546</i>	TTCTTTTTTTCCGAGTGTCTGAGA	TTCATCCCGCCAGTTCGATATA
<i>Mt_miR399a</i>	CATTTCTTAGTGTGCAATCTGCCA	CAGGAGAATCGCTGGGCAA
<i>Mt_miR399b</i>	TAGGGCATGTCTCTATTGGTAGGT	GCAAGTGAATTTCTGAAGCCTCTA
<i>Mt_miR399c</i>	TTCTGCTGTTGAGGAATGATAGG	CAGGGCAAATCTCCTTTGGC
<i>Mt_miR399d</i>	TAAGCAAATCAGTCATAGGGCATG	TAGGGCAGCTCTCCTTTGGC
<i>Mt_miR399e</i>	CAGGGTGAGTTCTCCATTGGC	GGCAGATTACACACTAAGTGATGA
<i>Mt_miR399F</i>	AGAGCAAATCTCTATTGGCAGAAC	CCTTTGGCAAACCAGAAGCA

Bezeichnung	3'-Oligonukleotid	5'-Oligonukleotid
<i>Mt_miR399G</i>	AGCAAATCTCTATTAGCAGAACG	CCTTTGGCAAACCAGAAGCA
<i>Mt_miR399H</i>	GCAGCATTACAGGGCATGTTC	GCAGGTTACACACTCAAAGAGTA
<i>Mt_miR399I</i>	TGATAGGGGAAATCTCTTTTGGC	GCATGTTCAAGCTCTCTAGCT
<i>Mt_miR399J</i>	AGTTCTCCATTGGCAGGTAGC	TGCACACTAAGAGATGAATTGCA
<i>Mt_miR399K</i>	GGTGCATTACTGGGCAATGACT	GTGAGTTTGTTCATCATCTGAA
<i>Mt_miR399L</i>	GTCATAGGGCATGTCTCTATTGGT	GTGAGTTTGTTCATCATCTGAA
<i>Mt_miR399M</i>	TGGCAGGTGATATAGTGATATGGC	ACTCACAGGGCAGCTCTCCT
<i>Mt_miR399N</i>	ATTTCAATTTGACTTTAAGGCTCTAG	GTAGGGCAGCTCTCCTTTGG
<i>Mt_miR399O</i>	TAGGGCACCTCTCTCCTGGCAA	TTGGCAAGTTATTGGCACTGAGC
<i>Mt4</i>	AATGATTGCTGGGAATGAACCTT	TTCCAAAGAGAAAATCCCATCAA
<i>MtAcpho</i>	GAACGCTTCTGCGCTTATTGT	GGCAATGCAAGTCCACAGAGT
<i>MtBcp2</i>	GCCAATCACTGCGAAAATGGA	GAGGCTGAAGGTGAGGAGGGT
<i>MtGlp</i>	TAAGGCTTGGTGATGGGTGC	GAAATTAATGTAACATTAGAAAAACACA AATG
<i>MtGst1</i>	CGGAAAATGCAAACTCGTCTC	GACGTGATAACACTTAGCGACAA
<i>MtHa1</i>	CTTTGTGCTTTTCGCGACATAACAT	AGACAAAAAATATAAAACAATAGCCAA TG
<i>MtLec10</i>	TTTCAATATTCATAACTTCAAAGCTCATT	CGGTTCTTATCATATGGGCACAA
<i>MtLec11</i>	CACCAAAATTCAAATCCCCA	CCGAGGAATCCACCTTCTGAT
<i>MtLec5</i>	ACACATGATATTCTTTCTTGGTCCTTT	CAATGCTCTCTACAAGTTTGAAACAAA
<i>MtLec6</i>	TTGAAACAGCCTTATAATACTAGCAAC TC	TTGAACTCCCCAATTCCCA
<i>MtLec7</i>	GCACAAGATTCTTTCTTGGACTTTTA	GTAACCACATCACTGGAAGCTTGAC
<i>MtLec8</i>	GTGAACTTGCCGAAACACATGA	AATTTGAAGTGAAAGACCATGAAAGA
<i>MtLec9</i>	ATTAATTGGTCTTTTGAAGCAGCC	ATTCCCAAGAGTTGCTAGTTATTATAAG G
<i>MtPho2</i>	GGAGCCTCCACAGTTCTTCAAG	AAGGACAAGAGCCTGCAGAGAG
<i>MtPhr1</i>	ATCACTCACGCGCTGCGATG	AACGGCAACGAACGGATGCG
<i>MtPpl</i>	TTGATGAATGGAAAGCCGTGG	GCGGAGGCTATGGGAAAATTT
<i>MtPT1</i>	ATTCTTATGTTTCGGCGCTCTTCC	GCGGTGTAACGGGCTGTTTCTG
<i>MtPT5</i>	TCCTACCCAACCAAAGCCAGGTG	GCAACACCAGTTACCGCAGCTTG
<i>MtPta</i>	CAAATACCCAGTTGGAATCAAATTC	TTTTTTAAGAAAGAACAATTCCCAAG
<i>MtSPX</i>	CAFGATAGGTGCTGAGTTTAGCTCT	GAGAAACAGGAAACACGCGAA

Bezeichnung	3'-Oligonukleotid	5'-Oligonukleotid
<i>MtSTP</i>	GAGCCCAAGTCAAGTGTCGC	TTTCATTATTACGGTTTATGCATCATATT
<i>MtSyr</i>	GAGTCCTGGTTGCTACAACCAAG	GGGCAATACACCAAATAATCTGAA
<i>MtMyb</i>	GCCCTCTCTTTCCGAGGAAT	TCGCTGTTTCGATGTTCTTCGT
<i>MtHistone</i>	TGGTTTCTAATTCTGATTCCACTGAT	TTTCCATTTGCATGACAGTGGTAT
<i>MtRemorin</i>	CCCTGTTGTGGAAAAGGATTCA	TGCTGATTAGGCTCCTGACTGA
<i>MtZnF</i>	ACCACAAAACACTGCATCACAA	TTTCAGCAGCAATCACATCG
<i>MtERF2</i>	GTGTTGCAAGTTTCCTTCACC	CCAATTTGATTCCGAACGAG
<i>MtNSPII</i>	CAACACCCCTACTTCCGACGAGGATT	GATTCCGGTGCACGGTAACCTAAGGTG

## 2.2.2. Oligonukleotidsequenzen für „RACE“ („*rapid amplification of cDNA ends*“)-PCR-Untersuchungen

**Tab. 10:** „RACE“-Oligonukleotide. Sequenz der Oligonukleotide, die für die „Amplifizierung von cDNA-Enden (RACE)“-PCR gewählt wurden.

Gen	TC-Nummer (TIGR)	Oligonukleotid-Sequenz	RACE-Orientierung
<i>MtAmT</i>	TC82016	ATAGCGATTGTCTCCCTTGTTTTT	3'
		AGGTTTATATGCAGGAATGGGACTT	5'
<i>MtCoT</i>	TC97522	CTTTGGCTGCCGAGGTTTTT	3'
		TCTTCTTCCCCTAAAAATCTTCTCTT	5'
<i>MtLLK</i>	TC111717	CAATCATCACAAAGAGAAAGCCT	3'
		TGCTCCCAATACTCCCAACA	5'
<i>MtMDRL</i>	TC96634	AAGGGACAAAACAACACCAGACAA	3'
		AGTGCAATTATAGTGGATT	5'
<i>MtPPK</i>	TC714803	AGGGCCCATTTGGATTGACTTA	3'
		CTTTGGCTGCCGAGGTTTTT	5'
<i>MtSuT</i>	TC65476	ATAAACCATGGAAATAACGCTGTAAA	3'
		ACATCCGGAGTTTCAAGTCAGTG	5'
TC63455	TC63455	GGTGAAACTCATTGGTTGGTGCT	3'
		ACAGCCGCTAAAGATCAATG	5'
TC71536	TC71536	CACCATGTCTGGAGCACTTCCTTC	3'
		CCACCTTGGCCGAGTTTGTT	5'

Gen	TC-Nummer (TIGR)	Oligonukleotid-Sequenz	RACE-Orientierung
<i>TC71585</i>	TC71585	CACCACCGTCCTTCTAATTG	3'
		TAGTCATCTGCGCCATTGTC	5'
<i>TC71978</i>	TC71978	GGCTGGAGATGATGGAAGAT	3'
		CATCACCTTCATTTTCGATGTG	5'
<i>TC72388</i>	TC72388	CCCCATGTCTTGTCGTTAAT	3'
		GTACGCGGGGATCAAAGAAA	5'
<i>TC72546</i>	TC72546	CAGAGGGAGCATTTGCATCA	3'
		AAATCAATGATGGGCTTTGC	5'

### 2.2.3. Oligonukleotidsequenzen für die Amplifikation der RNAi-Konstrukte

**Tab. 11: Oligonukleotide, die für die Erzeugung von RNAi-Konstrukten gewählt wurden.** Angegeben sind Genname und zugehörige TC-Nummer („Tentative-Consensus“) bzw. ID auf der TF-Plattform. Des Weiteren ist der Bereich der mRNA des jeweiligen Genes vermerkt, in dem die Sequenzen für das RNAi-Konstrukt liegen. Den Sequenzen der vorwärts Oligonukleotide ist jeweils ein „CACC“-Überhang für die pENTR™-Klonierung vorangestellt.

Genname	ID	UTR	Vorwärts-Oligonukleotid	Rückwärts-Oligonukleotid
<i>MtCoT</i>	TC97522	3'	CACCTTGAGAGAGTGGAGGTGCA	CCGACCACACTGCATATCTC
		5'	CACCCTATGGCTCCAGGACAAAG	GTTATTTGGCCACCCTGAGA
<i>MtDES</i>	886.m00017	3'	CACCGAGACAAGCAGGTGCATAT	TTGAGAAAACAATTGGAGCTACAC
		5'	TCAGG	C
<i>MtNTS</i>	926.m00034	3'	CACCGCGCTTAGCCTTCTC	TGTTGCAGCTGTTGGGATCAA
		5'	CACCGGCAATGTTGATAGAAAACGTCTCCA	ACTTGTTTCTGTGCCATC
<i>MtSuT</i>	TC65476	3'	CACCGTCTCTGTGTCGAGCACTT	GGCTTCCTATGGAAGACGTG
		5'	CA	CACCACACTTTTCTCTGCTTCCCT
			AATTCA	TCAGCCTCTGGTACACCACCTTC

## 2.2.4. Sequenzen der Oligonukleotide für Promotor::CFP-Fusionen

**Tab. 12: Oligonukleotide für die subzelluläre Aktivitätsstudie verschiedener AMS-spezifischer Promotoren.** Angegeben ist der jeweilige Oligonukleotidname und seine ID (TIGR-TC-Nummer, bzw. ID der TF-Profilung-Plattform). Den Vorwärts-Oligonukleotiden ist jeweils ein „CACC“ für die pENTR/DTOPO® Klonierung vorangestellt.

Gen	ID (TF-Plattform; TIGR)	Vorwärts-Oligonukleotid	Rückwärts-Oligonukleotid
<i>MtAmt</i>	TC82016	CACCACACATATTTTGAGACGAAG G	AAGTTTAAGAGAGATTCATGCAC
<i>MtDES</i>	886.m00017	CACCTTCAAAGCATAGAC	ATTGTTTCTTTATTTTTCTCTG
<i>MtMDRL</i>	TC96634	CACCTCAAATCTAACCTGAACACT CA	TTCCCTATAGACTCTCCCTTT
<i>MtNTS</i>	926.m00034	CACCAAATGCAAATGACAACGA	TTTGTTCTAATTCTTCTCTACTTA G
<i>MtOFTN</i>	1539.m00019	CACCGAACCCAGACACTCTAC	GATTTTCCTTCATAAGTAAACTGC
<i>MtPPK</i>	TC714803	CACCTCTTCAATGATTTTCTTGTT G	TTACAACATAGAAACATTTTCTCT T

## 2.2.5. Oligonukleotidsequenzen für das ethanolinduzierbare System

**Tab. 13: Oligonukleotide für die Amplifikation der kodierenden Sequenz (CDS) von AMS-spezifischen Transkriptionsfaktoren und der CDS von mRFP.** Oligonukleotidsequenzen für das ethanolinduzierbare System (pBin ΔalcR). An die Oligonukleotidsequenzen wurden Nukleotide für eine Pst1-beziehungsweise BamH1-Schnittstelle angefügt.

Gen	Vorwärts-Oligonukleotid + Pst1	Rückwärts-Oligonukleotid + BamH1
<i>MtDES</i>	CTGCAGATGAGACAAGCAGGTGCATA	GGATCCTTAAGAAGAATTCATAGTTT
<i>MtNTS</i>	CTGCAGATGGCAATGTTGATAGAAAAC	GGATCCCGAAAGTCATTATTTTATTGTCCAAA
<i>mRFP</i>	CTGCAGATGGCCTCCTCCGAGGACGT	GGATCCTTAGGCGCCGGTGGAGTGCC

## 2.3. Vektoren und Organismen

### 2.3.1. Bakterien

Tab. 14: Bakterienstämme und deren Herkunft

Bezeichnung	Hersteller
<i>A. rhizogenes</i> ARqual	Quandt <i>et al.</i> , 1993
<i>E. coli</i> DH5a	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
<i>E. coli</i> TOP10	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

### 2.3.2. Plasmide

Tab. 15: Vektoren und deren Herkunft

Bezeichnung	Herkunft
pKDSR(I)	Kryvoruchkov (MPIMP, 2009)
pGWB443	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pCR2.1/TOPOTA	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pENTR/DTOPO	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
pUCΔA1cAN	Syngenta (Maintal, Deutschland)
pBinΔa1cR	Syngenta (Maintal, Deutschland)

### 2.3.3. *Medicago truncatula*-Ökotypen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde der *M. truncatula*-Ökotyp Jemalong A17 (INRA, Frankreich; Referenznummer L000738) verwendet.

### 2.3.4. Pilzinokulum

Zur Inokulierung von *M. truncatula*-Pflanzen wurde *Glomus intraradices* (Linie BBE) von Agrauxone (Dijon, Frankreich) verwendet. Dieses wurde mit Hilfe von *Allium*

*schoenoprabum* im Gewächshaus des Max-Planck-Institutes für molekulare Pflanzenphysiologie in Potsdam-Golm vermehrt.

Zur Infizierung von *M. truncatula*-Pflanzen mit *Aphanomyces euteiches* wurde eine Kultur der Universität Bielefeld verwendet (Fischer, IGZ EV).

## 2.4. Kulturmedien und Dünger

### 2.4.1. Kulturmedien für Bakterien

**Tab. 16: Medien für die Bakterienkultivierung.** *E.coli* wurde mit LB-Medium kultiviert. *A. rhizogenes* wurde mit YT-Medium kultiviert.

Medium	Menge	Chemikalie
LB-Medium (pH 7,0; NaOH)	10 g/l	Bacto™ Tryptone
	5 g/l	Yeast extract
	10 g/l	NaCl
YEB-Medium (pH 7,2; NaOH)	5 g/l	Bacto™ Beef Extract
	5 g/l	Bacto™ Peptone
	1 g/l	Yeast extract
	5 g/l	Zucker
	2 ml/l	1 M MgSO <sub>4</sub>
YT-Medium (pH 7,2; NaOH)	8 g/l	Bacto™ Tryptone
	5 g/l	Yeast extract
	5 g/l	NaCl

---

Für die Herstellung von Festmedien wurde den Ansätzen vor dem Autoklavieren 15 g/l Select Agar beigefügt

---

## 2.4.2. Medien für *Aphanomyces euteiches*-Zoosporenproduktion

**Tab. 17: Medien zur Kultivierung und Zoosporenproduktion von *A. euteiches*.** Das Seewasser wurde direkt aus dem Zernsee in Brandenburg entnommen.

Name	Menge	Chemikalie
Pepton-Maltose-Broth (PMB)	3 % w/v	Maltose
	1 % w/v	Pepton
Seewasser		Zernsee (Brandenburg); filtriert und autoklaviert
Corn-Meal-Agar	15 g/l	Corn Meal Agar

## 2.4.3. *In vitro*-Pflanzenmedium (Fahraeus-Medium)

**Tab. 18: Fahraeus-Medium.** Zusammensetzung des modifizierten Fahraeus-Mediums (Barker *et al.*, 2006).

Nährstoffe	Konzentration
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,8 mM
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,5 mM
Na <sub>2</sub> EDTA * 2H <sub>2</sub> O	50 µM
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	50 µM
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l
CuSO <sub>4</sub>	0,1 mg/l
ZnSO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0,1 mg/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,1 mg/l
CaCl <sub>2</sub>	1,0 mM
Bacto™ Agar	15 g/l
pH 6.5; eingestellt mit KOH	

#### 2.4.4. Kulturmedium für *in vitro*-Wurzelkulturen (M-Medium)

**Tab. 19: M-Medium.** Zusammensetzung des M-Mediums für Wurzelkulturen von *M. truncatula*

Lösung	Nährstoff	Menge in Stammlösung	Menge Stammlösung in 1l M-Medium
Makroelemente	KNO <sub>3</sub>	3,2 g/l	25 ml/l
	MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	29,2 g/l	
	KCl	2,6 g/l	
Mikroelemente	MnCl <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	6 g/l	1 ml/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,5 g/l	
	ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	2,65 g/l	
	KI	0,75 g/l	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,0024 g/l	
	CuSO <sub>4</sub> * 5H <sub>2</sub> O	0,13 g/l	
Calcium	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> * 4H <sub>2</sub> O	57,6 g/l	5 ml/l
Phosphat	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,8 g/l	1 ml/l
FeEDTA	NaFeEDTA	1,6 g/l	5 ml/l
pH 5,5			
Sucrose			10 g/l
Phytigel			3 g/l
-----			
vor Zugabe der Vitamine autoklavieren			
Vitamine	Glycin		0,3 g/l
	Myo-Inositol		5 g/l
	Nicotinic acid		50 mg/l
	Pyridoxin HCl		10 mg/l
	Thiamin HCl		10 mg/l

## 2.4.5. Düngerlösung für *in vivo*-Pflanzen (Hoagland's-Lösung)

**Tab. 20: Hoagland's-Lösung.**

0,5 x Hoagland's-Lösung zum Düngen von *in vivo* *M. truncatula* - Pflanzen (Hoagland und Arnon, 1950).

Nährstoff	Endkonzentration
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	2,5 mM
KNO <sub>3</sub>	2,5 mM
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,0 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	20 µM
NaFeEDTA	50 µM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0,2 µM
H <sub>2</sub> BO <sub>3</sub> *H <sub>2</sub> O	10 µM
NiSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,2 µM
ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1,0 µM
MnCl <sub>2</sub> *4H <sub>2</sub> O	2,0 µM
CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0,5 µM
CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0,2 µM

## 2.4.6. Substrate zur *in vivo*-Kultivierung von *M. truncatula*

Quarzsand

Blähton

Vermiculit

Erde-Typ-P (Tantau GmbH)

Previcur® N (Bayer)

Typ-G-Substrat (MPI-MP)

Hakaphos® red solution (Compo)

## 2.5. Geräte und Programme

### 2.5.1. Geräte

Tab. 21: Auflistung von Geräten und den jeweiligen Herstellern.

Bezeichnung	Hersteller
5417R Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
ABI Prism TM 7900 Real-Time-PCR	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
BX51 Epifluoreszenz-Mikroskop	Olympus (Hamburg, Deutschland)
ChemiDoc Gel Documentation System	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
EG 300-3M Waage	Kern & Sohn GmbH (Albstadt, Deutschland)
Feinwaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Gelelektrophoresesystem Mupid® exU	Advance co. Ltd (Tokyo, Japan)
Gene Pulser® II Elektroporationseinheit	BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
GFL 3017 Schütteltisch	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, Deutschland)
Leica TCS SP5	Leica Mikrosysteme (Wetzlar, Deutschland)
Micromat Mikrowelle	AEG (Frankfurt am Main, Deutschland)
Mini Spin Zentrifuge	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
MR 3001 Magnetrührer	Heidolph Elektro (Kelheim, Deutschland)
MS2 Minishaker	IKA Works (WilMington, NC, USA)
NanoDrop™ 8000 Spektrophotometer	Thermo Fisher (Watham, MA, USA)
pHmeter 766 Calimatic®	Knick (Berlin, Deutschland)
PTC 200 Multicycler	MJ Research (Waltham, USA)
Purelab Plus Wasseraufreinigungssystem	ELGA LabWater (Celle, Deutschland)
Real Time PCR Cycler StepOne™ Plus	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Reference® Pipetten Set	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rollodrum Rotator	New Brunswick Scientific (Wesseling Berzdorf, Deutschland)
RZR2020 Laborrührer	Heidolph Elektro GmbH & Co.(Kelheim, Deutschland)
Spectrafuge Minizentrifuge	Labnet International (Woodbridge, NJ, USA)

Bezeichnung	Hersteller
Sterilbank Hera Safe KS18	Thermo Electron (Langenselbold, Deutschland)
ThermoMixer Comfort 5355	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Wasserbad 1003	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, Deutschland)

## 2.5.2. Programme

**Tab. 22: Bioinformatische- und Bildbearbeitungsprogramme**

Bezeichnung	Hersteller
BioMath Calculators	Promega (Mannheim, Deutschland)
Blast, NCBI	National Centre for Biotechnology Information (Bethesda, MD, USA)
CellP	Soft Imaging System, Olympus (Hamburg, Deutschland)
DNA STAR® Lasergene v 8.1.4	DNA STAR (Madison, WI, USA)
ImageJ64 1.43u	Wayne Rasband (National Institutes of Health, USA)
Interpro	Hunter <i>et al.</i> , 2009
MeV-MultiExperiment Viewer	Dana-Farber Cancer Institute (Boston, MA, USA)
Microsoft Excel	Microsoft (Redmond, USA)
Primer3	Rozen, S. <i>et al.</i> 2000
PrimerExpress	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
UniProtKB	The UniProt Consortium
WoLF PSORT	Horten <i>et al.</i> , 2007

## 2.6. Referenzen

**Tab. 23: Untersuchte Gene und deren Referenzen.** Angegeben sind die in dieser Arbeit untersuchten Gene und deren IDs. Es wurden je nach Herkunft der Sequenzinformation entweder die TC-Nummern angegeben, deren ID in der UrMeL-Datenbank oder die ID in der NCBI-Datenbank. Zusätzlich ist die TF-Profilings-Plattform-ID für die näher untersuchten TFs angegeben. Die Referenz der Gene ist in der letzten Spalte angegeben. Die Abkürzungen stehen für: F = Frenzel *et al.*, 2005; Kak = Kakar *et al.*, 2008; Na = Nakagawa *et al.*, 2007; H= Harrison *et al.*, 2002; Hu= Harrison *et al.*, 2000, unveröffentlicht; Ba= Branscheid *et al.*, 2010; Bu= Burleigh und Harrison, 1999; Ho= Hohnjec *et al.*, 2005; W= Wulf *et al.*, 2003; D= Doll *et al.*, 2003; Li= Liu *et al.* 2008

Gen	TC-Nummer (TIGR)	TF-Plattform-ID	URMEL DB-ID	NCBI Genbank-ID	Referenz
MtAmT	TC82016				F // diese Arbeit
MtCoT	TC97522				F // diese Arbeit
MtLLK	TC111717				F // diese Arbeit
MtMDRL	TC96634		AC202319_10		F // diese Arbeit
MtPPK	TC714803				F // diese Arbeit
MtSuT	TC65476				F // diese Arbeit
TC63455	TC63455				F // diese Arbeit
TC71536	TC71536				F // diese Arbeit
TC71585	TC71585				F // diese Arbeit
TC71978	TC71978		CT033767_23		F // diese Arbeit
TC72388	TC72388				F // diese Arbeit
TC72546	TC72546				F // diese Arbeit
MtOTDN		1399.m00016	AC152406_36		Kak
MtFTO		1111.m00004	AC137823.45		Kak
MtDOTO		1131.m00004	AC146758.11		Kak
MtOFTN		1539.m00019	AC155888_20		Kak
MtSF		65.m00254	AC144431_26		Kak
MtEON		819.m00002	CT573020_4 AC127170_2		Kak
MtDES		886.m00017	AC136138_17		Kak
MtNTS		926.m00034	AC137994_34		Kak
mRFP				AB294466.1	Na
MtPT4				AY116211	H
MtEf1 $\alpha$				EST317575	Hu
MtGAPDH				CT573421.4_3	Kak
MtPdf2	TC107161				kak
MtUbi	TC102473				Kak
Mt_miR399a					Ba
Mt_miR399b					Ba
Mt_miR399c					Ba

Gen	TC-Nummer (TIGR)	TF-Plattform-ID	URMEL DB-ID	NCBI Genbank-ID	Referenz
Mt_miR399d					Ba
Mt_miR399e					Ba
Mt_miR399F					Ba
Mt_miR399G					Ba
Mt_miR399H					Ba
Mt_miR399I					Ba
Mt_miR399J					Ba
Mt_miR399K					Ba
Mt_miR399L					Ba
Mt_miR399M					Ba
Mt_miR399N					Ba
Mt_miR399O					Ba
Mt4				AF055921.1	Bu
MtAcpho				AC197464.5	Ho
MtBcp2				AC126009.22_2	W
MtGlp				AY184807.1	D
MtGst1				AY134608	W
MtHa1				AJ132892.1	K
MtLec10				DQ314212.1	F
MtLec11				DQ314213.1	F
MtLec5				DQ314207.1	F
MtLec6				DQ314208.1	F
MtLec7				DQ314209.1	F
MtLec8				DQ314210.1	F
MtLec9				DQ314211.1	F
MtPho2				AC144658.33	Ba
MtPhr1				AC147517.24	Ba
MtPpl				AC147963_27	UrMel-DB
MtPT1				AF000354.1	Liu
MtPT5				EF016359.1	Liu
MtPta				AC167330.2	K
MtSPX				AC145331.19	Ho
MtSTP					K
MtSyr				TC56482	K
MtTi1				AC135416_7	K
MtUnknown				AC144483_20	Ho

## **2.7. Weitere Chemikalien, Verbrauchsstoffe und Glaswaren**

### **2.7.1. Anbieter von weiteren Chemikalien, Verbrauchsstoffen und Glaswaren**

Brand GmbH (Gießen, Deutschland), Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Duchefa BiocheMie B.V. (Haarlem, Niederlande), Eastman Kodak Co. (Rochester, NY, USA), Eppendorf GmbH (Hamburg, Deutschland), Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland), Fluka (Buchs, Schweiz), Greiner BioOne GmbH (Frickenhausen, Deutschland), Hirschmann Laborgeräte GmbH (Eberstadt, Deutschland), Kisker GbR (Steinfurt, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland), Roche (Mannheim, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), SigmaAldrich (Steinheim, Deutschland), Schott AG (Mainz, Deutschland), TPP AG, (Trasadingen, Schweiz) Unigloves GmbH (Troisdorf, Deutschland), VWR International (Darmstadt, Deutschland).

## 3. Methoden

### 3.1. Wachstums- und Kultivierungsbedingungen

#### 3.1.1. Kultivierungsbedingungen der Mikroorganismen

##### *Flüssigkulturen von Escherichia coli*

*E. coli*-Klone wurden in fünf Milliliter LB-Medium (mit Selektionsreagenz) angezogen. Die Kulturen wurden in einem vertikalen Drehschüttler bei 37 °C für 13-18 Std. bei 250 U/min. inkubiert.

##### *Flüssigkulturen von Agrobacterium rhizogenes*

*A. rhizogenes*-Bakterien wurden in 5 ml YT-Flüssigmedium in einem vertikalen Drehschüttler angezogen (28 °C, 250 U/min, 13-18 Std.).

##### *Plattenkulturen von E. coli*

*E. coli*-Flüssigkulturen wurden zum Vereinzeln der Klone auf LB-Agarplatten ausgestrichen und überkopf bei 37 °C in Dunkelheit inkubiert.

##### *Plattenkulturen von A. rhizogenes*

*A. rhizogenes*-Flüssigkulturen wurden zum vereinzeln der Klone auf YT-Agarplatten ausgestrichen und bei 28 °C in Dunkelheit für 48 Std. inkubiert

#### 3.1.2. Kultivierung anderer Organismen

##### *Kultivierung von A. euteiches und Produktion von Zoosporen*

*A. euteiches* wurde auf Maismehl (CM)-Agar bei Raumtemperatur im Dunkeln kultiviert. Die Kulturen wurden in ein cm<sup>2</sup> große Stücke zerteilt und jeweils drei in einen kleinen Erlenmeyerkolben mit PMB (Pepton-Maltose-Broth) gegeben. Die Agarstücke sind dabei von dem PMB bedeckt gewesen. Die Kulturen wurden sieben Tage im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Kulturen viermal alle zwei Stunden mit Seewasser gewaschen. Anschließend wurden sie über Nacht in Seewasser inkubiert. Die Anzahl der Zoosporen in der Seewasserlösung wurde in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer bestimmt.

Kultivierung von *Glomus intraradices*

Kommerziell erworbenes *G. intraradices*-Inokulum (Agrauxone) wurde mit Hilfe von *Allium schoenoprasum*-Kulturen propagiert. Das Substrat (1:1 Mischung Blähton/ Quarzsand) von diesen, mindestens vier Monate alten *A. schoenoprasum*-Kulturen, wurde zur Inokulation von *M. truncatula*-*in-vivo*-Kulturen verwendet. Die desinfizierten Sporen von *G. intraradices* wurden für die Wurzelkulturen verwendet.

### 3.1.3. Pflanzenkultivierungsbedingungen

*Oberflächensterilisation, Brechen der Dormanz und Keimungsbedingungen von M. truncatula-Samen*

Zum Entfernen der Samen aus den reifen Samenkapseln wurden diese aufgebrochen. Die Samen wurden daraufhin für neun Min. in konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> geschüttelt, um die Samenruhe zu brechen. Anschließend wurden die Samen mehrmals mit Wasser gewaschen. Für die Oberflächensterilisation wurde 10 %iges (v/v) Na-Hypochlorit verwendet. Darin wurden die Samen für drei Min. geschüttelt und danach sorgfältig mit sterilem Wasser gewaschen. Die Samen wurden auf Wasseragarplatten (0,5 % w/v) ausgelegt, für zwei Tage bei 4 °C im Dunkeln gelagert und daraufhin zwei Tage bei 25 °C im Dunkeln zur Keimung gebracht.

*Pflanzenanzucht für die Samenproduktion*

Gekeimte Samen wurden in Plastiktöpfen (7 x 7 x 6,5 cm) mit Erde vom Typ P (Tantau GmbH) transferiert und zum wachen in das Gewächshaus gebracht. Zuvor wurde die Erde mit dem Fungizid Previcur® N (Bayer) behandelt. Die Wachstumsbedingungen im Gewächshaus waren: 16/ 8 Std. hell/ dunkel Periode; 21°C/17°C Tag/ Nacht, 65 % rel. Luftfeuchtigkeit. Nach zwei Wochen wurden die Pflanzen in größere Töpfe (16 x 12 x 12 cm) mit Typ G-Substrat (MPI-MP) umgetopft. Ab der fünften Woche wurden die Pflanzen zweimal die Woche mit 100-150 ml Hakaphos® red solution (2 g/l, Compo) besprüht. Die Samen wurden nach ungefähr 14 Wochen geerntet und anschließend bei 16°C gelagert.

*Inokulierung von M. truncatula-Pflanzen mit G. intraradices*

Das Substrat für *M. truncatula*-Pflanzen, die mit *G. intraradices* inokuliert wurden, setzte sich aus einer 1:1 Mischung Blähton und Quarzsand mit 10 % (v/v) Inokulum aus einer Schnittlauchkultur zusammen. Die Kontrollpflanzen wurden ohne das zusätzliche In-

okulum angezogen. Die Pflanzen für das qRT-PCR-Profilung wuchsen im Gewächshaus (16/ 8 Std. hell/ dunkel Periode; 21 °C/17 °C Tag/ Nacht, 65 % rel. Luftfeuchtigkeit). Zur Anwendung kamen 10 cm große Töpfe. Zweimal wöchentlich wurden die Pflanzen mit Hoagland's-Lösung in halber Konzentration gedüngt. Die Pflanzen für die Promotor::CFP-Untersuchungen wurden in einem Phytotron angezogen (22 °C, 16 Std. Licht, 60 % rel. Luftfeuchte).

#### *Inokulierung von M. truncatula-Pflanzen mit A. euteiches*

Drei Wochen alte *M. truncatula*-Pflanzen, die in einer Mischung aus einem Teil Quarzsand und zwei Teilen Vermiculit unter Gewächshausbedingungen wuchsen, wurden mit *A. euteiches*-Zoosporen infiziert. Dafür wurde eine Zoosporensuspension verwendet, die in Seewasser (Großer Zernsee, Brandenburg) je nach Replik, 40000-55000 Sporen pro Milliliter enthielt. Die Kontrollpflanzen wurden mit gefiltertem und sterilem Seewasser ohne Zoosporen behandelt. Nach drei Tagen wurden die Pflanzen geerntet und stichprobenartig mit einer WGA-Alexa-Fluor® 488 Färbung und darauf folgenden mikroskopischen Untersuchung auf eine Infektion durch *A. euteiches* getestet.

#### *Anlegen von Wurzelkulturen*

Von den mit *A. rhizogenes* transformierten *in vitro*-Pflanzen wurden nach drei Wochen transgene Wurzeln abgeschnitten und auf M-Medium mit  $\beta$ -Bactyl steril kultiviert. Im Falle von mit dem Vektor pKDSR transformierten Wurzeln, wurde unter UV-Licht nach rot leuchtenden Wurzeln selektiert. Im Falle von Wurzeln, transformiert mit dem Vektor pGWB443 oder pBin- $\Delta$ alcR wurde nach Wurzeln selektiert, die ein starkes Wachstum zeigen. Durch das in dem Fahræus-Medium befindliche Kanamycin sind nicht transgene Wurzeln ausselektiert worden, bzw. in ihrem Wachstum stark gehemmt. Nach zwei Wochen Wachstum auf M-Medium wurden die Wurzelkulturen an zwei Stellen mit jeweils ungefähr zehn Sporen inokuliert und darauf folgend acht Wochen bei 24 °C in Dunkelheit kokultiviert.

#### *Ernten von in vivo-Pflanzenmaterial*

*M. truncatula*-Pflanzen wurden vorsichtig aus dem Substrat gelöst, mit Leitungswasser gewaschen und auf Eiswasser gelagert. Der Spross wurde von der Wurzel gelöst und beides einzeln gewogen. Die Proben wurden leicht getrocknet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Für visuelle Untersuchungen wurden

einzelne Pflanzen des Ansatzes nicht eingefroren, sondern in destilliertem Wasser bei 4° C zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

#### *Ernten von in vitro-Pflanzenmaterial*

*M. truncatula*-Wurzelkulturen wurden mit einem sterilen Skalpell in ein schachbrettartiges Muster zerteilt. Eine Hälfte wurde für 30 Sekunden in eine Citrat-Pufferlösung gegeben, damit sich das Phytigel des M-Mediums auflöst. Darauf folgend wurden die Wurzeln kurz mit Wasser gewaschen. Diese Hälfte der Wurzeln wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die zweite Hälfte wurde bei 4 °C für eine visuelle Untersuchung gelagert.

## **3.2. Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1. Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Plasmid-DNA wurde nach Sambrook und Russell (2001) über eine alkalische Lyse extrahiert. Das Pellet wurde danach in 40  $\mu$ l sterilem Wasser aufgenommen und bei 4 °C bzw. bei -20 °C gelagert.

### **3.2.2. Restriktionsverdau**

Für Ansätze mit FastDigest®-Enzymen (Fermentas) wurde ein Reaktionsvolumen von 20  $\mu$ l (nach Handbuch) gewählt. Bei einem Restriktionsverdau mit einem Roche Enzym wurden Ansätze von 25  $\mu$ l (nach Handbuch) verwendet. Zur Durchmusterung nach positiven Klonen mit Hilfe eines Restriktionsverdaues, wurden 3  $\mu$ l (~ 4,5  $\mu$ g DNA) einer Plasmid-DNA-Minipräparation verwendet und der Ansatz für 10-15 Min. bei 37 °C inkubiert. Für Klonierungen wurden 6 $\mu$ l (~9  $\mu$ g DNA) Plasmid-DNA-Minipräparation verwendet und 30-45 Min. bei 37 °C inkubiert. Ansätze mit Roche-Enzymen wurden 60 Min. inkubiert. Bei Ansätzen bei denen das Plasmid in einer Klonierungsreaktion weiter verwendet werden sollte, ist das Enzym bei 65 °C für 15 Min. inaktiviert worden.

### 3.2.3. Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCR)

Alle Ansätze (GoTaq Flexi® DNA-Polymerase (Promega), Advantage® 2 DNA-Polymerase (Clontech) und Phire® Hot Start DNA-Polymerase (Fermantas)) wurden nach den Herstellerprotokollen angesetzt. Die Temperaturen für die Anlagerung der Oligonukleotide an die DNA wurden mit Hilfe von „BioMath Calculator“ berechnet. Die Oligonukleotide für quantitative „*Real-Time*“-PCR (qRT-PCR) Anwendungen wurden mit Primer Express® erstellt. Wenn die zu amplifizierenden Fragmente für Klonierungen verwendet werden sollten, wurden die Oligonukleotide mit „Primer3“ erstellt. Für Kolonie-PCRs wurde entweder 1 µl einer 1:10 verdünnten, über Nacht angesetzten Flüssigkultur (*E. coli* oder *A. rhizogenes*), oder ein Aliquot einer Kolonie von einer Agarplatte eingesetzt.

### 3.2.4. Aufreinigung von DNA aus einem Agarosegel

Aus einem Agarosegel (2 %) wurde ein Fragment mit der gesuchten Größe ausgeschnitten und mit Hilfe des Wizard® SV Gel und PCR Clean-up System (beide Promega) nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA wurde mit 40 µl nukleasefreiem Wasser aus der Säule eluiert.

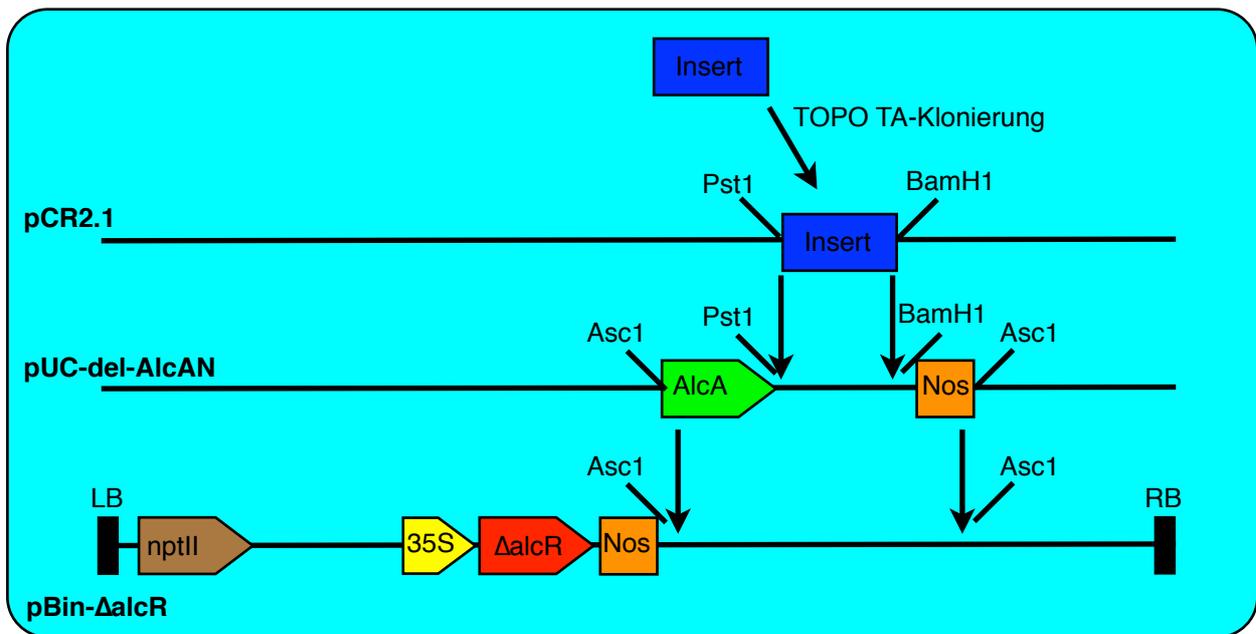
### 3.2.5. Klonierung

#### *Dephosphorylierung geschnittener Vektor-DNA*

5'-Phosphatgruppen wurden von dem geschnittenen Vektor (pUC-del-AlcAN, pBin-ΔalcR) mit der Antarctic Phosphatase (NEB) nach Herstellerprotokoll entfernt.

#### *Ligation*

Die Ligation dephosphorylierter und geschnittener Vektor-DNA mit einem aufgereinigten DNA-Fragment wurde mit der T4-DNA-Ligase (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das DNA-Fragment wurde nach einer PCR mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits in den pCR2.1-Vektor kloniert. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass das Vorwärtsoligonukleotid eine „Pst1“ und das Rückwärtsoligonukleotid eine „BamH1“-Schnittstelle besitzt. So konnte das in den pCR2.1-Vektor klonierte Fragment mit diesen zwei Restriktionsenzymen ausgeschnitten und gerichtet in den pUC-del-AlcAN-Vektor kloniert werden. Aus diesem Vektor wurde das Konstrukt mit AlcA-



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Klonierung für das ethanolinduzierbare System.** Dargestellt sind schematisch alle drei benötigten Vektoren für die Klonierung. Angegeben sind die verwendeten Restriktionsenzyme und die nach der Klonierung auf der T-DNA (LB <-> RB) des pBin-ΔalcR-Vektor vorliegenden Promotoren (35S und AlcA), Terminatoren (Nos), Gene (ΔalcR und nptII als Resistenzgen in der Pflanze).

Promotor, kloniertem Fragment und Nos-Terminator mit Hilfe des Restriktionsenzymes Asc1 ausgeschnitten und in den Vektor pBin-ΔalcR kloniert (Abb. 5). Es wurden jeweils 1  $\mu$ l geschnittene und dephosphorylierte Vektor-DNA und 4  $\mu$ l Insert eingesetzt. Die Ligation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

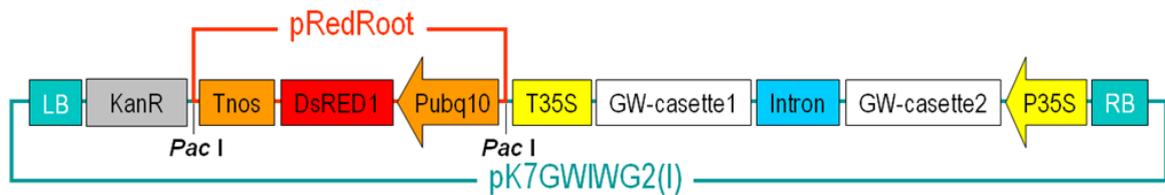
#### *Schnelle Amplifizierung von cDNA-Enden (rapid amplification of cDNA ends (RACE))*

Die mRNA-Sequenz der Gene *MtSut*, *MtCoT*, *MtPPK* und *MtAmt* wurde mit Hilfe des SMART™ RACE cDNA Kits (Clontech) amplifiziert. Dafür wurde 1:10 verdünnte cDNA aus mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln verwendet. Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und das Amplifikat mit Hilfe des TOPO TA Cloning® Kits in den pCR2.1-Vektor kloniert. Das positiv auf das Insert getestete Plasmid wurde zur Sequenzierung zu LGC Genomics (Berlin) geschickt. Die Ergebnisse sind im Anhang dargestellt.

