

**Untersuchungen zur Funktion der mykorrhizainduzierten Apocarotinoide
in Wurzeln von *Medicago truncatula***

Dissertation

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

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von
Daniela S. Floß
geboren am 26. Juni 1979 in Plauen

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Dieter Strack
2. Prof. Dr. Ralf B. Klösgen
3. Prof. Dr. Marcel Bucher

Halle (Saale), den 15.12.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000014949

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014949>]

There is no sadder sight in the world than to see a beautiful theory killed by a brutal fact.

Thomas Henry Huxley (1825 - 1895)

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

TABELLEN & ABBILDUNGEN

| | | |
|-------------|---|-----------|
| I | EINLEITUNG | 1 |
| I.1 | Die arbuskuläre Mykorrhiza | 1 |
| I.2 | Die Akkumulation von Apocarotinoiden in mykorrhizierten Wurzeln | 6 |
| I.3 | Der Carotinoidstoffwechsel | 9 |
| I.4 | Zielstellung der Arbeit | 14 |
| II | MATERIAL UND METHODEN | 16 |
| II.1 | Material | 16 |
| II.1.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 16 |
| II.1.2 | Pflanzen- und Pilzmaterial | 16 |
| II.1.3 | Bakterienstämme und Kultivierung | 16 |
| II.1.4 | Nährmedien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterien | 17 |
| II.1.5 | Plasmide | 18 |
| II.1.6 | Oligonucleotide | 19 |
| II.2 | Methoden | 19 |
| II.2.1 | Molekularbiologische Arbeiten mit DNA | 19 |
| II.2.1.1 | Präparation von Plasmid-DNA | 19 |
| II.2.1.2 | Elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren | 19 |
| II.2.1.3 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 19 |
| II.2.1.4 | Klonierungstechniken | 20 |
| II.2.1.4.1 | Restriktionsspaltung von DNA | 20 |
| II.2.1.4.2 | Dephosphorylierung | 21 |
| II.2.1.4.3 | Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen | 21 |
| II.2.1.4.4 | Reinigung von DNA-Fragmenten | 21 |
| II.2.1.4.5 | Anhängen von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkte (<i>A-tailing</i>) | 21 |
| II.2.1.4.6 | Auffüllen von Enden mit 5'-Überhängen (<i>fill in</i>) | 21 |
| II.2.1.4.7 | Ligation von DNA-Fragmenten | 22 |
| II.2.1.5 | Sequenzierung und Sequenzanalyse | 22 |
| II.2.2 | Transformation von Bakterien | 22 |
| II.2.2.1 | Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen | 22 |
| II.2.2.2 | Herstellung und Transformation kompetenter <i>A. rhizogenes</i> -Zellen | 23 |
| II.2.3 | Molekularbiologische Arbeiten mit RNA | 23 |
| II.2.3.1 | Präparation von Gesamt-RNA aus <i>M. truncatula</i> | 23 |
| II.2.3.2 | Deoxyribonuclease (DNase)-Behandlung von RNA | 24 |
| II.2.3.3 | cDNA-Erststrangsynthese | 24 |
| II.2.3.4 | Real-Time RT-PCR | 24 |
| II.2.3.5 | Microarray-Analysen | 27 |

| | | |
|--------------|---|-----------|
| II.2.4 | Arbeiten mit Pflanzen | 28 |
| II.2.4.1 | Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung | 28 |
| II.2.4.2 | Wurzeltransformation von <i>M. truncatula</i> und Identifikation transgener Wurzeln | 28 |
| II.2.5 | Mikroskopische Arbeiten | 29 |
| II.2.5.1 | Anfärben von Pilzstrukturen | 29 |
| II.2.5.1.1 | Tintenfärbung und Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads | 30 |
| II.2.5.1.2 | Fuchsinsäurefärbung | 30 |
| II.2.5.2 | Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität | 30 |
| II.2.5.3 | Fixierung/Einbettung des Materials und Herstellung von semi-dünnen Schnitten | 31 |
| II.2.6 | Metaboliten-Analysen | 31 |
| II.2.6.1 | Extraktion von Apocarotinoiden aus Wurzeln von <i>M. truncatula</i> | 31 |
| II.2.6.2 | Analytische und semi-präparative HPLC | 32 |
| II.2.6.3 | Analyse der polaren Primärmetabolite | 33 |
| II.2.6.4 | Bestimmung des anorganischen Phosphatgehalts in Wurzeln | 34 |
| II.2.6.5 | Massenspektrometrie | 34 |
| II.2.7 | Proteinbiochemische Arbeiten | 35 |
| II.2.7.1 | Heterologe Genexpression in <i>E. coli</i> | 35 |
| II.2.7.2 | SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) | 35 |
| II.2.7.3 | Aktivitätstest der rekombinanten MtCCD1 | 35 |
| II.2.8 | Statistische Auswertung | 36 |
| III | ERGEBNISSE | 37 |
| III.1 | Analyse der <i>MtDXS2-1</i>-Promotoraktivität in mykorrhizierten Wurzeln | 37 |
| III.1.1 | Herstellung der Expressionskassette und Generierung chimärer Pflanzen | 37 |
| III.1.2 | Zelluläre Lokalisation der Aktivität des <i>MtDXS2-1</i> -Promotors in mykorrhizierten Wurzeln | 39 |
| III.1.3 | Analyse von Promotordeletionen | 40 |
| III.2 | RNAi-vermittelte Suppression von <i>MtDXS2</i> und deren Auswirkung auf den Carotinoidstoffwechsel | 43 |
| III.2.1 | Erzeugung chimärer Pflanzen mit reduzierten <i>MtDXS2</i> -Transkriptmengen | 44 |
| III.2.1.1 | <i>MtDXS2</i> -Transkriptakkumulation in Wurzelsystemen chimärer Pflanzen | 45 |
| III.2.1.2 | <i>MtDXS1</i> -Transkriptakkumulation in Wurzeln mit reduzierten <i>MtDXS2-1</i> -Transkriptmengen | 47 |
| III.2.2 | Untersuchung der AM-induzierten Akkumulation von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in Wurzeln mit reduzierten <i>MtDXS2-1</i> -Transkriptmengen | 48 |
| III.2.3 | Transkriptakkumulation weiterer Gene des Carotinoidstoffwechsels | 49 |
| III.3 | Auswirkung der <i>MtDXS2</i>-Suppression auf die AM-Symbiose | 50 |
| III.3.1 | Veränderte Transkriptmengen des AM-spezifischen Phosphattransporters <i>MtPT4</i> | 50 |

| | | |
|--------------|---|------------|
| III.3.2 | Untersuchungen zum Arbuskelvorkommen und zur Arbuskelmorphologie | 55 |
| III.3.2.1 | Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen | 55 |
| III.3.2.2 | Arbuskelmorphologie | 57 |
| III.3.3 | Untersuchung des Phosphatgehalts in mykorrhizierten Wurzeln mit reduzierten <i>MtDXS2-1</i> -Transkriptmengen | 59 |
| III.3.4 | Transkriptom-Analyse zur Identifikation AM-responsiver Gene mit veränderter Regulation | 59 |
| III.3.5 | Veränderung von Primärmetaboliten nach <i>MtDXS2</i> -Suppression | 67 |
| III.4 | Suppression von <i>MtCCD1</i> und deren Auswirkungen auf die Apocarotinoidakkumulation und die AM-Symbiose | 69 |
| III.4.1 | Aktivität der <i>MtCCD1</i> <i>in vitro</i> | 69 |
| III.4.2 | Erzeugung chimärer Pflanzen mit reduzierten <i>MtCCD1</i> -Transkriptmengen | 71 |
| III.4.3 | Untersuchung der AM-induzierten Apocarotinoide in Wurzeln mit reduzierten <i>MtCCD1</i> -Transkriptmengen | 73 |
| III.4.3.1 | Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate | 73 |
| III.4.3.2 | Identifikation eines C ₂₇ -Apocarotinoids | 75 |
| III.4.4 | Auswirkung der <i>MtCCD1</i> -Suppression auf die AM-Symbiose | 79 |
| III.4.4.1 | Untersuchung der <i>MtPT4</i> -Transkriptakkumulation | 79 |
| III.4.4.2 | Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelmorphologie | 80 |
| III.4.4.3 | Transkriptakkumulation weiterer AM-induzierter Gene | 82 |
| IV | DISKUSSION | 83 |
| V | ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY | 102 |
| VI | LITERATUR | 106 |
| VII | ANHANG | 117 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. *Taq*), Länder (u.a. USA, Deutschland) bzw. Staaten (u.a. MO, CA), Maßeinheiten (z.B. min, °C, bar) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert sind, werden nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Bei zusammengesetzten Abkürzungen, z.B. Gen- und Enzymbezeichnungen, sind die jeweiligen Teile getrennt angegeben. Gene sowie aus dem Englischen und dem Latein übernommene Begriffe werden in der Arbeit kursiv hervorgehoben.

Nucleobasen

| | |
|---|---------|
| a | Adenin |
| c | Cytosin |
| g | Guanin |
| t | Thymin |

Abkürzungen

| | | | |
|--------|---|----------------------------------|---|
| ABA | Abscisinsäure | dNTPs | Deoxynucleosidtriphosphate, Gemisch aus dATP, Deoxycytidintriphosphat (dCTP), Deoxyguanosintriphosphat (dGTP) und Deoxythymidintriphosphat (dTTP) |
| ABC | engl. <i>ATP-binding cassette</i> | ds | doppelsträngig |
| ANOVA | engl. <i>analysis of variance</i> | DXR | 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase |
| At | <i>Arabidopsis thaliana</i> | DXS | 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase |
| AM | arbuskuläre Mykorrhiza | E | PCR-Effizienz |
| APCI | engl. <i>atmospheric pressure chemical ionization</i> | EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ATPase | Adenosintriphosphatase | EF 1 α | Translations-Elongationsfaktor 1 α |
| BCP | engl. <i>blue copper-binding protein</i> | ENOD | engl. <i>early nodulin</i> |
| BTUB | β -Tubulin | ESI | Elektrospray-Ionisation |
| BLAST | engl. <i>basic local alignment search tool</i> | EST | engl. <i>expressed sequence tag</i> |
| CaMV | engl. <i>cauliflower mosaic virus</i> | EV | engl. <i>empty vector</i> |
| CCD | engl. <i>carotenoid cleavage dioxygenase</i> | FG | Frischgewicht |
| cDNA | engl. <i>complementary DNA</i> | FTICR | Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz |
| CHIT | Chitinase | GC | Gaschromatografie |
| CID | engl. <i>collision-induced dissociation</i> | Gi | <i>Glomus intraradices</i> |
| CLA | engl. <i>altered chloroplasts</i> | GLP | engl. <i>germin-like protein</i> |
| Cm | <i>Cucumis melo</i> | GST | Glutathion-S-Transferase |
| CMS | 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-Synthase | GUS | β -Glucuronidase |
| Ct | engl. <i>threshold cycle</i> | H ₂ O _d | deionisiertes Wasser |
| D | engl. <i>dwarf</i> | H ₂ O _{dd} | doppelt deionisiertes Wasser |
| DAD | engl. <i>decreased apical dominance</i> | H ₂ O _{DEPC} | DEPC-Wasser |
| dATP | Deoxyadenosintriphosphat | HDR | 1-Hydroxy-2-methyl-butenyl-4-diphosphat-Reduktase |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat | HPLC | engl. <i>high pressure liquid chromatography</i> |
| DFCI | Dana-Faber Cancer Institute | HSD | engl. <i>honestly significantly different</i> |
| DMAPP | Dimethylallyldiphosphat | | |
| DMSO | Dimethylsulfoxid | | |
| DNA | Deoxyribonucleinsäure | | |
| DNase | Deoxyribonuclease | | |

| | | | |
|-------------------|---|-----------------|---|
| HTD | engl. <i>high tillering dwarf</i> | r_s | Korrelationskoeffizient nach Spearman |
| IPB | Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie | RT | Raumtemperatur |
| IPP | Isopentenylidiphosphat | RT-PCR | Reverse Transkription-PCR |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thio-galactopyranosid | SCF | engl. <i>Skp1-cullin-F-box protein complex</i> |
| LEA | engl. <i>late embryogenesis abundant</i> | SCP | Serin-Carboxypeptidase |
| LEC | Lectin | SDS | Natriumdodecylsulfat |
| MAX | engl. <i>more axillary branching</i> | si | engl. <i>small interfering</i> |
| MEP | 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat | SI | <i>Solanum lycopersicum</i> |
| MPI | Max-Planck-Institut | sr | engl. <i>strong reduction</i> |
| MOPS | 3-Morpholino-1-propansulfonsäure | TC | engl. <i>tentative consensus sequence</i> |
| mRNA | engl. <i>messenger RNA</i> | T-DNA | Transfer-DNA |
| mr | engl. <i>moderate reduction</i> | TILLING | engl. <i>targeting induced local lesions in genomes</i> |
| MS | Massenspektrometrie | T_m | Schmelztemperatur |
| Mt | <i>Medicago truncatula</i> | TOF | engl. <i>time of flight</i> |
| Myk | Mykorrhizierung | T_{opt} | optimale Temperatur (engl. <i>annealing temperature</i>) |
| m/z | Masse/Ladungs-Verhältnis | TP | Targetprobe |
| NADPH | reduziertes Nicotinamidadenin-dinucleotidphosphat | TUBB | β -Tubulin |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information | <i>uidA</i> | codierende Sequenz des β -Glucuronidase-Gens |
| NCED | engl. <i>nine-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase</i> | <i>uidA-int</i> | codierende Sequenz des β -Glucuronidase-Gens mit Intron |
| NFR | engl. <i>Nod-factor receptor</i> | UV | ultraviolett |
| NMR | engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> | VIS | engl. <i>visible</i> |
| Nod | Nodulation | VP | engl. <i>viviparous</i> |
| OCS | Octopinsynthase | v/v | Volumen pro Volumen |
| OD ₆₀₀ | optische Dichte bei 600 nm | Vv | <i>Vitis vinifera</i> |
| <i>P</i> | Signifikanzniveau (<i>P</i> -Wert) | wai | engl. <i>weeks after inoculation</i> |
| PAA | Polyacrylamid | w/v | Gewicht pro Volumen |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese | w/w | Gewicht pro Gewicht |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion | X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid |
| PDS | Phytoen-Desaturase | X-Gluc | Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure |
| PEG | Polyethylenglycol | ZG | Zielgen |
| Ph | <i>Petunia hybrida</i> | Zm | <i>Zea mays</i> |
| P _i | anorganisches Phosphat | λ_{max} | Absorptionsmaximum |
| PLACE | engl. <i>plant cis-acting regulatory DNA elements</i> | \emptyset | Durchmesser |
| PT | Phosphattransporter | 35S | CaMV 35S-Promotor |
| RG | Referenzgen | | |
| Ri | engl. <i>root inducing</i> | | |
| RI | Retentionszeitindex | | |
| RISC | engl. <i>RNA-induced silencing complex</i> | | |
| RMS | engl. <i>ramosus</i> | | |
| RNA | Ribonucleinsäure | | |
| RNAi | RNA <i>interference</i> | | |
| RP | engl. <i>reversed-phase</i> | | |
| RP | Referenzprobe (nur in Kapitel II) | | |

TABELLEN & ABBILDUNGEN

| Tabelle | Seite |
|--|------------|
| Tab. II-1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika. | 18 |
| Tab. II-2: Generelles Schema für PCR-Programme. | 20 |
| Tab. II-3: Reaktionsbedingungen der durchgeführten Real-Time RT-PCR-Untersuchungen. | 26 |
| Tab. II-4: Ablauf der Substitution von Ethanol mit PEG 1500. | 31 |
| Tab. III-1: Anzahl AM-responsiver Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. | 60 |
| Tab. III-2: AM-reprimierte Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. | 61 |
| Tab. III-3: AM-induzierte Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. | 63 |
| Tab. III-4: Untersuchung von AM-reprimierten und AM-induzierten Genen mit veränderter Regulation in srRNAi-Wurzeln mittels Real-Time RT-PCR. | 65 |
| Tab. III-5: Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene in mrRNAi-Wurzeln. | 66 |
| Tab. III-6: Signifikant veränderte polare Primärmetabolite in RNAi-Wurzeln. | 68 |
| Tab. III-7: Molares Verhältnis von Cyclohexenon- und Mycorradicinderivaten in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln mit reduzierter <i>MtCCDI</i> -Transkriptakkumulation. | 75 |
| Tab. III-8: Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der detektierten Verbindungen in methanolischen Wurzelextrakten von RNAi-Pflanzen. | 76 |
| Tab. III-9: Transkriptakkumulation arbuskelrelevanter, pflanzlicher Gene in <i>MtCCDI</i> -RNAi-Wurzeln. | 82 |
| Tab. VII-1: Sequenzen der Oligonucleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die durchgeführten Klonierungsarbeiten. | A1 |
| Tab. VII-2: Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide für Real-Time RT-PCR-Untersuchungen. | A1 |
| Tab. VII-3: Korrelationsmatrix von Transkript- und Metabolitendaten aller RNAi-Wurzeln des Experiments IV. | A5 |
| Tab. VII-4: Log ₂ -Intensitätsverhältnisse der Gene mit erhöhter Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln des Experiments I. | A7 |
| Tab. VII-5: Log ₂ -Intensitätsverhältnisse der Gene mit reduzierter Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln des Experiments I. | A10 |
| | |
| Abbildung | Seite |
| Abb. I-1: Schematische Darstellung der Kolonisierungsformen einer AM-Symbiose. | 3 |
| Abb. I-2: Vollständig entwickelter Arbuskel von <i>Glomus mosseae</i> in einer Wurzelcortexzelle von <i>Allium porrum</i> . | 4 |
| Abb. I-3: Orangebraune Färbung der Wurzeln von <i>M. truncatula</i> durch Mykorrhizierung. | 7 |
| Abb. I-4: Hypothetisches Biosyntheschema der akkumulierenden Cyclohexenon- und Mycorradicinderivate in AM-Wurzeln. | 9 |
| Abb. I-5: Schema des MEP-Wegs der Isoprenoidbiosynthese. | 11 |
| Abb. III-1: Chimäre <i>M. truncatula</i> -Pflanze. | 38 |
| Abb. III-2: <i>MtDXS2-1</i> -Promotoraktivität in Wurzeln von <i>M. truncatula</i> . | 39 |
| Abb. III-3: Fusionskonstrukte des <i>MtDXS2-1</i> -Promotors und der Promotordeletionen mit dem β -Glucuronidase-Gen. | 40 |
| Abb. III-4: Makroskopische Untersuchung der P-211-, P-145-, P-60- und P-0-Deletionen des <i>MtDXS2-1</i> -Promotors. | 41 |
| Abb. III-5: Aktivität der <i>MtDXS2-1</i> -Promotordeletionen in mykorrhizierten Wurzeln von <i>M. truncatula</i> . | 42 |
| Abb. III-6: Schematische Darstellung der T-DNA. | 44 |

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Abb. III-7: | Einteilung des Wurzelsystems für die Einzelpflanzenanalyse. | 45 |
| Abb. III-8: | <i>MtDXS2-1</i> -Transkriptmenge in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen. | 46 |
| Abb. III-9: | <i>MtDXS1</i> -Transkriptmenge in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen. | 47 |
| Abb. III-10: | Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte in mykorrhizierten Wurzelsystemen chimärer Pflanzen. | 49 |
| Abb. III-11: | Transkriptmenge von Genen des Carotinoidstoffwechsels. | 50 |
| Abb. III-12: | Transkriptmengen und Apocarotinoidgehalte in mykorrhizierten Wurzeln von EV- und RNAi-Pflanzen. | 53 |
| Abb. III-13: | Korrelationsanalysen von der <i>MtDXS2-1</i> -Transkriptakkumulation und den Apocarotinoidgehalten mit der <i>MtPT4</i> -Transkriptmenge. | 54 |
| Abb. III-14: | Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzeln von EV- und RNAi-Pflanzen. | 56 |
| Abb. III-15: | Anteil verschiedener Entwicklungsstadien der Arbuskel an deren Gesamtpopulation in EV- und RNAi-Wurzeln. | 58 |
| Abb. III-16: | Phosphatgehalt in mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln. | 59 |
| Abb. III-17: | Heterologe Expression von <i>MtCCDI</i> in <i>E. coli</i> und Nachweis der Enzymaktivität <i>in vitro</i> . | 71 |
| Abb. III-18: | Gelborangefärbung mykorrhizierter Wurzelsysteme chimärer <i>MtCCDI</i> -RNAi-Pflanzen. | 72 |
| Abb. III-19: | <i>MtCCDI</i> -Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln chimärer EV- und RNAi-Pflanzen. | 73 |
| Abb. III-20: | Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln mit reduzierter <i>MtCCDI</i> -Transkriptakkumulation. | 74 |
| Abb. III-21: | RP-HPLC-Chromatogramme von Wurzelextrakten chimärer Pflanzen mit <i>MtCCDI</i> -Suppression. | 76 |
| Abb. III-22: | RP-HPLC-Chromatogramme von hydrolysierten Extrakten mykorrhizierter Wurzeln chimärer Pflanzen mit <i>MtCCDI</i> -Suppression. | 77 |
| Abb. III-23: | HPLC-MS-Daten von Verbindung Apo2. | 78 |
| Abb. III-24: | Fragment-Ionen der MS/MS-Analyse von Verbindung Apo2 und deren strukturelle Interpretation. | 79 |
| Abb. III-25: | <i>MtPT4</i> - und <i>GiBTUB1</i> -Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen mit <i>MtCCDI</i> -Suppression. | 80 |
| Abb. III-26: | Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzeln von EV- und <i>MtCCDI</i> -RNAi-Pflanzen. | 81 |
| Abb. III-27: | Relative Arbuskelanzahl der verschiedenen Entwicklungsstadien in EV- und <i>MtCCDI</i> -RNAi-Wurzeln. | 81 |
| Abb. IV-1: | Schema der oxidativen Spaltung von β -Carotin durch rekombinantes CCD1-Protein. | 91 |
| Abb. IV-2: | Postuliertes Spaltungsschema des C ₄₀ -Vorläufercarotinoids zur Synthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate. | 95 |
| Abb. VII-1: | Schematische Darstellung des Vektors p35 <i>Suida</i> -int. | A3 |
| Abb. VII-2: | Transkriptmengen und Apocarotinoidgehalte in mykorrhizierten Wurzelsystemen von EV- und RNAi-Pflanzen des Experiments IV. | A4 |
| Abb. VII-3: | Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzelsegmenten von EV- und RNAi-Pflanzen des Experiments IV. | A6 |

I Einleitung

Über 90% der heute vorkommenden Landpflanzen können mit ihren Wurzeln eine mutualistische Interaktion mit Pilzen eingehen (Strack *et al.*, 2003), die als Mykorrhiza bezeichnet wird (griechisch: *mykes* - Pilz, *rhiza* - Wurzel). Dieser Begriff wurde 1885 von Bernhard Frank eingeführt und entscheidend geprägt (Frank, 1885). Der Mutualismus beschreibt eine spezielle Form der Symbiose, die für beide Partner von Nutzen ist. In der Mykorrhiza ist der beiderseitige Nutzen der Lebensgemeinschaft zwischen Pflanzenwurzel und Mykorrhiza-Pilz die gegenseitige Versorgung mit Nährstoffen. Eine Vergrößerung der Wurzeloberfläche durch die extraradikalen Pilzhypen führt bei mykorrhizierten Pflanzen zu einer verbesserten Nährstoffaufnahme aus dem Boden. Hierbei sind besonders Phosphat und Wasser, in einem geringeren Ausmaß auch Stickstoff, von Bedeutung. Im Gegenzug erhält der Pilz von der Pflanze Assimilate der Photosynthese (Smith & Read, 1997).

In den folgenden Kapiteln wird in die Thematik der mykorrhizainduzierten Akkumulation von Apocarotinoiden, die Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist, eingeführt.

I.1 Die arbuskuläre Mykorrhiza

Aufgrund der Vielseitigkeit des Zusammenlebens von Pflanze und Pilz existieren verschiedene Mykorrhiza-Symbiosen. Diese werden in arbuskuläre Mykorrhiza, Ektomykorrhiza, ericoide Mykorrhiza, monotropoide Mykorrhiza, Mykorrhiza bei den Orchideen und in die speziellen Formen Ektendomykorrhiza und arbutoide Mykorrhiza unterteilt (Übersicht bei Smith & Read, 1997).

Die häufigste Mykorrhiza-Symbiose ist die arbuskuläre Mykorrhiza (AM), die ca. 80% aller Landpflanzen, inklusive Horn- und Lebermoose, Bärlappgewächse und Farne (Karandashov & Bucher, 2005), mit Pilzen des Phylums Glomeromycota (Schüssler *et al.*, 2001) in fast allen terrestrischen Ökosystemen eingehen können (Übersicht bei Strack *et al.*, 2003). Ausnahmen stellen dabei einige Mitglieder der Pflanzenfamilien der Kreuzblütengewächse (Brassicaceae, einschließlich der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*), Nelkengewächse (Caryophyllaceae), Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae) und Brennnesselgewächse (Urticaceae) dar (Vierheilig *et al.*, 1994; Vierheilig *et al.*, 1996). Da sich die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit auf die AM-Symbiose konzentrierten, beziehen sich alle weiteren Ausführungen auf diese mutualistische Lebensgemeinschaft.

Fossile Funde von AM-Strukturen in Wurzeln einer moosähnlichen Pflanze aus dem Devon bestätigen das bereits sehr frühe Auftreten der AM (Remy *et al.*, 1994). Der Ursprung dieser Lebensgemeinschaft wird anhand fossiler Hyphen und Sporen von AM-Pilzen sogar in die Zeit des Ordoviziums datiert (Redecker *et al.*, 2000), als erste Pflanzen die Landmassen besiedelten. Eine Unterstützung der Landbesiedlung der Pflanzen durch die AM wird daher postuliert (Simon *et al.*, 1993).

Die verbesserte Nährstoffversorgung der Pflanzen durch die AM ist nicht ihr einziger Vorteil aus dieser mutualistischen Lebensgemeinschaft. Die Symbiose wirkt sich außerdem positiv im Hinblick auf eine Vielzahl biotischer und abiotischer Stressfaktoren der Pflanze aus. So besitzen mykorrhizierte Pflanzen eine erhöhte Toleranz gegenüber Phytopathogenen (Übersicht bei Whipps, 2004; Li *et al.*, 2006; de la Pena *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007), Trocken- sowie Salzstress (Augé, 2001; Giri *et al.*, 2007) und Schwermetallen (Ouziad *et al.*, 2005; Vogel-Mikus *et al.*, 2006).

Die Etablierung der AM-Symbiose

Die AM-Pilze sind obligat biotrophe Organismen, die sich asexuell durch Sporulation vermehren und für ihren Lebenszyklus auf das Zusammenleben mit Pflanzen angewiesen sind (Requena *et al.*, 2007). Die Sporen dieser Pilze sind mit durchschnittlich 45 µm sehr groß. Als Reservestoffe speichern sie Lipide und Kohlenhydrate, besonders Glycogen. Weiterhin besitzen die Sporen mehrere tausend Zellkerne sowie dicke, widerstandsfähige Zellwände (Smith & Read, 1997).

Die Entwicklung der AM-Pilze beginnt mit der Sporenkeimung, die nicht auf spezifische Signalstoffe der Pflanze angewiesen ist, jedoch durch Wurzelexsudate oder flüchtige Verbindungen stimuliert werden kann (Harrison, 2005). Das Wachstum der daraus entstandenen Keimhyphne unterbleibt, wenn keine Wurzel einer Wirtspflanze in der näheren Umgebung vorgefunden wird (Bago *et al.*, 2000; Harrison, 2005). Existiert ein Symbiosepartner, so tritt eine starke Verzweigung der wachsenden Keimhyphne auf, die durch spezifische Wurzelexsudate, z.B. den Signalstoff 5-Deoxystrigol, hervorgerufen werden kann (Akiyama *et al.*, 2005).

Nach dem physischen Kontakt von Keimhyphne und Wurzeloberfläche bildet der Pilz ein Appressorium und penetriert die Wurzelepidermis. Dies kann auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Im ersten Fall weichen die angrenzenden Zellwände von zwei benachbarten Epidermiszellen auseinander und ein Spalt wird gebildet, der eine interzelluläre Penetration der Pilzhyphe ermöglicht (Demchenko *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu kann der Pilz im zweiten Fall auch direkt die Epidermiszelle penetrieren (intrazellulär). Bei diesem Vorgang entsteht schon während der Appressorienbildung ein so genannter Präpenetrationsapparat in der Epidermiszelle, der die eindringende Hyphe durch die Zelle leitet (Genre *et al.*, 2005).

Die Etablierung der AM ist, soweit bekannt, weitgehend unspezifisch, d.h. jeder AM-Pilz kann jede Wirtspflanze besiedeln. Die Erkennung des Symbiosepartners und die erfolgreiche Etablierung der AM-Symbiose setzen jedoch einen spezifischen Signalmechanismus voraus. In Leguminosen existieren Gemeinsamkeiten in der Signaltransduktion bei der symbiontischen Interaktion mit stickstofffixierenden Knöllchenbakterien (Rhizobien) und AM-Pilzen (Catoira *et al.*, 2000; Kistner *et al.*, 2005). Diese ermittelten gemeinsamen Komponenten der Signalwege beider Endosymbiosen sind der Erkennung des Nodulationsfaktor (Nod-Faktor)-Signals durch membrangebundene NFR-Kinasen (*Nod-*

factor receptor) nachgeschaltet. Sie betreffen zum einen eine rezeptorähnliche Proteinkinase, einen plastidären putativen Kationenkanal und ein Nucleoporin zum Auslösen eines Calciumsignals durch oszillierende Ca^{2+} -Konzentrationen (*Ca²⁺-spiking*) und zum anderen eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase, die durch dieses Signal aktiviert wird (Übersichten bei Parniske, 2004; Paszkowski, 2006 und Reinhardt, 2007). Während bei der Wurzelknöllchen-Symbiose die Nod-Faktoren der Rhizobien als Lipooligosaccharide identifiziert wurden, sind die Mykorrhizierung auslösenden Faktoren (Myk-Faktoren) der AM-Symbiose noch unbekannt. Hinweise für deren Existenz liefern zwei noch nicht identifizierte pilzliche, diffusionsfähige Komponenten, die in *Medicago truncatula* bereits vor dem physischen Kontakt der Symbiosepartner zur Expression des AM-induzierten Gens *MtENOD11* und einer verstärkten Seitenwurzelbildung führen (Kosuta *et al.*, 2003; Olah *et al.*, 2005).

Innerhalb der AM lassen sich zwei morphologisch verschiedene Kolonisierungsformen unterscheiden, der „Arum“- und der „Paris“-Typ (Abb. I-1). Ihre Bezeichnung erfolgte nach den Pflanzenarten *Arum maculatum* und *Paris quadrifolia*, in denen sie erstmals von Gaullaud (1905) identifiziert wurden.

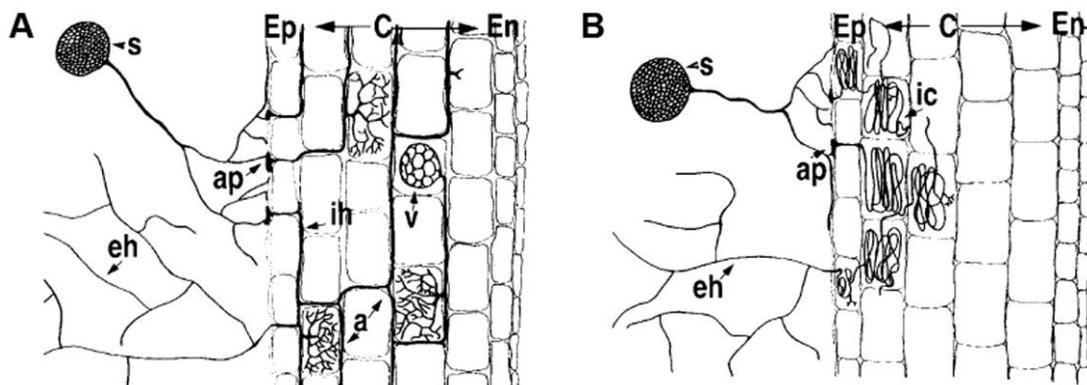


Abb. I-1: Schematische Darstellung der Kolonisierungsformen einer AM-Symbiose. A: „Arum“-Typ. **B:** „Paris“-Typ. Ep: Epidermis, C: Cortex, En: Endodermis, s: Spore, ic: intrazelluläre *coil*-Hyphe, ap: Appressorium, ih: interzelluläre Hyphe, v: Vesikel, eh: extraradikale Hyphe, a: Arbuskel. Abbildung nach Barker *et al.* (1998).

Der „Arum“-Typ ist durch die ausgedehnte Kolonisierung mit interzellulären Pilzhyphen im äußeren Bereich des Wurzelcortex gekennzeichnet (Abb. I-1 A). Nur gelegentlich kommt es hierbei zur Ausbildung von intrazellulären Hyphen. Im Inneren des Wurzelcortex werden, ausgehend von den Seitenarmen interzellulärer Hyphen, die Arbuskel in den Cortexzellen gebildet. Beim „Paris“-Typ hingegen erfolgt die Besiedlung des Wurzelcortex hauptsächlich über intrazelluläre, spiralförmige Hyphen (Abb. I-1 B). An diesen werden in der Regel mehrere sehr kleine Arbuskel (*arbusculate coils*) ausgebildet. Größtenteils scheint es von der Pflanzenart abhängig zu sein, welcher der beiden Kolonisierungstypen vorliegt (Smith & Smith, 1997). Jedoch existieren auch Studien, die belegen, dass unterschiedliche Pilzarten die Ausbildung der Kolonisierungsformen beeinflussen (Cavagnaro *et al.*, 2001). Da die meisten molekularen Untersuchungen zur Erforschung der AM-Symbiose an Kulturpflanzen

durchgeführt wurden und diese den „Arum“-Typ ausbilden, wird sie als die geläufigste Kolonisierungsform angesehen (Dickson, 2004). Diese Annahme muss jedoch etwas relativiert werden, da bei vielen Pflanzenfamilien vorwiegend der „Paris“-Typ auftritt. Es können allerdings auch beide Kolonisierungstypen innerhalb einer Pflanzenfamilie vorkommen (Smith & Smith, 1997).

Nach erfolgreicher Besiedlung der Pflanzenwurzel bildet der AM-Pilz ein extraradikales Hyphennetz aus, das zur Nährstoffaufnahme aus dem Boden dient oder zur Kolonisierung weiterer Pflanzenwurzeln beiträgt (Requena *et al.*, 2007). Ebenfalls können die meisten AM-Pilze intraradikale Vesikel ausbilden, die große Mengen an Lipiden enthalten und somit als Speicherorgane fungieren (Smith & Read, 1997). Der Lebenszyklus eines AM-Pilzes ist nach der Entstehung von Sporen, die in der Regel außerhalb der Wurzel an den extraradikalen Hyphen gebildet werden, vollendet.

Arbuskel - Wichtige Organe zum Nährstoffaustausch

Da Studien zur Untersuchung der AM-Symbiose, insbesondere im molekularen Bereich, hauptsächlich am „Arum“-Typ durchgeführt wurden, einschließlich denen der vorliegenden Arbeit, beziehen sich alle weiteren Ausführungen ausschließlich auf Arbuskel dieser Kolonisierungsform.

Arbuskel sind dichotom stark verzweigte, haustorienartige, pilzliche Strukturen, die in den Wurzelcortezellen der Wirtspflanzen gebildet werden und namensgebend für die AM-Symbiose sind. Sie existieren nicht dauerhaft in diesen Zellen, sondern weisen einen Lebenszyklus von durchschnittlich 7 - 10 Tagen auf (Alexander *et al.*, 1988). Dieser umfasst die Entwicklung von jungen, über voll ausgeprägte (Abb. I-2) bis zu vollständig zerfallenen Strukturen. Nach Vollendung des Lebenszyklus werden Arbuskel von der Pflanzenzelle abgebaut (Hause & Fester, 2005). Diese wird dabei nicht beeinträchtigt und kann während (M. J. Harrison, persönliche Mitteilung) oder nach diesem Vorgang neu besiedelt werden (Harrison, 1999).



Abb. I-2: Vollständig entwickelter Arbuskel von *Glomus mosseae* in einer Wurzelcortezelle von *Allium porrum*. Abbildung aus Brundrett *et al.* (1984).

Arbuskel entstehen innerhalb der Wurzelcortexzellen, bleiben jedoch durch die Plasmamembran der Pflanzenzelle von deren Cytoplasma getrennt. Diese Membran umschließt dabei jeden einzelnen Hyphenast der pilzlichen Struktur (Harrison, 2005) und bildet die periarbuskuläre Membran (Strack *et al.*, 2003). Der dadurch entstandene periarbuskuläre Zwischenraum, der pflanzliche und pilzliche Membran voneinander trennt, verkörpert ein neuartiges, apoplastisches Kompartiment (Harrison, 1999; Hause & Fester, 2005). Zusätzlich finden weitere morphologische Veränderungen in arbuskulierten Wurzelcortexzellen statt. Diese betreffen die Fragmentierung der Zentralvakuole, die Zunahme des Cytoplasmavolumens, die Erhöhung der Anzahl an Zellorganellen sowie die zentrale Positionierung und Hypertrophie des Zellkerns, wobei letztere aus einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität des Pflanzengenoms resultiert (Harrison, 1999; Strack *et al.*, 2003; Hause & Fester, 2005). Die gebildeten Arbuskel werden von netzwerkartigen Strukturen der Plastiden (Fester *et al.*, 2001; Hans *et al.*, 2004), der Mitochondrien sowie des Endoplasmatischen Retikulums umgeben (Hause & Fester, 2005), die auf einen erhöhten Metabolismus der besiedelten Zellen hindeuten. Außerdem treten nach der Kolonisierung Veränderungen im Cytoskelett arbuskulierter Wurzelcortexzellen auf (Übersichten bei Strack *et al.*, 2003 und Hause & Fester, 2005).

Während der Arbuskelentwicklung verliert die pilzliche Zellwand stufenweise an Stärke, sodass beide Symbiosepartner hauptsächlich durch ihre Plasmamembranen sowie den periarbuskulären Zwischenraum voneinander getrennt sind und damit in sehr engem Kontakt zueinander stehen (Harrison, 1999). Das Ansäuern des periarbuskulären Zwischenraums (Guttenberger, 2000) und die Induktion pflanzlicher H⁺-ATPase codierender Gene in arbuskulierten Cortexzellen (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2000; Krajinski *et al.*, 2002) deuten auf einen aktiven Stoffaustausch durch die periarbuskuläre Membran hin. Der Austausch von Phosphat zwischen AM-Pilz und Wirtspflanze findet dabei über die Arbuskel statt. Phosphat kann über die extraradikalen Pilzhypen mittels pilzspezifischer Phosphattransporter aus dem Boden aufgenommen, in Polyphosphat umgewandelt und in dieser Form über Cytoplasmaströme und/oder ein freibewegliches, röhrenförmiges Vakuolensystem in die intraradikalen Hyphenäste der Arbuskel transportiert werden (Übersichten bei Karandashov & Bucher, 2005; Bucher, 2007 und Javot *et al.*, 2007b). Es wird angenommen, dass während der Reifung der Arbuskel Polyphosphat hydrolysiert und die entstandenen Phosphationen über passive Membrantransporter in den periarbuskulären Zwischenraum abgegeben werden (Ezawa *et al.*, 2002). Über pflanzliche Phosphattransporter, deren Gene hauptsächlich oder ausschließlich in arbuskulierten Wurzelcortexzellen exprimiert werden (Übersicht bei Javot *et al.*, 2007b), können die Phosphationen dann von der Pflanze aufgenommen werden. Studien des mykorrhizaspezifischen Phosphattransporters MtPT4 der Modellleguminose *M. truncatula* zeigen dessen Lokalisation in der periarbuskulären Membran, wobei das stärkste MtPT4-Signal in Zellen mit vollständig ausgebildeten Arbuskeln auftritt (Harrison *et al.*, 2002). Die Notwendigkeit dieses Phosphattransporters für die AM-Symbiose wurde erst

kürzlich von Javot *et al.* (2007a) beschrieben. Diese Untersuchungen legen dar, dass ohne funktionsfähigen MtPT4 die Arbuskel frühzeitig kollabieren und eine erfolgreiche Etablierung der AM-Symbiose nicht möglich ist.

Inwieweit der symbiontische Austausch des Stickstoffs zwischen AM-Pilz und Wirtspflanze über die Arbuskel erfolgt, ist trotz Identifikation mykorrhizainduzierter Nitrat- oder Ammoniumtransporter (Frenzel *et al.*, 2005; Guimil *et al.*, 2005; Hohnjec *et al.*, 2005), noch nicht geklärt (Javot *et al.*, 2007b). Auch die Aufnahme der bereitgestellten, photosynthetisch gebildeten Kohlenhydrate der Pflanze über die Arbuskel wird noch diskutiert (Übersicht bei Hause & Fester, 2005). Anhaltspunkte für die Aufnahme der Kohlenhydrate liefern Studien, die eine Korrelation zwischen der Arbuskelanzahl und der Menge der gebildeten extraradikalen Pilzhyphen (Kling *et al.*, 1996) bzw. der Sporulation des Pilzes zeigten (Douds, 1994). Die erhöhte Aktivität einer pilzlichen, wahrscheinlich in den Aufnahmeprozess involvierten H⁺-ATPase in interzellulären Hyphen (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1991) und die Induktion pflanzlicher Invertasen in der Nähe dieser pilzlichen Strukturen (Schaarschmidt *et al.*, 2006) sprechen hingegen für eine Aufnahme über die Hyphen.

I.2 Die Akkumulation von Apocarotinoiden in mykorrhizierten Wurzeln

Ein seit langem bekanntes Phänomen der AM ist die Gelbfärbung besiedelter Pflanzenwurzeln, die erstmals von Jones (1924) beschrieben wurde und bei vielen, jedoch nicht allen Wirtspflanzen anzutreffen ist. Ebenso kann eine orangebraune Färbung, wie im Falle von *M. truncatula*, auftreten (Walter *et al.*, 2007; Abb. I-3).

Als farbbegibende Komponente dieser Färbung, des so genannten „Gelben Pigments“, wurde Mycorradicin, eine C₁₄-Dicarbonsäure mit konjugiertem Doppelbindungssystem, aus mykorrhizierten Wurzeln von *Zea mays* isoliert und identifiziert (Klingner *et al.*, 1995a). Mycorradicin liegt soweit bekannt ist, mit Ausnahme von geringen Konzentrationen in *Ornithogalum umbellatum* (Schliemann *et al.*, 2006), *in planta* nie als freie C₁₄-Dicarbonsäure in AM-Wurzeln vor. Vermutlich ist es mit unbekanntem Verbindungen oder, wie bei *Z. mays*, als Kernstruktur des „Gelben Pigments“ mit Zuckerresten von Cyclohexenonderivaten (siehe nachfolgend) verestert (Fester *et al.*, 2002a). Aus diesem Grund wird im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit von Mycorradicinderivaten gesprochen. Diese akkumulieren in mykorrhizierten Wurzelsystemen von einkeimblättrigen Pflanzen in unterschiedlichen Mengen, die mit der beobachteten Gelbfärbung der Wurzeln korrelieren (Strack & Fester, 2006). In mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays* tritt der „Gelbe Pigment“-Komplex in lipophilen Tröpfchen innerhalb des Cytoplasmas von Wurzelcortexzellen auf, die degenerierende Arbuskel besitzen. Nach vollständigem Zerfall der pilzlichen Struktur werden diese Tröpfchen in der Vakuole wiedergefunden (Fester *et al.*, 2002a). Mycorradicinderivate kommen in mykorrhizierten Wurzeln einiger zweikeimblättriger Pflanzen nicht vor (Fester *et al.*, 2002a). Im Gegensatz dazu treten aber geringe Mengen auch in nicht mykorrhizierten

Wurzeln von *Nardus stricta*, *Cucumis sativus*, *Cucurbita pepo*, *Phaseolus vulgaris* und *O. umbellatum* auf (Fester *et al.*, 2002a; Schliemann *et al.*, 2006).

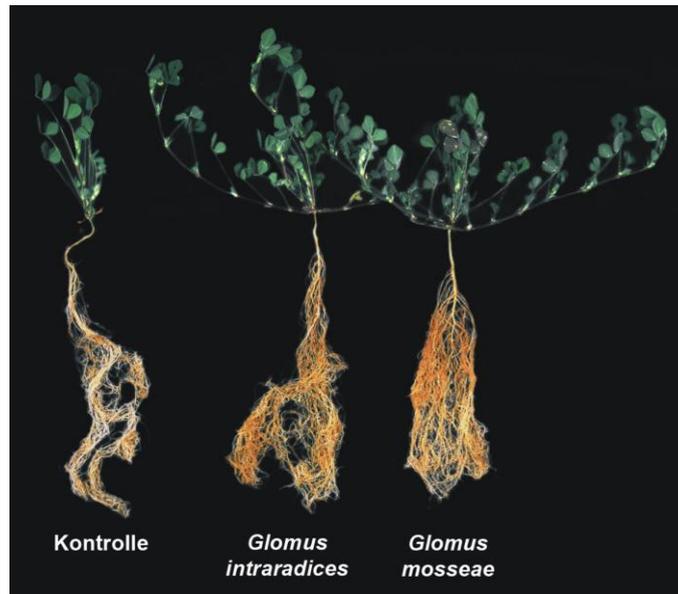


Abb. I-3: Orangebraune Färbung der Wurzeln von *M. truncatula* durch Mykorrhizierung. Die Kultivierung der Pflanzen mit *G. intraradices* oder *G. mosseae* erfolgte über sechs Wochen. Die Wurzelsysteme kolonisierter Pflanzen zeigen eine deutliche orangebraune Färbung im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Wurzeln von Kontrollpflanzen. Abbildung nach Walter *et al.* (2007).

Zeitgleich mit der strukturellen Aufklärung von Mycorradicin wurde aus AM-Wurzeln einiger Getreidepflanzen Blumenin, ein C₁₃-Cyclohexenonglycosid, isoliert und identifiziert, dessen Menge direkt mit dem Kolonisierungsgrad der Wurzel korrelierte (Maier *et al.*, 1995). Neben Blumenin treten weitere Cyclohexenonderivate in AM-Wurzeln von Süßgräsern auf (Maier *et al.*, 1997), wobei ihr Vorkommen nicht nur auf einkeimblättrige Pflanzenarten beschränkt ist, wie beispielsweise *O. umbellatum* (Schliemann *et al.*, 2006) und *A. porrum* (Schliemann *et al.*, 2008b). Auch aus AM-Wurzeln von Nachtschattengewächsen (*Solanum lycopersicum* und verschiedenen *Nicotiana*-Spezies; Maier *et al.*, 1999; Maier *et al.*, 2000), *Lotus japonicus* (Fester *et al.*, 2005) und *M. truncatula* (Schliemann *et al.*, 2008a) wurden Cyclohexenonderivate isoliert. Eine detaillierte Übersicht einiger dieser Verbindungen findet sich in Strack & Fester (2006). Cyclohexenonderivate treten nach Besiedlung mit verschiedenen AM-Pilzen auf (Vierheilig *et al.*, 2000). Ihre Biosynthese wird aber weder durch abiotische noch biotische Stressfaktoren in den Pflanzenwurzeln induziert (Maier *et al.*, 1997). Kürzlich konnten diese Verbindungen aber in sehr geringen Mengen auch aus nicht mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays* isoliert werden (Park *et al.*, 2004).

Die gleichzeitige Akkumulation der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in AM-Wurzeln der Wirtspflanzen beginnt ca. zwei Wochen nach Inokulation mit dem Pilz (Walter *et al.*, 2000). Aufgrund der Strukturähnlichkeit von Mycorradicin mit verschiedenen Apocarotinoiden (Übersicht bei Strack & Fester, 2006), den Spaltprodukten von Carotinoiden, wurde bereits bei dessen Identifizierung eine Biosynthese durch die Spaltung eines C₄₀-Carotinoids vermutet (Klingner *et al.*, 1995b). Die detektierten C₁₃-Cyclohexenon-

derivate enthalten α -Ionon-Ringstrukturen, die sich aus C_{40} -Carotinoidvorstufen ableiten lassen (Abb. I-4). Erste Hinweise auf die mögliche Herkunft der C_{13} -Cyclohexenonderivate aus Carotinoiden wurden durch Fütterungsversuche erhalten (Maier *et al.*, 1998). Erstmals wurde von Walter *et al.* (2000) postuliert, dass Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate nach oxidativer Spaltung eines gemeinsamen C_{40} -Carotinoids entstehen. Für diese Hypothese sprechen die von Fester *et al.* (2002b) durchgeführten Inhibierungsexperimente der Carotinoidbiosynthese in mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays*. Anhand dieser Studien konnte gezeigt werden, dass durch Applikation des Herbizids Norflurazon, das zur Hemmung der Phytoen-Desaturase führt, das Substrat Phytoen akkumuliert. Ein weiteres Argument für den postulierten Biosyntheseweg sind die nicht detektierbaren Mycorradicingehalte in mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays*-Mutanten, die in der Carotinoidbiosynthese gestört sind (Fester *et al.*, 2002b). Ferner sprechen erhöhte Transkriptmengen von Genen des Carotinoidstoffwechsels in AM-Wurzeln ebenfalls für die Biosynthese der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate über ein Carotinoid (Fester *et al.*, 2002b; Lohse *et al.*, 2005). Das C_{40} -Vorläufercarotinoid der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate konnte allerdings bislang noch nicht identifiziert werden. Ein möglicher Kandidat ist Lactucaxanthin, das wie die Cyclohexenonderivate ebenfalls α -Iononstrukturen aufweist (Strack & Fester, 2006). Für die Bildung von zwei C_{13} -Ketonen und einem C_{14} -Dialdehyd aus dem C_{40} -Vorläufercarotinoid kann eine carotinoidspaltende Dioxygenase (*carotenoid cleavage dioxygenase*, CCD, vgl. I.3), die *trans*-konfigurierte Carotinoide symmetrisch an der 9,10- und 9',10'-Position spaltet, verantwortlich sein. Die erhöhte Transkriptakkumulation einer CCD in mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays* und *M. truncatula* spricht für die postulierte Biosynthese (Sun *et al.*, 2008; Lohse *et al.*, 2005). Die entstandenen Ketogruppen der C_{13} -Ketone können weiterhin reduziert und glycosidiert werden, sodass unterschiedliche Cyclohexenonderivate entstehen. Der C_{14} -Dialdehyd hingegen kann zu Mycorradicin oxidiert und mit noch unbekanntem Verbindungen verestert werden (Abb. I-4). Die korrespondierenden Enzyme dieser Stoffwechselprozesse sind jedoch noch unbekannt.