#### *Klonierung der RNAi-Konstrukte*

Als RNAi-Expressionsvektor wurde der pKDSR(I)-Vektor verwendet (Abb. 6). Als Sequenz für die dsRNA wurde wenn möglich, jeweils der 5'-untranslatierte Bereich (UTR) und der 3'-UTR der jeweiligen mRNA-Sequenz gewählt. Die PCR wurde mit der Advantage® 2 DNA-Polymerase und cDNA aus mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln durchgeführt und mit Hilfe der Gateway®-Technologie (Invitrogen) nach Hersteller-

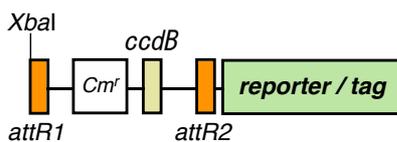
protokoll in den Transkriptionsvektor kloniert. Die Plasmide positiver Klone wurden von LGC Genomics (Berlin) sequenziert.



**Abb. 6: Schematische Darstellung des pKDSR(I)-Vektors.** Das Grundgerüst des Vektors entstammt dem Vektor pK7GWIWG2. Dieses beinhaltet auf der T-DNA (LB -> RB) eine Kanamycinresistenz (*KanR*), einen 35S-Promotor (P35S) mit dazu gehörigem Terminator (*T35S*). Dazwischen liegt die binäre RNAi-Kassette in welche die Insters durch die LR-Reaktion komplementär eingebaut werden. Da-zwischen ein trennendes Intron (aus *Arabidopsis thaliana*). Die konstitutiv über *Arabidopsis thaliana UBQ10* exprimierte DsRED1-Kassette entstammt pRedRoot und besitzt einen Nos-Terminator. DsRed1 stammt ursprünglich aus der Koralle *Anthozoa spp.*. Abbildung verändert entnommen aus Kryvoruchko (2009).

#### Konstruktion der Promotor::*CFP*-Fusionsvektoren

Als Promotorsequenz für die jeweiligen Gene wurden ungefähr 1kb vor dem ATG-Startcodon des entsprechenden Genes gewählt (Sequenzen siehe Anhang). Die PCR zur Amplifikation wurde mit Advantage® 2 DNA-Polymerase und *M. truncatula*-DNA durchgeführt. Mit Hilfe der Gateway® Technologie wurden die PCR-Produkte nach Herstellerprotokoll in den Transkriptionsvektor pGWB443 (Nakagawa *et al.*, 2007; Abb. 7) kloniert. Die Plasmide positiver Klone wurden von LGC Genomics (Berlin) sequenziert.



**Abb. 7: Schematische Darstellung des pGWB443-Vektors.** Das *Cm<sup>r</sup>*- und *ccdB*-Gen werden durch den zu untersuchenden Vektor über eine LR-Reaktion ersetzt. Der Reporter ist im Falle von pGWB443 CFP. Zusätzlich liegt auch der T-DNA eine Kanamycin-Resistenz vor. Abbildung aus Nakagawa *et al.*, 2007.

### 3.2.6. Quantitative „Real-Time-PCR“ (qRT-PCR)

#### *RNA-Isolation*

Das gefrorene Wurzelmaterial wurde auf flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert. Für die RNA-Isolation wurden 100 mg dieses Materials verwendet. Für die qRT-PCR-Profilings-Versuche wurde die RNA mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die RNA-Menge wurde mit einem Photometer bestimmt und in einem denaturierenden Formaldehyd-Gel die Qualität der RNA getestet.

Im Falle der Wurzelkulturen / RNAi-Untersuchungen wurde die RNA mit dem InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit (Invitek) nach Herstellerangaben aus 100 mg gemörsertem Wurzelmaterial isoliert.

#### *Synthese der cDNA*

Für die Synthese der cDNA wurden 5-10 µg der gesamten RNA verwendet, die zuvor mit Turbo™ DNase (Ambion) nach dem Herstellerprotokoll behandelt worden war. Die Synthese wurde nach Herstellerangaben in einem 20 µl Maßstab mit SuperScript™ III reverse transcriptase (Invitrogen) angesetzt.

#### *qRT-PCR-Reaktionen*

Für die qRT-PCR-Reaktionen wurde eine 1:10 mit nukleasefreiem Wasser verdünnte cDNA verwendet. Ein qRT-PCR-Ansatz bestand aus 1 µl verdünnter cDNA, 4 µl eines 0,5 µM Primermixes und 5 µl SYBR® Green mix (Applied Biosystems). Die Einstellungen für das qRT-PCR-Programm waren: 95 °C für 10 Min, 40 Zyklen, 95 °C für 15 sek. und 60 °C für 60 sek.

#### *Analyse der qRT-PCR-Resultate*

Als Schwellenwert für die Veränderung des Fluoreszenzsignals von einem Zyklus zum nächsten wurde ein Wert von 0,2 gewählt. Der Zyklus in dem dieser Wert erreicht worden ist, wurde für die weitere Berechnung des Transkriptionslevels des jeweiligen Genes verwendet (Ct-Wert). Es wurde das Programm SDS 2.3 (Applied Biosystems) verwendet. Zur Normalisierung wurde ein „housekeeping gene“-Index aus vier Genen verwendet (mathematischer Mittelwert aus den Ct-Werten von *MtEf1α*, *MtPdf*, *MtUbiex*, *MtGapDH*, Ct-Werte  $\sim 20 \pm 1$ ). Zur Berechnung des Transkriptionslevels der Gene wurde dieser Wert von den Ct-Werten der zu untersuchenden Gene abgezogen ( $\Delta$ Ct-Wert) und als negativer Exponent für die angenommene Primereffizienz von 100 %

verwendet ( $2^{-\Delta Ct}$ -Wert, relative Transkription). Die Primereffizienz spiegelt den Faktor wieder, mit dem das Amplifikat in einem Zyklus der PCR vervielfältigt wird. Hundert Prozent bedeuten, dass die Menge des zu amplifizierenden DNA-Fragments in einem Zyklus verdoppelt wird. Zur Darstellung der Veränderung des Transkriptionslevels verschiedener Gene von behandelten, mykorrhizierten (myk<sup>+</sup>) oder mit *A. euteiches*-infizierten (aph<sup>+</sup>) und nicht behandelten Kontrollwurzeln (myk<sup>-</sup> oder aph<sup>-</sup>), wurden die  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von behandelten durch die  $2^{-\Delta Ct}$ -Werte von nicht behandelten dividiert. Zur besseren Darstellung dieser Werte wurde von diesen der Zweierlogarithmus verwendet. Daraus wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus allen Replikaten berechnet.

Bei nicht detektierbaren Transkripten (n.d.) wurden ein Ct-Wert von „45“ festgelegt. Wenn in beiden zu vergleichenden Bedingungen (myk<sup>+</sup>/ myk<sup>-</sup>; aph<sup>+</sup>/ aph<sup>-</sup>) die Ct-Werte über „35“ lagen, wurden diese als nicht detektierbar gewertet und die Transkriptionsraten nicht berechnet.

Ein zweiseitiger t-Test für eine ungleiche Varianz wurde durchgeführt um signifikant regulierte Gene im Datensatz zu identifizieren. Dafür wurden die  $\Delta Ct$ -Werte der jeweiligen Bedingungen der Replikate miteinander verglichen und als Schwellenwert  $p < 0,05$  gewählt. Zusätzlich wurde, neben einem p-Wert von unter 0,05, ein weiteres Kriterium für eine signifikante Regulierung der Transkription des jeweiligen Genes verwendet. Falls eine mehr als vierfache Veränderung des Transkriptionslevels des jeweiligen Genes, bezogen auf die Kontrollbedingungen, in 80 % der Replikate gemessen werden konnte, wurde die Bedingung für dieses weitere Kriterium erfüllt. Wurde eines dieser Bedingungen erfüllt, so wurde die Transkription des Gens als signifikant verändert angesehen.

### **3.3. Transformationen**

#### **3.3.1. Transformation von Mikroorganismen**

##### *Transformation von E. coli*

Für Transformationen wurden die *E. coli*-Stämme DH5 $\alpha$  und TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Zu einem auf Eis aufgetauten Aliquot wurde 1  $\mu$ g des Plasmids gegeben. Nach zehn Min. auf Eis wurden die *E. coli*-Bakterien einem Hitzeschock unterzogen (TOP10 Zellen für 30 Sekunden; DH5 $\alpha$ -Zellen für 60 Sekunden). Nach dem

Hitzeschock wurden die Bakterien für zwei Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurde den Zellen LB-Medium beigegeben (TOP10-Zellen 250  $\mu$ l; DH5 $\alpha$ -Zellen 350  $\mu$ l). Die Zellen wurden für eine Stunde bei 37 °C unter schütteln inkubiert, bevor sie auf LB-Medium-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert (50  $\mu$ l und 200  $\mu$ l) und über Nacht bei 37 °C inkubiert worden sind. TOP10 *E. coli*-Zellen wurden bereits als hitzeschockkompetente Zellen von Invitrogen (Karlsruhe) geliefert. Die DH5 $\alpha$ -Zellen wurden in unserem Labor nach Sambrook und Russell (2001) hergestellt.

#### *Transformation von A. rhizogenes-Bakterien*

*A. rhizogenes*-ARqual wurden durch Elektroporation transformiert. Zu 100  $\mu$ l kompetenten Zellen wurde 1  $\mu$ g Plasmid-DNA gegeben. Die Zellen wurden in eine Elektroporationsküvette (25 x 1 mm) überführt und mit 2500 kV transformiert. Zu den transformierten Zellen wurden 1000  $\mu$ l YT-Medium geben und die Bakterien bei 28 °C für 2 Stunden inkubiert. Danach wurden 100  $\mu$ l und 300  $\mu$ l des jeweiligen Transformationsansatzes auf YT-Agarplatten mit dem passenden Antibiotikum ausplattiert und für zwei Tage bei 28 °C inkubiert. Positive Klone wurden mittels PCR getestet. Dafür wurde eine einen Tag alte Flüssigkultur von einer *A. rhizogenes*-Kolonie als Ausgangsmaterial verwendet. Diese wurde zehnfach verdünnt und davon 1  $\mu$ l in einem 50  $\mu$ l PCR-Ansatz verwendet. Die kompetenten ARqual-Zellen wurden in unserem Labor nach Sambrook und Russell (2001) hergestellt.

### **3.3.2. Pflanzentransformationen**

#### *A. rhizogenes* medierte Pflanzentransformation

Die Transformation der *M. truncatula*-Pflanzen mit *A. rhizogenes* wurde nach einem veränderten Protokoll von Boisson-Dernier *et. al* (2001) durchgeführt. Nachdem die Samen gekeimt waren, wurden die Wurzeln mit einem sterilen Messer so abgeschnitten, dass die Wurzeln noch ungefähr drei Zentimeter lang waren. Daraufhin wurden die Wundflächen über eine YT-Agarplatte mit einem gleichmäßigem *A. rhizogenes*-Bakterienteppich gestrichen. Aus einer *A. rhizogenes*-Flüssigkultur wurden 400  $\mu$ l gleichmäßig auf einer YT-Platte ausgestrichen und zwei Tage inkubiert, damit sich ein Bakterienteppich bildete. Nachdem die Wunde den *A. rhizogenes*-Bakterien ausgesetzt worden ist, wurden die Keimlinge auf eine Wasseragarplatte gelegt und 24 Std. bei 25 °C inkubiert, damit die Bakterien die Wurzel infizieren konnten. Danach wurden die Pflanzen in Weckgläser mit Fahraeus-Medium mit Kanamycin (25 mg/ ml) überführt.

Nach drei bis vier Wochen wurden die Pflanzen in eine *in vivo*-Kultur (Phytotron 22 °C, 16 Std. Licht, 60 % Luftfeuchtigkeit) oder in eine Wurzelkultur (25 °C; 24 Std. Dunkelheit) überführt. Transgene Wurzeln wurden im Falle des pKDSR(I)-Vektors durch die, unter UV-Licht rot erscheinende, konstitutiv exprimierte "DSRed"-Färbung ausselektiert. Im Falle des pGWB443- und pBin- $\Delta$ alcR-Vektors wurde nach der Länge der Wurzeln selektiert. Durch das Antibiotikum im Medium sollten nur transgene Wurzeln ein starkes Wachstum zeigen.

### 3.3.3. Mikroskopie

#### *Herstellen von Vibratomschnitten*

Wurzeln die mit dem pGWB443-Vektor transformiert und mit *G. intraradices* inokuliert worden sind, wurden mit Epi-Fluoreszenz unter UV-Licht auf CFP-Signale untersucht. Wurzelbereiche die ein Signal zeigten wurden in 4 % Agarblöcken eingebettet. Von so stabilisierten Wurzeln wurden mit Hilfe eines Vibratoms (Leica) bei einer Frequenz von 7000 Hz ,100  $\mu$ m dicke Querschnitte hergestellt.

#### *Anfärben von Wurzelmaterial*

Das Wurzelmaterial wurde in 10 % (w/v) KOH für 20 Min. bei 90 °C inkubiert. Anschließend wurden die Wurzeln mehrmals mit Wasser und zuletzt zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. WGA-Alexa-Fluor® 488- oder 594-Färbelösung wurde zu den Wurzeln gegeben und für 30 Min. im Dunkeln inkubiert. Die gefärbten Wurzeln wurden zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Bei untransformierten Wurzeln und bei solchen, transformiert mit dem pKDSR (I)-Vektor, wurde das unter UV-Licht grün leuchtende WGA-Alexa-Fluor® 488 verwendet. Im Falle der mit dem pGWB443-Vektor transformierten Wurzeln wurde das unter UV-Licht rot leuchtende WGA-Alexa-Fluor® 594 verwendet. So konnte eine Überlagerung der Fluoreszenz mit dem cyanfarbenen leuchtenden CFP der aktiven Promotoren verhindert werden. Im Falle der Vibratomschnitte wurden die Schnitte in der Färbelösung für 30 Min. inkubiert und unter einem Laser-Scanning-Mikroskop untersucht.

#### *Mikroskopieeinstellung (Laser-Scanning-Mikroskop; LSM)*

Die Blende des LSM wurde in allen Aufnahmen auf das Maximum der möglichen Öffnung eingestellt, um eine geringere elektronische Verstärkung des Signals (gain) nutzen zu müssen. Das Signal wurde für jede Aufnahme solange verstärkt, bis die ers-

ten Hintergrundsignale auftauchten (Bildrauschen und Eigenfluoreszenz der Zellwand) und daraufhin wieder leicht verringert. Die verwendeten Lasereinstellungen sind in Tab. 24 aufgelistet.

*Mikroskopieeinstellung (Epi-Fluoreszenz-Mikroskop)*

Zur Anregung der mit WGA-Alexa-Fluor® 488 gefärbten Wurzeln wurde eine UV-Licht emittierende Diode und ein GFP-Filter-Set von Olympus verwendet.

**Tab. 24: LSM-Einstellungen.** Es wurden für die Untersuchungen der Promotor::CFP-Pflanzenproben folgende Einstellungen für die Laser benutzt.

Fluoreszenzfarbstoff	Anregung		gemessene Emission nm
	Laser	nm	
CFP	Ar/Kr Laser	476	490 / 20
WGA-Alexa-Fluor® 594	Ar/Kr Laser	568	620 / 20

## 4. Ergebnisse

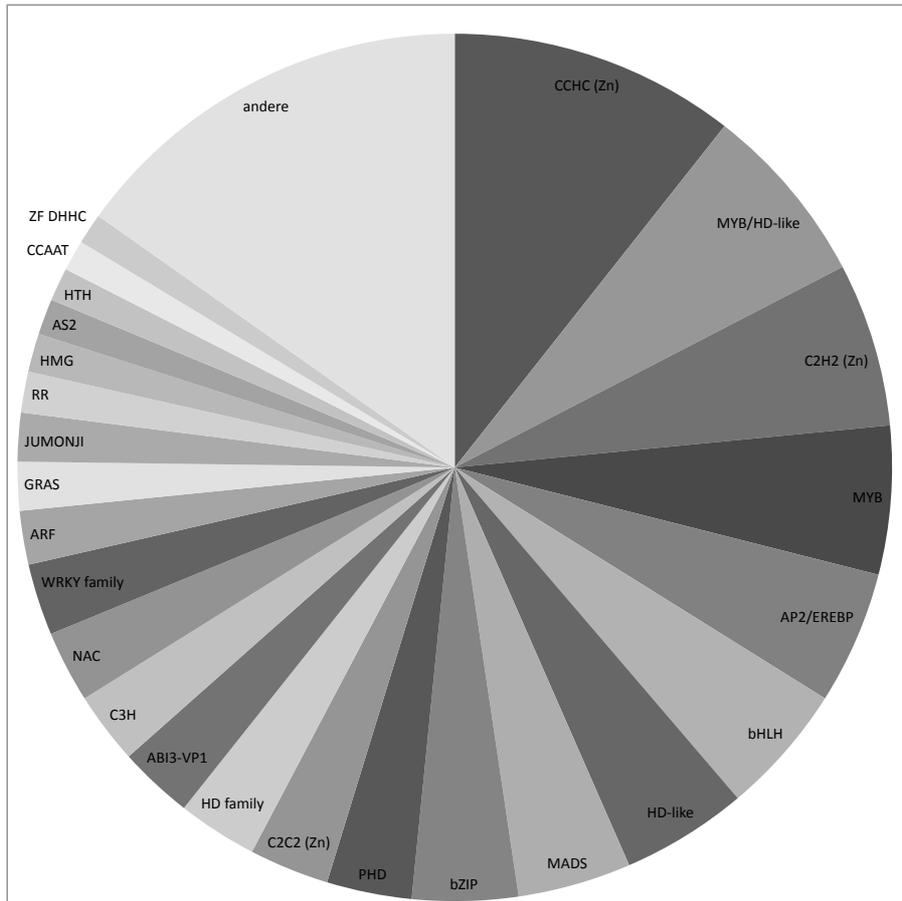
### 4.1. Transkriptionsanalyse AMS-induzierter Gene in *M. truncatula*

#### 4.1.1. Mess- und Berechnungsverfahren der qRT-PCR-Messungen

Die aus den qRT-PCR-Messungen gewonnenen Ct-Werte wurden in allen nachfolgenden Untersuchungen mit Hilfe eines „housekeeping gene“-Indexes (*MtEf1a*, *MtPdf*, *MtUbiex*, *MtGapDH*) normalisiert ( $\Delta\text{Ct}$ -Werte). Die Transkriprate wird als Verhältnis  $\Delta\text{Ct}^{\text{Bedingung A}} / \Delta\text{Ct}^{\text{Bedingung B}}$  im Zweierlogarithmus (LFC) dargestellt. Positive Werte stehen dabei für eine in Bedingung A erhöhte Transkription, negative für eine Verringerung selbiger. Um zu untersuchen, ob bestimmte Gene im Vergleich zwischen verschiedenen Bedingungen oder zwischen verschiedenen Pflanzenorganen signifikant reguliert sind, wurden die  $\Delta\text{Ct}$ -Werte aller Replikate des jeweiligen Ansatzes mit einem t-Test gegeneinander geprüft. Als Schwellenwert für eine signifikante Regulierung wurde ein p-Wert von 0,05 gewählt. Gene, die dieses Kriterium erfüllen, wurden in den Diagrammen mit einem „\*“ gekennzeichnet. Ein weiteres hinreichendes Signifikanzkriterium in dieser Arbeit war eine, im Vergleich zur Kontrolle, vierfach regulierte Transkription (LFC von  $\pm 2$ ) des Genes in 80 % der Replikate. Diese Gene werden auch dann, wenn der t-Test negativ ausfiel, im Text als signifikant reguliert genannt. In den Diagrammen wurden diese Gene mit „○“ markiert.

#### 4.1.2. Identifizieren von AMS-regulierten Transkriptionsfaktoren

In dieser Arbeit sollten durch AMS-regulierte Transkriptionsfaktoren (TFs) in *M. truncatula* identifiziert werden (TF-Profilung). Um dies zu erreichen, wurde die Transkriptmenge von 1050 TFs von den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln (myk<sup>+</sup>) mit der von nicht kolonisierten Wurzeln (myk<sup>-</sup>) verglichen. Die Pflanzen wurden 21 Tage nach der Inokulierung mit *G. intraradices* geerntet. Für die Identifizierung der AMS-regulierten TFs wurde die von Kakar *et al.* (2008) etablierte *M. truncatula* qRT-PCR-TF-Plattform verwendet. Die TFs, die auf der Plattform durch 1050 Oligonukleotidpaare (siehe Anhang) repräsentiert sind, wurden mit Hilfe bioinformatischer Methoden aus dem *M. truncatula*-Genom (International Medicago Genome Annotation Group (IMGAG) Version 2.0 Genom; <http://www.medicago.org/genome/IMGAG/>) vorhergesagt



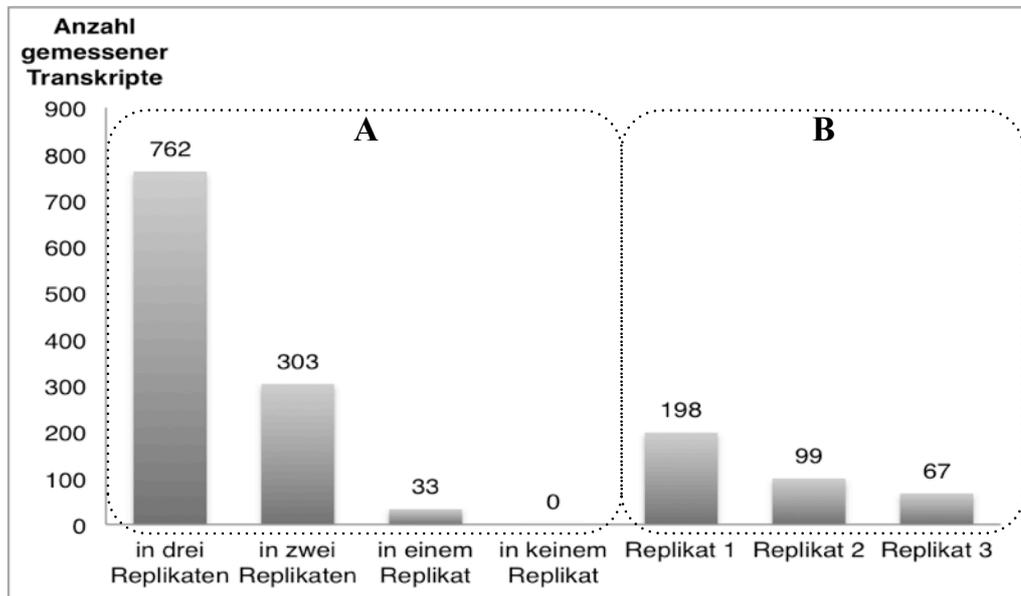
**Abb. 8: Verteilung der TF-Familien in der *M. truncatula*-qRT-PCR-TF-Plattform.** TF-Familien (Verändert nach Kakar *et al.*, 2008), aufgeteilt nach deren Häufigkeit innerhalb der TF-Plattform. Alle TF-Familien die weniger als zehnmal in der Plattform vorkommen sind unter „andere“ zusammengefasst.

(Kakar *et al.*, 2008). Diese TFs können in verschiedene bekannte TF-Familien eingeteilt werden (Abb. 8).

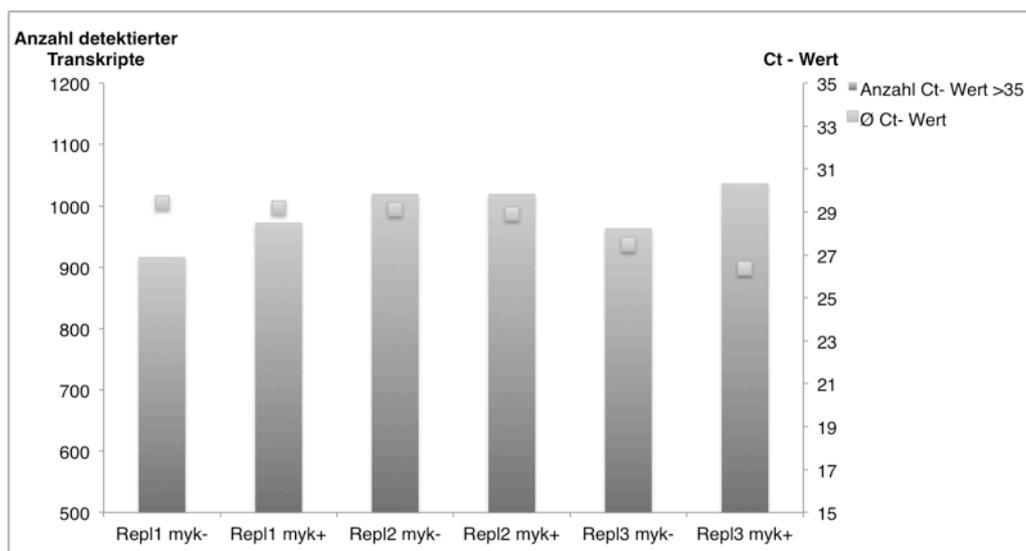
Die qRT-PCR-Messungen für das TF-Profilung wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Aufgrund der auf der TF-Plattform gemessenen Markergene *MtPt4* für den Mykorrhizierungsgrad und *GiGlom* für das Vorhandensein von *G. intraradices* konnte eine Kolonisierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies konnte auch durch mikroskopische Untersuchungen gefärbter Wurzelstücke bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Die Anzahl der in den qRT-PCR-Messungen nachgewiesenen Transkripte wurde berechnet und sind graphisch dargestellt (Abb. 9). „Nicht gemessen“ bedeutet in diesem Fall, dass in beiden Bedingungen des jeweiligen Replikates der Ct-Wert gleich oder über 35 war. Von zwei Dritteln der auf der Plattform vorhandenen TFs konnten in allen drei Replikaten vorhandene Transkripte gemessen werden. 33 Transkripte konnten jeweils nur in einem Replikat detektiert werden. Dass ein Transkript in keinem der Replikate detektiert werden konnte kam nicht vor. In den jeweiligen Replikaten konnten 67, 99 bzw. 198 Transkripte unter beiden Bedingungen nicht gemessen werden. Der

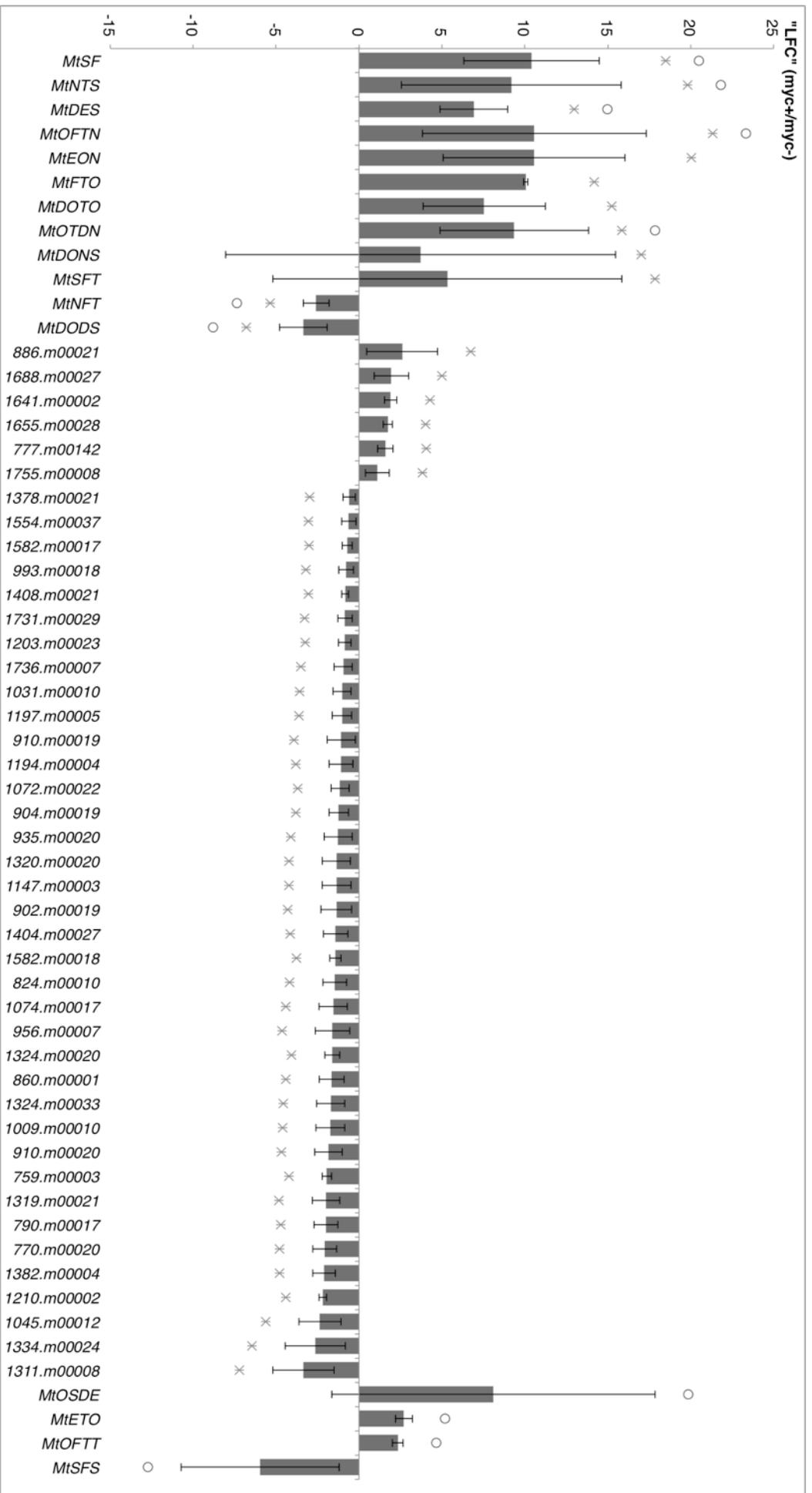
durchschnittliche Ct-Wert unter den detektierten Transkripten liegt in allen Messungen zwischen 26 und 29 (Abb. 10). Die gemessenen TFs wurden nachfolgend auf ihre Signifikanz hinsichtlich der Regulierung getestet.



**Abb. 9. : Anzahl gemessener Transkripte während des TF-Profilings.** Darstellung der gemessenen (A) bzw. nicht gemessenen Transkripte (B) in der qRT-PCR des TF-Profilings. „A“ stellt die Anzahl der Transkripte dar, die in drei, nur in zwei, einem oder in keinem der drei Replikate in beiden Bedingungen Ct-Werte unter 35 hatten, also nachgewiesen werden konnten. „B“ stellt die Anzahl der Transkripte je Replikat dar, deren Ct-Wert in beiden Bedingungen über 35 lag, also nicht messbar waren.

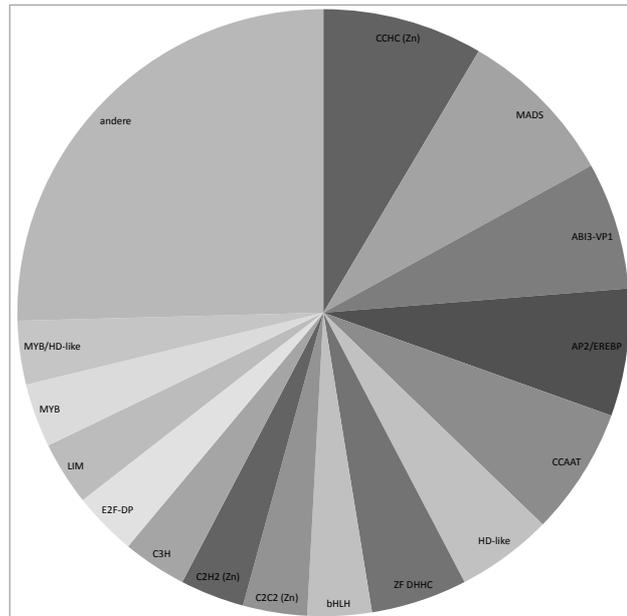


**Abb. 10: Durchschnittliche Ct-Werte je Messung im TF-Profilings.** Darstellung der durchschnittlichen Ct-Werte (rechte y-Achse) in jeder Messung. Zur Berechnung wurden nur die detektierbaren (Ct-Wert > 35) Transkripte verwendet, deren Anzahl ebenfalls angegeben ist (linke y-Achse).



**Abb. 11.: Signifikante Transkriptveränderung (LFC) AM-regulierter TFs nach 21 Infektionsstagen.** Dargestellt sind mit qRT-PCRs gemessene Mittelwerte (im Zweierlogarithmus) der Transkription (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln) aus sechs (Kasten) bzw. drei Replikaten. Die Kandidaten entstammen der TF-Profilings-Plattform. Auf der „x-Achse“ ist die Erhöhung der Transkriptionsrate in mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula* Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten Wurzeln im Zweierlogarithmus aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Symbole „\*“ und „○“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 Infektionsstagen („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0.05; „○“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionsstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war).

Die qRT-PCR-Messungen für das TF-Profilung ergaben nach 21 dpi („*days past infection*“; Tage nach der Infektion), dass 59 der gemessenen TFs während der AMS signifikant reguliert waren (Abb. 11). Das entspricht 5,6 % der auf der TF-Plattform vorhandenen Gene. Die Häufigkeit bestimmter TF-Familien in dem Datensatz verändert sich, werden nur noch die 59 signifikant regulierten TFs heran-gezogen (Abb. 12). Bestimmte TF-Familien sind verstärkt repräsentiert (MADS, ABI3-VP1, AP2/EREBP). Andere TF-Familien sind während der AMS jedoch geringer repräsentiert (MYB/HD-like, MYB). Die



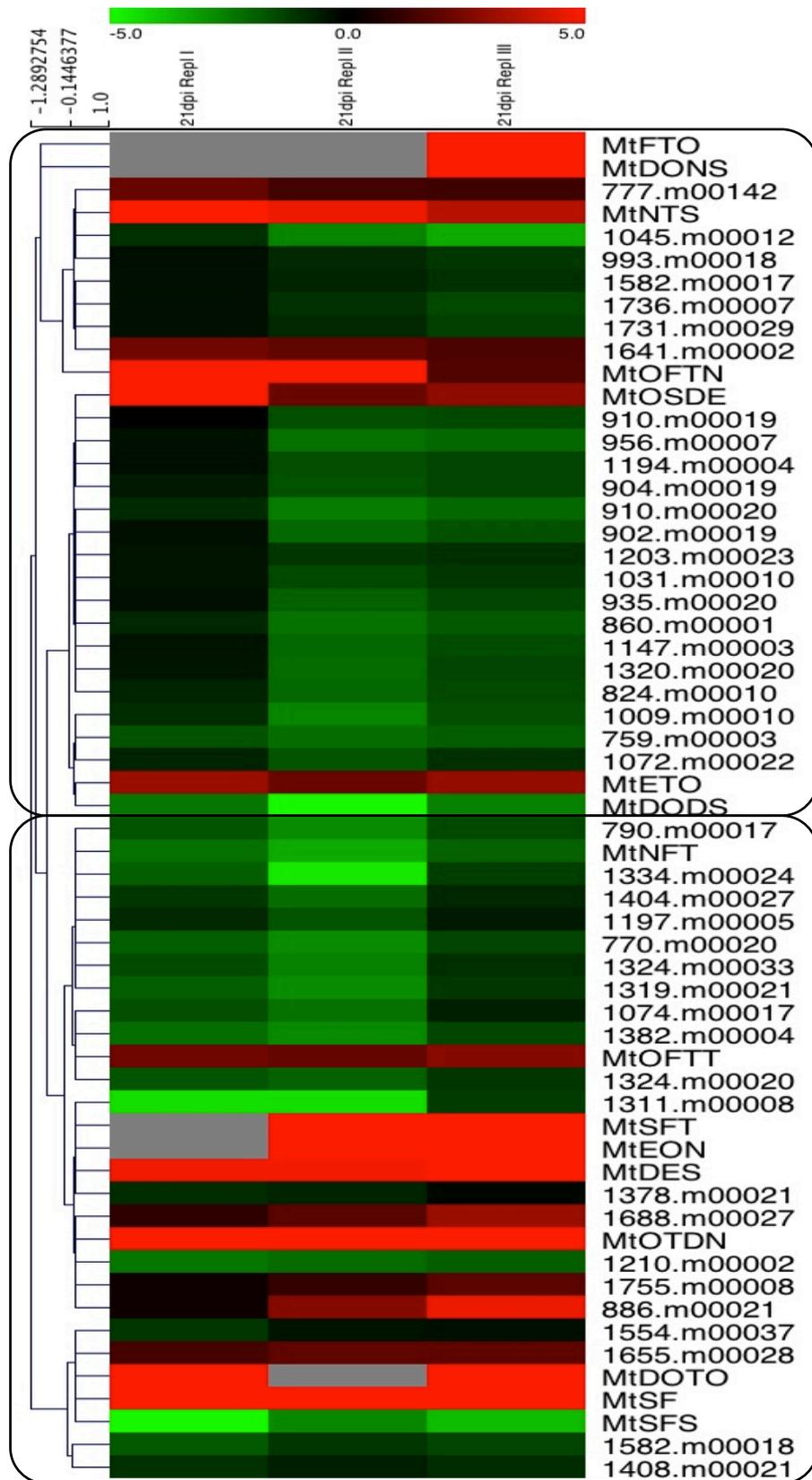
**Abb. 12: Verteilung der TF-Familien für AMS-regulierte TFs.** Die Verteilung der signifikant regulierten TFs auf verschiedene TF-Familien. Die Zugehörigkeit zu bestimmten Familien wurde bioinformatisch abgeglichen (blastx, Uniprot). Alle TFs, die nur einmal in dem Datensatz vorkommen sind unter „andere“ zusammengefasst.

Transkriptmenge von 19 TFs war in „myk<sup>+</sup>“-Wurzeln erhöht, die restlichen 40 der signifikant regulierten TFs waren in „myk<sup>+</sup>“-Wurzeln geringer exprimiert als in der Kontrolle. Neben ihrer Annotation wurden 16 der dargestellten TFs (Abb. 11) mit einem Genamen versehen (Tab. 25). Es handelt sich dabei um zehn TFs, die in der AMS-spezifischen Plattform in drei zusätzlichen Replikaten gemessen wurden (Tab. 26; Kapitel 4.2), zwei TFs, deren Transkriptmengen signifikant reguliert waren und zusätzlich zwischen vier- und sechzehnfach verringert waren (*MtNFT* und *MtDODS*). Zusätzlich vier TFs, die das zweite Signifikanzkriterium erfüllten, aber deren t-Test einen p-Wert höher als 0,05 ergab und daher nicht in die AM-spezifische Plattform übernommen wurden. Der p-Wert für diese 16 TFs ist angegeben (Tab. 25).

Mit den „LFCs“ der 59 signifikant regulierten TFs wurde, um Koregulationen zwischen den TFs zu erkennen, mit Hilfe des Programms MeV (Dana-Farber Cancer Institute, 44 Binney St, Boston, MA, USA) eine Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 13). Wendet man für das hierarchische Clustering einen Schwellenwert für die Distanz der Gene von 1,5 (euklidische Distanz) an, so ergeben sich zwei große Gruppen koregulierter TFs (durch Rahmen gekennzeichnet).

**Tab. 25: AMS-regulierte Transkriptionsfaktoren in *M. truncatula*.** Aufgelistet sind die zehn in der AMS-Plattform gemessenen TFs (Kapitel 4.2) und sechs weitere signifikant regulierte TFs. Angegeben sind die TF-Familie, TF-Profilung-Plattform ID und der jeweilige p-Wert nach Durchführung eines t-Testes. Zusätzlich ist angegeben, ob die TFs nach einem der zwei Kriterien signifikant reguliert sind. Zwei TFs (*MtDONS* und *MtSFT*) konnten in den Messungen der AMS-Plattform nicht bestätigt werden und sind daher als nicht signifikant angegeben. Grau unterlegt sind die als TF-Topkandidaten klassifizierten TFs.