Eine Funktion der akkumulierenden Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose konnte bisher noch nicht nachgewiesen werden und wird ausführlich diskutiert (Übersichten bei Strack & Fester, 2006; Akiyama, 2007 und Walter *et al.*, 2007).

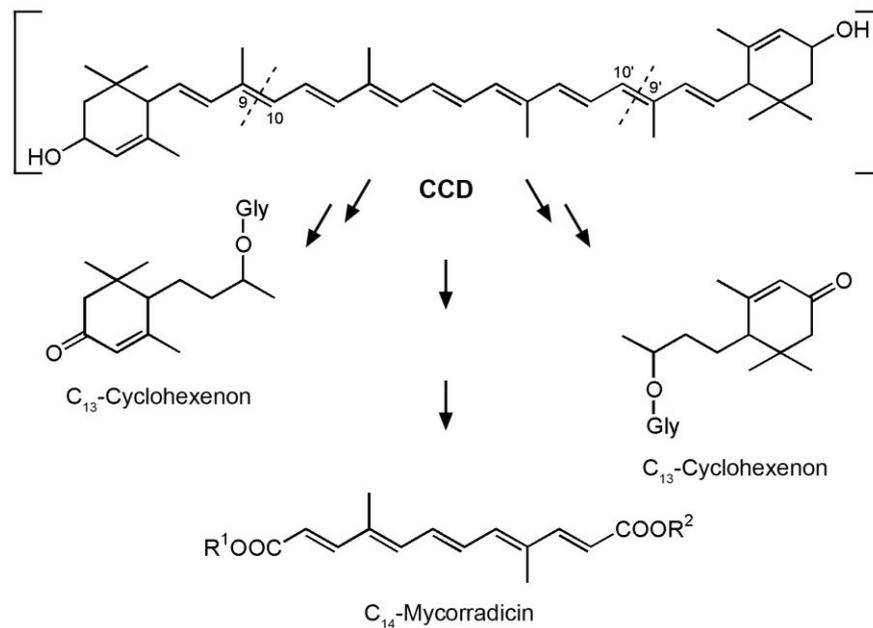


Abb. I-4: Hypothetisches Biosyntheschema der akkumulierenden Cyclohexenon- und Mycorradicinderivate in AM-Wurzeln. Die oxidative Spaltung des C₄₀-Carotinoids an den Positionen 9,10 und 9',10' durch eine carotinoidspaltende Dioxygenase (CCD) und anschließende Modifikationen der entstandenen Abbauprodukte, z.B. Glycosidierung der reduzierten Ketogruppe (Gly) und Veresterungen mit derzeit noch unbekanntem Verbindungen (R¹, R²), können zur Entstehung der C₁₃-Cyclohexenon- und C₁₄-Mycorradicinderivate führen.

I.3 Der Carotinoidstoffwechsel

Carotinoide sowie deren Spaltprodukte sind Isoprenoide, die aus den Grundbausteinen Isopentenylidiphosphat (IPP) und dessen Isomer Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) gebildet werden. Die Entstehung von IPP/DMAPP für die Carotinoidbiosynthese erfolgt in Pflanzen über den plastidären Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg, der darüber hinaus IPP/DMAPP auch als Grundbausteine für die Bildung von Abscisinsäure (ABA), Gibberellinen, Monoterpenen, Diterpenen, Isopren und den Seitenketten von Chlorophyllen, Tocopherolen, Phyllochinonen sowie Plastochinonen liefert (Rodríguez-Concepción, 2006). Die Grundbausteine IPP/DMAPP für die Synthese von Sterolen, Brassinosteroiden, Sesquiterpenen, Polyterpenen, Dolichol sowie für die Prenylketten zur Proteinmodifikation werden dagegen über den klassischen, im Cytosol ablaufenden Acetat-Mevalonat-Weg gebildet (Rodríguez-Concepción, 2006). Teilweise werden Sesquiterpene aber über den MEP-Weg synthetisiert (Dudareva *et al.*, 2005). Auch ein Austausch von IPP/DMAPP zwischen den Synthesewegen beider Kompartimente ist möglich (Übersicht bei Rodríguez-Concepción, 2006).

Der plastidäre Methylerythritolphosphat-Weg

Der plastidäre MEP-Syntheseweg wurde von Rohmer *et al.* (1993) in Eubakterien entdeckt und neben Pflanzen auch in Algen, Cyanobakterien und Apicomplexa-Parasiten, z.B. *Plasmodium falciparum* (Jomaa *et al.*, 1999), nachgewiesen (Hunter, 2007). Bereits 1998

wurde anhand von Fütterungsexperimenten gezeigt, dass die Grundbausteine für die Biosynthese der AM-induzierten Cyclohexenonderivate aus dem MEP-Syntheseweg hervorgehen (Maier *et al.*, 1998).

Im ersten Reaktionsschritt des MEP-Wegs (Abb. I-5, Übersichten bei Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Dubey *et al.*, 2003; Rodríguez-Concepción, 2006 und Hunter, 2007) wird unter Beteiligung von Thiamindiphosphat das Pyruvat decarboxyliert und in einer transketolaseähnlichen Reaktion auf Glycerinaldehyd-3-phosphat übertragen. Die Reaktion wird durch das Enzym 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase (DXS) katalysiert und führt zur Bildung des Intermediats 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, das neben der Synthese von IPP/DMAPP auch in die Bildung von Thiamin (Vitamin B₁) und Pyridoxin (Vitamin B₆) eingehen kann. Für Pflanzen konnte jedoch kürzlich gezeigt werden, dass Pyridoxin nicht aus 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat hervorgeht (Tambasco-Studart *et al.*, 2005). Im zweiten Syntheseschritt wird 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat zu 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) umgewandelt. Dies geschieht durch eine intramolekulare Umlagerung sowie eine NADPH-abhängige Reduktion, die durch die 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase (DXR) katalysiert wird. Anschließend erfolgt in einer cytidintriphosphatabhängigen Reaktion die Bildung von 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol. Durch die Phosphorylierung der 2-Hydroxy-Gruppe wird es in 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-2-phosphat umgewandelt. Das zyklische Intermediat 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat, das im nächsten Syntheseschritt durch Abspaltung von Cytidinmonophosphat entsteht, wird zu 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reduziert und durch das Enzym 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase in ein Gemisch aus IPP und DMAPP umgewandelt. Die Isomerisierung von IPP zu DMAPP wird durch Isopentenylidiphosphat-Isomerasen katalysiert.

Die Bedeutung des MEP-Synthesewegs für die Lebensfähigkeit der Pflanzen wird durch die Charakterisierung der *dxs*-, *dxr*- sowie *cms*-Arabidopsis-Mutanten offensichtlich (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002). Alle untersuchten Mutanten zeigten einen letalen Keimlingsphänotyp, der auf die Blockierung der Biosynthese von Carotinoiden, den Phytol-Seitenketten von Chlorophyllen und Plastochinon-9 zurückgeführt wurde (Budziszewski *et al.*, 2001).

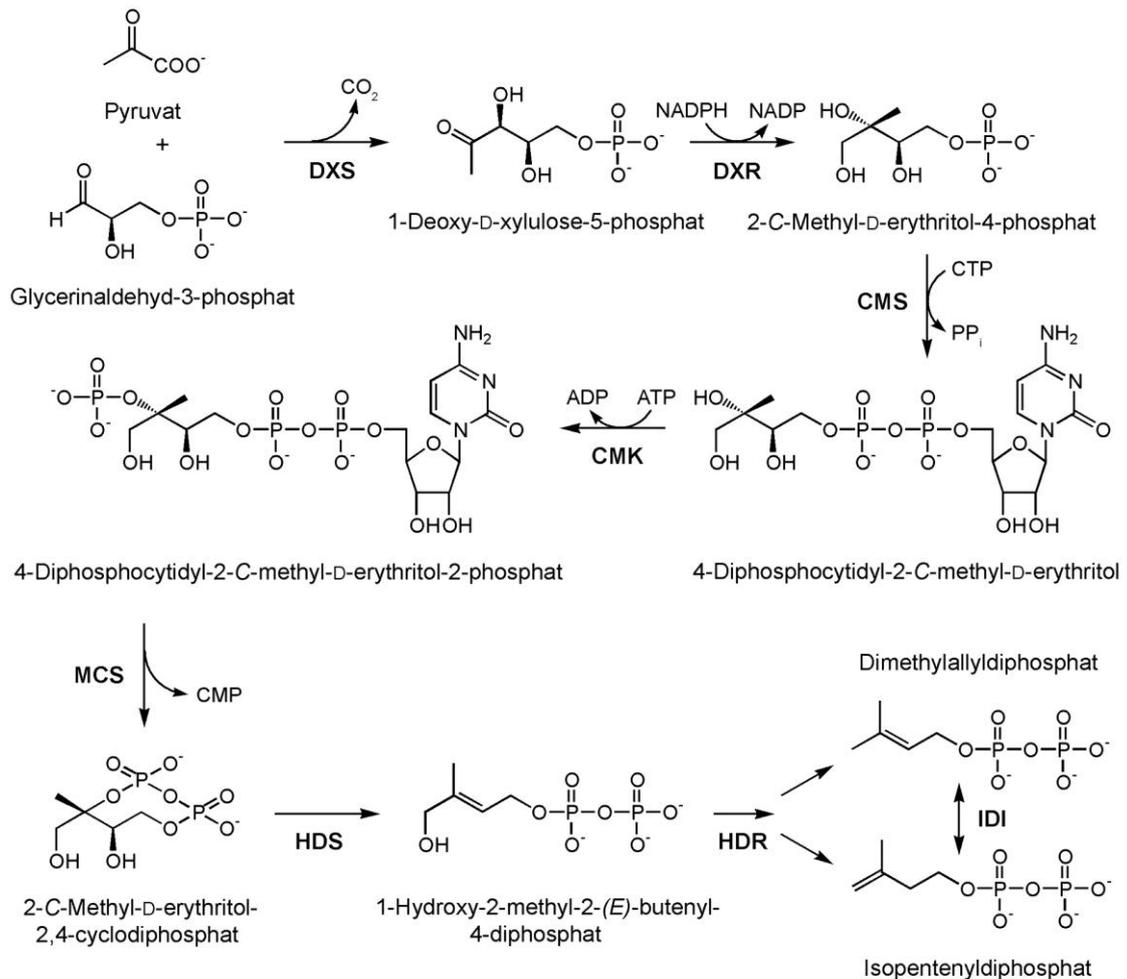


Abb. I-5: Schema des MEP-Wegs der Isoprenoidbiosynthese. DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, NADPH: reduziertes Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, NADP: Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, CMS: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-Synthase, CTP: Cytidintriphosphat, PP_i : Pyrophosphat, CMK: 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol-Kinase, ATP: Adenosintriphosphat, ADP: Adenosindiphosphat, MCS: 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase, CMP: Cytidinmonophosphat, HDS: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase, HDR: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase, IDI: Isopentenylidiphosphat-Isomerase.

1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthasen

Bei der Bildung der plastidären Vorstufen IPP/DMAPP für die Isoprenoidbiosynthese ist die DXS einer der limitierenden Faktoren, da deren Modulation direkt mit einer Erhöhung bzw. Reduktion MEP-abhängiger Isoprenoide in Pflanzen korreliert (Estevez *et al.*, 2001; Enfissi *et al.*, 2005; Munoz-Bertomeu *et al.*, 2006).

In den Jahren 1997 bzw. 1998 wurde das Gen für DXS aus *Escherichia coli* identifiziert (Sprenger *et al.*, 1997; Lois *et al.*, 1998). Der Reaktionsmechanismus konnte anhand der vor kurzem untersuchten Kristallstruktur der DXS-Proteine von *E. coli* und *Deinococcus radiodurans* besser charakterisiert werden (Xiang *et al.*, 2007). Auch aus anderen Organismen gelang die Klonierung und Charakterisierung des DXS-Gens, z.B. aus einem *Streptomyces*-Stamm (Kuzuyama *et al.*, 2000), aus *Synechococcus leopoliensis* (Miller

et al., 1999), aus der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Lichtenthaler, 1999) sowie den Höheren Pflanzen *Mentha x piperita* (Lange *et al.*, 1998), *Capsicum annuum* (Bouvier *et al.*, 1998), *S. lycopersicum* (Lois *et al.*, 2000) und *A. thaliana* (*CLA1*; Mandel *et al.*, 1996; Estevez *et al.*, 2000). Pflanzliche DXS-Proteine werden von nukleären Genen codiert (Rodríguez-Concepción, 2006) und besitzen eine N-terminale Signalsequenz für den Plastidenimport (Bouvier *et al.*, 1998; Lange *et al.*, 1998).

In zahlreichen Pflanzen, beispielsweise *M. truncatula*, *Z. mays* und *S. lycopersicum*, wird DXS von zwei Genen codiert (Walter *et al.*, 2002). Bislang wurde angenommen, dass DXS das einzige Enzym des MEP-Synthesewegs ist, welches von mehreren Genen codiert wird (Rodríguez-Concepción, 2006). Kürzlich konnten jedoch Kim *et al.* (2008) drei bzw. zwei Isogene für die 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase in *Ginkgo biloba* und *Pinus taeda* identifizieren.

Eine Vielzahl der bisher charakterisierten pflanzlichen DXS-Proteine ordnet sich in die DXS1-Klasse ein (Rodríguez-Concepción, 2006). So codiert beispielsweise das in *A. thaliana* charakterisierte *CLA1*-Gen (Mandel *et al.*, 1996; Estevez *et al.*, 2000) ein DXS1-Protein. Allerdings existieren in *Arabidopsis* noch zwei weitere DXS-ähnliche Sequenzen mit bisher unbekannt Funktionen, die putative DXS1-Proteine codieren (Rodríguez-Concepción & Boronat, 2002; Rodríguez-Concepción, 2006). Ein *DXS2*-Gen kommt in *A. thaliana* nicht vor (Walter *et al.*, 2002). Den zwei bis heute identifizierten DXS-Isoenzymen werden aufgrund komplett unterschiedlicher Genexpressionsmuster verschiedene Funktionen zugesprochen. Das Isoenzym, das aufgrund der Aminosäuresequenz der DXS1-Klasse angehört, wird dem Primärstoffwechsel zugeordnet, während das Isoenzym der DXS2-Klasse sekundärstoffwechselspezifisch ist (Walter *et al.*, 2002).

In mykorrhizierten Pflanzen von *M. truncatula*, *Z. mays* und *S. lycopersicum* tritt eine differenzielle Expression von *DXS1*- und *DXS2*-Genen auf (Walter *et al.*, 2002). Während abundante *DXS1*-Transkriptmengen in oberirdischen Pflanzenteilen vorkommen, sind *DXS1*-Transkriptmengen in den Pflanzenwurzeln kaum nachweisbar. Die *DXS2*-Transkriptmengen hingegen sind in allen Pflanzenteilen gering, werden jedoch durch die Kolonisierung der Wurzel mit AM-Pilzen in diesen Organen induziert und korrelieren mit der Akkumulation der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate (Walter *et al.*, 2002).

Carotinoide und ihre Spaltprodukte

Carotinoide werden in Bakterien, Algen, Pilzen und Pflanzen synthetisiert (Sandmann, 2001). Aufgrund des konjugierten Doppelbindungssystems ihres Molekülgerüsts sind sie in der Lage, Lichtenergie im Bereich von 420 - 500 nm zu absorbieren. Bedeutung besitzen diese Verbindungen als Farbstoffe in Blüten und Früchten, als akzessorische Photosynthesepigmente, als Antioxidantien und bei der Veränderung der Membranfluidität (Bouvier *et al.*, 2005).

Für die Biosynthese von Carotinoiden wird durch eine aufeinander folgende Kopf-Schwanz-Addition von drei IPP-Molekülen an ein DMAPP-Molekül Geranylgeranyldiphosphat gebildet. Der erste eigentliche Schritt der Carotinoidbiosynthese ist die Kondensation von zwei Geranylgeranyldiphosphat-Molekülen zu 15-*cis*-Phytoen, die von dem Enzym Phytoen-Synthase katalysiert wird. Die Phytoen- und ζ -Carotin-Desaturase wandeln anschließend 15-*cis*-Phytoen zu Lycopin um. Mit Hilfe von Zyklasten werden die Endgruppen von Lycopin zu Ringstrukturen modifiziert, das einseitig (monozyklische Carotinoide, z.B. γ - und δ -Carotin) oder beidseitig (dizyklische Carotinoide, z.B. α - und β -Carotin) erfolgen kann. Durch Hydroxylierung dieser Ringstrukturen entstehen Xanthophylle, z.B. Zeaxanthin. Aus diesem gehen durch Epoxidierung Antheraxanthin und Violaxanthin hervor. Letzteres ist die Ausgangsverbindung für Neoxanthin und das Phytohormon ABA (Übersichten bei Hirschberg, 2001 und Sandmann, 2001).

Nicht nur Carotinoide in ihrer intakten Form besitzen eine Bedeutung. Auch viele ihrer Spaltprodukte, die als Apocarotinoide bezeichnet werden, haben biologische Funktionen. Beispiele hierfür sind Trisporsäure als Pheromon bei Pilzen, ABA als Phytohormon sowie β -Iononverbindungen als pflanzliche Duft- und Aromastoffe (Übersicht bei Auldrige *et al.*, 2006b). Apocarotinoide entstehen durch den enzymatisch-oxidativen Abbau von Carotinoiden (Camara & Bouvier, 2004). Hierbei werden die Doppelbindungen der Carotinoide durch molekularen Sauerstoff gespalten und Aldehyd- und Ketonverbindungen als Intermediate gebildet. Die oxidative Spaltung kann dabei an jeder konjugierten Doppelbindung des Carotinoids erfolgen (Bouvier *et al.*, 2005) und resultiert, aufgrund der mehr als 600 bisher beschriebenen Carotinoiden und der Modifikation der Reaktionsprodukte, in einer Vielzahl an verschiedenen Apocarotinoiden (Vogel *et al.*, 2008). Unspezifische Spaltungen von Carotinoiden, die in Pflanzen beispielsweise durch Lipoxygenasen katalysiert werden oder chemisch-oxidativ auftreten, können auch vorkommen, sind aber an der Synthese biologisch bedeutsamer Apocarotinoide nicht beteiligt (Bouvier *et al.*, 2005).

Carotinoidspaltende Dioxygenasen

Die spezifische Spaltung der Doppelbindungen wird durch carotinoidspaltende Dioxygenasen katalysiert, die in Bakterien, Pflanzen und Tieren vorkommen (Auldrige *et al.*, 2006b). Das erste Enzym dieser Familie (VP14) wurde anhand der ABA-defizienten *vp14*-Mutante von *Z. mays* identifiziert (Schwartz *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 1997). VP14 ist eine 9-*cis*-Epoxy-carotinoid-spaltende Dioxygenase (*nine-cis-epoxy-carotinoid dioxygenase*, NCED) der ABA-Biosynthese, die *cis*-konfigurierte Isomere von Neoxanthin oder Violaxanthin an der 11,12-Position spaltet und somit Xanthoxin als Vorstufe von ABA bildet (Schwartz *et al.*, 1997). Im Genom von *A. thaliana* existieren neun Gene, die eine Sequenzähnlichkeit zu *VP14* aufweisen. Fünf dieser Gene (*AtNCED2*, *AtNCED3*, *AtNCED5*, *AtNCED6* und *AtNCED9*) codieren Proteine, die wahrscheinlich ebenfalls in die Biosynthese von ABA involviert sind (Iuchi *et al.*, 2001; Tan *et al.*, 2003) und aufgrund ihrer

Substratspezifität zu 9-*cis*-Epoxy-carotinoiden in die Klasse der NCEDs eingeordnet werden. Die vier verbleibenden Gene (*AtCCD1*, *AtCCD4*, *AtCCD7*, *AtCCD8*) codieren Proteine, die zur Klasse der carotinoidspaltenden Dioxygenasen (CCD) zählen und Doppelbindungen von Carotinoiden symmetrisch oder asymmetrisch spalten. *AtCCD1* katalysiert *in vitro* die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Position einer Vielzahl *trans*-konfigurierter Carotinoide (Übersicht bei Auldrige *et al.*, 2006b) und führt zur Bildung von zwei C₁₃-Produkten und einem C₁₄-Produkt (Schwartz *et al.*, 2001). Dienen 9-*cis*-konfigurierte Carotinoide als Substrate, so spaltet *AtCCD1* die 9',10'-Position und C₂₇-Produkte entstehen (Schwartz *et al.*, 2001). Kürzlich wurde auch die symmetrische Spaltung der Doppelbindungen an der 5,6- und 5',6'-Position von Lycopin beschrieben (Vogel *et al.*, 2008). Rekombinantes *AtCCD7*-Protein hingegen spaltet die 9,10-Position von β-Carotin und liefert ein C₁₃- und ein C₂₇-Produkt (Schwartz *et al.*, 2004). Letzteres wird durch *AtCCD8* in ein C₁₈-Produkt gespalten (Schwartz *et al.*, 2004). *AtCCD7* und *AtCCD8* fungieren im gleichen Stoffwechselweg und scheinen an der Synthese eines bislang nicht identifizierten Phytohormons beteiligt zu sein, das die laterale Verzweigung des Sprosses reguliert (Turnbull *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2004; Schwartz *et al.*, 2004). Mit Ausnahme von *AtCCD1* sind alle NCEDs und CCDs von *Arabidopsis* im Plastiden lokalisiert (Tan *et al.*, 2003, Booker *et al.*, 2004; Auldrige *et al.*, 2006a). Orthologe NCEDs und CCDs konnten bis heute in vielen Pflanzenarten identifiziert werden (Übersicht bei Bouwmeester *et al.*, 2007).

I.4 Zielstellung der Arbeit

Die Funktion des Carotinoidstoffwechsels in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln wurde erstmals von Fester *et al.* (2002b) untersucht. Hierbei zeigten Studien mit carotinoiddefizienten *Z. mays*-Mutanten eine negative Beeinflussung der AM. Jedoch konnten Sekundäreffekte, die durch die Beeinträchtigung der Symbiose aufgrund einer reduzierten Photosyntheseleistung der Pflanze auftreten, nicht ausgeschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit sollen die massiv akkumulierenden Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate, deren Funktion in der AM-Symbiose bis heute ungeklärt ist, untersucht werden. Mit der Akkumulation dieser Verbindungen korreliert die Transkriptmenge des *DXS2*-Isogens des MEP-Synthesewegs (Walter *et al.*, 2002). *DXS2* stellt somit ein geeignetes Zielgen für einen transgenen *loss of function*-Ansatz dar, der keine Auswirkungen auf die Biosynthese primärstoffwechselspezifischer Isoprenoide haben sollte.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Lokalisierung der *DXS2*-Promotoraktivität in mykorrhizierten Pflanzenwurzeln zur Charakterisierung des mykorrhizaregulierten *DXS2*-Isogens. Anhand dieser Untersuchungen soll der genaue Ort der Genexpression ermittelt werden, um erste Hinweise für die Bedeutung von *DXS2* in der AM-Symbiose zu erhalten.

Als zweites Ziel soll durch einen RNAi-vermittelten *loss of function*-Ansatz der direkte funktionelle Nachweis der Biosynthese von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten über

den DXS2-abhängigen MEP-Weg erfolgen. Dieser sollte die plastidären Grundbausteine IPP/DMAPP verringern und somit zu einer Reduktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate führen. Anhand der erzeugten RNAi-Pflanzen soll letztendlich die Funktion der akkumulierenden Apocarotinoide für die AM-Symbiose untersucht werden.

Der *DXS2*-RNAi-Ansatz beeinflusst einen sehr frühen Reaktionsschritt der Isoprenoidbiosynthese, der nicht ausschließlich zur Bildung von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in mykorrhizierten Wurzeln führt. Aus diesem Grund sollen die Auswirkungen des *DXS2*-Ansatzes auf die AM-Symbiose durch die Suppression einer *CCD1* in AM-Wurzeln bestätigt werden. Da für rekombinantes CCD1-Protein von *A. thaliana* die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Position einer Vielzahl *trans*-konfigurierter Carotinoide gezeigt wurde (Schwartz *et al.*, 2001), könnte eine CCD1 an der Biosynthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate beteiligt sein. Des Weiteren soll die Reduktion der *CCD1*-Transkriptmenge zur Identifikation des bis heute unbekanntes C₄₀-Vorläufercarotinoids beitragen, das in mykorrhizierten *CCD1*-RNAi-Wurzeln akkumulieren müsste.

Alle Untersuchungen wurden an der Leguminose *M. truncatula* durchgeführt, da diese Pflanze einen der Modellorganismen des Schwerpunktprogramms 1084 (Molekulare Grundlagen der Mykorrhiza-Symbiosen) darstellte, in dessen Rahmen die vorliegende Arbeit angefertigt wurde. Darüber hinaus waren die *MtDXS1*- und *MtDXS2*-Isogene bereits identifiziert (Walter *et al.*, 2002). Auch ein putativer *MtCCD1*-cDNA-Klon aus mykorrhizierten Wurzeln lag zu Beginn der Arbeit vor.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle für die Versuche verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien stammen, sofern nichts anders erwähnt, von den Firmen Carl Roth GmbH + Co. (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) und Merck (Darmstadt, Deutschland). Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001) mit H₂O_{dd} angefertigt und bei Bedarf autoklaviert (20 min, 121°C, 2 bar). Für besondere Reagenzien werden an den jeweiligen Textstellen entsprechende Hinweise gegeben.

II.1.2 Pflanzen- und Pilzmaterial

Alle Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurden mit *M. truncatula* L. Gaertn. var. Jemalong (Perkiss Seeds, Australien) durchgeführt.

Für Mykorrhizierungsansätze wurde der AM-Pilz *G. intraradices* Schenk & Smith (Isolat 49, H. von Alten, Universität Hannover, Deutschland) an Lauchpflanzen (*A. porrum* L. cv. Elefant, Erfurter Samen- und Pflanzenzucht GmbH, Erfurt, Deutschland) vermehrt und als Inokulum in Blähton (Original Lamstedt Ton, 2 - 5 mm Partikelgröße, Fibo ExClay, Lamstedt, Deutschland) eingesetzt.

II.1.3 Bakterienstämme und Kultivierung

E. coli

Für allgemeine Klonierungsarbeiten wurde der *E. coli*-Stamm XL1 Blue {*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac*[F' *proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (tet^r)*], Stratagene, La Jolla, CA, USA} verwendet. Die heterologe Genexpression von *MtCCD1* erfolgte im Stamm BL21(D3) [F' *ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm* (DE3), Novagen, Darmstadt, Deutschland]. Zum Aktivitätsnachweis von *MtCCD1* wurden BL21(D3)-Stämme verwendet, die zusätzlich das Plasmid pAC-BETA (Cunningham *et al.*, 1996) oder pAC-ZEAX (Sun *et al.*, 1996) enthalten. Die Vektoren tragen jeweils die codierenden Sequenzen von Enzymen der Carotinoidbiosynthese aus *Erwinia herbicola*, die zur Akkumulation von β-Carotin (pAC-BETA) oder Zeaxanthin (pAC-ZEAX) in den Bakterien führen.

Alle Stämme wurden auf LB-Agarplatten (vgl. II.1.4) oder als Suspensionsschüttelkultur (180 - 200 rpm, Schüttelinkubator, GFL[®] 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) in LB-Medium (vgl. II.1.4) unter Zugabe der entsprechenden Antibiotika (vgl. II.1.4) über Nacht bei 37°C kultiviert. Eine Selektion auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika (vgl.

II.1.4). Für die Lagerung über einen längeren Zeitraum wurde ein Aliquot einer Flüssigkultur mit 7% (v/v) DMSO versetzt, mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Agrobacterium rhizogenes

Die Agrobakterium-vermittelte Wurzeltransformation von *M. truncatula* wurde mit dem *A. rhizogenes*-Stamm ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993) durchgeführt. Die Anzucht der Bakterien erfolgte sowohl auf LB-Agarplatten (vgl. II.1.4) als auch in Suspensionsschüttelkultur (200 rpm, Schüttelinkubator, Certomat[®] BS-1, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) in LB-Medium (vgl. II.1.4) unter Zugabe von Streptomycin (vgl. II.1.4) für 24 bis 48 h bei 28°C. Durch entsprechende Antibiotika (vgl. II.1.4) wurde eine Selektion der transformierten Bakterien erzielt. Die Lagerung erfolgte in 7% (v/v) DMSO bei -80°C.

II.1.4 Nährmedien und Antibiotika für die Anzucht von Bakterien

Die Zusammensetzung der Medien erfolgte nach Sambrook & Russell (2001). Alle Nährmedien wurden sterilisiert (20 min, 121°C, 2 bar). Die Zugabe der Antibiotika (Tab. II-1) sowie weiterer Reagenzien [z.B. Glucose, IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid), X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid)] erfolgte nach Abkühlung der sterilisierten Medien auf 50°C. Die verwendeten Nährmedien und deren Zusammensetzung werden nachfolgend aufgeführt.

| | |
|---------------------------|--|
| Luria-Bertani-Medium (LB) | 1,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,0% (w/v) NaCl 1,5% (w/v) Agar [*] |
| SOC-Medium | 2,0% (w/v) Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1,5% (w/v) Agar [*] 10,0 mM NaCl 2,5 mM KCl 1,0 mM MgCl ₂ ^{**} 1,0 mM MgSO ₄ ^{**} 2,0 mM Glucose ^{**} |

^{*}Zusatz ausschließlich bei Nährmedien für Agarplatten

^{**}Zugabe nach dem Autoklavieren

Alle Antibiotika wurden als Stammlösungen, soweit nicht anders angegeben, in H₂O_{dd} angefertigt und steril filtriert (Rotilabo[®]-Spitzenfilter steril; 0,22 µm).

Tab. II-1: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika.

| Antibiotikum | Stammlösung | Arbeitskonzentration |
|-----------------|-------------|----------------------|
| Carbenicillin* | 50 mg/ml** | 50 µg/ml |
| Chloramphenicol | 50 mg/ml** | 50 µg/ml |
| Kanamycin | 50 mg/ml | 50 µg/ml |
| Streptomycin | 50 mg/ml | 50 µg/ml |
| Tetracyclin | 50 mg/ml | 12,5 µg/ml |

* entspricht der Selektion auf Ampicillinresistenz

** in Ethanol

II.1.5 Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasmide verwendet:

pGEM[®]-T Easy (Promega, Madison, WI, USA): Dieser Klonierungsvektor (3015 bp) liegt im pGEM[®]-T Easy-Klonierungskit in linearer Form vor und kann aufgrund der 3'-T-Überhänge zur TA-Klonierung von PCR-Produkten verwendet werden. Das Plasmid trägt eine Ampicillinresistenz und ermöglicht eine Blau-/Weiß-Selektion mit IPTG und X-Gal.

pET-28a(+) (Novagen, Darmstadt, Deutschland): Bei diesem Vektor handelt es sich um ein 5369 bp großes Plasmid für die heterologe Genexpression in *E. coli*. Der Vektor trägt, ausgehend von der multiplen Klonierungsstelle, einen N-terminalen 6x Histidin-, Thrombin- und T7-tag sowie einen weiteren C-terminalen 6x Histidin-tag. Das Plasmid vermittelt Kanamycinresistenz.

pRNAi (René Geurts, Universität Wageningen, NL): Dieses Plasmid (4780 bp) diente der Subklonierung von RNAi-Konstrukten (Limpens *et al.*, 2004). Die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *SwaI* am 5'-Ende sowie *BamHI* und *SpeI* am 3'-Ende des *spacer*-Elements ermöglichten die Klonierung der RNAi-Fragmente in *sense*- und *antisense*-Orientierung. Der Vektor besitzt eine Ampicillinresistenz zur Selektion.

p35SuidA-int: Dieser Vektor (6394 bp) wurde hergestellt, um Fusionskonstrukte des *MtDXS2-1*-Promotors und dessen Promotordeletionen mit dem β -Glucuronidase-Gen (*uidA*) zu erzeugen. Hierfür wurde unter Verwendung spezifischer Primer (vgl. Tab. VII-1 im Anhang) der codierende Bereich von *uidA-int* aus pGUS-INT (Küster *et al.*, 1995) amplifiziert (vgl. II.2.1.3) und zwischen die *NcoI*- und die *SpeI*-Schnittstellen des pRNAi-Vektors ligiert (vgl. II.2.1.4.7). Die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *NcoI* des erzeugten Vektors ermöglichten die Klonierung des *MtDXS2-1*-Promotors sowie dessen Promotordeletionen zur Herstellung der Fusionen mit dem β -Glucuronidase-Reporter gen. Das entstandene Plasmid (vgl. Abb. VII-1 im Anhang) vermittelt Ampicillinresistenz.

pRedRoot (René Geurts, Universität Wageningen, NL): Dieses Plasmid ist der in der vorliegenden Arbeit verwendete binäre Vektor (13527 bp) bei der Agrobakterium-vermittelten Wurzeltransformation (Limpens *et al.*, 2004). Die Restriktionsschnittstellen *PacI*

und *KpnI* ermöglichten die Klonierung der erzeugten RNAi-Konstrukte. Zur Insertion der Promotorfusionskonstrukte diente die *HindIII*-Schnittstelle. Der Vektor trägt eine Kanamycinresistenz für die Selektion sowie das aus der Seeanemone *Discosoma striata* stammende fluoreszierende Protein DsRED zur Identifikation transgener Wurzeln (Matz *et al.*, 1999).

II.1.6 Oligonucleotide

Oligonucleotide für die Sequenzierungsreaktionen und PCR-Amplifikationen wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Sequenzen sind im Anhang VII.1 aufgeführt.

II.2 Methoden

II.2.1 Molekularbiologische Arbeiten mit DNA

II.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus einer Suspensionsschüttelkultur des jeweiligen Bakterienklons wurde der QIAprep[®] Spin Miniprep Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) oder der GeneJET[™] Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) nach den jeweiligen Herstellerangaben verwendet.

II.2.1.2 Elektrophoretische Trennung von Nucleinsäuren

Die Auftrennung von Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.1), mit Restriktionsenzymen geschnittener DNA (vgl. II.2.1.4.1), PCR-Fragmenten (vgl. II.2.1.3) und RNA (vgl. II.2.3.1) erfolgte, sofern nichts anders erwähnt, im 1% (w/v) Agarose-Gel in 0,5x TBE-Puffer (0,05 M Tris-HCl; 0,04 M Borsäure; 1 mM EDTA; pH 8,0). Zur Visualisierung der Nucleinsäuren wurde der aufgeschmolzenen Gellösung 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die zu trennenden Proben wurden vor dem Auftragen mit 10x Probenpuffer [20% (v/v) Glycerin; 0,1 M EDTA; 1% (w/v) SDS; 0,2% (w/v) Bromphenolblau; 0,2% (w/v) Xylencyanol FF; pH 8,0] versetzt. Die Elektrophorese erfolgte je nach Gelgröße bei 80 - 120 V in 0,5x TBE-Puffer. Nach der Gelelektrophorese wurden die Agarose-Gele mit dem Geldokumentationssystem (BioDocAnalyze, Whatmann Biometra, Göttingen, Deutschland) unter UV-Anregung ausgewertet. Die Fragmentgröße und Konzentration der DNA wurden anhand eines DNA-Markers (SmartLadder, Eurogentec, Seraing, Belgien) ermittelt.

II.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion stellt ein Verfahren für die gezielte Amplifikation eines Abschnitts aus einem DNA-Strang (*template*) mittels zweier spezifischer Oligonucleotide (Primer) und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase dar (Mullis & Faloona, 1987). Bei

diesem Prozess wird eine zyklische Abfolge von Denaturierung der DNA, Primeranlagerung (*annealing*) und Synthese (*elongation*) 25 - 35-mal durchlaufen. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte im Eppendorf MasterCycler® Gradient Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit GoTaq®-DNA-Polymerase und für die Klonierung von PCR-Fragmenten mit *Pfu*-DNA-Polymerase (beides Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) in folgendem Reaktionsansatz:

| | |
|---|--------------------|
| Reaktionspuffer inkl. MgSO ₄ | 1x |
| dNTP Mix | 200 µM |
| <i>forward</i> Primer | 0,2 µM |
| <i>reverse</i> Primer | 0,2 µM |
| DNA <i>template</i> | 100 ng Plasmid-DNA |
| DNA-Polymerase | 1,25 U |
| H ₂ O _{dd} | ad 50 µl |

Ein Standard PCR-Programm ist in Tab. II-2 dargestellt.

Tab. II-2: Generelles Schema für PCR-Programme. Die *annealing*-Temperatur (T_{opt}) im Schritt 3 lag meist 2 - 4°C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur (T_m) der Primer. Die Dauer der *elongation* war abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments und betrug 1 kb/min für Reaktionen mit der GoTaq®-DNA-Polymerase und 2 kb/min für Ansätze mit der *Pfu*-DNA-Polymerase.

| Prozess | Temperatur | Dauer |
|---------------------------------------|------------|-----------|
| 1 Initiale Denaturierung | 95°C | 1 - 2 min |
| 2 Denaturierung | 95°C | 30 s |
| 3 <i>annealing</i> | T_{opt} | 30 s |
| 4 <i>elongation</i> | 72°C | 1 - 6 min |
| 5 25 - 35 Zyklen der Schritte 2 bis 4 | | |
| 6 Finale <i>elongation</i> | 72°C | 10 min |
| 7 Abkühlung | 4°C | ∞ |

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.2).

II.2.1.4 Klonierungstechniken

II.2.1.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Alle Restriktionsenzyme und Puffer wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland), New England BioLabs® (Ipswich, MA, USA) und Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen. Die Restriktionsspaltung von 0,5 - 1 µg DNA erfolgte in einem Endvolumen von 20 µl nach Angaben des Herstellers. Für präparative Reaktionen wurden entsprechend größere Mengen an DNA eingesetzt. Die Kontrolle der Restriktionsspaltung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.2).

II.2.1.4.2 Dephosphorylierung

Zur Vermeidung der Selbstligation des Vektors nach Restriktionsspaltung wurden die Phosphatreste an den 5'-Enden mittels *shrimp alkaline phosphatase* (SAP, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) entfernt. Die Reaktion erfolgte nach dem Herstellerprotokoll.

II.2.1.4.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte für eine Fragmentgröße bis 4 kb mit dem MinElute[®] Gel Extraction Kit bzw. für Fragmente größer als 4 kb mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (beides Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Die elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmente (vgl. II.2.1.2) wurden auf dem UV-Leuchttisch des Geldokumentationssystems BioDocAnalyse (Whatmann Biometra, Göttingen, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die Elution der Fragmente aus der Gelmatrix erfolgte nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Anschließend wurde die DNA-Konzentration durch Agarose-Gelelektrophorese unter Verwendung eines Größenstandards mit definierter Konzentration bestimmt (vgl. II.2.1.2).

II.2.1.4.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten nach PCR (vgl. II.2.1.3), Restriktionsspaltung (vgl. II.2.1.4.1) und Dephosphorylierung (vgl. II.2.1.4.2) wurde mit dem SureClean Kit der Firma Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

II.2.1.4.5 Anhängen von 3'-A-Überhängen an PCR-Produkte (*A-tailing*)

DNA-Amplifikationsprodukte der *Pfu*-DNA-Polymerase besitzen am 3'-Ende keinen Adenosin-Überhang (A-Überhang), im Gegensatz zu *Taq*-DNA-Polymerase generierten Produkten. Für eine TA-Klonierung in den Vektor pGEM[®]-T Easy (vgl. II.1.5) mussten diesen DNA-Fragmenten 3'-A-Überhänge angefügt werden. Dies erfolgte durch Inkubation der entsprechenden PCR-Fragmente (ca. 150 ng) mit 0,2 mM dATP, 1x Reaktionspuffer und 5 U GoTaq[®]-DNA-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) für 30 min bei 70°C. Anschließend konnten die Produkte bei Ligationsreaktionen eingesetzt werden (vgl. II.2.1.4.7).

II.2.1.4.6 Auffüllen von Enden mit 5'-Überhängen (*fill in*)

Die Auffüllreaktion der 5'-Überhänge von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsspaltung entstanden waren (vgl. II.2.1.4.1), wurde mit dem Klenow-Fragment der *E. coli*-Polymerase I der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

II.2.1.4.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden unterschiedliche Ansätze verwendet. Das molare Verhältnis zwischen Vektor- und *insert*-DNA betrug aber stets 1:5.

Die Ligation von PCR-Produkten mit dem Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy (vgl. II.1.5) wurde mit der im Klonierungskit vorhandenen T4 DNA-Ligase (Promega, Madison, WI, USA) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Ligation von DNA-Fragmenten mit pET-28a(+), p35*SuidA*-int und pRNAi (vgl. II.1.5) wurde die T4 DNA-Ligase der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Reaktionen wurden über Nacht bei 22°C inkubiert.

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in den binären Vektor pRedRoot (vgl. II.1.5) erfolgte mit folgendem Ligationsansatz:

Nach Restriktionsspaltung (vgl. II.2.1.4.1) der Vektor- und *insert*-DNA wurden die Reaktionsansätze vereinigt und gereinigt (vgl. II.2.1.4.4). Für die Ligation wurde das erhaltene DNA-Pellet getrocknet, in einem 20 µl Ligationsansatz mit T4 DNA-Ligase und Reaktionspuffer der Firma Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) aufgenommen und über Nacht bei 22°C inkubiert.

Die Inaktivierung der Ligase erfolgte bei allen Ligationsreaktionen durch eine Inkubation für 10 min bei 65°C.

Zur Transformation von *E. coli* (vgl. II.2.2.1) wurden 3 - 6 µl Ligationsansatz eingesetzt.

II.2.1.5 Sequenzierung und Sequenzanalyse

Alle DNA-Sequenzierreaktionen wurden von der Firma MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) als externe Auftragsarbeit durchgeführt. Die Auswertung der Nucleotidsequenzen erfolgte mit den Programmen Clone Manager Professional Suite (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA) und Chromas (Griffith University, Brisbane, Queensland, Australien).

II.2.2 Transformation von Bakterien

II.2.2.1 Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch-kompetenter Zellen wurden 100 ml LB-Medium (vgl. II.1.4) mit 1 ml Suspensionsschüttelkultur (vgl. II.1.3) beimpft und bei 37°C und 180 - 200 rpm (Schüttelinkubator, GFL[®] 3032, Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 g, 4°C) pelletiert und auf Eis in 20 ml steril filtrierten Puffer 1 [30 mM K-Acetat; 100 mM RbCl; 10 mM CaCl₂; 50 mM MnCl₂; 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8] resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt erfolgte die Aufnahme der Zellen in 4 ml steril filtrierten Puffer 2 [10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂; 10 mM RbCl; 15%

(v/v) Glycerin; pH 6,5] und eine Inkubation von 30 min auf Eis. Von der Zellsuspension wurden 50 µl-Aliquote angefertigt und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurde ein Aliquot dieser Zellen auf Eis aufgetaut, mit 3 - 6 µl Ligationsansatz (vgl. II.2.1.4.7) versetzt, 5 min auf Eis, 75 s bei 42°C und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach folgte die Zugabe von 200 µl SOC-Medium (vgl. II.1.4) zum Transformationsansatz und eine Inkubation für 45 min bei 37°C und 180 - 200 rpm. Anschließend wurden 10 bis 100 µl dieser Kultur auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (vgl. II.1.4) verteilt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Identifikation von Klonen mit dem gewünschten Vektor erfolgte mittels Restriktionsspaltung (vgl. II.2.1.4.1) der isolierten Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.1).

II.2.2.2 Herstellung und Transformation kompetenter *A. rhizogenes*-Zellen

Zur Herstellung elektro-kompetenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium (vgl. II.1.4) mit 2 ml Bakterienkultur (vgl. II.1.3) beimpft und bei 28°C und 200 rpm (Schüttelinkubator, Certomat® BS-1, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 g und 4°C pelletiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift der Zellen in 4°C kaltem, sterilen H₂O_{dd}, ein weiterer in 10% (v/v) Glycerin und nach erneuter Zentrifugation (10 min, 3000 g, 4°C) die Aufnahme der Zellen in 1 ml 10% (v/v) Glycerin. Die 50 µl-Aliquote der Zellen wurden bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

Die Transformation von *A. rhizogenes* erfolgte durch Elektroporation. Hierfür wurde ein Aliquot der kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 ng Plasmid-DNA versetzt und in eine vorgekühlte Küvette (2 mm Spaltbreite, Eurogentec, Seraing, Belgien) überführt. Die Transformation wurde im Micropulser™ der Firma BioRad Laboratories GmbH (München, Deutschland) mit der Einstellung *Agr* durchgeführt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit LB-Medium (vgl. II.1.4) 1:1000 verdünnt und für 3 h bei 28°C und 200 rpm inkubiert. Zur Selektion wurden 10 µl Transformationsansatz auf LB-Agarplatten (vgl. II.1.4) mit den entsprechenden Antibiotika (vgl. II.1.4) verteilt und 2 d bei 28°C inkubiert. Die Identifikation von Bakterienkolonien mit dem gewünschten Plasmid erfolgte mittels Restriktionsspaltung (vgl. II.2.1.4.1) isolierter Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.1).

II.2.3 Molekularbiologische Arbeiten mit RNA

II.2.3.1 Präparation von Gesamt-RNA aus *M. truncatula*

Gesamt-RNA aus *M. truncatula*-Wurzeln für quantitative Real-Time RT-PCR-Untersuchungen (vgl. II.2.3.4) wurde mit dem RNeasy® Plant Mini Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben isoliert.

Die Isolation von RNA für Microarray-Analysen (vgl. II.2.3.5) erfolgte nach einer Trizol-Methode, bei der 100 mg gemörseretes Wurzelmaterial in 1 ml TRIzol[®] Reagent (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) resuspendiert wurde. Im Anschluss erfolgten eine Inkubation von 10 min bei RT (schüttelnd) sowie die Zentrifugation der Proben für 10 min bei 12000 g und RT. Nach Zugabe von 300 µl Chloroform und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT (schüttelnd) wurden die Proben für 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Dann erfolgte durch Zugabe von 300 µl Na-Acetat/NaCl-Lösung (0,8 M Na-Acetat; 1,2 M NaCl in H₂O_{DEPC}) sowie einer je 10-minütigen Inkubation bei RT und 4°C die Präzipitation der Nucleinsäuren aus der wässrigen Phase. Die RNA wurde durch Zentrifugation (15 min, 12000 g, 4°C) pelletiert, dreimal mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O_{DEPC} gelöst.

Nach fotometrischer Quantifizierung und Qualitätskontrolle durch elektrophoretische Trennung im 1,2% (w/v) Agarose-Gel (vgl. II.2.1.2) wurde die RNA bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

II.2.3.2 Deoxyribonuclease (DNase)-Behandlung von RNA

Für die Entfernung kontaminierender, genomischer DNA in RNA-Proben wurde rekombinante DNase I der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet. Die Reaktion erfolgte nach Angaben des Herstellers und wurde 15 min bei 30°C inkubiert. Nach anschließender Inaktivierung der DNase erfolgte eine erneute Qualitätskontrolle der RNA durch Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.2). Die Kontamination mit genomischer DNA wurde durch PCR bestimmt (vgl. II.2.1.3). Hierfür wurden 50 ng DNase-behandelte RNA als *template* eingesetzt. Nach erfolgter Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.2) wurden kontaminierte Proben einer erneuten DNase-Behandlung unterzogen.

II.2.3.3 cDNA-Erststrangsynthese

Die cDNA-Synthese von 1 µg DNase-behandelter Gesamt-RNA (vgl. II.2.3.2) wurde mit einem Oligo(dT19)-Primer und der M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant (Promega, Madison, WI, USA) nach den Angaben des Herstellers in einem Reaktionsvolumen von 20 µl durchgeführt. Vor Verwendung des cDNA-Ansatzes als *template* in der Real-Time RT-PCR (II.2.3.4) erfolgte dessen Verdünnung auf 10 ng RNA-Äquivalent/µl H₂O_{DEPC}.

II.2.3.4 Real-Time RT-PCR

In der Real-Time RT-PCR werden, beruhend auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR (vgl. II.2.1.3), Nucleinsäuren amplifiziert und mittels Fluoreszenzmessungen während bzw. am Ende eines PCR-Zyklus quantifiziert. Die Quantifizierung kann absolut über eine Kalibrierungskurve (Pfaffl & Hageleit, 2001) oder relativ, z.B. über die Normierung auf die Transkriptmenge eines nicht regulierten Gens, erfolgen (Rasmussen, 2001). Das Maß für die

Quantifizierung ist der Ct-Wert, der den PCR-Zyklus angibt, bei dem ein definiertes Fluoreszenzniveau (*threshold*) über dem Hintergrundsignal (Basislinie) detektiert wird.

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurde in der vorliegenden Arbeit der Fluoreszenzfarbstoff SYBR[®] Green I verwendet. Die Bindung dieses Farbstoffs an doppelsträngige DNA führt zum Anstieg seiner Fluoreszenzintensität, die mit der Zunahme an *template*-DNA korreliert.