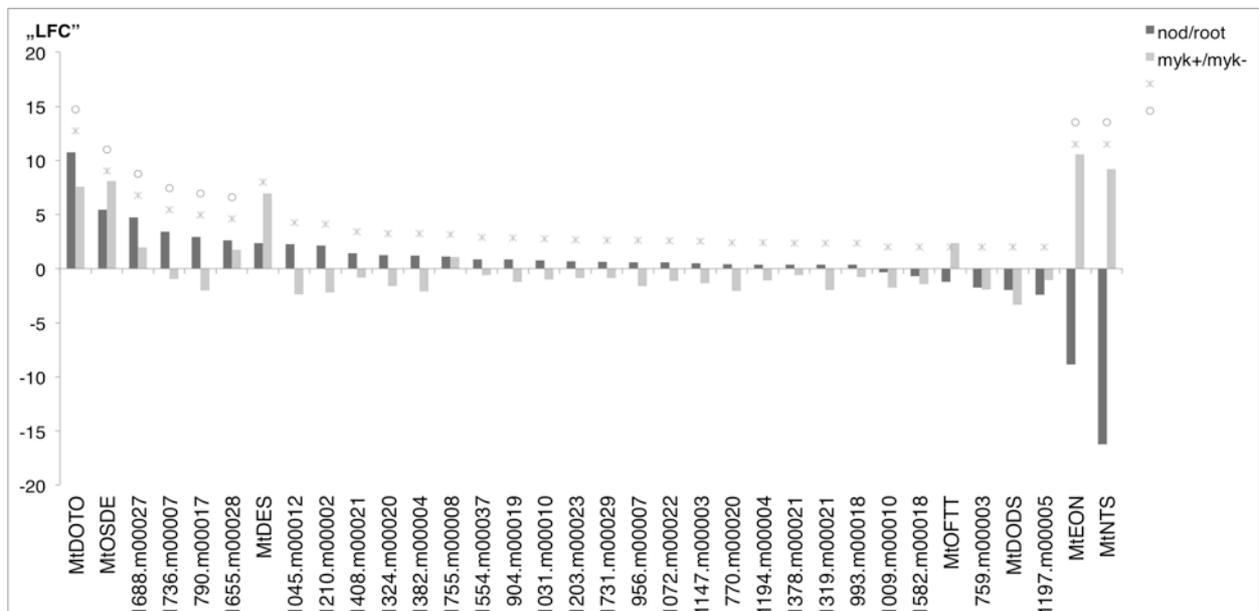
Gen	TF-Familie	TF-Profilung-Plattform-ID	p-Wert	Signifikant		
				p-Wert > 0,05	log <sup>2</sup> =2 in 80 % der Replikate	LFCs
<i>MtDES</i>	CCAAT-Box	886.m00017	0,00	✓	✓	6,92
<i>MtDODS</i>	Zink-Finger	1177.m00001	0,01	✓	✓	-3,36
<i>MtDONS</i>	Zink-Finger	1196.m00004	0,14	✗	✗	3,71
<i>MtDOTO</i>	Zink-Finger	1131.m00004	0,03	✓	✓	7,55
<i>MtEON</i>	Homeodomain-ähnlicher TF	819.m00002	0,04	✓	✓	10,54
<i>MtETO</i>	NAC	821.m00020	0,22	✓	✓	2,70
<i>MtFTO</i>	MADS-Box	1111.m00004	0,03	✓	✓	10,04
<i>MtNFT</i>	MYB-ähnlicher TF	953.m00007	0,01	✓	✓	-2,59
<i>MtNTS</i>	AP2/EREBP	926.m00034	0,00	✓	✓	9,19
<i>MtOFTN</i>	AP2/EREBP	1539.m00019	0,00	✓	✓	10,57
<i>MtOFTT</i>	Zink-Finger	1432.m00019	0,09	✗	✓	2,33
<i>MtOSDE</i>	MADS-Box	1688.m00029	0,24	✓	✓	8,11
<i>MtOTDN</i>	Zink-Finger	1399.m00016	0,05	✓	✓	9,35
<i>MtSF</i>	bHLH	65.m00254	0,00	✓	✓	10,40
<i>MtSFS</i>	Zink-Finger	746.m00009	0,22	✓	✓	-5,97
<i>MtSFT</i>	MADS-Box	642.m00127	0,11	✗	✗	5,32



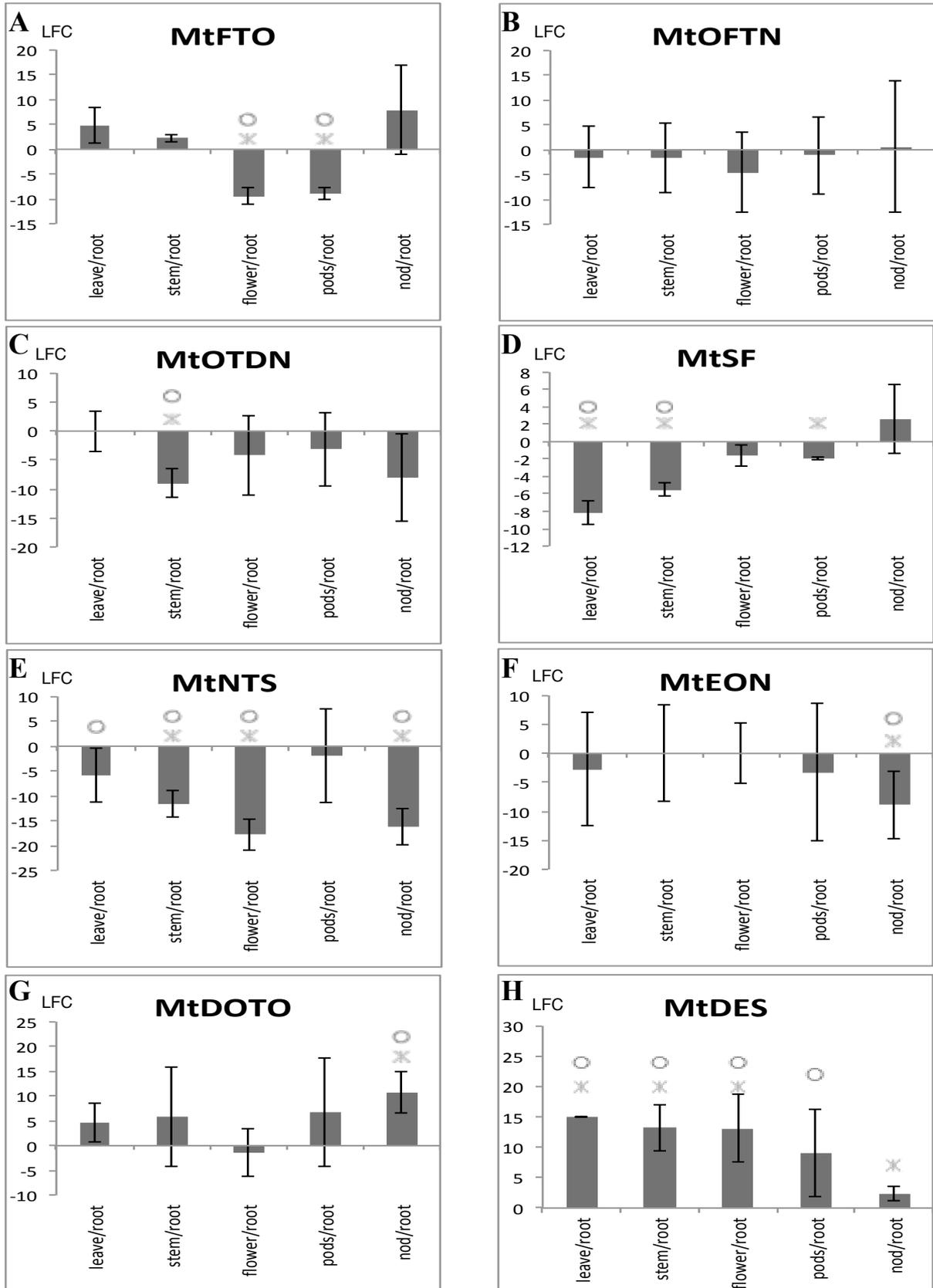
**Abb. 13: Clusteranalyse der 59 signifikant regulierten TFs.** Durch das qRT-PCR TF-Profilung wurden 59 signifikant regulierte TFs gefunden. Diese wurden mit dem Programm MeV durch eine Pearson-Korrelation gruppiert um mögliche Koregulationen zu entdecken. Die Farbwerte geben die LFCs (myk+/myk-) mit einem „cutoff“ bei  $\pm 5$  an. Die zwei Runden Rahmen verdeutlichen die zwei Cluster, wendet man für das Clustering einen Schwellenwert für die Distanz der Gene von 1,5 (euklidische Distanz) an.

#### 4.1.3. Vergleich der TF-Regulation in *M. truncatula* zwischen mykorrhizierten Wurzeln, Wurzelknöllchen und weiteren Pflanzenorganen.

Einhergehend mit der Etablierung der qRT-PCR-TF-Profilings-Plattform durch Kakar *et al.* (2008) wurden Messungen der Transkriptmenge dieser TFs mit Blatt, Spross, Blüte, Hülse, Wurzelknöllchen und Kontrollwurzeln durch K. Kakar durchgeführt. Mit Hilfe einer Neuberechnung dieser Daten konnten mögliche Koregulationen in der TF-Transkription zwischen Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln untersucht werden. Es wurden 34 sowohl in mykorrhizierten als auch in Wurzelknöllchen im Vergleich zu nicht kolonisierten Wurzeln signifikant regulierte TFs gefunden (Abb. 14). Von diesen 34 TFs sind 26 TFs in Wurzelknöllchen verstärkt, acht TFs vermindert transkribiert. Die TFs *MtDOTO* und *MtOSDE* sind in beiden Fällen stark hochreguliert. Die Transkriptmenge der TFs *MtEON* sowie *MtNTS*, die in mykorrhizierten Wurzeln verstärkt transkribiert werden, ist in Wurzelknöllchen im Vergleich zu nicht kolonisierten Kontrollwurzeln verringert. Zusätzlich wurden die Daten von K. Kakar verwendet, um die Transkription von Kandidaten-TFs in den verschiedenen Pflanzenorganen im Vergleich zu deren Transkription in Kontrollwurzeln zu untersuchen. Die Transkriptlevel der acht Topkandidaten in Blatt, Spross, Blüte, Hülse und Wurzelknöllchen wurden analysiert und im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollwurzeln, berechnet (Abb. 15). Als Topkandidaten



**Abb. 14 :** Änderung der Transkriptmenge von TFs die sowohl in mykorrhizierten Wurzeln als auch in Wurzelknöllchen von *M. truncatula* signifikant reguliert sind. TFs, die im Vergleich zu Kontrollwurzeln signifikant sowohl in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln, als auch in Wurzelknöllchen (Rohdaten für die Nodulierung entnommen aus Kakar *et al.*, 2008) reguliert sind. Die myk+/myk--Daten entstammen dem Profiling aus dieser Arbeit. Die y-Achse stellen LFCs dar (Erhöhung der Transkriptmenge im Zweierlogarithmus). („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „○“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war; für nod/root).



**Abb. 15: Transkriptregulation der TF-Topkandidaten in weiteren Pflanzenorganen.** Die LFCs der Transkription der acht Topkandidatengene für fünf weitere Pflanzenorgane (Blatt, Spross, Blüte, Hülse, Wurzelknöllchen) im Vergleich zur Transkription in Wurzeln. Die Rohdaten sind Kakar *et al.* (2008) entnommen und neu nach den zuvor beschriebenen Methoden berechnet. Auf der y-Achse sind die LFCs aufgetragen. Die Symbole „\*“ und „○“ kennzeichnen signifikante Werte („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „○“ - falls die Transkriptionsraten in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war).

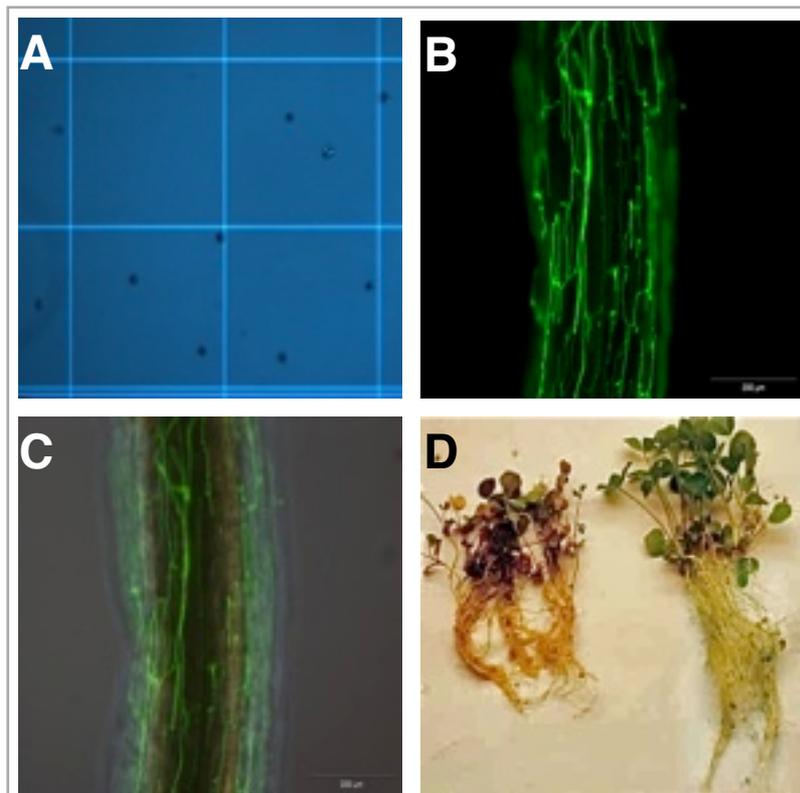
gelten jene TFs, die nach sechs Replikaten signifikant reguliert sind (t-Test) und *MtOTDN*, das in fünf der sechs Replikate verstärkt transkribiert war.

In mykorrhizierten Wurzeln sind alle diese TFs verstärkt exprimiert (Abb. 11). Durch die Symbole „✱“ und „○“ sind signifikante Regulationen dargestellt. Zwei der TFs sind in den Blättern vermindert transkribiert: *MtSF* (15.D) und *MtNTS* (15.E). Im Spross werden *MtOTDN* (15.C), *MtSF* (15.D) und *MtNTS* (15.E) transkribiert. In den Blüten ist *MtNTS* signifikant herunter reguliert, in den Hülsen *MtFTO* (15.A) und *MtSF* (15.D). Die Transkriptmenge von *MtNTS* (15.E) und *MtEON* (15.F) ist in den Wurzelknöllchen signifikant verringert. Die Transkriptmenge von *MtDOTO* (15.G) ist in Wurzelknöllchen erhöht. Die Transkriptmenge von *MtDES* (15.H) ist in allen Pflanzenorganen signifikant erhöht, jedoch am geringsten in Wurzelknöllchen. *MtOSDE*, das in mykorrhizierten Wurzeln und in Wurzelknöllchen stärker transkribiert wird als in nicht kolonisierten bzw. Kontrollwurzeln (Abb. 14), ist ebenso in allen Pflanzenorganen im Vergleich zu nicht kolonisierten Wurzeln verstärkt exprimiert (Daten nicht gezeigt).

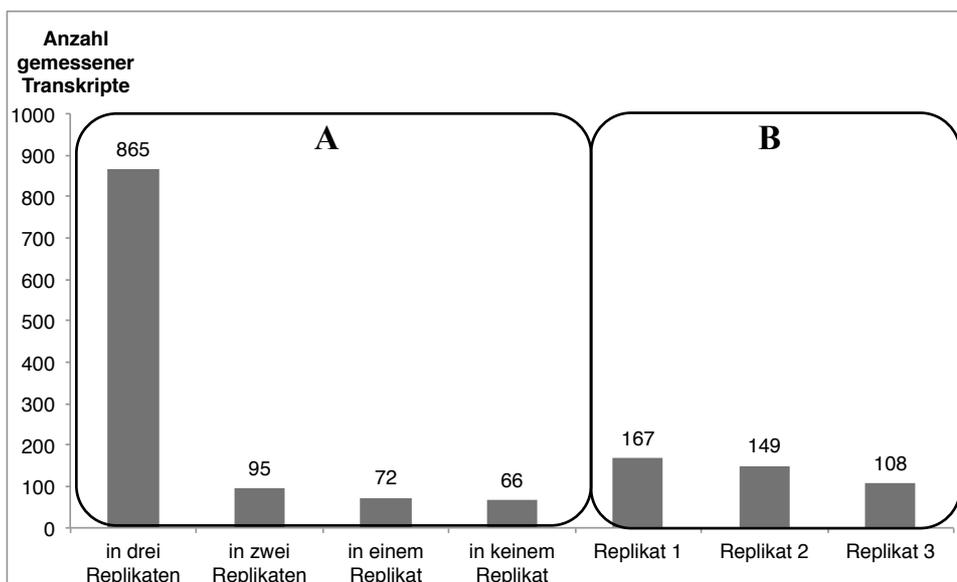
#### **4.1.4. Identifizierung koregulierter Transkriptionsfaktoren zwischen *A. euteiches*-infizierten und in *G. intraradices*-kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln.**

Diese TF-Plattform wurde zusätzlich genutzt um ein TF-Profilung mit Wurzeln durchzuführen, die durch den pathogenen Oomycet *A. euteiches* infiziert wurden (Abb. 16). Es wurden ebenfalls in drei biologische Replikate gemessen und die gleichen Berechnungsmethoden angewendet wie in den vorangegangenen Experimenten. Die Infizierung der Wurzeln mit *A. euteiches* konnte durch eine WGA-Alexa-Fluor®-Färbung nachgewiesen werden (Abb. 16.B). 80 % der auf der Plattform vorhandenen TFs konnten in allen drei Replikaten nachgewiesen werden (Abb. 17). Nur 66 Transkripte konnten in keinem der Replikate detektiert werden. In den jeweiligen Replikaten konnten zwischen 108 und 167 Transkripte unter beiden Bedingungen nicht gemessen werden. Der durchschnittliche Ct-Wert unter den detektierten Transkripten lag in allen Messungen zwischen 26 und 29 (Abb. 18).

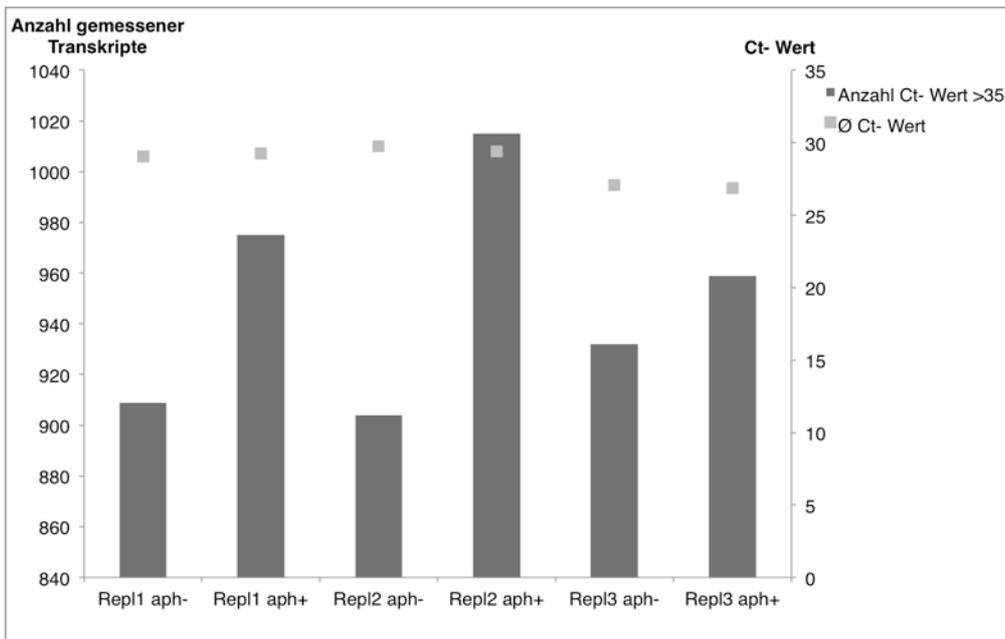
Von den detektierbaren TFs waren 47 in den mit *A. euteiches*-infizierten Wurzeln im Vergleich zu Kontrollwurzeln signifikant reguliert (Abb. 19; dargestellt durch „✱“ und „○“). Im Gegensatz zu Wurzelknöllchen konnten bei den durch *A. euteiches* infizierten Wurzeln keine TFs gefunden werden die ebenfalls in mykorrhizierten Wurzeln reguliert sind.



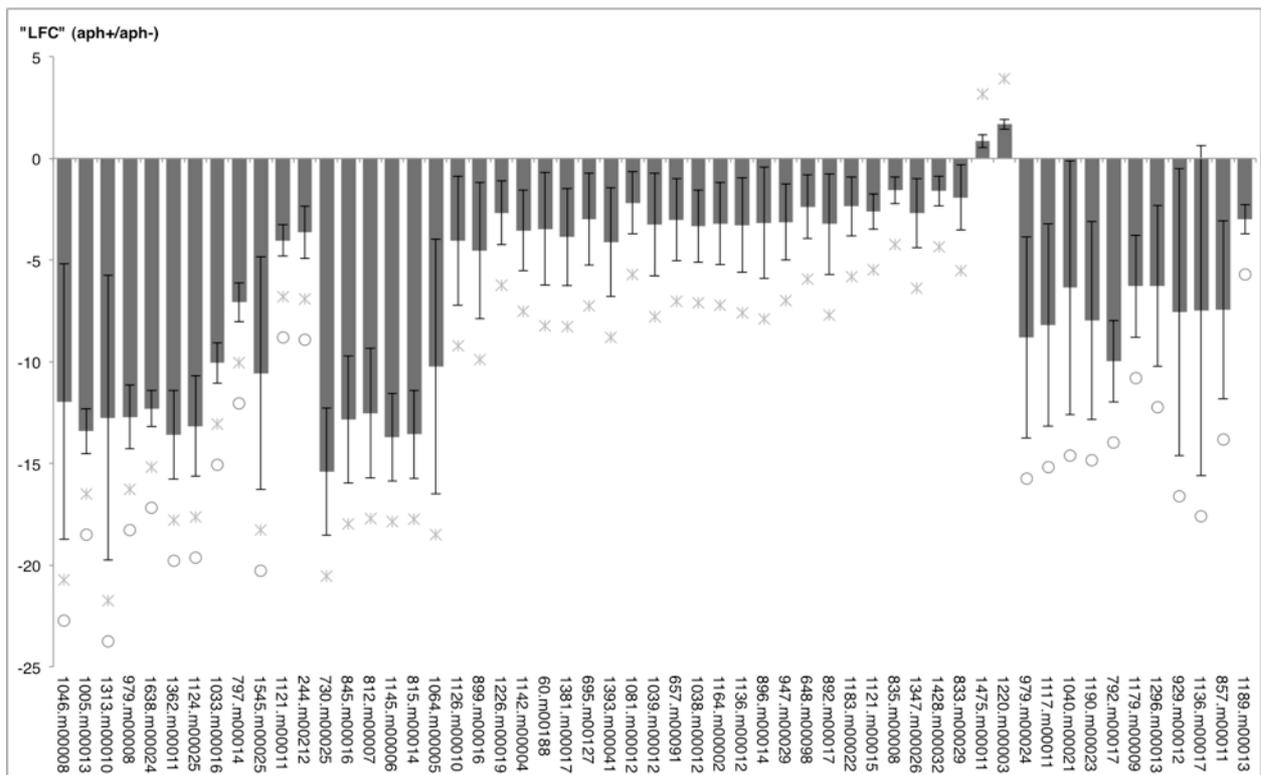
**Abb. 16: *Aphamoyces euteiches*-Infektion.** Zoosporen von *A. euteiches* (A) infizieren und kolonisieren nach drei Tagen das Wurzelsystem von *M. truncatula* (*A. euteiches* durch WGA-Alexa-Fluor® gefärbt (B); Overlay der WGA-Alexa-Fluor® gefärbten Aufnahme und einer Hellfelddaufnahme (C)). Verringerung der Wurzelmasse durch eine *A. euteiches* Infektion in *Medicago sativa* (D; entnommen aus Malvick (2002)). Rechts eine nicht infizierten Kontrollwurzeln, links eine infizierte.



**Abb. 17 : Anzahl gemessener Transkripte während des TF-Profilings mit *A. euteiches*-infizierten Wurzeln.** Darstellung der gemessenen (A) bzw. nicht gemessenen Transkripte (B) in der qRT-PCR des TF-Profilings. „A“ stellt die Anzahl der Transkripte dar, die in drei, nur in zwei, einem oder in keinem der drei Replikate in beiden Bedingungen Ct-Werte unter 35 hatten, also nachgewiesen werden konnten. „B“ stellt die Anzahl der Transkripte je Replikat dar, deren Ct-Wert in beiden Bedingungen über 35 lag, also nicht dedektierbar waren.



**Abb. 18: Durchschnittliche Ct-Werte je Messung im TF-Profilung mit *A. euteiches* infizierten Wurzeln.** Darstellung der durchschnittlichen Ct-Werte in jeder Messung. Zur Berechnung wurden nur die detektierbaren (Ct-Wert > 35) Transkripte verwendet, deren Anzahl ebenfalls angegeben ist.



**Abb. 19: Mittelwerte der Veränderung der Transkriptmenge von signifikant regulierten TFs in *A. euteiches* infizierten Wurzeln.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen LFCs (Veränderung der jeweiligen Transkriptmenge in infizierten Wurzeln; im Zweierlogarithmus) aus drei Replikaten mit 21 Tage alten *M. truncatula*-Pflanzen und drei Tage nach der Infizierung mit *A. euteiches*. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Symbole „\*“ und „o“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 Infektionstagen („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war -, „o“).

## 4.2. Mittels qRT-PCR durchgeführte Zeitverlaufsexperimente AMS-regulierter Gene

### 4.2.1. Etablierung qRT-PCR-Plattform zur parallelen Messung bekannter AM-relevanter Gene aus *M. truncatula*

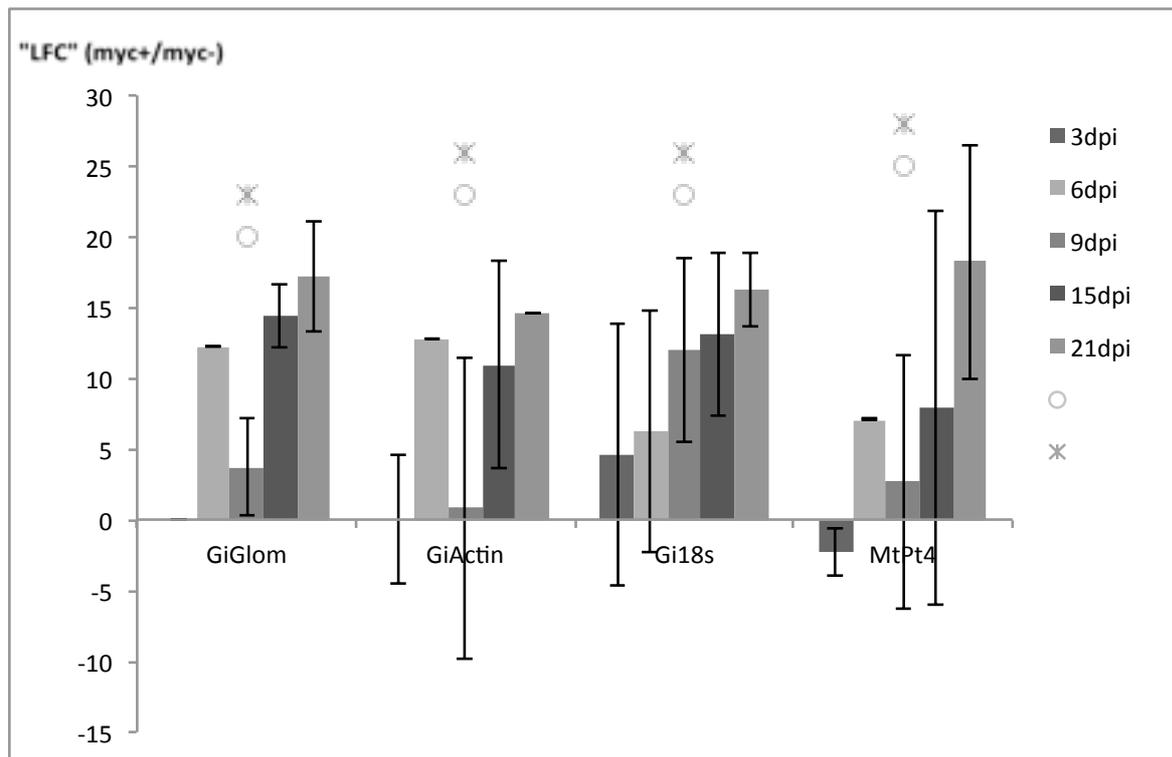
Zum einfachen und schnellen Messen von Transkripten in AM-kolonisierten Wurzeln wurde eine AMS-spezifische qRT-PCR-Plattform etabliert (Tab. 26). Damit sollte die Möglichkeit gegeben werden, AMS-relevante Gene mittels qRT-PCR zu messen. Diese Plattform beinhaltete zehn, der in dem TF-Profilung gefundenen, AMS-spezifisch transkribierten TFs. Kriterium für die Aufnahme in die AMS-Plattform war eine signifikante und im Mittel mehr als sechzehnfache Erhöhung der Transkriptmenge in kolonisierten Wurzeln. Weitere Kandidaten waren einige der als AM-spezifisch vermuteten Gene aus Frenzel *et al.* (2005). Diese Gene wurden mit Hilfe einer auf suppressiver, subtraktiver Hybridisierung basierenden (SSH) Bibliothek gefunden. Das Augenmerk wurde dabei auf solche TCs („tentative consensus“-Sequenz) gelegt, deren Sequenz Ähnlichkeiten mit Transporterproteinen (*MtAmT*, *MtCoT*, *MtMDRL*, *MtSuT*, *MtZiT*), mit Kinasen (*MtLLK*, *MtPPK*, *MtSPK*) oder Rezeptoren (*MtMlo2*, *MtNBS*, *MtRLP*) aufweisen. Zusätzlich wurden AM-regulierte Lektine und sechs TCs, deren Sequenzen keinerlei Ähnlichkeit mit bekannten Proteinmotiven besaßen untersucht (Frenzel *et al.* 2005). Des Weiteren wurden Oligonukleotide für neun weitere bekannte AMS-spezifische Gene mit unterschiedlichen Funktionen (*MtBCP2*, *MtGst1*, *MtHa1*, *MtStp*, *MtSyr*, *MtTi1*) in die Plattform aufgenommen. Außerdem befinden sich auf der AMS-Plattform Oligonukleotide zum Nachweis der Transkripte von Genen, die in die Phosphatmangelsignalkette involviert sind (*Mt4*, *MtAcpho*, *MtSPX*, *MtUnknown*, *Pho2*, *Phr1*, *MtPpl*, *MtPta*, *MtPt1*, *MtPt5*) und Oligonukleotide zum Messen der Vorläufermoleküle verschiedener miRNA399, die ebenfalls eine Rolle in der Signaltransduktion unter Phosphatmangelbedingungen und möglicherweise in der AMS spielen (Branscheid *et al.*, 2010). Als Markergen zum Überprüfen der Kolonisierung und des Mykorrhizierungsgrades wurde *MtPt4* gewählt. MtPT4 ist ein Phosphattransporter, der spezifisch in der periarbuskulären Membran lokalisiert ist (Harrison *et al.*, 2002). Als Referenzgene für die Präsenz von *G. intraradices* wurden entsprechende Oligonukleotide für *GiGlom*, *Gi18s* (binden an die rRNA von *G. intraradices*) und *GiActin* (bindet an das Transkript für Actin von *G. intraradices*) verwendet. Um die Dynamik der transkriptionellen

**Tab. 26: Zusammensetzung der AMS-Plattform.** Angeben sind Gene deren Transkriptmenge in den qRT-PCR-AMS-Plattform Messungen untersucht wurde. Zusätzlich ist deren vorhergesagte Funktion aufgelistet. Die Symbole geben die Zuordnung für Abb. 28 an.

Genname	vorhergesagte Funktion	Genname	vorhergesagte Funktion
<b>G. intraradices</b> Markergene ▲		<b>Signalproteinähnliche Gene in <i>M. truncatula</i></b> ★	
<i>G.int_18s</i>	<i>G.intraradices</i> 18s	<i>MtLLK</i>	Leucin-Kinase
<i>G.int_Actin</i>	<i>G.intraradices</i> Actin	<i>MtMLO2</i>	Mehltau-Resistenz-Locus-o
<i>GLOM</i>	<i>G.intraradices</i> rRNA	<i>MtNBS</i>	Protein mit Nukleotid-Bindestelle
<b>Pi-homeostasis Gene in <i>M. truncatula</i></b> ◆		<i>MtPPK</i>	Protein-Kinase
<i>Mt_miR399a</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtRLP</i>	Rezeptorprotein
<i>Mt_miR399b</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtSPK</i>	Serin-Protein-Kinase
<i>Mt_miR399c</i>	Pi-Mangelsignal	<b>Sonstige Gene in <i>M. truncatula</i></b> ★	
<i>Mt_miR399d</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtBCP2</i>	blaues Kupferbindeprotein
<i>Mt_miR399e</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtGlp</i>	Germin-ähnliches Protein
<i>Mt_miR399f</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtGST1</i>	Glutathion-S-transferase
<i>Mt_miR399g</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtHA1</i>	H <sup>+</sup> -ATPase
<i>Mt_miR399h</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec10</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399i</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec11</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399j</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec5</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399k</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec6</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399l</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec7</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399m</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec8</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399n</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtLec9</i>	AM-reguliertes Lektin
<i>Mt_miR399o</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtSTP</i>	gewebespezifisches Protein
<i>Mt4</i>	Pi-Mangelsignal	<i>MtSyr</i>	Proteinprozessierung
<i>MtAcpho</i>	saure Phosphatase	<i>MtTi1</i>	Protease-Inhibitor
<i>MtPhr1</i>	Myb-like-TF	<b>Transkriptionsfaktoren in <i>M. truncatula</i></b> ★	
<i>MtPlp</i>	Phospholipase-D	<i>MtDES</i>	CCAAT-TF
<i>MtPT1</i>	Pi-Transporter	<i>MtDONS</i>	CCHC-(Zink-Finger)-TF
<i>MtPt4</i>	AM-spez. Pi-Transporter	<i>MtDOTO</i>	CCHC-(Zink-Finger)-TF
<i>MtPT5</i>	Pi-Transporter	<i>MtEON</i>	HD-like-TF
<i>MtPta</i>	Phosphatase	<i>MtFTO</i>	MADS-Box-TF
<i>MtSPX</i>	Pi-Mangel-Signal	<i>MtNTS</i>	AP2/EREBP-TF
<i>Mtunknown</i>	Pi-Mangel-Signal	<i>MtOFTN</i>	AP2/EREBP-TF
<i>Pho2</i>	E2-Ubiquitin-Konjugase	<i>MtOTDN</i>	CCHC (Zink-Finger)-TF
<b>Transporterproteinähnl. Gene in <i>M. truncatula</i></b>		<i>MtSF</i>	bHLH-TF
<i>MtAmT</i>	Ammoniumtransporter	<i>MtSFT</i>	MADS-Box-TF
<i>MtCoT</i>	Kupfertransporter	<b>Proteine ohne Sequenzähnl. in <i>M. truncatula</i></b> ★	
<i>MtMDRL</i>	MDR-ABC-Transporter	<i>TC63455</i>	unbekannt
<i>MtSuT</i>	Zuckertransporter	<i>TC71536</i>	unbekannt
<i>MtZiT</i>	Zinktransporter	<i>TC71585</i>	unbekannt
		<i>TC71978</i>	unbekannt
		<i>TC72388</i>	unbekannt
		<i>TC72546</i>	unbekannt

Regulation dieser Gene und mögliche Koregulationen zu untersuchen wurde ein Zeitverlaufsexperiment durchgeführt. In diesem konkreten Fall wurde mit Hilfe dieser AMS-Plattform die Transkription der Gene an fünf verschiedenen Zeitpunkten (3, 6, 9, 15, 21 Infektionstage) in drei biologischen Replikaten gemessen.

Nach 21 dpi sind die Transkriptmengen der vier Markergene (*Gi18s*, *GiActin*, *GiGlom* und *MtPt4*) über die fünf Zeitpunkte im Vergleich zu nicht kolonisierten Wurzeln signifikant erhöht (Abb. 20).

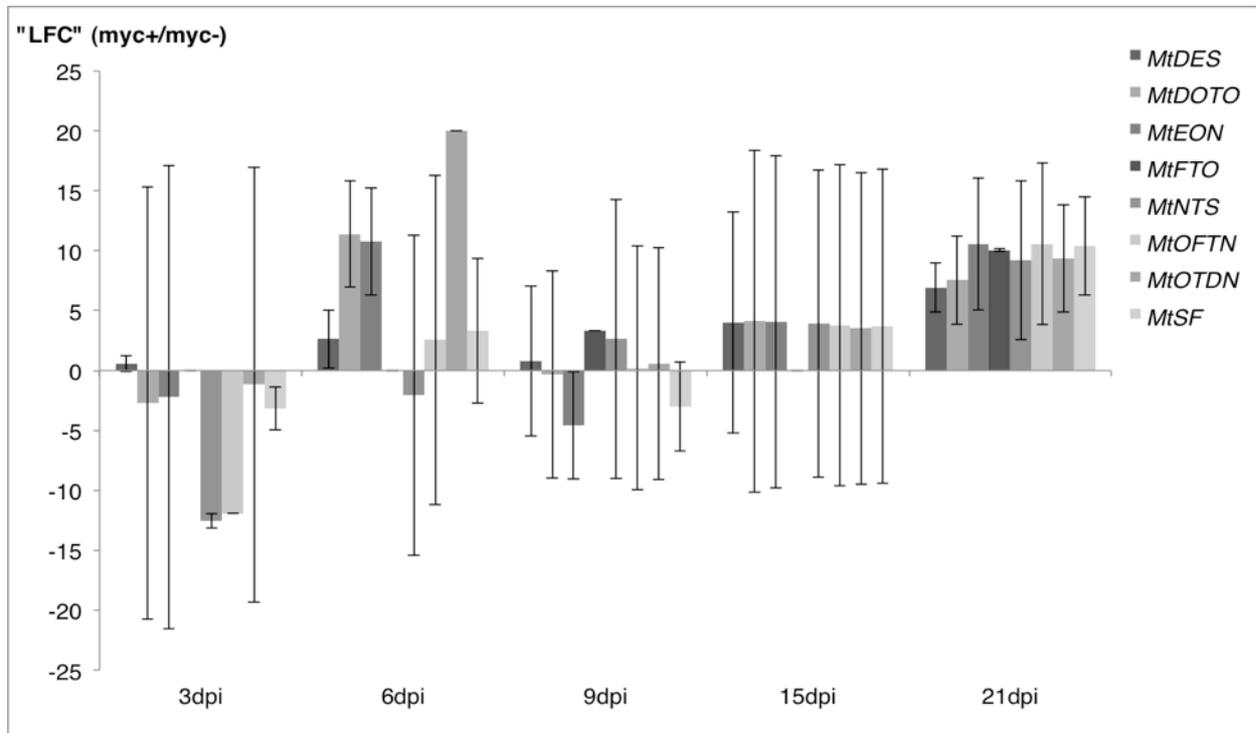


**Abb. 20: qRT-PCR-Messungen für mykorrhizaspezifische Markergene.** Dargestellt sind die LFCs von *Gi18s*, *GiActin* und *GiGlom* und *MtPt4*, gemessen in der qRT-PCR der AMS-Plattform über sechs Zeitpunkte. Signifikante Daten nach 21 Infektionstagen sind gekennzeichnet mit „x“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05 und „o“, falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war. Weitere signifikant veränderte Transkriptlevel liegen nach 15 Tagen für *GiActin* und *Gi18s*, und nach sechs Tagen für *GiGlom* vor.

#### 4.2.2. Untersuchung der Veränderung der Transkription AM-spezifischer TFs in einem Zeitverlaufsexperiment

Von den zehn für die AMS-Plattform ausgewählten TFs konnte die AMS-Regulierung für acht TFs in dem Zeitverlaufsexperiment zum Zeitpunkt 21 dpi bestätigt werden (Abb. 21). Zu früheren Zeitpunkten konnten nur zwei TFs als signifikant reguliert gemessen werden. Dies ist *MtSF*, dessen Transkriptmenge jedoch im Gegensatz zu den Werten nach 21 Tagen, nach drei Tagen in myk<sup>+</sup>-Wurzeln geringer war als in den Kontrollen.

Daneben ist die Transkription von *MtFTO* bereits nach 15 Tagen signifikant reguliert. Zwei der acht Topkandidaten gehören zu der Familie der AP2/EREBP-ähnlichen TFs (*MtOFTN*, *MtNTS*). Zwei weitere der TF-Kandidaten sind der Familie der Zink-Finger ähnlichen (CCHC-(Zn)) zuzuordnen. Die restlichen vier verteilen sich auf die TF-Familien bHLH, CCAAT, HD-like und MADS (Tab. 26).



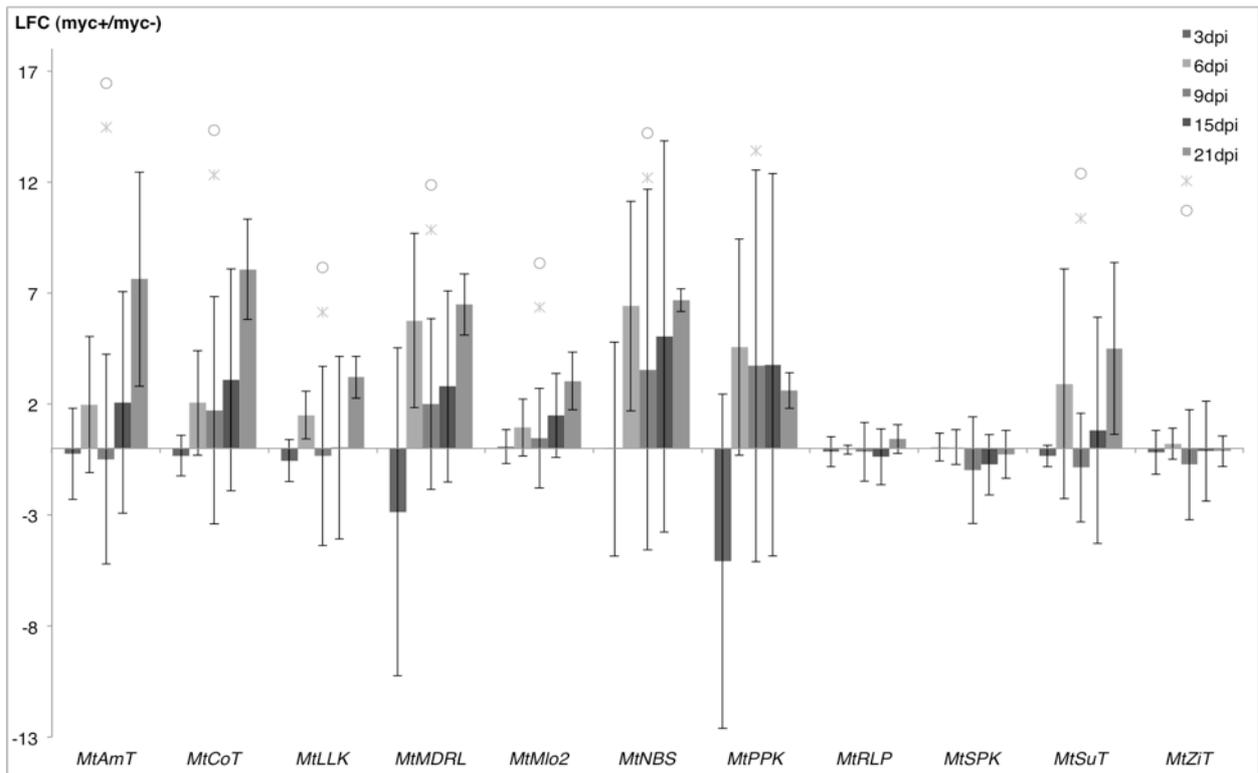
**Abb. 21: Transkriptraten der AMS-regulierten TF-Topkandidaten im Zeitverlauf.** Dargestellt sind mit qRT-PCRs gemessenen Mittelwerte (im Zweierlogarithmus) der Transkription (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln) aus drei (3 dpi - 15 dpi) und sechs Replikaten (21 dpi). Die Kandidaten entstammen der TF-Profilierung-Plattform. Auf der „x-Achse“ ist die Veränderung der Expressionsrate in mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu den nicht kolonisierten Wurzeln im Zweierlogarithmus aufgetragen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

#### 4.2.3. Untersuchung des Transkriptionsverlaufes AM-spezifischer Gene

Auf der AMS-Plattform befinden sich Oligonukleotidpaare für die Messung der Transkripte von Genen, die für Transporter-, Signalproteine und für Proteine mit unterschiedlichen und auch teilweise unbekannt Funktionen kodieren. Diese sollten auf ihre AMS-spezifische Transkription hin bestätigt und durch die parallele Messung an verschiedenen Zeitpunkten mögliche Koregulationen entdeckt werden. Die Informationen über diese Gene entstammen größtenteils aus Frenzel *et al.* (2005; Gene die für Signalproteine, Transporterproteine, Lektine und unbekannte Proteine kodieren), die

restlichen Gene entstammen unterschiedlichen Quellen (Tab. 23).