Die Ableitung der verwendeten Primer (vgl. Tab. VII-2 im Anhang) erfolgte mit der Software Primer Express[™] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Für die Gewährleistung ihrer Spezifität wurde eine Schmelztemperatur von 59 - 60°C gewählt und, wenn möglich, mindestens ein Primer für die Amplifikation eines Gens über eine Exon/Exon-Grenze gelegt. Aufgrund der unspezifischen Bindung von SYBR[®] Green I an doppelsträngige DNA wurden Dimere oder Sekundärstrukturen der Primer vermieden. Des Weiteren erfolgte die Überprüfung der Spezifität der Primer durch Datenbankabfragen mit BLAST (Altschul *et al.*, 1997) über die Internetseiten DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/cgibin/tgi/Blast/index.cgi>) und NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte betrug zwischen 100 - 150 bp und deren Schmelztemperatur 75 - 80°C. Zur Kontrolle der spezifischen Amplifikation eines DNA-Fragments erfolgte nach Ablauf der PCR die Bestimmung der Schmelztemperatur des PCR-Produkts mittels Schmelzkurvenanalyse. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich von 60 auf 95°C erhöht und die Fluoreszenzintensität gemessen. Beim Erreichen der spezifischen Schmelztemperatur des PCR-Produkts zerfällt der DNA-Doppelstrang, SYBR[®] Green I wird freigesetzt und die Fluoreszenzintensität geht zurück. Die Amplifikation eines DNA-Fragments wird durch einen charakteristischen Peak der Schmelzkurve verdeutlicht.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Real-Time RT-PCR-Untersuchungen erfolgten in einem Mx3000P[®] oder Mx3005P[™] QPCR-System der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) unter Verwendung des SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in nachfolgendem Reaktionsansatz:

| | |
|---|---------------------|
| SYBR [®] Green PCR Master Mix | 1x |
| <i>forward</i> Primer | 100 nM |
| <i>reverse</i> Primer | 100 nM |
| cDNA <i>template</i> /DNase-behandelte RNA* | 5 ng RNA-Äquivalent |
| H ₂ O _{dd} | <i>ad</i> 10 µl |

*Kontrolle zur Bestimmung von genomischer DNA

Für die Amplifikation wurde das in Tab. II-3 aufgeführte PCR-Programm verwendet. Der Einsatz von DNase-behandelter RNA als *template* diente als Kontrollreaktion, um die Menge an genomischer DNA in den Proben zu bestimmen. Es wurden nur RNA-Proben verwendet, die eine Kontamination mit genomischer DNA von weniger als 1% aufwiesen.

Tab. II-3: Reaktionsbedingungen der durchgeführten Real-Time RT-PCR-Untersuchungen.

| Prozess | Temperatur | Dauer |
|---|------------|--------|
| 1 Aktivierung der <i>Taq</i> DNA-Polymerase | 95°C | 10 min |
| 2 Denaturierung | 95°C | 30 s |
| 3 <i>annealing</i> | 60°C | 60 s |
| 4 <i>elongation</i> | 72°C | 30 s |
| 5 50 Zyklen der Schritte 2 bis 4 | | |
| 6 Schmelzkurvenanalyse* | | |

*Kontrolle (Ermittlung der Schmelztemperatur der PCR-Produkte)

Die Auswertung der Fluoreszenzmessungen erfolgte mit dem Programm MxPro™ der QPCR-Software (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Die gemessenen Fluoreszenzwerte wurden auf den im SYBR® Green PCR Master Mix enthaltenen Fluoreszenzfarbstoff ROX normiert und der maschinell ermittelte *threshold* im Bereich 0,03 - 0,06, bezogen auf die Differenz zu ROX, beibehalten. Die Berechnung der Basislinie erfolgte adaptiv mit den gemessenen Ct-Werten pro Reaktion. Für alle Reaktionen wurde der *threshold* als signifikante Erhöhung der Fluoreszenzmenge über der Basislinie festgelegt.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Real-Time RT-PCR-Untersuchungen wurde eine relative Quantifizierung der Transkriptmengen vorgenommen. Die Normalisierung der erhaltenen Ct-Werte der zu untersuchenden Gene (Zielgene, ZG) erfolgte auf den Translations-Elongationsfaktor 1 α (Referenzgen, RG) von *M. truncatula* (Doll *et al.*, 2003) unter Verwendung von Formel (1):

$$\Delta Ct = Ct_{RG} - Ct_{ZG} \quad (1)$$

ΔCt normalisierter Ct-Wert
 Ct_{RG} Ct-Wert des Referenzgens
 Ct_{ZG} Ct-Wert des Zielgens

Beträgt die PCR-Effizienz 100%, so verdoppeln sich mit jedem PCR-Zyklus die Mengen an amplifizierter DNA und parallel dazu die Fluoreszenzintensitäten. Die Bestimmung der PCR-Effizienz (E) der verwendeten Primerpaare erfolgte mit den normierten Fluoreszenzdaten und dem Programm LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003). Die Effizienz des RG lag in allen Proben bei 1,95 - 2,05 und wurde deswegen 2 gesetzt. Die relative Transkriptmenge der ZG (T_R), die das Verhältnis zwischen der Transkriptmenge des RG und der Transkriptmenge des ZG angibt, wurde nach Formel (2) mit den ermittelten PCR-Effizienzen der ZG berechnet:

$$T_R = E^{\Delta Ct} \quad (2)$$

Die ermittelte relative Transkriptmenge eines Gens von einer Probe resultiert aus dem Mittelwert von drei technischen Wiederholungen.

II.2.3.5 Microarray-Analysen

Zur Untersuchung der differentiellen Genexpression in Wurzeln von *M. truncatula* wurden Microarray-Analysen in Zusammenarbeit mit Dr. H. Küster (Universität Bielefeld, Deutschland) unter Verwendung des Mt16kOLI1Plus Microarray-Chips durchgeführt. Jeder Chip ist in 48 Raster mit je 26 Zeilen und 28 Spalten unterteilt und besitzt somit 34944 Positionen. Davon stellen 33792 die Testfelder (*spots*) dar. Diese *spots* repräsentieren, neben zahlreichen Kontrollen, alle 16086 TCs (*tentative consensus sequences*) des DFCI *M. truncatula* Gen Index 5 sowie 384 Transkriptionsfaktoren als synthetisch hergestellte Oligonucleotide mit einer Länge von 70 bp. Bei den TCs handelt es sich um virtuelle Transkripte, die durch Aneinanderreihung verschiedener überlappender EST-Klone (*expressed sequence tag*) gebildet wurden. Die TCs und Transkriptionsfaktoren liegen auf jedem Microarray als Duplikate im gleichen Raster vor (Tellström *et al.*, 2007). Die Oligonucleotide dienen als Sonde, mit denen komplementäre mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Cy3 oder Cy5) markierte cDNAs hybridisieren können. Zur Identifizierung differentiell exprimierter Gene in der zu untersuchenden Probe (Targetprobe, TP) wird deren markierte cDNA und die mit dem jeweiligen anderen Fluoreszenzfarbstoff markierte cDNA der Referenzprobe (RP) vermischt, auf dem Array aufgebracht und hybridisiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgt die Bestimmung der Fluoreszenzintensität beider Farbstoffe. Aufschlüsse über die Genexpression der TG liefern letztendlich die Position und Intensität der emittierten Fluoreszenz des jeweiligen *spot*.

Die nach der Trizol-Methode aus Wurzeln isolierte RNA (vgl. II.2.3.1) wurde zur Kontrolle elektrophoretisch getrennt (vgl. II.2.1.2) und anschließend mit Microcon-30-Säulen (Millipore, Schwalbach, Deutschland) auf 1,25 µg/µl RNA konzentriert. Die isolierte RNA der RPs wurde jedoch vor der Konzentration vereinigt, um gleiche Referenzen bei allen Hybridisierungen zu gewährleisten. Die Herstellung Cy3- und Cy5-markierter cDNA wurde nach Hohnjec *et al.* (2005) mit 20 µg RNA durchgeführt. Die Hybridisierung der Arrays mit den beiden unterschiedlich markierten cDNAs von TP und RP sowie das Auslesen der erhaltenen Fluoreszenzsignale erfolgte wie in Küster *et al.* (2004) und Hohnjec *et al.* (2005) beschrieben, wobei in der vorliegenden Arbeit als TP RNAi-Wurzeln und als RP EV-Wurzeln dienten. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit der EMMA 2.0-Software analysiert (Dondrup *et al.*, 2003), normiert und statistisch ausgewertet (Küster *et al.*, 2004). Gene wurden als differentiell exprimiert definiert, wenn die mittlere Intensität beider Fluoreszenzen über der des Hintergrunds lag, mindestens eines der Testfelder pro Gen ein Signal zeigte und der *P*-Wert $\leq 0,05$ sowie die \log_2 -Intensitätsverhältnisse zwischen TP und RP, angegeben als \log_2 -Wert, $-1 \geq \log_2\text{-Wert} \geq 1$ betragen. Wurde für ein Gen ein \log_2 -Wert von 1 erhalten, so lag eine Verdopplung der Transkriptmenge in der TP vor, währenddessen bei einer zweifach erniedrigten Transkriptmenge des Gens in der TP der \log_2 -Wert -1 war.

Die Validierung der Ergebnisse der Microarray-Analyse erfolgte durch Real-Time RT-PCR mit Pflanzen eines unabhängigen Transformationsansatzes (vgl. II.2.3.4). Hierfür wurden

Primerpaare ausgewählter Gene verwendet (vgl. Tab. VII-2 im Anhang). Anhand der berechneten ΔC_t -Werte von RP und TP [vgl. Formel (1)] erfolgte die Bestimmung des $\Delta\Delta C_t$ -Werts eines Gens unter Verwendung von Formel (3):

$$\Delta\Delta C_t\text{-Wert} = \Delta C_{t_{TP}} - \Delta C_{t_{RP}} \quad (3)$$

$\Delta C_{t_{TP}}$ normalisierter C_t -Wert des Gens in der Targetprobe

$\Delta C_{t_{RP}}$ normalisierter C_t -Wert des Gens in der Referenzprobe

Unter Berücksichtigung einer PCR-Effizienz von nahezu 100% ($E = 2$) war der berechnete $\Delta\Delta C_t$ -Wert mit dem \log_2 -Wert des Microarrays vergleichbar.

II.2.4 Arbeiten mit Pflanzen

II.2.4.1 Pflanzenanzucht und Mykorrhizierung

Die Keimung der Medicago-Samen erfolgte durch eine 8 - 10-minütige Behandlung in konz. H_2SO_4 , um die Samenschale aufzubrechen und das Eindringen von Wasser und Sauerstoff zu gewährleisten. Zur vollständigen Entfernung der H_2SO_4 schlossen sich vier 2-minütige Waschschrte mit H_2O_{dd} an. Anschließend wurden die Samen in sterilem H_2O_{dd} für 4 h bei RT und Licht inkubiert. Die stark gequollenen Samen wurden auf feuchten H_2O -Agarplatten [0,8% (w/v)] ausgelegt und für 4 d unter Lichtabschluss bei 4°C aufbewahrt. Danach folgte eine 2-tägige Inkubation der invertierten Agarplatten bei RT ohne Licht und eine 1-tägige Inkubation im Lichtraum, bevor sich die Wurzeltransformation anschloss (vgl. II.2.4.2). Bei Wildtyp-Analysen wurde je ein Keimling in einen Plastiktopf (\varnothing 12 cm; Gärtnerbedarf Kammlot GmbH, Erfurt, Deutschland) mit Blähton (Original Lamstedt Ton, 2 - 5 mm Partikelgröße, Fibo ExClay, Lamsted, Deutschland) pikiert und, sofern nicht anders angegeben, im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (16 h Tag bei 23°C, 8 h Nacht bei 18°C, 50% rel. Luftfeuchte) angezogen. Die Pflanzen wurden einmal wöchentlich mit 10 ml 0,5x Long Ashton Dünger (Hewitt, 1966) mit 20% Phosphat (bezogen auf den Gesamtphosphatgehalt nach Long Ashton) versorgt und dreimal wöchentlich mit H_2O_d gegossen.

Für Mykorrhizierungsansätze wurde eine Pflanze in einen Plastiktopf (\varnothing 12 cm) mit einem Gemisch aus Pilz-Inokulum (vgl. II.1.2) und sterilem Blähton [3:7 (w/w)] pikiert.

II.2.4.2 Wurzeltransformation von *M. truncatula* und Identifikation transgener Wurzeln

Die Erzeugung transgener Wurzeln erfolgte mittels des gram-negativen Bodenbakteriums *A. rhizogenes*, das durch die Übertragung der *root locus (rol)*-Gene seiner Ri-T-DNA in das pflanzliche Genom, zusätzlich zu den Wildtyp-Wurzeln, die Bildung von Adventivwurzeln an der Infektionsstelle bewirkt (Chilton *et al.*, 1982; Nilsson & Olsson, 1997). Aufgrund ihrer großen Anzahl an Wurzelhaaren werden diese als *hairy roots* bezeichnet. Die in der Gentechnik verwendeten Agrobakterien-Stämme ermöglichen die gleichzeitige Übertragung

ihrer Ri-T-DNA und der T-DNA eines binären Vektors und führen so zur Bildung von transgenen *hairy roots*. Da der Spross und die Wildtyp-Wurzel bei diesem Vorgang unbeeinflusst bleiben, entstehen chimäre Pflanzen mit Wildtyp-Spross, Wildtyp-Wurzel und transgenen *hairy roots*. Die in der Arbeit angewandte Methode zur Erzeugung transgener *hairy roots* orientierte sich an Vieweg *et al.* (2004), wobei die Keimung der Samen, wie unter Punkt II.2.4.1 beschrieben, durchgeführt wurde.

Für die Transformation wurden 150 µl Suspensionsschüttelkultur der Agrobakterien (vgl. II.1.3) auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (vgl. II.1.4) verteilt und für 2 d bei 28°C inkubiert. Die Aufnahme der Bakterien erfolgte pro Agarplatte in 5 ml Puffer (51 mM NaH₂PO₄; 22 mM KH₂PO₄; 86 mM NaCl; pH 7,0). Durch eine drei- bis fünfmalige Injektion von insgesamt 50 - 100 µl dieser Bakteriensuspension in das Hypokotyl der *Medicago*-Keimlinge wurde die Bildung transgener *hairy roots* induziert. Anschließend wurden je zwei Keimlinge in Plastiktöpfe (Ø 5,5 cm, Hermann Meyer KG, Nossen Deutschland) mit feuchtem Blähton (Original Lamstedt Ton, 2 - 5 mm Partikelgröße, Fibo ExClay, Lamstedt, Deutschland) pikiert, wobei die Injektionsstellen nicht bedeckt wurden. Die Kultivierung der Keimlinge erfolgte für 2 Wochen unter einer Plastikhaube, die für die ersten 3 d schattiert war, bei 20°C und einer Lichtperiode von 16 h (Lichtintensität: 180 µmol/m²/s) und anschließend weitere 2 Wochen ohne Plastikhaube bei 23°C. Erzeugte *hairy roots* wurden mit einem Vermiculit/Sand-Gemisch [1:1 (v/v)] bedeckt.

Zur Identifikation transgener *hairy roots* erfolgte 4 Wochen nach der Agrobakterium-Injektion eine erste Untersuchung auf das fluoreszierende Protein DsRED, dessen codierende Sequenz auf der T-DNA des binären Vektors pRedRoot lokalisiert ist (vgl. II.1.5). Hierfür wurde der Blähton von den Pflanzenwurzeln entfernt und die Fluoreszenz mittels eines Fluoreszenzstereomikroskops (Leica MZ FLIII mit DsRED-Filter, Leica Camera AG, Solms, Deutschland) detektiert. Alle nicht fluoreszierenden *hairy roots* sowie die Wildtyp-Wurzel wurden entfernt und die Pflanzen erneut in Plastiktöpfe (Ø 12 cm; Gärtnereibedarf Kammlott GmbH, Erfurt, Deutschland) mit Blähton pikiert. Eine weitere Anzucht der Pflanzen für 2 Wochen bei 23°C und einer Lichtperiode von 16 h (Lichtintensität: 180 µmol/m²/s) schloss sich an. Danach erfolgte eine zweite Selektion der Pflanzen auf DsRED-Fluoreszenz und eine eventuelle Mykorrhizierung wie in Punkt II.2.4.1 beschrieben.

II.2.5 Mikroskopische Arbeiten

II.2.5.1 Anfärben von Pilzstrukturen

Zur Visualisierung der Pilzstrukturen wurden die Wurzelsegmente mehrmals mit H₂O_d gewaschen und für 10 min bei 90°C in 10% (w/v) KOH inkubiert. Anschließend erfolgte die Teilung der Wurzelproben für die nachfolgend beschriebenen Färbungen der Pilzstrukturen.

II.2.5.1.1 Tintenfärbung und Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads

Nach einer 10-minütigen Inkubation bei RT in 2% (v/v) Essigsäure erfolgte die Färbung mit 5% (v/v) Tinte (Sheaffer Skrip jet black, Sheaffer Manufacturing, Madison, WI, USA) in 2% (v/v) Essigsäure (Vierheilig *et al.*, 1998). Nach dem Waschen der gefärbten Proben war die Lagerung in H₂O_d bei 4°C über einen längeren Zeitraum möglich. Um Aussagen über den Grad der Mykorrhizierung zu treffen, wurden unter Verwendung eines Stereomikroskops (Stemi 2000-C, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und des Computerprogramms „Mycocalc“ (Trouvelot *et al.*, 1986; <http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Mycocalc-prg>) die Kolonisierungsrate und die Arbuskelabundanz in den Wurzelstücken bestimmt.

II.2.5.1.2 Fuchsinäurefärbung

Zur gezielteren Untersuchung der Arbuskelmorphologie wurden die Wurzelsegmente 5 min bei RT in 10% (v/v) Milchsäure inkubiert, anschließend über Nacht in 0,01% (w/v) Fuchsinäure [in 90% (v/v) Milchsäure, 100% Glycerin und H₂O im Verhältnis 1:1:1] gefärbt (Dickson *et al.*, 2003) und bis zur Auswertung bei 4°C gelagert. Für die Analyse wurden die Wurzelsegmente in H₂O_d gewaschen, auf Objektträger mit 100% Glycerin überführt und an einem Zeiss LSM 510 Meta Konfokalmikroskop (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) bei einer Anregungswellenlänge von 543 nm ausgewertet. Die Verarbeitung der Bilder erfolgte mit der Zeiss LSM 510 Meta-Software und dem LSMIX-Computerprogramm (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

II.2.5.2 Histochemischer Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität

Der Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte anhand einer Farbreaktion, bei der das Substrat X-Gluc (Cyclohexylammoniumsalz der 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure) zu dem schwer löslichen Indigo-Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo umgesetzt wurde.

Die Untersuchungen erfolgten ausschließlich mit transgenen *hairy roots*, die durch DsRED-Fluoreszenz selektiert wurden (vgl. II.2.4.2). Für die Analyse wurden die Wurzeln mehrmals mit H₂O_d gewaschen und anschließend, wie in Blume & Grierson (1997) beschrieben, fixiert und über Nacht bei 37°C in Färbelösung {100 mM NaH₂PO₄; 10 mM EDTA; 0,5 mM K₃[Fe(CN)₆]; 0,5 mM K₄[Fe(CN)₆]; 0,1% (v/v) Triton X-100; 1 mM X-Gluc; pH 7,0} inkubiert. Die Wurzeln wurden mit PBS-Puffer (137 mM NaCl; 7 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄; 2,7 M KCl; pH 7,0) gewaschen und zur Dokumentation fotografiert. Zur Untersuchung der zellspezifischen Lokalisation des Indigo-Farbstoffs wurden Querschnitte der Wurzeln angefertigt (vgl. II.2.5.3).

II.2.5.3 Fixierung/Einbettung des Materials und Herstellung von semi-dünnen Schnitten

Die Wurzeln von *M. truncatula* wurden mit einer Rasierklinge in 5 mm große Stücke geschnitten und in Fixativ [4% (w/v) Paraformaldehyd; 0,1% (v/v) Triton X-100 in PBS-Puffer] eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit PBS-Puffer (jeweils 15 min) gewaschen und bei RT, sofern nicht anders angegeben, in einer aufsteigenden Ethanolreihe [30 min 10% (v/v), 1 h 30% (v/v), 1 h 50% (v/v), über Nacht 70% (v/v), 30 min 90% (v/v) und 30 min 100% Ethanol] dehydriert. Die Proben wurden in einen Inkubationsschrank mit 50°C überführt und eine weitere 30-minütige Inkubation der Wurzeln in 100% Ethanol schloss sich an. Bei Wurzelstücken ohne sichtbare GUS-Färbung erfolgte die Inkubation in 0,1% (w/v) Eosin-Lösung (in 100% Ethanol), die zu einer dezenten Rotfärbung führte und das Auffinden der Wurzelstücke in ausgehärtetem PEG 1500 erleichtern sollte. Danach wurde die Substitution des Ethanols im Probenmaterial mit PEG 1500 begonnen. Der Ablauf ist in Tab. II-4 dargestellt.

Tab. II-4: Ablauf der Substitution von Ethanol mit PEG 1500. Alle Schritte wurden bei 50°C im Inkubationsschrank durchgeführt.

| PEG : Ethanol (v/v) | Inkubationszeit bei 50°C |
|---------------------|--------------------------|
| 3:1 | 1 h |
| 1:1 | 1 h |
| 1:3 | 1 h |
| reines PEG 1500 | 2 h |

Die Wurzelstücke wurden anschließend in die Einbettungsformen überführt und in PEG 1500 eingebettet, nach langsamen Abkühlen (über Nacht) luftdicht verschlossen und bei 4°C gelagert.

Mit einem Rotationsmikrotom (HM 325, Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland) erfolgte die Anfertigung von 8 µm-Schnitten der eingebetteten Proben. Diese wurden anschließend mittels 45% (w/v) PEG 6000-Lösung (in PBS-Puffer) auf Objektträger übertragen und am Lichtmikroskop (Axioplan, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) analysiert. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe einer Digitalkamera (AxioCam MRc5, Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) und der Software Axiovision (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland).

II.2.6 Metaboliten-Analysen

II.2.6.1 Extraktion von Apocarotinoiden aus Wurzeln von *M. truncatula*

Zur Herstellung der Extrakte wurden 200 mg homogenisiertes und bei -80°C aufbewahrtes Wurzelmaterial dreimal mit 400 µl 80% (v/v) wäss. Methanol extrahiert.

Zur Analyse der Cyclohexenonderivate wurden 200 µl des Extrakts zur Trockne eingengt (*speed vac*, Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) und anschließend in 40 µl 80% (v/v) wäss. Methanol gelöst.

Die Untersuchung der Mycorradicinderivate erfolgte mit 300 µl des 80% (v/v) wäss. Methanolextrakts nach alkalischer Hydrolyse der Esterbindungen durch Zugabe von 10 µl 10 M KOH (Fester *et al.*, 2002a). Die Proben wurden im Anschluss 1 h bei RT inkubiert und für 15 min bei 20000 g und RT zentrifugiert.

Zur Verwendung der Proben für semi-präparative HPLC-Untersuchungen (vgl. II.2.6.2) wurde das gesamte Volumen des 80% (v/v) wäss. Methanolextrakts in der *speed vac* zur Trockne eingeengt, in 100 µl 80% (v/v) wäss. Methanol gelöst, zur alkalischen Hydrolyse der Esterbindungen mit 10 µl 10 M KOH versetzt und 30 min bei RT inkubiert.

II.2.6.2 Analytische und semi-präparative HPLC

Für analytische und semi-präparative HPLC-Untersuchungen stand ein System der Firma Waters GmbH (Eschborn, Deutschland) zur Verfügung. Die *Reversed-Phase*-Chromatografie erfolgte an einer 5 µm Nucleosil C₁₈-Säule (250 x 4 mm, Macherey-Nagel, Düren, Deutschland), wobei als Laufmittel standardmäßig 1,5% (v/v) Phosphorsäure (Laufmittel A) und 100% (v/v) Acetonitril (Laufmittel B) eingesetzt wurden. Das Injektionsvolumen der Extrakte betrug 20 µl.

Die Trennung der Cyclohexenonderivate erfolgte mit dem in Schliemann *et al.* (2008a) publizierten Gradienten des Systems 2 aus Laufmittel A und B und die fotometrische Detektion bei einer Wellenlänge von 245 nm (Waters 2996 Photodioden-Array Detektor). Die Mycorradicinderivate wurden mit einem modifizierten Gradienten nach Fester *et al.* (2002a) getrennt. Der verwendete Gradient aus Laufmittel A und B stieg innerhalb der ersten 20 min von 25 auf 60% B, in einer weiteren Minute auf 100% B an und sank nach 25 min auf 25% B. Die Detektion der Mycorradicinderivate erfolgte fotometrisch bei einer Wellenlänge von 377 nm. Die Apocarotinoide wurden anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert (Fester *et al.*, 2002a; Schliemann *et al.*, 2008a) und mit den externen Standards ABA (für Cyclohexenonderivate, da sie den identischen 1,1,5-Trimethyl-cyclohex-4-en-on-Chromophor enthält) und Crocetin oder Mycorradicindimethylester (H. Bothe, Universität Köln, Deutschland, beide für Mycorradicin) quantifiziert. Hierfür wurden die Peakflächen aller detektierten Mycorradicin- bzw. Cyclohexenonderivate addiert und auf die Menge des entsprechenden Standards umgerechnet.

Die Trennung von C₂₇-Apocarotinoiden in Methanolextrakten erfolgte unter Verwendung eines Gradienten aus Laufmittel A und B, der in 60 min von 0 auf 100% B anstieg. Nach alkalischer Hydrolyse der Esterbindungen wurden die C₂₇-Apocarotinoide mit einem Gradienten, der in 35 min von 0 auf 100% Laufmittel B anstieg und nach vier Minuten innerhalb einer Minute auf 0% B sank, getrennt.

Für semi-präparative HPLC-Untersuchungen wurde 1,5% (v/v) Phosphorsäure als Laufmittel A gegen 2% (v/v) Ameisensäure ersetzt und ein Gradient, der in 35 min von 0 auf 100% Laufmittel B anstieg, verwendet.

II.2.6.3 Analyse der polaren Primärmetabolite

Die Untersuchung von Primärmetaboliten wurde in der Arbeitsgruppe Angewandte Metabolom-Analyse/Wurzelmetabolismus am MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie Potsdam-Golm (Deutschland), geleitet von Dr. J. Kopka, durchgeführt.

Dafür wurden je Probe 120 ± 5 mg unter N_2 gemörsertes Wurzelmaterial in 340 μ l Extraktionslösung [Mastermix für alle Proben aus 300 μ l 100% Methanol, 30 μ l Nonadecansäuremethylester (2 mg/ml in Chloroform, lipophiler Standard), 10 μ l Ribitol (0,2 mg/ml in Methanol, polarer Standard)] resuspendiert und 15 min bei 70°C (schüttelnd) inkubiert. Anschließend wurden 200 μ l Chloroform für die Extraktion unpolarer Metabolite den Proben zugegeben und 5 min bei 37°C (schüttelnd) inkubiert. Durch Zugabe von 400 μ l H_2O_{dd} und anschließender Zentrifugation (5 min, 20000 g, RT) erfolgte die Phasentrennung. Aus der polaren Phase wurden je Probe zwei 160 μ l-Aliquote entnommen und in der *speed vac* (Concentrator 5301, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) zur Trockne eingengt.

Zur chemischen Derivatisierung wurden 40 μ l *O*-Methylhydroxylaminhydrochlorid (20 mg/ml in Pyridin) den eingengten Proben zugegeben und für 1,5 h bei 30°C inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 70 μ l *N*-Methyl-*N*-trimethylsilyl-trifluoracetamid sowie von 10 μ l Alkanmix der RI-Standards [Decan (RI 1000), Dodecan (RI 1200), Pentadecan (RI 1500), Octadecan (RI 1800), Nonadecan (RI 1900), Docosan (RI 2200), Octacosan (RI 2800), Dotriacontan (RI 3200), Hexatriacontan (RI 3600), jedes mit einer Konzentration von 0,22 mg/ml in Pyridin] und eine Inkubation der Proben für 30 min bei 37°C (schüttelnd).

Die GC-TOF-MS (Gaschromatografie-*Time of Flight*-Massenspektrometrie)-Untersuchungen erfolgten wie in Erban *et al.* (2007) beschrieben. Mit dem TagFinder (Lüdemann *et al.*, 2008) wurde die GC-Rohdatenanalyse durchgeführt und eine Datenmatrix generiert, die relative Intensitäten der gemessenen Metabolite in der Target- (TP) bzw. der Referenzprobe (RP) enthielt. Hierbei wurden ebenfalls die RNAi-Wurzeln als TPs und die EV-Wurzeln als RPs betrachtet. Die Normierung der relativen Intensitäten erfolgte mit der eingewogenen Frischmasse der Wurzelprobe und dem RI-Standard Pentadecan. Signifikante Unterschiede in der relativen Intensität eines gemessenen Metabolits zwischen TP und RP wurden mit der Varianzanalyse (ANOVA) und einem anschließenden Tukey-HSD-Test ermittelt. Anhand der berechneten Mittelwerte der relativen Intensitäten der Metabolite von TPs und RPs wurde das Verhältnis (*ratio*) des Metabolits in der TP im Vergleich zur RP berechnet. Alle Metabolite der TP, deren relative Intensitäten mindestens 1,75-fach erhöht oder erniedrigt waren ($0,57 \geq \text{ratio} \geq 1,75$) und signifikante Unterschiede zu der RP zeigten ($P\text{-Wert} \leq 0,05$), wurden als verändert definiert. Die Annotation der identifizierten Metabolite erfolgte manuell unter Verwendung des TagFinders (Lüdemann *et al.*, 2008).

II.2.6.4 Bestimmung des anorganischen Phosphatgehalts in Wurzeln

Für die kolorimetrische Bestimmung des anorganischen Phosphatgehalts (P_i) nach Taussky & Shorr (1953) wurde 200 mg unter N_2 gemörsertes Wurzelmaterial in 800 μ l 3% (v/v) Perchlorsäure homogenisiert und für 20 min bei RT (schüttelnd) inkubiert. Nach Zentrifugation (15 min, 20000 g, RT) wurden 100 μ l des Überstands in 96-Well-Platten (MICROLON[®] F-Boden, Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland) überführt, mit 66,6 μ l Reagenzlösung {10% (v/v) Ammoniummolybdat-Stammlösung [0,4 M $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ in 10 N H_2SO_4]; 0,18 M $FeSO_4$ } versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Parallel dazu erfolgte in den Proben die Bestimmung der Blindwerte durch die Zugabe von 66,6 μ l Reagenzlösung ohne 10% (v/v) Ammoniummolybdat-Stammlösung. Die Extinktionsmessungen erfolgten bei 750 nm im Spektralphotometer (Sunrise[™], Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland). Zur Berechnung der P_i -Gehalte wurde eine Eichgerade mit KH_2PO_4 angefertigt. Unter Berücksichtigung der Menge des eingewogenen Wurzelmaterials, dem Blindwert der Proben und dem Anstieg der Eichgeraden erfolgte die Ermittlung des P_i -Gehalts.

II.2.6.5 Massenspektrometrie

Die in der Arbeit angegebenen massenspektrometrischen Analysen wurden von Dr. J. Schmidt (IPB, Halle, Deutschland) durchgeführt. Hochaufgelöste ESI-Massenspektren der Apocarotinoidverbindungen wurden an einem 7,0 Tesla Fourier-Transform-Ionenzyklotronresonanz-Massenspektrometer (FTICR-MS, Bruker Apex III, Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA), das mit einer Infinity[™]-Zelle und einer externen APOLLO Elektrospray-Ionenquelle (Agilent, *off axis spray*) ausgestattet ist, aufgenommen. Als Trockengas wurde Stickstoff bei 150°C genutzt. Die Probenlösungen wurden kontinuierlich über eine Spritzenpumpe (Flussrate: 120 μ l/h) zugeführt.

Die ESI-Massenspektren positiver und negativer Ionen wurden an einem Finnigan MAT TSQ Quantum Ultra AM MS-System aufgenommen. Dieses MS-System ist mit einer *hot ESI source* (HESI, Elektrosprayspannung: 3,0 kV, Sprühgas: Stickstoff, Verdampfer Temperatur: 50°C, Kapillartemperatur: 250°C) ausgestattet und mit einer Surveyor Plus Mikro-HPLC (Thermo Electron) gekoppelt [Säule: Ultrasep ES RP18E-column (5 μ m, 1x100 mm, SepServ)]. Für die HPLC wurde folgendes Gradientensystem verwendet: H_2O :Acetonitril 90:10 [beide enthalten 0,2% (v/v) Essigsäure] bis 5:95 in 15 min und dann isokratisch bei 5:95 für weitere 15 min (Flussrate: 50 μ l/min). Die CID (*collision-induced dissociation*)-Massenspektren von Verbindung Apo2 wurden während der HPLC-Analyse mit einer Kollisionsenergie von 15 bzw. 25 eV aufgenommen (Kollisionsgas: Argon, Kollisionsdruck in der Kollisionszelle: 0,2 Pa).

II.2.7 Proteinbiochemische Arbeiten

II.2.7.1 Heterologe Genexpression in *E. coli*

Für die bakterielle Expression von *MtCCD1* wurde das pET-28a(+)-Vektorsystem (vgl. II.1.5) und der *E. coli*-Stamm BL21(D3) mit den Vektoren pAC-BETA oder pAC-ZEAX verwendet (vgl. II.1.3).

Hierfür wurden 2 ml Suspensionsschüttelkultur (vgl. II.1.3) bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Danach erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 0,2 mM IPTG und eine weitere Inkubation für 4 h bei 28°C und 200 rpm (Schüttelinkubator, Certomat[®] BS-1, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurden jeweils 100 µl dieser Zellen durch Zentrifugation (2 min, 20000 g, 4°C) pelletiert, in 20 µl Probenpuffer [20 ml H₂O_{dd}; 5 ml 0,5 mM Tris-HCl; 0,4 ml Glycerin; 8 ml 10% (w/v) SDS-Lösung; 2 ml β-Mercaptoethanol; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; pH 6,8] aufgenommen, für 5 min bei 95°C inkubiert und in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt (vgl. II.2.7.2).

II.2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970). Für die Herstellung der SDS-PAA-Gele wurde konzentrierte Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30, die 30% (w/v) Acrylamid und 0,8% (w/v) Bisacrylamid enthält, verwendet. Die Trennung der Proteine erfolgte in 12% SDS-PAA-Gelen bei konstanter Stromstärke (25 mA). Zur Identifikation des Molekulargewichts der rekombinanten Proteine wurde der Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein[™] Dual Color Standards (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) genutzt. Nach der Elektrophorese wurden die SDS-PAA-Gele mit Coomassie-Lösung [0,2% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250; 10% (v/v) Essigsäure; 40% (v/v) Methanol] durch Erhitzen in der Mikrowelle für 2 - 3 min gefärbt. Anschließend erfolgte deren Entfärbung durch mehrmaliges Aufkochen in H₂O_d, bis die Proteinbanden deutlich sichtbar waren. Die SDS-PAA-Gele wurden fotografisch dokumentiert.

II.2.7.3 Aktivitätstest der rekombinanten *MtCCD1*

Der Nachweis der Enzymaktivität erfolgte durch die bakterielle Expression von *MtCCD1* in *E. coli*-Stämmen [BL21(D3)], die β-Carotin oder Zeaxanthin akkumulieren (vgl. II.1.3). Hierfür wurden Zellen einer Suspensionsschüttelkultur (vgl. II.1.3) mit der Impföse auf LB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika (vgl. II.1.4) und 0,1 mM IPTG ausgestrichen, für 4 d bei RT im Dunkeln inkubiert und anschließend zur Dokumentation fotografiert.

II.2.8 Statistische Auswertung

Alle in der Arbeit angewendeten statistischen Berechnungen erfolgten mit dem Computerprogramm R (<http://www.R-project.org>).

Für statistische Untersuchungen wurde zunächst überprüft, ob die Daten normalverteilt sind (Shapiro-Wilk-Test) und Varianzhomogenität (Fligner-Killeen-Test) aufweisen. Messwerte, die keiner Normalverteilung entsprachen, wurden einer logarithmischen (LN) Transformation unterzogen, um die Voraussetzung der Normalverteilung zu erfüllen. Dahingegen erfolgte bei relativen Häufigkeiten zur Stabilisierung der Varianz und zur Normalverteilung der Daten die Arcus-Sinus-Transformation.

Für statistische Analysen normalverteilter Daten wurde der in R verfügbare *oneway.test* benutzt, der bei Varianzhomogenität der ANOVA entspricht. Als *post hoc*-Test wurde der Tukey-Test eingesetzt. Die statistische Auswertung nicht normalverteilter Daten erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Nemenyi-Test als *post hoc*-Test.

Für Korrelationsanalysen wurde der Korrelationskoeffizient nach Spearman (r_s), der keine Normalverteilung der Daten voraussetzt, berechnet. Mit der Funktion *cor.test* konnte die Signifikanz der Korrelation getestet werden.

Die in der Arbeit erhobenen Messwerte resultierten aus Einzelpflanzenanalysen (vgl. III.2.1), die gleichzeitig die biologischen Replikate der zu untersuchenden Varianten darstellten.

III Ergebnisse

III.1 Analyse der *MtDXS2-1*-Promotoraktivität in mykorrhizierten Wurzeln

Eine wichtige Ebene der Regulation zellulärer Prozesse ist neben vielen Möglichkeiten der post-transkriptionellen Modifikation von Proteinen die Steuerung der Transkription. Die Expression von Genen findet oft nur in bestimmten Organen oder während bestimmter Phasen der Entwicklung von Zellen und Geweben statt. Definierte DNA-Abschnitte (*cis*-Elemente) des Promotors, dem vom Transkriptionsstart in 5'-Richtung liegenden Sequenzabschnitt eines Gens, dienen zur Regulation der Transkription. Die *cis*-Elemente werden für die Bindung der RNA-Polymerasen sowie für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, die deren Aktivität beeinflussen, benötigt. Die zell- oder gewebespezifische Transkription eines Gens kann anhand der Promotoraktivität nachgewiesen bzw. untersucht werden. Hierfür erfolgt die Fusion der Promotorregion mit dem codierenden Bereich eines Reportergens, dessen Expression als Anzeichen der Promotoraktivität dient.

Das Isogen *MtDXS2* liegt als Tandem-Wiederholung aus *MtDXS2-1* und einem fast identischen Duplikat *MtDXS2-2* (97% Sequenzidentität) im Genom von *M. truncatula* vor, wobei *MtDXS2-1* wesentlich stärker durch Mykorrhizierung induziert wird als *MtDXS2-2* (unveröffentlicht, M. H. Walter, IPB, Halle, Deutschland). Aufgrund der höheren Transkriptmengen von *MtDXS2-1* gegenüber *MtDXS2-2* wurde die *MtDXS2-1*-Promotoraktivität untersucht.

III.1.1 Herstellung der Expressionskassette und Generierung chimärer Pflanzen

Für die zellspezifische Lokalisation der Aktivität des *MtDXS2-1*-Promotors in mykorrhizierten Wurzeln von Medicago-Pflanzen wurde ein Fusionskonstrukt der Promotorregion mit dem codierenden Bereich des β -Glucuronidase-Gens (*uidA*) aus *E. coli* hergestellt. Die β -Glucuronidase katalysiert die hydrolytische Spaltung von fluorogenen (z.B. 4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronid) oder chromogenen β -Glucuronid-Substraten (z.B. X-Gluc). Die Enzymaktivität lässt sich anhand der Fluoreszenz oder histochemisch nachweisen (X-Gluc, GUS-Aktivität, vgl. II.2.5.2). Letzteres wurde in diesen Studien verwendet. Zur Vermeidung der Detektion der Expression von Reportergenen in Agrobakterien wurde das Fusionskonstrukt mit einem *uidA*-Gen, das ein Intron (*uidA-int*) trägt, angefertigt.

Zur Herstellung der Fusionskonstrukte wurde der Basisvektor p35*SuidA-int* erzeugt (vgl. II.1.5 und Abb. VII-1 im Anhang). Für das Fusionskonstrukt aus *MtDXS2-1*-Promotorregion und Reportergen wurde ein vom Translationsstart in 5'-Richtung liegender 2723 bp-Sequenzabschnitt von *MtDXS2-1* (P-2723, vgl. Abb. III-3) amplifiziert. Dieser wurde durch das *screening* einer genomischen Bank von *M. truncatula* erhalten und lag zu Beginn der Arbeit bereits im Klonierungsvektor pGEM[®]-T Easy vor (vgl. II.1.5). Es erfolgte der

Austausch des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus (*cauliflower mosaic virus*, CaMV 35S) von p35*SuidA*-int durch das P-2723-Promotorfragment. Für die Generierung transgener Wurzeln (vgl. II.2.4.2) wurde das erhaltene Fusionskonstrukt in den linearisierten binären Vektor pRedRoot überführt (vgl. II.1.5). Die Erzeugung chimärer Pflanzen erfolgte durch die Agrobakterium-vermittelte Wurzeltransformation von *M. truncatula* (vgl. II.2.4.2, Abb. III-1 A).

Anhand der DsRED-Fluoreszenz (vgl. II.2.4.2, Abb. III-1 B und C) konnten bei etwa 30% der transformierten Pflanzen transgene *hairy roots* identifiziert werden. Diese Pflanzen wurden anschließend ohne (nicht mykorrhiziert) sowie mit *G. intraradices* (mykorrhiziert) für sieben Wochen im Gewächshaus kultiviert (vgl. II.2.4.1).

Im Folgenden sind die Gründe für die Anwendung des transienten Transformationssystems genannt. Da bis jetzt kein geeigneter wurzelspezifischer Promotor für *M. truncatula* isoliert wurde, kann mit dieser Methode die gezielte wurzelspezifische Expression der erzeugten Konstrukte erreicht werden. Dies war im weiteren Verlauf der Arbeit für die Analyse der Funktionen von *DXS2* und *CCD1* in Bezug auf deren Rolle bei der Akkumulation der AM-induzierten Apocarotinoide wichtig. Ein weiteres Argument ist die deutlich verkürzte Regenerationszeit der chimären *Medicago*-Pflanzen (ca. sechs Wochen) im Vergleich zu stabil transformierten Pflanzen (ca. fünf Monate; Chabaud *et al.*, 2006). Außerdem konnte die Eignung transgener *hairy roots* zur Untersuchung der AM-Symbiose bereits anhand von Studien belegt werden (Isayenkov *et al.*, 2005; Maeda *et al.*, 2006).

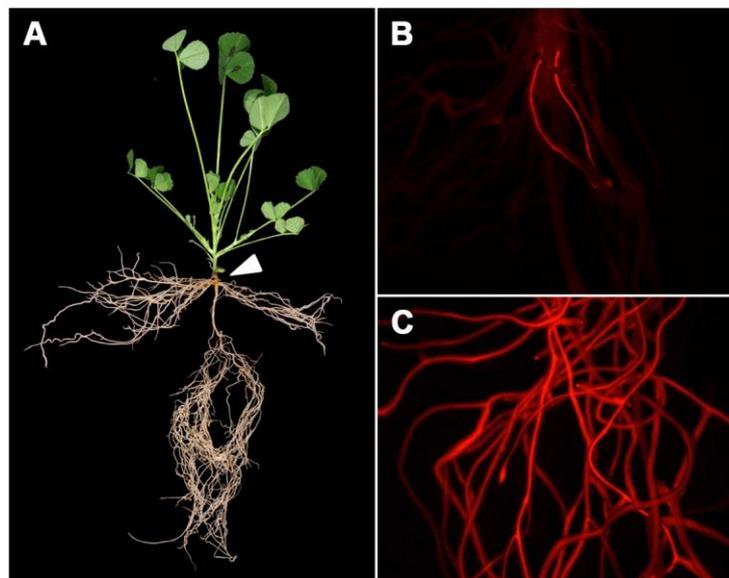


Abb. III-1: Chimäre *M. truncatula*-Pflanze. A: Chimäre *M. truncatula*-Pflanze mit Wildtyp-Spross und Wildtyp-Wurzelsystem. Durch Agrobakterium-vermittelte Wurzeltransformation entstehen *hairy roots* an der Injektionsstelle der Bakterien (Pfeilspitze). B: Identifikation von transgenen *hairy roots* durch DsRED-Fluoreszenz vier Wochen nach Bakterieninjektion. Nur ca. 5% der *hairy roots* einer Pflanze fluoreszierten und wurden als transgene Wurzeln eingestuft. Nicht transgene *hairy roots*, ohne DsRED-Fluoreszenz, wurden entfernt. C: DsRED-Fluoreszenz von *hairy roots* sechs Wochen nach Injektion der Agrobakterien und einer ersten Selektion. Die Fluoreszenz war bei ca. 90% der Wurzeln einer Pflanze sichtbar.

III.1.2 Zelluläre Lokalisation der Aktivität des *MtDXS2-1*-Promotors in mykorrhizierten Wurzeln

Die Analyse der zellulären Lokalisation der *MtDXS2-1*-Promotoraktivität wurde in transgenen Wurzelsystemen von jeweils drei mykorrhizierten sowie nicht mykorrhizierten, chimären *M. truncatula*-Pflanzen durchgeführt. Der Nachweis der Enzymaktivität der β -Glucuronidase (GUS-Aktivität) und somit der Promotoraktivität erfolgte histochemisch (vgl. II.2.5.2) und wurde anhand von 8 μ m dicken Wurzelquerschnitten ausgewertet (vgl. II.2.5.3).

GUS-Aktivität konnte makroskopisch nur in mykorrhizierten Wurzelsystemen beobachtet werden (Abb. III-2 A und B). Die Aktivität wurde jedoch nicht im gesamten Wurzelsystem gleichmäßig detektiert. Neben Bereichen mit deutlicher GUS-Aktivität wurden ebenfalls Wurzelbereiche ohne GUS-Aktivität identifiziert (Abb. III-2 C). Letztere enthielten keine Pilzstrukturen von *G. intraradices* (Abb. III-2 E). In Querschnitten der gefärbten Bereiche wurde die GUS-Aktivität in arbuskulierten Cortexzellen und oftmals auch im Zentralzylinder der Wurzel nachgewiesen (Abb. III-2 F). In Querschnitten nicht mykorrhizierter Wurzeln konnte ebenfalls eine schwache Aktivität des *MtDXS2-1*-Promotors im Zentralzylinder detektiert werden (Abb. III-2 D). Diese wurde jedoch nicht in allen Querschnitten der nicht mykorrhizierten Wurzeln beobachtet.

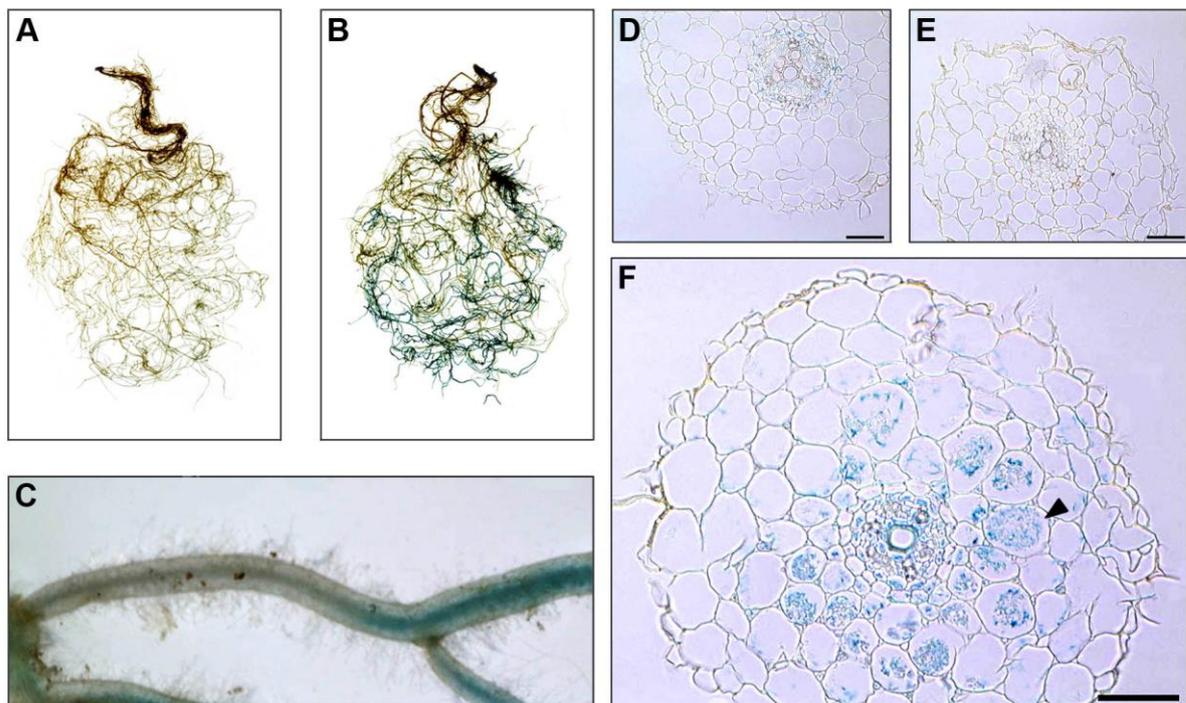


Abb. III-2: *MtDXS2-1*-Promotoraktivität in Wurzeln von *M. truncatula*. Der histochemische Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte in nicht mykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzeln von *Medicago*, die das *MtDXS2-1*-Promotorfusionskonstrukt exprimierten. **A:** Transgenes, nicht mykorrhiziertes Wurzelsystem ohne makroskopisch sichtbare GUS-Aktivität. **B:** Transgenes, mykorrhiziertes Wurzelsystem mit GUS-Aktivität. **C:** Transgene Wurzel eines mykorrhizierten Wurzelsystems mit Bereichen mit bzw. ohne GUS-Aktivität. **D:** Querschnitt (8 μ m) einer transgenen, nicht mykorrhizierten Wurzel. **E:** Querschnitt (8 μ m) einer transgenen, mykorrhizierten Wurzel ohne GUS-Aktivität. **F:** Querschnitt (8 μ m) einer transgenen, mykorrhizierten Wurzel mit deutlicher GUS-Aktivität in arbuskulierten Cortexzellen. Die Pfeilspitze markiert eine der arbuskulierten Wurzelcortexzellen. Die Balken in D - F entsprechen 50 μ m.

III.1.3 Analyse von Promotordeletionen

Aufgrund der beobachteten *MtDXS2-1*-Promotoraktivität könnte die vorhandene Promotorsequenz eine geeignete Grundlage zur Identifikation von *cis*-Elementen für die spezifische Genexpression in arbuskulierten Wurzelcortexzellen sein. Hierfür wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene Promotordeletionen mit dem β -Glucuronidase-Gen fusioniert und in mykorrhizierten Wurzeln exprimiert.

Für die Promotordeletionskonstrukte wurden 993 bp (**P-993**), 782 bp (**P-782**), 510 bp (**P-510**), 332 bp (**P-332**), 211 bp (**P-211**), 145 bp (**P-145**) und 60 bp (**P-60**) des vom Translationsstart in 5'-Richtung liegenden Sequenzabschnitts von *MtDXS2-1* mit PCR amplifiziert (vgl. II.2.1.3) und im Austausch gegen das P-2723-Promotorfragment in p35*SuidA*-int ligiert (vgl. II.2.1.4.7). Als Kontrolle diente ein Fusionskonstrukt ohne Promotorsequenz (**P-0**). Alle erhaltenen Fusionskonstrukte (Abb. III-3) wurden analog zu dem P-2723-Promotorfragment in den binären Vektor pRedRoot überführt (vgl. II.1.5) und für die Agrobakterium-vermittelte Wurzeltransformation verwendet (vgl. II.2.4.2).