Für Gene, die für Transporter oder Signalproteine kodieren (Tab. 26), konnte die AMS-Spezifität bei acht der elf untersuchten Gene bestätigt werden (Abb. 22). Nach 21 Infektionstagen konnten *MtAmt*, *MtCoT*, *MtLLK*, *MtMDRL*, *MtMlo2*, *MtNBS*, *MtPPK* und *MtSuT* in mykorrhizierten Wurzeln im Vergleich zu nicht mit *G. intraradices* inokulierten Kontrollwurzeln als signifikant hochreguliert nachgewiesen werden.



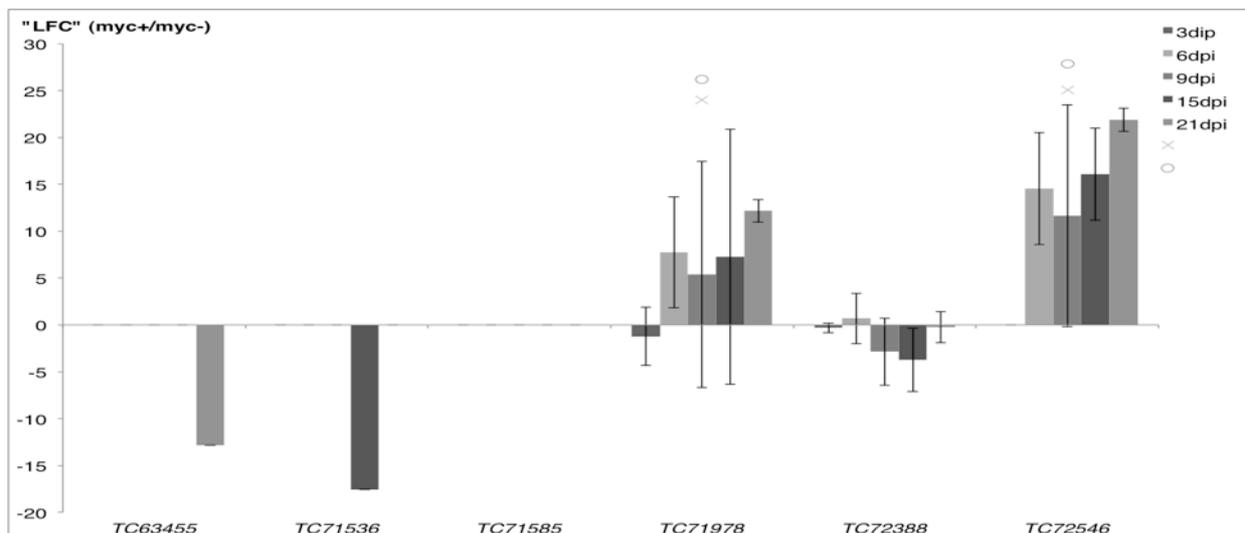
**Abb. 22: Transkription AMS-regulierter Gene aus Frenzel *et al.* (2005) im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkriptionsraten (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln; im Zweierlogarithmus) aus sechs Replikaten und zu fünf Zeitpunkten. Die Gene entstammen Frenzel *et al.* (2005). Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkriptionsrate in mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu den nicht kolonisierten Wurzeln dar. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. Die Symbole „\*“ und „o“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 Infektionstagen („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „o“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war).

Die Messungen nach sechs Infektionstagen ergaben eine signifikante Erhöhung der Transkriptmenge bei *MtMDRL*, *MtNBS* und *MtPPK*. Die Signifikanz zeigt sich sowohl durch einen t-Test, als auch durch das in dieser Arbeit zusätzlich angewandten Kriterium, dass in 80 % der Replikate eine vierfache Erhöhung der Transkriptmenge vorlag. Weitere signifikante Veränderungen der Transkription konnten nicht nachgewiesen werden.

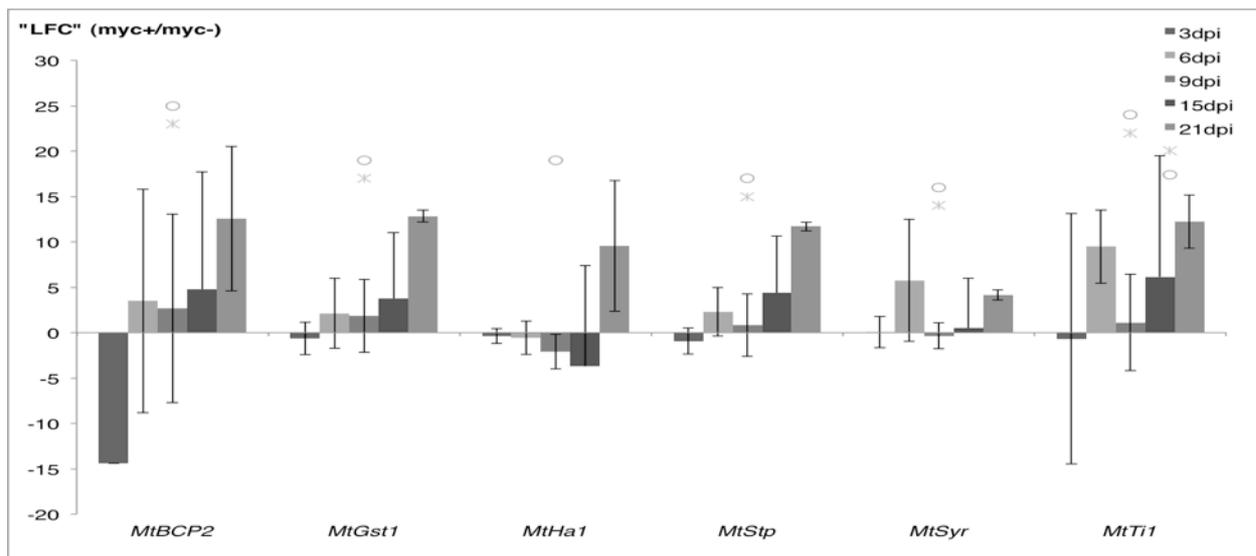
Für die beiden Transkripte *TC71978* und *TC72546* konnte nach 21 Tagen eine signifikante Erhöhung des Transkriptionslevels in Wurzeln die mit *G. intraradices* kolonisiert waren, gemessen werden (Abb. 23; „\*“ und „o“). Zusätzlich war die Transkriptmenge

von *TC71978* nach sechs Infektionstagen und bei *TC72546* nach 15 Infektionstagen signifikant erhöht. Die Transkripte der restlichen TCs konnten entweder nicht detektiert werden (*TC63455*, *TC71585*, *TC72536*) oder wurden als nicht signifikant reguliert detektiert (*TC72388*; Abb. 23).

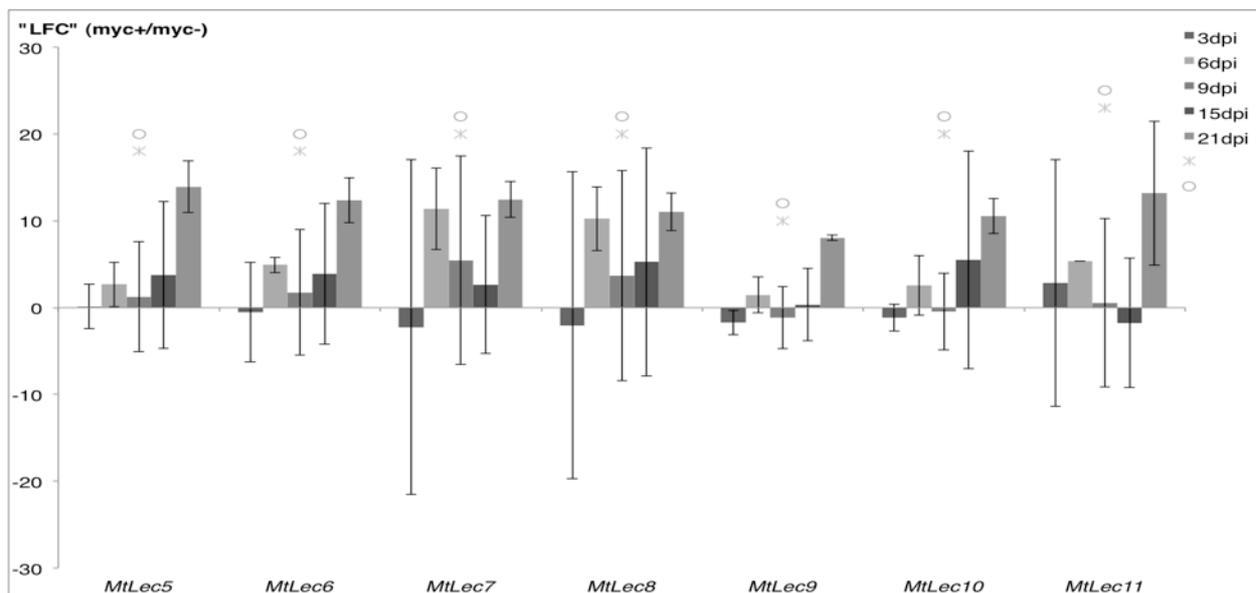
Die qRT-PCR-Messungen weiterer AMS-regulierter Gene mit unterschiedlichen Motiven in ihrer Proteinstruktur (*MtBCP2*, *MtGst1*, *MtHa1*, *MtStp*, *MtSyr*, *MtTi1*) ergaben erst nach 21 Infektionstagen signifikante Unterschiede. Die Transkriptmengen waren zu diesem Zeitpunkt signifikant erhöht (Abb. 24; dargestellt durch „\*“ und „○“). Die gemessenen Transkriptmengen der Lektine (Abb. 25; „\*“ und „○“) ergaben, dass diese nach 21 Tagen in „myk<sup>+</sup>“-Wurzeln signifikant erhöht sind. Zusätzlich sind *MtLec6*, *MtLec7* und *MtLec8* auch nach sechs Tagen signifikant reguliert. Für die weiteren Messungen ergaben sich keine signifikanten Werte.



**Abb. 23: Transkriptraten AMS-regulierter Gene mit unbekannter Funktion im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkriptionsraten (Induzierung in myk(+)-Wurzeln; LFC) aus drei Replikaten und fünf Zeitpunkten. Die Gene entstammen Frenzel *et al.* (2005). Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkriptionsrate in den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten dar. Die Fehlerbalken stehen für die Standardabweichung. „\*“ und „○“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 dpi („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „○“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 dpi in 80 % der Replikate um das 4-fache erhöht war).



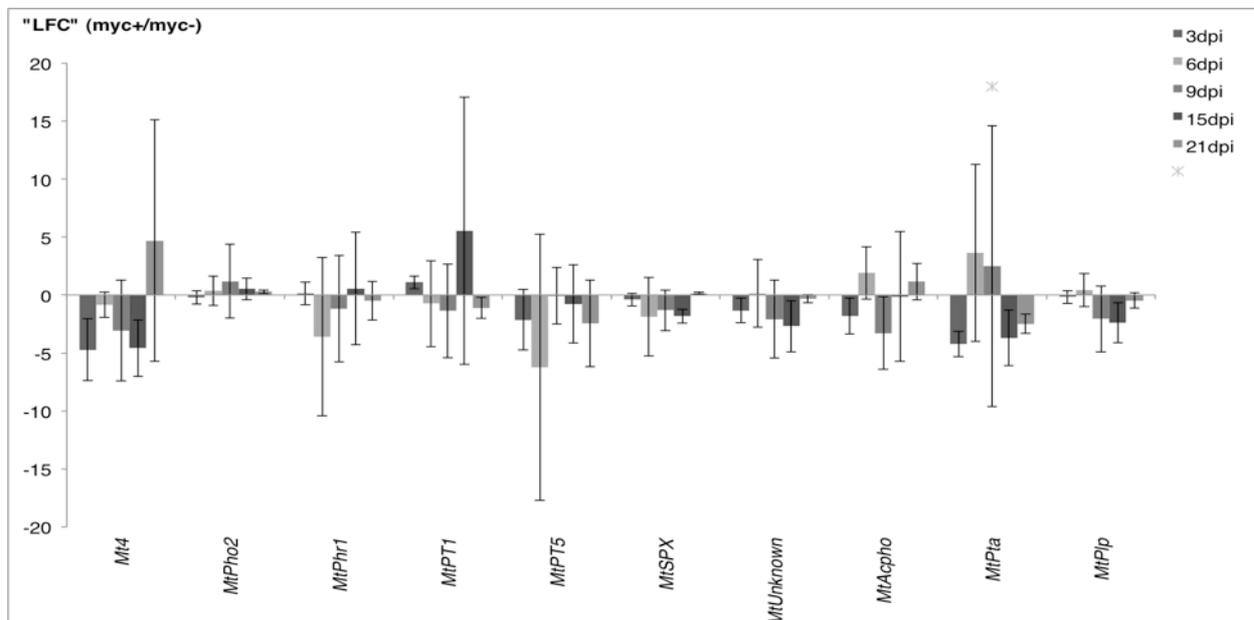
**Abb. 24: Veränderung der Transkriptmengen für AM-regulierte Gene aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkriptionsraten (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln; LFC) aus drei Replikaten und an fünf verschiedenen Zeitpunkten. Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkriptionsrate in den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Symbole „\*“ und „o“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 Infektionstagen („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „o“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war)



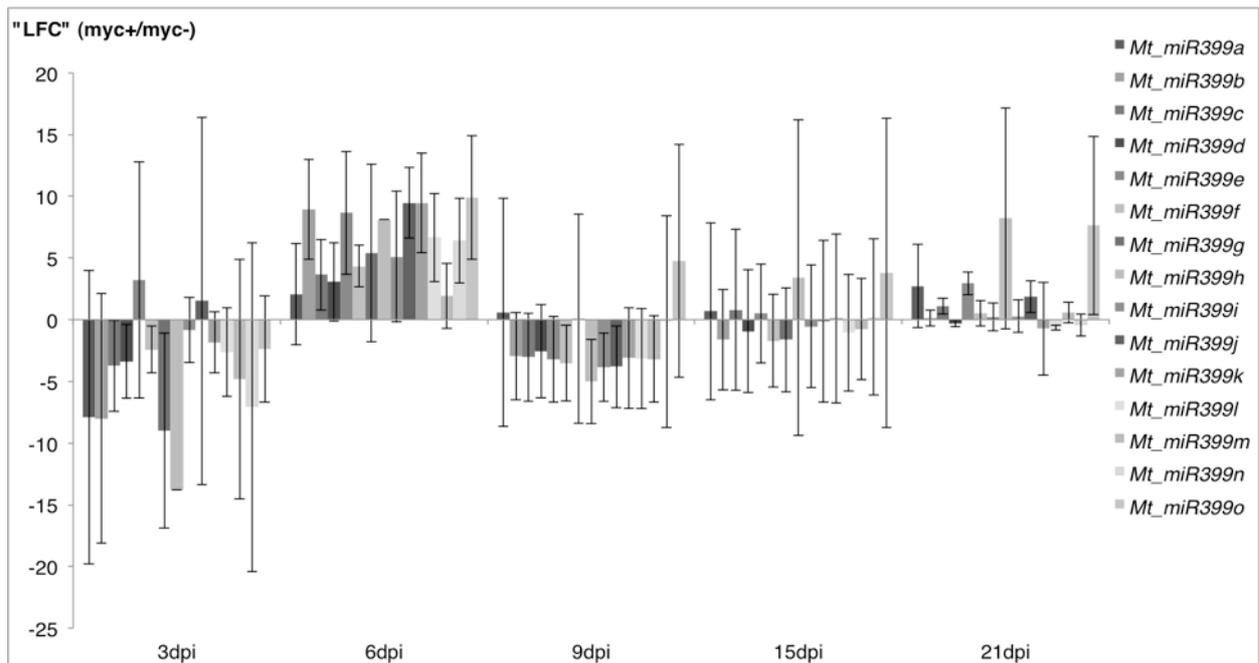
**Abb. 25: Veränderung der Transkriptmengen für AMS-regulierte Lektine im Zeitverlauf.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkription (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln; LFC) aus drei Replikaten und an verschiedenen fünf Zeitpunkten. Die Gene entstammen Frenzel *et al.* (2005). Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkription in den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. „\*“ und „o“ kennzeichnen signifikante Werte nach 21 Infektionstagen („\*“ für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; „o“ - falls die Transkriptionsraten nach 21 Infektionstagen in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war).

#### 4.2.4. Untersuchung des zeitlichen Transkriptionsverlaufes von unter Phosphatmangel induzierter Gene in AM-kolonisierten Wurzeln

Zur Untersuchung der Transkriptraten von unter Phosphatmangelbedingungen in *M. truncatula* induzierten Genen zu verschiedenen Zeitpunkten während der AMS, wurden diese in die AMS-Plattform aufgenommen. Dabei waren die Transkriptmengen von *MtSPX* (15 dpi) und *MtPta* (21 dpi und 3 dpi) während der AMS signifikant verringert. Tendenziell ist das Level der Transkription der in die Signaltransduktion unter Phosphatmangel involvierten Gene während der AMS vergleichbar mit dem der nicht mykorrhizierten Wurzeln (Abb. 26). Die Messung der *Mt\_miRNA399*-Vorläufer, die in die Phosphatmangelsignalkette (Branscheid *et al.*, 2010) involviert sind, ergab nach sechs Tagen eine signifikante Veränderung der Transkription für fünf der gemessenen 15 miRNA-Vorläufer (*Mt\_miRNA399b*, *Mt\_miRNA399j-l*, *Mt\_miRNA399n*; Abb. 27). Die Transkriptmenge war im Falle dieser miRNAs in allen drei Replikaten in kolonisierten Wurzeln um das vierfache erhöht. Tendenziell ist die Transkriptmenge von allen gemessenen miRNA399-Vorläufern in mykorrhizierten Wurzeln nach sechs Tagen erhöht, während sie nach drei bzw. neun Infektionstagen eher verringert und von da an unverändert waren (Abb. 27). Als einzige miRNA zeigte der *miRNA399e*-Vorläufer eine signifikante Erhöhung des Transkriptlevels nach 21 Tagen.



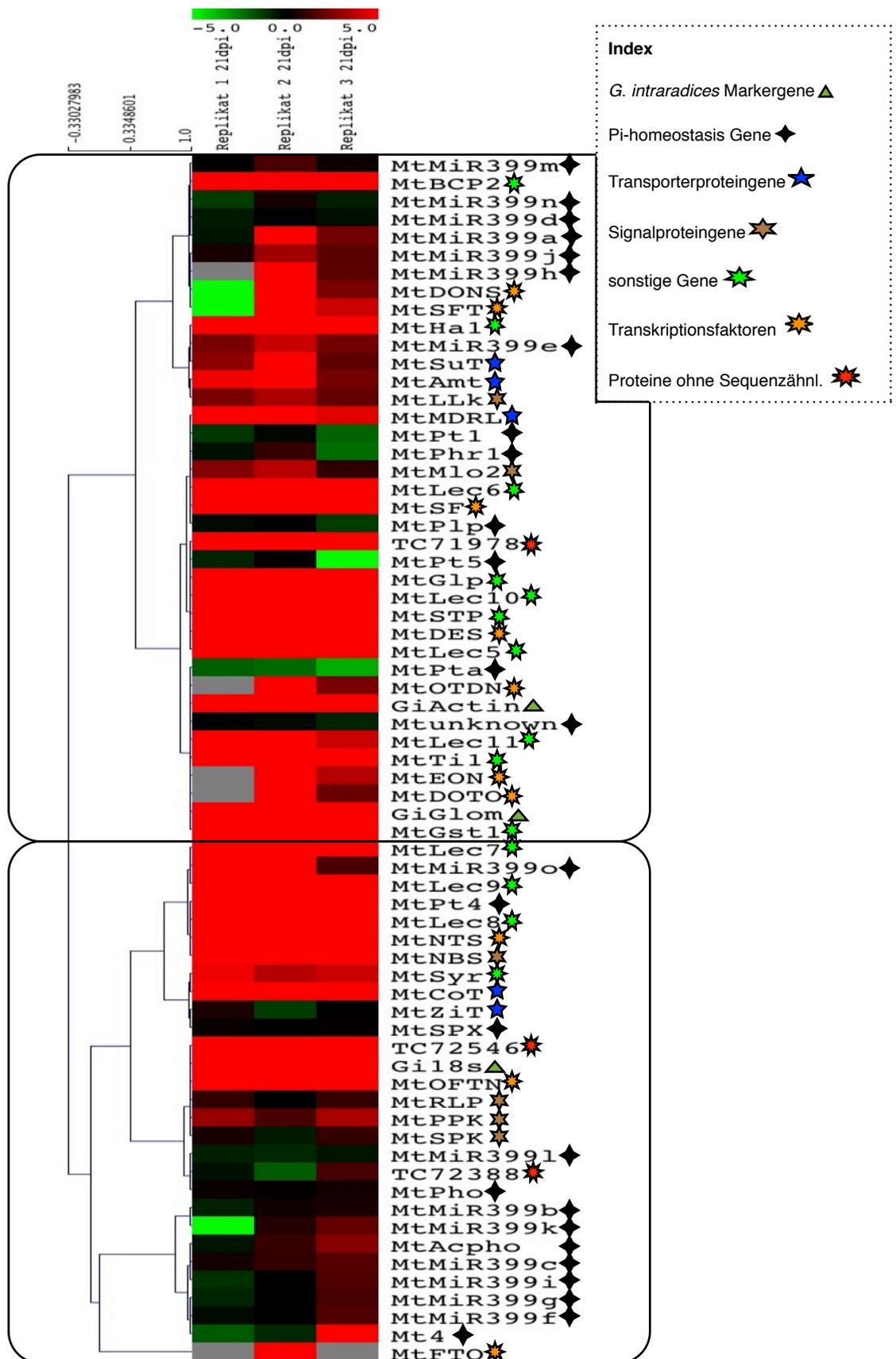
**Abb. 26: Veränderung der Transkriptmengen für Gene des Phosphatmangel-Signalweges aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.** Die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkription (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln; LFC) aus drei Replikaten und an fünf Zeitpunkten. Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkription in den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Symbole \*, \*' und , O ' stehen für signifikante Werte nach 21 dpi (\*, \*' für einen t-Test mit einem p-Wert < 0,05; , O -falls die Transkription nach 21 dpi in 80 % der Replikate um den Faktor vier erhöht war).



**Abb. 27: Mittelwerte der Erhöhung der Transkriptmenge für verschiedene Vorläufermoleküle der miRNA399-Gene aus der AMS-Plattform über fünf Zeitpunkte.** Dargestellt sind die Mittelwerte der mit qRT-PCR gemessenen Transkription (Induzierung in mykorrhizierten Wurzeln; LFC) aus drei Replikaten und an fünf Zeitpunkten. Die miRNA entstammen Branscheid *et al.* (2010). Die Werte der x-Achse stellen die Erhöhung der Transkription in den mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Wurzeln im Vergleich zu nicht kolonisierten dar. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

#### 4.2.5. Clusteranalyse der qRT-PCR 21 dpi AMS-Plattform-Transkriptionsdaten

Eine mit Hilfe einer Pearson-Korrelation durchgeführte Clusteranalyse der gemessenen Transkriptlevel, der mit der AMS-Plattform gemessenen Gene nach 21 Infektionstagen, zeigt keine großen Distanzunterschiede zwischen den Clustern, was sich durch zwei Hauptgruppen (Rahmen) an korrelierenden Genen zeigt (Schwellenwert der Distanz von 1,5; vergleiche Kapitel 4.4; Abb. 28).



**Abb. 28:** „Clustering“ der AMS-Plattform-Transkriptionsdaten nach 21 Infektionstagen. Das „Clustering“ wurde mit Hilfe einer Pearson-Korrelation durchgeführt. Die Farbwerte geben die LFCs (myk<sup>+</sup>/myk<sup>-</sup>) mit einem „*cutoff*“ bei  $\pm 5$  an. Es wurden nur die Daten nach 21 Tagen verwendet. Wendet man für die Gruppierung der Gene einen Schwellenwert der euklidischen Distanz von 1,5 an, so ergeben sich zwei große Gruppen ähnlich regulierter Genen (dargestellt durch die Rahmen). Die farbigen Symbole geben die Sortierung der Gene an (Vergl. Tab. 26).

### 4.3. Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter Gene

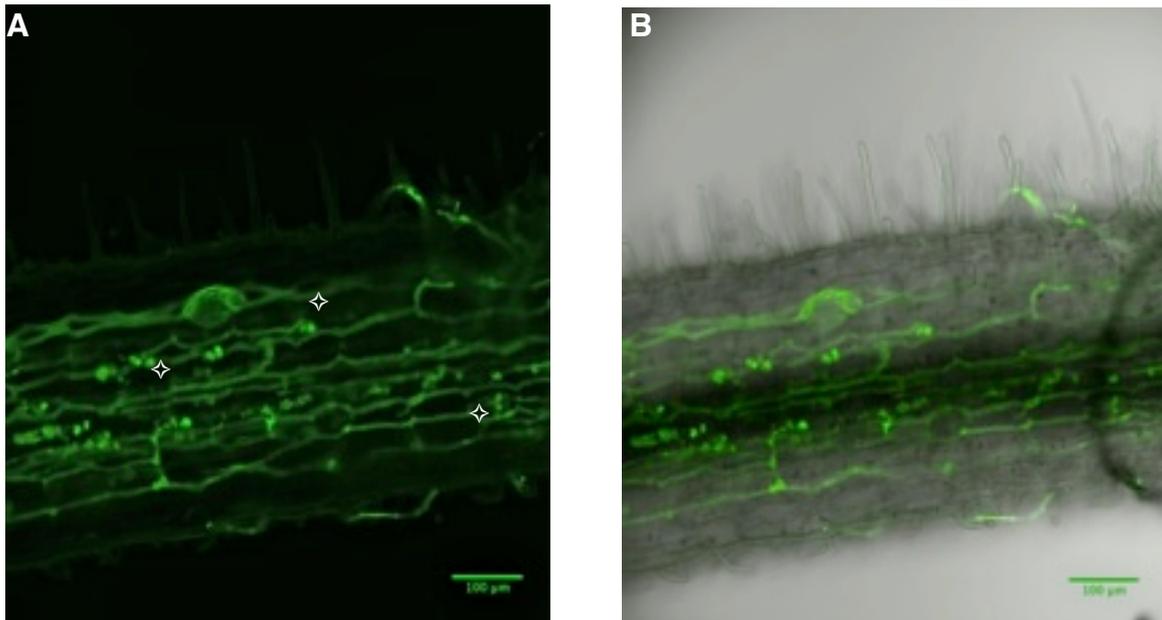
#### 4.3.1. Auswahl der Gene für *Promotor::CFP*-Fusionen und Herstellung der Wurzeltransformanden

Mit Hilfe der qRT-PCR-Untersuchungen konnten neue AMS-regulierte Gene in *M. truncatula* identifiziert werden. Die erhaltenen Transkriptionsdaten erlauben jedoch keine Rückschlüsse auf den spezifischen Zelltyp in dem die Gene transkribiert werden. Dies sollte durch Promotor-Reporter-gen-Fusionen erreicht, und so eventuelle Beschränkungen der Transkription auf bestimmte Zelltypen erkannt werden. Für die Studie wurden die TFs mit dem niedrigsten p-Wert ausgewählt (*MtDES*, *MtNTS*, *MtOFTN*, *MtSF*, Tab. 25). Zusätzlich wurden Promotoraktivitätsstudien für die zwei transporterähnlichen Gene *MtAmT* und *MtMDRL* und für das proteinkinaseähnliche Gen *MtPPK* durchgeführt (Tab. 26). Für *MtCoT* und *MtSuT* lagen zu jenem Zeitpunkt keine Sequenzinformationen für den Promotor vor.

Es wurde der Vektor pGWB443 verwendet (Nakawaga *et al.*, 2007). Dieser Vektor besitzt als Reporter eine CFP (cyan fluoreszierendes Protein)-Kassette. Es wurde jeweils ca. 1 kbp vor dem Startcodon des entsprechenden Genes als potentielle Promotorregion vor das CFP in den Vektor kloniert (*MtNTS\_Prom::CFP*, *MtDES\_Prom::CFP*, *MtNFST\_Prom::CFP*, *MtAmT\_Prom::CFP*, *MtMRDL\_Prom::CFP*, *MtPPK\_Prom::CFP*; Sequenzen siehe Anhang). Auf diese Weise konnte eine Promotoraktivität durch die CFP-Fluoreszenz innerhalb der mykorrhizierten Wurzel visualisiert werden. Als Kontrolle wurde der 35S-Promotor des CaMV vor das CFP des Vektors kloniert (*35S\_Prom::CFP*). Das CFP sollte damit in der Wurzel konstitutiv exprimiert werden. Eine weitere Kontrolle war ein 327bp-Fragment des „grün fluoreszierenden Proteins“ GFP (*GFPi*), das vor das CFP kloniert wurde (*GFPi::CFP*). Dieses Fragment sollte keinerlei Promotoraktivität zeigen und daher auch keine Fluoreszenz vermitteln.

Diese Konstrukte wurden über eine *A. rhizogenes* vermittelte Wurzeltransformation in *M. truncatula*-Wurzeln eingeführt. Im Gegensatz zu den Promotoraktivitätsstudien von *MtNTS*, *MtDES* und *MtOFTN*, die in *in vivo*-Topfkulturen durchgeführt wurden, wurden die Aktivitätsstudien von *MtAmT*, *MtMDRL* und *MtPPK* in *in vitro*-Wurzelkulturen durchgeführt. Die Arbuskeln sind in den Wurzelkulturen jedoch nicht gut entwickelt und daher schlechter zu erkennen als in den *in vivo*-Kulturen (Abb. 29). Die transgenen Wurzeln der mit *G. intraradices* inokulierten Pflanzen, wurden mit Hilfe eines konfokalen

Laser-Scanning-Mikroskopes (LSM) visuell untersucht. Es wurden Hellfeldaufnahmen (grau) durchgeführt und Aufnahmen der CFP-Fluoreszenz (Emission zwischen 480-500 nm). Zur Visualisierung von *G. intraradices*-Strukturen innerhalb der Wurzel wurden die Wurzel mit WGA-Alexa-Fluor® 594 angefärbt und die Fluoreszenz aufgenommen (Emission zwischen 610-630 nm). Die Abbildungen sind entweder Aufnahmen ganzer Wurzeln oder sie zeigen mit einem Vibratom durchgeführte Wurzelquerschnitte (100 µm Schichtdicke).



**Abb.29: Mit WGA-Alexa-Fluor® gefärbte mykorrhizierte *M. truncatula*-Wurzeln aus einer Wurzelkultur.** Mikroskopaufnahme einer mykorrhizierten Wurzel aus einer *in vitro*-Wurzelkultur. Die Wurzel wurde mit WGA-Alexa-Fluor®<sub>488</sub> gefärbt. Zu sehen sind die nicht voll entwickelten Arbuskeln (einige markiert mit „◇“), die den Großteil der in Wurzelkulturen zu findenden Arbuskeln ausmachen. In „A“ sind die *G. intraradices*-Strukturen zu sehen, „B“ ist ein Overlay aus „A“ und einer Hellfeldaufnahme des Wurzelfragments.

#### 4.3.2. *Prom::CFP*-Vektorkontrollen (*35S::CFP*; *GFPi::CFP*)

*Lokalisierung der Promotoraktivität der beiden Vektorkontrollen 35S::CFP\_Prom und GFPi::CFP\_Prom*

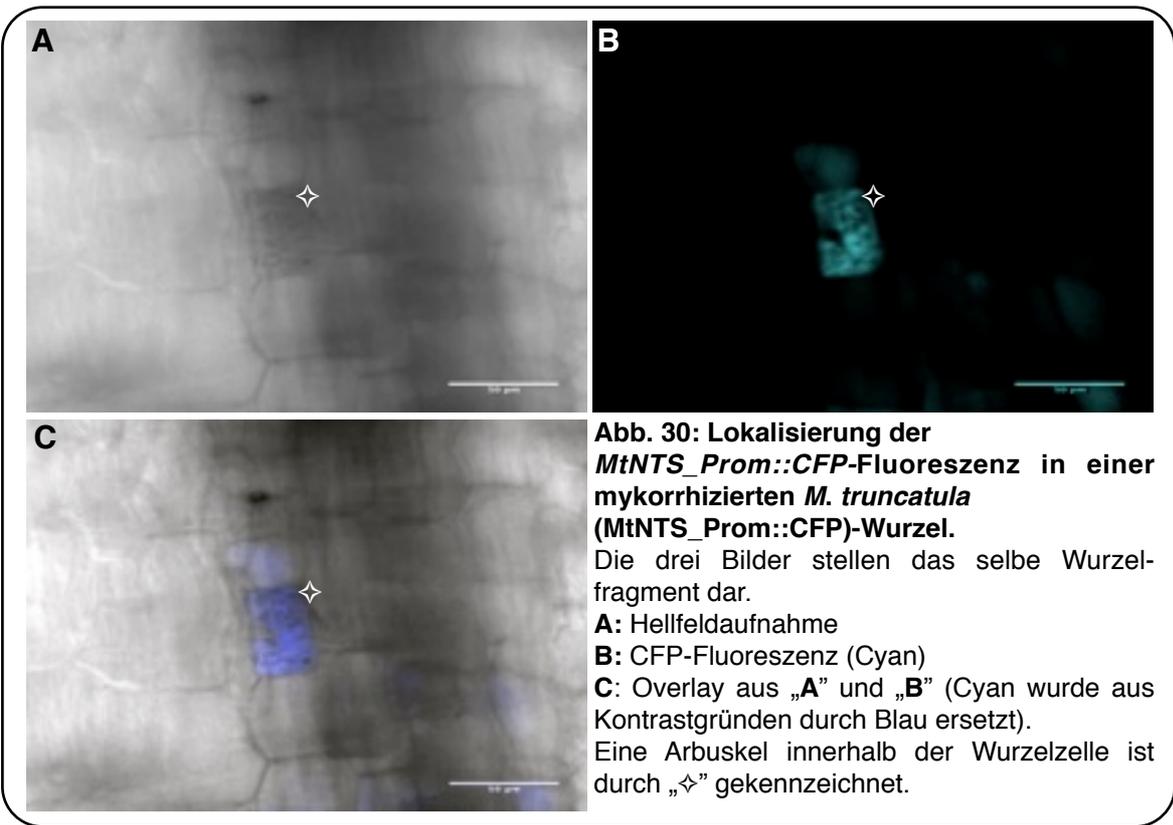
Um auszuschließen, dass die Promotorsignale durch den Vektor verursacht werden, wurde ein *35S::CFP*-Konstrukt als Vektorkontrolle gewählt. Als weitere Vektorkontrolle wurde ein Konstrukt aus einem kleinen Fragment aus der Gensequenz von *GFP* (*GFPi*) als Promotor gewählt. Dabei ist zu erwarten, dass keine Promotoraktivität vorliegt, und damit auch kein Promotorsignal. Die Wurzel mit dem *GFPi::CFP\_Prom* zeigte keinerlei

CFP-Signal (Daten nicht gezeigt). Damit kann ausgeschlossen, dass es sich im nachfolgenden um unspezifische Signale handelt. Die Wurzeln mit dem *35S::CFP\_Prom* Konstrukt zeigen wie erwartet ein CFP Signal in der gesamten Wurzel. (Daten nicht gezeigt).

#### **4.3.3. Promotor::*CFP*-Fusion der Transkriptionsfaktoren *MtNTS*, *MtDES*, *MtOFTN***

##### *Lokalisierung der Promotoraktivität von MtNTS*

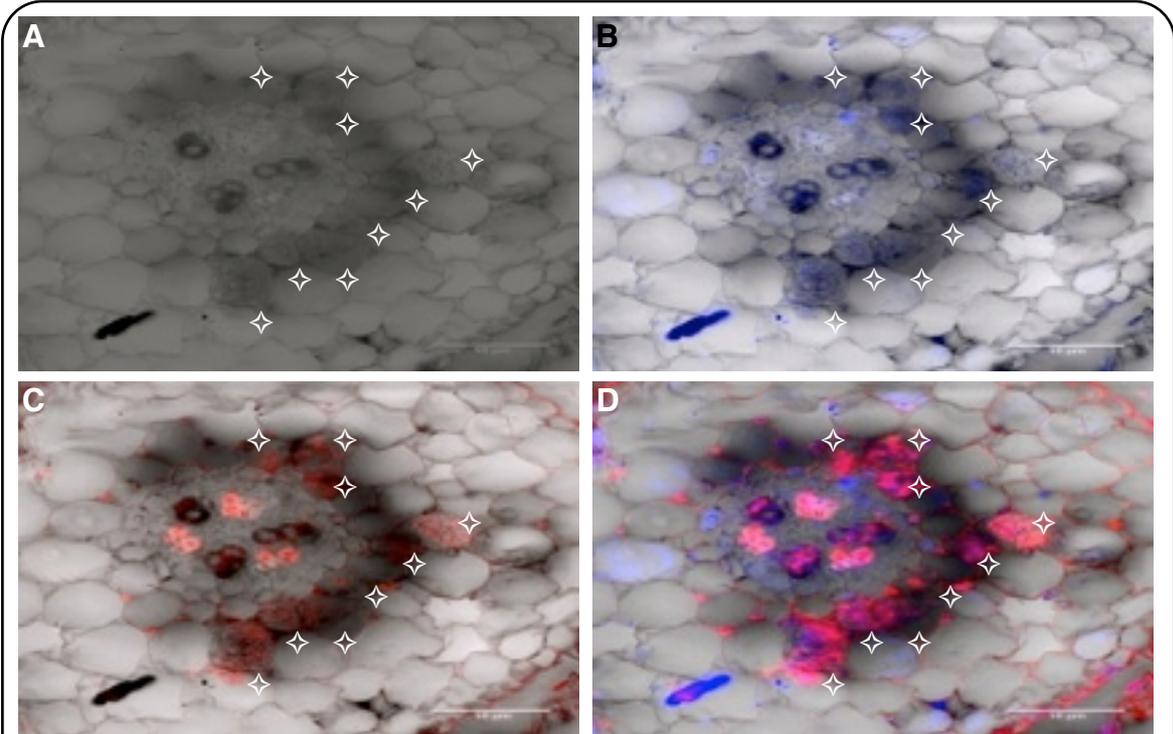
Durch mikroskopische Untersuchungen an *MtNTS\_Prom::CFP*-Wurzeln konnte die Promotoraktivität von *MtNTS* erkannt werden (Abb. 30 und 31). In den Hellfeldaufnahmen sind deutlich Arbuskeln zu erkennen (durch „ $\diamond$ “ gekennzeichnet). Gezeigt sind jeweils Hellfeldaufnahme sowie Overlays aus diesen und LSM-Scans (CFP Signal oder WGA-Alexa-Fluor<sup>®</sup> 594 Signal). In der Nahaufnahme einer Arbuskel kann die *MtNTS*-Promotoraktivität in und um diese Zelle erkannt werden (Abb. 30). Eine Aufnahme eines Wurzelquerschnitt mit mehreren Arbuskeln, die um den Zentralzylinder herum angeordnet sind zeigt eine starke Promotoraktivität in eben diesen arbuskelhaltigen Zellen (Abb. 31.B). Die AM-Strukturen wurden mit WGA-Alexa-Fluor WGA-Alexa-Fluor<sup>®</sup> 594 angefärbt und in einem separaten Kanal aufgenommen (Abb. 31.C; Darstellung als Overlay mit Hellfeldaufnahme). Die rot gefärbten Strukturen innerhalb der Zellen sind deckungsgleich mit den Arbuskeln. Durch ein Overlay aus allen Kanälen (Hellfeld, CFP, WGA-Alexa-Fluor<sup>®</sup> 594) konnte eine Kollokalisierung der arbuskelhaltigen Zellen und der Promotoraktivität erkannt werden (Abb. 31.D). Zusätzlich liegt eine schwache Aktivität dieses Promotors in den benachbarten Zellen vor (Abb. 30 und 31). Der Promotor ist daher in allen Zellen mit Arbuskeln aktiv, jedoch nicht nur ausschließlich in diesen. Er zeigt aber die größte Aktivität in den arbuskelhaltigen Zellen. Um des Weiteren eine Aktivität des WGA-Alexa594-Farbstoffes zwischen 480-500 nm auszuschließen, wurde eine Aufnahme gemacht, ohne das Wurzelfragment mit diesem zu färben. Das Promotorsignal ist deutlich zu sehen, wiederum am stärksten in arbuskelhaltigen Zellen und schwach in benachbarten Zellen (Daten nicht gezeigt). Das Fluoreszenz kommt also nicht von dem WGA-Alexa 594 Farbstoff, sondern durch die Aktivität des Promotors.



**Abb. 30: Lokalisierung der *MtNTS\_Prom::CFP*-Fluoreszenz in einer mykorrhizierten *M. truncatula* (*MtNTS\_Prom::CFP*)-Wurzel.**

Die drei Bilder stellen das selbe Wurzel-fragment dar.

- A:** Hellfeldaufnahme
  - B:** CFP-Fluoreszenz (Cyan)
  - C:** Overlay aus „A“ und „B“ (Cyan wurde aus Kontrastgründen durch Blau ersetzt).
- Eine Arbuskel innerhalb der Wurzelzelle ist durch „◇“ gekennzeichnet.

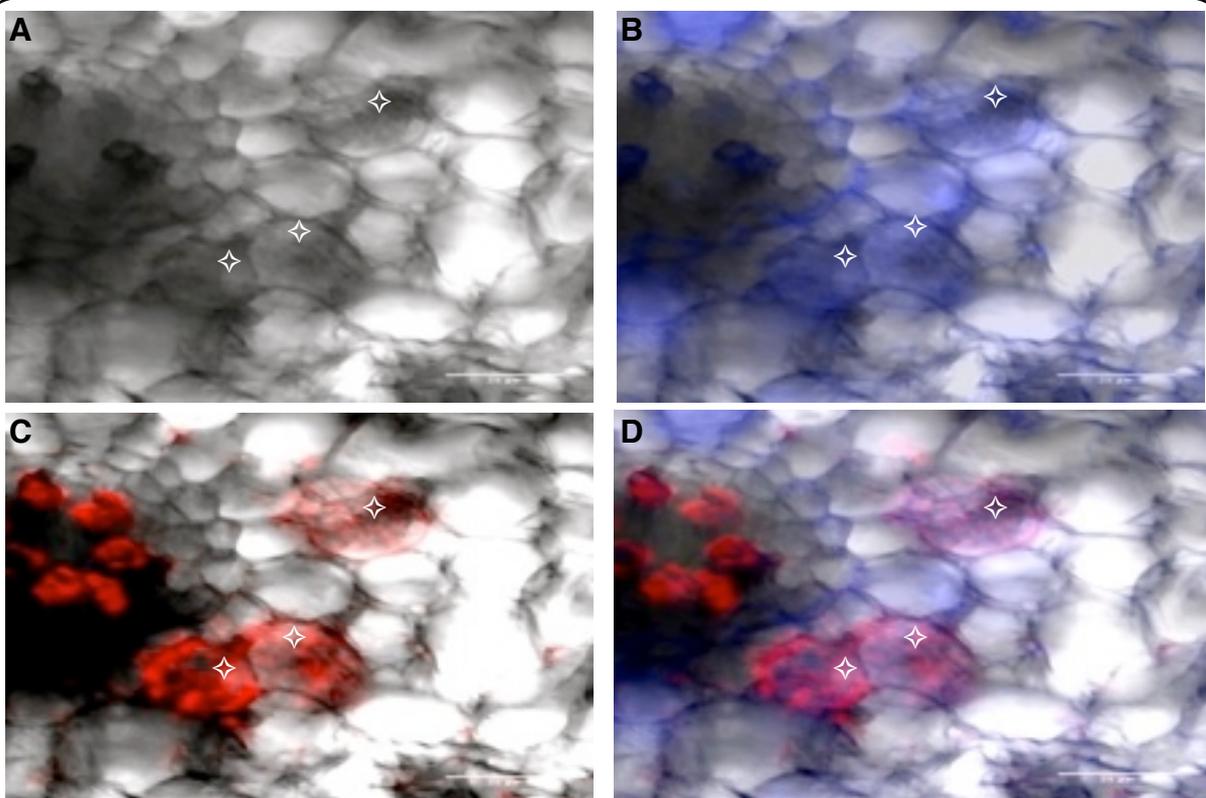


**Abb. 31: Lokalisierung der *MtNTS\_Prom::CFP*-Fluoreszenz im Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten *M. truncatula* (*MtNTS\_Prom::CFP*)-Wurzel.** Die drei Bilder stellen das selbe Wurzel-fragment dar. Arbuskeln innerhalb der Wurzelzellen sind durch „◇“ gekennzeichnet.

- A:** Hellfeldaufnahme.
- B:** Overlay aus „A“ und CFP-Fluoreszenz (Blau).
- C:** Overlay aus „A“ und WGA-Alexa-Fluor® 594-Fluoreszenz (Rot).
- D:** Overlay aus „A“, CFP-Fluoreszenz (Blau) und WGAlexa594 Fluor-Fluoreszenz (Rot).

### Lokalisierung der Promotoraktivität von *MtDES*

Die mikroskopischen Untersuchungen von *MtDES\_Prom::CFP*-Wurzeln deckten die Wurzelzellen auf in denen der Promotor von *MtNTS* aktiv ist (Abb.32). Die in den Hellfeldaufnahmen (Abb. 32.A) innerhalb der Zellen erkennbaren Strukturen sind Arbuskel, zusätzlich zu erkennen ist der Zentralzylinder. Die AM-Strukturen wurden mit WGA-Alexa-Fluor® 594 angefärbt (Abb. 32.C) und in allen Aufnahmen durch „✧“ gekennzeichnet. Anders als bei *MtNTS* ist der Promotor von *MtDES* in einzelnen, benachbarten Zellen ebenso aktiv wie in arbuskelhaltigen (Abb. 32.B). Dies kann deutlich durch ein Overlay aus allen drei Kanälen erkannt werden (Abb. 32.D). Der Promotor ist also in allen Zellen aktiv die durch WGA-Alexa-Fluor® 594 gefärbt sind, jedoch nicht ausschließlich in diesen.



**Abb. 32: Lokalisierung der *MtDES\_Prom::CFP*-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten *M. truncatula* (*MtDES\_Prom::CFP*)-Wurzel.** Die drei Bilder stellen das selbe Wurzelzellfragment dar. Arbuskeln innerhalb der Wurzelzellen sind durch „✧“ gekennzeichnet.

**A:** Hellfeldaufnahme.

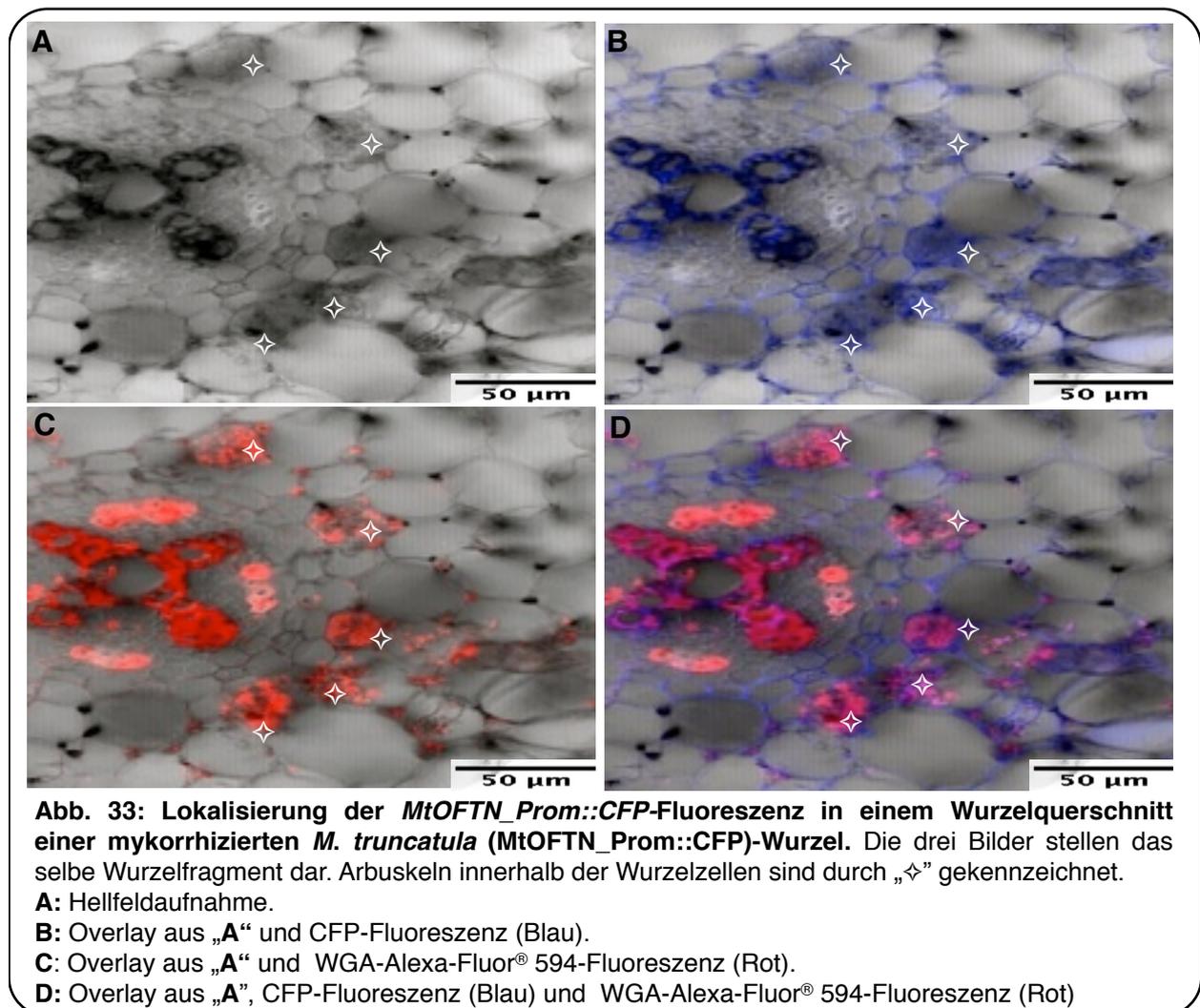
**B:** Overlay aus „A“ und CFP-Fluoreszenz (Blau).

**C:** Overlay aus „A“ und WGA-Alexa-Fluor® 594-Fluoreszenz (Rot).

**D:** Overlay aus „A“, CFP-Fluoreszenz (Blau) und WGA-Alexa-Fluor® 594-Fluoreszenz (Rot)

### Lokalisierung der Promotoraktivität von *MtOFTN*

Der Bereich der Promotoraktivität von *MtOFTN* konnte durch Untersuchung von *MtOFTN\_Prom::CFP*-Wurzeln erkannt werden (Abb. 33). In der Hellfeldaufnahme von kann eine Anzahl Arbuskeln erkannt werden (Abb. 33.A; ✧), diese wurden zusätzlich mit WGA-Alexa-Fluor® 594 angefärbt (Abb. 33.C). Die Aktivität des Promotors von *MtOFTN* (Abb. 33.B) ist auf die arbuskelhaltigen Zellen beschränkt (Abb. 33.D).

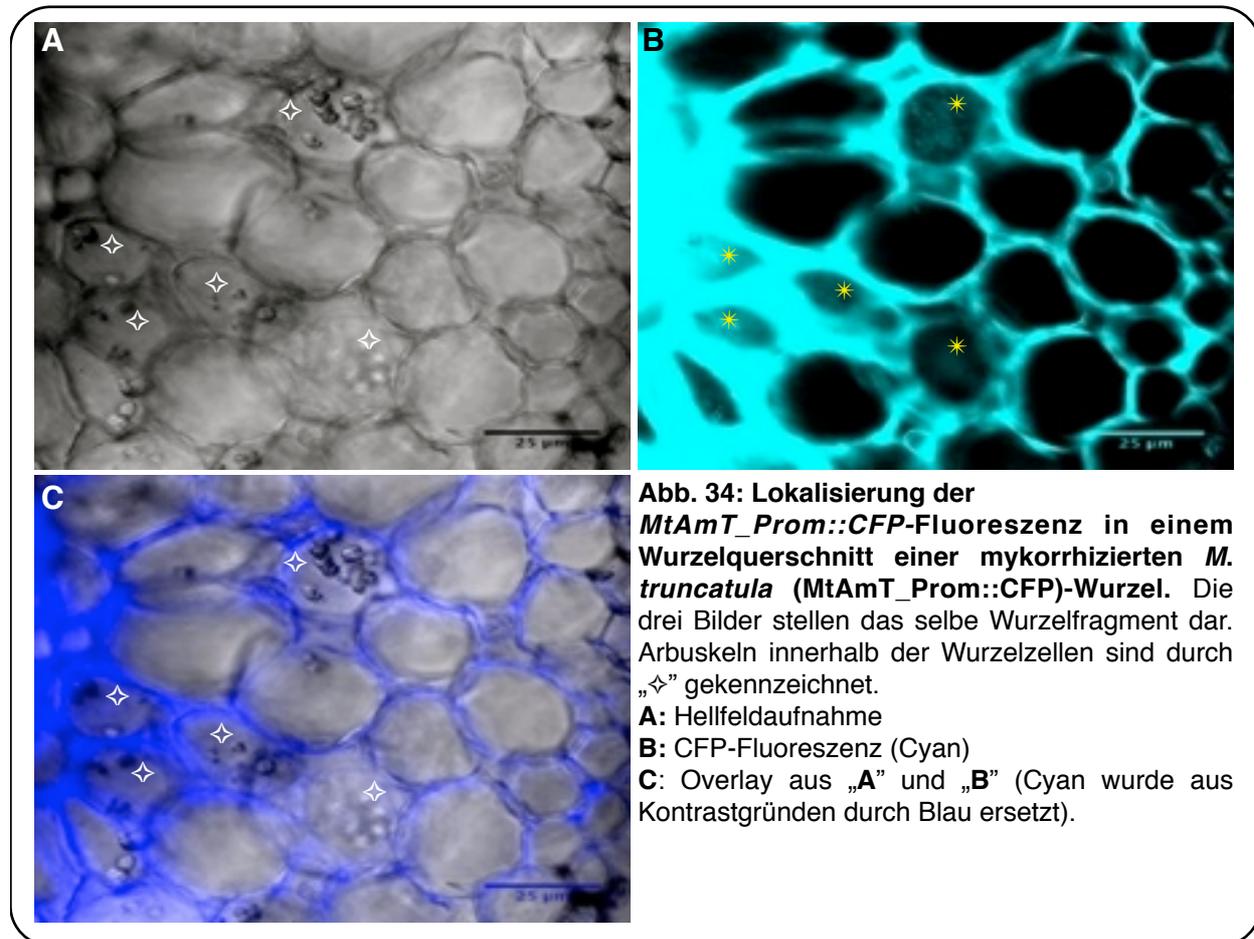


### 4.3.4. *Prom::CFP*-Fusion von *MtAmT*, *MtMDRL* und *MtPPK*

#### Lokalisierung der Promotoraktivität von *MtAmT*

Der Promotor von *MtAmT* ist ausschließlich in den fünf arbuskelhaltigen Zellen aktiv (Abb. 34). Die zu erkennenden Arbuskelstrukturen sind durch „✧“ gekennzeichnet (Abb. 34.A und 34.C). Es können einzelne Zellen mit einer Aktivität des Promotors

erkannt werden (Abb. 34.B; „\*“). Die Kolokalisierung innerhalb der Zellen mit den Arbuskeln ist durch ein Overlay aus Hellfeldaufnahmen und Aufnahmen des fluoreszenzmarkierten Promoters von *MtAmT* ersichtlich (Abb 34.C).

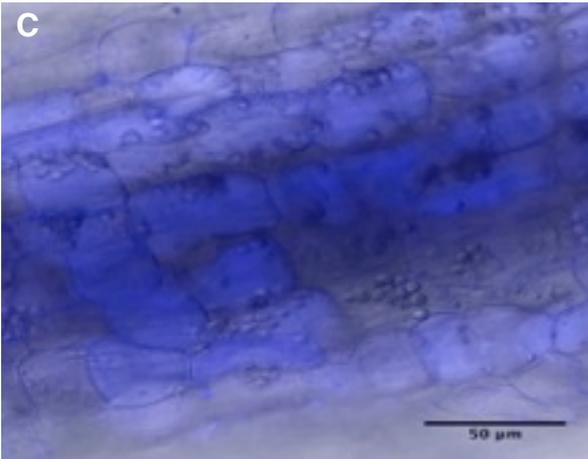
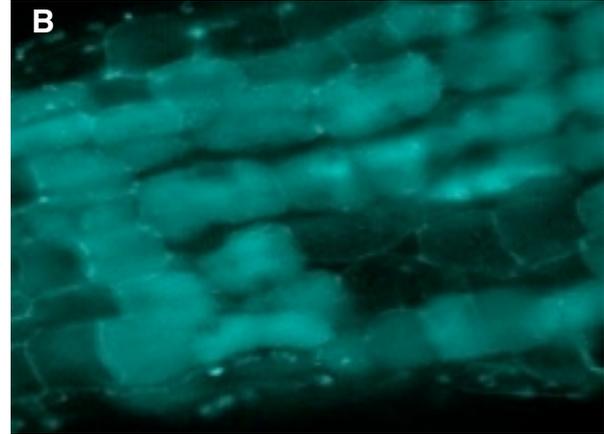
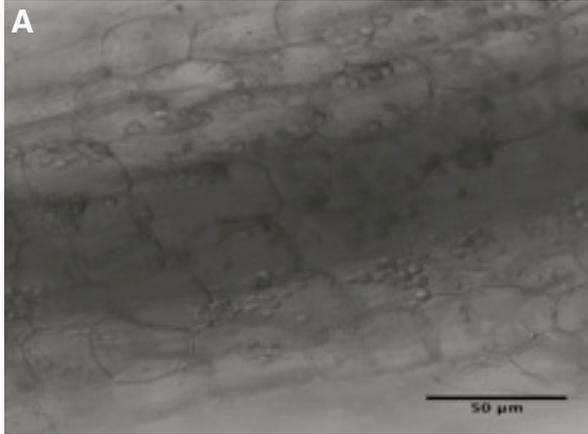


#### Lokalisierung der Promotoraktivität von *MtMDRL*

Die Aktivität des Promotors von *MtMDRL* ist nur schwer auf einen bestimmten Zelltyp festzulegen und scheint nicht auf eine bestimmte Zellart beschränkt (Abb. 35). AM-Strukturen sind nur schwer zu erkennen und das Signal des CFPs, hervorgerufen durch die Aktivität des *MtMDRL*-Promotors, ist in nahezu allen Zellen detektierbar (Abb. 35.B). Die Zellen mit den aktiven Promotoren sind jedoch immer benachbart (Abb. 35.C).

#### Lokalisierung der Promotoraktivität von *MtPPK*

Die Aktivität des Promotors von *MtPPK* ist auf die arbuskelhaltigen Zellen beschränkt (Abb. 36). Arbuskeln sind durch „◇“ gekennzeichnet. Der Promotor von *MtPPK* ist jedoch nicht in allen arbuskelhaltigen Zellen aktiv, sondern nur in zwei der Zellen mit arbuskulären Strukturen (Abb. 36.B; „\*“).

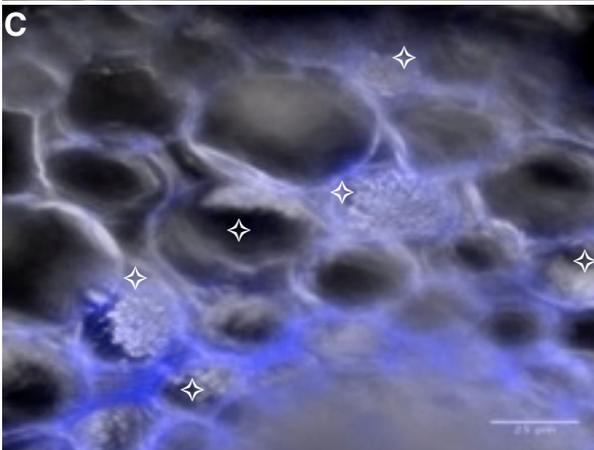
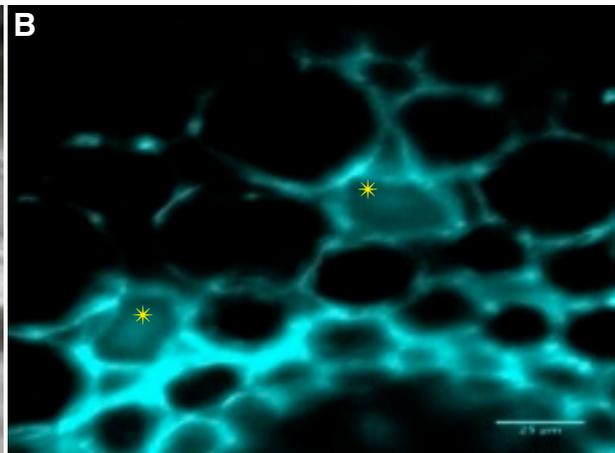
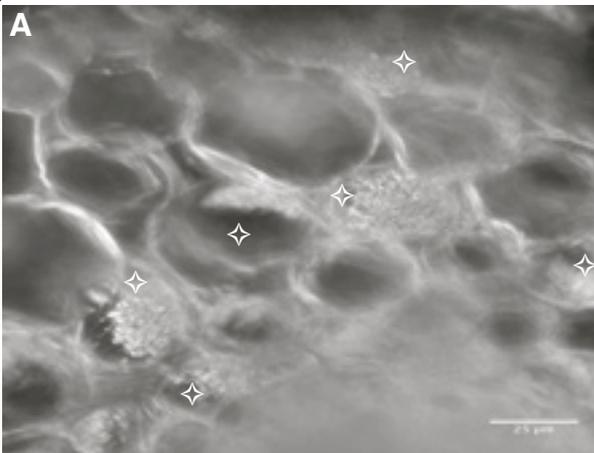


**Abb. 35: Lokalisierung der *MtMDRL\_Prom::CFP*-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten *M. truncatula* (*MtMDRL\_Prom::CFP*)-Wurzel.** Die drei Bilder stellen das selbe Wurzelfragment dar.

**A:** Hellfeldaufnahme

**B:** CFP-Fluoreszenz (Cyan)

**C:** Overlay aus „A“ und „B“ (Cyan wurde aus Kontrastgründen durch Blau ersetzt).



**Abb. 36: Lokalisierung der *MtPPK\_Prom::CFP*-Fluoreszenz in einem Wurzelquerschnitt einer mykorrhizierten *M. truncatula* (*MtPPK\_Prom::CFP*)-Wurzeln.** Die drei Bilder stellen das selbe Wurzelfragment dar. Arbuskeln innerhalb der Wurzelzellen sind durch „◊“ gekennzeichnet.

**A:** Hellfeldaufnahme

**B:** CFP-Fluoreszenz (Cyan);

**C:** Overlay aus „A“ und „B“ (Cyan wurde aus Kontrastgründen durch Blau ersetzt).

## 4.4. „Silencing“ von AMS-regulierten Genen mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi)

### 4.4.1. Identifizierung der mRNA-Sequenz und Klonierung der RNAi-Konstrukte ausgewählter Kandidatengene

Die Transkriptionsanalyse mykorrhizierter *M. truncatula*-Wurzeln (Kapitel 4.1) führte zur Identifizierung von AM-Symbiose regulierten Genen. Ausgewählte Kandidatengene sollten daraufhin funktionell untersucht werden. Als Verfahren wurde die RNA-Interferenz gewählt. So sollte der Einfluss der Zielgene auf die Kolonisierung durch *G. intraradices* untersucht und die Veränderung im Transkriptom im Vergleich zu einer Vektorkontrolle erkannt werden. Dazu wurden sowohl die am stärksten regulierten TFs ausgewählt, für die in dieser Arbeit auch Promotorstudien (Kapitel 4.3) durchgeführt wurden (*MtNTS* und *MtDES*), als auch signifikant regulierte Gene aus Kapitel 4.2.3, deren Proteinsequenz auf eine Funktion als Transporter hinweist (*MtCoT* und *MtSuT*). Um die genannten Gene in *M. truncatula* zu reprimieren, wurde ein Gateway®-kompatibler RNAi-Vektor gewählt (pKDSR (I), Kryvoruchkov, MPIMP Golm, unveröffentlicht) verwendet. Um die Auswahl erfolgreicher Transformationsereignisse von nicht erfolgreichen zu vereinfachen, besitzt dieser Vektor in seiner T-DNA neben einer Kanamycin-Resistenz eine konstitutiv exprimierte „dsred“-Kassette. Diese steht unter der Kontrolle des aus *Arabidopsis thaliana* stammenden *UBQ10*-Promotors. Die RNAi-Kassette steht unter der Kontrolle eines 35S-Promotors (Abb. 6). Die mRNA- und CDS-Sequenzen der TFs stammen aus der UrMeLDB-Medicago-Genom-Datenbank. Für die Gene *MtCoT* und *MtSuT* lagen zu diesem Zeitpunkt, außer den kurzen TC-Sequenzen, keine weiteren Sequenzinformation vor (International Medicago Genome Annotation Group [IMGAG] Version 2.0 Genom). Um die mRNA-Sequenz inklusive der untranslatierten Bereiche (UTR) für diese Gene zu identifizieren, erfolgte eine Amplifizierung der cDNA-Enden (RACE) und deren anschließende Sequenzierung. Die Kenntnis der UTRs war wichtig, da diese Bereiche sehr spezifisch für jedes Gen sind und dadurch ein RNAi-Konstrukt, das nur diesen Bereich abdeckt, spezifischer ist. Für *MtCoT* und *MtSuT* konnte die RACE erfolgreich durchgeführt werden (Sequenzdaten, siehe Anhang). Die Ergebnisse aus der RACE von *MtCoT* und *MtSuT* konnten jedoch nicht mit genomischen Sequenzinformationen abgeglichen werden. Die Klonierung der RNAi-Konstrukte wurde erfolgreich für *MtDES*, *MtNTS*, *MtCoT*, *MtSuT* durchgeführt. Im Falle

von *MtNTS*, *MtCoT* und *MtSuT* war die Klonierung für den 5'-UTR-Bereich und den 3'-UTR-Bereich erfolgreich - für *MtDES* nur für den 3'-UTR-Bereich. Diese Konstrukte werden im folgenden *3'DES\_RNAi*, *3'NTS\_RNAi*, *5'NTS\_RNAi*, *3'CoT\_RNAi*, *5'CoT\_RNAi*, *3'SuT\_RNAi* und *5'SuT\_RNAi* genannt.

#### **4.4.2. RNAi *in vivo*- und *in vitro*-Kulturen zur Identifizierung möglicher RNAi-Effekte auf die AMS**

Die mittels *A. rhizogenes* transformierten Wurzeln wurden drei Wochen in einem mit *G. intraradices* inokuliertem Ton-Sand-Gemisch angezogen. Als Vektorkontrolle wurde ein Konstrukt mit einem 327 bp langen Sequenzbereich von *GFP* gewählt (im folgenden *GFPi\_RNAi*). *GFP* wurde gewählt, da keine *GFPi*-ähnliche Sequenz in *M. truncatula* vorkommt und es daher auch zu keinem RNAi-Effekt durch dieses Konstrukt kommen kann.

Nach 21 Tagen wurden die Pflanzen geerntet und nach transgenen Wurzeln durchmustert. Dieser Versuchsaufbau lieferte jedoch nur wenig Material. Eine statistisch abgesicherte Berechnung des Mykorrhizierungsgrades nach Trouvelot *et al.* (1986) oder eine molekulare Phänotypisierung konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund wurde zu einem *in vitro*-Ansatz gewechselt, der eine größere Menge Material aus genetisch identischen Transformationsereignissen lieferte. Hierfür wurden transgene Wurzeln auf M-Medium kultiviert. Nach zwei Wochen erfolgte die Inokulierung der Wurzelkulturen mit Sporen von *G. intraradices* und eine darauf folgende achtwöchige Kokultivierung. Die Wurzeln wurden für die Ernte aus der Phytigelmatrix gelöst und eine Hälfte des Wurzelmaterials für die RNA-Isolation weiterverwendet, die andere für die phänotypische Untersuchung.

Zur Untersuchung der Stärke des RNAi-Effektes in den verschiedenen Linien wurde die cDNA von acht *5'SuT\_RNAi*-Linien und von achtzehn *3'CoT\_RNAi*-Linien mittels qRT-PCR gemessen. Zu diesem Zweck wurden in den Messungen neben Oligonukleotiden die sowohl im RNAi-Konstrukt als auch im Zielgen binden, auch solche verwendet, die ausschließlich im Zielgen binden. Zusätzlich wurde der Grad der Mykorrhizierung der jeweiligen Linien anhand der Transkriptmenge des mykorrhizaspezifischen Phosphattransporters *MtPt4* bestimmt.

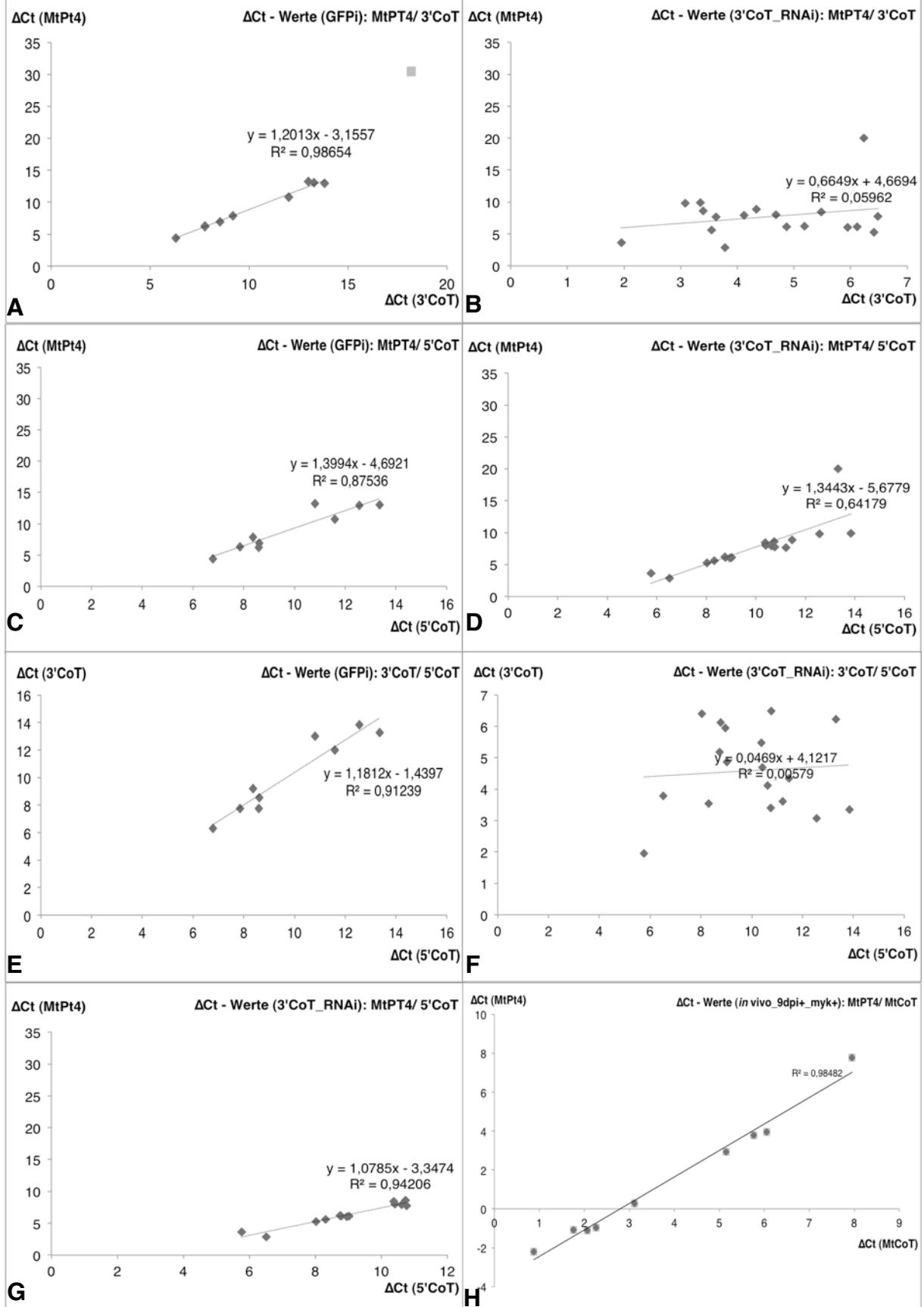
Eine lineare Korrelation zwischen den relativen Transkriptmengen von *3'CoT*/*5'CoT* bzw. *5'SuT*/*SuT* in den *GFPi\_RNAi*-Linien konnte erkannt werden (Abb. 37.E und 38.E). In den *3'CoT\_RNAi*-Linien ist keinerlei Korrelation mehr zwischen *3'CoT* und

5'CoT erkennbar (Abb. 37.F). Das bedeutet, dass die Transkription der beiden Bereiche, durch die Überexpression des RNAi-Konstruktes (3'CoT) und die gleichzeitige teilweise Reprimierung von *MtCoT* (5'CoT) in 3'CoT\_RNAi, voneinander unabhängig ist.

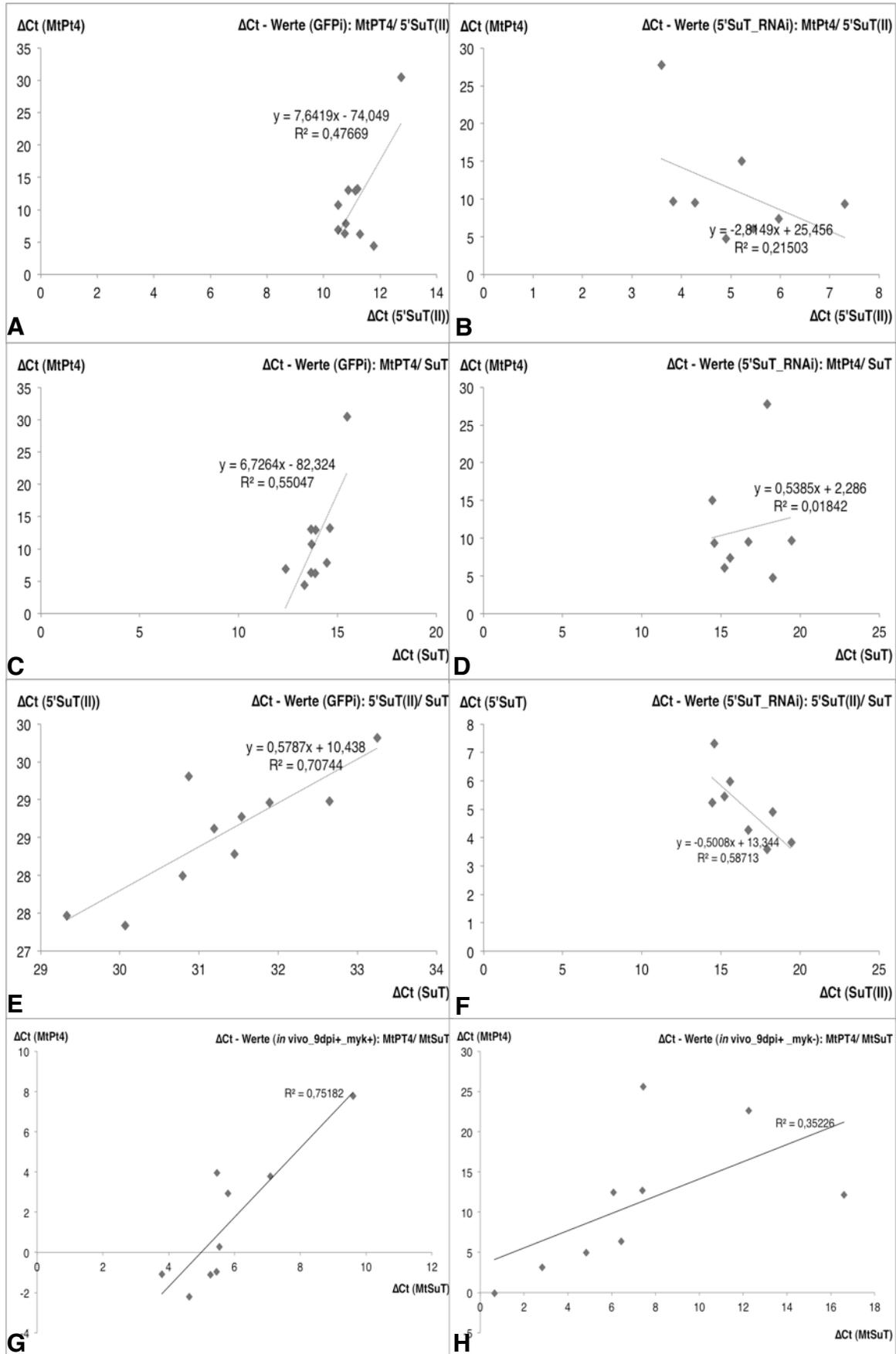
Eine negative lineare Korrelation der  $\Delta$ Ct-Werte der beiden Oligonukleotidpaare für *MtSuT* ist für die Linien von 5'SuT\_RNAi zu erkennen (Abb. 38.F). Das heißt, um so stärker das RNAi-Konstrukt exprimiert ist (5'SuT), desto geringer die Transkriptmenge von *MtSuT* selbst (SuT).

In der Vektorkontrolle GFPi\_RNAi korreliert die Transkription von *MtCoT* linear mit der des Markergens *MtPt4* (Abb. 37.A, 37.C). Das bedeutet, je stärker die Wurzelkultur mykorrhiziert ist, desto stärker wird dieser AMS-regulierte Kupfertransporter exprimiert. Werden die in den 3'CoT\_RNAi gemessenen  $\Delta$ Ct-Werte von 3'CoT und *MtPt4* (Abb. 37.B) und 5'CoT und *MtPt4* (Abb. 37.D; 37.G) gegeneinander aufgetragen, sieht man, dass es im Falle von 3'CoT/ *MtPt4* durch die Überexpression zu keinerlei Korrelation mehr kommt. Im Falle von 5'CoT/ *MtPt4* ist die Korrelation nicht mehr so stark (Abb. 37.D), dies lässt darauf schließen, dass in einigen Linien *MtCoT* reprimiert ist. Verwendet man für die Korrelation die Linien, in denen *MtCoT* wahrscheinlich durch RNAi reprimiert ist nicht mehr, so ist die selbe Korrelation wie in der GFPi-Vektorkontrolle oder im *in vivo*-Wildtyp (Abb. 37.H) zu erkennen (Abb. 37.G).

Für *MtSuT* liegt keine so deutliche lineare Korrelation vor. Zur Überprüfung der Korrelation wurden auch Werte aus der *in vivo*-Kultivierung von *M. truncatula* zusammen mit *G. intraradices* verwendet. Die Werte entstammen dem Zeitverlaufsexperiment mit der AMS-Plattform (Kapitel 4.2.3). Verwendet wurden die  $\Delta$ Ct-Werte der Messzeitpunkte 9, 15 und 21 dpi, jeweils in drei Replikaten. In diesen Werten ist eine deutliche lineare Korrelation zu erkennen (Abb. 38.G;  $R^2$ -Wert von 0,75). In nicht mykorrhizierten Wurzeln kommt es nicht zu dieser Korrelation (Abb. 38.H;  $R^2$ -Wert von 0,35). Auch in den 5'SuT\_RNAi-Linien kommt es in keiner Weise mehr zu einer linearen Korrelation (Abb. 38.B; 38.D).

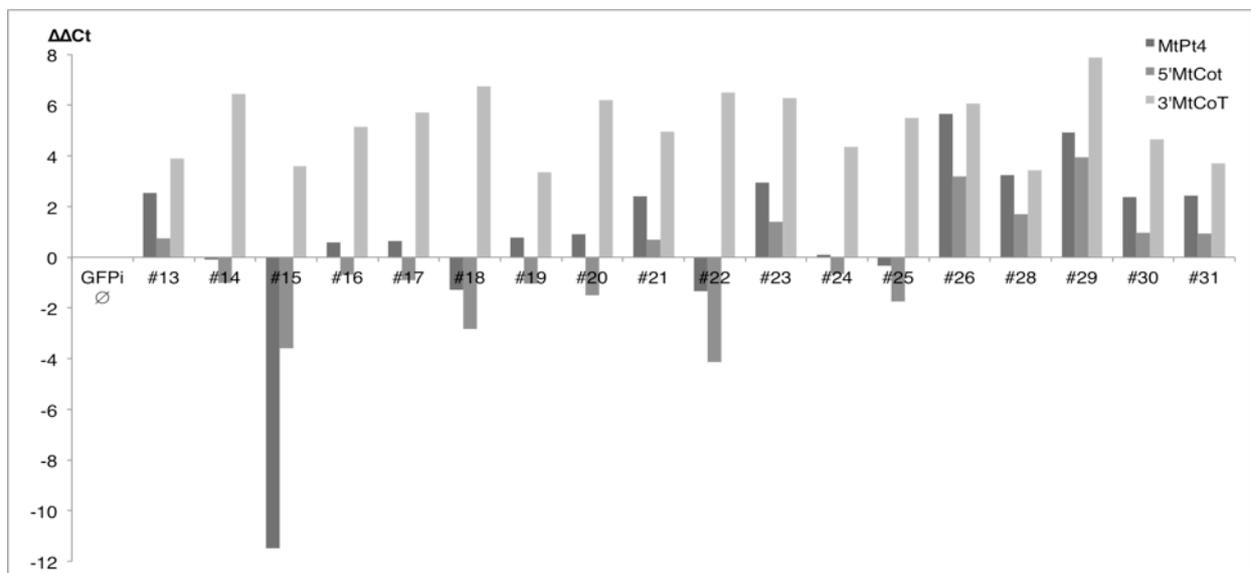


**Abb. 37: Korrelationen der  $\Delta\text{Ct}$ -Werten (3'CoT\_RNAi):** Korrelationen von  $\Delta\text{Ct}$ -Werten (GFPi\_RNAi (A, C und E) und 3'CoT\_RNAi (B, D und F)). Dargestellt sind MtPt4 gegen 3'CoT (A und B) bzw. 5'CoT (C und D) und 3'CoT gegen 5'CoT (E und F). G stellt ist die Korrelation zwischen den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten von 5'CoT gegen MtPt4 dar, ohne die fünf Linien in denen die RNAi erfolgreich war. H stellt die Korrelation zwischen MtPt4/MtCoT mit den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten aus Kapitel 4.2.3 (*in vivo*-Kulturen; ab 9 dpi) dar.



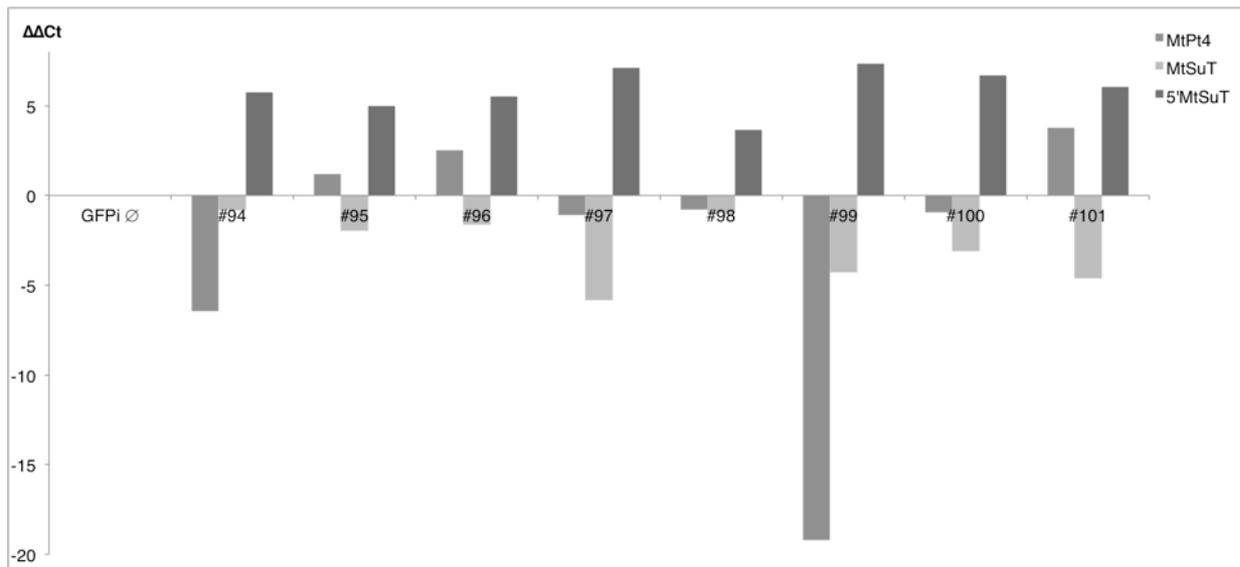
**Abb. 38: Korrelationen der  $\Delta\text{Ct}$ -Werten (5'SuT\_RNAi):** Korrelationen von  $\Delta\text{Ct}$ -Werten (GFPi\_RNAi (A, C und E) und 5'SuT\_RNAi (B, D und F)) von MtPt4 mit 5'SuT (II) (A und B) bzw. SuT (C und D) und 5'SuT mit SuT (E und F). G (*myk+*) und H (*myk-*) stellt die Korrelation zwischen MtPt4/MtSuT mit den  $\Delta\text{Ct}$ -Werten aus Kapitel 4.2.3 (*in vivo*-Kulturen; ab 9 dpi) dar.

Um festzustellen in welchen RNAi-Linien die Transkriptmenge der zu reprimierenden Gene und auch um wie viel Prozent die Transkriptmenge abgenommen hat, wurde aus den  $\Delta\Delta Ct$ -Werten ( $\Delta Ct^{\text{Vektorkontrolle}} - \Delta Ct^{\text{RNAi}}$ ) die Veränderung der Transkriptmenge im Vergleich zu GFPi\_RNAi als Bezugswert berechnet (Abb. 39 und 40). Zu sehen ist, dass in den gemessenen Linien von 3'CoT\_RNAi (Abb. 39) bei mehreren Linien die Transkriptmenge von MtCoT vermindert war (#14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #22, #24, #25). Für die weiteren Messungen wurden nur die fünf Linien verwendet bei denen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte größer als eins waren (#15, #18, #20, #22, #25). Im Falle von 5'SuT\_RNAi war *MtSuT* in allen Linien reprimiert (#94, #95, #96, #97, #98, #100, #101; Abb. 40). Für weitere Messungen wurde auch die Linie #94 verwendet obwohl ihr  $\Delta\Delta Ct$ -Wert unter eins lag.