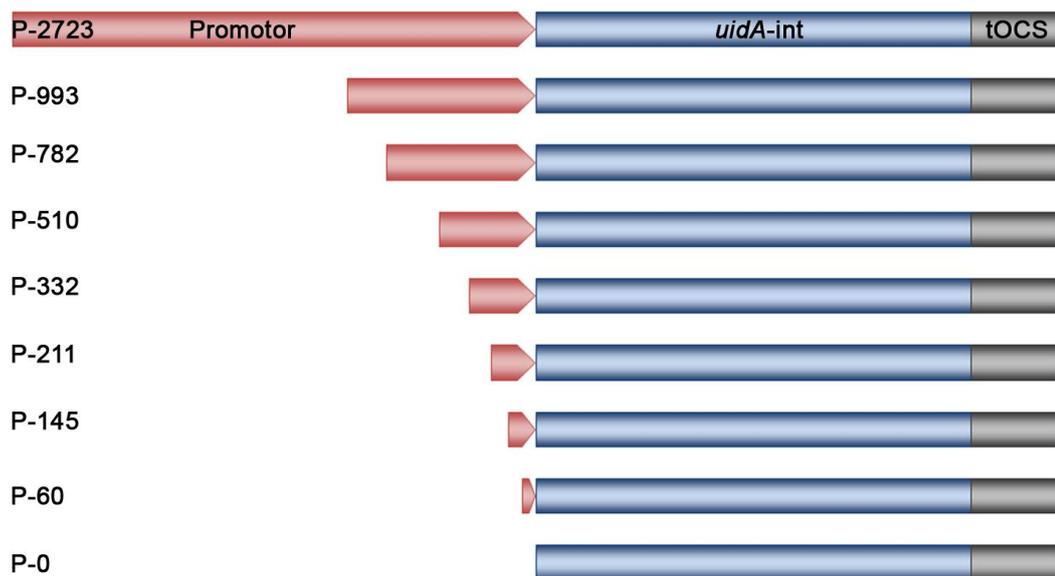


Abb. III-3: Fusionskonstrukte des *MtDXS2-1*-Promotors und der Promotordeletionen mit dem β -Glucuronidase-Gen. P-... steht hierbei für den vom Translationsstart in 5'-Richtung liegenden, amplifizierten Sequenzabschnitt von *MtDXS2-1*. Als Kontrolle wurde ein Fusionskonstrukt ohne Promotorsequenz verwendet (P-0). *uidA-int*: β -Glucuronidase mit Intron, tOCS: Terminator des Octopinsynthasegens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Anhand der DsRED-Fluoreszenz (vgl. II.2.4.2, vgl. Abb. III-1 B und C) wurden chimäre *Medicago*-Pflanzen mit transgenen *hairy roots* selektiert und für Mykorrhizierungsansätze verwendet (vgl. II.2.4.1). Die Analyse erfolgte analog dem P-2723-Promotorfragment mit dem histochemischen Nachweis der GUS-Aktivität in transgenen Wurzeln von je drei chimären Pflanzen sieben Wochen nach der Inokulation mit *G. intraradices* (vgl. II.2.5.2). Makroskopisch konnten keine Unterschiede in der GUS-Aktivität bei Wurzelsystemen, die P-2723 bzw. die Deletionen P-993, P-782, P-510, P-332 oder P-211 (Abb. III-4) exprimierten, festgestellt werden. Dagegen war in Wurzelsystemen der P-145-Deletion nur eine schwache

GUS-Aktivität sichtbar, die bei P-60 und der Kontrolle (P-0) nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. III-4).

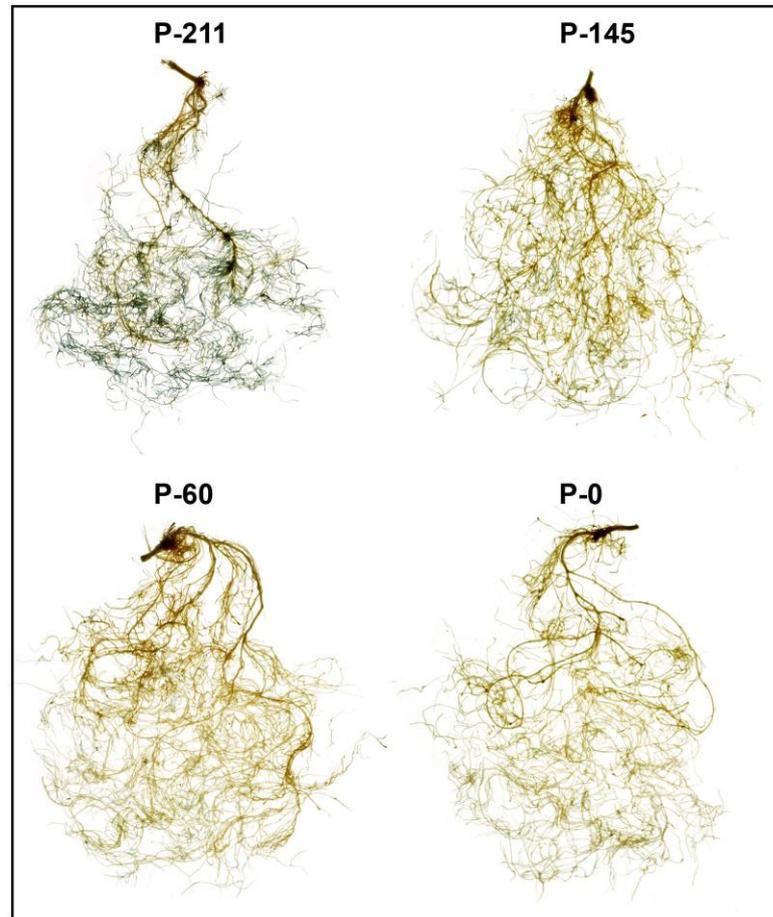


Abb. III-4: Makroskopische Untersuchung der P-211-, P-145-, P-60- und P-0-Deletionen des *MtDXS2-1*-Promotors. Der histochemische Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte in Wurzeln, die mit dem entsprechenden P-211-, P-145-, P-60- oder P-0-Fusionskonstrukt (Promotordeletion und *uidA*-int Reporter gen) transformiert wurden.

Zur lichtmikroskopischen Auswertung wurden 8 μ m dicke Querschnitte von Wurzeln, die die erzeugten Promotordeletionskonstrukte exprimierten, angefertigt (vgl. II.2.5.2). Die bereits im vorangegangenen Abschnitt beschriebene *MtDXS2-1*-Promotoraktivität in arbuskulierten Zellen konnte bei den P-993-, P-782-, P-510-, P-332-, P-211- und P-145-Deletionen des *MtDXS2-1*-Promotors ebenfalls beobachtet werden (Abb. III-5 A). Bei der Evaluierung von Bereichen mykorrhizierter Wurzeln ohne GUS-Aktivität wurden lediglich in Wurzeln, die mit dem P-211- oder dem P-145-Fusionskonstrukt transformiert waren, Pilzstrukturen identifiziert (Abb. III-5 B). Bei allen weiteren Promotordeletionen konnten keine kolonisierten Zellen in den Wurzelbereichen ohne GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Die bereits makroskopisch beobachtete fehlende Aktivität des Enzyms β -Glucuronidase in Wurzeln des P-60-Fusionskonstrukts sowie des Kontrollkonstrukts ohne Promotorsequenz (P-0) wurde in den 8 μ m-Querschnitten bestätigt (Abb. III-5 A).

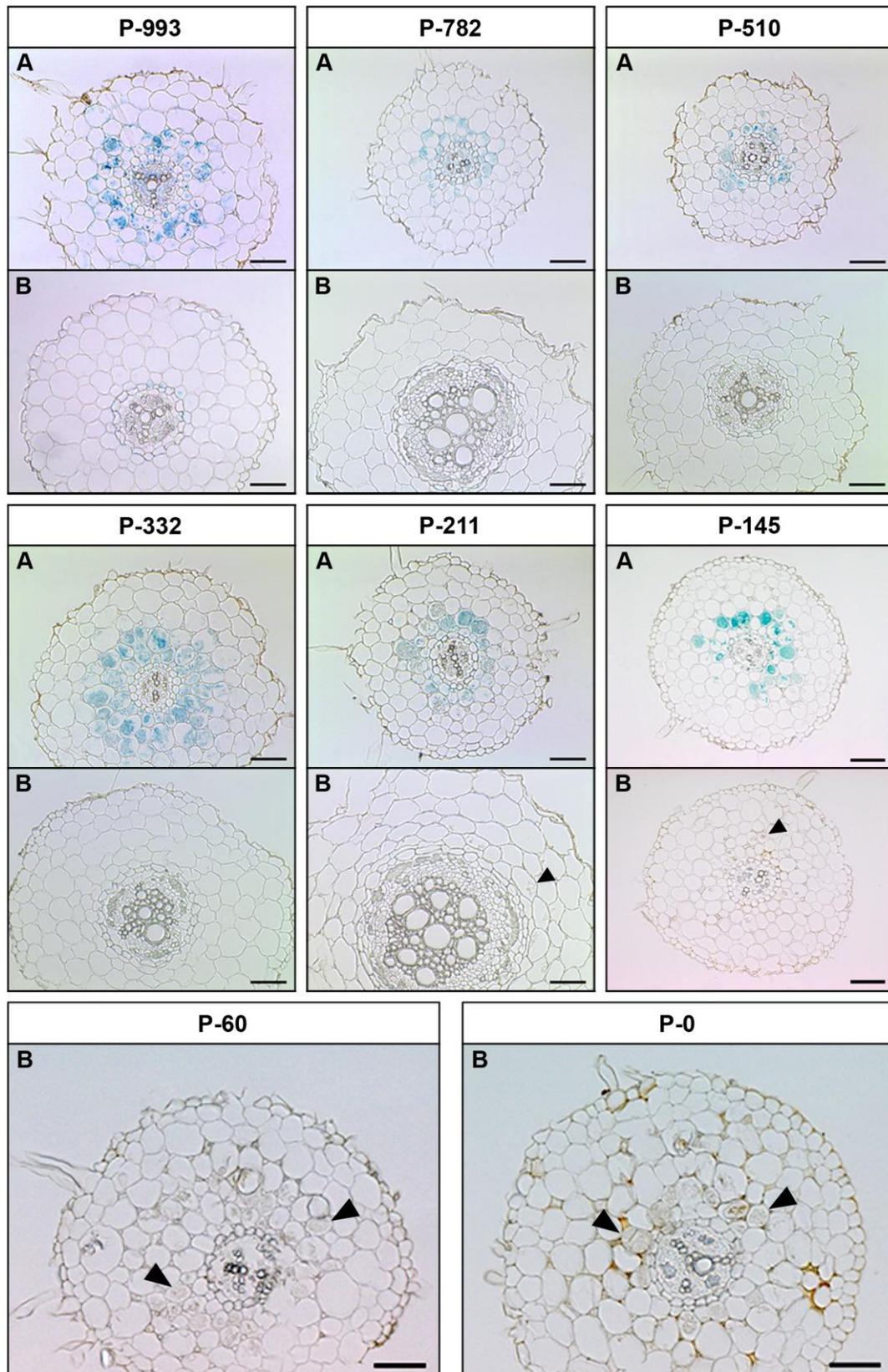


Abb. III-5: Aktivität der *MtDXS2-1*-Promotordeletionen in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*. Der histochemische Nachweis der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte in Wurzeln, die mit dem entsprechenden Fusionskonstrukt (Promotordeletion und *uidA*-int Reportergen) transformiert wurden. **A:** Querschnitte (8 μ m) von Wurzelbereichen mit GUS-Aktivität. **B:** Querschnitte (8 μ m) von Wurzelbereichen ohne GUS-Aktivität. Die schwarzen Pfeilspitzen weisen auf arbuskulierte Wurzelcortexzellen hin, die keine GUS-Aktivität zeigten. Die Balken entsprechen 50 μ m.

Unter Verwendung der PLACE-Datenbank (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>; Higo *et al.*, 1999) konnte eine TATA- und CAAT-Box innerhalb des vom Translationsstart in 5'-Richtung liegenden 145 bp-Sequenzabschnitts identifiziert werden, die nicht von dem 60 bp-Sequenzabschnitt umfasst werden. Diese Motive sowie die beobachtete schwächere GUS-Aktivität der P-145-Promoterdeletion liefern Hinweise, dass die Initiierung der Transkription in diesem Sequenzbereich stattfinden könnte. Die vom Translationsstartpunkt in 5'-Richtung gelegenen 145 bp könnten somit den möglichen *MtDXS2-1*-Minimalpromotor kennzeichnen.

Es wird angenommen, dass *cis*-Elemente, die die räumlich-zeitliche Expression von Genen regulieren, sich in dem in 5'-Richtung liegendem Sequenzabschnitt vor dem Minimalpromotor befinden, wobei auch im ersten Intron des Gens regulatorische Elemente auftreten können (Rombauts *et al.*, 2003). Detaillierte Kenntnisse über Promotorelemente, die die spezifische Genexpression in kolonisierten Wurzeln regulieren, sind derzeit nur begrenzt vorhanden (Krajinski & Frenzel, 2007). Folglich ist auch eine Vorhersage putativer AM-spezifischer *cis*-Elemente durch Datenbanken noch nicht realisierbar. Deren Identifikation ist somit lediglich durch Promotordeletionsanalysen möglich. Die aufgeführten Ergebnisse der P-993-, P-782-, P-510-, P-332- und P-211-Promotordeletionen verdeutlichen jedoch, dass wahrscheinlich kein spezieller Sequenzbereich oder putatives *cis*-Element im 5'-Richtung liegendem Sequenzabschnitt vor dem möglichen Minimalpromotor liegt und eine transkriptionelle Regulation der *MtDXS2-1*-Genexpression in arbuskulierten Cortezellen bedingt.

III.2 RNAi-vermittelte Suppression von *MtDXS2* und deren Auswirkung auf den Carotinoidstoffwechsel

Zur Untersuchung der Bedeutung der Apocarotiniode in der AM-Symbiose sollten durch einen RNA *interference* (RNAi)-vermittelten *loss of function*-Ansatz von *MtDXS2* chimäre Pflanzen generiert (vgl. III.1.1) und charakterisiert werden. Bei dieser Methode wird die in Pflanzen als *post transcriptional gene silencing* (PTGS) beschriebene post-transkriptionelle Unterdrückung der Expression eines Gens, initiiert durch doppelsträngige RNA (dsRNA), genutzt. Die dsRNA wird von einem Proteinkomplex (Dicer) erkannt, in *small interfering-RNA* (siRNA)-Fragmente mit einer Länge von 21 - 25 Nucleotide gespalten und in den RNA-*induced silencing complex* (RISC) eingebaut. RISC wird durch das Entfernen von einem der beiden Stränge der siRNA aktiviert, bindet an homologe mRNAs und zerschneidet diese.

Eine Möglichkeit zur Erzeugung von dsRNA ist die Transformation von Pflanzen mit einem Konstrukt, das einen transkribierten Bereich des Zielgens in *sense*- und *antisense*-Orientierung, getrennt durch einen *spacer*, trägt. Aus dieser Sequenz entsteht nach der Integration in das Genom und der Transkription ein doppelsträngiges *hairpin*-RNA-Molekül (hpRNA), das den Auslöser zur Unterdrückung der Genexpression darstellt (Smith *et al.*, 2000).

III.2.1 Erzeugung chimärer Pflanzen mit reduzierten *MtDXS2*-Transkriptmengen

Um die Möglichkeit einer maximalen Suppression von *MtDXS2* zu erhöhen, wurden zwei unterschiedliche RNAi-Konstrukte hergestellt: Ein 172 bp-Fragment (RNAi-I) des 5'-codierenden Sequenzbereichs der *MtDXS2-1*-cDNA und ein 525 bp-Fragment (RNAi-II), das Teile des 3'-codierenden und 3'-nicht translatierten Sequenzbereichs der cDNA umfasst. Für die Fragmente wurden Bereiche der *MtDXS2-1*-cDNA gewählt, die lediglich 6% (RNAi-I) bzw. 16% Sequenzidentität (RNAi-II) zum Isogen *MtDXS1* aufweisen und somit dessen Suppression nicht auslösen sollten. Aufgrund der hohen Identität der Nucleotidsequenz von *MtDXS2-2* zu RNAi-I (95%) bzw. RNAi-II (96%) wurde die zusätzliche Suppression von *MtDXS2-2* und somit die Suppression beider paraloger *MtDXS2*-Gene vorausgesetzt.

Die Klonierung der DNA-Fragmente in den Vektor pRNAi erfolgte über die eingefügten Restriktionsschnittstellen (vgl. II.1.5). Die Expressionskassette, bestehend aus CaMV 35S-Promotor, Fragment in *sense*-Orientierung, *spacer*, Fragment in *antisense*-Orientierung und OCS-Terminator, wurde in den binären Vektor pRedRoot kloniert (vgl. II.1.5). Die T-DNAs der binären Plasmide (Abb. III-6) wurden mittels Agrobakterium-vermittelter Wurzeltransformation in *M. truncatula* überführt (vgl. II.2.4.2). Da Veränderungen in der AM-Kolonisierung und/oder der Genexpression der Pflanzen durch *A. rhizogenes* nicht ausgeschlossen werden konnten, wurden keine Wildtyp-Pflanzen als Referenzen verwendet. Parallel zu den RNAi-Pflanzen wurden EV-Pflanzen (*empty vector*-Pflanzen) durch Transformation der T-DNA des binären Vektors pRedRoot ohne RNAi-Konstrukt generiert und als Referenzpflanzen eingesetzt. Ein erst kürzlich durchgeführter Vergleich von Wildtyp-Wurzeln und *hairy roots* zeigte jedoch, dass keine Veränderungen in der Genexpression, dem Mykorrhizierungsgrad und der Morphologie der AM-Strukturen nachgewiesen werden konnten (unveröffentlicht, C. Mrosk, IPB, Halle, Deutschland).

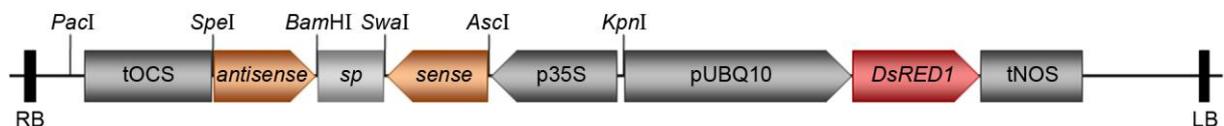


Abb. III-6: Schematische Darstellung der T-DNA. Die Grafik zeigt die zwischen RB und LB gelegene RNAi-Kassette und den Selektionsmarker DsRED. Die Ligation des 172 bp- (RNAi-I) sowie 525 bp- (RNAi-II) Fragments in den Vektor pRNAi in *sense*-Orientierung erfolgte zwischen die Restriktionsschnittstellen *AscI* und *SmaI* und in *antisense*-Orientierung zwischen *BamHI* und *SpeI*. Über die Restriktionsschnittstellen *PacI* und *KpnI* wurden die RNAi-Konstrukte in den binären Vektor pRedRoot überführt. RB: *right border*, tOCS: Terminator des Octopinsynthasegens aus *A. tumefaciens*, *sp*: *spacer*, p35S: CaMV 35S-Promotor, pUBQ10: *AtUBQ10*-Promotor, *DsRED1*: DsRED aus *D. striata*, tNOS: Terminator des Nopalinsynthasegens aus *A. tumefaciens*, LB: *left border*.

Bei jedem Wurzelsystem einer erzeugten chimären Pflanze handelte es sich um ein eigenständiges Transformationsereignis, das nicht in die nachfolgende Generation übertragbar war (= transiente Expression) und auf einer unterschiedlichen Anzahl an Integrationen der T-DNA des binären Vektors beruhte. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit

Einzelpflanzenanalysen durchgeführt, die eine Teilung des transgenen Wurzelsystems jeder Pflanze erforderten (Abb. III-7).

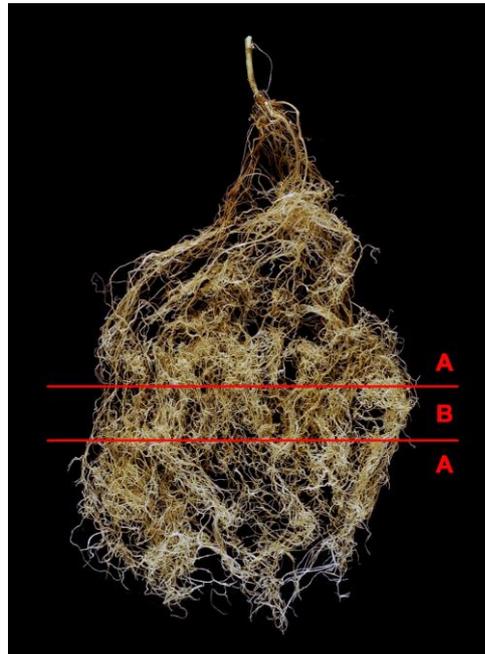


Abb. III-7: Einteilung des Wurzelsystems für die Einzelpflanzenanalyse. A: Bereiche des Wurzelsystems, die für analytische Untersuchungen verwendet wurden. B: Ca. 1,5 cm breiter, mittig gelegener Ausschnitt des Wurzelsystems, der anhand der DsRED-Fluoreszenz zur Selektion von chimären Medicago-Pflanzen mit transgenen Wurzeln diente und anschließend zum Anfärben der Pilzstrukturen verwendet wurde.

Zur Bestätigung des transgenen Status der Wurzeln wurde der ca. 1,5 cm breite, mittig gelegene Bereich B (Abb. III-7) auf DsRED-Fluoreszenz untersucht (vgl. II.2.4.2). Bei Pflanzen mit DsRED-Fluoreszenz wurde dieser Ausschnitt weiterhin zum Anfärben der Pilzstrukturen verwendet (vgl. II.2.5.1). Die verbliebenen Bereiche A (Abb. III-7) wurden vereinigt und stellten das Material für Real-Time RT-PCR-Untersuchungen (vgl. II.2.3.4), Microarray- und Metaboliten-Analysen dar (vgl. II.2.3.5 und II.2.6). Alle Wurzelsysteme ohne DsRED-Fluoreszenz wurden verworfen.

Die erfolgreiche *MtDXS2*-Suppression wurde anhand der Transkriptmenge und der Gehalte an Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in EV- und RNAi-Wurzeln untersucht. Auch Auswirkungen auf andere Gene wurden anhand ihrer Transkriptakkumulation analysiert. Die Bestimmung der Transkriptmengen erfolgte in der vorliegenden Arbeit stets mit Real-Time RT-PCR, bzw. mittels Microarray-Analyse auf die speziell in Abschnitt III.3.4 eingegangen wird.

III.2.1.1 *MtDXS2*-Transkriptakkumulation in Wurzelsystemen chimärer Pflanzen

Da bekannt war, dass eine Kolonisierung der Wurzel mit AM-Pilzen zu einer deutlichen Erhöhung der *MtDXS2*-Transkriptakkumulation führt (Walter *et al.*, 2002), wurde die *MtDXS2*-Transkriptmenge in nicht mykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzelsystemen bestimmt. Aufgrund der für den RNAi-Ansatz gewählten, nahezu identischen

Sequenzbereiche von *MtDXS2-1* und *MtDXS2-2* und der deutlich stärkeren Transkriptakkumulation von *MtDXS2-1* gegenüber *MtDXS2-2*, stellte *MtDXS2-1* einen geeigneten Marker zur Ermittlung der *MtDXS2*-Transkriptmengen dar.

In Abb. III-8 sind die Mittelwerte der *MtDXS2-1*-Transkriptmengen von drei mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzelsystemen der EV- und RNAi-Pflanzen, die mit dem RNAi-I- bzw. RNAi-II-Konstrukt transformiert wurden, dargestellt. Die Kultivierung der analysierten Pflanzen erfolgte für neun Wochen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (vgl. II.2.4.1).

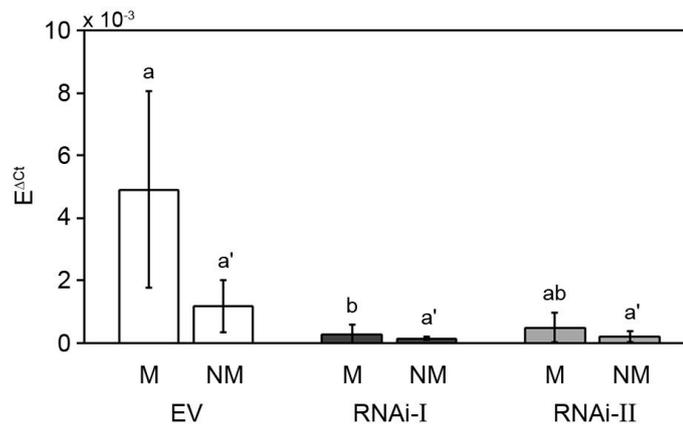


Abb. III-8: *MtDXS2-1*-Transkriptmenge in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen. Mittelwerte und Standardabweichungen der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge von jeweils drei mykorrhizierten (M) sowie nicht mykorrhizierten (NM) EV-Wurzeln (EV) und RNAi-Wurzeln, die entweder das RNAi-I- (RNAi-I) oder das RNAi-II-Konstrukt (RNAi-II) exprimierten, wurden berechnet. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz in mykorrhizierten (a, b) und nicht mykorrhizierten Proben (a') geprüft ($P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. $E^{\Delta C_t}$: Relative *MtDXS2-1*-Transkriptmenge bezogen auf den Translations-Elongationsfaktor 1α (EF 1α).

Aus Abb. III-8 geht hervor, dass die bereits von Walter *et al.* (2002) gezeigte Steigerung der *MtDXS2*-Expression in mykorrhizierten Wildtyp-Wurzeln ebenfalls in den erzeugten EV-Wurzeln nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus ist erkennbar, dass die wurzelspezifische Suppression von *MtDXS2* zu einer Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge auf durchschnittlich 6% in mykorrhizierten RNAi-I- und 10% in RNAi-II-Wurzeln im Vergleich zum Mittelwert der mykorrhizierten EV-Wurzeln (100%) führte. Anhand statistischer Analysen (*oneway.test* mit anschließendem Tukey-HSD-Test) war diese Reduktion lediglich in mykorrhizierten RNAi-I-Wurzeln signifikant. In nicht mykorrhizierten RNAi-Wurzeln konnten die *MtDXS2-1*-Transkriptmengen auf durchschnittlich 12% in den RNAi-I- und 16% in den RNAi-II-Wurzeln im Vergleich zum berechneten Mittelwert der nicht mykorrhizierten EV-Wurzeln (100%) reduziert werden. Aufgrund der geringen Transkriptmenge in EV-Wurzeln und der stärkeren Variabilität ihrer Transkriptakkumulation lagen hier jedoch keine signifikanten Unterschiede vor.

Die Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge in Wurzeln führte zu keinen sichtbaren Veränderungen des Phänotyps mykorrhizierter und nicht mykorrhizierter *Medicago*-Pflanzen.

III.2.1.2 *MtDXS1*-Transkriptakkumulation in Wurzeln mit reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen

Zum Ausschluss einer möglichen Suppression des *MtDXS1*-Isogens durch die erzeugten RNAi-Konstrukte wurde dessen Transkriptakkumulation in den bereits hinsichtlich der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge analysierten Proben untersucht.

Abb. III-9 zeigt, dass kein Unterschied in den *MtDXS1*-Transkriptmengen der mykorrhizierten bzw. nicht mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln vorlag. Dieses Resultat wurde mit allen weiteren Transformationsansätzen bestätigt. Aus diesem Grund wird von keiner Beeinträchtigung der *MtDXS1*-Transkriptakkumulation durch den *MtDXS2*-RNAi-Ansatz ausgegangen.

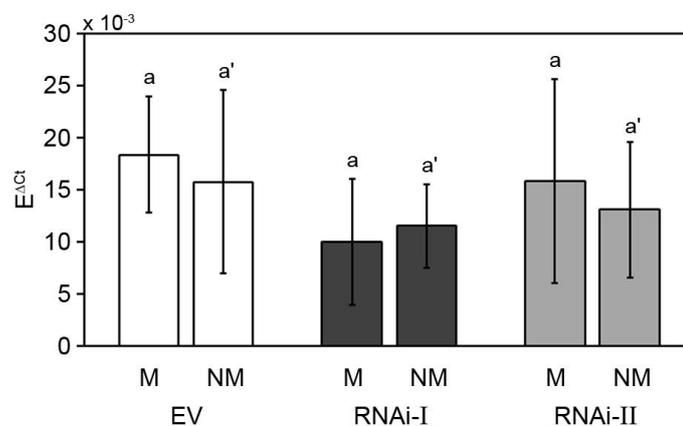


Abb. III-9: *MtDXS1*-Transkriptmenge in mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen. Mittelwerte und Standardabweichungen der *MtDXS1*-Transkriptmenge von jeweils drei mykorrhizierten (M) sowie nicht mykorrhizierten (NM) EV-Wurzeln (EV) und RNAi-Wurzeln, die entweder das RNAi-I- (RNAi-I) oder das RNAi-II-Konstrukt (RNAi-II) exprimierten, wurden berechnet. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz in mykorrhizierten (a) und nicht mykorrhizierten Proben (a') geprüft ($P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. E^{ΔCt}: Relative *MtDXS1*-Transkriptmenge bezogen auf EF 1α.

Die ermittelten *MtDXS1*-Transkriptmengen aller durchgeführten Transformationsansätze zeigten, dass kein Anstieg der *MtDXS1*-Transkriptmenge durch die Kolonisierung mit AM-Pilzen erfolgte. Dies wurde bereits von Walter *et al.* (2002) festgestellt. Gleichzeitig geht aber aus Abb. III-8 und Abb. III-9 auch hervor, dass in mykorrhizierten *hairy roots* keine niedrigeren *MtDXS1*- als *MtDXS2-1*-Transkriptmengen vorlagen. In den meisten durchgeführten Transformationsansätzen wurden in diesen Wurzeln ähnliche *MtDXS1*- und *MtDXS2-1*-Transkriptmengen detektiert (Daten nicht gezeigt), wobei aber auch deutlich höhere *MtDXS1*- als *MtDXS2-1*-Transkriptmengen auftraten (vgl. Abb. III-8 und Abb. III-9).

III.2.2 Untersuchung der AM-induzierten Akkumulation von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in Wurzeln mit reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen

Anhand der erzeugten chimären Pflanzen konnte untersucht werden, ob die wurzelspezifische *MtDXS2*-Suppression zu einer Reduktion der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate führt. Wie bereits erwähnt, ist Mycorradicin *in planta* mit bislang unbekanntem Verbindungen verestert oder bildet durch Veresterung mit Cyclohexenonderivaten die Kernstruktur des „Gelben Pigments“ in *Z. mays* (Fester *et al.*, 2002a). Da bekannt war, dass Mycorradicin als freie C₁₄-Dicarbonsäure nach alkalischer Hydrolyse der Esterbindungen mittels HPLC-Untersuchungen in AM-Wurzeln detektiert werden konnte (Fester *et al.*, 2002a; Strack & Fester, 2006), wurden in der vorliegenden Arbeit auf diese Weise die Gehalte der akkumulierten Mycorradicinderivate ermittelt. Als Grundlage für die Bestimmung der Cyclohexenonderivatgehalte der Wurzeln dienten die vier aus mykorrhizierten *Medicago*-Wildtyp-Wurzeln isolierten und identifizierten Cyclohexenonderivate (Schliemann *et al.*, 2008a), die anhand ihrer Retentionszeiten und UV-Spektren ebenfalls in mykorrhizierten *hairy roots* der EV-Pflanzen detektiert wurden. Dabei handelte es sich um die 9-*O*-β-D-Glucopyranoside des Blumenols C und des 13-Hydroxyblumenols C sowie deren 6'-*O*-Malonylkonjugate (Schliemann *et al.*, 2008a). Die akkumulierten Apocarotinoide wurden für die Analysen aus mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln extrahiert (vgl. II.2.6.1), mittels HPLC getrennt, anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert und anschließend mit externen Standards quantifiziert (vgl. II.2.6.2). Ein erster Vorversuch zeigte, dass bereits deutlich reduzierte Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte in *hairy roots* der EV-Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Wurzeln auftraten (Daten nicht gezeigt).

Abb. III-10 stellt die Mittelwerte der detektierten Mengen an Mycorradicin und Cyclohexenonderivaten der drei mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln, die bereits hinsichtlich der *MtDXS2-1*- und *MtDXS1*-Transkriptakkumulation analysiert wurden, dar. Unabhängig von dem verwendeten RNAi-Konstrukt trat in RNAi-Wurzeln eine signifikante Reduktion des Mycorradicins auf durchschnittlich 14 nmol/g FG und eine ebenfalls signifikante Reduktion der Cyclohexenonderivate auf durchschnittlich 3 nmol/g FG auf. Bezogen auf den Mittelwert der EV-Wurzeln (100%) war dies eine Reduktion der Verbindungen auf etwa 20 bzw. 3%. Zwischen den verschiedenen RNAi-Konstrukten konnten keine signifikanten Unterschiede in der detektierten Menge dieser AM-induzierten Apocarotinoide festgestellt werden.

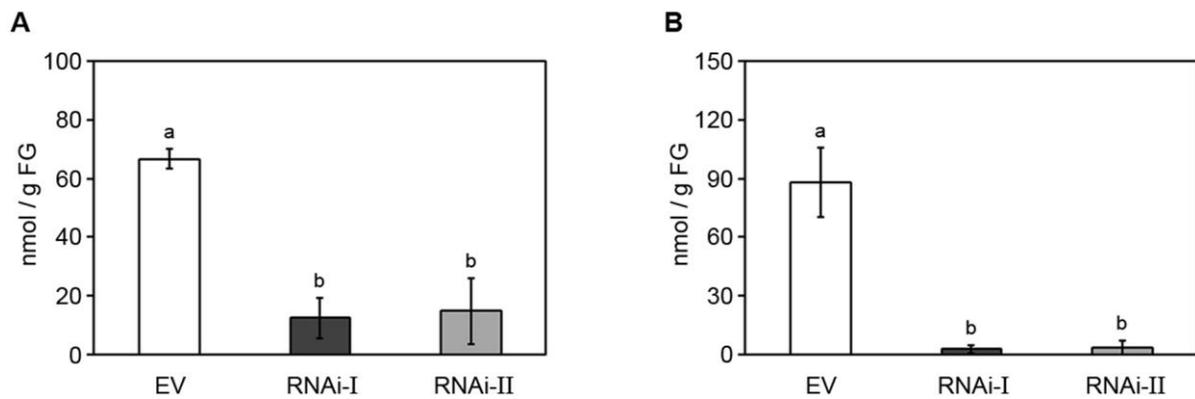


Abb. III-10: Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte in mykorrhizierten Wurzelsystemen chimärer Pflanzen. Mittelwerte und Standardabweichungen der (A) Mycorradicin- und (B) Cyclohexenonderivatgehalte von jeweils drei mykorrhizierten EV-Wurzeln (EV) und RNAi-Wurzeln, die entweder das RNAi-I- (RNAi-I) oder das RNAi-II-Konstrukt (RNAi-II) exprimierten, wurden berechnet. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Quantifizierung des Mycorradicins erfolgte mit dem externen Standard Crocetin und die Quantifizierung der Cyclohexenonderivate mit dem externen Standard ABA.

Die deutlich reduzierten Gehalte der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln sind somit der funktionelle Nachweis, dass deren Biosynthese über den DXS2-abhängigen MEP-Syntheseweg verläuft. Welche Auswirkung diese Unterbrechung auf die AM-Symbiose hat, sollte in nachfolgenden Analysen anhand der chimären RNAi-Pflanzen untersucht werden.

III.2.3 Transkriptakkumulation weiterer Gene des Carotinoidstoffwechsels

Parallel zu den *MtDXS1*-Transkriptanalysen (vgl. III.2.1.2) wurde in den mykorrhizierten Wurzelsystemen der generierten chimären Pflanzen die Transkriptakkumulation weiterer Gene des Carotinoidstoffwechsels untersucht. Spezifische Primer (vgl. Anhang VII.1) wurden anhand der TC Sequenzen des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8 für die *1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase* (*DXR*, TC101502), die *1-Hydroxy-2-methyl-butenyl-4-diphosphat-Reduktase* (*HDR*, TC109218), die *Phytoen-Desaturase* (*PDS*, TC106289) und die *Carotinoid cleavage-Dioxygenase1* (*CCD1*, TC100912) abgeleitet. Die zwei zuerst genannten Gene codieren Enzyme des MEP-Synthesewegs (vgl. Abb. I-5), während die weiteren Gene Enzyme des Carotinoidstoffwechsels spezifizieren (vgl. I.3).

Aus Abb. III-11 geht hervor, dass in RNAi-Wurzeln geringere Transkriptmengen von allen vier Genen als in den EV-Wurzeln gemessen wurden, jedoch konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Die Verringerung der Transkriptakkumulation dieser Gene, die für nachfolgende Biosyntheseschritte verantwortlich sind, bleibt weit hinter der Reduktion des *MtDXS2-1*-Transkriptniveaus zurück.

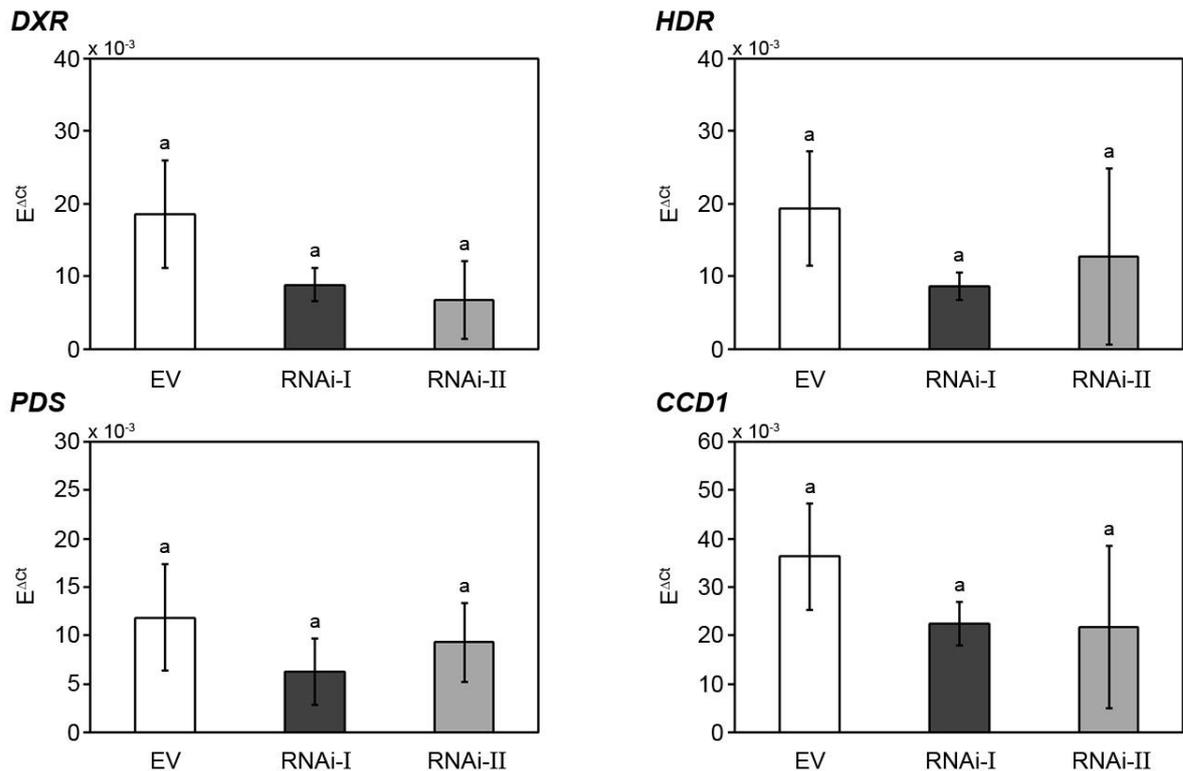


Abb. III-11: Transkriptmenge von Genen des Carotinoidstoffwechsels. Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmenge von jeweils drei mykorrhizierten EV-Wurzeln (EV) und RNAi-Wurzeln, die entweder das RNAi-I- (RNAi-I) oder das RNAi-II-Konstrukt (RNAi-II) exprimierten, wurden ermittelt. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz geprüft (a; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. E^{ACT}: Relative Transkriptmenge bezogen auf EF 1 α , DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, HDR: 1-Hydroxy-2-methyl-butenyl-4-diphosphat-Reduktase, PDS: Phytoen-Desaturase, CCD1: Carotinoid cleavage-Dioxygenase 1.

III.3 Auswirkung der *MtDXS2*-Suppression auf die AM-Symbiose

Inwieweit die Suppression des *DXS2*-Isogens einen Einfluss auf die AM-Symbiose besitzt, wurde mit RNAi-Wurzeln, die das RNAi-I-Konstrukt exprimierten, untersucht, da für dieses die stärkste Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge nachgewiesen werden konnte (vgl. III.2.1.1). Für diese Studien wurden Pflanzen von acht unabhängigen Transformationsansätzen analysiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in der vorliegenden Arbeit nicht alle Ansätze aufgeführt, sondern nur die Ergebnisse von drei repräsentativen Experimenten dargestellt. Zu deren Unterstützung bzw. Bestätigung wird an entsprechenden Textstellen auf den Anhang verwiesen, in dem die Ergebnisse eines weiteren Transformationsansatzes gezeigt werden.

III.3.1 Veränderte Transkriptmengen des AM-spezifischen Phosphattransporters *MtPT4*

Die parallele Anzucht von mykorrhizierten EV- und RNAi-Pflanzen zeigte bei allen durchgeführten Experimenten keine Unterschiede im Wuchstypus der Pflanzen sowie der Biomasse von Wurzel und Spross über den gesamten Kultivierungszeitraum. Zur

Untersuchung der physiologisch aktiven Symbiose zum Zeitpunkt der Aufarbeitung, die anhand einer verbesserten Versorgung durch schwer verfügbare Mineralien, wie z.B. Phosphat, definiert wird, stellen die bei einigen Pflanzen charakterisierten AM-spezifischen Phosphattransporter geeignete molekulare Marker dar (Übersicht bei Bucher, 2007). In *M. truncatula* wurde MtPT4 als AM-spezifischer, pflanzlicher Phosphattransporter von Harrison *et al.* (2002) identifiziert. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung von MtPT4 basierend auf der Transkriptmenge des zugehörigen Gens.

Aus der Zusammenfassung der Analysen aller Experimente konnte geschlussfolgert werden, dass ein Zusammenhang zwischen der verbliebenen *MtDXS2-1*-Transkriptmenge und der Höhe der *MtPT4*-Transkriptakkumulation existiert. Unabhängig von den Kultivierungsbedingungen und der Mykorrhizierungsdauer konnten in RNAi-Wurzeln, die eine Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation auf unter 10% des Mittelwerts der EV-Wurzeln (100%) aufwiesen, deutlich geringere *MtPT4*-Transkriptmengen als in EV- und RNAi-Wurzeln, die eine moderate Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge zeigten (10 - 50%), beobachtet werden. Ausgehend von dieser Abhängigkeit wurde eine Gruppierung in RNAi-Wurzeln mit starker Reduktion (*strong reduction*, srRNAi) und mit moderater Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (*moderate reduction*, mrRNAi) vorgenommen.

Abb. III-12 zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen und Mykorrhizierungszeiträumen. Die Pflanzen von Experiment I wurden sieben Wochen mit *G. intraradices* in der Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 h Tag bei 22°C, 8 h Nacht bei 18°C, 50% rel. Luftfeuchte, 375 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ Lichtintensität) kultiviert. Die Kultivierung der Pflanzen des Experiments II und III mit *G. intraradices* erfolgte über einen Zeitraum von jeweils neun Wochen. Während die Pflanzen des Experiments II im Gewächshaus unter Langtagbedingungen (vgl. II.2.4.1) kultiviert wurden, erfolgte die Anzucht der Pflanzen von Experiment III in einer Phytokammer mit veränderten Licht- und Temperaturbedingungen (17 h Tag bei 25°C, 7 h Nacht bei 22°C, 50% rel. Luftfeuchte, 375 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ Lichtintensität).

Anhand der in den Wurzeln ermittelten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen konnten im Experiment I sechs der RNAi-Pflanzen der Kategorie mrRNAi und neun der Kategorie srRNAi zugeordnet werden. Signifikante Unterschiede in der *MtPT4*-Transkriptmenge wurden nur in srRNAi-Wurzeln beobachtet. In diesen Wurzeln konnten durchschnittlich lediglich 20% der *MtPT4*-Transkriptmenge der EV-Wurzeln detektiert werden (Abb. III-12 B). Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wird im Anhang VII.3 ein weiteres unabhängiges Experiment (Experiment IV) aufgeführt. In Experiment II und III hingegen wurden nur mrRNAi-Wurzeln identifiziert. Diese zeigten, wie auch die mrRNAi-Wurzeln von Experiment I, im Vergleich zu den EV-Wurzeln keine signifikanten Unterschiede in der *MtPT4*-Transkriptakkumulation, wobei aber die *MtPT4*-Transkriptmenge der mrRNAi-Wurzeln aus Experiment I im Vergleich zu den EV-Wurzeln tendenziell erhöht war.

Parallel zu diesen Analysen erfolgte die Bestimmung der Transkriptakkumulation des Pilzgens *β-Tubulin1* (*GiBTUB1*; Corradi *et al.*, 2004), die ein Maß für vitale Pilzstrukturen darstellt (Abb. III-12 C). Differenzen in der Transkriptakkumulation konnten weder für die srRNAi-Wurzeln von Experiment I noch für die mrRNAi-Wurzeln von Experiment II und III festgestellt werden. Eine signifikante Erhöhung der *GiBTUB1*-Transkriptmenge wurde dagegen in mrRNAi-Wurzeln von Experiment I beobachtet. Diese Tendenz konnte jedoch in Experiment II, III und IV nicht bestätigt werden (Abb. III-12 C und vgl. Abb. VII-2 C im Anhang).

Werden die Mengen der AM-induzierten Cyclohexenon- und Mycorradicinderivate in den Wurzeln betrachtet, so traten, wie bereits im Vorexperiment beobachtet (vgl. Abb. III-10), sowohl in srRNAi-Wurzeln als auch in mrRNAi-Wurzeln signifikant geringere Mengen dieser Verbindungen im Vergleich zu den EV-Wurzeln auf (Abb. III-12 D und E). In Experiment I betrug der Gehalt an Cyclohexenonderivaten in mrRNAi-Wurzeln durchschnittlich 13 nmol/g FG bzw. in srRNAi-Wurzeln 5 nmol/g FG. Bezogen auf den Mittelwert der EV-Wurzeln (100%) bedeutet dies eine Reduktion der Verbindungen auf 17 bzw. 7%. Die beobachtete stärkere Reduktion der Cyclohexenonderivate in srRNAi-Wurzeln im Vergleich zu mrRNAi-Wurzeln konnte mit statistischen Analysen (*oneway.test* mit anschließendem Tukey-HSD-Test) für dieses Experiment bestätigt werden (Abb. III-12 D). Das im Anhang aufgeführte Experiment IV zeigte zwar ebenfalls eine erhöhte Absenkung, aber keinen signifikanten Unterschied zwischen mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln (vgl. Abb. VII-2 D im Anhang). Die gemessenen Gehalte der Cyclohexenonderivate in mrRNAi-Wurzeln von Experiment II und III betrugen durchschnittlich 13 bzw. 11 nmol/g FG. Dies entsprach einer Reduktion auf 18 bzw. 8% der Gehalte der EV-Wurzeln. Im Gegensatz zu den Cyclohexenonderivaten ergaben die Untersuchungen der Mycorradicinderivate, die als hydrolytisch freigesetztes Mycorradicin gemessen wurden, in mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln von Experiment I keine signifikanten Unterschiede der Gehalte. Durchschnittlich wurden 27 nmol/g FG in mrRNAi-Wurzeln und 21 nmol/g FG in srRNAi-Wurzeln gemessen. Dies entsprach einer Absenkung des Mycorradicins auf 13 bzw. 10% der Mengen der EV-Wurzeln. In mrRNAi-Wurzeln von Experiment II und III wurden 45 bzw. 17 nmol/g FG gemessen, das eine Reduktion auf 30 bzw. 5% bedeutete.