**Abb. 39: Transkriptionsveränderung in 3'CoT\_RNAi-Linien.** Darstellung der Veränderung der Transkription ( $\Delta\Delta Ct$ -Werte) in den 3'CoT\_RNAi-Linien (Transkripte gemessen mit den Oligonukleotidpaaren MtPt4, 5'MtCoT, 3'MtCoT) im Vergleich zu den  $\Delta Ct$ -Werte der GFPi-Kontrolle. Als Bezugsgröße für die  $\Delta Ct$ -Werte der 3'CoT\_RNAi-Linien wurden die mathematischen Mittel der  $\Delta Ct$ -Werte der jeweiligen Oligonukleotidpaare aus allen mykorrhizierten Linien von GFPi\_RNAi verwendet ( $\Delta Ct^{\text{GFPi}} - \Delta Ct^{\text{RNAi}}$ ). Positive Werte geben an, dass die jeweilige Transkription im Vergleich zur GFPi-Vektorkontrolle erhöht war. In jenen Linien in denen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte von 5'MtCoT im negativ waren, sofern jene von 3'MtCoT positiv waren, liegt wahrscheinlich ein RNAi-Effekt vor (#14, #15, #16, #17, #18, #19, #20, #22, #24, #25). Die y-Achse gibt die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte an.

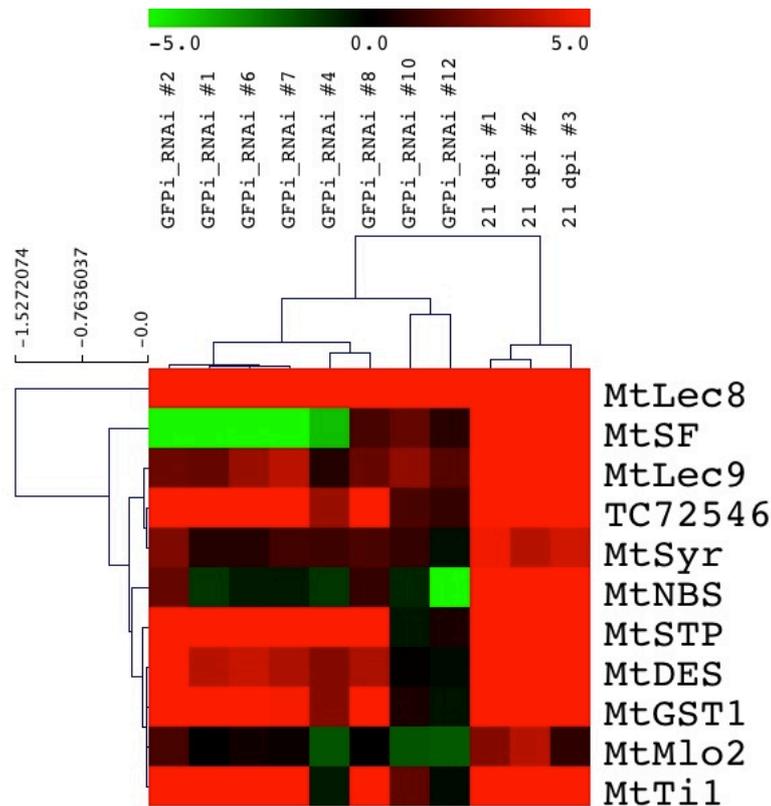
Zur weiteren Charakterisierung des molekularen Phänotyps wurden weitere RNAi-Messungen durchgeführt. Es wurden ausgewählte als signifikant reguliert gemessene Gene aus der AMS-Plattform (Kapitel 4.2) verwendet und dies neue Plattform wird im weiteren Verlauf als RNAi-Plattform bezeichnet. Zusätzlich wurden Oligonukleotide für AM-regulierte TFs aus Messungen von S. Bortfeld und J. Teply verwendet (*MtMyb*, *MtHistone*, *MtRemorin*, *MtZnF*, *MtERF2*, *MtUriKin*, *MtERF2*; nicht veröffentlicht). Zusätzlich wurden auch Oligonukleotide zur Bestimmung der Transkriptmenge von *MtNsp2* verwendet.



**Abb. 40: Transkriptionsveränderung in 5'SuT\_RNAi-Linien.** Darstellung der Veränderung der Transkription ( $\Delta\Delta Ct$ -Werte) in den 5'SuT\_RNAi-Linien (Transkripte gemessen mit den Oligonukleotidpaaren MtPt4, MtSuT, 5'MtSuT) im Vergleich zu den  $\Delta Ct$ -Werte der GFPi-Kontrolle. Als Bezugsgröße für die  $\Delta Ct$ -Werte der 5'SuT\_RNAi-Linien wurden die mathematischen Mittel der  $\Delta Ct$ -Werte der jeweiligen Oligo-nukleotidpaare aus allen mykorrhizierten Linien von GFPi\_RNAi verwendet ( $\Delta Ct^{GFPi} - \Delta Ct^{RNAi}$ ). Positive Werte geben an, dass die jeweilige Transkription im Vergleich zur GFPi-Vektorkontrolle erhöht war. In jenen Linien in denen die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte von MtSuT im negativ waren, sofern jene von 5'MtSuT positiv waren, liegt wahrscheinlich ein RNAi-Effekt vor (#94, #95, #96, #97, #98, #100, #101). Die y-Achse gibt die  $\Delta\Delta Ct$ -Werte an.

#### 4.4.3. Vergleich zwischen Transkriptionsdaten von *in vivo*-Topfkulturen und *in vitro*-Wurzelkulturen

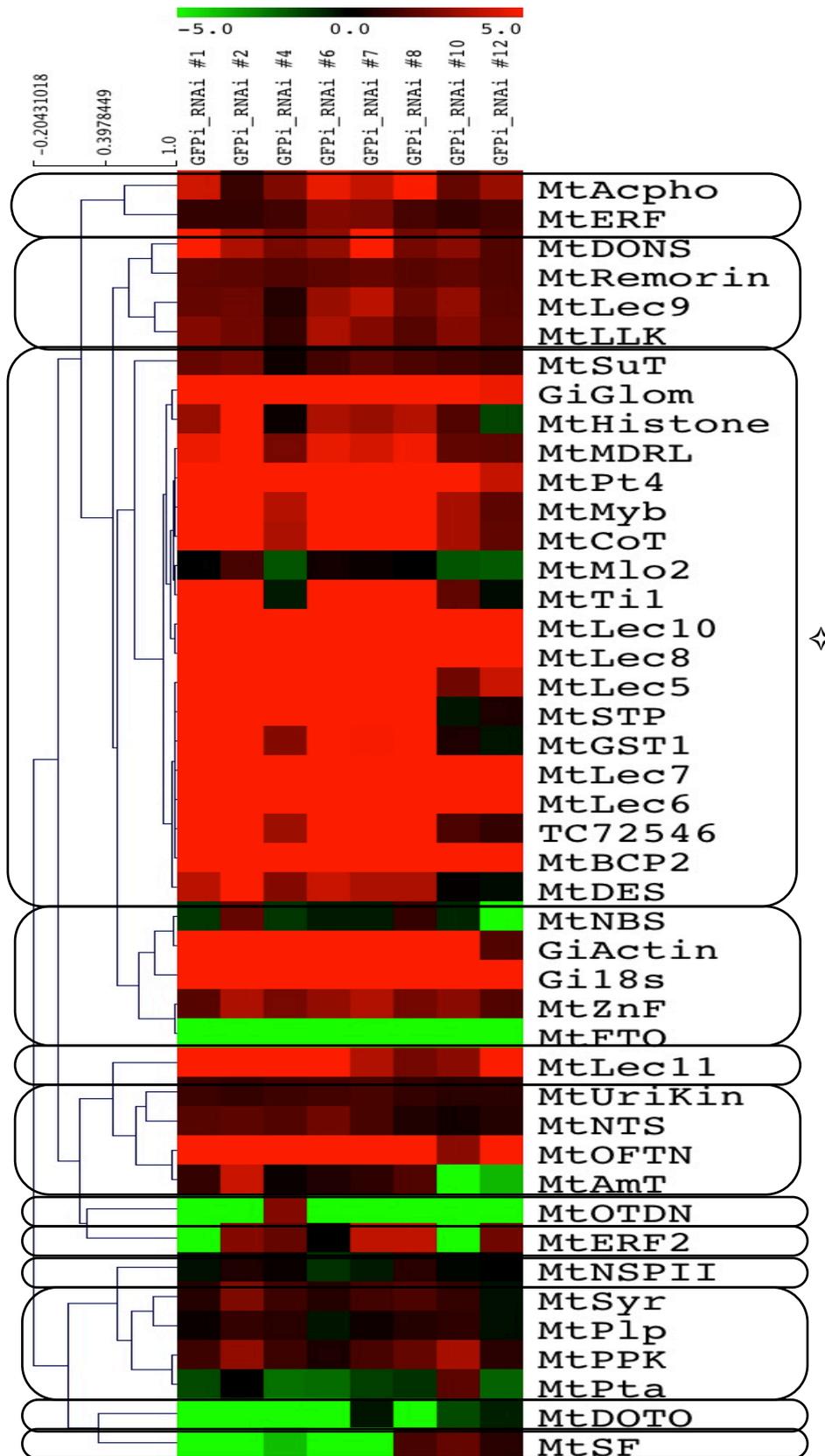
Um zu überprüfen ob die Transkriptionsmuster in mykorrhizierten Wurzelkulturen dem der *in vivo*-Kulturen entsprechen, wurden die LFCs (Zweierlogarithmus  $2^{-\Delta Ct(myk+)} / 2^{-\Delta Ct(myk-)}$ ) der GFPi\_RNAi-Linien mit denen der drei AMS-Plattform-Replikate auf signifikante Veränderungen getestet. Es wurden t-Tests (p-Wert 0,05) durchgeführt. Insgesamt sind elf Gene in mykorrhizierten Wurzelkulturen im Vergleich zu *in vivo*-Kulturen unterschiedlich transkribiert (Abb. 41). Die restlichen Gene zeigen ein ähnliches Transkriptionsmuster *in vivo* wie *in vitro*. Die Transkription der TFs aus den Datensätzen von S. Bortfeld und J. Tepy wurde nicht in den drei *in vivo*-Kulturen gemessen. Ihre AMS-Spezifität war zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt und konnten daher nicht auf ihre Signifikanz getestet werden. Die Transkriptionswerte der restlichen Gene zeigen in den *in vitro*-Kulturen ein ähnliches Muster, sind jedoch häufig geringer transkribiert als in den *in vivo*-Kulturen. Beispielsweise sind *MtAmT*, *MtNTS* und *MtSuT* in mykorrhizierten Wurzelkulturen stärker transkribiert als in den nicht mykorrhizierten Wurzelkulturen. In den *G. intraradices* inokulierten *in vivo*-Kulturen können jedoch höhere Transkriptmengen nachgewiesen werden.



**Abb. 41: Signifikant regulierte Gene zwischen GFPi\_RNAi und den drei AMS-Plattform-Replikaten.** Die t-Tests wurden zwischen allen angegebenen GFPi\_RNAi-Linien und den drei Replikaten aus den Messungen der AMS-Plattform (Kapitel 4.2.1) mit einem p-Wert-Signifikanzschwellenwert von 0,05 durchgeführt. Das „Clustering“ wurde mit Hilfe einer Pearson-Korrelation durchgeführt. Die Farbwerte geben die „LFCs“ (myk<sup>+</sup>/myk<sup>-</sup>) mit einem „cutoff“ bei ±5 an.

#### 4.4.4. Veränderungen der Transkription in den RNAi-Linien

Um weitere mögliche Koregulationen neben der zwischen *MtPt4*/*MtCoT* bzw. *MtSuT* zu erkennen, wurden die LFCs aller GFPi\_RNAi-Linien mit Hilfe des Programmes MeV geclustert (Abb. 42). Dabei kristallisierten sich zwölf größere Gruppen heraus. Die Markergene *MtPt4* und *GiGlom* können mit *MtSuT* und *MtCoT* einer Gruppe zugeordnet werden, sind also in einem gewissen Maße koreguliert (Vergleiche Abb. 37 und 38). Gruppieren man die Transkriptionsdaten der 3'CoT\_RNAi-Linien, so ergeben sich sieben größere Gruppen (Daten nicht gezeigt). *MtCoT* ist nicht mehr mit *MtPt4* und *GiGlom* koreguliert. Die Transkriptionswerte für *MtSuT*, *MtPt4* und *GiGlom* sind weiterhin einer Gruppe zugehörig, zusammen mit den meisten anderen Genen aus der gemeinsamen Gruppe der GFPi\_RNAi-Vektorkontrolle („◇“; *MtBCP2*, *MtDES*, *MtGST1*, *MtHistone* *MtLec5*, *MtLec6*, *MtLec7*, *MtLec8*, *MtLec10*, *MtMDRL*, *TC72546*). *MtLec* und *MtNSP11* scheinen jedoch weiterhin mit *MtCoT* koreguliert zu sein, während *MtMlo2* jetzt in einer



**Abb. 42: „Clustering“ und Expressionshöhe (LFCs; myk+/ myk-) in GFPi\_RNAi-Wurzelkulturen.** Das „Clustering“ wurde mit Hilfe einer Pearson-Korrelation durchgeführt. Die Farbwerte geben die LFCs (myk+/myk-) mit einem „cutoff“ bei  $\pm 5$  an. Wendet man für die Gruppierung der Gene einen Schwellenwert der euklidischen Distanz 1,5 an, so ergeben sich zwölf große Gruppen von ähnlich regulierten Genen (dargestellt durch die Rahmen).

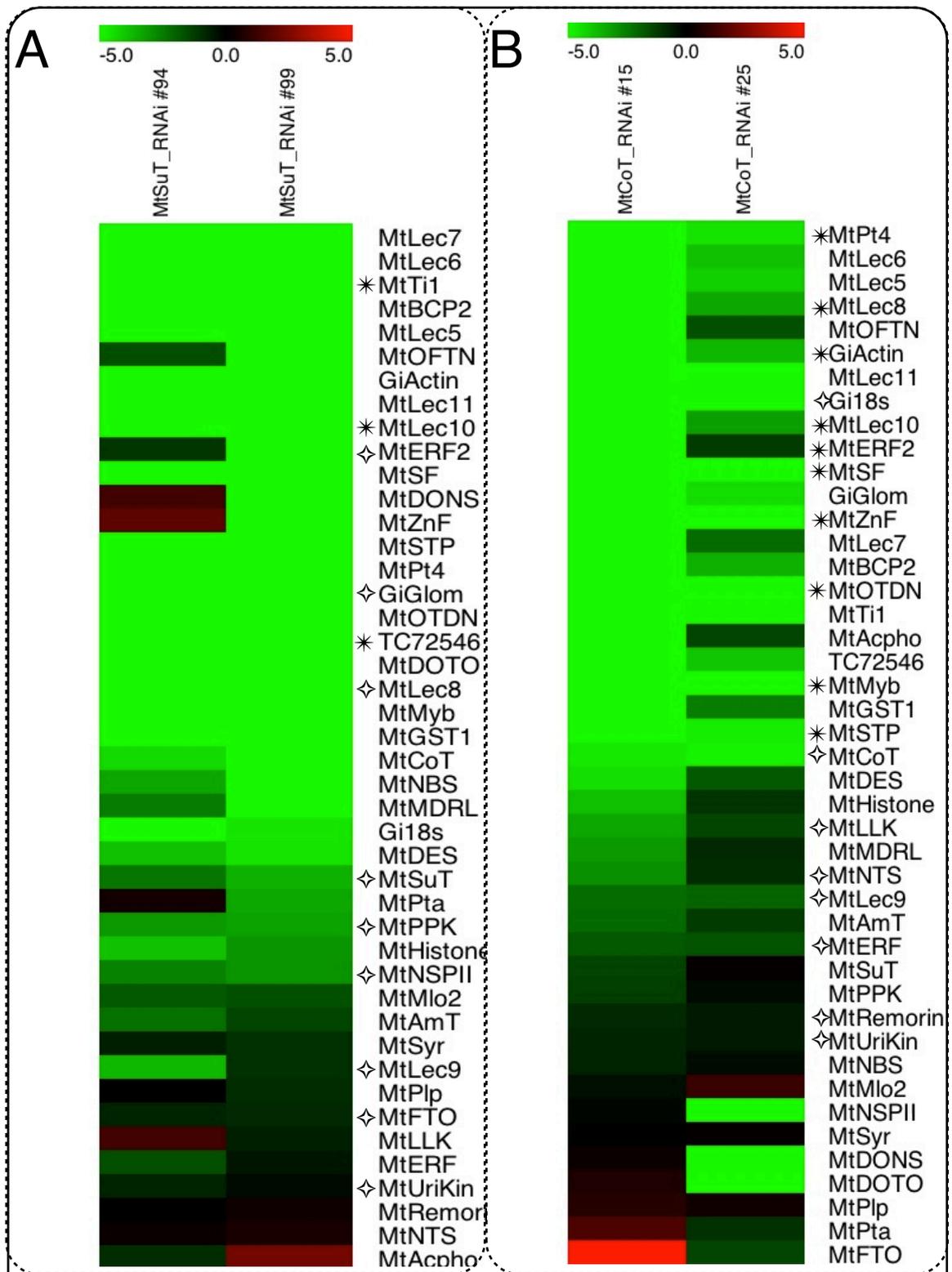
andere Gruppe liegt.

Die Transkriptionswerte von 5'SuT\_RNAi gruppieren sich in sechs größere Gruppen (Daten nicht gezeigt). *MtSuT* bildet in 5'SuT\_RNAi eine einzelne isolierte Gruppe. *MtPt4* und *GiGlom* sind durch die RNAi nicht mehr mit *MtSuT* koreguliert. Sie liegen aber weiterhin in der selben Gruppe wie die restlichen Gene der „✧“-Gruppe der GFPi-RNAi-Linien.

Um zu testen welche Gene signifikant in den gemessenen 3'CoT\_RNAi-Linien oder 5'SuT\_RNAi-Linien reguliert sind, wurden t-Tests durchgeführt. Dafür wurden die  $\Delta$ Ct-Werte der mykorrhizierten GFPi\_RNAi-Linien mit den gemessenen  $\Delta$ Ct-Werten der 3'CoT\_RNAi- bzw. 5'SuT\_RNAi-Linien verglichen. Als Schwellenwert wurde wiederum ein p-Wert von 0,05 verwendet.

Dabei zeigt sich, dass in den Linien von 3'CoT\_RNAi acht Gene signifikant reguliert sind (Abb. 43.B; „✧“). Dies sind neben dem reprimierten *MtCoT* auch *MtNTS*, *MtLLK*, *MtLec9*, *Gi18s*, *MtRemorin*, *MtERF* und *MtUriKin*. Des Weiteren wurden Gene, die in 80 % der 3'CoT\_RNAi-Linien eine mehr als zweifache Regulierung (LFC) vorweisen, mit einem „\*“ gekennzeichnet. Neben den AMS-Markergenen *MtPt4* und *GiActin* sind dies *MtERF2*, *MtLec10*, *MtLec8*, *MtMyb*, *MtOTDN*, *MtSF*, *MtSTP* und *MtZnF*. Alle diese Gene werden in den RNAi-Linien von 3'CoT\_RNAi geringer transkribiert als in der Vektorkontrolle. Von den gemessenen Genen ist einzig *MtFTO* im Schnitt mehr als zweifach (LFC von 1) verstärkt transkribiert verglichen mit der Vektorkontrolle, jedoch nicht signifikant.

In den RNAi-Linien von 5'SuT\_RNAi sind neben dem AMS-Markergen *GiGlom* und dem Zielgen *MtSuT*, auch *MtERF*, *MtFTO*, *MtLec8*, *MtLec9*, *MtNSPII*, *MtPPK* und *MtUriKin* signifikant reguliert (t-Test; Abb. 43.A; „✧“). *MtLec10*, *MtTi1* und *TC72546* sind in 80 % der gemessenen RNAi-Linien zweifach reguliert („\*“). Ebenso wie in den Linien von 3'CoT\_RNAi liegen auch hier die Transkripte der genannten Gene in geringeren Mengen vor. Ein Gen, das durch den RNAi-Effekt verstärkt transkribiert wird (mindestens einen LFC von 1), kommt in den Linien von 5'SuT\_RNAi-Linien nicht vor.



**Abb. 43: LFCs der mit der RNAi-Plattform gemessenen Transkripte den-Linien 5'MtSuT\_RNAi #94 und #96 und 3'MtCoT\_RNAi #15 und #25.** Die LFCs der mittels der RNAi-Plattform gemessenen Transkripte von jeweils zwei ausgewählten RNAi-Linien von 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi (stärksten Regulierung der AMS-Marker-Gene (*MtPt4* und *GiGlom*)). Die Farbwerte geben die LFCs gegen GFPi\_RNAi mit einem „cutoff“ bei  $\pm 5$  an. „A“ zeigt die Werte für zwei 5'MtSuT\_RNAi-Linien an (#94 und #99). „B“ zeigt die Werte für zwei 3'MtCoT\_RNAi-Linien (#15 und #25). Signifikant regulierte Gene sind durch „◇“ (t-Test,

## 4.5. Induzierbares Promotorsystem zur funktionellen Untersuchung von Transkriptionsfaktoren

*Die Herstellung ethanolinduzierbarer Promotorsysteme für AMS-regulierte Transkriptionsfaktoren*

Das Transkriptionsfaktor-Profilung (Kapitel 4.1) führte zur Identifizierung AM-regulierter Transkriptionsfaktoren (Abb. 11). Um die Rolle dieser Transkriptionsfaktoren in der Signaltransduktion und bei der Aktivierung von AMS-regulierten Genen zu untersuchen wurde ein System gewählt, bei dem das zu untersuchende Gen von einem Promotor kontrolliert wird, der durch die Applikation von Ethanol aktiviert wird (pBin- $\Delta$ alcR, Syngenta, Roslan *et al.*, 2001). Als Kandidaten wurden die TFs *MtNFS* und *MtDES* gewählt. Von diesen wurden im Laufe dieser Arbeit sowohl eine Promotorstudie, als auch ein RNAi-Experiment durchgeführt. Das RNAi-Experiment lieferte keine *M. truncatula*-Linien mit verminderter Transkription dieser TFs.

Die kodierende Sequenz (CDS) der entsprechenden Gene wurde mit Hilfe der UrMeLDB-Medicago-Genom-Datenbank (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/plant/medi3/index.jsp>) gefunden. Als Vektorkontrolle wurde die CDS von mRFP aus dem pGWB454-Vektor (Nakagawa *et al.*, 2007) verwendet. *M. truncatula*-Wurzeln wurden mit Hilfe von *A. rhizogenes* mit diesen drei Konstrukten (*MtDES\_EtOH*, *MtNFS\_EtOH* und mRFP\_EtOH) transformiert. Darauf folgend wurden transgene *in vitro*-Wurzelkulturen auf M-Medium von diesen Transformanden angelegt. Diese transgenen Wurzelkulturen liegen am Max-Planck-Institut für molekulare Pflanzenphysiologie vor und können dort untersucht werden.

## 5. Diskussion

### 5.1. Transkriptionsanalyse AMS-induzierter TFs in *Medicago truncatula*

#### 5.1.1. Während der AMS signifikant regulierte Transkriptionsfaktoren in *M. truncatula*

Das TF-Profiling lieferte Informationen über die transkriptionelle Regulation der AMS in *M. truncatula* durch pflanzliche TFs (Abb. 11). Von den 59, in mit *G. intraradices* kolonisierten *M. truncatula*-Pflanzen signifikant regulierten TFs, war annähernd die selbe Anzahl an TFs sowohl hoch- wie auch herunterreguliert. Die TFs deren Transkriptmenge sich am stärksten veränderten waren jene, die während der AMS verstärkt transkribiert wurden. Eine Erklärung für diesen Umstand könnte sein, dass es bei der Etablierung der AMS, u. a. an der periarbuskuläre Membran (PAM) zu einer massiven Veränderung der Proteinzusammenstellung kommt (Benedito *et al.*, 2008; Javot *et al.*, 2007b). Dadurch müssen in großem Ausmaß neue Proteine synthetisiert werden, was u. a. durch TFs reguliert wird (Udvardi *et al.*, 2007). Gleichzeitig müssen die vielfältigen Abwehrmechanismen der Pflanze überwunden werden, damit der Pilz die Pflanze besiedeln kann (Harrison und Dixon, 1994; Benedito *et al.*, 2008). Die Abwehrmechanismen und die sie regulierenden TFs, die in nicht kolonisierten Wurzeln konstitutiv aktiv sind, müssen daher herunterreguliert werden. Diese konstitutiv exprimierten Abwehrproteine sollten aus Gründen des Energieaufwandes nur schwach exprimiert sein. Im Falle einer Pathogeninfektion werden diese Abwehrproteine und damit eine Signalkaskade aktiviert, welche die pflanzlichen Abwehrmechanismen startet. Für eine erfolgreiche Kolonisierung der Pflanze und Etablierung der AMS sollten diese Gene nicht aktiv sein und dadurch im Laufe der AMS herunterreguliert oder ausgeschaltet werden. Des weiteren zeigt sich durch eine Clusteranalyse aller signifikant regulierter TFs, dass sich zwei Gruppen an, in ihrer Transkription korrelierenden TFs, bilden. Dies könnte an zwei unterschiedlichen AMS-regulierten Signalwegen liegen (Abb. 13; Kosuta *et al.*, 2003; Siciliano *et al.* 2007).

### 5.1.2. Überproportional vertretene TF-Familien unter den während der AMS-signifikant regulierten TFs in *M. truncatula*

Durch das TF-Profilierung mykorrhizierter Wurzeln und die Zuordnung dieser TFs zu bestimmten TF-Familien konnte erkannt werden, welche TF-Familien in der AMS eine übergeordnete Rolle spielen (Abb. 12).

Betrachtet man alle während der AMS signifikant regulierten TFs, so sind die Familien der MADS-Box, ABI3-VP1, AP2/ EREBP ähnlichen TFs, überproportional im Vergleich zu ihrer Häufigkeit auf der qRT-PCR-TF-Plattform vertreten. Sie dürften daher in der AMS eine größere Rolle spielen. MADS-Box TFs (vertreten u. a. durch *MtOSDE*, *MtFTO* und *MtSFT*) spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Pflanze, besonders in der Blütenentwicklung (Nam *et al.*, 2003). ABI3-VP1-TFs sind bekannt für ihre Rolle in der Regulation von Genen, die während der Samenentwicklung auf Abscisinsäure reagieren, also eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Samen spielen (Lazarova *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2003). Diese TF-Familien scheinen auch, nach den Ergebnissen aus dieser TF-Profilierung-Studie, eine größere Rolle in der AMS zu spielen als bisher bekannt.

Werden nur noch die acht AMS-regulierten als TF-Topkandidaten klassifizierten TFs mit einbezogen (Tab. 25), so sind die AP2/EREBP durch zwei TFs vertreten und könnten daher möglicherweise eine übergeordnete Rolle in der Antwort der Pflanze auf die AMS spielen. Die Familie der CCHC-ähnlichen (Zink-Finger) TFs macht bereits 11% aller TFs auf der qRT-PCR-TF-Plattform aus, und ist daher ebenfalls vertreten.

AP2/ EREBP-TFs sind auf Pflanzen beschränkt und spielen in viele Entwicklungsprozesse eine Rolle. Mitglieder dieser TF-Familie sind unter anderem in die Stressantwort und in die Entwicklung der pflanzlichen Zelle involviert (Riechmann *et al.*, 1998). Interessanterweise sind TFs dieser Familie auch an der Entwicklung der Wurzelknöllchensymbiose beteiligt. So sind zum Beispiel zwei dieser TFs für die Regulierung des frühen NOD-Faktor induzierten Genes *Enod11* verantwortlich (Andriankaja *et al.*, 2007). Nach neueren Erkenntnissen wird dieses Gen nicht nur durch NOD-Faktoren induziert, sondern auch durch AM-Pilzsignale (Maillet *et al.*, 2011). Die beiden in mykorrhizierten Wurzeln signifikant hochregulierten TF-Topkandidaten aus der AP2/EREBP-Familie (*MtOFTN*, *MtNTS*), spielen in Wurzelknöllchen jedoch keine Rolle (Abb. 14 und 15). *MtNTS* war in Wurzelknöllchen sogar signifikant geringer exprimiert als in Kontrollwurzeln. Die Transkription der zwei weiteren AP2/EREBP-TFs (1655.m00028 und *MtOFTT*) deren Transkription in mykorrhizierten Wurzeln signifikant erhöht war, war dies

in einem Fall auch in Wurzelknöllchen (1655.m00028), in einem anderen Fall war die Transkription verringert (*MtOFTT*). Der TF 1655.m00028 ist also in der transkriptionellen Regulation beider Symbiosen beteiligt. Welche Gene 1655.m00028 dabei aktiviert oder reprimiert ist nicht bekannt.

Der prozentuale Anteil von signifikant erhöhten AP2/EREBP-TFs war in Wurzelknöllchen im Gegensatz zu mykorrhizierten Wurzeln nicht höher (5,5 %) als sie allgemein repräsentiert sind auf der TF-Plattform (4,9 %).

TFs der AP2/EREBP-TF-Familie sind überproportional an der Regulation der AMS in Pflanzen beteiligt. Zu vermuten ist, dass diese TFs eine wichtigere Rolle in der transkriptionellen Regulation der AMS spielen, als in der Wurzelknöllchensymbiose.

### **5.1.3. Untersuchung von Koregulationsereignissen in der Transkription von TFs in mykorrhizierten, nodulierten und *A. euteiches* infizierten *M. truncatula*-Wurzeln**

Die gewonnenen Transkriptionsdaten aus mykorrhizierten Wurzeln wurden mit den Transkriptionsdaten nodulierter (Kakar *et al.*, 2008) und durch *A. euteiches* infizierter Wurzeln verglichen. *A. euteiches* ist verantwortlich für große Ertragsverluste in Erbsenkulturen durch Wurzelfäule. Eine Infektion mit diesem Pathogen führt dabei aber zu einem fast vollständigen Absterben der Wurzel und damit auch zum Tod der Pflanze und wurde in dieser Arbeit als beispielhaft für eine Pathogeninfektion mit ähnlichem Wachstum wie AM-Pilze gewählt.

Der Vergleich der Datensätze lieferte einen interessanten Einblick in die unterschiedliche Regulation von TFs der Symbiosen im Gegensatz zur pathogenen Infektion. In beiden ist dabei Fällen zu bedenken, dass in den Wurzelknöllchen ca. 50 % der gemessenen TFs (582) signifikant reguliert waren, in den beiden anderen Ansätzen jedoch nur ca. 6 % bzw. 5 %. In den Untersuchungen mykorrhizierter oder mit *A. euteiches* infizierter Pflanzen wurde die gesamte Wurzel mit allen zu ihr zählenden Geweben transkriptionell untersucht. Die nicht kolonisierten oder nicht infizierten Bereiche konnten nicht aussortiert werden. Es kommt daher auch zu einem Verdünnungseffekt zwischen gut kolonisierten Wurzelfragmenten und weniger oder nicht kolonisierten Bereichen der Pflanzen und besonders zwischen kolonisierten und nicht kolonisierten Zellen. Bei der Untersuchung der Transkription in Wurzelknöllchen wurde nur das Wurzelknöllchen als isoliertes Wurzelorgan verwendet. Als Kontrolle wurde, ebenso wie in den beiden anderen Ansätzen, die gesamte Wurzel verwendet. Es wurden also zwei

unterschiedliche Gewebe untersucht (Wurzelknöllchen <-> Wurzel), im Gegensatz zu zwei unter unterschiedlichen Bedingungen gewachsenen Organen (kolonisierte <-> nicht kolonisierte Wurzel). Dadurch kommt es im Fall der Wurzelknöllchen zu der um den Faktor zehn höheren Anzahl an signifikant unterschiedlich transkribierten TFs.

Während es in der Wurzelknöllchensymbiose möglich ist, visuell die Wurzelknöllchen von nicht kolonisierten Wurzelabschnitten zu unterscheiden und die Wurzelknöllchen zu ernten, ist dies bei Pilzinfektionen wie z. B. durch AM-Pilze nicht ohne weiteres möglich. Um die kolonisierten von den nicht kolonisierten Bereichen trennen zu können, muss entweder die Wurzel gefärbt (was die RNA zerstört), oder mittels Lasermikrodissektion eine Einzelzelluntersuchung durchgeführt werden. Würde man sich dabei auf arbuskelhaltige Zellen beschränken und als Kontrolle ganze, nicht kolonisierte Wurzeln verwenden, wäre der Versuchsaufbau vergleichbarer und die Anzahl als signifikant reguliert gemessener TFs wahrscheinlich höher.

Während es in mykorrhizierten Wurzeln und Wurzelknöllchen eine gewisse Koregulation zwischen TFs gab (Abb. 14; Abschnitt 5.1.2), kam keiner der in mykorrhizierten Wurzeln signifikant regulierten TFs in *A. euteiches* infizierten Wurzeln signifikant reguliert vor. Dies lässt auf eine unterschiedliche Kontrolle der Transkription schließen.

Von den 59 während der AMS signifikant regulierten TFs waren 34 TFs auch in Wurzelknöllchen signifikant reguliert. *MtDOTO* *MTOSDE*, *1688.m00027* und *1655.m00028* sind dabei in beiden Datensätzen verstärkt transkribiert, wobei die beiden letzteren in Wurzelknöllchen stärker reguliert waren als in mykorrhizierten Wurzeln (vierfach erhöhte Transkriptmenge in drei Replikaten). Diese TFs sind also möglicherweise an regulatorischen Prozessen während der Ausbildung beider Symbiosen beteiligt, eventuell während des bereits bekannten gemeinsamen *SYM*-Signalwegs (Kistner *et al.*, 2005) oder in der Unterdrückung von Abwehrmechanismen der Pflanze. Genaue Erkenntnisse könnten weitere Untersuchungen liefern.

*MtDODS*, *759.m00003* und *1197.m00005* waren in beiden Datensätzen geringer transkribiert als in den jeweiligen Kontrollwurzeln, könnten also in der Pathogenabwehr eine Rolle spielen, die während der Symbiose umgangen bzw. unterdrückt werden muss (Harrison und Dixon, 1994; Benedito *et al.*, 2008).

*MtEON* und *MtNTS*, beide während der AMS hochreguliert, sind in Wurzelknöllchen im Vergleich zur Kontrollwurzel herunterreguliert. Sie zeigen damit in ihrem Transkriptionsmuster ein antagonistisches Verhalten. Beide TFs scheinen damit in Bereichen der Wurzel aktiv zu sein und in regulatorischen Prozessen eine Rolle zu spielen die in Wurzelknöllchen im Vergleich zur Kontrollwurzel keine Rolle zu spielen. Diese Prozesse

scheinen jedoch essentiell in den Bereichen zu sein, in der die AMS ausgebildet wird. Um zu untersuchen ob diese TFs auch in der Wurzelknöllchensymbiose generell eine Rolle spielen, sollte eine gesamte kolonisierte Wurzel untersucht werden. So könnte man sehen ob die genannten TFs an der Regulation der Symbiose in der Wurzel beteiligt sind, ohne in den Wurzelknöllchen direkt aktiv zu sein.

Von den 45 in *A. euteiches*-infizierten Wurzeln herunterregulierten TFs (Abb. 19) sind 19 auch in Wurzelknöllchen signifikant reguliert (Daten nicht gezeigt). In Wurzelknöllchen waren diese jedoch zu etwa gleichen Teilen herauf- oder herunterreguliert. Die zwei in *A. euteiches* infizierten Wurzeln hochregulierten TFs waren auch in Wurzelknöllchen verstärkt transkribiert. Über die Funktion dieser beiden TFs in diesen Fällen kann nur spekuliert werden. Der TF *1220.m00003* ist ein TrpR (Tryptophan (*trp*) Repressor)-TF. In *E. coli* ist TrpR für die Unterdrückung der Transkription des *trp-regulons* verantwortlich (Gunsalus *et al.*, 1980), indem es die RNA-Polymerase daran hindert mit dem Promotor des Genes zu interagieren (Squires *et al.*, 1975). In AM-kolonisierten Wurzeln ist dieser TF nicht reguliert, scheint also nur in nodulierten oder *A. euteiches* infizierten Wurzeln die Transkription eines oder mehrerer Gene negativ zu regulieren.

Der TF *1475.m00011* ist ein NAC-TF. Diese TFs sind spezifisch für Pflanzen und unter anderem auch an der Abwehr von Pilz- und Bakterieninfektionen beteiligt (Wang und Basnayake, 2009; Xia *et al.*, 2010). NAC-TFs sind aber auch an verschiedenen Aspekten der pflanzlichen Entwicklung beteiligt. Zwei NAC-TFs sind z. B. an dem Aufbau von Meristemen in *A. thaliana* beteiligt (Souer *et al.*, 1996, Aida *et al.*, 1997). Ein weiterer TF ist an der Unterscheidung zwischen Zellteilung und Zellexpansion (Sablowski und Meyerowitz 1998) und über Auxin an der Ausbildung von lateralen Wurzeln beteiligt. Darüber, an welcher dieser möglichen Aufgaben TF *1475.m00011* beteiligt ist, kann nur spekuliert werden. Eine verstärkte Transkription eines an der Pathogenabwehr beteiligten TFs in *A. euteiches* infizierten Pflanzen erscheint sinnvoll. In einem Wurzelknöllchen träfe dies eher auf einen an der Entwicklung und Differenzierung der Zelle beteiligten TF zu.

Der *A. euteiches* TF-Profilings Datensatz liefert einen interessanten Einblick in die Veränderung der TF-Transkription in *A. euteiches* infizierten Wurzeln. Bis auf die zwei oben genannten Ausnahmen, sind alle signifikant regulierten TFs in den infizierten Wurzeln herunterreguliert. Während es durch das Gießen der Kontrollpflanzen mit Seewasser zu einem Wachstumsschub kam (Daten nicht gezeigt), führt die Infektion mit *A. euteiches* zu einer Verringerung der Biomasse. Eine große Anzahl an Signalwegen scheint durch die Infektion herunterreguliert zu werden. Während die als „housekeeping

*gene*“ verwendeten, als nicht-reguliert angenommenen Gene, von den unterschiedlichen Behandlungen nicht beeinflusst werden.

#### **5.1.4. Transkription der acht TF-Topkandidaten in verschiedenen Pflanzenorganen von *M. truncatula***

Die acht AMS-regulierten TF-Topkandidaten wurden durch eine *in silico*-Datenbankrecherche auf ihre Transkriptionsstärke in anderen Pflanzenorganen im Vergleich zur Wurzel untersucht (Abb. 15). Dabei wurde der Datensatz von Kakar *et al.* (2008) verwendet, aus dem auch die Daten für die Wurzelknöllchen stammen. Dabei zeigte sich, dass sieben dieser acht TFs nur in Wurzeln transkribiert werden. Nur *MtDES*, ein CCAAT bindender TF, ist auch in anderen Pflanzenorganen transkribiert. In nicht inokulierten Kontrollwurzeln (weder mykorrhiziert, noch noduliert) war dieser TF geringer transkribiert als in allen anderen gemessenen Pflanzenorganen. Dieser TF scheint also in einem, in allen Pflanzenorganen ablaufenden, regulatorischen Prozess eine Rolle zu spielen. Dieser Vorgang spielt in oberirdischen Pflanzenorganen und in mykorrhizierten Wurzeln eine größere Rolle als in nicht kolonisierten Wurzeln oder in Wurzelknöllchen (Kapitel 5.1.3). Welche Aufgabe und welche nachgeschalteten Prozesse *MtDES* reguliert muss durch eine funktionelle Analyse untersucht werden.

*MtDOTO* (CHCC-Zink Finger TF) spielt eine wichtige Rolle in der Regulation beider Symbiosen (Kapitel 5.1.3). Die Transkription ist in beiden Fällen stark hochreguliert. Eine signifikante Erhöhung der Transkriprate in anderen Pflanzenorganen liegt nicht vor (Abb.15). Interessant wären weitere Messungen, ob dieser TF auch in weiteren Symbiosen verstärkt exprimiert ist. Über die regulatorische Funktion von *MtDOTO* in beiden Symbiosen ist nichts bekannt und müsste weiter untersucht werden.

## **5.2. Transkriptionsanalyse mykorrhizierter *M. truncatula*-Wurzeln mit Hilfe der qRT-PCR AMS-Plattform**

### **5.2.1. Anwendung und Nutzen der qRT-PCR-AMS-Plattform**

Durch die qRT-PCR-Messungen der AMS-Plattform zeigte sich der Vorteil in der Verwendung einer solchen qRT-PCR-Plattform. Auf diese Art und Weise konnten schnell und unkompliziert die Auswirkungen der AMS auf die Transkription ver-

schiedener Gruppen von Genen, die in die AMS direkt oder indirekt involviert sind, oder sein könnten, gemessen und mögliche Korrelationen erkannt werden (Abb. 28). So konnte herausgefunden werden, dass qRT-PCR-Messungen von AMS-regulierten Genen in mykorrhizierten Wurzeln zu früheren Zeitpunkten, anders als nach drei Wochen, kaum signifikante Daten liefern. Dies liegt an der ungleichmäßigen Kolonisierung ganzer Wurzeln durch *G. intraradices*. Zu früheren Zeitpunkten sind nur geringe Bereiche der Wurzeln kolonisiert (9 dpi und 15 dpi), oder es ist bis dahin nur zu einem Hyphenwachstum bzw. Ausformung von Appressorien gekommen, ohne dass es bis dahin zu einer Ausbildung von Arbuskeln gekommen wäre (3 dpi und 6 dpi). Die qRT-PCR-Messungen in diesem Versuchsaufbau wurden mit einer Mischung aus stark, kaum und nicht kolonisierten Wurzelfragmenten durchgeführt. Eine Selektion der Wurzel an den unterschiedlichen Zeitpunkten nach Kolonierungsgrad konnte durch den bereits beschriebene Versuchsaufbau nicht durchgeführt werden. So könnten an frühen Zeitpunkten nur sehr stark regulierte Gene durch die qRT-PCR-Messungen, über mehrere Replikate als signifikant reguliert gemessen werden. Eine Möglichkeit diesen Umstand zu umgehen und selektiv das Transkriptom von arbuskelhaltigen Zellen, auch an frühen Zeitpunkten zu analysieren ist die Lasermikrodissektion. Ein Verfahren, mit dem bei einer Lasermikrodissektion die RNA nicht degeneriert, ist in unserer Arbeitsgruppe durch N. Gaude (Gaude *et al.*, 2012) etabliert worden.

Nach 21 Tagen sind die Wurzeln von *M. truncatula* jedoch nahezu komplett kolonisiert und die Transkription der AM-regulierten Gene konnten nach 21 Infektionstagen bestätigt werden (Abb. 20-27) und mögliche Koregulationen (Abb. 28) erkannt werden. Gene, die an der Entwicklung der AMS und deren Aufrechterhaltung beteiligt sind, sind zu diesem Zeitpunkt in der gesamten Wurzel aktiv und können also mit einer qRT-PCR und Proben, bestehend aus der gesamten Wurzel, detektiert werden. Die Analyse der möglichen Koregulationen ergab, dass in Bezug auf ihre funktionelle Einordnung (Tab. 26) kein Muster zu erkennen ist (Abb.28). Einzig die gemessenen miRNA399er sind in zwei unterschiedliche Cluster gruppiert. Die drei Markergene für *G. intraradices* sind in zwei unterschiedliche Cluster gruppiert. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Unterschiede in den Transkriptionsmustern der untersuchten Gene ausgesprochen gering sind. Die Mehrheit der Gene könnten koreguliert sein und eventuell von einem oder zwei gemeinsamen Signalwegen reguliert werden (*SYM*-Signalweg; Kistner *et al.*, 2005). Ebenso wie das Clustern der Ergebnisse der AMS-Plattform (Abb. 28) zeigt auch das Clustern der Ergebnisse der TF-Plattform (Abb. 13) zwei große Gruppen an korrelierenden und koregulierten Transkripten. Möglicherweise

liegt dies ebenfalls an zwei grundlegenden Signalwegen, die zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Symbiose führen, die eventuell durch ein gemeinsames Signal („myk-Faktor“) gestartet werden, sich dann aber aufspalten.

Die Verwendung der AMS-Plattform ist sinnvoll um die Transkription bekannter AMS-regulierter Gene zu verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Ebenso ist es möglich Koregulationen zwischen diesen zu entdecken und neue, vermutete AM-regulierte Gene in die Symbiose in Bezug auf ihre Transkription einzuordnen. Um das System aber noch zu verbessern, speziell an frühen Zeitpunkten und um zellspezifische Regulationen zu erkennen, wäre die Anwendung der Lasermikrodissektion von Vorteil.

### **5.2.2. Analyse der Transkription von unter Phosphatmangel verstärkt transkribierten Genen in mykorrhizierten *M. truncatula*-Wurzeln**

Die AMS sorgt für eine Verbesserung der Phosphatversorgung der Pflanzen. Daher ist es ein weiterer interessanter Aspekt zu verstehen, inwieweit sich die Transkription von Genen während der AMS verändert, die in die Phosphatmangel-Signalkette involviert sind (Abb. 26 und 27). Es scheint in der Transkription dieser Gene kaum einen Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln unter niedriger Phosphatverfügbarkeit (20  $\mu$ M) zu geben. Die AMS hat demnach keinen Einfluss auf die Transkription dieser Gene. Zu erwarten wäre eine Erhöhung der Transkriptmenge der Vorläufermoleküle der miRNA 399 (microRNA) in Blättern (Branscheid *et al.*, 2010). Die Transkription der Vorläufermoleküle der miRNA399 ist ausschließlich nach sechs Tagen in mykorrhizierten Wurzeln signifikant verändert (Abb. 27). Das Signalwegmodell, das in Branscheid *et al.* (2010) für den Signalweg der miRNA399 vorgeschlagen wurde, sagt aus, dass die Vorläufermoleküle der miRNA399 in AM-kolonisierten Pflanzen im Spross transkribiert und die reifen miRNA399er dann in die Wurzel transportiert werden, um dort die Transkription des TFs *MtPho2* zu unterdrücken. Dieser unterdrückt seinerseits die Transkription der Phosphatmangelgene *MtSpx* und *MtUn*. Auch wenn die Phosphatversorgung durch die AMS verbessert ist, werden auf diese Weise weitere Phosphatmangelgene transkribiert. Dies ist in soweit logisch, dass durch die höhere Verfügbarkeit von Phosphat durch die AMS, die Phosphatmangelgene nicht mehr transkribiert werden würden. Als Folge würde die Pflanze die Symbiose beenden oder die Ausbildung der Symbiose wäre nicht so effektiv (Ryan und Graham, 2002; Javot *et al.*, 2007b).

Warum nun das Transkriptlevel der miRNA399er Vorläufermoleküle nach sechs Tagen

in mykorrhizierten Wurzeln höher ist als in den Kontrollwurzeln ist unklar. Eine Erklärung könnte sein, dass in drei (diese Arbeit) oder fünf Wochen (Branscheid *et al.*, 2006) alten Pflanzen der hauptsächliche „*sink*“ für Phosphate wachstumsbedingt die oberirdischen Pflanzenteile darstellt. Nach sechs Tagen ist dies eventuell aber noch die Wurzeln, da zusätzlich durch die Ausbildung der Symbiose mit dem AM-Pilz das Wachstum der Wurzeln angeregt wird (Oláh *et al.*, 2005). Diese Gene, die in die Messung des Phosphatlevels involviert sind, werden also eventuell in den Wachstumsbereichen der Pflanze transkribiert und entfalten in den „*source*“ Bereiche ihre Wirkung. Das hypothetische, systemische Mykorrhizierungssignal entfaltet demnach seine Wirkung in den „*sink*-Bereichen“ des Phosphates und aktiviert dort einen Phosphatmangel-Signalweg über die Transkription von miRNA339er-Vorläufermolekülen.

### **5.3. Funktionelle Analyse AMS-regulierter Gene**

#### **5.3.1. Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter TFs**

Für die Untersuchung in welchen Zellen der durch *G. intraradices* kolonisierten Wurzel die zuvor in dem Profiling gefunden TFs aktiv sind, wurde der vorhergesagte Promotor der zu untersuchenden Gene vor ein Reporter gen kloniert. In diesem Fall war dies CFP. In drei Wochen alten Wurzeln wurde die Aktivität der Promotoren von *MtNTS*, *MtDES*, *MtOFTN* untersucht. *MtNTS* (AP2/EREBP-ähnlicher TF, Abb. 30 und 31) und *MtDES* (CCAAT-ähnlicher TF, Abb. 32) sind dabei nicht nur in arbuskelhaltigen, sondern auch in anderen Zellen des Wurzelparenchyms aktiv. Dies deckt sich auch mit den Messungen der qRT-PCR. Die Transkripte von *MtNTS* und *MtDES* waren ebenfalls in den nicht mykorrhizierten Kontrollwurzeln detektierbar (Ct-Wert ~30 in den Kontrollwurzeln <-> Ct-Wert ~24/25 in mykorrhizierten Wurzeln). Diese TFs werden also auf einem niedrigen Level konstitutiv in *M. truncatula*-Wurzeln transkribiert, aber erst durch die AMS werden die jeweiligen Promotoren in arbuskelhaltigen Zellen in einem stärkeren Maße aktiviert. Diese TFs sind also für die Regulierung der Transkription von Genen verantwortlich, die in geringerem Maße in Wurzelzellen allgemein benötigt werden, in arbuskelhaltigen Zellen jedoch in einem weit größeren Ausmaß. Um welche Gene es sich dabei handeln könnte, könnte durch ein induzierbares Promotorsystem herausgefunden werden. *MtNTS* ist dabei wurzelspezifisch und scheint in anderen Pflanzenorganen und in Wurzelknöllchen keine Rolle zu spielen (Abb. 15). *MtDES* wurde

dagegen in anderen Pflanzenorganen sogar stärker transkribiert als in nicht mykorrhizierten Wurzeln (Abb. 15).

Der Promotor des TFs *MtOFTN* (AP2/EREBP-TF) ist ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen aktiv (Abb. 33). Der TF scheint an der zellspezifischen Regulation in arbuskelhaltigen Zellen beteiligt zu sein. Das deckt sich mit den qRT-PCR-Daten, in denen das Transkript von *MtOFTN* nur in mykorrhizierten Wurzeln nachweisbar war (Abb. 15; Ct-Werte, Daten nicht gezeigt).

### 5.3.2. Promotoraktivitätsstudien AMS-regulierter Gene

Drei der während der AMS signifikant regulierter Gene aus Frenzel *et al.* (2005) wurden ebenfalls auf ihre Promotoraktivität getestet. Dies waren *MtAmT* (Ammoniumtransporter), *MtMDRL* (ABC-Transporter) und *MtPPK* (Proteinkinase).

AM-Pilze scheinen Stickstoff in Form von Arginin von den extraradikulären zu den intraradikulären Hyphen zu transportieren und wird dort in Form von  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  in den PAS (periarbuskulärer Raum) freigegeben (Guether *et al.*, 2009), wo es durch das saure Milieu, hervorgerufen durch  $\text{H}^+$ -ATPasen (Hause und Fester, 2005; Balestrini *et al.*, 2007), größtenteils (>99,99%) als  $\text{NH}_4^+$  vorliegt.

Der Promotor von *MtAmT* ist ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen aktiv (Abb. 34). Es wurde damit erstmals für einen Ammoniumtransporter in *M. truncatula* nachgewiesen, dass dessen Promotor ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen aktiv ist. Es wurde noch keine funktionelle Untersuchung eines Ammoniumtransporters in *M. truncatula* durchgeführt. In *L. japonicus* konnte jedoch ein Ammoniumtransporter (LjAMT2;2) identifiziert werden, der AMS-spezifisch in arbuskelhaltigen Zellen exprimiert wird und als Ammoniumtransporter in der PAM in Frage kommt (Guether *et al.*, 2009). Dieser Ammoniumtransporter gehört wie MtAMT zu der Untergruppe der AMT2 ähnlichen Ammoniumtransporter, was eine Sequenzanalyse mittels Uniprot zeigte. Diese Untergruppe wird möglicherweise größtenteils zellspezifisch transkribiert, da die Transkripte der Mitglieder dieser Familie nur sehr selten in Transkriptanalysen detektiert werden können (Guether *et al.*, 2009). Die Sequenzähnlichkeit zwischen LjAMT2;2 und MtAMT liegt bei ca. 50 % und beschränkt sich auf die ersten 200 Aminosäuren (abgeglichen über Uniprot, Accession-Nummer für LjAMT2;2 ist C4NY35). Zur Lokalisation der pflanzlichen Zellmembran, in die MtAMT eingebaut wird, wäre eine subzellulären Lokalisierung von MtAMT in mykorrhizierten Wurzeln interessant. Eine *in silico* Datenbanksuche zur subzellulären Lokalisierung ergab aber eine wahrscheinliche

Lokalisierung in der Plasmamembran für MtAMT und eine Lokalisierung als integrales Membranprotein für LjAMT2;2 (WoLF PSORT, <http://wolfsort.org/>). Ob MtAMT in der PAM lokalisiert ist, kann ohne weitere Untersuchungen nicht diskutiert werden. Das spezifische Signalmolekül der PAM ist noch nicht bekannt.

Ausgehend von der Aktivität des Promotors von *MtAmT* ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen wird *MtAmT* wahrscheinlich ebenfalls nur in arbuskelhaltigen Zellen transkribiert und translatiert. Er könnte damit das Äquivalent zu *LjAmT* in *M. truncatula* sein. Damit wäre MtAMT wichtig für die Stickstoffversorgung der Pflanze während einer AMS.

Während dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass der Promotor von *MtPPK* ausschließlich in arbuskelhaltigen Zellen aktiv ist (Abb. 36). Der Promotor ist aber nur in wenigen arbuskelhaltigen Zellen aktiv. Ob es sich dabei um Arbuskeln handelt, die sich im Aufbau befinden, voll entwickelt sind, oder bereits am degenerieren sind, ist nicht zu erkennen. Die *in silico*-Suche zur Vorhersage der subzelluläre Lokalisierung ergab eine wahrscheinliche Lokalisierung im Zellkern (WoLF PSORT, <http://wolfsort.org/>). Dies müsste über eine subzelluläre *in vivo*-Lokalisierung mittels eines Reportergens nachgeprüft werden. Eventuell spielt *MtPPK* bei der Aktivierung von TFs oder Enzymen durch Phosphorylierung des Proteins eine Rolle.

Das ABC-Transporter in der AMS eine Rolle spielen wurde durch Zhang *et al.* (2010) bewiesen. Durch ein „*screening*“ von *M. truncatula*-Mutanten wurde ein Phänotyp mit unterentwickelten und verkleinerten Arbuskeln entdeckt. Dieser beruht auf einer Mutation in einem ABC-Transporter (MtSTR1). Der selbe Phänotyp tritt auch dann auf, wenn man einen anderen ABC-Transporter (MtSTR2) der selben Familie (ABCG-Unterfamilie) durch RNAi herunterreguliert. Die Unterfamilie der ABCG-ähnlichen ABC-Transporter scheinen an dem Transport von Lipiden beteiligt zu sein. MtSTR1 sowie MtSTR2 sind dabei in der PAM lokalisiert (Zhang *et al.*, 2010). Der in dieser Arbeit untersuchte ABC-Transporter MtMDRL ist im Gegensatz dazu jedoch ein Mitglied der ABC\_MTABC3\_MDL1\_MDL2 Unterfamilie (blastn; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), die in den Eisenhaushalt der Pflanze involviert ist. In dieser Arbeit konnte damit ein weiterer ABC-Transporter nachgewiesen werden, der in der AMS eine Rolle spielt. Das Transkript dieses ABC-Transporters ist zwar auch in nicht mykorrhizierten Wurzeln detektierbar, in mykorrhizierten Wurzeln wird die Transkription jedoch verstärkt. In den Promotor Reporterstudien konnte eine Beschränkung dieses ABC-Transporters auf einen bestimmten Zelltyp innerhalb der mykorrhizierten Wurzel (z. B. arbuskelhaltige Zellen) mit den vorhandenen Aufnahmen nicht festgestellt werden (Abb. 35). Die

*in silico* Datenbankrecherche ergab eine mit größter Wahrscheinlichkeit subzelluläre Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran (WoLF PSORT, <http://wolfpsort.org/>). Da MtMDRL zusätzlich nur geringe Sequenzähnlichkeit zu MtSTR1 und MtSTR2 besitzt (~ 30 %), können die Ergebnisse von Zhang *et al.* (2010) somit nicht auf diesen ABC-Transporter übertragen werden. Viel eher dürften MtSTR1 und MtSTR2 gemeinsam in einen Signalweg involviert sein und MtMDRL eventuell in den allgemeinen Mineralstoffhaushalt von *M. truncatula*. Dieser ist in Folge der veränderten Versorgung durch die AM-Symbiose in *M. truncatula* verändert. Dadurch sollten auch die daran beteiligten Proteine bzw. Gene eine veränderte Expression vorweisen. Möglicherweise wird durch die verbesserte Versorgung mit Mineralstoffen durch die AMS eine größere Menge dieser Transporter für den Zell-Zell-Transport innerhalb der Wurzel zum Xylem benötigt, was in diesem Fall für *MtMDRL* zutreffen könnte

### 5.3.3. Funktionelle Charakterisierung zweier AMS-regulierter Transporter mittels RNAi

#### *RNAi-Kulturen*

Um die AMS-regulierten Gene funktionell untersuchen zu können, wurde das RNA-Interferenzverfahren gewählt. Gelingt es das Zielgen durch RNAi herunterzuregulieren, kann der dadurch hervorgerufene Einfluss auf die AMS erkannt werden. Zur molekularen Phänotypisierung wurde eine RNAi-qRT-PCR-Plattform verwendet, die eine große Anzahl von Oligonukleotiden für AMS-spezifische Gene umfasst (Abb. 42).

Für die beiden AMS-regulierten Transporter *MtCoT* und *MtSuT* konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich RNAi-Linien in Wurzelkulturen hergestellt werden. Von den 18 transgenen *3'CoT\_RNAi*-Linien zeigten fünf einen RNAi-Effekt (qRT-PCR-Messungen). Dies entspricht etwa 27 % der Linien. Bei den *5'SuT\_RNAi*-Linien zeigten alle acht vorhandenen Linien einen RNAi-Effekt (Abb. 37 und 38). Verringerte sich die Transkriptmenge des Zielgenes um 50 % wurde ein erfolgreiches „*silencing*“ angenommen (RNAi-Effekt). Als Vektorkontrolle wurde ein Fragment der *GFP*-Sequenz (GFPi) in den verwendeten RNAi-Vektor kloniert.

Die beiden AMS-regulierten TFs *MtNTS* und *MtDES* sollten ebenfalls durch RNAi funktionell untersucht werden. Von den verfügbaren Linien zeigte jedoch keine einen RNAi-Effekt. Da TFs an einer Vielzahl verschiedener Entwicklungsprozesse beteiligt sind, sind *MtNTS* und *MtDES* möglicherweise nicht nur für die Ausbildung der AMS wichtig. Zusätzlich haben sie eventuell eine weitere, von der AMS unabhängige und für

das Überleben der Pflanze essentielle, Aufgabe. Erhärtet wird diese Vermutung dadurch, dass die Transkripte von *MtNTS* und *MtDES* auch in nicht mykorrhizierten Wurzeln auf einem niedrigem Level nachgewiesen werden kann. Im Falle von *MtDES* ist die Transkription sogar in allen anderen Pflanzenorganen im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Wurzeln verstärkt. Für den Fall, dass dieser TFs essentiell für die Entwicklung der Pflanze ist, wäre es nicht verwunderlich, dass es nicht möglich war, transgene Pflanzen herzustellen aus denen dann Wurzelkulturen angelegt worden wären, die in diesen Genen einen RNAi Effekt zeigten. Die Transkripte von *MtCoT* und *MtSuT* sind zwar auch in nicht mykorrhizierten Wurzeln nachweisbar (Daten nicht gezeigt), diese Proteine spielen aber eventuell keine essentielle Rolle in der Entwicklung der Pflanze.

#### *Vergleich der Transkription zwischen in vivo- und in vitro-Kulturen*

Um zu überprüfen, inwieweit die transkriptionelle Regulation der auf der RNAi-qRT-PCR-Plattform vorhandenen Gene sich unter *in vitro*-Bedingungen von denen der *in vivo*-Kultur unterscheidet, wurden die qRT-PCR-Daten der Vektorkontrolle mit denen der *in vivo*-Messungen aus Kapitel 4.2 verglichen. Die generellen Wachstumsbedingungen der Wurzel in den *in vitro*-Kulturen unterscheiden sich von denen der *in vivo*-Kulturen. Es fehlt der Spross und dadurch die photosynthetisch aktiven Bereiche, die sowohl in der systemischen Regulation der Transkription als auch in der Translation eine Rolle spielen. Dadurch ist neben der Aufnahme von Vitaminen auch die von Saccharose aus dem Medium über die Zellwand nötig. Dies stellt einen gewichtigen Einfluss auf den Metabolismus dar. Besonders auf den Zuckermetabolismus, der durch die AMS ein weiteres mal beeinflusst wird.

Durch den Vergleich der Transkriptionswerte wird deutlich, dass elf Gene in den *in vitro*-Kulturen im Vergleich zu den *in vivo*-Kulturen signifikant unterschiedlich exprimiert werden (Abb. 41). Besonders im Falle des TFs *MtSF*, eines bHLH (basic Helix-Loop-Helix) ähnlichen TFs, ist ein deutlicher Unterschied zu erkennen. Während dieser TF in den *in vivo*-Kulturen hochreguliert ist ( $\emptyset$  LFC von 10,4), ist er in den *in vitro*-Kulturen herunterreguliert. Eventuell spielen bei diesem TF systemische Signale aus dem Spross eine Rolle und der TF ist nur indirekt über Signale aus dem Spross AMS-reguliert. Ebenso wie *MtMlo2*, *MtNBS* und *MtSyr*, die *in vitro* ebenfalls nicht mehr reguliert zu sein scheinen. Aus welchem Grund *MtSF* sogar geringer in mykorrhizierten Wurzelkulturen transkribiert wird als in nicht mykorrhizierten, darüber kann nur spekuliert werden. Eventuell wird *MtSF* durch ein Signalmolekül innerhalb der mykorrhizierten Wurzel in seiner Transkription unterdrückt, was aber während der AMS durch ein hypothetisches

systemisches Signal aus dem Spross wiederum unterdrückt wird. Dieses Signal fehlt aber wahrscheinlich in den Wurzelkulturen. Dadurch ist dann *MtSF* in mykorrhizierten Wurzelkulturen wahrscheinlich geringer transkribiert als in nicht mykorrhizierten. Die restlichen Gene (*MtDES*, *MtGST1*, *MtLec8*, *MtLec9*, *MtSTP*, *MtTi1* und TC72546) sind mit der selben Tendenz reguliert wie *in vivo*. Einige Gene scheinen also in den *in vitro*-Kulturen keine so gewichtige Rolle in der Regulation (*MtDES* und *MtSF*, als TFs) oder Aufrechterhaltung der Symbiose zu spielen (*MtGST1*, *MtMlo2*, *MtNBS*, *MtLec8*, *MtLec9*, *MtSTP*, *MtSyr* und *MtTi1*). Ob dies an der veränderten Nährstoffzufuhr für die Wurzel, oder wie bereits erwähnt an fehlenden systemischen Signalen, z. B. aus dem Spross liegt, müsste noch weiter untersucht werden. Die restlichen 25 gemessenen Transkripte sind jedoch nicht signifikant reguliert (Abb. 52), d. h. sie zeigen das selbe Transkriptionsmuster während der AMS in mykorrhizierten Wurzelkulturen und Wurzeln. Für acht Transkripte (*MtERF2*, *MtHistone*, *MtMyb*, *MtNSPII*, *MtRemorin*, *MtUriKin* und *MtZnF*) lagen keine *in vivo*-Daten vor. Zu den Genen, die keine signifikante Veränderungen in ihrer Transkription in beiden Kulturen zeigen gehören neben den beiden untersuchten Transportern (*MtCoT* und *MtSuT*) ebenso die AMS-Markergene (*Gi18s*, *GiActin*, *GiGlom*, *MtPt4*). Somit kann die Auswirkung der RNAi der beiden Transporter auf die Mykorrhizierung untersucht und auch, unter Vorbehalt, auf *in vivo*-Kulturen übertragen werden. Zur Bestätigung der Ergebnisse sollten die Versuche mit *in vivo*-RNAi-Kulturen, oder besser mit „*knock-out*“-Mutanten, wiederholt werden. Zu bedenken ist weiterhin, dass die Transkriptmenge generell für die untersuchten Gene eher niedriger ist als in den *in vivo*-Kulturen. Dies könnte auch mit dem deutlich höheren Alter der *in vitro*-Kulturen in Zusammenhang stehen. Während die *in vivo*-Kulturen nach drei Wochen geerntet wurden, waren die *in vitro*-Kulturen bei der Ernte 13 Wochen alt (Vergleich Kapitel 3.1.3). Das kann auch ein Grund für die Unterschiede in der Regulation der genannten elf Gene sein (Abb. 41). Diese Gene könnten auch in der Ausbildung und Regulation früherer Ereignisse der Symbiose eine Rolle spielen. Diese treten aber, auch wenn es in der AMS zu ständigen Neuinfektionen kommt, in Kulturen mit diesem Alter in geringerem Ausmaß auf, als es bei drei Wochen alten Kulturen der Fall ist.

Die LFCs der Transkripte der jeweiligen Gene aus der Vektorkontrolle wurden mit Hilfe einer Pearson-Korrelation gruppiert (Abb. 42). Wenn ein Schwellenwert von 1,5 für die euklidische Distanz angewendet wird, ergeben sich zwölf größere Gruppen von Genen die in ihrer Transkription in den acht Replikaten korrelieren. In der größten Gruppe befinden sich dabei unter Anderem die Transporter *MtCoT* und *MtSuT* sowie die

Markergene *GiGlom* und *MtPt4*. Die Transkription dieser Gene ist demnach in der Vektorkontrolle voneinander abhängig und je stärker die Wurzel mykorrhiziert ist, desto höher ist auch das Transkriptlevel von *MtCoT* und *MtSuT* (siehe Abb. 37 und 38). Die Transkription dieser Gene ist also von einem gemeinsamen Regulationsprozess abhängig. In welcher Weise die Gene sich gegenseitig regulieren und welche die vorgeschalteten und nachgeschalteten Prozesse sind, kann aus diesen Untersuchungen nicht erkannt werden. Wie sich jedoch ein gezieltes „silencing“ von *MtCoT* oder von *MtSuT* auf die Transkription der weiteren Gene auswirkt wird im nächsten Abschnitt diskutiert.

#### *RNAi von MtCoT*

In den RNAi-Linien des Kupfertransporters *MtCoT* liegt die im oberen Abschnitt erwähnte gemeinsame Koregulation nicht mehr vor (Abb. 37; Clusteranalyse-Daten nicht gezeigt). *MtCoT* ist im Falle der RNAi-Linien nicht mehr mit den Markergenen oder *MtSuT* koreguliert, sondern nur noch mit dem TF *MtMyb* sowie mit *MtLec11*, *MtNSPII* und mit *MtSTP*. *MtSTP* ist aber durch die signifikante Veränderung der Transkription (Abb. 41) in den *in vitro*-Kulturen im Vergleich zu den *in vivo*-Kulturen von geringerem Interesse. Die Markergene für eine Mykorrhizierung (*Gi18s*, *GiActin*, *GiGlom* und *MtPt4*) sind weiterhin untereinander koreguliert. Diese sind jedoch alle in den RNAi-Linien geringer transkribiert als in der Vektorkontrolle, was generell auf alle gemessenen Transkripte zutrifft (Daten nicht gezeigt). Zu den Genen die nach einem t-Test signifikant ( $p$ -Wert < 0,05) unterschiedlich transkribiert waren, gehören neben einem *G. intraradices*-Markergen (*Gi18s*) und dem durch die RNAi herunterregulierte *MtCoT* auch *MtERF*, *MtLLK*, *MtNTS*, *MtRemorin* und *MtUriKin* (Abb. 43).

Weitere AM-Markergene sind zwar nach einem t-Test nicht signifikant reguliert, jedoch in 80 % der gemessenen RNAi-Linien im Vergleich zur Vektorkontrolle um mindestens das Vierfache herunterreguliert. Dies sind namentlich neben *Gi18s* auch *GiActin* als weiteres *G. intraradices*-Markergen, *MtPt4* als AMS-Markergen und zusätzliche Gene die diese Kriterien erfüllen (Abb. 43; markiert mit „◇“ und „\*“). Zu den Genen die keinen signifikanten Unterschied in ihrer Transkription zwischen 3'CoT\_RNAi und GFPi\_RNAi zeigen und damit nicht signifikant durch die RNAi und die verringerte Mykorrhizierung in ihrer Transkription beeinflusst werden, zählen *MtMlo2*, *MtNBS*, *MtPlp*, *MtPPK*, *MtPta*, *MtRemorin*, *MtSuT*, *MtSyr* und *MtUriKin*. Diese Gene scheinen also auf einem anderen Signalweg aufbauend in ihrer Transkription während der AMS reguliert zu sein.

Falls, ähnlich wie *MtPt4* für Phosphat, *MtCoT* ein Transporter ist, der Kupfer aus der PAS aufnimmt und über die PAM in die Pflanzenzelle transportiert, liegt die Vermutung nahe, dass die Pflanze auch die Versorgung mit anderen Mineralstoffen außer Phosphat kontrolliert. Gegebenenfalls kann dann die Symbiose, falls die Mineralstoffzufuhr nicht dem von der Pflanze gewünschten Ausmaß entspricht, beendet, bzw. verringert werden (Ryan und Graham, 2002; Javot *et al.*, 2007b). Diese Verringerung der Kolonisierung durch *G. intraradices* klingt insofern wahrscheinlich, da nicht nur die Menge an *G. intraradices*-RNA (*GiActin*, *Gi18s*) geringer ist, sondern auch die Symbiose an sich in geringerem Maße ausgebildet wird (*MtPt4*). Das Wachstum des Pilzes ist, wahrscheinlich durch die geringere Versorgung mit Kohlenhydraten, ebenfalls schwächer. Es werden auch eine Vielzahl von in die Symbiose involvierten und mit der RNAi-Plattform gemessenen Gene in niedrigerer Menge transkribiert. Die Pflanze scheint also nicht nur den Phosphatgehalt innerhalb der Zelle zu messen (Rubio *et al.*, 2001; Bari *et al.*, 2006), sondern auch den Kupfergehalt, und davon in gewissem Maße den Nutzen der Symbiose abhängig zu machen und sie gegebenenfalls zu beenden oder verringern. In dem gegebenen Fall kann die Pflanze das von dem AM-Pilz zur Verfügung gestellte Kupfer nicht mehr aus dem PAS aufnehmen und ist dadurch in der Kupferversorgung gestört. Die Versorgung der Pflanze mit Kupfer fällt dadurch möglicherweise unter einen kritischen Wert und es werden Signalwege aktiviert, welche die verstärkte Expression von Mineralstofftransporten in der Rhizodermis und das Beenden der AMS zur Folge haben könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein „*silencing*“ von *MtCoT*, möglicherweise auf ähnlichem Signalweg wie bei *mtpt4*, zu einer Verringerung der Symbiose führt. Einige Gene sind in ihrer Transkription nicht direkt beeinflusst. Dies erhärtet ein weiteres Mal die Vermutung, dass die Symbiose über zwei Signalwege reguliert wird, die teilweise unabhängig voneinander sind.

#### *RNAi von MtSuT*

Eine Datenbanksuche mit der Proteinsequenz von *MtSuT* ergab, dass MtSUT als genereller Zuckertransporter bei InterPro annotiert ist (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Vergleiche mit bereits annotierten Proteinen bei Uniprot (<http://www.uniprot.org/>) zeigte, dass *MtSuT* die größte Ähnlichkeit mit einem Inositoltransporter hat, der ebenfalls zu den Zuckertransportern gehört. Eine *in silico*-Suche zur subzellulären Lokalisierung des Proteins ergab eine wahrscheinliche Lokalisierung als membranständiges Protein (WoLF PSORT, <http://wolfpsort.org/>).

Inositol (*myo*-Inositol) wird über *myo*-Inositol-3-Phosphat (Ins3P) aus Glucose-6-Phosphat synthetisiert. *Myo*-Inositol selbst ist unter anderem am Aufbau von Raffinosen (Karner *et al.*, 2004) und von Polysacchariden für die Zellwandsynthese (Loewus, F; 2006) sowie der Membranbiogenese beteiligt (Collin *et al.*, 1999). Zusätzlich ist Phosphatidylinositol, das durch die Pflanze aus *myo*-Inositol synthetisiert wird, ein wichtiger Bestandteil aller eukaryotischen Membranen und an der Signaltransduktion  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Phosphorylierungen von Proteinen beteiligt (Collin *et al.*, 1999). Ins3P, das auch in umgekehrter Weise von der Pflanze aus *myo*-Inositol synthetisiert wird, wird u. a. in Phytinsäure umgewandelt. Dieses wird durch mehrfache Phosphorylierung als Phosphatspeicherstoff von der Pflanze verwendet (Rasmussen *et al.*, 2010). MtSUT könnte somit als Transporter an der Bereitstellung von *myo*-Inositol beteiligt sein. Dieses wird eventuell benötigt um in arbuskelhaltigen Zellen den durch das Ausformen der PAM erhöhten Bedarf an membranspezifischen Molekülen zu decken. Zusätzlich könnte es über Phosphatidylinositol an zellspezifischen Antworten auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen beteiligt sein. Möglich wäre auch, dass Inositol als Vorstufe von Ins3P für die Synthese der Phytinsäure benötigt wird, um den erhöhten Phosphatgehalt in arbuskelhaltigen Zellen zu binden.

In den RNAi-Linien des Zuckertransporters *MtSuT* lag eine Koregulation von *MtSuT* mit *MtPt4* oder auch *GiGlom* nicht mehr vor (Abb. 38; Clusteranalysedaten nicht gezeigt). Durch den RNAi-Effekt scheint *MtSuT* mit keinem der gemessenen Genen mehr koreguliert zu sein. Die Mehrzahl der Gene war in den RNAi-Linien herunterreguliert (Abb. 43). Zu den über einen t-Test signifikant regulierten Genen zählte neben anderen auch das *G. intraradices*-Markergen *GiGlom*. Erwähnt werden sollte zusätzlich noch *MtNSPII*, ein für die Nodulation der Wurzel wichtiger GRAS-TF. Er spielt eventuell eine nachgeschaltete Rolle im „sym“-Signalweg und könnte die Unterscheidung zwischen AMS und Wurzelknöllchensymbiose vermitteln (Maillet *et al.*, 2011). *MtNSPII* ist im Vergleich zur Vektorkontrolle in *5'SuT\_RNAi* massiv herunterreguliert. Die geringere Transkription in *5'SuT\_RNAi* macht Sinn, da *MtNSPII* in der Regulation der AMS eine Rolle spielt und es in *5'SuT\_RNAi* zu einer Verringerung der Mykorrhizierung kommt. Durch die Herunterregulierung von *MtSuT* nahm auch die Mykorrhizierung ab (Abb. 43). *MtPt4* war im Mittel 16-fach herunterreguliert, jedoch nicht mathematisch signifikant (t-Test). *GiGlom*, *Gi18s* und *GiActin* waren ebenfalls in diesem Ausmaß herunterreguliert, wobei nur *GiGlom* signifikant reguliert war. Sollte *MtSuT* wie oben erwähnt ein Inositol-transporter sein, so könnte es durch die mangelhafte Versorgung der arbuskelhaltigen Zelle mit Membran- bzw. Zellwandbausteinen zu Problemen in der Entwicklung der

PAM oder auch des PPA kommen und damit auch nicht zu einer effektiven Ausformung der Symbiose. In dem Fall, dass Phosphatidylinositol an der  $Ca^{2+}$ -Oszillation (Kosuta et al., 2008) beteiligt ist, könnte dies die niedrigere Transkription von *MtNSP11* erklären, da dieses der Oszillation nachgeschaltet ist, was wiederum die Ausformung der Symbiose beeinträchtigen würde. Warum einige Gene auf demselben Level exprimiert werden wie in der mykorrhizierten Vektorkontrolle, könnte an einem weiteren, SYM-unabhängigen, Signalweg liegen (Kosuta et al., 2003; Siciliano et al., 2007). Generell kann die Pflanze vom AM-Pilz bei herunterreguliertem *MtSuT* nicht im selben Maße kolonisiert werden wie im Wildtyp

#### *Schlussbetrachtung zur RNAi*

Der TF *MtERF* und das für ein Lektin kodierende *MtLec10* scheinen eine besondere Rolle in der AMS zu spielen, da beide in den 5'SuT\_RNAi und den 3'CoT\_RNAi-Linien im Vergleich zur mykorrhizierten Vektorkontrolle in ihrer Transkriprate signifikant herunter reguliert gewesen sind (Abb. 43). Sie könnten demnach in eine allgemeine Antwort auf eine bereits etablierte Mykorrhizierung verwickelt sein. *MtPPK* war nur in der RNAi Linie von 5'SuT\_RNAi transkriptionell beeinflusst (Abb. 43) und scheint daher möglicherweise direkt von dem Vorhandensein von MtSUT abhängig zu sein. Hinzu kommt, dass dieses Gen nur in arbuskelhaltigen Zellen transkribiert wird und wahrscheinlich im Nukleus lokalisiert ist.

## **5.4. Überblick und Ausblick**

Die durchgeführten Studien belegen eine AMS-Regulation einer Vielzahl von Genen. Darunter sind eine Vielzahl an TFs, die hier erstmals als AMS-reguliert beschrieben wurden.

Bei den auf ihre Promotoraktivität untersuchten TFs (*MtNTS*, *MtDES* und *MtOFTN*) stellte sich eine Aktivität in arbuskelhaltigen oder benachbarten Zellen heraus.

*MtNTS*\_Prom ist aktiv in arbuskelhaltigen und in wenigen nicht arbuskelhaltigen Zellen. Das Transkript von *MtNTS* ist beschränkt auf die Wurzeln von *M. truncatula* und in mykorrhizierten Wurzeln hochreguliert und spielt in den Wurzelknöllchen keine Rolle. Ist die AMS durch den RNAi-Effekt in 5'SuT\_RNAi verringert, scheint die Expression von *MtNTS* dabei jedoch nicht beeinflusst zu sein. Im Falle von 3'CoT\_RNAi ist die Transkription von *MtNTS* signifikant verringert. Dies deckt sich mit der Clusteranalyse der

AMS-Plattform. *MtNTS* ist im selben Cluster lokalisiert wie *MtCoT* und nicht in dem Cluster von *MtSuT*. *MtNST* ist ein TF der für die Regulation eines Genes verantwortlich ist, dass in geringem Ausmaß konstitutiv in der Wurzel transkribiert wird, in mykorrhizierten Wurzeln jedoch in stärkerem Maße benötigt wird.

*MtDES\_Prom* ist in arbuskelhaltigen Zellen und den diesen benachbarten Zellen gleich aktiv. Der TF *MtDES* ist in allen Pflanzenorganen transkribiert und ist in den oberirdischen Pflanzenteilen sogar stärker transkribiert als in mykorrhizierten Wurzeln. Das geringste Transkriptlevel war in nicht mykorrhizierten Wurzeln nachweisbar. In den RNAi Linien von 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi ist *MtDES* in geringem Maße schwächer transkribiert als in der Vektorkontrolle, jedoch nicht signifikant. Die Transkription von *MtDES* in Wurzeln scheint also vom allgemeinen Vorhandensein einer gut ausgebildeten AMS abhängig zu sein. In der Clusteranalyse der GFPi\_RNAi-Linien ist *MtDES* auch im selben Cluster präsent wie *MtCoT* und *MtSuT*.

*MtOFTN\_Prom* ist nur in arbuskelhaltigen Zellen aktiv und das Transkript von *MtOFTN* ist nach 21 dpi nur in mykorrhizierten Wurzeln nachweisbar. *MtOFTN* scheint also mykorrhiza- und arbuskelspezifisch zu sein. In den RNAi Linien von 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi ist *MtOFTN* um ein vielfaches geringer transkribiert als in der Vektorkontrolle. In 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi wird die Wurzel geringer von *G. intraradices* kolonisiert, dadurch auch weniger Arbuskeln ausgebildet - was dazu führt, dass auch der arbuskelspezifische TF *MtOFTN* weniger transkribiert wird.

In zukünftigen Untersuchungen der TFs könnte man sich mit Hilfe des ethanol-induzierbaren Promotorsystems oder auch einem Hefe-1-Hybrid-System („*Yeast-1-Hybrid-System*“) auf die Zielgene dieser TFs konzentrieren. Das induzierbare Promotorsystem gibt die Möglichkeit zur Untersuchung von nachgeschalteten Genen oder Ereignissen von AMS-regulierten Genen, unabhängig von einer tatsächlichen AMS. Transgene Wurzelkulturen von *M. truncatula*, die ein Konstrukt mit einem TF tragen, der unter der Kontrolle eines durch Ethanolzugabe induzierbaren Promotors steht, wurden für die TFs *MtNTS* und *MtDES* hergestellt. Die Durchführung einer Affimetrix-Gene-Chip-Hybridisierung, die im Gegensatz zu der TF-Profiling-Plattform nicht nur TFs umfasst, kann einen umfassenden Einblick in die Signalkaskade geben, die von den jeweiligen AMS-regulierten TFs ausgelöst bzw. reguliert wird. Sollte dieses System erfolgreich angewendet werden, so könnte es auch für Genen, z. B. Kinasen, eingesetzt werden, um ihre Funktion während der Symbiose zu klären. Auch könnte die hier vorgestellte AMS-Plattform angewendet werden um im geringeren Ausmaß Einblicke in die Signalkaskade, welche dem TF nachgeschaltet ist, zu erlangen.

Das Material für diese Untersuchungen von *MtNTS\_EtOH* und *MtDES\_EtOH* wurde im Laufe dieser Arbeit hergestellt und liegt vor.

Um auch die dem TF vorgeschalteten Gene zu identifizieren, könnte neben einem weiteren RNAi *in vivo*-Versuch auch TNT1-Insertionslinien verwendet werden. Für *MtNTS* liegen diese Insertionslinien vor, wurden jedoch noch nicht untersucht. Im Falle von *MtDES* produzieren die Linien keine Samen (Wen, Noble Foundation, persönliche Kommunikation), was durch die Relevanz des TFs auch in anderen Pflanzenorganen nicht verwunderlich ist.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Aktivität des Promotors eines Ammoniumtransporter von *M. truncatula* als arbuskelspezifisch beschrieben. Für diesen AMS-regulierten Ammoniumtransporter liegen TNT1-Insertionslinien vor. Zusätzlich zu einer subzellulären Proteinlokalisierungsstudie könnte dies aufschlussreich für die Bestimmung der Funktion von *MtAmT* sein. In 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi ist *MtAmT* schwächer transkribiert.

Bei der erstmals untersuchten Kinase (*MtPPK*), dessen Promotor in ausgewählten arbuskelhaltigen Zellen aktiv ist, wäre es zusätzlich aufschlussreich zu untersuchen welche Proteine phosphoryliert werden. In 5'SuT\_RNAi ist *MtPPK* geringer transkribiert in 3'CoT\_RNAi jedoch in seiner Transkription nicht beeinflusst. Damit zeigt *MtPPK* ein entgegengesetztes Verhalten in seiner Transkription als *MtNTS*. *MtPPK* scheint also eventuell in der Signalketten *MtSuT* nachgeschaltet eine Rolle zu spielen.

Eine Promotoraktivitätsstudie des AM-regulierten, eventuell in den Mineralstoffhaushalt involvierten *MtMDRL* lieferte kein eindeutiges Ergebnis. Eine Proteinlokalisierung von *MtMDRL* könnte aufschlussreich sein, um die subzelluläre Lokalisation zu klären und weitere biochemische Versuche könnten endgültig die physiologische Aufgabe von *MtMDRL* klären. In 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi ist *MtMDRL* niedriger transkribiert als in der Vektorkontrolle, wobei dieser Effekt stärker in 5'SuT\_RNAi zu sehen ist, als in 3'CoT\_RNAi. Falls, wie spekuliert *MtMDRL* für einen Zell-Zell-Mineralstofftransporter codiert, dessen Transkription von der Mineralstoffkonzentration in der Zelle (in diesem Fall Eisen) abhängt sollte dieser, wie gemessen, durch die verringerte Mineralstoffzufuhr durch die verringerte AMS geringer transkribiert werden als in der Vektorkontrolle.

Die beiden *in vitro*-RNAi-Versuche mit Genen *MtCoT* (möglicher Kupfertransporter) und *MtSuT* (möglicher Zucker- oder Inositoltransporter) zeigten, dass eine durch RNAi hervorgerufene Herunterregulierung des Transkriptlevels sowohl von *MtCoT*, als auch von *MtSuT* eine Verringerung der Mykorrhizierung und der *G. intraradices*-RNA-Menge

zur Folge hat. Damit einhergehend werden auch eine Vielzahl von AMS-regulierten Genen geringer transkribiert, wobei Unterschiede im Transkriptom von 5'SuT\_RNAi und 3'CoT\_RNAi zu erkennen sind und somit auf eine unterschiedliche transkriptionelle Regulation, die zur Beendigung der Symbiose führt, zu schließen ist. Zusätzlich sollte noch eine mikroskopische phänotypische Untersuchung oder Auszählung der Mykorrhizaparameter durchgeführt werden, um mögliche Unterschiede in Form und Aussehen der Mykorrhizierung zwischen den *GFPi\_RNAi* und den RNAi- Linien zu entdecken. Das Material liegt vor und ist bereit zur Untersuchung.