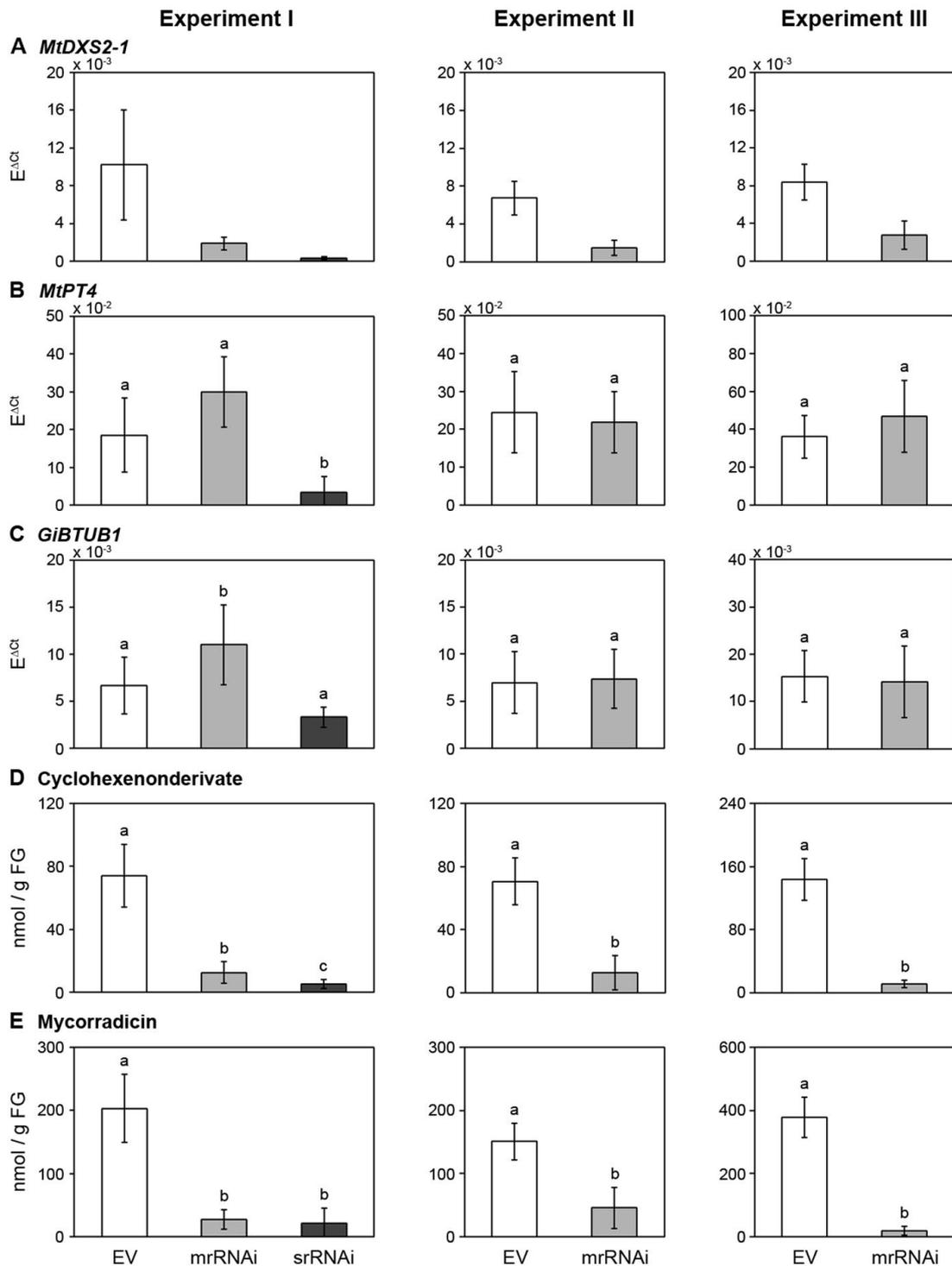


Abb. III-12: Transkriptmengen und Apocarotenoidgehalte in mykorrhizierten Wurzeln von EV- und RNAi-Pflanzen. **A:** *MtDXS2-1*-Transkriptmenge. **B:** *MtPT4*-Transkriptmenge. **C:** *GiBTUB1*-Transkriptmenge. **D:** Cyclohexenonderivatgehalte. **E:** Mycorradicinergehalte. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, die in Experiment I aus acht EV-Wurzeln (EV), sechs RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (mrRNAi) bzw. neun RNAi-Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (srRNAi), in Experiment II aus sechs EV-Wurzeln bzw. sechs mrRNAi-Wurzeln und in Experiment III aus sechs EV-Wurzeln bzw. 14 mrRNAi-Wurzeln berechnet wurden. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; c; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Quantifizierung des Mycorradicins erfolgte anhand des externen Standards Mycorradicindimethylester und die Quantifizierung der Cyclohexenonderivate mit dem externen Standard ABA. E^{ACT} : Relative Transkriptmenge bezogen auf EF 1 α .

Ein möglicher Zusammenhang zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptakkumulation bzw. Cyclohexenon-, Mycorradicinderivate und *MtPT4*-Transkriptmenge wurde anhand der erhaltenen Ergebnisse von EV- und RNAi-Wurzeln des Experiments I untersucht (Abb. III-13).

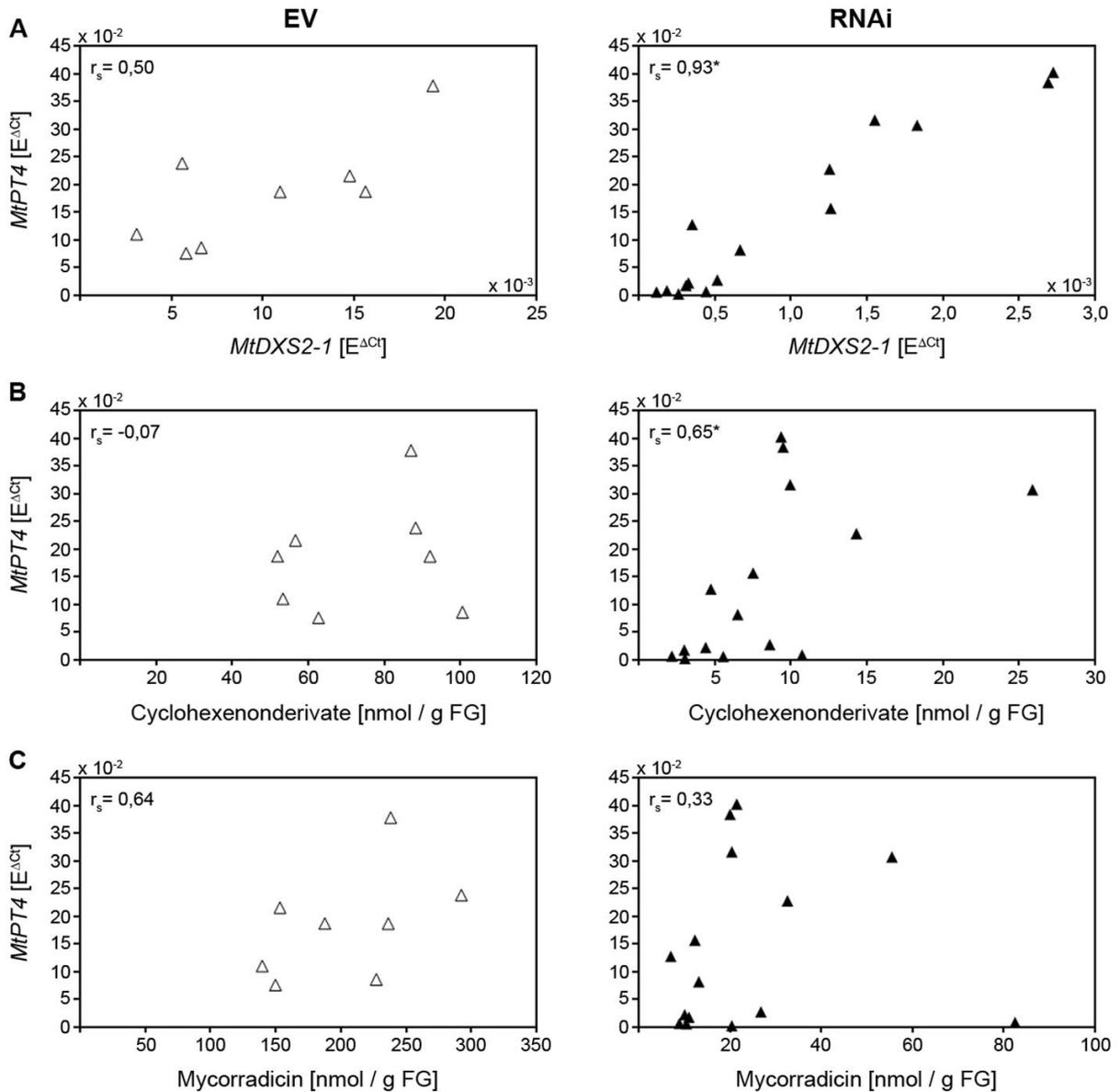


Abb. III-13: Korrelationsanalysen von der *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation und den Apocarotinoidgehalten mit der *MtPT4*-Transkriptmenge. Die Grafiken zeigen den Zusammenhang zwischen (A) *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation und *MtPT4*-Transkriptmenge sowie zwischen den (B, C) Apocarotinoidgehalten und der *MtPT4*-Transkriptmenge. Die in den Diagrammen dargestellten Transkriptmengen von *MtDXS2-1* und *MtPT4* sowie die Apocarotinoidgehalte repräsentieren die Ergebnisse der Einzelpflanzenanalyse von EV-Wurzeln (EV, Δ) und RNAi-Wurzeln (RNAi, \blacktriangle) aus Experiment I. Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten erfolgte nach Spearman (r_s). Mit *cor.test* wurde die Signifikanz der Korrelation geprüft (* $P \leq 0,05$).

Die durchgeführten Korrelationsanalysen zeigten einen stark signifikanten Zusammenhang zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptmenge in RNAi-Wurzeln ($r_s = 0,93$; Abb. III-13 A, RNAi), der unter Verwendung der Daten von Experiment IV bestätigt werden konnte (vgl. Tab. VII-3 im Anhang). Dagegen korrelierten die Gehalte der

Cyclohexenonderivate nur schwach mit den *MtPT4*-Transkriptmengen der RNAi-Wurzeln ($r_s = 0,65$; Abb. III-13 B, RNAi). Kein signifikanter Zusammenhang wurde zwischen dem Mycorradicingehalt und der *MtPT4*-Transkriptakkumulation in RNAi-Wurzeln beobachtet (Abb. III-13 C, RNAi). In den EV-Wurzeln konnte zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptmenge sowie zwischen den Apocarotinoidgehalten und der *MtPT4*-Transkriptmenge keine signifikante Korrelation ermittelt werden (Abb. III-13, EV).

III.3.2 Untersuchungen zum Arbuskelvorkommen und zur Arbuskelmorphologie

Der AM-spezifische Phosphattransporter MtPT4 wurde in der periarbuskulären Membran von arbuskulierten Cortezellen lokalisiert, wobei Harrison *et al.* (2002) das stärkste MtPT4-Signal in Zellen, die vollständig ausgebildete Arbuskel besitzen, nachwies. In Zellen mit sehr jungen oder kollabierten Strukturen konnte kein MtPT4-Signal detektiert werden. Ausgehend von dieser Tatsache könnten die stark reduzierten *MtPT4*-Transkriptmengen in srRNAi-Wurzeln auf eine Veränderung dieser Pilzstrukturen hinweisen. Anhand der ermittelten Transkriptdaten konnte jedoch nicht geschlussfolgert werden, ob es sich um eine Veränderung in der Anzahl, Morphologie oder Funktionalität der Arbuskel handelte. Hinweise zu den ersten beiden genannten Parametern sollte eine visuelle Untersuchung von mit Tinte bzw. Fuchsin gefärbten Wurzelbereichen der EV- und srRNAi-Pflanzen liefern (vgl. II.2.5.1). Wurzeln der mrRNAi-Pflanzen wurden ebenfalls in die Analysen einbezogen.

III.3.2.1 Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen

Die ermittelten *GiBTUB1*-Transkriptmengen (vgl. Abb. III-12 C) ließen lediglich Schlussfolgerungen über die Vitalität der Pilzstrukturen zu und lieferten keine Aussagen über die Frequenz und Intensität der Mykorrhizierung. Aus diesem Grund erfolgte die mikroskopische Evaluierung der Pilzstrukturen in einem Blindtest (durchgeführt von Dr. M. H. Walter, IPB, Halle, Deutschland) bei durchschnittlich 70 tintengefärbten Wurzelsegmenten nach Trouvelot *et al.* (1986) (vgl. II.2.5.1.1). Gleichzeitig konnte die Häufigkeit des Arbuskelvorkommens (Arbuskelabundanz) in den etwa gleich großen Wurzelsegmenten analysiert werden. Anhand des von Trouvelot *et al.* (1986) vorgegebenen Boniturschemas und des Computerprogramms „Mycocalc“ wurden die Wurzelsegmente hinsichtlich der Kolonisierung mit dem AM-Pilz *G. intraradices* und dem Auftreten von Arbuskeln bewertet.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von EV- und RNAi-Wurzeln aus Experiment I, II und III sind in Abb. III-14 dargestellt. Aus den Diagrammen geht hervor, dass keine gravierenden Unterschiede in der Frequenz der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem (F, Abb. III-14 A), der Intensität der AM-Kolonisierung (m, Abb. III-14 B) und der Arbuskelabundanz (a, Abb. III-14 C) in den evaluierten Wurzelsegmenten von EV-, mrRNAi- und srRNAi-Pflanzen beobachtet wurden. Der signifikante Unterschied, der in der Intensität der AM-Kolonisierung zwischen EV- und mrRNAi-Wurzeln des Experiments II ermittelt

wurde, konnte in Experiment I, III (m, Abb. III-14 B) und IV (vgl. Abb. VII-3 B im Anhang) nicht bestätigt werden. Eine mögliche Erklärung dieser verringerten Intensität der AM-Kolonisierung kann die inhomogene Mykorrhizierung von Wurzelsystemen sein.

Hervorzuheben ist jedoch die, trotz stark reduzierter *MtPT4*-Transkriptakkumulation, unveränderte Arbuskelabundanz in srRNAi-Wurzeln des Experiments I (Abb. III-14 C), die mit den Analysen der srRNAi-Wurzeln des Experiments IV bestätigt werden konnte (vgl. Abb. VII-3 C im Anhang). Die Anzahl an vorkommenden Arbuskeln scheint somit in srRNAi-Wurzeln unverändert zu sein. Inwieweit die *MtDXS2*-Suppression Auswirkungen auf die Morphologie oder Funktionalität der Arbuskel hat, konnte anhand der tintengefärbten Wurzelsegmente nicht beantwortet werden.

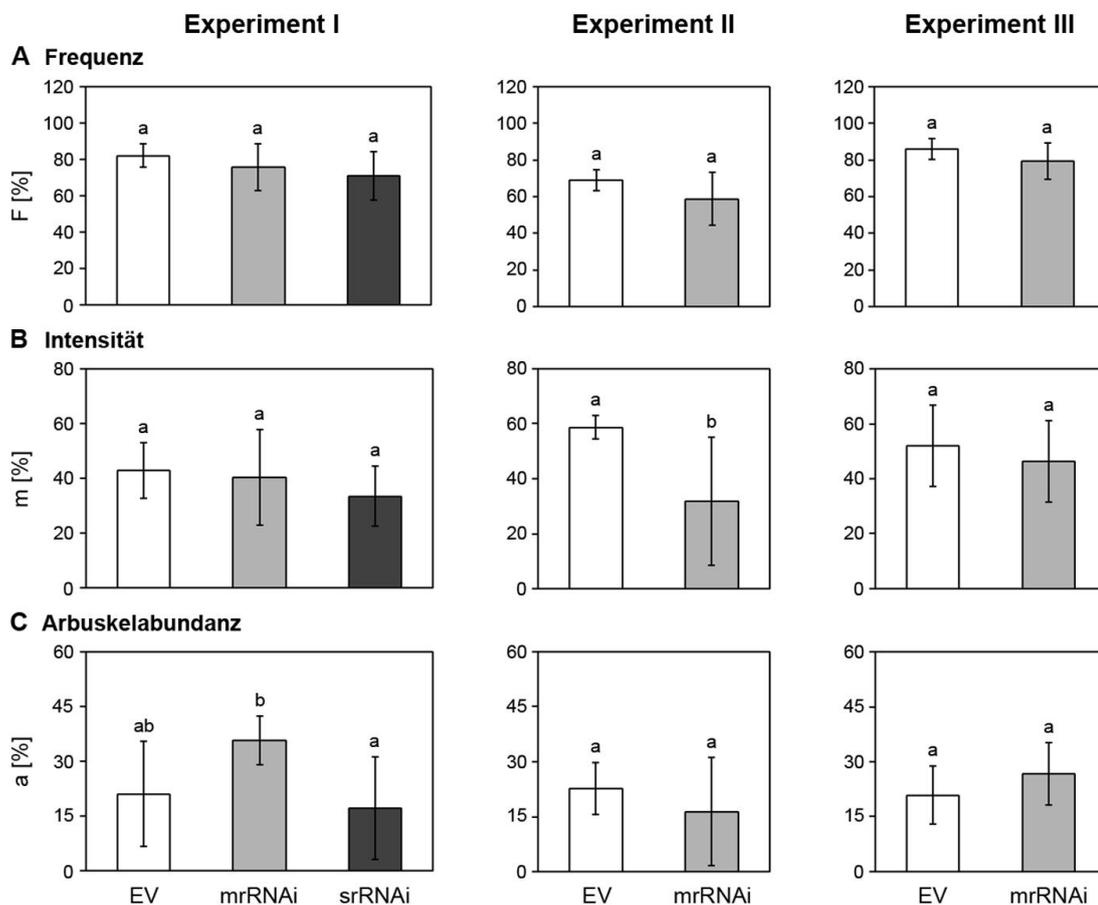


Abb. III-14: Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzeln von EV- und RNAi-Pflanzen. A: Frequenz der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem, F. B: Intensität der AM-Kolonisierung in den Wurzelsegmenten, m. C: Arbuskelabundanz in den kolonisierten Wurzelsegmenten, a. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, die in Experiment I aus acht EV-Wurzeln (EV), sechs RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (mrRNAi) bzw. neun RNAi-Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (srRNAi), in Experiment II aus sechs EV-Wurzeln bzw. sechs mrRNAi-Wurzeln und in Experiment III aus sechs EV-Wurzeln bzw. 14 mrRNAi-Wurzeln berechnet wurden. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten.

III.3.2.2 Arbuskelmorphologie

Zur visuellen Untersuchung der Arbuskelmorphologie wurden in 1,5 cm großen Segmenten des Ausschnitts B (vgl. Abb. III-7) die Pilzstrukturen in EV- und RNAi-Wurzeln mit Fuchsin säure gefärbt und am Laserscanningmikroskop analysiert (vgl. II.2.5.1.2). In RNAi-Wurzeln konnten keine Unterschiede hinsichtlich einer Veränderung in der Arbuskelmorphologie im Vergleich zu EV-Wurzeln festgestellt werden. Allerdings war das Verhältnis der Arbuskel in den verschiedenen Entwicklungsstadien verändert, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

Der Lebenszyklus eines Arbuskels in der pflanzlichen Zelle beträgt ungefähr 7 - 10 Tage (Alexander *et al.*, 1988) und umfasst die Entwicklung von jungen, über voll entwickelte bis zu vollständig zerfallenen Strukturen. Die Entstehung und der Zerfall der Arbuskel ist ein fortlaufender Prozess, der aufgrund der asynchronen Kolonisierung zum Vorkommen aller Entwicklungsstadien in einer mykorrhizierten Wurzel führt. Für eine detailliertere Analyse der Arbuskelanzahl in den verschiedenen Entwicklungsstadien wurden für diese Arbeit vier Zustände anhand der Arbuskelmorphologie klassifiziert:

- (1) Der Arbuskel befindet sich in der Entwicklung zur vollständig ausgebildeten Symbiosestruktur. Die charakteristischen Merkmale dieses Stadiums sind der zunehmende Verzweigungsgrad der distalen Hyphen und das durch den Arbuskel nicht vollständig ausgefüllte Zellvolumen (Abb. III-15 A, 1).
- (2) Der Arbuskel ist vollständig ausgebildet und füllt durch seine stark verzweigten Hyphen das gesamte Volumen der besiedelten Cortexzelle aus (Abb. III-15 A, 2).
- (3) Der Arbuskel befindet sich in der Abbauphase. Das auffälligste Merkmal dieses Entwicklungsstadiums ist die zunehmende Anzahl an Septen, die eine Trennung von vitalen und kollabierenden Hyphenabschnitten darstellen (Cox & Sanders, 1974; Abb. III-15 A, 3).
- (4) Der Arbuskel ist nahezu vollständig zerfallen und hat das Endstadium seines Lebenszyklus erreicht. Während dieses Stadiums sind die distalen Hyphen des Arbuskels nicht mehr deutlich zu erkennen, sondern es sind lediglich diffuse Aggregate sichtbar (Abb. III-15 A, 4).

Zur Bestimmung der Anzahl der Arbuskel in diesen vier Entwicklungsstadien wurden je Wurzelsystem drei mykorrhizierte Wurzelsegmente aus dem Ausschnitt B ausgewählt (vgl. Abb. III-7). In drei willkürlich festgelegten Bereichen eines jeden Wurzelsegments erfolgte die Einordnung aller vorhandenen Arbuskel in die beschriebenen Stadien. Anhand der Gesamtanzahl der bewerteten Arbuskel einer Einzelpflanze ($n \approx 100$) wurde die relative Arbuskelanzahl in dem jeweiligen Entwicklungsstadium ermittelt. Für die Analysen standen die Wurzelsysteme der EV- und RNAi-Pflanzen von Experiment I und II zur Verfügung.

Eine Mykorrhizierungskinetik mit EV- und RNAi-Pflanzen war aufgrund der geringen Anzahl an erzeugten chimären Pflanzen nicht möglich. Die untersuchten Wurzelbereiche der

beiden Experimente konnten aber unterschiedlichen Stadien der Mykorrhizierung zugeordnet werden. Im Vergleich zu den EV-Wurzeln von Experiment I (Abb. III-15 B, Experiment I) wurden in den EV-Wurzeln von Experiment II mehr Arbuskel im vollständig ausgebildeten Entwicklungsstadium und deutlich weniger in der Abbauphase vorgefunden (Abb. III-15 B, Experiment II). Aus diesem Grund wurden die Pflanzen aus Experiment II in ein früheres Mykorrhizierungsstadium als die von Experiment I eingeordnet und sind in Abb. III-15 B und C zuerst aufgeführt.

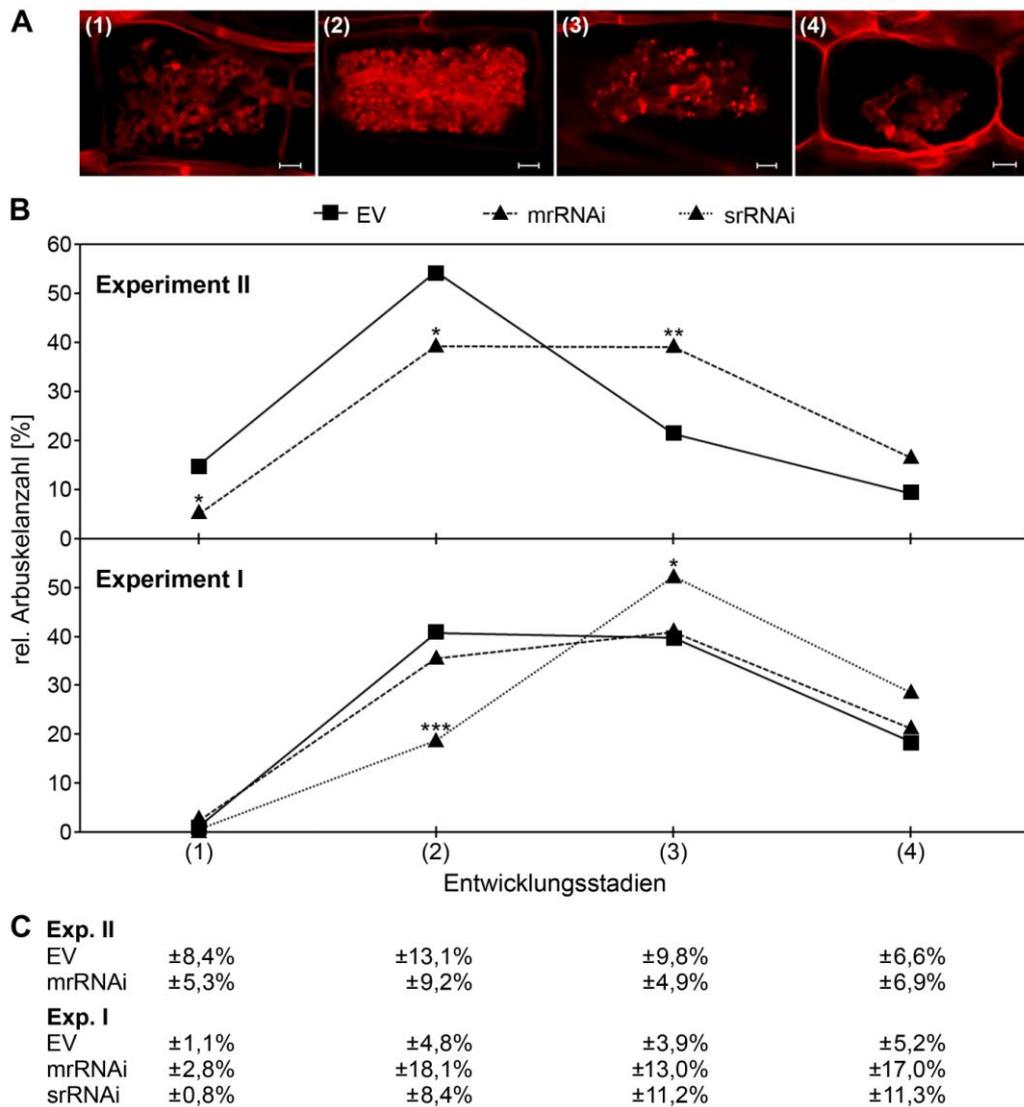


Abb. III-15: Anteil verschiedener Entwicklungsstadien der Arbuskel an deren Gesamtpopulation in EV- und RNAi-Wurzeln. A: Dargestellt sind die vier anhand der Arbuskelmorphologie klassifizierten Entwicklungsstadien: (1) Entwicklungsphase, (2) vollständig ausgebildete Struktur, (3) Abbauphase, (4) Endstadium. Die Balken entsprechen 5 µm. B: Ergebnisse von sechs EV-Wurzeln (EV) bzw. sechs mrRNAi-Wurzeln (mrRNAi) aus Experiment II und von acht EV-Wurzeln, sechs mrRNAi-Wurzeln bzw. acht srRNAi-Wurzeln (srRNAi) aus Experiment I. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Arbuskelanzahl im entsprechenden Entwicklungsstadium. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$). C: Berechnete Standardabweichungen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in den Grafiken aufgeführt werden.

In RNAi-Wurzeln des früheren Mykorrhizierungsstadiums (Experiment II), die alle lediglich eine moderate Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge aufwiesen (mrRNAi), wurden mehr

Arbuskel in der Abbauphase gefunden (Abb. III-15 B, Experiment II). Im späteren Mykorrhizierungsstadium (Experiment I) konnten in mrRNAi-Wurzeln keine Unterschiede in der relativen Arbuskelanzahl in den verschiedenen Entwicklungsstadien beobachtet werden, da in den EV-Wurzeln bereits eine deutlich erhöhte Anzahl an degenerierenden Strukturen vorlag (Abb. III-15 B, Experiment I). Allerdings wurden in diesem Experiment in RNAi-Wurzeln mit stark reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (srRNAi) mehr Arbuskel in der Abbauphase und deutlich weniger vollständig entwickelte Arbuskel identifiziert (Abb. III-15 B, Experiment I).

III.3.3 Untersuchung des Phosphatgehalts in mykorrhizierten Wurzeln mit reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen

Die Reduktion der *MtPT4*-Transkriptakkumulation und die Zunahme der Anzahl an Arbuskel, die sich in der Abbauphase befinden, impliziert eine gestörte Funktionalität der AM-Symbiose, die in einer verringerten Phosphataufnahme der Pflanze resultieren könnte. Um dies zu untersuchen, wurde der anorganische Phosphatgehalt (P_i -Gehalt) in EV- und RNAi-Wurzeln von Experiment I und II bestimmt (vgl. II.2.6.4).

Abb. III-16 verdeutlicht, dass keine Unterschiede im P_i -Gehalt von EV- und RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen beobachtet wurden. Der signifikant erhöhte P_i -Gehalt in Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (srRNAi-Wurzeln) konnte nur in Experiment I gezeigt werden.

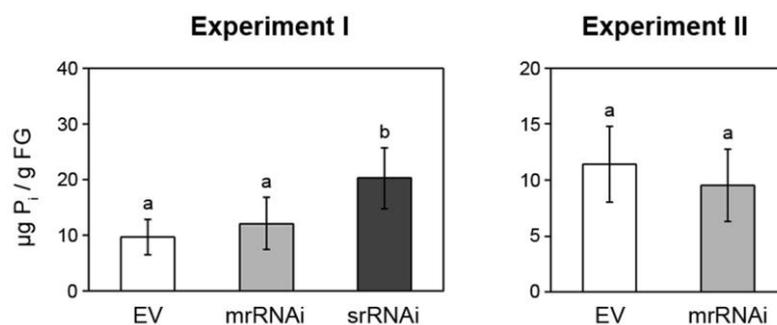


Abb. III-16: Phosphatgehalt in mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen, die in Experiment I aus acht EV-Wurzeln (EV), sechs mrRNAi-Wurzeln bzw. acht srRNAi-Wurzeln und in Experiment II aus sechs EV-Wurzeln bzw. fünf mrRNAi-Wurzeln berechnet wurden. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten.

III.3.4 Transkriptom-Analyse zur Identifikation AM-responsiver Gene mit veränderter Regulation

Da die starke *MtDXS2*-Suppression zu einer deutlich verringerten *MtPT4*-Transkriptakkumulation in mykorrhizierten Wurzeln führte, wurde durch eine Microarray-basierte Transkriptom-Analyse untersucht (vgl. II.2.3.5), ob weitere AM-responsive Gene durch die Suppression von *DXS2* beeinflusst wurden. Dies erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. H. Küster (Universität Bielefeld, Deutschland). Für die Untersuchungen wurden die

Transkriptome von mykorrhizierten mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln aus Experiment I mit dem Transkriptom von mykorrhizierten EV-Wurzeln verglichen. Für die Gewährleistung repräsentativer Ergebnisse erfolgte die Verwendung von jeweils vier biologischen Replikaten. Als differenziell regulierte Gene wurden jene klassifiziert, deren Transkriptakkumulation mindestens zweifach signifikant erhöht oder erniedrigt war ($P\text{-Wert} \leq 0,05$; $-1 \geq \log_2\text{-Wert} \geq 1$; weitere Details vgl. II.2.3.5).

Die Grundlage der Datenanalyse stellten die von Hohnjec *et al.* (2005) anhand von Microarray-Analysen identifizierten AM-responsiven Gene dar. Hierbei handelte es sich um 176 Gene, die während der symbiontischen Interaktion von *G. intraradices/M. truncatula* und *G. mosseae/M. truncatula* eine reduzierte Transkriptakkumulation zeigten und somit als AM-reprimiert bezeichnet wurden. Weiterhin wurden unter diesen Bedingungen 201 Gene ermittelt, die eine erhöhte Transkriptakkumulation in mykorrhizierten Wildtyp-Wurzeln von *Medicago* besaßen. Diese wurden als AM-induziert bezeichnet.

Die durchgeführte Transkriptom-Analyse zeigte, dass in *DXS2*-reprimierten mrRNAi-Wurzeln 281 Gene mit veränderter Transkriptakkumulation identifiziert wurden. Von diesen konnten 20 den AM-reprimierten und sechs den AM-induzierten Genen zugeordnet werden (Tab. III-1). In srRNAi-Wurzeln waren dagegen 1132 Gene dereguliert, wobei die Gene mit der stärksten Veränderung der Transkriptakkumulation den AM-responsiven Genen zugeordnet werden konnten (vgl. Anhang VII.5). Innerhalb der 1132 deregulierten Gene wurden 57 als AM-reprimiert und 66 als AM-induziert eingestuft (Tab. III-1).

Tab. III-1: Anzahl AM-responsiver Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. Für die Microarray-Analysen wurden jeweils vier mykorrhizierte EV-, mrRNAi-, srRNAi-Wurzeln aus Experiment I verwendet. In der Tabelle sind die Gesamtanzahl sowie die Anzahl induzierter und reprimierter Gene in mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln dargestellt, die in der symbiontischen Interaktion zwischen *G. intraradices/M. truncatula* und *G. mosseae/M. truncatula* als AM-reprimiert bzw. AM-induziert beschrieben wurden (Hohnjec *et al.*, 2005). mrRNAi: Wurzeln mit moderater *MtDXS2-1*-Suppression, srRNAi: Wurzeln mit starker *MtDXS2-1*-Suppression, EV: EV-Wurzeln.

| AM-responsive Gene nach Hohnjec <i>et al.</i> (2005) | mrRNAi/EV | | | srRNAi/EV | | |
|---|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|------------|
| | gesamt | induziert | reprimiert | gesamt | induziert | reprimiert |
| AM-reprimiert | 20 | 17 | 3 | 57 | 52 | 5 |
| AM-induziert | 6 | 1 | 5 | 66 | 2 | 64 |

Aus Tab. III-1 geht hervor, dass viele der von Hohnjec *et al.* (2005) als AM-reprimiert definierten Gene oftmals eine erhöhte Transkriptakkumulation in RNAi-Wurzeln aufwiesen, also induziert waren, während die als AM-induziert beschriebenen Gene reprimiert waren. Besonders auffällig war dies bei den identifizierten AM-reprimierten bzw. AM-induzierten Genen der srRNAi-Wurzeln. Insgesamt scheint somit vor allem in srRNAi-Wurzeln eine Veränderung der AM-vermittelten Genregulation vorzuliegen.

AM-reprimierte Gene, die eine veränderte Regulation in mrRNAi- oder srRNAi-Wurzeln zeigten, sind in Tab. III-2 aufgelistet. Von diesen wurden deutlich mehr in srRNAi-Wurzeln identifiziert (Tab. III-1). Wie bereits erwähnt, zeigten die meisten deregulierten AM-

reprimierten Gene eine höhere Transkriptakkumulation in mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln als in EV-Wurzeln. Die höchsten Transkriptmengen konnten beispielsweise in srRNAi-Wurzeln für Gene, die ein Dehydrin (TC100921) oder vier LEA-Proteine (*late embryogenesis abundant*, TC94389, TC94508, TC94387, TC94509) codieren, ermittelt werden. Eine geringere Transkriptakkumulation konnte für drei AM-reprimierte Gene in mrRNAi-Wurzeln und für fünf weitere Gene in srRNAi-Wurzeln nachgewiesen werden. Davon zeigte jedoch keines eine ähnliche Regulation in mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln. Divergent regulierte AM-reprimierte Gene wurden in mrRNAi-Wurzeln im Vergleich zu srRNAi-Wurzeln nicht identifiziert.

Tab. III-2: AM-reprimierte Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. Die Tabelle listet die erhaltenen \log_2 -Werte der mrRNAi- und der srRNAi-Wurzeln auf. Hervorgehoben sind die \log_2 -Werte der Gene, die eine mindestens zweifach erhöhte oder erniedrigte Transkriptakkumulation zeigten. DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, Oligo ID: Bezeichnung des 70 bp Oligonucleotids von *M. truncatula*, mrRNAi: Wurzeln mit moderater *MtDXS2-1*-Suppression, srRNAi: Wurzeln mit starker *MtDXS2-1*-Suppression, EV: EV-Wurzeln, *P*: Signifikanzniveau (*P*-Wert).

| DFCI ID | Oligo ID | Annotation | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
|-----------------------|----------|--|----------------|----------|----------------|----------|
| | | | \log_2 -Wert | <i>P</i> | \log_2 -Wert | <i>P</i> |
| TC100921 | MT000542 | <i>Dehydrin-like protein</i> | 2,82 | 0,0204 | 5,16 | 0,0000 |
| TC94389 | MT014312 | <i>Late embryogenesis abundant protein 2</i> | 3,29 | 0,0004 | 4,97 | 0,0000 |
| TC94508 | MT007556 | <i>Seed maturation protein LEA4</i> | 0,24 | 0,0646 | 4,63 | 0,0000 |
| TC112317 | MT005274 | <i>Late embryogenesis abundant protein 2</i> | 2,09 | 0,0062 | 4,08 | 0,0009 |
| TC94387 | MT014313 | <i>Late embryogenesis abundant protein 2</i> | 1,22 | 0,0030 | 3,48 | 0,0000 |
| TC94509 | MT007558 | <i>Seed maturation protein LEA4</i> | 1,41 | 0,0002 | 3,13 | 0,0000 |
| TC107798 | MT008389 | <i>HVA22-like protein</i> | 1,13 | 0,0002 | 3,06 | 0,0000 |
| TC94074 | MT015170 | <i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase</i> | 1,23 | 0,0635 | 2,80 | 0,0004 |
| TC100264 | MT015129 | <i>Dehydrin</i> | 0,49 | 0,0060 | 2,54 | 0,0000 |
| TC109750 | MT002839 | <i>Hypothetical protein</i> | 1,36 | 0,0023 | 2,52 | 0,0006 |
| TC95168 | MT000869 | <i>Early nodulin-like protein 2 precursor</i> | 1,17 | 0,1412 | 2,40 | 0,0000 |
| TC95539 | MT008432 | <i>Stachyose synthase precursor</i> | 1,23 | 0,0001 | 2,37 | 0,0000 |
| TC93941 | MT014053 | <i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase</i> | 0,49 | 0,0999 | 2,29 | 0,0002 |
| TC96963 | MT003716 | <i>Ferritin</i> | 0,31 | 0,4366 | 2,28 | 0,0000 |
| TC107226 | MT007766 | <i>Lactoylglutathione lyase protein/Glyoxalase I protein</i> | 1,48 | 0,0473 | 2,11 | 0,0057 |
| BG452670 ^A | MT015128 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,27 | 0,3186 | 2,08 | 0,0016 |
| TC102369 | MT001661 | <i>Ubiquitin ligase SINAT3</i> | 1,03 | 0,0033 | 2,07 | 0,0000 |
| TC100258 | MT007538 | <i>Caenorhabditis elegans LEA-1 protein</i> | 0,51 | 0,1930 | 1,99 | 0,0105 |
| TC95237 | MT000967 | <i>Beta-expansin</i> | 0,30 | 0,4845 | 1,95 | 0,0000 |
| TC106842 | MT007300 | <i>Chitinase</i> | 0,43 | 0,1891 | 1,90 | 0,0007 |
| BF632428 ^A | MT015140 | <i>Galactinol synthase</i> | 1,15 | 0,0713 | 1,83 | 0,0001 |
| TC102149 | MT010777 | <i>Aldehyde dehydrogenase/Antiquitin</i> | 0,88 | 0,0004 | 1,83 | 0,0000 |
| TC95846 | MT001400 | <i>Protein phosphatase 2C</i> | 0,65 | 0,0920 | 1,75 | 0,0000 |
| TC94110 | MT000029 | <i>Thioredoxin domain 2</i> | 1,31 | 0,0001 | 1,74 | 0,0000 |
| TC98964 | MT005666 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,88 | 0,0577 | 1,60 | 0,0005 |
| TC101594 | MT008137 | <i>Hydrophobic protein RC12B</i> | 0,90 | 0,1155 | 1,60 | 0,0046 |
| TC97642 | MT003439 | <i>GTP-binding protein yptV3</i> | 0,59 | 0,2901 | 1,53 | 0,0160 |
| TC107542 | MT008226 | <i>Homeobox-leucine zipper protein ATHB-7</i> | 2,17 | 0,0236 | 1,52 | 0,0058 |

Tab. III-2 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | Annotation | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
|-----------------------|----------|--|------------------------|--------|------------------------|--------|
| | | | log ₂ -Wert | P | log ₂ -Wert | P |
| TC95896 | MT002055 | <i>AP2 domain-containing transcription factor</i> | 0,52 | 0,0024 | 1,52 | 0,0006 |
| TC93941 | MT015169 | <i>Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase</i> | 0,21 | 0,7677 | 1,46 | 0,0022 |
| BF636170 ^A | MT014768 | <i>Hypothetical protein</i> | 1,00 | 0,0054 | 1,43 | 0,0004 |
| TC102873 | MT003596 | <i>Heavy-metal-associated domain-containing protein/Copper chaperone-related</i> | 1,39 | 0,0021 | 1,42 | 0,0019 |
| TC94467 | MT007340 | <i>Annexin</i> | -0,12 | 0,6581 | 1,36 | 0,0000 |
| TC94962 | MT001085 | <i>Hypothetical protein</i> | 1,44 | 0,0001 | 1,35 | 0,0008 |
| TC107628 | MT007837 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,68 | 0,0470 | 1,32 | 0,0040 |
| TC94228 | MT000126 | <i>Adenosylmethionine decarboxylase</i> | 1,89 | 0,0100 | 1,29 | 0,0058 |
| TC102741 | MT015737 | <i>Expressed protein</i> | 0,28 | 0,7093 | 1,23 | 0,0001 |
| TC110135 | MT014784 | <i>Low-temperature-induced protein</i> | 0,55 | 0,2265 | 1,23 | 0,0003 |
| TC103683 | MT003654 | <i>Zinc finger</i> | 0,90 | 0,0004 | 1,21 | 0,0000 |
| TC95464 | MT001568 | <i>Hypothetical protein</i> | 1,07 | 0,0633 | 1,16 | 0,0193 |
| TC96130 | MT009487 | <i>NAC domain-containing protein 29</i> | 0,76 | 0,0314 | 1,15 | 0,0000 |
| TC94229 | MT014222 | <i>Adenosylmethionine decarboxylase</i> | 0,30 | 0,3394 | 1,13 | 0,0005 |
| TC100970 | MT002640 | <i>Expressed protein</i> | 0,89 | 0,0355 | 1,13 | 0,0000 |
| TC107129 | MT007565 | <i>Universal stress protein</i> | 1,20 | 0,0688 | 1,12 | 0,0004 |
| TC94549 | MT015334 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,49 | 0,1188 | 1,11 | 0,0030 |
| TC109832 | MT004870 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,58 | 0,0095 | 1,09 | 0,0006 |
| TC106660 | MT014257 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,44 | 0,0219 | 1,08 | 0,0000 |
| TC95820 | MT005126 | <i>MtSUCS2</i> | -0,03 | 0,8371 | 1,03 | 0,0014 |
| TC94915 | MT000799 | <i>NAC domain-containing protein 19</i> | 1,08 | 0,0012 | 1,02 | 0,0002 |
| TC98972 | MT012651 | <i>MtLYK8</i> | 0,28 | 0,2719 | 1,02 | 0,0000 |
| TC108162 | MT001703 | <i>Hydrophobic protein RC12B</i> | 0,23 | 0,0527 | 1,01 | 0,0001 |
| TC106343 | MT007549 | <i>CBL-interacting protein kinase 23</i> | 0,40 | 0,3259 | 1,01 | 0,0365 |
| TC93971 | MT015445 | <i>50S ribosomal protein L3</i> | -1,09 | 0,0126 | 0,67 | 0,1029 |
| TC95843 | MT001901 | <i>Dehydration-responsive protein</i> | -1,88 | 0,0005 | 0,07 | 0,7813 |
| TC94259 | MT015227 | <i>Probable glutathione S-transferase</i> | -1,45 | 0,0000 | -0,89 | 0,0018 |
| TC99615 | MT015049 | <i>GDSL-motif lipase/Hydrolase family protein</i> | -0,27 | 0,2846 | -1,06 | 0,0025 |
| TC95093 | MT000912 | <i>4-Coumarate-CoA ligase/4-Coumaroyl-CoA synthase</i> | -0,11 | 0,3485 | -1,15 | 0,0117 |
| TC95489 | MT010277 | <i>Peroxidase</i> | -0,58 | 0,3779 | -1,18 | 0,0103 |
| TC103130 | MT009388 | <i>Organ-specific protein S2</i> | -0,63 | 0,0904 | -1,91 | 0,0184 |
| CB065323 ^A | MT014360 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,71 | 0,0063 | -3,02 | 0,0000 |

^AGen-Bank ID

AM-induzierte Gene, die eine veränderte Transkriptakkumulation in mrRNAi- oder srRNAi-Wurzeln zeigten, werden in Tab. III-3 aufgeführt. Anhand der Transkriptom-Analyse konnten in srRNAi-Wurzeln deutlich mehr deregulierte AM-induzierte Gene identifiziert werden als in mrRNAi-Wurzeln (Tab. III-1). Nahezu alle diese Gene wiesen in srRNAi-Wurzeln eine reduzierte Transkriptmenge im Vergleich zu den EV-Wurzeln auf. Unter den deregulierten Genen konnten, neben dem bereits analysierten Marker *MtPT4*, fünf weitere Gene, deren Expression entweder einzig in arbuskulierten Zellen oder zusätzlich auch in den benachbarten Zellen auftritt, identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um *MtSCP1* (*Serin-*

Carboxypeptidase; Liu *et al.*, 2003), *MtGST1* (*Glutathion-S-Transferase*; Wulf *et al.*, 2003), *MtGLP1* (*Germin-like Protein*; Doll *et al.*, 2003), *MtLEC7* (*Lectin*; Frenzel *et al.*, 2005) und *MtBCP1* (*Blue copper-binding Protein*; Hohnjec *et al.*, 2005). Von den genannten Genen zeigte nur *MtSCP1* eine reduzierte Transkriptakkumulation in mrRNAi-Wurzeln. Als AM-induzierte Gene, die eine höhere Transkriptakkumulation in RNAi-Wurzeln besaßen, wurden lediglich TC112140 und TC95490 ermittelt. Eine divergente Regulation von AM-induzierten Genen in mrRNAi-Wurzeln konnte im Vergleich zu srRNAi-Wurzeln nicht festgestellt werden.

Tab. III-3: AM-induzierte Gene mit veränderter Regulation in RNAi-Wurzeln. Legende wie in Tab. III-2.

| DFCI ID | Oligo ID | Annotation | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
|-----------------------|----------|--|------------------------|--------|------------------------|--------|
| | | | log ₂ -Wert | P | log ₂ -Wert | P |
| TC107197 | MT014644 | <i>Organ-specific protein S2</i> | 0,13 | 0,6060 | -5,92 | 0,0000 |
| TC94753 | MT008095 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,44 | 0,2612 | -5,42 | 0,0000 |
| TC107197 | MT002169 | <i>Organ-specific protein S2</i> | -0,40 | 0,4436 | -5,07 | 0,0001 |
| TC105109 | MT012688 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,24 | 0,0280 | -5,06 | 0,0000 |
| TC100812 | MT002208 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,48 | 0,1445 | -4,90 | 0,0000 |
| TC101060 | MT014645 | <i>Gamma thionin/Defensin</i> | -0,75 | 0,0895 | -4,87 | 0,0001 |
| TC101124 | MT011611 | <i>Clavamate synthase-like protein</i> | -0,23 | 0,5222 | -4,36 | 0,0011 |
| TC102881 | MT009557 | <i>Plant lipid transfer/Seed storage/Trypsin-alpha amylase inhibitor</i> | -0,03 | 0,7078 | -4,11 | 0,0000 |
| TC106955 | MT009186 | <i>Serine carboxypeptidase II</i> | -1,27 | 0,0421 | -3,96 | 0,0000 |
| TC106954 | MT009185 | <i>MtSCP1</i> | -1,24 | 0,0263 | -3,77 | 0,0000 |
| TC100720 | MT009013 | <i>MtGST1</i> | -0,58 | 0,0091 | -3,69 | 0,0000 |
| TC112474 | MT015000 | <i>Kunitz inhibitor</i> | 0,79 | 0,0005 | -3,68 | 0,0000 |
| AW329171 ^A | MT007595 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,41 | 0,0083 | -3,47 | 0,0000 |
| TC106921 | MT002501 | <i>Nitrite transporter</i> | 0,10 | 0,6544 | -3,37 | 0,0000 |
| TC106691 | MT007159 | <i>Hypothetical protein</i> | -1,22 | 0,1388 | -3,35 | 0,0010 |
| TC108376 | MT002165 | <i>Serine carboxypeptidase II</i> | -0,40 | 0,4915 | -3,20 | 0,0001 |
| TC95018 | MT009704 | <i>MtGLP1</i> | -0,62 | 0,0274 | -2,95 | 0,0000 |
| TC104147 | MT004619 | <i>Double-stranded RNA-binding domain-containing protein</i> | 0,50 | 0,2383 | -2,68 | 0,0000 |
| TC101627 | MT001930 | <i>MtMYBCC</i> | 0,14 | 0,8111 | -2,62 | 0,0000 |
| TC106921 | MT009589 | <i>Nitrite transporter</i> | -0,05 | 0,8068 | -2,57 | 0,0000 |
| TC106582 | MT007032 | <i>Plant lipid transfer/Seed storage/Trypsin-alpha amylase inhibitor</i> | -0,65 | 0,5270 | -2,51 | 0,0092 |
| TC96854 | MT010383 | <i>Desacetoxyvindoline 4-hydroxylase</i> | -0,52 | 0,2277 | -2,43 | 0,0021 |
| TC106656 | MT000153 | <i>Beta glucosidase-like protein</i> | -0,32 | 0,2108 | -2,40 | 0,0027 |
| TC107321 | MT000669 | <i>Hypothetical protein</i> | -1,11 | 0,0218 | -2,28 | 0,0000 |
| TC101520 | MT008518 | <i>Leucoanthocyanidin dioxygenase</i> | -0,51 | 0,1429 | -2,21 | 0,0000 |
| TC106906 | MT000634 | <i>Auxin-regulated protein GH3</i> | -0,97 | 0,0013 | -2,11 | 0,0031 |
| TC108664 | MT014872 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,43 | 0,1638 | -2,09 | 0,0003 |
| AJ498718 ^A | MT000228 | <i>Taxane 13-alpha-hydroxylase</i> | -0,96 | 0,1601 | -1,99 | 0,0017 |
| TC103088 | MT003219 | <i>Taxane 10-beta-hydroxylase</i> | 0,07 | 0,9018 | -1,97 | 0,0061 |
| TC94347 | MT007030 | <i>Cationic peroxidase</i> | -0,94 | 0,3195 | -1,96 | 0,0009 |
| TC110699 | MT013567 | <i>53 kD symbiosome membrane nodulin</i> | -0,02 | 0,9404 | -1,94 | 0,0002 |
| TC95567 | MT003520 | <i>MtLEC7</i> | -0,26 | 0,4692 | -1,89 | 0,0075 |
| TC95651 | MT002771 | <i>MtDXS2</i> | -0,05 | 0,9017 | -1,78 | 0,0016 |

Tab. III-3 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | Annotation | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
|-----------------------|----------|--|------------------------|--------|------------------------|--------|
| | | | log ₂ -Wert | P | log ₂ -Wert | P |
| TC94345 | MT000207 | <i>Fructokinase</i> | -0,61 | 0,2582 | -1,78 | 0,0000 |
| TC96704 | MT015993 | <i>Late nodulin protein</i> | -1,18 | 0,2451 | -1,77 | 0,0385 |
| TC101075 | MT000961 | <i>Branched-chain amino acid aminotransferase</i> | -0,38 | 0,0674 | -1,69 | 0,0014 |
| TC100805 | MT015420 | <i>Kunitz inhibitor</i> | 0,52 | 0,1197 | -1,69 | 0,0111 |
| TC106728 | MT001054 | <i>Cycline-like F-box containing protein</i> | -0,21 | 0,4158 | -1,65 | 0,0000 |
| BF003720 ^A | MT006929 | <i>Histone H1/H5</i> | 0,08 | 0,7502 | -1,64 | 0,0000 |
| TC108853 | MT003012 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,20 | 0,7808 | -1,63 | 0,0059 |
| TC110192 | MT003230 | <i>Pentatricopeptide repeat-containing protein</i> | -0,14 | 0,5512 | -1,63 | 0,0003 |
| TC105254 | MT005171 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,97 | 0,0031 | -1,61 | 0,0005 |
| TC95933 | MT004574 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,11 | 0,7587 | -1,50 | 0,0000 |
| TC95491 | MT008228 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,14 | 0,7149 | -1,50 | 0,0135 |
| TC101133 | MT000873 | <i>Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit</i> | -0,50 | 0,0283 | -1,49 | 0,0005 |
| TC103981 | MT011784 | <i>Homeobox-leucine zipper</i> | -0,08 | 0,7832 | -1,47 | 0,0000 |
| TC104204 | MT004625 | <i>Ent-kaurene synthase A</i> | -0,67 | 0,0473 | -1,46 | 0,0090 |
| TC108966 | MT002011 | <i>Hydroxymyristoyl ACP dehydrase</i> | -0,40 | 0,1432 | -1,43 | 0,0000 |
| TC96249 | MT015692 | <i>Cytochrome P450</i> | -0,67 | 0,0328 | -1,43 | 0,0005 |
| TC102130 | MT015611 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,16 | 0,6234 | -1,42 | 0,0007 |
| TC96284 | MT008921 | <i>Hypothetical protein</i> | 0,27 | 0,3082 | -1,40 | 0,0022 |
| TC98373 | MT006073 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,18 | 0,3287 | -1,36 | 0,0000 |
| TC94453 | MT009707 | <i>MtPT4</i> | 0,27 | 0,3829 | -1,35 | 0,0003 |
| TC96557 | MT002953 | <i>Prolyl oligopeptidase</i> | -0,23 | 0,6596 | -1,34 | 0,0011 |
| TC105073 | MT013028 | <i>Proteinase inhibitor</i> | -0,36 | 0,1136 | -1,33 | 0,0000 |
| TC96500 | MT015668 | <i>MtBCP1</i> | -0,59 | 0,0057 | -1,32 | 0,0002 |
| TC109691 | MT002974 | <i>Pectate lyase</i> | -0,35 | 0,3632 | -1,31 | 0,0072 |
| TC100835 | MT000450 | <i>Blue copper-binding protein</i> | -0,51 | 0,2533 | -1,30 | 0,0447 |
| TC94050 | MT014213 | <i>Histone H2B</i> | -0,46 | 0,1169 | -1,29 | 0,0001 |
| TC95384 | MT002711 | <i>Cytochrome P450</i> | -0,25 | 0,5042 | -1,15 | 0,0001 |
| TC97926 | MT006551 | <i>Putative phyto-sulfokine LRR-type receptor kinase</i> | -0,30 | 0,3769 | -1,15 | 0,0005 |
| TC97582 | MT010125 | <i>Hypothetical protein</i> | -0,02 | 0,9391 | -1,09 | 0,0001 |
| TC103144 | MT003693 | <i>Gibberellin 20 oxidase 1</i> | -0,32 | 0,2358 | -1,09 | 0,0121 |
| TC100493 | MT000216 | <i>Plant lipid transfer/Seed storage/Trypsin-alpha amylase inhibitor</i> | -0,11 | 0,8675 | -1,06 | 0,0178 |
| TC95680 | MT008396 | <i>L-Ascorbate oxidase</i> | -1,67 | 0,0035 | -0,66 | 0,0595 |
| TC107875 | MT015537 | <i>Heavy metal transport/Detoxification protein</i> | -1,13 | 0,0015 | 0,00 | 0,9942 |
| TC112140 | MT006556 | <i>Nitrate/chlorate transporter</i> | 0,14 | 0,7755 | 1,23 | 0,0345 |
| TC95490 | MT001597 | <i>MtN21-like protein</i> | 2,90 | 0,0039 | 2,35 | 0,0000 |

^AGen-Bank ID

Zur Bestätigung der Ergebnisse der Microarray-Analysen wurden die in Tab. III-4 gelisteten AM-reprimierten bzw. AM-induzierten Gene ausgewählt und deren Transkriptmenge in jeweils vier mykorrhizierten EV- und srRNAi-Wurzeln eines unabhängigen Transformationsansatzes (Experiment IV, vgl. Anhang VII.3) mit Real-Time RT-PCR ermittelt. Unter den AM-induzierten Genen befanden sich *MtSCP1*, *MtGST1*, *MtGLP1*, *MtLEC7* und *MtBCP1* (Liu *et al.*, 2003; Wulf *et al.*, 2003; Doll *et al.*, 2003; Frenzel *et al.*,

2005; Hohnjec *et al.*, 2005). Weiterhin wurden in diese Untersuchungen die Bestimmung der *MtTUBB1*-Transkriptmenge (β -Tubulin, TC94919) einbezogen, denn eine *MtTUBB1*-Expression wurde ebenfalls in den arbuskulierten sowie deren benachbarter Zellen gezeigt (Manthey *et al.*, 2004). Auch *MtCHIT3-3* (*Chitinase*, TC11430) wurde als AM-induziertes Gen gewählt, da Bonanomi *et al.* (2001) eine spezifische Transkriptakkumulation des Gens in Zellen nachwies, die sich entwickelnde oder vollständig ausgebildete Arbuskel besaßen. Von diesem Gen war jedoch kein Oligonucleotid auf dem Microarray vertreten. Die berechneten $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Real-Time RT-PCR-Untersuchungen (vgl. II.2.3.5) konnten direkt mit den \log_2 -Werten der Microarray-Analysen verglichen werden (Tab. III-4).