*MtCoT* und *MtSuT* sollten weiter auf ihre physiologische Aufgabe hin untersucht werden und es sollten *in vivo*-RNAi-Kulturen hergestellt werden um die *in vitro*-Ergebnisse zu bestätigen. Im Hinblick auf ihre physiologische Aufgabe wären unter anderem Heferversuche erforderlich. In Kupfertransporter defizitären Hefestämmen könnte *MtCoT* kloniert werden und gegebenenfalls diese Aufgabe übernehmen. Damit könnte gezeigt werden, dass MtCOT tatsächlich ein Kupfertransporter ist. Des Weiteren sollten Lokalisierungsstudien sowohl des Proteins, als auch des Promotors, welcher erst noch identifiziert werden müsste, durchgeführt werden. Im speziellen Fall der RNAi-Linien sollte noch der Nachweis des Nichtvorhandenseins des MtCOT Proteins über Antikörper erbracht und Messungen des Kupfergehalts in der Pflanze durchgeführt werden. Um zu klären welche Rolle *MtSuT* in der Symbiose spielt, wäre es essentiell mittels Frosch-Oozyten zu untersuchen, welches Molekül genau transportiert wird und ebenfalls, in welcher Membran MtSUT lokalisiert ist. Auch hier wäre es, wie im Falle von *MtCoT*, zusätzlich notwendig den Promotor zu identifizieren und ebenso Antikörperuntersuchungen durchzuführen.

# 6. Zusammenfassung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit erstmals, neben MtPT4 ein weiterer AM-regulierter Transporter beschrieben wurden, dessen Expression über eine Rückkopplung direkt die Ausbildung der AMS zu beeinflussen scheint. Wird *M. truncatula* durch die verringerte Transkription von *MtCoT* nicht ausreichend durch den AM-Pilz mit Kupfer versorgt, so verringert die Pflanze die AMS mit *G. intraradices*.

Mit MtSUT wurde ein weiterer Transporter beschrieben der eine wichtige Rolle in der Ausbildung der AMS spielt und dessen durch RNAi verringerte Transkription die Kolonisation durch *G. intraradices* erschwert. Diese Kenntnisse geben Einblicke in die Regulation von Transportern in *M. truncatula* in der AMS und deren Rolle in der Ausbildung der AMS.

Des Weiteren wurden eine Vielzahl von TFs erstmals als AMS-reguliert beschrieben und deren Transkription mit der in verschiedenen Pflanzenorganen und in der Wurzelknöllchensymbiose und während einer Pathogeninfektion verglichen. So wurde gezeigt, dass die AMS neben spezifischen TFs, einige regulierte TFs in *M. truncatula* mit der Wurzelknöllchensymbiose teilt. Jedoch keine mit der als beispielhaft gewählten Pathogeninfektion mit *A. euteiches*.

Weiterhin wurden für drei TFs und drei weitere Gene erstmals der Zelltyp beschrieben in dem deren Promotoren aktiv sind. Dabei stellte sich heraus, dass einige der Promotoren spezifisch in arbuskelhaltigen Zellen aktiv sind.

Die beschriebenen Ergebnisse erweitern das Wissen und das Verständnis über die molekularbiologischen Grundlagen der AMS in *M. truncatula*. Des Weiteren geben sie Anhaltspunkte für weitere Untersuchungen, um die Kenntnisse über die AMS zu erweitern und so zu verstehen auf welche Art und Weise die AM während der Symbiose die Nährstoffaufnahme verbessert. Diese Kenntnisse könnten später im Anbau von Nutzpflanzen eingesetzt werden und so die Aufnahme von Nährstoffen aus dem Boden bei geringerer Düngung des Ackerbodens verbessert werden.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aida M., Ishida T., Fukaki H., Fujisawa H. und Tasaka H.:** Genes involved in organ separation in Arabidopsis: an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant. *The Plant cell* (1997) vol. 9 (6) pp. 841-57
- Akiyama K., Matsuzaki K. und Hayashi, H.:** Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* (2005) vol. 435 (7043) pp. 824-827
- Alexander T., Toth R., Meier R. und Weber H. C.:** Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, and tomato with reference to vesicular– arbuscular mycorrhizae in grasses. *Canadian journal of botany* (1989) vol. 67 (8) pp. 2505-2513
- Andriankaja A., Boisson-Dernier A, Frances L., Sauviac L., Jauneau A., Barker D. G. und Carvalho-Niebel F.:** AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent Mt ENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif. *Plant Cell* (2007) vol. 19 (9) pp. 2866-85
- Ané J.-M., Kiss G. B., Riely B. K., Penmetsa R. V., Oldroyd G. E. D., Ayax C., Lévy J., Debelle F., Baek J.-M., Kalo P., Rosenberg C., Roe B. A., Long S. R., Dénarié J. und Cook D. R.:** *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* (2004) vol. 303 (5662) pp. 1364-7
- Augé R. M.:** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* (2001) vol. 11 (1) pp. 3-42
- Azcón-Aguilar C., und Barea J. M.:** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens – an overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* (1997) vol. 6 (6) pp. 457-464
- Bago B., Zipfel W., Williams R. M., Jun J., Arreola R., Lammers P. J., Pfeffer P E. und Shachar-Hill Y.:** Translocation and utilization of fungal storage lipid in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant physiology* (2002) vol. 128 (1) pp. 108-124
- Balestrini R., Gomez-Ariza J., Lanfranco L. und Bonfante P.:** Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol Plant Microbe Interact* (2007) vol 20 (9) pp 1055–1062
- Bari R., Datt Pant B., Stitt M. und Scheible W.-R.:** PHO2, MicroRNA399, and PHR1 Define a Phosphate-Signaling Pathway in Plants. *Plant Physiology* (2006) vol. 141 (3) pp. 988-999

- Barker D. G., Bianchi S., Blondon F., Dattée Y., Duc G., Essad S., Flament P., Philippe Gallusci, Génier G., Guy P., Muel X., Tourneur J., Dénarié J. und Huguet T.:** *Medicago truncatula*, a model plant for studying the molecular genetics of the Rhizobium-legume symbiosis. *Plant Molecular Biology Reporter* (1990) vol. 8 (1) pp. 40-49
- Barker D. G., Pfaff T., Moreau D., Groves E., Ruffel S., Lepetit M., Whitehand S., Maillet F., Nair R. und Journet E.:** Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions. In: *Medicago truncatula* handbook (2006) <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/GrowingMedicagotruncatula.pdf>
- Benedito V.A., Torres-Jerez I., Murray J.D., Andriankaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He J., Dai X., Zhao P.X., Tang Y. und Udvardi M.K.:** A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* (2008) vol. 55 (3) pp. 504-513
- Bianciotto V. und Bonfante P.:** Quantification of the nuclear DNA content of two arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* (1992) vol. 96 (12) pp. 1071-1076
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Rosenberg C. und Barker D. G.:** *Agrobacterium rhizogenes*-based transformation of *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interaction* (2001)
- Bonfante P., und Perotto S.:** Tansley Review No. 82 Strategies of Arbuscular Mycorrhizal Fungi when Infecting Host Plants. *New Phytologist* (1995) vol. 130 (1) pp. 3-21
- Branscheid A., Sieh D., Pant B. D., May P., Devers E. A., Elkrog A., Schauser L., Scheible W. R. und Krajinski F.:** Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol Plant Microbe Interact* (2010) vol. 23 (7) pp. 915-26
- Brundrett M.C.:** Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytologist* (2002) vol. 154 (2) pp. 275-304
- Burleigh S. H. und Harrison M. J.:** The down-regulation of Mt4-like genes by phosphate fertilization occurs systemically and involves phosphate translocation to the shoots. *Plant physiology* (1999) vol. 119 (1) pp. 241-248
- Chabaud M., Boisson-Dernier A., Zhang J., Taylor C. G., Yu O. und Barker D. G.:** *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. *Medicago truncatula* handbook (2006) <http://www.noble.org/medicagohandbook/>

- Chabaud M, Ratet P., Sousa Araújo S., Roldão Lopes A. S., Duque A., Harrison M. und Barker D. G.:** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and in vitro plant regeneration of *M. truncatula* (2007) <http://www.noble.org/medicagohandbook/>
- Clark R.B. und Zeto S.K.:** Mineral acquisition by arbuscular mycorrhizal plants. *Journal of Plant Nutrition* (2000) vol. 23 (7) pp. 867-902
- Collin S., Justin A.-M., Cantrel C., Arondel V., und Kader J.-C.:** Identification of AtPIS, a phosphatidylinositol synthase from Arabidopsis. *Eur. J. Biochem.* (1999) 262 (3) pp. 652–658
- Croll D., Giovannetti M., Koch A. M., Sbrana C., Ehinger M., Lammers P. J. und Sanders I. R.:** Nonself vegetative fusion and genetic exchange in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytol* (2009) vol. 181 (4) pp. 924-37
- Doll J., Hause B., Demchenko K., Pawlowski K. und Krajinski F.:** A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. *Plant Cell Physiol* (2003), vol. 44 (11) pp. 1208-14
- Drissner D., Kunze G., Callewaert N., Gehrig P., Tamasloukht M., Boller T., Felix G., Amrhein N. und Bucher M.:** Lyso-phosphatidylcholine is a signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Science* (2007) vol. 318 (5848) pp. 265-8
- Endre G., Kereszt A., Kevei Z., Mihacea S., Kaló P. und Kiss G.B.:** A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature* (2002) vol. 417 (6892) pp. 962-6
- Feddermann N., Boller T., Salzer P., Elfstrand S., Wiemken A. und Elfstrand M.:** *Medicago truncatula* shows distinct patterns of mycorrhiza-related gene expression after inoculation with three different arbuscular mycorrhizal fungi. *Planta* (2008) vol. 227 (3) pp. 671-80
- Frenzel A., Manthey K., Perlick A. M., Meyer F., Pühler A., Küster H. und Krajinski F.:** Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific *Medicago truncatula* Lektin genes. *Mol Plant Microbe Interact* (2005) vol. 18 (8) pp. 771-82
- Ferrol, N. und Pérez-Tienda, J.:** Coordinated Nutrient Exchange in Arbuscular Mycorrhiza. *Mycorrhiza functional processes and ecological impact* (2009) pp.73-87
- Fester T., Strack D. und Hause B.:** Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* (2001) vol. 213 (6) pp. 864-868
- Gaude, N., Bortfeld, S., Duensing, N., Lohse, M. und Krajinski, F.:** Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive

and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* (2012), 69 (3) pp 510–528

**Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P. und Barker D.G.:** Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* (2005) vol. 17 (12) pp. 3489-99

**Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M. und Gianinazzi S.:** Differential activation of H<sup>+</sup>-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* (2000) vol. 211 (5) pp. 609-13

**Gianinazzi-Pearson V., Maldonado- Mendoza I., Lopez- Meyer M., Weidmann S., und Harrison M. J.:** Arbuscular Mycorrhiza. In: *Medicago truncatula* handbook version November 2006. Available: <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/ArbuscularMycorrhiza.pdf>

**Glass N. L., Rasmussen C., Roca M. G. und Read N.D.:** Hyphal homing, fusion and mycelial interconnectedness. *Trends Microbiol* (2004) vol. 12 (3) pp. 135-41

**Gleason C., Chaudhuri S., Yang T., Muñoz A., Poovaiah B. W. und Oldroyd G. E. D.:** Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* (2006) vol. 441 (7097) pp. 1149-52

**Govindarajulu M., Pfeffer P. E., Jin H., Abubaker J., Douds D. D., Allen J. W., Bücking H., Lammers P. J. und Shachar-Hill Y.:** Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* (2005) vol. 435 (7043) pp. 819-23

**Guether M., Neuhäuser B., Balestrini R., Dynowski M. und Ludewig U. und Bonfante P.:** A Mycorrhizal-Specific Ammonium Transporter from *Lotus japonicus* Acquires Nitrogen Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Plant Physiology* (2009) vol. 150 (1) pp. 73-83

**Gunsalus R. P. und Yanofsky C.:** Nucleotide sequence and expression of *Escherichia coli* trpR, the structural gene for the trp aporepressor. *Proc Natl Acad Sci USA* (1980) vol. 77 (12) pp. 7117-21

**Gus-Mayer S., Naton B., Hahlbrock K. und Schmelzer E.:** Local mechanical stimulation induces components of the pathogen defense response in parsley. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) vol. 95 (14) pp. 8398-403

**Gutjahr C., Banba M., Croset V., An K., Miyao A., An G., Hirochika H., Imaizumi-Anraku H. und Paszkowskiv U.:** Arbuscular mycorrhiza-specific signaling in rice transcends the common symbiosis signaling pathway. *Plant Cell* (2008) vol. 20 (11) pp. 2989-3005

- Harris J. M., Wais R. und Long S. R.:** Rhizobium-Induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol Plant Microbe Interact* (2003) vol. 16 (4) pp. 335-41
- Harrison M. J. und Dixon R. A.:** Spatial patterns of expression of flavonoid/isoflavonoid pathway genes during interactions between roots of *Medicago truncatula* and the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *The Plant Journal* (1994) vol. 6 (1) pp. 9-20
- Harrison M. J. und van Buuren M. L.:** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* (1995) vol. 378 (6557) pp. 626-9
- Harrison M. J.:** The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in Plant Science* (1997) vol. 2 (2) pp. 54-60
- Harrison M. J., Dewbre G. R. und Liu J.:** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* (2002) vol. 14 (10) pp. 2413-29
- Harrison M. J.:** Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol* (2005) vol. 59 pp. 19-42
- Hause B. und Fester T.:** Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* (2005) vol. 221 (2) pp. 184-96
- Heckman D. S., Geiser D. M., Eidell B. R., Stauffer R. L., Kardos N. L. und Hedges S. B.:** Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* (2001) vol. 293 (5532) pp. 1129-33
- Heupel S., Roser B., Kuhn H., Lebrun M.-H., Villalba F. und Requena N.:** Erl1, a novel era-like GTPase from *Magnaporthe oryzae*, is required for full root virulence and is conserved in the mutualistic symbiont *Glomus intraradices*. *Mol Plant Microbe Interact* (2010) vol. 23 (1) pp. 67-81
- Hijri M. und Sanders I. R.:** The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* is haploid and has a small genome size in the lower limit of eukaryotes. *Fungal Genet Biol* (2004) vol. 41 (2) pp. 253-61
- Hijri M. und Sanders I. R.:** Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei. *Nature* (2005) vol. 433 (7022) pp. 160-3
- Hirsch S., Kim J., Muñoz A., Heckmann A. B., Downie A. J. und Oldroyd G. E. D.:** GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* (2009) vol. 21 (2) pp. 545-57
- Hoagland D. und Arnon D.:** The water-culture method for growing plants without soil. *Calif. Agr. Exp. Sta. Circ.* 347 (1950)

- Hohnjec N., Vieweg M F., Pühler A., Becker A. und Küster H.:** Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus fungi* provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiology* (2005) vol. 137 (4) pp. 1283-301
- Hohnjec N., Henckel K., Bekel T., Gouzy J., Dondrup M., Goesmann A. und Küster, H.:** Transcriptional snapshots provide insights into the molecular basis of arbuscular mycorrhiza in the Modell legume *Medicago truncatula*. *Functional plant biology* (2006), 33, pp. 737-748
- Horton P., Park K.-J., Obayashi T., Fujita N., Harada H., Adams-Collier C.J und Nakai Kenta.:** "WoLF PSORT: Protein Localization Predictor", *Nucleic Acids Research*, doi:10.1093/nar/gkm259, 2007
- Hosny M., Gianinazzi-Pearson V. und Dulieu H.:** Nuclear DNA content of 11 fungal species in *Glomales*. *Genome* (1998) vol. 41 (3) pp. 422-428
- Hunter S., Apweiler R., Attwood T. K., Bairoch A., Bateman A., Binns D., Bork P., Das U., Daugherty L., Duquenne L., Finn R. D., Gough J., Haft D., Hulo N., Kahn D., Kelly E., Laugraud A., Letunic I., Lonsdale D., Lopez R., Madera M., Maslen J., McAnulla C., McDowall J., Mistry J., Mitchell A., Mulder N., Natale D., Orengo C., Quinn A. F., Selengut J. D., Sigrist C. J., Thimma M., Thomas PD., Valentin F., Wilson D., Wu C. H. und Yeats C.:** InterPro: the integrative protein signature database (2009). *Nucleic Acids Res.* 37: D223- 228.
- Imaizumi-Anraku H., Takeda N., Charpentier M., Perry J., Mitra H., Umehara Y., Kouchi H., Murakami Y., Mulder L., Vickers K., Pike J., Downie J. A., Wang T., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Yoshikawa M., Murooka Y., Wu G. J., Kawaguchi M., Kawasaki S., Parniske M. und Hayashi M.:** Plastid proteins crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. *Nature* (2005) vol. 433 (7025) pp. 527-31
- Imhof S.:** Arbuscular, ecto-related, orchid mycorrhizas—three independent structural lineages towards mycoheterotrophy: implications for classification?. *Mycorrhiza* (2009) vol. 19 (6) pp. 357-363
- James T. Y., Kauff F., Schoch C. L., Matheny B. P., Hofstetter V., Cox C. J., Celio G., Gueidan C., Fraker E., Miadlikowska J., Lumbsch H. T., Rauhut A., Reeb V., Arnold A E., Amtoft A., Stajich J. E., Hosaka K., Sung G. H., Johnson D., O'Rourke B., Crockett M., Binder M., Curtis J M., Slot J. C., Wang Z., Wilson A. W., Schüssler A., Longcore J. E., O'Donnell K., Mozley-Standridge S., Porter D., Letcher P. M., Powell M. J., Taylor J. W., White M. M., Griffith G. W., Davies D. R., Humber R. A., Morton J. B., Sugiyama J., Rossman A. Y., Rogers J. D., Pfister D.**

- H., Hewitt D., Hansen K., Hambleton S., Shoemaker R. A., Kohlmeyer J., Volkmann-Kohlmeyer B., Spotts R. A., Serdani M., Crous P. W., Hughes K. W., Matsuura K., Langer E., Langer G., Untereiner W. A., Lücking R., Büdel B., Geiser D. M., Aptroot A., Diederich P., Schmitt I., Schultz M., Yahr R., Hibbett D. S., Lutzoni F., McLaughlin D. J., Spatafora J. W. und Vilgalys R.: Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* (2006) vol. 443 (7113) pp. 818-22
- Jany J. L. und Pawlowska T. E.**: Multinucleate spores contribute to evolutionary longevity of asexual *glomeromycota*. *Am Nat* (2010) vol. 175 (4) pp. 424-35
- Javot H., Varma Penmetsa R., Terzaghi N., Cook D. R. und Harrison M. J.**: A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007a) vol. 104 (5) pp. 1720-5
- Javot H., Pumplun N. und Harrison M. J.**: Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ* (2007b) vol. 30 (3) pp. 310-22
- Johnson N., Graham J.-H. und Smith F.**: Functioning of mycorrhizal associations along the mutualism–parasitism continuum\*. *New Phytologist* (1997) vol. 135 (4) pp. 575-585
- Kakar K., Wandrey M., Czechowski T., Gaertner T., Scheible W., Stitt M., Torres-Jerez I., Xiao Y., Redman J., Wu H., Cheung F., Town C. und Udvardi M.**: A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* (2008) vol. 4 (18)
- Kaló P., Gleason C., Edwards A., Marsh J., Mitra R. M., Hirsch S., Jakab J., Sims S., Long S. R., Rogers J., Kiss G. B., Downie A. J. und Oldroyd G. E. D.**: Nodulation signaling in legumes requires *NSP2*, a member of the GRAS family of transcriptional regulators. *Science* (2005) vol. 308 (5729) pp. 1786-9
- Kanamori N., Madsen L. H., Radutoiu S., Frantescu M., Quistgaard E. M. H., Mitra H., Downie J. A., James E. K., Felle H. H., Haaning L. L., Jensen T. H., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N. und Stougaard J.**: A nucleoporin is required for induction of Ca<sup>2+</sup> spiking in legume nodule development and essential for rhizobial and fungal symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2006) vol. 103 (2) pp. 359-64
- Karner, U., Peterbauer, T., Raboy, V., Jones, D.A., Hedley, C.L. und Richter, A.**: Myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose family oligosaccharides in seeds. *J. Exp. Bot.* (2004) 55 (405), 1981–1987

- Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Shusei Sato, Takakazu Kaneko, Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb K. J., Szczyglowski K. und Parniske M.:** Seven Lotus japonicus genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* (2005) vol. 17 (8) pp. 2217-29
- Klironomos J.:** Variation in Plant Response to Native and Exotic Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Ecology* (2003) vol. 84 (9) pp. 2292-2301
- Koltai H., Kapulnik Y., Giovannetti M, Avio L. und Sbrana C.:** Fungal Spore Germination and Pre-symbiotic Mycelial Growth – Physiological and Genetic Aspects. (2010) pp. 3-32
- Koske R.:** *Gigaspora gigantea*: Observations on Spore Germination of a VA-Mycorrhizal Fungus. *Mycologia* (1981) vol. 73 (2) pp. 288-300
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G. und Bécard G.:** A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific MtENOD11 expression in roots of *Medicago truncatula*. *PLANT PHYSIOLOGY* (2003) vol. 131 (3) pp. 952-62
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Mitra H., Morris R. J., Allan Downie J., und Oldroyd G. E. D.:** Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes. *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) vol. 105 (28) pp. 9823-8
- Krajinski F., Biela A., Schubert D., Gianinazzi-Pearson V., Kaldenhoff R., und Franken P.:** Arbuscular mycorrhiza development regulates the mRNA abundance of Mtaqp 1 encoding a mercury-insensitive aquaporin of *Medicago truncatula*. *Planta* (2000) vol. 211 (1) pp. 85-90
- Krajinski F., Hause B., Gianinazzi-Pearson V. und Franken P.:** Mtha1, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue, *Plant Biology* (2002) vol. 4 (6) pp. 754-761
- Krajinski F., und Frenzel A.:** Towards the elucidation of AM-specific transcription in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* (2007) vol. 68 (1) pp. 75-81
- Kryvoruchko I.:** Functional Analysis of Arbuscular Mycorrhiza-related Genes in *Medicago truncatula* Gaertn. Universität Potsdam (2009)
- Küster H., Hohnjec N., Krajinski F., El Y. F., Manthey K., Gouzy J., Dondrup M., Meyer F., Kalinowski J., Brechenmacher L., van Tuinen D., Gianinazzi-Pearson V., Pühler A., Gamas P. und Becker A.:** Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the Modell legume *Medicago truncatula*. *J Biotechnol* (2004) vol. 108 (2) pp. 95-113

- Küster H., Vieweg M. F., Manthey K., Baier M. C., Hohnjec N., und Perlick A. M. .** Identification and expression regulation of symbiotically activated legume genes. *Phytochemistry* (2007), 68 (1) pp. 8–18.
- Kwon C., Bednarek P., und Schulze-Lefert P.:** Secretory pathways in plant immune responses. *Plant Physiol* (2008) vol. 147 (4) pp. 1575-83
- Lammers P., Tuskan G. A., DiFazio S. P., Podila G. K. und Martin F.:** Mycorrhizal symbionts of *Populus* to be sequenced by the United States Department of Energy's Joint Genome Institute. *Mycorrhiza* (2004) vol. 14 (1) pp. 63-4
- Lanfranco L., Novero M., und Bonfante P.:** The mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* possesses a CuZn superoxide dismutase that is up-regulated during symbiosis with legume hosts. *Plant Physiol* (2005) vol. 137 (4) pp. 1319-30
- Larsen J. Ravnkov S. und Hansen C.W.:** Phyllosphere microbial communities in pot roses respond to low P fertilization and mycorrhiza inoculation, but not to application with the biocontrol fungus *Ulocladium atrum*. *IOBC WPRS Bulltein* (2007) vol 30 (6/2) pp 255-256
- Lazarova G., Zeng Y. und Kermodé A. R.:** Cloning and expression of an ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 3 (ABI3) gene homologue of yellow-cedar (*Chamaecyparis nootkatensis*). *J Exp Bot* (2002) vol. 53 (371) pp. 1219-21
- Leake, J. R.:** Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Curr Opin Plant Biol* (2004) vol. 7 (4) pp. 422-8
- Lévy J., Bres C., Geurts R., Chalhoub B., Kulikova O., Duc G., Journet E.-P., Ané J. M., Lauber E., Bisseling T., Dénarié J., Rosenberg C. und Debelle F.:** A putative Ca<sup>2+</sup> and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* (2004) vol. 303 (5662) pp. 1361-4
- Libault M., Joshi T., Benedito V., Xu D., Udvardi M. und Stacey G.:** Legume transcription factor genes; what makes legumes so special? *Plant physiology* (2009) vol. 151 (3) pp. 991-1001
- Liu J., Versaw W. K., Pumplin N., Gomez S. K., Blaylock L. A. und Harrison M. J.:** Closely related members of the *Medicago truncatula* PHT1 phosphate transporter gene family encode phosphate transporters with distinct biochemical activities. *J Biol Chem* (2008) vol. 283 (36) pp. 24673-81
- Liu J., Blaylock L. A., Endre G., Cho J., Town C. D., Van den Bosch K. A. und Harrison, M. J.:** Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals

- genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* (2003) vol. 15 (9) pp. 2106-23
- Loewus F. A.:** Inositol and plant cell wall polysaccharide biogenesis. *Subcell Biochem* (2006) vol. 39 pp. 21-45
- Macas J., Neumann P. und Navrátilová, A.:** Repetitive DNA in the pea (*Pisum sativum* L.) genome: comprehensive characterization using 454 sequencing and comparison to soybean and *Medicago truncatula*. *BMC Genomics* (2007) vol. 8 pp. 427
- Maillet F., Poinsoit V., André O., Puech-Pagès V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E. A., Driguez H., Bécard G. und Dénarié J.:** Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza. *Nature* (2011) vol. 469 (7328) pp. 58-63
- Maldonado-Mendoza I. E., Dewbre G. R. und Harrison M. J.:** 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. *Mol Plant Microbe Interact* (2001) vol. 14 (10) pp. 1140-8
- Malvick D.:** Be Aware of *Aphanomyces* Root Rot of Alfalfa Caused by Different Races of *Aphanomyces* in Illinois. <http://bulletin.ipm.illinois.edu/pastpest/articles/200204h.html> (2002)
- Manthey K., Krajinski F., Hohnjec N., Firnhaber C., Pühler A., Perlick A. M. und Küster H.:** Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Mol Plant Microbe Interact* (2004) vol. 17 (10) pp. 1063-77
- Markmann K., Giczey G. und Parniske M.:** Functional adaptation of a plant receptor-kinase paved the way for the evolution of intracellular root symbioses with bacteria. *PLoS Biol* (2008) vol. 6 (3) pp. e68
- Marschner H.:** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* (1994) vol. 159 (1) pp. 89-102
- Marsh J. F., Rakocevic A., Mitra R. M., Brocard L., Sun, J., Eschstruth A., Long S. R., Schultze M., Ratet P., und Oldroyd G. E. D.:** *Medicago truncatula* NIN is essential for rhizobial-independent nodule organogenesis induced by autoactive calcium/calmodulin-dependent protein kinase. *Plant physiology* (2007) vol. 144 (1) pp. 324-35
- Martin F., Gianinazzi-Pearson V., Hijri M., Lammers P., Requena N., Sanders I. R., Shachar-Hill Y., Shapiro H., Tuskan G. A. und Young J. P.:** The long hard road to a completed *Glomus intraradices* genome. *New Phytol* (2008) vol. 180 (4) pp. 747-50

- Massoumou M., van Tuinen D., Chatagnier O., Arnould C., Brechenmacher L., Sanchez L., Selim S., Gianinazzi S. und Gianinazzi-Pearson V.:** *Medicago truncatula* gene responses specific to arbuscular mycorrhiza interactions with different species and genera of *Glomeromycota*. *Mycorrhiza* (2007) vol. 17 (3) pp. 223-34
- Mauffras L.Y., Wicker E., Samseme J.:** Les maladies racinaires du pois (1). *Perspect. Agricol.* (1997) 226:68-75
- McAinsh M. R. und Pittman J. K.:** Shaping the calcium signature. *New Phytol* (2009) vol. 181 (2) pp. 275-94
- Middleton P. H., Jakab J., Penmetsa R. V., Starker C. G., Doll J., Kaló P., Prabhu R., Marsh J. F., Mitra R. M., Kereszt A., Dudas B., Van den Bosch K., Long S. R., Cook D. R., Kiss G. B. und Oldroyd G.E.:** An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction. *Plant Cell* (2007) vol. 19 (4) pp. 1221-34
- Mikkelsen B. L., Rosendahl S. und Jakobsen, I.:** Underground resource allocation between individual networks of mycorrhizal fungi. *New Phytol* (2008) vol. 180 (4) pp. 890-8
- Mitchell, P.:** Chemiosmotic coupling in energy transduction: a logical development of biochemical knowledge. *J Bioenerg* (1972) vol. 3 (1) pp. 5-24
- Mitra R., Gleason C., Edwards A., Hadfield J., Downie J., Oldroyd G., und Long S.:** A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) vol. 101 (13) pp. 4701-4705
- Mitra R. M., Sidney S. L. und Long S. R.:** Six nonnodulating plant mutants defective for Nod factor-induced transcriptional changes associated with the legume-rhizobia symbiosis. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004) vol. 101 (27) pp. 10217-10222
- Mosse B.:** Some studies relating to "independent" growth of vesicular–arbuscular endophytes. *Can. J. Bot.* (1988) vol. 66 (12) pp. 2533-2540
- Murphy P., Langridge P. und Smith, S.:** Cloning plant genes differentially during colonization of roots of *Hordeum vulgare* by the vesicular–arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *New Phytologist* (1997) vol. 135 (2) pp. 291-301
- Nakagawa T., Suzuki T., Murata S., Nakamura S., Hino T., Maeo K., Tabata R., Kawai T., Tanaka K., Niwa Y., Watanabe Y., Nakamura K., Kimura T. und Ishiguro S.:** Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants. *Biosci Biotechnol Biochem* (2007) vol. 71(8) pp. 2095-2100

- Nam J., de Pamphilis C. W., Ma H. und Nei M.:** Antiquity and evolution of the MADS-box gene family controlling flower development in plants. *Mol Biol Evol* (2003) vol. 20 (9) pp. 1435-1447
- Navazio L., Moscatiello R., Genre A., Novero M., Baldan B., Bonfante P. und Mariani, P.:** A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells. *Plant physiology* (2007) vol. 144 (2) pp. 673-681
- Oláh B., Brière C., Bécard G., Dénarié J. und Gough, C.:** Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway. *Plant J* (2005) vol. 44 (2) pp. 195-207
- Oldroyd G. E. D. und Allan Downie J.:** Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* (2008) vol. 59 pp. 519-46
- Papavizas G.:** *Aphanomyces* species and their root diseases in pea and sugarbeet: a review. Technical Bulletin United States Department Agriculture (1979), vol 1485, pp 158
- Parniske M.:** Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nat Rev Micro* (2008) vol. 6 (10) pp. 763-75
- Peiter E., Sun J., Heckmann A. B., Venkateshwaran M., Riely B. K., Otegui M. S., Edwards, A., Freshour G., Hahn M. G., Cook D. R., Sanders D., Oldroyd G. E. D., Downie J. A., und Ané J.-M.:** The *Medicago truncatula* DMI1 protein modulates cytosolic calcium signaling. *Plant Physiol* (2007) vol. 145 (1) pp. 192-203
- Pozo M. J., Verhage A., García-Andrade J., García J. M. und Azcón-Aguilar C.:** Priming Plant Defence Against Pathogens by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. In: *Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact* (2009) Springer Berlin Heidelberg pp. 123-135
- Pumplin N. und Harrison M.:** Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology* (2009) vol 151 (2) pp. 809-819
- Rasmussen S. K., Ingvarlsen C. R. und Torp A. M.:** Mutations in genes controlling the biosynthesis and accumulation of inositol phosphates in seeds. *Biochem Soc Trans* (2010) vol. 38 (2) pp. 689-94
- Read D. J., Duckett J. G., Francis R., Ligron R. und Russell A.:** Symbiotic fungal associations in 'lower' land plants. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci* (2000) vol. 355 (1398) pp. 815-31;

- Remy W., Taylor T. N., Hass H. und Kerp H.:** Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc Natl Acad Sci USA* (1994) vol. 91 (25) pp. 11841-11843
- Requena N., Breuninger M., Franken P. und Ocón A.:** 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* (2003) vol. 132 (3) pp. 1540-9
- Requena N., Serrano E., Ocón A. und Breuninger, M.:** Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* (2007) vol. 68 (1) pp. 33-40
- Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B. K. und Yu G.:** *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* (2000) vol. 290 (5499) pp. 2105-2110
- Riechmann, J. L. und Meyerowitz, E. M.:** The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biol Chem* (1998) vol. 379 (6) pp. 633-646
- Rillig M.:** Arbuscular mycorrhizae and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters* (2004) vol. 7 (8) pp. 740-754
- Roca M. G., Davide L. C., Davide L. M. C., Mendes-Costa M. C., Schwan R. F. und Wheals A. E.:** Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species. *Mycol Res* (2004) vol. 108 (11) pp. 1320-1326
- Roca G., Read N. und Wheals A.:** Conidial anastomosis tubes in filamentous fungi. *FEMS Microbiol Lett* (2005a) vol. 249 (2) pp. 191-198
- Roca M. G., Arlt J., Jeffree C. E. und Read N. D.:** Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. *Eukaryotic Cell* (2005b) vol. 4 (5) pp. 911-919
- Roslan H. A., Salter M. G., Wood C. D., White M. R., Croft K. P., Robson F., Coupland G., Doonan J., Laufs P., Tomsett A. B. und Caddick M. X.:** Characterization of the ethanol-inducible alc gene-expression system in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal: for cell and molecular biology* (2001), 28 (2), 225–235.
- Rozen S. und Skaletsky H. J.:** In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (2000) Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Rubio V., Linhares F., Solano R., Martín A. C., Iglesias J., Leyva A. und Paz-Ares J.:** A conserved MYB transcription factor involved in phosphate starvation signaling

both in vascular plants and in unicellular algae. *Genes Dev* (2001) vol. 15 (16) pp. 2122-2133

**Ryan M. und Graham J.:** Is there a role for arbuscular mycorrhizal fungi in production agriculture?. *Plant and Soil* (2002) vol. 244 (1) pp. 263-271

**Sablowski R.W. und Meyerowitz E. M.:** A homolog of NO APICAL MERISTEM is an immediate target of the floral homeotic genes APETALA3/PISTILLATA. *Cell* (1998) vol. 92 (1) pp. 93-103

**Saito K., Yoshikawa M., Yano K., Mitra H., Uchida H., Asamizu E., Sato S., Tabata S., Imaizumi-Anraku H., Umehara Y., Kouchi H., Murooka Y., Szczyglowski K., Downie J. A., Parniske M., Hayashi M. und Kawaguchi M.:** NUCLEOPORIN85 is required for calcium spiking, fungal and bacterial symbioses, and seed production in *Lotus japonicus*. *Plant Cell* (2007) vol. 19 (2) pp. 610-24

**Salzer P., Bonanomi A., Beyer K., Vögeli-Lange R., Aeschbacher R. A., Lange J., Wiemken A., Kim D., Cook D. R. und Boller T.:** Differential expression of eight chitinase genes in *Medicago truncatula* roots during mycorrhiza formation, nodulation, and pathogen infection. *Mol Plant Microbe Interact* (2000) vol. 13 (7) pp. 763-77

**Sambrook D. W. und Russell J.:** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.) (2001), Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Sanders I. R. und Croll D.:** Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner. *Annu Rev Genet* (2010) vol. 44 pp. 271-292

**Sato S. Nakamura Y., Asamizu E., Isobe S. und Tabata S.:** Genome sequencing and genome resources in Modell legumes. *Plant Physiol* (2007) vol. 144 (2) pp. 588-593

**Schauser L., Roussis A., Stiller J. und Stougaard J.:** A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature* (1999) vol. 402 (6758) pp. 191-195

**Schüssler A., Martin H., Cohen D., Fitz M. und Wipf D.:** Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi. *Nature* (2006) vol. 444 (7121) pp. 933-936

**Schüßler A.:** Molecular phylogeny, taxonomy, and evolution of *Geosiphon pyriformis* and arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant and Soil* (2002) vol. 244 (1) pp. 75-83

**Siciliano V., Genre A., Balestrini R., Cappellazzo G., de Wit P. J. G. M. und Bonfante P.:** Transcriptome analysis of arbuscular mycorrhizal roots during development of the prepenetration apparatus. *Plant Physiology* (2007) vol. 144 (3) pp. 1455-66

- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debelle F., Gough C., Bisseling T. und Geurts R.:** NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science* (2005) vol. 308 (5729) pp. 1789-91
- Smith F., Jakobsen I. und Smith S.:** Spatial Differences in Acquisition of Soil Phosphate between Two Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Symbiosis with *Medicago truncatula*. *New Phytologist* (2000) vol. 147 (2) pp. 357-366
- Smith S. und Read D.:** Mycorrhizal symbiosis. Elsevier Ltd., New York, 1997
- Smith S. und Read D.:** Mycorrhizal symbiosis. Elsevier Ltd., New York, 2008
- Smith S. und Smith F.:** Tansley Review No. 20. Structure and Function of the Interfaces in Biotrophic Symbioses as They Relate to Nutrient Transport. *New Phytologist* (1990) vol. 114 (1) pp. 1-38
- Squires C. L., Lee F. D. und Yanofsky C.:** Interaction of the trp repressor and RNA polymerase with the trp operon. *J Mol Biol* (1975) vol. 92 (1) pp. 93-111
- Souer E., van Houwelingen A., Kloos D., Mol J. und Koes R.:** The no apical meristem gene of *Petunia* is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries. *Cell* (1996) vol. 85 (2) pp. 159-70
- Strack D., Fester T. und Hause B.:** Die arbuskuläre Mykorrhiza: Eine unterirdische Lebensgemeinschaft. *Biologie in unserer Zeit* (2001) vol 31 (5) pp 286-295
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. und Parniske M.:** A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature* (2002) vol. 417 (6892) pp. 959-62
- Suzuki M., Ketterling M. G., Li Q.-B. und McCarty, D. R.:** Viviparous1 alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiol* (2003) vol. 132 (3) pp. 1664-77
- The Arabidopsis Genome Initiative.:** Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* (2000) vol. 408 (6814) pp. 796-815
- The UniProt Consortium:** The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* (2009) vol. 47 pp. 169-174
- Tadege M., Wen J., He J., Tu H. und Kwak Y.:** Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the Modell legume *Medicago truncatula*. *Plant J* (2008) vol. 54 (2) pp. 335-47
- Tirichine L., Imaizumi-Anraku H., Yoshida S., Murakami Y., Madsen L. H., Mitra H., Nakagawa T., Sandal N., Albrechtsen A. S., Kawaguchi M., Downie A., Sato S.,**

- Tabata S., Kouchi H., Parniske M., Kawasaki S und Stougaard J.:** Dereglulation of a Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* (2006) vol. 441 (7097) pp. 1153-6
- Tollet M., Wong Sak Hoi J., van Tuinen D., Arnould C., Chatagnier O., Dumas B., Gianinazzi-Pearson V. und Seddas P. M.:** An STE12 gene identified in the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* restores infectivity of a hemibiotrophic plant pathogen. *New Phytol* (2009) vol. 181 (3) pp. 693-707
- Town C. D.:** Annotating the genome of *Medicago truncatula*. *Curr Opin Plant Biol* (2006) vol. 9 (2) pp. 122-7
- Udvardi M. K., Kakar, K., Wandrey M., Montanari, O., Murray, J., Andriankaja A., Zhang J.-Y., Benedito V., Hofer J. M. I., Chueng F. und Town C. D.:** Legume transcription factors: global regulators of plant development and response to the environment. *Plant Physiology* (2007) vol. 144 (2) pp. 538-549
- Vance C., Uhde-Stone C. und Allan D.:** Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource. *New Phytologist* (2003) vol. 157 (3) pp. 423-447
- Wang, B. und Qiu, Y.-L.:** Phylogenetic distribution and evolution of mycorrhizas in land plants. *Mycorrhiza* (2006) vol. 16 (5) pp. 299-363
- Wang X., Basnayake B. M. V. S., Zhang H., L. G., Li W., Virk N., Mengiste T. und Song F.:** The Arabidopsis ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* (2009) vol. 22 (10) pp. 1227-38
- Weidmann S., Sanchez L., Descombin J., Chatagnier O., Gianinazzi S. und Gianinazzi-Pearson, V.:** Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmi3* gene in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* (2004) vol. 17 (12) pp. 1385-93
- Wulf A., Manthey K., Doll J., Perlick A. M., Linke B., Bekel T., Meyer F., Franken P., Küster H. und Krajinski F. :** Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the Modell plant *Medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* (2003) vol. 16 (4) pp. 306-14
- Xia N., Zhang G., Sun Y.-F., Zhu L., Xu L.-S., Chen X.-M., Liu B., Yu Y.-T., Wang X.-J., Huang L.-L. und Kang Z.-S.:** TaNAC8, a novel NAC transcription factor gene in wheat, responds to stripe rust pathogen infection and abiotic stresses. *Physiological and Molecular Plant Pathology* (2010) vol. 74 (5-6) pp. 394-402

- Young, N. D. und Udvardi, M.:** Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol* (2009) vol. 12 (2) pp. 193-201
- Zhang Q., Blaylock L. A. und Harrison M. J.:** Two *Medicago truncatula* half-ABC-Transporters are essential for arbuscule development in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *The plant cell online* (2010) vol. 22(5) pp. 1483–1497.

## 8. Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Franziska Krajinski-Barth für die Möglichkeit in diesem interessanten Fachgebiet zu arbeiten und für ihre Betreuung während dreieinhalb Jahre. Ich danke meinen ehemaligen Arbeitskollegen für die vielen interessanten Tage im Labor und die netten Abende. Ein spezieller Dank an Dr. Nicole Gaude für die Hilfe zu Beginn meiner Schreiberei.

Ein besonderer Dank an Dr. rer. nat. Santiago Ramirez Aguilar. Zehn Jahre Stuttgart und Berlin - es war ein Fest - und ein Dank für die durchdiskutierten Abende.

Ich danke allen Nichtbiologen mit denen ich die letzten drei Jahre zu tun hatte dafür, dass sie eben - nicht Biologen waren.

Schlussendlich möchte ich noch danken,...

...meinen Eltern für das Korrigieren meiner Arbeit und die Unterstützung...

...Santiago ein weiteres Mal, auch für das Lesen und Korrigieren...

...Dr. rer. nat. Silke Fanta für die inhaltliche Hilfe und die Bindestriche...

...der Schreibmaschine dafür, dass ich sie nicht benutzen musste.

# Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich versichere ebenfalls, dass die Arbeit an keiner anderen Hochschule als der Universität Potsdam eingereicht wurde.

Potsdam, den 14. September 2012

Armin Reinert