Aus den Real-Time RT-PCR-Daten geht hervor, dass nur drei der ausgewählten AM-reprimierten Gene erhöhte Transkriptmengen in srRNAi-Wurzeln zeigten, die im Falle von TC100921 bzw. TC112317 auch einer mindestens zweifachen Erhöhung gegenüber den Transkriptmengen der EV-Wurzeln entsprachen (Tab. III-4). Signifikante Unterschiede in den Transkriptmengen von srRNAi- und EV-Wurzeln (P -Wert $\leq 0,05$) konnten aber bei beiden Genen nicht festgestellt werden.

Tab. III-4: Untersuchung von AM-reprimierten und AM-induzierten Genen mit veränderter Regulation in srRNAi-Wurzeln mittels Real-Time RT-PCR. Die Tabelle listet die \log_2 -Werte der Microarray-Analysen und die $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Real-Time RT-PCR-Untersuchungen. Letztere erfolgte bei jeweils vier mykorrhizierten EV- und srRNAi-Wurzeln von Experiment IV. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz der Mittelwerte getestet. Signifikante Werte sind hervorgehoben (P -Wert $\leq 0,05$). DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, srRNAi: Wurzeln mit starker *MtDXS2-1*-Suppression, EV: EV-Wurzeln.

| DFCI ID | Kategorie | Annotation | srRNAi/EV | |
|----------|---------------|--|--------------|------------------|
| | | | Microarray | Real-Time RT-PCR |
| TC100921 | AM-reprimiert | <i>Dehydrin-like protein</i> | 5,16 | 2,40 |
| TC94508 | AM-reprimiert | <i>Seed maturation protein LEA4</i> | 4,63 | 0,75 |
| TC112317 | AM-reprimiert | <i>Late embryogenesis abundant protein 2</i> | 4,08 | 1,77 |
| TC106842 | AM-reprimiert | <i>Chitinase</i> | 1,90 | -0,29 |
| TC95820 | AM-reprimiert | <i>MtSUCS2</i> | 1,03 | 0,17 |
| TC100835 | AM-induziert | <i>Blue copper-binding protein</i> | -1,30 | -2,61 |
| TC96500 | AM-induziert | <i>MtBCP1</i> | -1,32 | -6,24 |
| TC95567 | AM-induziert | <i>MtLEC7</i> | -1,89 | -6,71 |
| TC95018 | AM-induziert | <i>MtGLP1</i> | -2,95 | -7,47 |
| TC94919 | | <i>MtTUBB1</i> | -3,03 | -3,34 |
| TC112474 | AM-induziert | <i>Kunitz inhibitor</i> | -3,68 | -8,44 |
| TC100720 | AM-induziert | <i>MtGST1</i> | -3,69 | -7,37 |
| TC106954 | AM-induziert | <i>MtSCP1</i> | -3,77 | -4,88 |
| TC101060 | AM-induziert | <i>Gamma thionin/Defensin</i> | -4,87 | -8,12 |
| TC111430 | | <i>MtCHIT3-3</i> | - | -4,90 |

Eine Bestätigung der Beobachtung, dass AM-induzierte Gene reprimiert sind, wurde für die ausgewählten AM-induzierten Gene erhalten. Die berechneten $\Delta\Delta$ Ct-Werte der Real-Time RT-PCR-Daten ergaben für jeden ausgewählten Kandidaten eine signifikante, um mindestens zweifach reduzierte Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln (Tab. III-4). Oftmals wurde

sogar eine noch deutlichere Absenkung der Transkriptmenge dieser Gene nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung dafür ist die biologische Variabilität der Mykorrhizierung, die zwischen den unabhängigen Experimenten auftrat. Angedeutet wird dies anhand der *MtPT4*- und *GiBTUB1*-Transkriptmengen, die in den EV-Wurzeln für die Real-Time RT-PCR-Untersuchungen deutlich höher waren als in den EV-Wurzeln der Microarray-Analysen (vgl. Abb. III-12 und Abb. VII-2 im Anhang). Auch in den Studien von Hohnjec *et al.* (2005) zeigten die mittels Real-Time RT-PCR gemessenen Transkriptmengen klare Unterschiede zu den Microarray-Analysen und wurden als ein häufig auftretendes Phänomen, besonders bei spezifisch exprimierten Genen, beschrieben.

Die ermittelte *MtPT4*-Transkriptmenge in mrRNAi-Wurzeln aus Experiment I war gegenüber den EV- und srRNAi-Wurzeln tendenziell erhöht (vgl. Abb. III-12 B). Um zu untersuchen, ob dies auch für die Transkriptakkumulation von *MtBCP1*, *MtLEC7*, *MtGLP1*, *MtGST1*, *MtSCP1* und *MtCHIT3-3* zutrifft, wurden deren Transkriptmengen zusätzlich mit Real-Time RT-PCR bestimmt, da hiermit eine sensitivere Detektion als in den Microarray-Analysen zu erwarten war. Parallel dazu erfolgte auch in den mrRNAi-Wurzeln von Experiment II, die deutlich mehr Arbuskel in der Abbauphase aufwies (vgl. Abb. III-15), eine Analyse der Transkriptakkumulation dieser Gene. Die berechneten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Real-Time RT-PCR-Untersuchungen (vgl. II.2.3.5) wurden anschließend mit den Ergebnissen der Microarray-Analysen verglichen (Tab. III-5). Bei Verwendung der RNA-Proben des Microarrays wurden keine erhöhten Transkriptmengen von *MtBCP1*, *MtLEC7*, *MtGLP1*, *MtGST1* und *MtSCP1* ermittelt. Es wurde sogar eine signifikant reduzierte Transkriptakkumulation für *MtBCP1*, *MtLEC7* und *MtSCP1* in den Wurzeln der mrRNAi-Pflanzen detektiert (P -Wert $\leq 0,05$). Diese verminderte Transkriptakkumulation konnte aber trotz der Präsenz von mehr Arbuskeln in der Abbauphase in den mrRNAi-Wurzeln von Experiment II nicht nachgewiesen werden. Als einziges Gen zeigte *MtCHIT3-3* eine signifikant erhöhte Transkriptmenge in beiden Experimenten.

Tab. III-5: Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene in mrRNAi-Wurzeln. Die Tabelle listet die \log_2 -Werte der Microarray-Analysen und die berechneten $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Werte der Real-Time RT-PCR-Untersuchungen von den verwendeten RNA-Proben des Microarrays bzw. von jeweils sechs EV- und mrRNAi-Wurzeln aus Experiment II. Mit *oneway.test* oder Kruskal-Wallis-Test (aufgrund nicht normalverteilter Daten) wurde auf Signifikanz der Mittelwerte getestet. Signifikante Werte sind hervorgehoben (P -Wert $\leq 0,05$). DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, Oligo ID: Bezeichnung des 70 bp Oligonucleotids von *M. truncatula*, mrRNAi: Wurzeln mit moderater *MtDXS2-1*-Suppression, EV: EV-Wurzeln.

| DFCI ID | Oligo ID | Annotation | mrRNAi/EV | | |
|----------|----------|------------------|--------------|------------------|------------------|
| | | | Experiment I | | Experiment II |
| | | | Microarray | Real-Time RT-PCR | Real-Time RT-PCR |
| TC96500 | MT015668 | <i>MtBCP1</i> | -0,59 | -0,75 | 0,35 |
| TC95567 | MT003520 | <i>MtLEC7</i> | -0,26 | -0,73 | -0,32 |
| TC95018 | MT009704 | <i>MtGLP1</i> | -0,62 | -0,02 | -0,17 |
| TC100720 | MT009013 | <i>MtGST1</i> | -0,58 | -0,15 | -0,47 |
| TC106954 | MT009185 | <i>MtSCP1</i> | -1,24 | -0,94 | -0,13 |
| TC111430 | - | <i>MtCHIT3-3</i> | - | 2,11 | 1,94 |

III.3.5 Veränderung von Primärmetaboliten nach *MtDXS2*-Suppression

Da bekannt war, dass die Kolonisierung von Wurzeln mit AM-Pilzen auch zu Veränderungen des pflanzlichen Primärstoffwechsels führt (Lohse *et al.*, 2005; Schliemann *et al.*, 2008a) wurden eine Reihe zugehöriger polarer Metabolite in srRNAi-Wurzeln untersucht. Die Analysen wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. J. Kopka (MPI für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm, Deutschland) durchgeführt (vgl. II.2.6.3). Bei diesen Untersuchungen wurden mykorrhizierte srRNAi- und mrRNAi-Wurzeln aus Experiment I mit mykorrhizierten EV-Wurzeln verglichen. Zur Berücksichtigung der biologischen Variabilität wurden von jeder Variante sechs biologische Replikate analysiert. Nach Zugabe des internen Standards Ribitol sowie weiterer RI-Standards vor der chromatografischen Trennung (vgl. II.2.6.3) erfolgte die Normierung der erhaltenen Messwerte auf die Frischgewichte der Wurzelproben und den RI-Standard Pentadecan. Eine Normierung auf den internen Standard Ribitol war aufgrund der Verdopplung seiner relativen Intensitäten in den Proben der srRNAi-Wurzeln nicht möglich. Technische Ursachen für dessen Erhöhung konnten durch die Anfertigung eines Mastermix zur Extraktion der Metabolite (vgl. II.2.6.3), der randomisierten Zugabe zum Wurzelmaterial und der zufälligen Messreihenfolge der Proben ausgeschlossen werden. Über einen möglichen Einfluss von endogen gebildetem Ribitol kann bis zur Wiederholung der Messungen lediglich spekuliert werden.

Tab. III-6 listet die annotierten Metabolite auf, deren relative Intensitäten als signifikant verändert in mrRNAi- oder srRNAi-Wurzeln identifiziert wurden. Darunter fielen jene Metabolite, deren relative Intensitäten gegenüber denen der EV-Wurzeln signifikant mindestens 1,75-fach erhöht oder erniedrigt waren ($P\text{-Wert} \leq 0,05$; $0,57 \geq \text{ratio} \geq 1,75$; weitere Details vgl. II.2.6.3). Diese wurden, mit Ausnahme der Aminosäure Valin, lediglich in srRNAi-Wurzeln identifiziert. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um 14 proteinogene Aminosäuren und einige Monosaccharide, z.B. Glucose und Mannose, die stärkere Intensitäten als in EV-Wurzeln aufwiesen. Der bereits kolorimetrisch gemessene, signifikant erhöhte Phosphatgehalt der srRNAi-Wurzeln (vgl. III.3.3) konnte mit den Messungen bestätigt werden.

Die identifizierten Metabolite liefern letztendlich jedoch nur erste Hinweise auf eine Veränderung des Primärmetabolismus in srRNAi-Wurzeln, die aufgrund des bereits genannten Normierungsproblems mit erneuten Messungen überprüft werden müssen. In diese Untersuchungen sollten ebenfalls nicht mykorrhizierte srRNAi-Wurzeln eingeschlossen werden, um zu klären, ob die Veränderungen der polaren Metabolite auf die veränderte AM-Symbiose zurückzuführen sind oder aus den stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen resultieren.

Tab. III-6: Signifikant veränderte polare Primärmetabolite in RNAi-Wurzeln. Aufgelistet sind Metabolite mit signifikant verändertem Anteil ihrer relativen Intensitäten (*ratio*) in mrRNA- und srRNAi-Wurzeln im Vergleich zu den EV-Wurzeln (mrRNAi/EV, srRNAi/EV). Die Bestimmung der Intensitäten erfolgte mittels GC-TOF-MS-Untersuchungen in jeweils sechs mykorrhizierten EV-, mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln aus Experiment I. Signifikante Unterschiede wurden mit Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-HSD-Test ermittelt. *Ratios*, die aus signifikant verschiedenen Mittelwerten berechnet und mindestens 1,75-fach erhöht bzw. erniedrigt (entspricht $\leq 0,57$) waren, sind hervorgehoben. KEGG-ID: Bezeichnung des Metaboliten in der KEGG Datenbank, mrRNAi: Wurzeln mit moderater *MtDXS2-1*-Suppression, srRNAi: Wurzeln mit starker *MtDXS2-1*-Suppression, EV: EV-Wurzeln, *P*: Signifikanzniveau (*P*-Wert).

| Name | Summenformel | KEGG-ID | Relative Intensität der Metabolite | | | |
|---------------------------|---|---------|------------------------------------|----------|--------------|----------|
| | | | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
| | | | <i>ratio</i> | <i>P</i> | <i>ratio</i> | <i>P</i> |
| Organische Säuren | | | | | | |
| Aconitsäure, (Z)- | C ₆ H ₆ O ₆ | C00417 | 0,84 | 0,4709 | 0,44 | 0,0023 |
| Gluconsäure | C ₆ H ₁₂ O ₇ | C00257 | 1,47 | 0,5285 | 3,25 | 0,0003 |
| Malonsäure | C ₃ H ₄ O ₄ | C00383 | 0,82 | 0,4862 | 0,37 | 0,0023 |
| Alkohole (Polyole) | | | | | | |
| Arabitol | C ₅ H ₁₂ O ₅ | C01904 | 2,11 | 0,3987 | 4,17 | 0,0046 |
| Monosaccharide | | | | | | |
| Glucose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | C00031 | 1,65 | 0,2953 | 2,47 | 0,0086 |
| Mannose | C ₆ H ₁₂ O ₆ | C00936 | 1,53 | 0,3290 | 2,77 | 0,0005 |
| Ribose | C ₅ H ₁₀ O ₅ | C08353 | 1,99 | 0,6141 | 4,60 | 0,0090 |
| Xylose | C ₅ H ₁₀ O ₅ | C00181 | 1,37 | 0,2120 | 1,94 | 0,0013 |
| Disaccharide | | | | | | |
| Trehalose | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | C01083 | 1,51 | 0,3177 | 2,93 | 0,0001 |
| Zuckerkonjugate | | | | | | |
| Galactinol | C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ | C01235 | 2,89 | 0,5727 | 16,97 | 0,0000 |
| Galactosylglycerol | C ₉ H ₁₈ O ₈ | C05401 | 0,81 | 0,4107 | 0,40 | 0,0023 |
| Phosphate | | | | | | |
| Glucose-6-phosphat | C ₆ H ₁₃ O ₉ P | C00092 | 1,00 | 1,0000 | 2,00 | 0,0419 |
| Phosphorsäure | H ₃ O ₄ P | C00009 | 1,58 | 0,3551 | 2,36 | 0,0124 |
| Aminosäuren | | | | | | |
| Alanin, 3-cyano- | C ₄ H ₆ N ₂ O ₂ | C02512 | 1,44 | 0,9627 | 7,26 | 0,0051 |
| β-Alanin | C ₃ H ₇ NO ₂ | C00099 | 1,86 | 0,2711 | 4,35 | 0,0000 |
| γ-Aminobuttersäure (GABA) | C ₄ H ₉ NO ₂ | C00334 | 1,16 | 0,7652 | 2,07 | 0,0009 |
| Asparagin | C ₄ H ₈ N ₂ O ₃ | C00152 | 1,64 | 0,8122 | 4,35 | 0,0143 |
| Asparaginsäure | C ₄ H ₇ NO ₄ | C00049 | 3,41 | 0,9109 | 30,95 | 0,0003 |
| Glutaminsäure | C ₅ H ₉ NO ₄ | C00025 | 1,88 | 0,9294 | 9,39 | 0,0091 |
| Glycin | C ₂ H ₅ NO ₂ | C00037 | 1,21 | 0,7062 | 2,68 | 0,0000 |
| Isoleucin | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | C00407 | 2,46 | 0,1363 | 6,28 | 0,0000 |
| Leucin | C ₆ H ₁₃ NO ₂ | C00123 | 3,30 | 0,0614 | 8,11 | 0,0000 |
| Lysin | C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ | C00047 | 1,93 | 0,3508 | 3,57 | 0,0034 |
| Phenylalanin | C ₉ H ₁₁ NO ₂ | C00079 | 1,91 | 0,0761 | 3,97 | 0,0000 |
| Prolin | C ₅ H ₉ NO ₂ | C00148 | 1,35 | 0,9559 | 13,16 | 0,0000 |
| Serin | C ₃ H ₇ NO ₃ | C00065 | 2,32 | 0,8601 | 22,65 | 0,0000 |
| Threonin | C ₄ H ₉ NO ₃ | C00188 | 1,44 | 0,1140 | 2,06 | 0,0003 |
| Tryptophan | C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂ | C00078 | 1,57 | 0,6771 | 5,89 | 0,0000 |
| Tyrosin | C ₉ H ₁₁ NO ₃ | C00082 | 2,34 | 0,1252 | 5,04 | 0,0000 |
| Valin | C ₅ H ₁₁ NO ₂ | C00183 | 1,95 | 0,0348 | 3,64 | 0,0000 |

Tab. III-6 fortgesetzt

| Name | Summen- formel | KEGG- ID | Relative Intensität der Metabolite | | | |
|--|---|-------------|------------------------------------|----------|--------------|----------|
| | | | mrRNAi/EV | | srRNAi/EV | |
| | | | <i>ratio</i> | <i>P</i> | <i>ratio</i> | <i>P</i> |
| Aminosäuren (Lactam Lactone) | | | | | | |
| Pyroglutaminsäure (Glutamin, Glutaminsäure) | C ₅ H ₇ NO ₃ | C02238 | 1,18 | 0,5790 | 2,12 | 0,0000 |

III.4 Suppression von *MtCCD1* und deren Auswirkungen auf die Apocarotinoidakkumulation und die AM-Symbiose

Die Suppression von *MtDXS2* in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula* resultierte bei allen durchgeführten Experimenten in einer signifikanten Reduktion der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate. Eine Auswirkung auf die Expression arbuskelrelevanter, pflanzlicher Gene konnte jedoch nur in Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen beobachtet werden. Die aufgeführten Ergebnisse belegen eindeutig eine Funktion des DXS2-abhängigen MEP-Synthesewegs in der AM-Symbiose (vgl. III.3). Welche Rolle dabei den Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten zukommt, bleibt aber ungewiss. Da DXS2 einen sehr frühen Schritt des MEP-Synthesewegs katalysiert, könnte auch die Bildung weiterer, für die AM-Symbiose relevanter Isoprenoidverbindungen beeinflusst sein.

Die Biosynthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate wird über ein gemeinsames C₄₀-Vorläufercarotinoid vermutet, das durch eine carotinoidspaltende Dioxygenase (CCD) oxidativ gespalten wird. Zur gezielten Untersuchung der Bedeutung dieser Apocarotinoide für die AM-Symbiose wurde eine *MtCCD1* als Zielgen für einen weiteren RNAi-Ansatz gewählt. Für die CCD1 aus *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass sie *in vitro* die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen von Carotinoiden katalysiert. Diese Reaktion führt zur Entstehung eines C₁₄-Dialdehyds und zwei C₁₃-Ketonen (Schwartz *et al.*, 2001), die *in vivo* zu Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten metabolisiert werden können.

III.4.1 Aktivität der *MtCCD1* *in vitro*

Ein putativer *MtCCD1*-cDNA-Klon aus mykorrhizierten Wurzeln, dessen Nucleotidsequenz identisch zum TC100912 des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8 ist, lag für diese Arbeit bereits vor. Die Sequenzidentität lieferte einen ersten Hinweis, dass dieser cDNA-Klon die vollständig codierende Sequenz einer *CCD1* aus Wurzeln von *M. truncatula* repräsentiert. Der ORF (*open reading frame*) codiert ein Protein von 540 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 60,9 kDa (nach http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html). Anhand von Datenbankanalysen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) wurden Identitäten in der Aminosäuresequenz zu CCD1 aus *P. vulgaris* (87%), *A. thaliana* (80%) und *Z. mays*

(76%) ermittelt, die ein weiteres Indiz für eine CCD1 aus mykorrhizierten Wurzeln darstellten. Da bekannt war, dass die bislang identifizierten CCD1-Proteine im Cytosol lokalisiert sind (Simkin *et al.*, 2004a; Bouvier *et al.*, 2005; Auldridge *et al.*, 2006a), liegt die Vermutung nahe, dass MtCCD1 keine Signalsequenz aufweist. Die Überprüfung dieser Annahme erfolgte unter Verwendung des Programms SignalP3.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>). Hierbei wurde keine Signalsequenz des Proteins identifiziert.

Inwieweit mit dem vorliegenden cDNA-Klon die Expression von funktionalem MtCCD1-Protein möglich ist, wurde *in vitro* mit carotinoidakkumulierenden *E. coli*-Stämmen getestet (Cunningham *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 1996). Die Expression des rekombinanten Proteins unter Verwendung dieser Stämme stellt hierbei eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung der Bildung von funktionalem Protein dar, die bereits bei der Charakterisierung vieler orthologer CCD1-Proteine Anwendung fand (Schwartz *et al.*, 2001; Simkin *et al.*, 2004a; Simkin *et al.*, 2004b; Mathieu *et al.*, 2005; Ibdah *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008).

Für die Untersuchung wurde die codierende Sequenz von *MtCCD1* unter Verwendung spezifischer Primer aus dem Klonierungsvektor amplifiziert (vgl. II.2.1.3). Um auszuschließen, dass ein C-terminaler 6x Histidin-*tag* (His-*tag*) die Funktionalität des heterolog exprimierten Proteins beeinflusst, wurde die erhaltene Sequenz sowohl ohne als auch mit dem C-terminalen His-*tag* in den Expressionsvektor pET-28a(+) kloniert. Die heterologe Genexpression erfolgte im *E. coli* BL21(D3)-Stamm, der zusätzlich das Plasmid pAC-BETA bzw. pAC-ZEAX enthielt (vgl. II.2.7.1). Als Negativkontrolle wurde der Vektor pET-28a(+) ohne codierende cDNA-Sequenz verwendet. Zur Überprüfung der heterologen Genexpression von *MtCCD1* wurde das Gesamtprotein von nicht induzierten und induzierten Suspensionsschüttelkulturen (vgl. II.1.3) im SDS-PAA-Gel getrennt (vgl. II.2.7.2). Bei induzierten Suspensionsschüttelkulturen, die die codierende Sequenz mit oder ohne C-terminalen His-*tag* im Expressionsvektor trugen, wurden Proteinbanden mit einer Größe von ca. 60 kDa im Coomassie-gefärbten SDS-PAA-Gel detektiert (Abb. III-17 A und B). Aufgrund des abgeleiteten Molekulargewichts der MtCCD1 von 60,9 kDa wurde auf eine erfolgreiche Expression des rekombinanten Proteins geschlossen.

Der Nachweis der Enzymaktivität des rekombinanten Proteins erfolgte wie unter Punkt II.2.7.3 beschrieben. Die *E. coli* BL21(D3)-Zellen mit den Vektoren pAC-BETA oder pAC-ZEAX, die codierende Sequenzen von Enzymen der Carotinoidbiosynthese aus *E. herbicola* tragen, akkumulierten β -Carotin bzw. Zeaxanthin. Dies resultierte in einer deutlichen Gelbfärbung der Bakterienzellen. Eine Färbung trat ebenfalls in BL21(D3)-Zellen auf, die mit dem pET-28a(+)-Expressionsvektor ohne die codierende Sequenz von *MtCCD1* transformiert wurden (Abb. III-17 D und E). Dahingegen führte die heterologe Genexpression von *MtCCD1* in diesen Zellen zum Verlust der charakteristischen Gelbfärbung (Abb. III-17 D und E). Dies ist auf die Umsetzung von β -Carotin bzw. Zeaxanthin in farblose Apocarotinoidverbindungen zurückzuführen. Somit konnten die Funktionalität des

rekombinanten MtCCD1-Proteins und β -Carotin bzw. Zeaxanthin als dessen Substrate anhand dieser Experimente nachgewiesen werden.

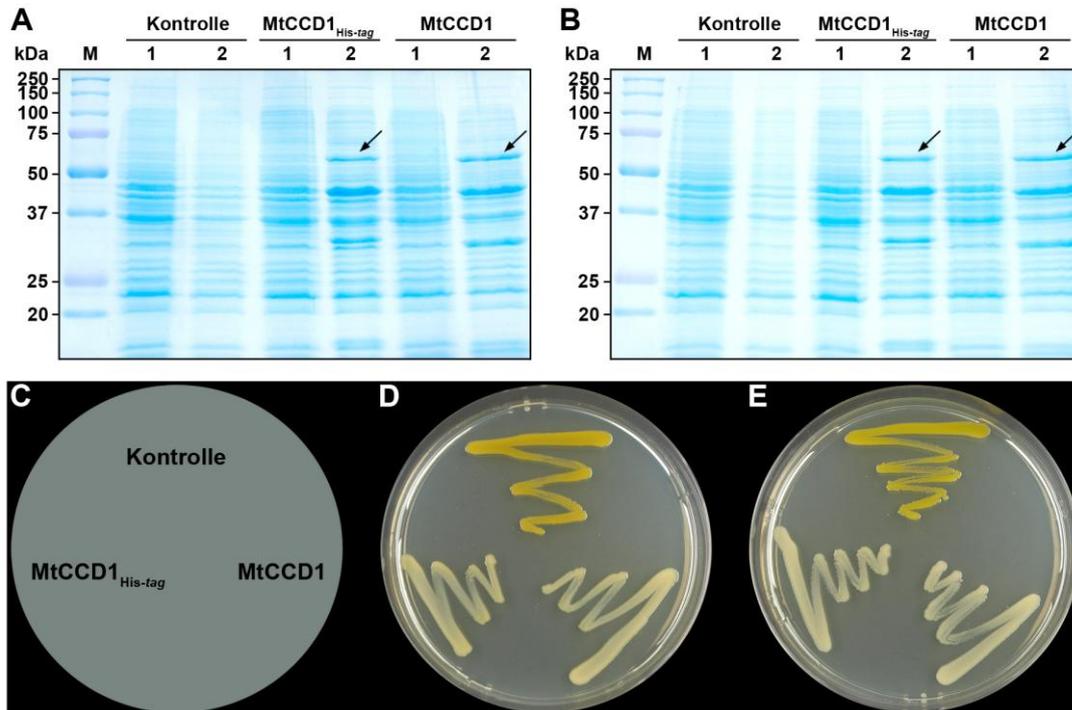


Abb. III-17: Heterologe Expression von *MtCCD1* in *E. coli* und Nachweis der Enzymaktivität *in vitro*. **A, B:** Generierung von rekombinantem MtCCD1-Protein durch pET-28a-gesteuerte Expression im Hintergrund von *E. coli*-Stämmen mit (A) β -Carotin- bzw. (B) Zeaxanthinproduktion. Die Trennung rekombinanter Proteine aus 100 μ l Suspensionsschüttelkultur erfolgte im SDS-PAA-Gel (12%). Die CCD1-Proteinbanden mit einer Größe von ca. 60 kDa wurden markiert (Pfeile). M: Molekulargewichtsmarker, 1: nicht induziert, 2: induziert. **C-E:** Enzymaktivitätsnachweis rekombinanter MtCCD1 durch Entfärbung carotinoidakkumulierender *E. coli*-Stämme. **C:** Anordnung der Konstrukte. **D, E:** LB-Agarplatten mit (D) β -Carotin- oder (E) Zeaxanthinproduzierenden Stämmen. Kontrolle: Expressionsvektor ohne codierende Sequenz von *MtCCD1*, MtCCD1_{His-tag}: Expressionsvektor mit codierender Sequenz und C-terminalem His-tag, MtCCD1: Expressionsvektor mit codierender Sequenz ohne C-terminalem His-tag.

III.4.2 Erzeugung chimärer Pflanzen mit reduzierten *MtCCD1*-Transkriptmengen

Zur Reduktion der *MtCCD1*-Transkriptmenge wurde ein RNAi-Konstrukt aus einem 335 bp-Fragment, das Teile des 3'-codierenden und 3'-nicht translatierten Sequenzbereichs der cDNA umfasst, analog den *MtDXS2*-RNAi-Konstrukten, hergestellt. Es wurde in den binären Vektor pRedRoot überführt und zur Agrobakterium-vermittelten Wurzeltransformation für die Erzeugung chimärer RNAi-Pflanzen mit einer wurzelspezifischen *MtCCD1*-Suppression verwendet. Gleichzeitig erfolgte die Generierung von chimären EV-Pflanzen (vgl. III.2.1).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte lediglich ein Transformationsansatz durchgeführt werden. Dabei wurden mykorrhizierte und nicht mykorrhizierte EV- und RNAi-Pflanzen sieben und neun Wochen mit *G. intraradices* im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert (vgl. II.2.4.1).

Die Identifikation von transgenen Wurzelsystemen der chimären Pflanzen und deren Teilung für die analytischen Untersuchungen erfolgte analog zu den Experimenten mit den *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen (vgl. III.2.1).

Auffallend bei der Evaluierung der Wurzelsysteme war die deutliche Gelborangefärbung des mittleren Bereichs mykorrhizierter RNAi-Wurzeln (Abb. III-18). Weitere phänotypische Unterschiede zwischen nicht mykorrhizierten oder mykorrhizierten EV- und RNAi-Pflanzen konnten bei den hier verwendeten Kultivierungszeiträumen nicht beobachtet werden.



Abb. III-18: Gelborangefärbung mykorrhizierter Wurzelsysteme chimärer *MtCCD1*-RNAi-Pflanzen. Abgebildet sind repräsentative Wurzelsysteme einer EV- und einer RNAi-Pflanze. Die Pflanzen wurden mit dem AM-Pilz *G. intraradices* sieben Wochen im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert. EV: EV-Wurzel, RNAi: RNAi-Wurzel mit reduzierter *MtCCD1*-Transkriptmenge.

Da mit der Suppression von *MtCCD1* in erster Linie die Reduktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate erreicht werden sollte, erfolgte die Bestimmung der *MtCCD1*-Transkriptmenge lediglich in den mykorrhizierten Wurzeln der erzeugten chimären Pflanzen. Hierfür wurden Real-Time RT-PCR-Untersuchungen von EV- und RNAi-Wurzeln beider Kultivierungszeiträume (7 wai und 9 wai, *weeks after inoculation*) durchgeführt. Die Mittelwerte der gemessenen *MtCCD1*-Transkriptmengen sind in Abb. III-19 dargestellt. Nach beiden Kultivierungszeiten konnte in RNAi-Wurzeln eine signifikante Reduktion der Transkriptmenge auf durchschnittlich 8% des Mittelwerts der EV-Wurzeln (100%) nachgewiesen werden.

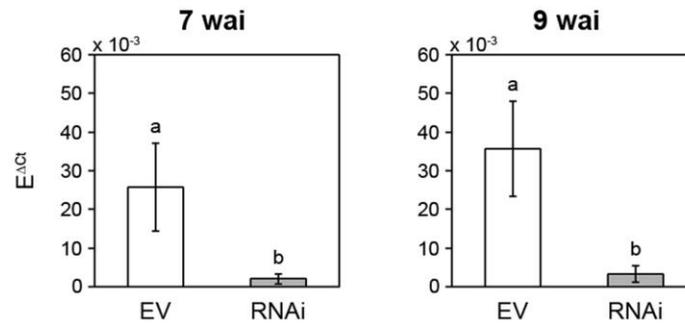


Abb. III-19: *MtCCDI*-Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln chimärer EV- und RNAi-Pflanzen. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus acht EV-Wurzeln (EV) bzw. acht RNAi-Wurzeln (RNAi) des 7 wai-Kultivierungszeitraums und aus neun EV-Wurzeln bzw. 13 RNAi-Wurzeln des 9 wai-Kultivierungszeitraums berechnet. Mit *oneway.test* (7 wai) oder Kruskal-Wallis-Test (9 wai, aufgrund nicht normalverteilter Daten) wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. E^{Act}: Relative *MtCCDI*-Transkriptmenge bezogen auf EF 1a, wai: weeks after inoculation.

III.4.3 Untersuchung der AM-induzierten Apocarotinoide in Wurzeln mit reduzierten *MtCCDI*-Transkriptmengen

Die beobachtete Gelborangefärbung der mykorrhizierten RNAi-Wurzeln stellte einen interessanten Befund dar, da eine Gelbfärbung von mykorrhizierter Wurzeln vieler Pflanzen ein weitverbreitetes Phänomen ist und bisher auf das Vorkommen von Mycorradicinderivaten zurückgeführt wurde (Klingner *et al.*, 1995a). Verläuft die Synthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate, wie angenommen, über die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen des C₄₀-Vorläufercarotinoids, sollte die *MtCCDI*-Suppression zur Akkumulation dieser Carotinoidverbindung führen. Ob die Gelborangefärbung der mykorrhizierten RNAi-Wurzeln darauf oder auf veränderte Apocarotinoidgehalte zurückzuführen war, sollte durch HPLC-Analysen geklärt werden.

III.4.3.1 Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate

Das Ausgangsmaterial für die Untersuchungen der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate waren die mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln, die bereits für die Bestimmung der *MtCCDI*-Transkriptmenge verwendet wurden (vgl. III.4.2). Die Verbindungen wurden analog dem *MtDXS2*-RNAi-Ansatz aus den Wurzeln extrahiert (vgl. II.2.6.1), mittels HPLC getrennt, anhand ihrer charakteristischen UV-Spektren identifiziert und anschließend mit externen Standards quantifiziert (vgl. II.2.6.2).

In allen RNAi-Wurzeln konnten signifikant geringere Mengen an Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten als in den EV-Wurzeln detektiert werden (Abb. III-20 A und B). Auffallend hierbei war die drastische Verringerung der Mycorradicinderivate, die als hydrolytisch freigesetztes Mycorradicin gemessen wurden. Diese belief sich auf 6% (7wai) bzw. 3% (9wai) der Gehalte der EV-Wurzeln. Im Gegensatz dazu waren die Mengen der Cyclohexenonderivate lediglich auf 30% (7wai) bzw. 47% (9wai) reduziert (Abb. III-20 B). Anhand der stark reduzierten Mycorradicingehalte konnten somit diese Verbindungen als

maßgebliche farbgebende Komponente in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln ausgeschlossen werden.

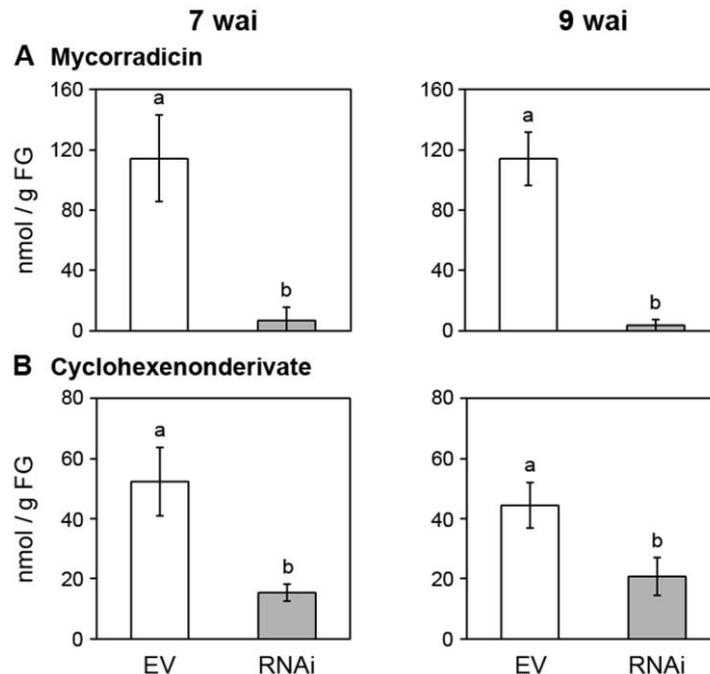


Abb. III-20: Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln mit reduzierter *MtCCDI*-Transkriptakkumulation. Mittelwerte und Standardabweichungen der (A) Mycorradicin- und (B) Cyclohexenonderivatgehalte wurden von acht EV-Wurzeln (EV) bzw. acht RNAi-Wurzeln (RNAi) des 7 wai-Kultivierungszeitraums und von neun EV-Wurzeln bzw. 13 RNAi-Wurzeln des 9 wai-Kultivierungszeitraums berechnet. Mit *oneway.test* (Cyclohexenonderivate) oder Kruskal-Wallis-Test (Mycorradicin, aufgrund der nicht normalverteilten Daten) wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Quantifizierung des Mycorradicins erfolgte anhand des externen Standards Mycorradicindimethylester und die Quantifizierung der Cyclohexenonderivate mit dem externen Standard ABA. wai: *weeks after inoculation*.

Die molaren Verhältnisse von Cyclohexenon- und Mycorradicinderivate sind in Tab. III-7 dargestellt und zeigten ebenfalls, dass sich die Verhältnisse in RNAi-Wurzeln gegenüber den EV-Wurzeln sehr stark verändert hatten. Während in EV-Wurzeln die doppelte Menge an Mycorradicinderivaten im Vergleich zu den Cyclohexenonderivaten detektiert wurde, akkumulierten in RNAi-Wurzeln zwei- bzw. sechsmal mehr Cyclohexenon- als Mycorradicinderivate. Darüber hinaus verdeutlichten die berechneten Verhältnisse, dass in mykorrhizierten *hairy roots* der EV-Pflanzen nicht das durch die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen des C_{40} -Vorläufercarotinoids vermutete 2:1 Verhältnis zwischen Cyclohexenon- und Mycorradicinderivaten auftrat. In diesen Wurzeln lag ein 0,5:1 bzw. 0,4:1 Verhältnis vor (Tab. III-7).

Tab. III-7: Molares Verhältnis von Cyclohexenon- und Mycorradicinderivaten in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln mit reduzierter *MtCCD1*-Transkriptakkumulation. Die Berechnung erfolgte mit den Mittelwerten der gemessenen Gehalte von analysierten Pflanzen beider Kultivierungszeiträume (7 wai und 9 wai). wai: *weeks after inoculation*.

| | Cyclohexenon:Mycorradicin | |
|--------------|---------------------------|-------|
| | 7 wai | 9 wai |
| EV-Wurzeln | 0,5:1 | 0,4:1 |
| RNAi-Wurzeln | 2,3:1 | 6,0:1 |

III.4.3.2 Identifikation eines C₂₇-Apocarotinoids

Die drastische Reduktion der Mycorradicinderivate, einhergehend mit einer Abnahme der Cyclohexenonderivate auf nur ca. 50% in RNAi-Wurzeln, legte die Vermutung nahe, dass nicht das postulierte C₄₀-Vorläufercarotinoid akkumulierte, sondern C₂₇-Apocarotinoid-derivate, die durch Abspaltung nur eines C₁₃-Ketons aus der C₄₀-Vorläuferverbindung entstanden sind.

Für deren Nachweis wurden Methanolextrakte von mykorrhizierten und nicht mykorrhizierten EV- und RNAi-Wurzeln des 9 wai-Kultivierungszeitraums angefertigt (vgl. II.2.6.1) und die Komponenten mittels HPLC getrennt (vgl. II.2.6.2). Zwei repräsentative Chromatogramme dieser Analysen sind als *overlay* in Abb. III-21 dargestellt. Aus dieser Abbildung geht hervor, dass in Methanolextrakten mykorrhizierter RNAi-Wurzeln sieben Verbindungen detektiert wurden, die sowohl in mykorrhizierten EV-Wurzeln (Abb. III-21 A) als auch in nicht mykorrhizierten RNAi-Wurzeln nicht auftraten (Abb. III-21 B). Die Komponenten wiesen Absorptionsmaxima zwischen 418 und 445 nm auf (Tab. III-8). Diese sind typisch für C₂₇-Apocarotinoide (Cooper *et al.*, 2003). Die Analysen weiterer RNAi-Wurzelsysteme zeigten ein ähnliches Muster akkumulierter C₂₇-Apocarotinoidderivate, jedoch variable Intensitäten einzelner Absorptionssignale (Abb. III-21 B), die mit den unterschiedlichen *MtCCD1*-Transkriptmengen der analysierten Einzelpflanzen korrelierten.

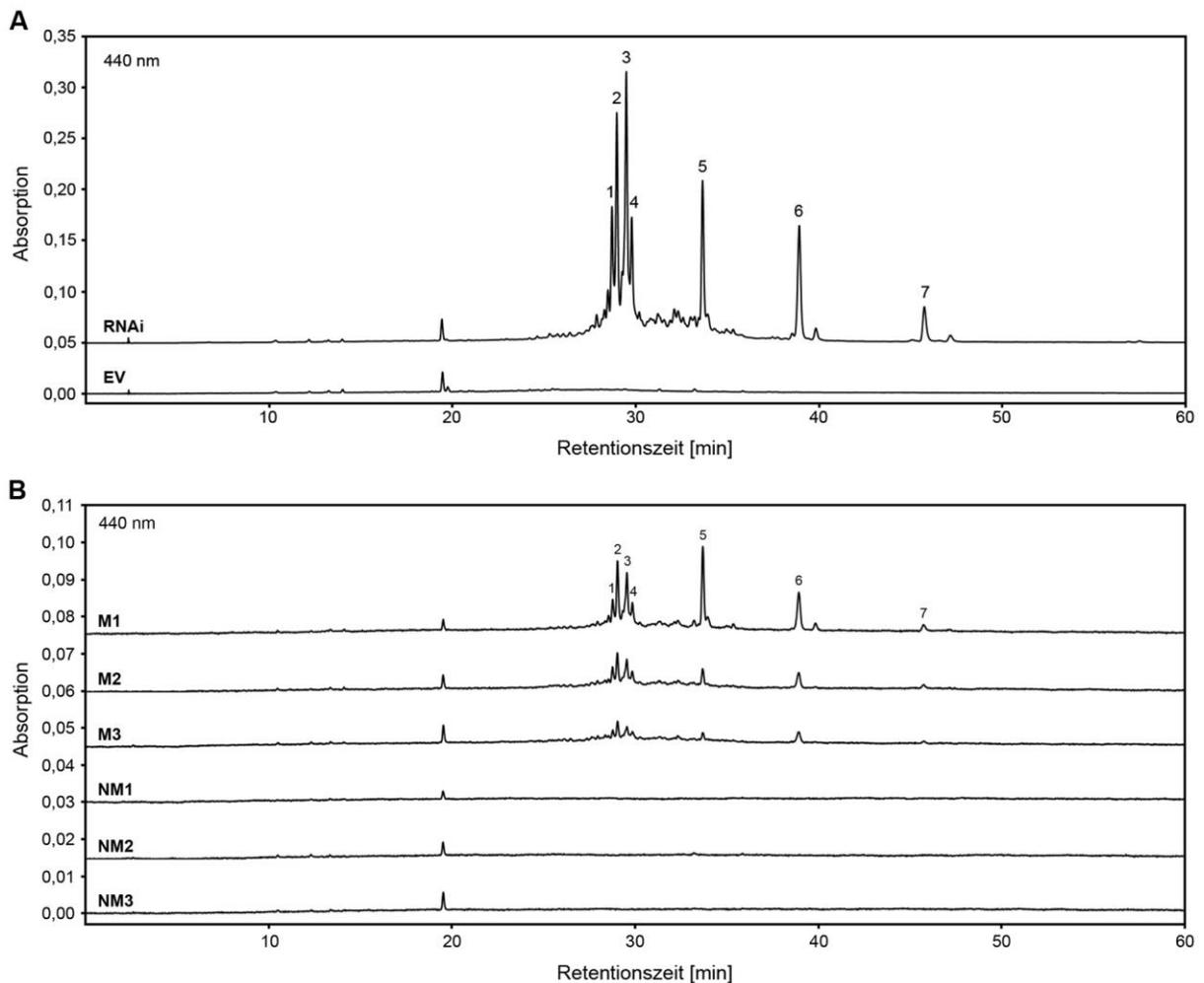


Abb. III-21: RP-HPLC-Chromatogramme von Wurzelextrakten chimärer Pflanzen mit *MtCCD1*-Suppression. **A:** *Overlay* repräsentativer Chromatogramme methanolischer Extrakte einer EV-Wurzel (EV) und einer RNAi-Wurzel (RNAi). **B:** *Overlay* von Chromatogrammen aus methanolischen Extrakten jeweils drei mykorrhizierter (M) und nicht mykorrhizierter (NM) RNAi-Wurzeln. Die Detektion erfolgte bei 440 nm. Die Bezeichnungen an den einzelnen Absorptionssignalen entsprechen den Nummern der Verbindungen in Tab. III-8.

Tab. III-8: Retentionszeiten und Absorptionsmaxima der detektierten Verbindungen in methanolischen Wurzelextrakten von RNAi-Pflanzen.

| Komponente | Retentionszeit [min] | λ_{\max} [nm] |
|------------|----------------------|-----------------------|
| 1 | 28,8 | 445 |
| 2 | 29,0 | 434 |
| 3 | 29,5 | 428 |
| 4 | 29,8 | 429 |
| 5 | 33,7 | 433 |
| 6 | 38,9 | 418, 440 |
| 7 | 45,8 | 418, 438 |

Analog zur Bestimmung der Mycorradicinderivate wurden die methanolischen Wurzelextrakte der EV- und RNAi-Wurzeln mit KOH versetzt, um eventuell vorkommende Esterbindungen der detektierten Komponenten zu spalten. Nach chromatografischer Trennung mittels HPLC (vgl. II.2.6.2) konnten in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln bei einer

Retentionszeit von 19,1 und 21,8 min zwei Verbindungen detektiert werden (Abb. III-22 A), die Absorptionsmaxima bei 428 und 434 nm zeigten (Abb. III-22 B). Sie wurden als Apo1 bzw. Apo2 bezeichnet und mittels semi-präparativer HPLC aus den Wurzelextrakten isoliert (vgl. II.2.6.2).

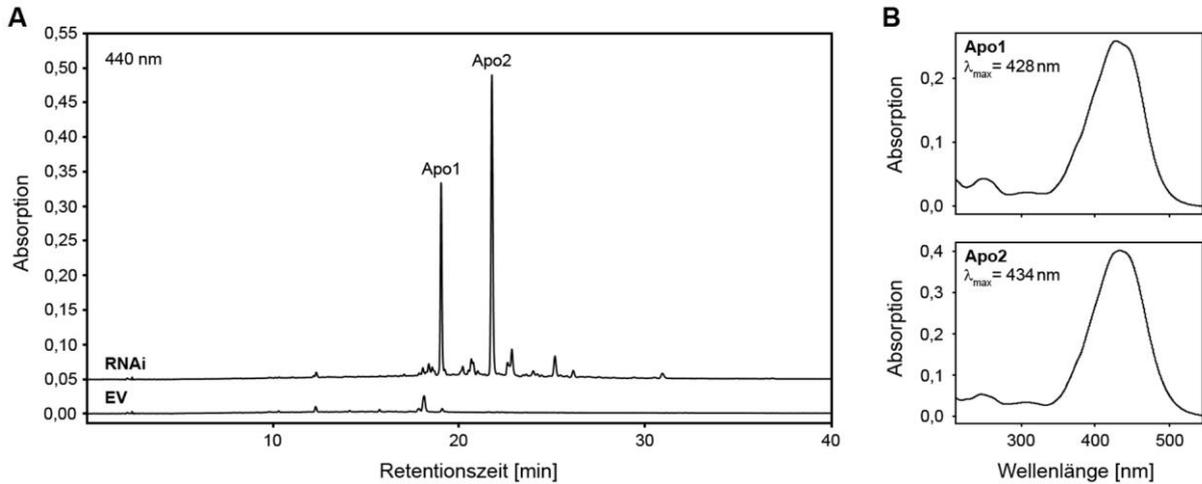


Abb. III-22: RP-HPLC-Chromatogramme von hydrolysierten Extrakten mykorrhizierter Wurzeln chimärer Pflanzen mit *MtCCD1*-Suppression. **A:** Overlay repräsentativer Chromatogramme methanolischer Extrakte einer EV-Wurzel (EV) und einer RNAi-Wurzel (RNAi), die zur Hydrolyse der Esterbindungen mit KOH versetzt wurden. Die Detektion erfolgte bei 440 nm. Die erhaltenen Absorptionssignale wurden mit Apo1 und Apo2 bezeichnet. **B:** UV-VIS-Absorptionsspektren der Verbindungen Apo1 und Apo2. λ_{max} : Absorptionsmaximum.

Um weitere Hinweise zu erhalten, dass es sich bei den Verbindungen Apo1 und Apo2 um C_{27} -Apocarotinoidderivate handelte, wurden massenspektrometrische Analysen von Dr. J. Schmidt (IPB, Halle, Deutschland) durchgeführt (vgl. II.2.6.5).

Die Identifikation der Komponente Apo1, die ein für C_{27} -Apocarotinoide typisches Absorptionsmaximum zeigte, misslang aufgrund der starken Kontamination mit einem Saponin, das anhand seiner massenspektrometrischen Fragmentierung als Bayogenindihexosid identifiziert werden konnte (Huhman *et al.*, 2005; Schliemann *et al.*, 2008a). Die Komponente Apo2 konnte jedoch saponinfrei erhalten und charakterisiert werden.

Verbindung Apo2 eluierte in der HPLC-MS bei einer Retentionszeit von 19,7 min und ließ sich im eingestellten Spektralbereich (400 - 450 nm) detektieren (Abb. III-23 A und B). Das ESI-FTICR-Massenspektrum zeigte ein $[M+H]^+$ -Ion bei m/z 733,37944, das einer Elementarzusammensetzung von $C_{39}H_{57}O_{13}$ entsprach (Abweichung +0,1 ppm). Das mit einem „Triple-Quadrupol“-Massenspektrometer erhaltene 15 eV-CID-Massenspektrum von m/z 733 wies einen konsekutiven Verlust von zwei Hexose-Einheiten ($\Delta m = 162$) auf (Abb. III-23 C). Die entsprechenden Ionen sind im Spektrum bei m/z 571 ($[M+H-162]^+$) und m/z 409 ($[M+H-2 \times 162]^+$, Abb. III-23 C, D und Abb. III-24) identifizierbar. Eine weitere H_2O -Abspaltung führte zum Basispeak bei m/z 391 ($[M+H-2 \times 162-H_2O]^+$, Abb. III-23 C und Abb. III-24). Mit dem 25 eV-CID-Massenspektrum wurden Ionen erhalten, die das Aglycon

näher charakterisierten (Abb. III-23 D und Abb. III-24). Signifikante Ionen bei m/z 269 (a) und m/z 187 (c) deuten hierbei auf das ursprüngliche Vorliegen einer C_{27} -Apocarotinoid-Carbonsäure hin (Cooper *et al.*, 2003).

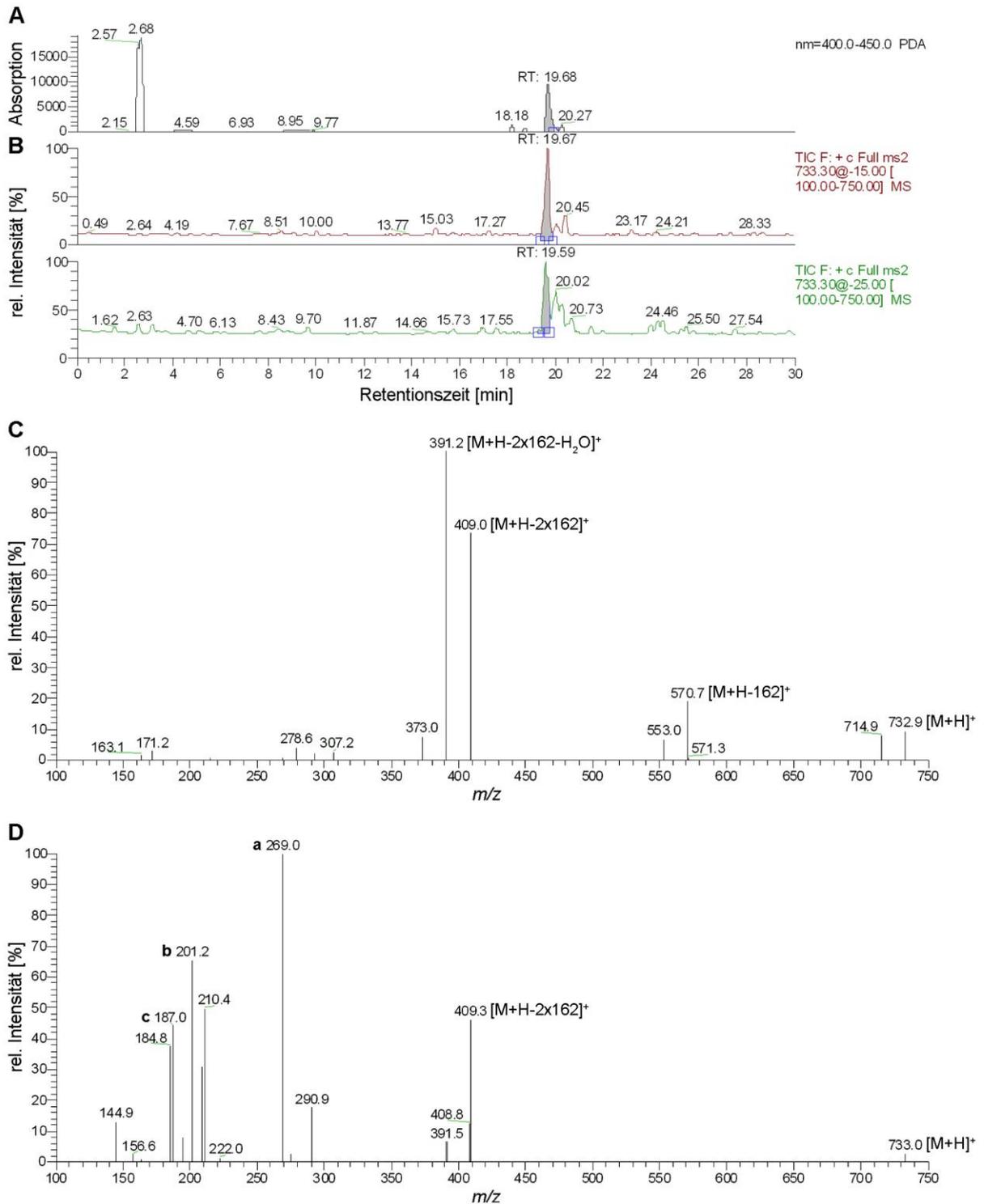


Abb. III-23: HPLC-MS-Daten von Verbindung Apo2. A: PDA-Spur (400 - 450 nm). **B:** TIC des CID-MS (15 eV und 25 eV). **C:** 15 eV-CID-Massenspektrum von m/z 733. **D:** 25 eV-CID-Massenspektrum von m/z 733. TIC: total ion current. Abbildung nach Angaben von Dr. J. Schmidt.

Mit den erhaltenen MS/MS-Daten kann somit die in Abb. III-24 gezeigte Struktur einer an der 3-Hydroxy-Position mit zwei Hexosen verknüpften C_{27} -Apocarotenoid-Carbonsäure vorgeschlagen werden.

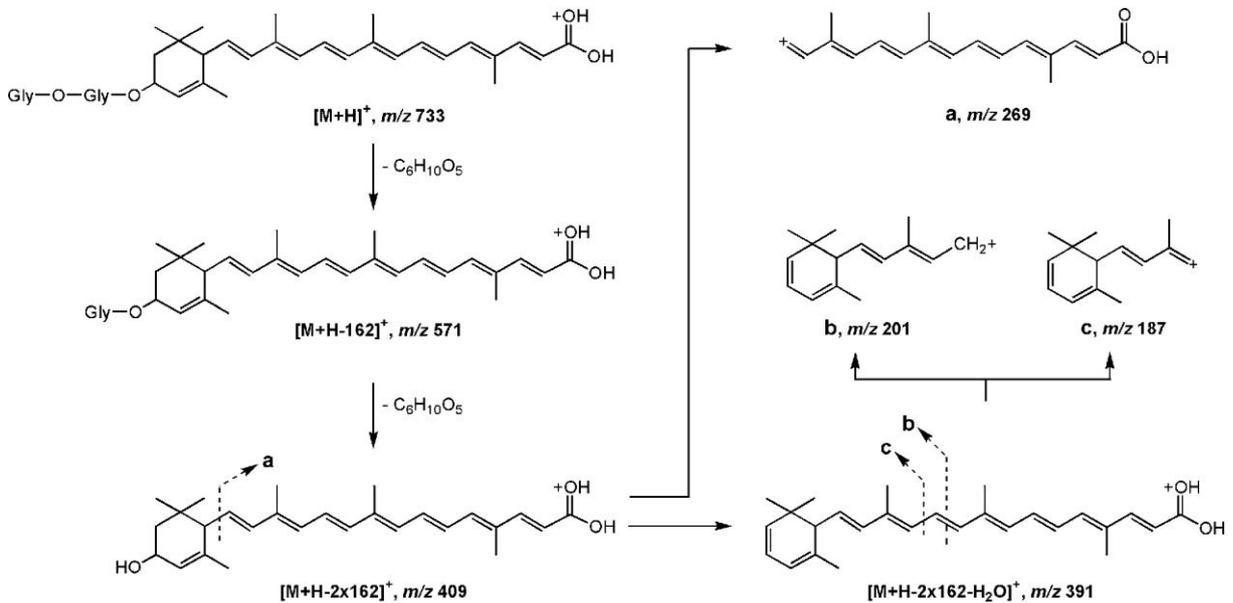


Abb. III-24: Fragment-Ionen der MS/MS-Analyse von Verbindung Apo2 und deren strukturelle Interpretation. Gly: Hexose. Abbildung nach Angaben von Dr. J. Schmidt.

Für die komplette Strukturaufklärung des durch Hydrolyse freigesetzten C_{27} -Apocarotenoidderivats, insbesondere die Lage der Doppelbindung im Cyclohexenring, die Stereochemie an C-3 und C-6 sowie die Art und Verknüpfung der Hexosen sind weiterführende NMR-Untersuchungen nötig.

III.4.4 Auswirkung der *MtCCDI*-Suppression auf die AM-Symbiose

Da die *MtCCDI*-Suppression zu einer Reduktion der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in mykorrhizierten Wurzeln führte, sollte mit den erzeugten RNAi-Wurzeln versucht werden, Aufschluss über deren physiologische Funktion in der AM-Symbiose zu erhalten. Unterschiede in der Biomasse von Spross und Wurzel bzw. im Phänotyp zu den EV-Pflanzen, die eine Beeinflussung der AM-Symbiose andeuten könnten, wurden bei den RNAi-Pflanzen nicht beobachtet.

III.4.4.1 Untersuchung der *MtPT4*-Transkriptakkumulation

Die bereits hinsichtlich *MtCCDI*-Transkriptakkumulation, Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate charakterisierten EV- und RNAi-Wurzeln beider Kultivierungszeiträume wurden ebenfalls zur Untersuchung der *MtPT4*-Transkriptakkumulation verwendet. Aus Abb. III-25 A geht hervor, dass keine Unterschiede bezüglich der *MtPT4*-Transkriptmenge in EV- und RNAi-Wurzeln beider Kultivierungszeiträume existierten. Gleichzeitig wurde die *GiBTUB1*-Transkriptakkumulation in den Proben bestimmt, die nur in

RNAi-Wurzeln des 9 wai-Kultivierungszeitraums leicht, aber signifikant, reduziert war (Abb. III-25 B).

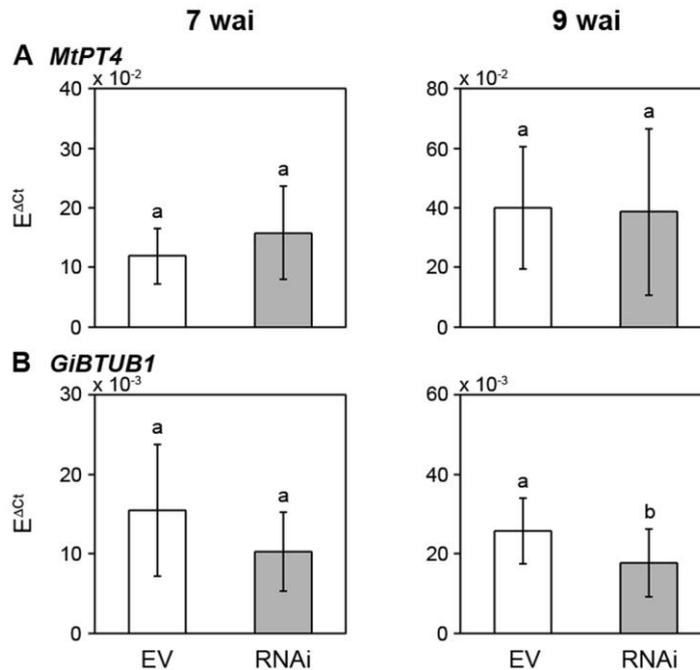


Abb. III-25: *MtPT4*- und *GiBTUB1*-Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln chimärer Pflanzen mit *MtCCD1*-Suppression. **A:** *MtPT4*-Transkriptmenge. **B:** *GiBTUB1*-Transkriptmenge. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von acht EV-Wurzeln (EV) bzw. acht RNAi-Wurzeln (RNAi) des 7 wai-Kultivierungszeitraums und von neun EV-Wurzeln bzw. 13 RNAi-Wurzeln des 9 wai-Kultivierungszeitraums berechnet. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. E^{Act} : Relative Transkriptmenge bezogen auf EF 1 α .

III.4.4.2 Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelmorphologie

Aus den vorangegangenen *MtDXS2*-Experimenten ging hervor, dass, trotz gleichbleibender *MtPT4*-Transkriptakkumulation, Veränderungen in dem Verhältnis einzelner Arbuskelstadien in Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen eines früheren Mykorrhizierungsstadiums auftraten, während keine Unterschiede in der Arbuskelabundanz vorlagen. Um zu untersuchen, ob dies ebenfalls in *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln auftrat, wurden in den mykorrhizierten Wurzeln der Pflanzen des 7 wai-Kultivierungszeitraums die Frequenz und Intensität der Mykorrhizierung sowie das Arbuskelvorkommen und die Arbuskelmorphologie analysiert. Detaillierte Angaben zur Durchführung dieser Analysen wurden bereits in Abschnitt III.3.2 gemacht.

Die berechneten Mittelwerte der Frequenz der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem (F), der Intensität der AM-Kolonisierung (m) und der Arbuskelabundanz (a) von jeweils acht EV- und *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln sind in Abb. III-26 dargestellt. Aus diesen wird ersichtlich, dass keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz (Abb. III-26 A) und der Intensität der Mykorrhizierung (Abb. III-26 B) sowie in dem Arbuskelvorkommen (Abb. III-26 C) zwischen EV- und RNAi-Wurzeln vorlagen.

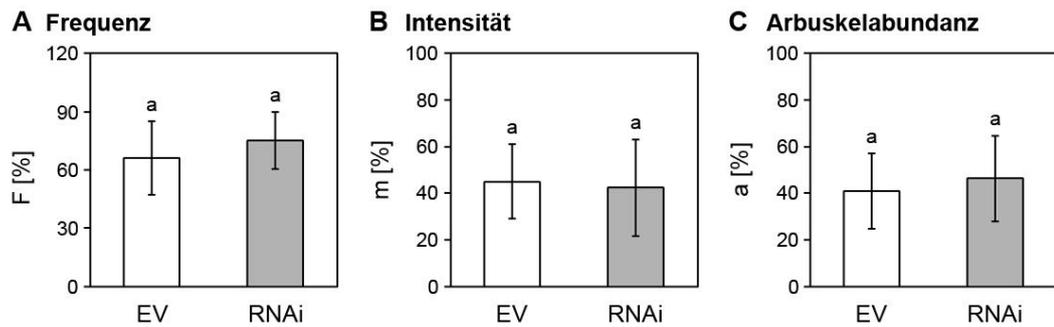


Abb. III-26: Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzeln von EV- und *MtCCDI*-RNAi-Pflanzen. **A:** Frequenz der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem, F. **B:** Intensität der AM-Kolonisierung in den Wurzelsegmenten, m. **C:** Arbuskelabundanz in den kolonisierten Wurzelsegmenten, a. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von acht EV-Wurzeln (EV) bzw. acht RNAi-Wurzeln (RNAi) des 7 wai-Kultivierungszeitraums berechnet. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz geprüft (a; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten.

Die in Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen identifizierte Zunahme der relativen Arbuskelanzahl in der Abbauphase lieferte einen ersten Hinweis für eine Bedeutung der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose (vgl. III.3.2.2). Um diese Annahme zu überprüfen, wurde die relative Arbuskelanzahl in den verschiedenen, bereits klassifizierten Entwicklungsstadien (vgl. III.3.2.2) in mykorrhizierten Wurzeln mit reduzierten *MtCCDI*-Transkriptmengen ermittelt. Die Analysen erfolgten bei je vier EV- und RNAi-Wurzeln, wobei diejenigen mit den niedrigsten *MtCCDI*-Transkriptmengen (3 - 6% der *MtCCDI*-Transkriptmenge der EV-Wurzeln) gewählt wurden.

Aus Abb. III-27 A geht hervor, dass in RNAi-Wurzeln signifikant mehr Arbuskel der Abbauphase (3. Entwicklungsstadium) zugeordnet wurden, wohingegen weniger vollständig zerfallene Strukturen auftraten (4. Entwicklungsstadium).

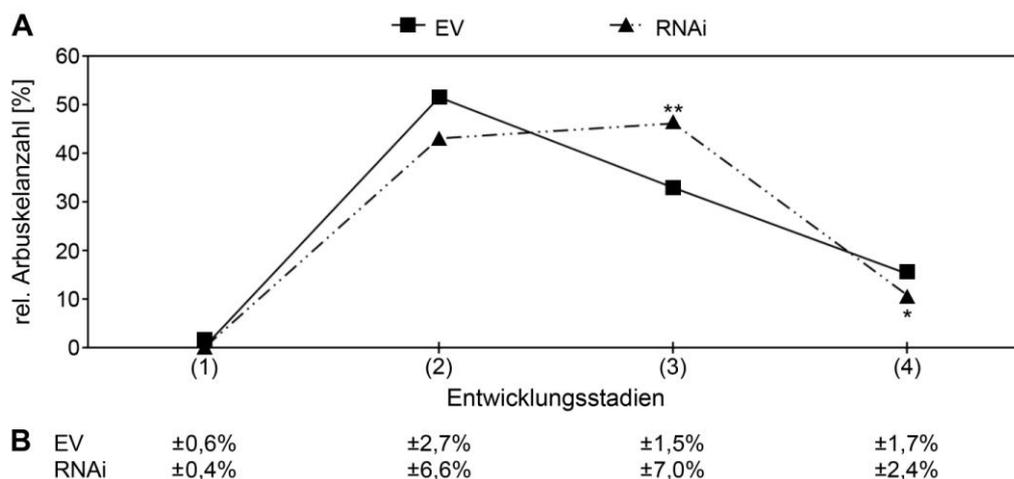


Abb. III-27: Relative Arbuskelanzahl der verschiedenen Entwicklungsstadien in EV- und *MtCCDI*-RNAi-Wurzeln. **A:** Ergebnisse von vier EV-Wurzeln (EV) und vier RNAi-Wurzeln (RNAi) mit reduzierter *MtCCDI*-Transkriptmenge. Dargestellt sind die Mittelwerte der relativen Arbuskelanzahl im entsprechenden Entwicklungsstadium. Mit Kruskal-Wallis-Test (1, aufgrund nicht normalverteilter Daten) und *oneway.test* (2, 3, 4) wurde auf Signifikanz geprüft (* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$). (1) Entwicklungsphase, (2) vollständig ausgebildete Struktur, (3) Abbauphase, (4) Endstadium. **B:** Berechnete Standardabweichungen, die aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Grafik aufgeführt werden.

III.4.4.3 Transkriptakkumulation weiterer AM-induzierter Gene

Um eine mögliche Auswirkung der veränderten Arbuskelstadien auf die Expression arbuskelrelevanter, pflanzlicher Gene zu untersuchen, wurde neben der *MtPT4*-Transkriptmenge (vgl. Abb. III-25 A) auch die Transkriptakkumulation von *MtGLP1*, *MtLEC7*, *MtDXS2-1*, *MtBCP1*, *MtGST1*, *MtSCP1* und *MtCHIT3-3* bestimmt.

In Tab. III-9 sind die berechneten Transkriptmengen dargestellt (vgl. II.2.3.4). Daraus geht hervor, dass nur für *MtLEC7* eine signifikant geringere Transkriptakkumulation in RNAi-Wurzeln detektiert werden konnte. Für die Transkriptmengen aller anderen Gene wurden keine signifikante Veränderung nachgewiesen.

Tab. III-9: Transkriptakkumulation arbuskelrelevanter, pflanzlicher Gene in *MtCCDI*-RNAi-Wurzeln. Die Tabelle listet die Mittelwerte und Standardabweichungen der Transkriptmengen in jeweils vier EV- und RNAi-Wurzeln. Mit *oneway.test* wurde auf Signifikanz der Mittelwerte getestet ($P \leq 0,05$). Signifikante Werte sind hervorgehoben. DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, $E^{\Delta Ct}$: Relative Transkriptmenge bezogen auf EF 1 α , RNAi: RNAi-Wurzeln mit reduzierter *MtCCDI*-Transkriptmenge, EV: EV-Wurzeln.

| DFCI ID | Gen | $E^{\Delta Ct} \times 10^3$ | |
|----------|------------------|-----------------------------|-----------------------|
| | | EV | RNAi |
| TC95018 | <i>MtGLP1</i> | 169,3 \pm 41,2 | 170,6 \pm 72,6 |
| TC95567 | <i>MtLEC7</i> | 80,3 \pm 19,7 | 42,8 \pm 7,4 |
| TC95651 | <i>MtDXS2-1</i> | 12,2 \pm 3,0 | 10,8 \pm 4,7 |
| TC96500 | <i>MtBCP1</i> | 5,0 \pm 1,2 | 3,9 \pm 1,7 |
| TC100720 | <i>MtGST1</i> | 96,3 \pm 21,6 | 76,9 \pm 19,3 |
| TC106954 | <i>MtSCP1</i> | 22,0 \pm 5,0 | 18,2 \pm 4,6 |
| TC111430 | <i>MtCHIT3-3</i> | 32,7 \pm 32,2 | 41,8 \pm 33,9 |

Die Analyse eines ersten Transformationsansatzes zeigte, dass die *MtCCDI*-Suppression, einhergehend mit den reduzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten, zu keiner wesentlichen Veränderung arbuskelrelevanter, pflanzlicher Gene führt. Nur eines der sieben Gene wies in RNAi-Wurzeln eine signifikant geringere Transkriptakkumulation gegenüber EV-Wurzeln auf. Es konnten jedoch, wie bereits in RNAi-Wurzeln mit moderater *MtDXS2-1*-Suppression, auch in den RNAi-Wurzeln mit reduzierter *MtCCDI*-Transkriptakkumulation, deutlich mehr Arbuskel der Abbauphase zugeordnet werden, wobei auch hier keine signifikanten Unterschiede in der Arbuskelabundanz auftraten.

IV Diskussion

Die Bedeutung von Sekundärmetaboliten in der AM-Symbiose

Zahlreiche Untersuchungen wurden zur Funktion und Bedeutung von Sekundärmetaboliten bei Abwehrreaktionen von Pflanzen gegenüber Pathogenen (Bennett & Wallsgrove, 1994; Dixon *et al.*, 2002) oder bei der mutualistischen Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien durchgeführt (Long, 2001). Das Wissen über die Relevanz von Sekundärstoffen in der AM-Symbiose ist jedoch noch begrenzt (Strack *et al.*, 2003; Strack & Fester, 2006).

Einige Flavonoide, die in Wurzelexsudaten der Wirtspflanzen vorkommen und Signalmoleküle in der Symbiose zwischen Leguminosen und Rhizobien sind, stimulieren die Keimung der Sporen von AM-Pilzen, sowie das Hyphenwachstum und die Kolonisierung der Wurzel (Übersicht bei Morandi *et al.*, 1996). Anhand dieser Erkenntnisse wurde vermutet, dass Flavonoide in den Signalmechanismus bei der Erkennung der Symbiosepartner involviert sein könnten. Fraglich ist jedoch, ob diese Verbindungen als generelles Signalmolekül bei der Etablierung der AM-Symbiose fungieren, da einerseits einige Flavonoide eine gattungs- und artspezifische Wirkung auf AM-Pilze besitzen (Scervino *et al.*, 2005a; Scervino *et al.*, 2005b) und andererseits Flavonoide für die Etablierung der AM-Symbiose nicht erforderlich sind (Bécard *et al.*, 1995). In späteren Mykorrhizierungsstadien, wenn die AM-Symbiose bereits etabliert ist, treten Veränderungen im Akkumulationsmuster von Flavonoiden auf (Harrison & Dixon, 1993; Larose *et al.*, 2002; Schliemann *et al.*, 2008a). Bis jetzt existieren jedoch noch keine eindeutigen Ergebnisse, die eine Funktion verschiedener Flavonoide in der AM-Symbiose belegen.

Das bislang prominenteste Beispiel für die Bedeutung von Sekundärmetaboliten in der AM-Symbiose sind Strigolactonderivate, die vermutlich, wie die Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate, auch aus dem Carotinoidstoffwechsel hervorgehen (Matusova *et al.*, 2005). Sie induzieren die Verzweigung der Hyphen von AM-Pilzen (Akiyama *et al.*, 2005) und scheinen eine wichtige Funktion bei der Etablierung der AM-Symbiose zu übernehmen (Akiyama & Hayashi, 2006). Für diese Annahme sprechen ebenfalls die Studien von Gomez-Roldan *et al.* (2006). Sie zeigten, dass die Blockierung der Carotinoidbiosynthese durch Applikation des Herbizids Fluridon, einem Inhibitor der Phytoen-Desaturase, zu *Z. mays*-Keimlingen eine geringere AM-Kolonisierung zur Folge hat. Nach Zugabe eines synthetischen Strigolactonanalogs zu den behandelten Pflanzen wurde dieser Effekt aufgehoben und es konnte eine ähnliche Kolonisierung wie in den Kontrollpflanzen nachgewiesen werden (Gomez-Roldan *et al.*, 2006). Strigolactonderivate kommen in Wurzelexsudaten vieler Pflanzenspezies vor (Übersicht bei Steinkeller *et al.*, 2007) und stimulieren auch die Keimung von Samen wurzelparasitischer Pflanzen, die den Gattungen *Striga* und *Orobanche* angehören (Bouwmeester *et al.*, 2003).

Während Strigolactonderivate in sehr geringen Mengen konstitutiv von der Wirtspflanze synthetisiert werden und als Signalmoleküle agieren, akkumulieren die AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in deutlich höheren Mengen (Strack & Fester, 2006). Obwohl letztere Verbindungen nicht in allen Pflanzenspezies nachweisbar sind, scheint generell in den Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen eine Induktion des Carotinoidstoffwechsels vorzuliegen. Dieser könnte mit der Biosynthese von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in Zusammenhang stehen (Fester *et al.*, 2005). Die Funktion dieser Verbindungen in der AM-Symbiose konnte bisher jedoch noch nicht aufgeklärt werden. Aufgrund ihrer massiven Akkumulation in den mykorrhizierten Wurzeln ist es aber eher unwahrscheinlich, dass sie als Signalstoffe dienen.

Die Aufklärung der physiologischen Bedeutung und Funktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose stellte ein wesentliches Ziel dieser Arbeit dar. Dafür wurden zwei Schritte des Carotinoidstoffwechsels durch *loss of function*-Ansätze unterbrochen. Diese betrafen zum einen die DXS2, ein Isoenzym des ersten Schritts des MEP-Synthesewegs, und zum anderen die CCD1, die vermutlich in die Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids involviert ist. Eine Beteiligung von CCD1 an der Biosynthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate wurde bislang nur anhand von erhöhten Transkriptmengen in mykorrhizierten Wurzeln vermutet (Lohse *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2008). Die Ergebnisse des *MtCCD1*-RNAi-Ansatzes liefern neue Erkenntnisse über die Biosynthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in mykorrhizierten Wurzeln und geben möglicherweise Aufschluss über die generelle Organisation der Carotinoidspaltung in Pflanzenzellen. Anhand der Ergebnisse des *MtDXS2*-RNAi-Ansatzes gelang erstmals der Nachweis eines funktionellen Zusammenhangs zwischen der DXS2-Expression und der Akkumulation von sekundärstoffwechselspezifischen Isoprenoiden, der bis jetzt lediglich spekulativ vermutet wurde (Walter *et al.*, 2002).

Die DXS2 als sekundärstoffwechselspezifisches Isoenzym des MEP-Synthesewegs

Die von Walter *et al.* (2002) aufgestellte Hypothese, dass DXS2 als sekundärstoffwechselspezifisches Isoenzym des MEP-Synthesewegs fungiert, basiert auf der Korrelation erhöhter DXS2-Transkriptmengen mit akkumulierenden, sekundärstoffwechselspezifischen Isoprenoiden, u.a. den AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten. Weitere Beispiele, die ebenfalls auf diesen Zusammenhang hinweisen, sind die Emission von Monoterpenen und Sesquiterpenen der Blüten von *Antirrhinum majus* (Dudareva *et al.*, 2005), die Biosynthese von Ginkgoliden, modifizierter diterpenoider Lactonverbindungen, in Wurzeln von *G. biloba* (Kim *et al.*, 2006), die Akkumulation von diterpenoiden Phytoalexinen in Zellkulturen von *Oryza sativa* nach Applikation pilzlicher Elicitoren (Okada *et al.*, 2007) sowie die Biosynthese von Oleoresin, einer Terpenoidverbindung zur Abwehr von Herbivoren und Pathogenen in *Picea abies* (Phillips *et al.*, 2007).

Northern Blot- und Transkriptom-Analysen von *M. truncatula*, *Z. mays*, *S. lycopersicum* bzw. *O. sativa* zeigten eine Induktion der *DXS2*-Genexpression in mykorrhizierten Wurzeln (Walter *et al.*, 2002; Guimil *et al.*, 2005; Hohnjec *et al.*, 2005). Der genaue Ort und Zeitpunkt der Expression konnte jedoch in diesen Analysen nicht bestimmt werden. Darüber hinaus verläuft die Kolonisierung der Wurzel durch einen AM-Pilz nie synchron. Folglich sind in einer mykorrhizierten Wurzel alle pilzlichen Strukturen (Appressorien, Hyphen, Arbuskel, Vesikel) in ihren verschiedenen Entwicklungsstadien gleichzeitig vertreten. Um die Funktion von *DXS2* während der AM-Symbiose zu charakterisieren, sind Informationen über den Ort der Genexpression bedeutend. Diese wurden anhand der durchgeführten Promotoranalysen erhalten (vgl. III.1.2). Die hier aufgeführten Ergebnisse sprechen für eine spezifische Regulation von *MtDXS2-1* nach Besiedlung der Wurzelcortexzelle, da *MtDXS2-1*-Promotoraktivität in arbuskulierten Cortexzellen auftritt (vgl. Abb. III-2). Diese lokale, auf einzelne Zellen beschränkte Induktion von *MtDXS2-1* spiegelt sich auch in den akkumulierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen der mykorrhizierten *hairy roots* von EV-Pflanzen wider. Da eine Induktion von *MtDXS2-1* in arbuskulierten Cortexzellen stattfindet, tritt wahrscheinlich ein Verdünnungseffekt bei den ermittelten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen auf, der die ähnlichen *MtDXS2-1*- und *MtDXS1*-Transkriptmengen erklären könnte (vgl. Abb. III-8 und Abb. III-9). Die Induktion der *DXS2*-Transkription tritt aber nicht nur in Wurzeln nach Besiedlung mit AM-Pilzen auf, sondern kann auch durch andere Faktoren hervorgerufen werden. So konnte nach Applikation von Jasmonsäure zu nicht mykorrhizierten Wurzeln, die das *MtDXS2-1*-Promotorfusionskonstrukt exprimierten, *MtDXS2-1*-Promotoraktivität in diesen Wurzeln nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Die Verwundung von Pflanzenwurzeln hat jedoch keine erhöhten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen zur Folge (Tretner *et al.*, 2008). Dagegen führt die Verwundung von Blättern bzw. des Sprosses der Pflanzen zu einer erhöhten *DXS2*-Transkriptakkumulation in diesen Organen (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2006; Arimura *et al.*, 2008; Tretner *et al.*, 2008).

Arbuskulierte Cortexzellen weisen eine starke Proliferation von Plastiden, den Orten der Carotinoidbiosynthese, auf (Fester *et al.*, 2001; Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2005). Durch Immunlokalisierung der DXR, dem zweiten Enzym des MEP-Synthesewegs (vgl. Abb. I-5), wurde festgestellt, dass eine DXR-Akkumulation in den Plastiden arbuskulierter Cortexzellen auftritt, die mit der Biosynthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate korreliert ist (Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2006). Darüber hinaus zeigte sich, dass das stärkste DXR-Signal in Plastiden, die degenerierende Arbuskel umgeben, detektiert wurde (Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2006). Über eine Korrelation der *MtDXS2-1*-Promotoraktivität mit den verschiedenen Entwicklungsstadien der Arbuskel kann aber keine Aussage getroffen werden, da keine Untersuchungen der Arbuskelstrukturen in den Wurzeln, die Promotoraktivität zeigten, durchgeführt wurden. Auch das zeitversetzte Auftreten von GUS-Aktivität und RNA-Akkumulation führt dazu, dass keine eindeutigen Schlussfolgerungen über eine mögliche Korrelation zwischen *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation und Arbuskelentwicklung möglich

sind. Anhand von *in situ*-Hybridisierung könnte untersucht werden, ob eine verstärkte *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation in Cortezzellen mit degenerierenden Arbuskeln auftritt. In diesen Zellen wiesen Fester *et al.* (2002a) hauptsächlich das Vorkommen der sekundärstoffwechselspezifischen Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate nach. Die Verbindungen akkumulierten als „Gelber Pigment“-Komplex in lipophilen Tröpfchen im Cytosol. In Zellen mit vollständig zerfallenen Arbuskeln traten diese Tröpfchen größtenteils in der Vakuole auf. In Übereinstimmung mit diesen bis jetzt verfügbaren Kenntnissen über die Biosynthese und Akkumulation der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in arbuskulierten Cortezzellen und den in dieser Arbeit durchgeführten Promotoranalysen kann somit eine zellspezifische Regulation ihrer Biosynthese angenommen werden.

Harrison (2005) klassifizierte zwei Gruppen von AM-spezifischen Promotoren. Die erste Gruppe beinhaltet Promotoren, die ausschließlich in arbuskulierten Cortezzellen aktiv sind, die zweite umfasst AM-spezifische Promotoren mit Aktivität in arbuskulierten Zellen sowie deren angrenzende Zellen. Von diesen setzt sich die *MtDXS2-1*-Promotoraktivität ab, denn sie ist nicht ausschließlich auf arbuskulierte und deren angrenzende Cortezzellen beschränkt. Auch im Zentralzylinder von mykorrhizierten sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln trat oftmals eine schwache *MtDXS2-1*-Promotoraktivität auf (vgl. Abb. III-2), die sich auch in den geringen *MtDXS2-1*-Transkriptmengen der nicht mykorrhizierten EV-Wurzeln widerspiegelte (vgl. Abb. III-8).

Einige bei verschiedenen Pflanzenspezies durchgeführte transgene Ansätze demonstrierten bereits, dass die DXS einen limitierenden Schritt in der Biosynthese plastidärer Isoprenoidverbindungen darstellt. So führte in *A. thaliana* die Überexpression von *CLA1*, dem *DXS1*-Ortholog, zu erhöhten Chlorophyll-, α -Tocopherol-, Carotinoid- und ABA-Gehalten, während die Suppression eine Reduktion dieser Verbindungen bewirkte (Estevez *et al.*, 2001). Die heterologe Überexpression einer *DXS1*-ähnlichen Sequenz von *A. thaliana* in *Lavandula latifolia* hatte den Anstieg der akkumulierenden Monoterpene, die den Hauptbestandteil des Lavendelöls repräsentieren, zur Folge (Munoz-Bertomeu *et al.*, 2006). In *S. lycopersicum* führte die heterologe Überexpression der *DXS* aus *E. coli* zu erhöhten β -Carotin- und Phytoengehalten (Enfissi *et al.*, 2005). Anhand dieser Beispiele kann angenommen werden, dass auch Mutanten bzw. transgene *loss of function*-Ansätze geeignete Werkzeuge sind, um zu untersuchen, ob die *DXS2* in die Biosynthese sekundärstoffwechselspezifischer Isoprenoide involviert ist. Allerdings existieren bis heute keine Nachweise über das Vorhandensein einer *dxs2*-Mutante sowie über transgene *loss of function*-Ansätze zur Suppression von *DXS2*, die die Beteiligung des *DXS2*-Isoenzym an der Biosynthese sekundärstoffwechselspezifischer Isoprenoide belegen würden.

Anhand von Fütterungsexperimenten mit ^{13}C -markierten Verbindungen bei mykorrhizierten Wurzeln von *Hordeum vulgare* konnte bereits gezeigt werden, dass die Grundbausteine IPP/DMAPP für die Synthese der Cyclohexenonderivate aus dem plastidären MEP-Weg hervorgehen (Maier *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob das *DXS2*-Isogen in die Biosynthese

der sekundärstoffwechselspezifischen Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate involviert ist, wurde ein RNAi-vermittelter *loss of function*-Ansatz von *MtDXS2* in *hairy roots* von *M. truncatula* angewandt. Dieser führte zu einer deutlichen Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation und zu einer drastischen Abnahme der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate nach Kolonisierung der Wurzeln mit *G. intraradices* (vgl. Abb. III-8 und Abb. III-10). Somit wurde erstmals der funktionelle Nachweis der Biosynthese dieser Verbindungen über den DXS2-abhängigen MEP-Weg erbracht. Beeinflussungen des primärstoffwechselspezifischen MEP-Synthesewegs können weitestgehend ausgeschlossen werden, da unveränderte Transkriptmengen des *MtDXS1*-Isogens in den Wurzeln detektiert wurden (vgl. Abb. III-9) und keine Veränderungen in Wachstum und Entwicklung bei den generierten chimären *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen auftraten. Die reduzierten Gehalte der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in RNAi-Wurzeln deuten außerdem darauf hin, dass eine Kompensation der *MtDXS2*-Aktivität durch *MtDXS1* offensichtlich nicht möglich ist. Sie validieren somit an einem Einzelfall die von Walter *et al.* (2002) aufgestellte Hypothese und sprechen dafür, dass sekundärstoffwechselspezifische Isoprenoide generell über das DXS2-Isoenzym gebildet werden, während primärstoffwechselspezifische Verbindungen über das DXS1-Isoenzym synthetisiert werden. Von einer Unterbrechung der Biosynthese der mykorrhizarelevanten Strigolactonderivate wird aufgrund der konstitutiven Bildung dieser Verbindungen nicht ausgegangen, da sie mit großer Wahrscheinlichkeit über den DXS1-abhängigen MEP-Syntheseweg verläuft. Für diese Annahme spricht die unveränderte Kolonisierung der RNAi-Wurzeln (vgl. Abb. III-14 und Abb. VII-3 im Anhang). Inwieweit neben den Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten weitere sekundärstoffwechselspezifische Isoprenoide durch den RNAi-Ansatz beeinflusst wurden, bleibt ungeklärt, da bis jetzt keine Hinweise auf die Existenz solcher Verbindungen in Wurzeln vorliegen.

Die DXS2-Suppression beeinträchtigt die Regulation AM-induzierter Gene

Die Kolonisierung von Pflanzenwurzeln durch AM-Pilze wird durch unterschiedliche Faktoren reguliert, z.B. durch den Phosphatgehalt des Bodens (Javot *et al.*, 2007b). Ob die Bedeutung der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate ebenfalls in der Regulation der AM-Kolonisierung zu finden ist, sollte die Analyse der *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen aufzeigen. Trotz der stark reduzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte, die in jedem durchgeführten Transformationsansatz nachgewiesen wurden, konnte jedoch kein Einfluss auf die Kolonisierung der RNAi-Wurzeln festgestellt werden. Sowohl die Frequenz und die Intensität der Mykorrhizierung als auch die Arbuskelabundanz waren in den *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln nicht verändert (vgl. Abb. III-14 und Abb. VII-3 im Anhang). Ein besonders interessanter Aspekt der vorliegenden Daten ist jedoch die trotz unveränderter Kolonisierung auftretende verringerte Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene unter den Bedingungen einer starken *DXS2*-Suppression (srRNAi-

Wurzeln, vgl. Tab. III-3). Hohnjec *et al.* (2005) identifizierten mit Microarray-Analysen insgesamt 201 Gene, die während der AM-Symbiose in *M. truncatula* induziert werden. Davon zeigten 64 eine stark reduzierte Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln im Vergleich zu den EV-Wurzeln (vgl. Tab. III-3). Dies lässt auf eine deutliche Veränderung oder sogar weitgehende Aufhebung AM-vermittelter Genregulation schließen. Unter den 64 Genen befanden sich auch solche, die aufgrund ihrer räumlich und zeitlich vorkommenden Genexpression in mykorrhizierten Wurzeln als molekulare Marker für die AM-Symbiose beschrieben sind (vgl. Tab. III-3; Gianinazzi-Pearson *et al.*, 2006). Dabei handelte es sich um *MtPT4*, *MtGLP1*, *MtLEC7*, *MtSCP1*, *MtGST1*, *MtBCP1* und *MtTUBB1*. *MtPT4* codiert einen AM-spezifischen Phosphattransporter, der in der periarbuskulären Membran, die den Arbuskel umgibt, lokalisiert ist (Harrison *et al.*, 2002). Dieser Transporter ist essenziell für die symbiontische Phosphataufnahme der Wirtspflanze (Javot *et al.*, 2007a) und stellt einen molekularen Marker für funktionelle Arbuskel dar (Isayenkov *et al.*, 2004). Die Gene *MtGLP1* und *MtLEC7* sind ausschließlich in arbuskulierten Wurzelcortexzellen exprimiert (Doll *et al.*, 2003; Frenzel *et al.*, 2005), während die Expression von *MtSCP1*, *MtGST1*, *MtBCP1* und *MtTUBB1* in arbuskulierten sowie deren benachbarter Zellen nachgewiesen wurde (Liu *et al.*, 2003; Wulf *et al.*, 2003; Hohnjec *et al.*, 2005; Manthey *et al.*, 2004). Die verringerte Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene konnte überraschenderweise aber nur in RNAi-Wurzeln, deren *MtDXS2-1*-Transkriptmengen auf unter 10% reduziert waren (srRNAi), detektiert werden. In RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen (mrRNAi-Wurzeln) traten die beschriebenen Veränderungen in der Transkriptakkumulation der AM-Markergene nicht auf (vgl. Tab. III-3 und Tab. III-5).

Das Fehlen der Transkriptakkumulation einzelner AM-Markergene, inklusive *MtPT4*, und die weitgehend unveränderte Arbuskelabundanz (vgl. Abb. III-14 C und Abb. VII-3 C im Anhang) lassen die Vermutung zu, dass viele der in den srRNAi-Wurzeln vorkommenden Arbuskel nicht mehr funktionell sind, sich also möglicherweise in der Abbauphase befinden oder bereits abgebaut sind. Der geringere Anteil vollständig entwickelter Arbuskel und die erhöhte Anzahl degenerierender bzw. degenerierter Strukturen in srRNAi-Wurzeln sprechen zwar für diese Annahme (vgl. Abb. III-15), spiegeln aber die starke Reduktion der AM-Markergene nur unvollkommen wider. Das Vorkommen von vollständig entwickelten, aber inaktiven Arbuskeln in srRNAi-Wurzeln wäre somit denkbar. Als Hinweis darauf kann der Phosphatanstieg in srRNAi-Wurzeln gewertet werden (vgl. Abb. III-16 und Tab. III-6). Es ist vorstellbar, dass das vom AM-Pilz zur Verfügung gestellte Phosphat aufgrund vieler funktionsloser Arbuskel nicht mehr von der Pflanze aufgenommen wird und aus diesem Grund im periarbuskulären Zwischenraum und/oder in den Pilzhyphen akkumuliert. Auch die signifikant veränderten Gehalte der identifizierten Primärmetabolite in srRNAi-Wurzeln können als Hinweis auf eine gestörte symbiontische Phosphataufnahme der srRNAi-Pflanzen betrachtet werden, da Wurzeln von *P. vulgaris*-Pflanzen, die unter Phosphatmangelbedingungen kultiviert wurden, erhöhte Gehalte an Aminosäuren, Polyolen und

Zuckern aufwiesen (Hernández *et al.*, 2007). Für viele Aminosäuren, Arabitol und einige Monosaccharide konnten in den srRNAi-Wurzeln ebenfalls signifikant erhöhte Gehalte nachgewiesen werden (vgl. Tab. III-6).

Anhand der vorliegenden Daten kann ausgeschlossen werden, dass sich die Suppression von *MtDXS2* negativ auf die Etablierung der AM auswirkt, denn deutliche Veränderungen im Mykorrhizierungsgrad waren nicht feststellbar (vgl. Abb. III-14 und Abb. VII-3 im Anhang). Für dieses Argument spricht außerdem die unveränderte Biomasse der RNAi-Pflanzen gegenüber den EV-Pflanzen, die eine gravierende Beeinflussung der AM-Symbiose über die gesamte Wachstumsperiode unwahrscheinlich erscheinen lässt (Daten nicht gezeigt). Vielmehr ist vorstellbar, dass die beobachteten Auswirkungen auf die Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene und die damit vermutete verringerte Funktionalität der AM erst in einem späteren Entwicklungsstadium der Pflanze auftreten. Welche Folgen eine gestörte Funktionalität der AM bereits bei Etablierung der AM-Symbiose zwischen *G. versiforme* und *M. truncatula* hat, zeigten erst kürzlich Javot *et al.* (2007a) anhand von stabil transformierten *MtPT4*-RNAi-Linien bzw. einer *mtpt4*-TILLING-Mutante. Diese Untersuchungen belegen, dass ohne funktionsfähigen MtPT4 die Arbuskel frühzeitig kollabieren und eine erfolgreiche Etablierung der AM nicht möglich ist. Mykorrhizierte *MtPT4*-RNAi-Pflanzen weisen dadurch einen reduzierten Phosphatgehalt im Spross und ein verringertes Sprossgewicht gegenüber mykorrhizierten Wildtyp-Pflanzen auf (Javot *et al.*, 2007a). Solche Auswirkungen wurden jedoch bei den *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen nicht beobachtet.

Ferner muss diskutiert werden, ob die fehlende Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene, welche nur in srRNAi-Wurzeln mit stark reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge beobachtet wurde, aus den reduzierten Gehalten der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate resultieren könnte. Ein Vergleich von srRNAi- und mrRNAi-Wurzeln zeigte keine Unterschiede in der Akkumulation der Mycorradicinderivate, wohingegen tendenziell geringere Cyclohexenonderivatgehalte in srRNAi-Wurzeln auftraten (vgl. Abb. III-12 und Abb. VII-2 im Anhang). Dies legt einen Zusammenhang zwischen der Reduktion der Transkriptakkumulation der AM-Markergene und der Abnahme der Cyclohexenonderivate nahe, während eine Beteiligung von Mycorradicinderivaten eher unwahrscheinlich ist. Der signifikante Unterschied in den Cyclohexenonderivatgehalten von mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln konnte aber lediglich in einem der unabhängig durchgeführten Experimente beobachtet werden (vgl. Abb. III-12 D und Abb. VII-2 D im Anhang). Weiterhin impliziert die schwache, aber signifikante Korrelation zwischen Cyclohexenonderivatgehalt und *MtPT4*-Transkriptakkumulation (vgl. Abb. III-13) einen Zusammenhang zwischen der Abnahme dieser Verbindungen und der Reduktion der AM-Markergene. Somit könnten die Mengen der akkumulierenden Cyclohexenonderivate entscheidend für das Expressionsniveau der AM-induzierten Gene sein. Letztendlich könnte erst eine Reduktion unter einen bestimmten Schwellenwert in einer fehlenden Expression der normalerweise AM-induzierten Gene resultieren. Diese Vermutung muss allerdings in weiteren Experimenten untersucht werden,

denn in einigen Transformationsansätzen wurden in mrRNAi-Wurzeln Cyclohexenonderivatgehalte detektiert, deren Relativwerte sogar denen der srRNAi-Wurzeln entsprachen (vgl. Abb. III-12 D, Experiment III). Auswirkungen auf die Transkriptakkumulation von AM-Markergenen, wie z.B. *MtPT4*, konnten in diesen Wurzeln jedoch nicht beobachtet werden (vgl. Abb. III-12 B, Experiment III).

Mit der *MtDXS2*-Suppression wird ein Syntheseschritt des MEP-Wegs beeinflusst, in dem IPP/DMAPP nicht nur als Grundbausteine für die Carotinoidbiosynthese gebildet werden. Deshalb ist auch nicht ausgeschlossen, dass eine bis jetzt noch unbekannte Isoprenoidverbindung, deren Synthese ebenfalls über den DXS2-abhängigen MEP-Weg erfolgt, durch die starke Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge in den srRNAi-Wurzeln beeinflusst sein könnte und die veränderte Regulation AM-induzierter Gene hervorruft. Hierbei könnte es sich einerseits um eine weitere AM-induzierte Verbindung handeln, aber andererseits wäre auch eine konstitutiv von der Pflanze synthetisierte Isoprenoidverbindung denkbar, die in geringer Menge gebildet wird. Als Hinweis auf das mögliche Vorkommen einer solchen Verbindung kann die beobachtete *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation in nicht mykorrhizierten EV-Wurzeln gewertet werden (vgl. Abb. III-8). Die tendenziell geringeren *MtDXS2-1*-Transkriptmengen, die in mykorrhizierten srRNAi-Wurzeln im Vergleich zu den nicht mykorrhizierten EV-Wurzeln detektiert wurden, würden die Hypothese einer solchen Isoprenoidverbindung stützen (vgl. Abb. III-8, Abb. III-12 A und Abb. VII-2 A im Anhang). Darüber hinaus kann auch die deutlich signifikante Korrelation zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptakkumulation (vgl. Abb. III-13 A) auf das Vorkommen einer solchen DXS2-abhängigen Isoprenoidverbindung hinweisen, die Bedeutung für physiologisch aktive Arbuskel besitzen könnte.

Um Sekundäreffekte, die durch die Störung der Biosynthese weiterer Isoprenoidverbindungen auftreten können, auszuschließen, wurde ein späterer, und deshalb spezifischerer Reaktionsschritt in der Biosynthese von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten mittels eines *loss of function*-Ansatzes gehemmt.

Die CCD1-Suppression impliziert ein neues Schema der Carotinoidspaltung in mykorrhizierten Wurzeln

Die Biosynthese der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate wurde bisher durch die symmetrische, oxidative Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen eines bis heute unbekanntes C₄₀-Carotinoids vermutet (Walter *et al.*, 2000). Die Regiospezifität an den 9,10- und 9',10'-Positionen wurde für AtCCD1 und weitere orthologe CCD1-Enzyme, beispielsweise SlCCD1, PhCCD1, VvCCD1, CmCCD1 und ZmCCD1 *in vitro* beschrieben (Schwartz *et al.*, 2001; Simkin *et al.*, 2004a; Simkin *et al.*, 2004b; Mathieu *et al.*, 2005; Ibdah *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2008). Hierbei resultiert die symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen eines C₄₀-Carotinoids, z.B. β -Carotin, in der Bildung von zwei β -Ionon-Molekülen (C₁₃) und einem C₁₄-Dialdehyd-Molekül (Abb. IV-1).

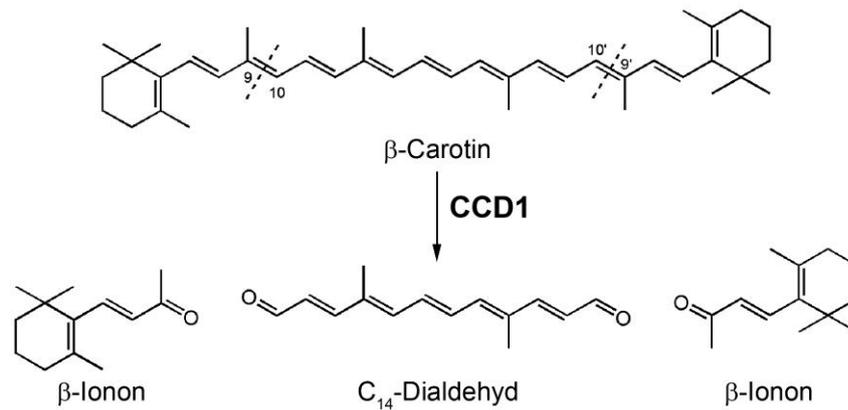


Abb. IV-1: Schema der oxidativen Spaltung von β -Carotin durch rekombinantes CCD1-Protein. Abbildung nach Simkin *et al.* (2004b).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass rekombinantes MtCCD1-Protein C_{40} -Carotinoide als Substrate umsetzt (vgl. Abb. III-17). Die vermutete Regiospezifität von CCD1 lässt somit erwarten, dass das stöchiometrische Verhältnis der akkumulierten Cyclohexenon- (C_{13} -Spaltprodukte) und Mycorradicinderivate (C_{14} -Spaltprodukt) in mykorrhizierten Wurzeln 2:1 beträgt. Jedoch ist bekannt, dass das berechnete Verhältnis der Verbindungen großen Schwankungen innerhalb verschiedener Pflanzenspezies unterliegt. So wiesen Schliemann *et al.* (2008a) für Wildtyp-Wurzeln von *M. truncatula* ein Verhältnis von 1:1 nach, während in *O. umbellatum*, *L. japonicus* und *A. porrum* 3-, 25- bzw. 27-mal mehr Cyclohexenon- als Mycorradicinderivate auftraten (Strack & Fester, 2006; Schliemann *et al.*, 2008b). In den hier erzeugten EV-Wurzeln betrug das Verhältnis von Cyclohexenon- zu Mycorradicinderivaten 0,5:1 (vgl. Tab. III-7). Die verschiedenen Verhältnisse der Gehalte dieser Verbindungen deuten somit einen unterschiedlich ablaufenden Stoffwechsel der Apocarotinoide in den einzelnen Pflanzenspezies an.

Der funktionelle Nachweis der MtCCD1-Aktivität *in planta* wurde mit dem RNAi-Ansatz erbracht. Überraschenderweise resultierte aber die Suppression von *MtCCD1* in einer unterschiedlichen Reduktion der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate (vgl. Abb. III-20). Während die Mycorradicinderivate stark reduziert waren, führte die *MtCCD1*-Suppression lediglich zu einer etwa 50-prozentigen Abnahme der akkumulierenden C_{13} -Cyclohexenonderivate (vgl. Abb. III-20). In der Literatur sind zwei transgene Ansätze beschrieben, mit denen die Funktion von CCD1 *in planta* untersucht wurde und die, bezüglich der C_{13} -Spaltprodukte, zu ähnlichen Ergebnissen führten. Simkin *et al.* (2004a) zeigten, dass in *S. lycopersicum* die Suppression von *CCD1* mit einer Absenkung der C_{13} -Spaltprodukte β -Ionon und Geranylaceton um lediglich ca. 50% einherging. Analysiert wurden in diesen Studien zwei transgene Linien, deren *SICCD1*-Transkriptmengen in Blättern und Früchten um etwa 90% reduziert waren. Eine ca. 50-prozentige Reduktion der Emission von β -Ionon konnte auch in Blüten transgener *Petunia hybrida*-Pflanzen, die nur etwa 5% der *PhCCD1*-Transkriptakkumulation des Wildtyps aufwiesen, gezeigt werden (Simkin *et al.*, 2004b). Als mögliche Ursache, warum die Gehalte der C_{13} -Spaltprodukte nicht mit der

Transkriptakkumulation korrelierten, wurde die redundante Aktivität eines weiteren, bis jetzt noch nicht identifizierten CCD-Enzyms diskutiert (Simkin *et al.*, 2004a). Hinweise auf die Gehalte des C₁₄-Spaltprodukts, die zur Aufklärung hätten beitragen können, gehen jedoch aus beiden Studien nicht hervor.

Die starke Reduktion der C₁₄-Mycorradicinderivate, die in den *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln nachgewiesen wurde, lässt wie erwartet schlussfolgern, dass für deren Biosynthese MtCCD1-Aktivität erforderlich ist. Im Gegensatz dazu sprechen die um etwa 50% reduzierten Gehalte der Cyclohexenonderivate dafür, dass MtCCD1-Aktivität nur für die Bildung eines der beiden C₁₃-Spaltprodukte benötigt wird. Diese Schlussfolgerung widerspricht aber dem bis jetzt angenommenen symmetrischen Spaltungsschema der CCD1 an den 9,10- und 9',10'-Positionen des C₄₀-Carotinoids *in planta*, das anhand von *in vitro*-Studien aufgestellt wurde.

Mit der nahezu vollständigen Reduktion der Mycorradicinderivate und der etwa 50-prozentigen Abnahme der Cyclohexenonderivatgehalte geht eine Gelborangefärbung mykorrhizierter Wurzelsysteme von *MtCCD1*-RNAi-Pflanzen einher (vgl. Abb. III-18). Die Gelbfärbung mykorrhizierter Wurzeln vieler, aber nicht aller Wirtspflanzen ist ein seit langem bekanntes Phänomen und basiert auf der Akkumulation von Mycorradicinderivaten (Klingner *et al.*, 1995a). In *M. truncatula* äußert sich diese durch eine eher orangebraune Färbung der Wurzeln (vgl. Abb. I-3), von der sich die beobachtete Gelborangefärbung der *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln aber deutlich absetzt. Da auch die stark reduzierten Mycorradicingehalte in RNAi-Wurzeln gegen Mycorradicin als farbgebende Komponente sprechen, scheinen Verbindungen mit einem anderen Chromophor zu akkumulieren.

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, dass in mykorrhizierten *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln Verbindungen auftreten (vgl. Abb. III-21), die ähnliche Absorptionsmaxima wie C₂₇-Apocarotinoide aus Blüten von *Boronia megastigma* aufweisen (vgl. Tab. III-8; Cooper *et al.*, 2003). Nach alkalischer Hydrolyse der Wurzelextrakte wurden zwei Komponenten identifiziert, die die charakteristischen Absorptionsmaxima von C₂₇-Apocarotinoiden zeigten (vgl. Abb. III-22). Diese Verbindungen könnten für die Gelborangefärbung der *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln verantwortlich sein, da Yokoyama & White (1966) für C₂₇-Apocarotinoide der Citrus-Hybride *Sinton citrangequat* eine gelborange Färbung nachwiesen. Anhand der MS/MS-Daten konnte für eine der beiden Verbindungen (Apo2) die Strukturformel einer C₂₇-Apocarotinoid-Carbonsäure vorgeschlagen werden, die zusätzlich zwei Hexose-Einheiten an der Hydroxygruppe des Cyclohexenrings trägt (vgl. Abb. III-24). Untermuert wird der Strukturvorschlag durch die Übereinstimmung von vier Fragment-Ionen (*m/z* 409, 391, 269, 187, vgl. Abb. III-23 C und D), die Cooper *et al.* (2003) in APCI-MS- und MS/MS-Analysen einer nicht glycosidierten 3-Hydroxy-β-apo-10'-carotinsäure (C₂₇) identifizierten. Da alle der bislang aus mykorrhizierten Wurzeln identifizierten Cyclohexenonderivate einen α-Iononring aufweisen (Strack & Fester, 2006), wird dieser auch der identifizierten C₂₇-Apocarotinoidverbindung zugesprochen, obwohl zu diesem Punkt noch weitere Untersuchungen durchzuführen sind. Die Akkumulation von C₂₇-Apocarotinoiden und der

fehlende Hinweis auf ein Vorkommen des möglichen C₄₀-Vorläufercarotinoids, das unter Annahme des bisherigen CCD1-Spaltungsschemas akkumulieren könnte, sind weitere Indizien, dass in mykorrhizierten Wurzeln keine symmetrische Spaltung der 9,10- und 9',10'-Positionen des C₄₀-Carotinoids vorzuliegen scheint.

Das Vorkommen von C₂₇-Apocarotinoiden in mykorrhizierten *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln lässt vermuten, dass in mykorrhizierten Wurzeln das C₂₇-Apocarotinoid als Substrat für die CCD1 fungiert. Diese Annahme wird durch *in vitro*-Studien von rekombinantem AtCCD1-Protein unterstützt. Für dieses Enzym konnten Schmidt *et al.* (2006) anhand der β -Ionongehalte zeigen, dass ein C₃₀-Apocarotinoid ein deutlich besseres Substrat als β -Carotin darstellt. Wenn C₂₇-Apocarotinoide als Substrate der CCD1 in mykorrhizierten Wurzeln fungieren, dann scheint die Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids in zwei aufeinander folgenden Reaktionsschritten zu erfolgen. Im ersten Schritt entsteht dabei ein C₁₃- und C₂₇-Spaltprodukt. Letzteres wird dann weiter in ein C₁₃- und C₁₄-Produkt durch die CCD1 gespalten. Ein solches Schema wurde bereits von Eugster & Märki-Fischer (1991) bei der Biosynthese von Rosafluen, einem C₁₄-Apocarotinoid aus Rosenblüten, vermutet, rückte jedoch durch die *in vitro*-Studien rekombinanter CCD1-Proteine in den Hintergrund.

Die Carotinoidbiosynthese findet in den Plastiden statt (Cunningham & Gantt, 1998). Anhand von Prognose-Algorithmen und experimentellen Studien konnte aber gezeigt werden, dass alle der bis heute identifizierten CCD1-Proteine im Cytosol lokalisiert sind (Simkin *et al.*, 2004a; Bouvier *et al.*, 2005; Auldridge *et al.*, 2006a; Sun *et al.*, 2008). Auch für MtCCD1 konnte keine erkennbare N-terminale Signalsequenz für den Plastidenimport gefunden werden (vgl. III.4.1). Daraus ergibt sich die Frage, wie eine symmetrische Spaltung des Vorläufercarotinoids erfolgen soll, wenn Substrat und Enzym in zwei verschiedenen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind. Bis heute existiert dafür keine befriedigende Erklärung. Zum einen wird spekuliert, dass ein Transport von Carotinoiden aus den Plastiden ins Cytosol erfolgt, wobei Hinweise existieren, dass in diesen Mechanismus Transportproteine, beispielsweise ABC-Transporter, involviert sein könnten (Bouvier *et al.*, 2005). Eine zweite Erklärung kann der Zerfall der Plastiden sein, der die Substratverfügbarkeit ermöglicht. In mykorrhizierten Wurzeln wäre diese Möglichkeit tatsächlich denkbar. Während der Arbuskelentwicklung tritt eine Proliferation der Plastiden auf, die ein den Arbuskel umschließendes Netzwerk ausbilden (Fester *et al.*, 2001; Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2005). Mit dem Zerfall der Arbuskel geht die Auflösung dieses Netzwerks einher (Fester *et al.*, 2001), was zur Freisetzung des C₄₀-Vorläufercarotinoids führen könnte. Die dritte und aufgrund der erhaltenen Ergebnisse wahrscheinlichste Erklärung kann eine konsekutive, zweistufige, in Plastiden und im Cytosol stattfindende Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids sein. In diesem Fall erfolgt bereits in Plastiden die Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids in ein C₂₇-Apocarotinoid und ein C₁₃-Molekül, das die Vorstufe der Cyclohexenonderivate darstellt. Anschließend können beide entstandenen Verbindungen ins Cytosol transportiert werden. Für die Akkumulation des gebildeten C₂₇-Spaltprodukts im

Cytosol und nicht im Plastiden spricht die Glycosidierung der identifizierten C₂₇-Apocarotinoidverbindung (vgl. Abb. III-24). Hierbei handelt es sich um eine Modifikationsmöglichkeit von Sekundärmetaboliten, die durch cytosolische Enzyme katalysiert wird (Bowles *et al.*, 2006). Im Cytosol kann dann die CCD1 die C₂₇-Apocarotinoide an deren 9,10-Position spalten. Dies führt zur Bildung eines C₁₄-Moleküls als Vorstufe der Mycorradicinderivate und des zweiten C₁₃-Moleküls. Auch bei der Biosynthese von ABA wurde gezeigt, dass die Spaltung der C₄₀-Vorläufercarotinoide 9'-*cis*-Neoxanthin und 9-*cis*-Violaxanthin in Plastiden stattfindet, denn die dafür zuständigen NCEDs verschiedener Pflanzenspezies sind im Plastiden lokalisiert (Nambara & Marion-Poll, 2005). Da die nachfolgenden Syntheseschritte im Cytosol ablaufen (Cheng *et al.*, 2002), wird vermutet, dass das entstandene C₁₅-Spaltprodukt Xanthoxin aus den Plastiden ins Cytosol transportiert wird. Der Mechanismus ist auch hier bis jetzt noch unbekannt (Nambara & Marion-Poll, 2005).

Sollte die Biosynthese der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate tatsächlich über das postulierte zweistufige Spaltungsschema erfolgen, stellt sich die Frage, welche der bisher bekannten CCDs die Spaltung der 9,10-Position des C₄₀-Vorläufercarotinoids in Plastiden katalysiert. In *A. thaliana* existieren neben AtCCD1 drei weitere CCDs (AtCCD4, AtCCD7, AtCCD8), die Doppelbindungen *trans*-konfigurierter Carotinoide spalten (Auldrige *et al.*, 2006b). Das Vorkommen einer weiteren, bis jetzt noch nicht identifizierten plastidären CCD ist auch denkbar, aber eher unwahrscheinlich, weil ihre codierende Sequenz sich vollkommen von den fünf identifizierten *NCED*-Genen bzw. den vier *CCD*-Genen von *A. thaliana* unterscheiden müsste. Da AtCCD7 im Plastiden lokalisiert ist und die höchsten Transkriptmengen in Wurzeln auftreten (Booker *et al.*, 2004; Auldrige *et al.*, 2006a), ist vorstellbar, dass eine CCD7 die Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids in mykorrhizierten Wurzeln katalysieren könnte. Für diese Vermutung sprechen die *in vitro*-Studien von AtCCD7. Diese Untersuchungen zeigen, dass rekombinantes AtCCD7-Protein die spezifische Spaltung der 9,10-Position von β -Carotin katalysiert, das zur Bildung eines C₂₇- und C₁₃-Produkts führt (Schwartz *et al.*, 2004). Außerdem deuten die gemessenen Gehalte der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in mykorrhizierten Wurzeln einer *ccd7*-Mutante von *Pisum sativum* tatsächlich auf die Notwendigkeit einer CCD7 bei der Biosynthese der AM-induzierten Apocarotinoide hin (unveröffentlicht, M. H. Walter, IPB, Halle, Deutschland). Eine schematische Darstellung der postulierten, aufeinander folgenden und durch Kompartimentierung getrennten Spaltungsschritte ist in Abb. IV-2 gezeigt.

Aufgrund der Ergebnisse eines transgenen *loss of function*-Ansatzes der *CCD1* in *S. lycopersicum*, der zu keinen erhöhten Carotinoidgehalten in den RNAi-Pflanzen führte (Simkin *et al.*, 2004a), ist vorstellbar, dass dieses Schema nicht ausschließlich für die Biosynthese von C₁₃- und C₁₄-Apocarotinoiden in mykorrhizierten Wurzeln zutrifft, sondern dass das bislang existierende Spaltungsschema der *CCD1 in planta* generell überprüft werden muss. Diese Annahme wird zusätzlich durch *ccd1*-Mutanten von *A. thaliana* unterstützt. Die

Analyse dieser Mutanten zeigte, dass lediglich die Carotinoidgehalte der Samen um ca. 37% gegenüber dem Wildtyp erhöht waren, während in den Blättern keine Unterschiede vorlagen (Auldridge *et al.*, 2006a).

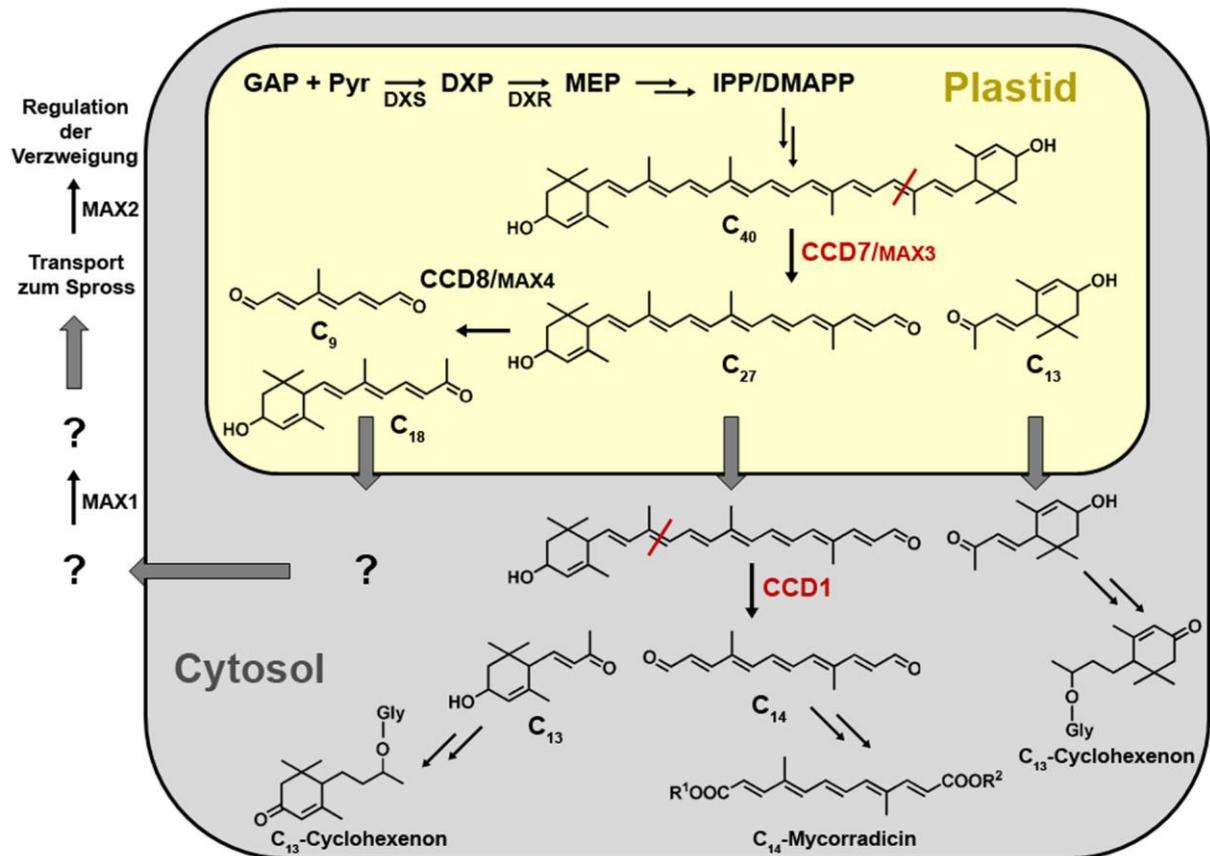


Abb. IV-2: Postuliertes Spaltungsschema des C₄₀-Vorläufercarotinoids zur Synthese der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate. Neben der AM-induzierten Biosynthese der Apocarotinoide ist ebenfalls die Bildung eines bis jetzt noch nicht identifizierten Phytohormons dargestellt, das als Carotinoidderivat beschrieben wird und ebenfalls CCD7-Aktivität für dessen Biosynthese benötigt (Booker *et al.*, 2004). GAP: Glycerinaldehyd-3-phosphat, Pyr: Pyruvat, DXS: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, DXP: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat, DXR: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, MEP: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, IPP: Isopentenylidiphosphat, DMAPP: Dimethylallyldiphosphat, CCD: carotinoid-spaltende Dioxygenase, MAX: *more axillary branching*.

Booker *et al.* (2004) konnten zeigen, dass eine CCD7 auch an der Biosynthese eines bis jetzt noch nicht identifizierten Phytohormons beteiligt ist, das die laterale Verzweigung des Sprosses inhibiert. Dieses als Carotinoidderivat beschriebene, aber strukturell noch nicht aufgeklärte Phytohormon, wird prinzipiell, aber nicht ausschließlich, in der Wurzel gebildet und akropetal in den Spross transportiert (Turnbull *et al.*, 2002). Eine weitere CCD, die in die Biosynthese dieses Phytohormons involviert zu sein scheint, ist CCD8, ein ebenfalls plastidäres Enzym (Auldridge *et al.*, 2006a). Auf Veränderungen in *AtCCD7* (*MAX3*) und *AtCCD8* (*MAX4*) werden die *max3*- und *max4* (*more axillary branching*)-Mutanten von *A. thaliana* zurückgeführt (Booker *et al.*, 2004; Sorefan *et al.*, 2003). Die Analyse von *max3/max4*-Doppelmutanten deutet darauf hin, dass beide Enzyme im gleichen Syntheseweg agieren, wobei *MAX4* limitierend für die Biosynthese des Phytohormons zu sein scheint

(Auldridge *et al.*, 2006a). Die Co-Expression von *AtCCD7* und *AtCCD8* in einem β -Carotin-akkumulierenden *E. coli*-Stamm resultierte in einem C_{18} -Spaltprodukt, dessen Bildung erst durch die Spaltung des von *AtCCD7* erzeugten C_{27} -Produkts durch die *AtCCD8* möglich war (Schwartz *et al.*, 2004). Sowohl die Mutantanalysen als auch die *in vitro*-Studien lassen somit vermuten, dass *CCD7* und *CCD8* die initialen Schritte der Biosynthese des neuartigen Apocarotinoid-Phytohormons in Plastiden katalysieren (Abb. IV-2). Es wird angenommen, dass *MAX1*, ein Cytochrom P450-Protein, das Phytohormon weiter modifiziert und somit ein mobiles Signal entsteht, das von der Wurzel in den Spross transportiert wird (Booker *et al.*, 2005). In die Signaltransduktion des Phytohormons ist *MAX2*, ein F-Box leucinreiches repeat-Protein, involviert (Stirnberg *et al.*, 2002). Erst kürzlich zeigten Stirnberg *et al.* (2007), dass *MAX2* als Komponente eines SCF-Komplexes fungiert, der an der Regulation des axillären Sprosswachstums an den Nodien beteiligt ist. Der Biosyntheseweg des bis jetzt noch unbekanntes Phytohormons, das die laterale Verzweigung des Sprosses steuert, tritt nicht nur in *Arabidopsis* auf. Orthologe *MAX*-Gene kommen in *P. sativum* (*RMS1/MAX4*; *RMS4/MAX2*; *RMS5/MAX3*; Sorefan *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2006), *P. hybrida* (*DAD1/MAX4*; Snowden *et al.*, 2005) und *O. sativa* vor (*HTD1/MAX3*; *D3/MAX2*; *D10/MAX4*; Zou *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007; Arite *et al.*, 2007).

Der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte *MtCCD1*-RNAi-Ansatz wurde gewählt, weil die *MtDXS2*-Suppression keine endgültige Schlussfolgerung auf die Bedeutung der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose zuließ. Die Suppression der *MtCCD1* sollte dabei, basierend auf dem bislang angenommenen Spaltungsschema der *CCD1* an den 9,10- und 9',10'-Positionen eines C_{40} -Carotinoids (Abb. IV-1), mit der Akkumulation des derzeit noch unbekanntes C_{40} -Vorläufercarotinoids und der Reduktion der AM-induzierten Apocarotinoide einhergehen. Da das Spaltungsschema anhand der erhaltenen Ergebnisse revidiert wurde, konnte mit dem *MtCCD1*-RNAi-Ansatz zwar eine nahezu vollständige Reduktion der Mycorradicinderivate erreicht werden, die Cyclohexenonderivatgehalte waren aber lediglich auf ca. 50% gesenkt (vgl. Abb. III-20).

Trotz der nur moderaten Reduktion der Cyclohexenonderivatgehalte wurden die erzeugten *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln genutzt, um die Funktionen der AM-induzierten Apocarotinoide in der Symbiose zu untersuchen. Hierzu erfolgte die Analyse der Transkriptakkumulation von AM-Markergenen, weil bereits bekannt war, dass eine starke Suppression der *MtDXS2*-Transkriptmenge zur Reduktion der Transkriptakkumulation dieser Gene führt (vgl. Tab. III-3 und Tab. III-4). Ein ähnliches Resultat konnte jedoch mit den *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln nicht erhalten werden. Weder *MtPT4* noch weitere analysierte AM-Markergene zeigten eine signifikant geringere Transkriptakkumulation (vgl. Abb. III-25 und Tab. III-9), die mit den der *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln vergleichbar war, obwohl eine starke Suppression der *MtCCD1* erzielt wurde.

Bereits die Korrelationsanalysen der *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen deuteten an, dass die reduzierten Gehalte der Mycorradicinderivate vermutlich nicht der Auslöser für die fehlende

Transkriptakkumulation von AM-Markergenen waren (vgl. Abb. III-13 C und Tab. VII-3 im Anhang). Die Ergebnisse des *MtCCDI*-RNAi-Ansatzes unterstützen diese Annahme, weil eine nahezu vollständige Reduktion der Mycorradicinderivate keine Rücknahme der Expression von AM-Markergenen bedingt (vgl. Abb. III-25 A und Tab. III-9). Wenn, wie bereits vermutet, diese nur durch eine starke Reduktion der Cyclohexenonderivate hervorgerufen wird, dann ist aufgrund ihrer lediglich etwa 50-prozentigen Absenkung nicht unerwartet, dass eine reduzierte Transkriptakkumulation von AM-Markergenen in *MtCCDI*-RNAi-Wurzeln nicht beobachtet werden konnte.

Welche Auswirkungen die Akkumulation von C₂₇-Apocarotinoiden, auf die AM-Symbiose hat, ist derzeit noch unbekannt und muss anhand weiterführender Experimente untersucht werden.

Aktuelle Perspektiven für die Bedeutung der AM-induzierten Apocarotinoide in der Symbiose

Über die Funktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose konnte bislang nur spekuliert werden, da kein funktioneller Nachweis existierte, der die Bedeutung dieser Verbindungen in der AM eindeutig belegt. So wurde vermutet, dass Mycorradicinderivate als Radikalfänger zum Schutz der Cortezellen gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies gebildet werden, weil eine Akkumulation von H₂O₂ in Zellen mit kollabierenden Arbuskeln auftritt (Salzer *et al.*, 1999; Fester & Hause, 2005). Schröder *et al.* (2001) wiesen jedoch nach, dass freies und methyliertes Mycorradicin nicht in der Lage ist, die Freisetzung von Sauerstoffradikalen zu unterdrücken, obwohl dies bei dem strukturell sehr ähnlichen Corticrocin des Ektomykorrhiza-Pilzes *Piloderma croceum* beobachtet wurde. Somit sind Mycorradicinderivate als Radikalfänger eher unwahrscheinlich. Als mutmaßliche Bedeutung der Cyclohexenonderivate wurde die Kontrolle der AM-Kolonisierung diskutiert. Für diese Annahme könnten Applikationsstudien von Blumenin, einem C₁₃-Cyclohexenonglycosid, zu mykorrhizierten Wurzeln von *H. vulgare* sprechen, die eine starke Reduktion der AM-Kolonisierung und Arbuskelentwicklung in der frühen Phase der Mykorrhizierung bewirkten (Fester *et al.*, 1999). Ob dieser Effekt auf einer moderat antifungalen Wirkung von Blumenin beruht, ist fraglich, da Fester *et al.* (1999) eine solche Wirkung mittels eines Bioassays nicht bestätigen konnten. Dagegen wurde für das Aglycon von Blumenin, dessen Isolation aus nicht mykorrhizierten Wurzeln von *Z. mays* erfolgte, eine antifungale Wirkung gegenüber bodenbürtigen Pathogenen, z.B. *Fusarium oxysporum* und *Cephalosporium gregatum*, nachgewiesen (Park *et al.*, 2004). Diese fiel jedoch schwächer aus als der Einfluss von 6-Methoxybenzoxazolinon (MBOA) oder der von 6,7-Dimethoxybenzoxazolinon (DMBOA), zwei antifungalen Sekundärmetaboliten von *Z. mays* (Park *et al.*, 2004). Da diese Studien mit phytopathogenen Pilzen durchgeführt wurden, bleibt aber eine direkte antifungale Wirkung des Aglycons von Blumenin gegenüber AM-Pilzen noch nachzuweisen.

Hinweise, dass die AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate eine arbuskelspezifische Funktion besitzen könnten, liefern die Ergebnisse der zellspezifischen Lokalisation der Aktivität des *DXS2-1*- (vorliegende Arbeit) sowie des *PDS*-Promotors (Fester *et al.*, 2002b), die Immunlokalisierung des Biosyntheseenzym DXR (Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2006) und das Vorkommen der Apocarotinoide in kolonisierten Wurzelcortexzellen (Fester *et al.*, 2002a). Ob Mycorradicin- oder Cyclohexenonderivate bzw. beide Verbindungen die Funktionsträger sind, bleibt vorerst spekulativ. Wie bereits erwähnt, deuten die hier erhaltenen Ergebnisse an, dass die Cyclohexenonderivate eine Bedeutung für die AM-Symbiose besitzen könnten. Diese Vermutung muss aber mit weiteren Experimenten bestätigt werden. Trotzdem sind die vorliegenden Ergebnisse in zwei Richtungen deutbar, die im Folgenden aufgezeigt und gewertet werden.

Die signifikante Korrelation zwischen Cyclohexenonderivatgehalt und *MtPT4*-Transkriptakkumulation (vgl. Abb. III-13) und die geringeren Transkriptmengen von AM-Markergenen in RNAi-Wurzeln mit einer starken *MtDXS2*-Suppression (srRNAi, vgl. Tab. III-3 und Tab. III-4) führen zu der Annahme, dass Cyclohexenonderivate eine fördernde Wirkung auf funktionelle, physiologisch aktive Arbuskel besitzen könnten. Studien zur Immunlokalisierung der DXR, dem zweiten Enzym des MEP-Synthesewegs, stehen allerdings mit dieser Hypothese nicht im Einklang, da eine solche Funktion die Biosynthese der Cyclohexenonderivate in Cortexzellen, die sich entwickelnde Arbuskel besitzen, voraussetzen würde. Zwar konnte in *M. truncatula* DXR-Protein auch in Cortexzellen mit jungen, sich entwickelnden Arbuskeln sehr schwach detektiert werden, starke DXR-Signale traten jedoch nur in Zellen mit degenerierenden Arbuskeln auf (Lohse *et al.*, 2006; Strack & Fester, 2006). Dies deutet an, dass die AM-induzierten Apocarotinoide hauptsächlich während des Arbuskelabbaus synthetisiert werden, das in Übereinstimmung mit deren vorwiegender Akkumulation während des Arbuskelabbaus steht (Fester *et al.*, 2002a). Aus diesem Grund ist es als wahrscheinlicher zu werten, dass Cyclohexenonderivate eine Bedeutung im Arbuskelabbau besitzen.

Die hier durchgeführten Untersuchungen zur Arbuskelmorphologie der *MtDXS2*- und *MtCCDI*-RNAi-Wurzeln zeigen, dass in Wurzeln mit reduzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten mehr Arbuskel in der Abbauphase vorliegen und weniger vollständig entwickelte, funktionsfähige Strukturen auftreten (vgl. Abb. III-15 und Abb. III-27). Dies spricht ebenfalls für eine Funktion der AM-induzierten Apocarotinoide im Arbuskelabbau. Da der höhere Anteil degenerierender Arbuskel in den srRNAi-Wurzeln von Experiment I mit den stark reduzierten Cyclohexenonderivatgehalten dieser Pflanzen korreliert (vgl. Abb. III-12 D und Abb. III-15 B), kann diese Veränderung auch eher den verminderten Cyclohexenon- als den Mycorradicinderivaten zugesprochen werden.

Das vermehrte Auftreten von degenerierenden Arbuskeln wirft weitere Fragen nach der Ursache dieser Verschiebung auf. Die Lebensdauer eines Arbuskels in der pflanzlichen Zelle ist auf ca. 7 - 10 Tage begrenzt und umfasst seine Entwicklung bis zum vollständig

ausdifferenzierten Symbioseorgan sowie seinen Zerfall (Alexander *et al.*, 1988). Es wird davon ausgegangen, dass die Wirtszelle während dieses Prozesses keinem Zelltod unterliegt und nach dem Abbau des Arbuskels wieder ein neues Symbioseorgan beherbergen kann (Paszkowski, 2006). Während festgestellt wurde, dass der Entwicklungsprozess des Arbuskels in der Cortezelle teilweise durch die Pflanze reguliert wird (Parniske, 2004; Paszkowski, 2006), ist der Mechanismus des Arbuskelabbaus bis jetzt noch vollständig unbekannt. Anhand der hier erhaltenen Ergebnisse ist jedoch vorstellbar, dass die Cyclohexenonderivate in einen aktiven, von der Pflanze gesteuerten Mechanismus für den Arbuskelabbau involviert sind. Die Reduktion der Cyclohexenonderivate könnte in einem gestörten, langsamer ablaufenden Abbauprozess resultieren, der wiederum ein verstärktes Auftreten degenerierender Strukturen zur Folge haben könnte. Diese Vorstellung steht im Einklang mit den bisherigen experimentellen Ergebnissen.

Es ist denkbar, dass ein von der Pflanze gesteuerter Arbuskelabbau dazu beiträgt, funktionslose Arbuskel aus den Wurzelcortezellen zu beseitigen, um deren Neubesiedlung einhergehend mit der Entwicklung von funktionsfähigen Strukturen zu ermöglichen. Die unveränderte Arbuskelabundanz in den *MtDXS2*- und *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln (vgl. Abb. III-14, Abb. III-26 und Abb. VII-3 im Anhang) und die geringere Anzahl sich entwickelnder Arbuskel in den *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln von Experiment II (vgl. Abb. III-15) würden diese Hypothese stützen. Der von der Pflanze gesteuerte Arbuskelabbau würde somit die Aufrechterhaltung der mutualistischen Lebensgemeinschaft sichern.

Hinweise auf die Existenz eines von der Pflanze gesteuerten Arbuskelabbaumechanismus kann der *loss of function*- bzw. Mutationsansatz des AM-spezifischen Phosphattransporters MtPT4 liefern (Javot *et al.*, 2007a). Der beobachtete frühzeitige Kollaps der Arbuskel, der noch vor dem Erreichen des vollständig ausgebildeten Entwicklungsstadiums des Symbioseorgans in den *MtPT4*-RNAi-Pflanzen bzw. *mtpt4*-Mutanten auftritt, wird von Javot *et al.* (2007a) als das Resultat eines von der Pflanze gesteuerten Arbuskelabbaus vorgeschlagen, der sich als Konsequenz der gestörten symbiontischen Phosphataufnahme der Wirtspflanze abzeichnet.

Aus den vorliegenden Daten stellt sich weiterhin die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen dem gestörten Arbuskelabbau und der beobachteten starken Reduktion der Transkriptniveaus der AM-Markergene der srRNAi-Wurzeln aus Experiment I besteht (vgl. Tab. III-3 und Tab. III-4). Es ist durchaus denkbar, dass die reduzierte Expression von AM-Markergenen eine Folge des gestörten Arbuskelabbaus ist. Dabei kann jedoch nur spekuliert werden, ob diese der erhöhten Anzahl an degenerierenden Arbuskeln und der damit einhergehenden Abnahme an funktionsfähigen Strukturen zuzuschreiben ist, oder ob in der Pflanze aufgrund der reduzierten Anzahl an funktionsfähigen Arbuskeln in einem separaten Mechanismus die AM-vermittelte Genregulation geändert wird.

Fazit und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Funktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate in der AM-Symbiose aufzuklären. Eine eindeutige Bedeutung konnte aber aus den bis jetzt erhaltenen Ergebnissen noch nicht abgeleitet werden. Im Kontext bereits veröffentlichter Ergebnisse über die AM-induzierte Biosynthese und Akkumulation der Apocarotinoide in Cortezzellen mit degenerierenden Arbuskeln kann jedoch anhand der vorliegenden Daten den Apocarotinoiden eine mögliche Funktion in einem pflanzengesteuerten Arbuskelabbau zugesprochen werden. Hinweise darauf liefern hauptsächlich der erhöhte Anteil an degenerierenden Arbuskeln an der Gesamtarbuskelpopulation und die unveränderte Arbuskelabundanz, die sowohl in *MtDXS2*- als auch in *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln beobachtet werden konnten. Außerdem lassen die hier erzielten Ergebnisse vermuten, dass die Cyclohexenonderivate die möglichen Funktionsträger der Apocarotinoide sein könnten. Darüber hinaus könnten aber auch andere Produkte des sekundärstoffwechselspezifischen MEP-Synthesewegs für eine funktionelle AM-Symbiose von entscheidender Bedeutung sein. Da der MEP-Syntheseweg bereits in Cortezzellen mit sich entwickelnden Arbuskeln abläuft (Hans *et al.*, 2004; Lohse *et al.*, 2006), impliziert die deutliche Korrelation zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptakkumulation in *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln die mögliche Bedeutung anderer DXS2-abhängiger Isoprenoidverbindungen für physiologisch aktive Arbuskel. Eine solche Korrelation konnte zwischen *MtCCD1*- und *MtPT4*-Transkriptakkumulation nicht beobachtet werden.

Für die endgültige Aufklärung der Funktion der AM-induzierten Apocarotinoide sind somit weitere Untersuchungen nötig. In zukünftigen Arbeiten sollte sich dabei auf die Blockierung der Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids konzentriert werden, denn mit der *DXS2*-Suppression kann die Beeinflussung von weiteren Isoprenoiden nicht ausgeschlossen werden. Hierzu lieferte die vorliegende Arbeit eine wichtige Voraussetzung, da anhand der erzielten Ergebnisse der *MtCCD1*-Suppression ein neues Biosyntheschema der AM-induzierten Apocarotinoide vorgeschlagen werden konnte. Dabei scheint mehr als nur eine CCD in den Spaltungsprozess des C₄₀-Vorläufercarotinoids involviert zu sein.

Um zu überprüfen, ob das konsekutive, zweistufige Spaltungsschema des C₄₀-Vorläufercarotinoids in mykorrhizierten Wurzeln generelle Gültigkeit besitzt, sind die von Simkin *et al.* (2004a) erzeugten transgenen *SICCD1-antisense*-Linien geeignete Objekte. Des Weiteren ist der Nachweis einer funktionellen CCD7 in mykorrhizierten Wurzeln notwendig, um das bislang angenommene Spaltungsschema endgültig zu revidieren. Dies kann zum einen anhand eines transgenen *loss of function*-Ansatzes in *hairy roots* von *M. truncatula* erfolgen. Weiterhin wären die *rms5*- und *htd1*-Mutanten von *P. sativum* und *O. sativa*, die beide in der CCD7-Aktivität gestört sind, ideale Objekte für diese Untersuchung (Johnson *et al.*, 2006; Zou *et al.*, 2006). Mit Hilfe der *ccd7*-Mutanten sollte es außerdem möglich sein, das bislang unbekanntes AM-induzierte C₄₀-Vorläufercarotinoid zu identifizieren.

In der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Verlaufs der AM-Symbiose bei Pflanzen mit reduzierten Apocarotinoiden nicht möglich, da keine stabilen, transgenen *M. truncatula*-Linien verfügbar waren. Zur weiteren Klärung der Bedeutung der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate sind Mykorrhizierungskinetiken aber essenziell. Erste Informationen hierzu können die bereits erwähnten *SICCD1-antisense*-Linien bzw. *rms5*- und *htd1*-Mutanten geben. Aber auch die Erzeugung stabiler *MtCCD1*- bzw. *MtCCD7*-RNAi-Linien ist denkbar. Darüber hinaus kann die Analyse dieser Pflanzen zeigen, ob, wie bereits angedeutet, die Cyclohexenonderivate tatsächlich die Funktionsträger der Apocarinoide darstellen und deren drastische Reduktion letztendlich auch in der veränderten Regulation AM-induzierter Gene resultiert.

V Zusammenfassung/Summary

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit standen Untersuchungen zur mykorrhizainduzierten Akkumulation von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten in kolonisierten Wurzeln, um deren funktionelle Bedeutung für die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) zu klären. Bisherige Studien über die Biosynthese von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten ließen vermuten, dass sie durch die symmetrische Spaltung eines C₄₀-Carotinoids entstehen, dessen Vorstufen Isopentenylidiphosphat (IPP)/Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) aus dem plastidären Methylerythritolphosphat (MEP)-Weg hervorgehen. Den wesentlichen Ausgangspunkt der Arbeit stellte die von Walter *et al.* (2002) gefundene Korrelation zwischen der Transkriptakkumulation von *1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase2 (DXS2)*, einem Isogen des MEP-Wegs, und der Akkumulation der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate dar. Als experimentelles System dienten transgene *hairy roots* der Modellleguminose *Medicago truncatula*, die über die *Agrobacterium rhizogenes*-vermittelte Wurzelstransformation erzeugt und mit dem AM-Pilz *Glomus intraradices* kolonisiert wurden. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Durch *MtDXS2*-Promotor-Reportergenfusionen konnte Promotoraktivität hauptsächlich in arbuskulierten Cortexzellen nachgewiesen und somit eine zellspezifische Regulation der *MtDXS2*-Expression gezeigt werden.
- Der Nachweis der Biosynthese von Mycorradicin- und Cyclohexenonderivaten über den postulierten sekundärstoffwechselspezifischen, *DXS2*-abhängigen MEP-Weg wurde durch einen RNAi-vermittelten *loss of function*-Ansatz geführt. In mykorrhizierten *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln konnte eine signifikante Reduktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte auf 5 - 20% bzw. 3 - 18% gegenüber den Wurzeln, die eine Vektorkontrolle exprimierten (EV), nachgewiesen werden. Die *DXS1*-Transkriptmengen der *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln blieben dabei unverändert. Phänotypische Unterschiede zwischen RNAi- und EV-Pflanzen wurden nicht festgestellt.
- Die chimären *MtDXS2*-RNAi-Pflanzen wurden auf Veränderungen in der AM-Symbiose untersucht. Durch eine Microarray-basierte Transkriptom-Analyse konnte in RNAi-Wurzeln, deren *MtDXS2*-Transkriptmengen auf ein Niveau von unter 10% reduziert waren (srRNAi), ein Fehlen der Transkriptakkumulation von typischen AM-Markergenen (*MtPT4*, *MtSCP1*, *MtGST1*, *MtGLP1*, *MtLEC7* und *MtBCP1*) nachgewiesen werden. Auswirkung auf den Mykorrhizierungsgrad und die Arbuskelabundanz waren nicht erkennbar. Die Analyse der Arbuskelmorphologie in srRNAi-Wurzeln zeigte aber ein deutlich verstärktes Auftreten von Strukturen, die sich in der Abbauphase befanden. Diese gravierenden Veränderungen traten bei RNAi-Pflanzen mit moderat reduzierter *MtDXS2*-Transkriptmenge (mrRNAi) nicht auf. In mrRNAi-Wurzeln eines früheren Mykorrhizierungsstadiums wurde jedoch ein vermehrtes Vorkommen degenerierender Arbuskel verzeichnet.

- Zur Klärung der Frage, ob die Suppression der Transkriptakkumulation AM-induzierter Gene in *MtDXS2*-RNAi-Wurzeln auf die reduzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte zurückzuführen war, wurde ein RNAi-vermittelter *loss of function*-Ansatz eines späten Biosyntheseschritts dieser Verbindungen verfolgt. Als geeignetes Zielgen wurde das Gen einer putativen carotenoidspaltenden Dioxygenase (CCD1) gewählt. Die heterologe Überexpression von *MtCCD1* in carotinoidakkumulierenden *Escherichia coli*-Stämmen führte zu rekombinantem MtCCD1-Protein. Dieses setzte die Substrate β -Carotin und Zeaxanthin um. Die RNAi-vermittelte Suppression von *MtCCD1* in mykorrhizierten *hairy roots* von *M. truncatula* führte zu einer Gelborangefärbung der Wurzeln und einer drastischen Reduktion der Mycorradicingehalte auf ca. 3 - 6%, während die Cyclohexenonderivate lediglich auf etwa 30 - 47% gesenkt waren. Parallel wurde in mykorrhizierten *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln die Akkumulation einer C₂₇-Apocarotinoidverbindung nachgewiesen. Sowohl die Gehalte der AM-induzierten Apocarotinoide als auch das Vorkommen von C₂₇-Verbindungen widersprechen der bislang angenommenen symmetrischen Carotinoidspaltung zur Bildung der AM-induzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten vielmehr auf eine konsekutive, zweistufige, durch Kompartimentierung getrennte Spaltung des C₄₀-Vorläufercarotinoids hin. Lediglich der zweite Schritt wird hierbei von CCD1 katalysiert.
- Mit der Analyse der *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln hinsichtlich der Auswirkungen von reduzierten Mycorradicin- und Cyclohexenonderivatgehalte auf die AM-Symbiose konnte nachgewiesen werden, dass die drastische Reduktion der Mycorradicingehalte einhergehend mit der etwa 50-prozentigen Abnahme der Cyclohexenonderivatgehalte keine Veränderungen in der Transkriptakkumulation von AM-Markergenen hervorruft. Ungeachtet dessen konnte auch in *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln ein vermehrtes Auftreten degenerierender Arbuskel festgestellt werden.
- Das vermehrte Auftreten von degenerierenden Arbuskeln sowohl in *MtDXS2*- als auch in *MtCCD1*-RNAi-Wurzeln könnte einen ersten Hinweis auf die Funktion der Cyclohexenonderivate in einem pflanzengesteuerten Arbuskelabbau liefern. Dieser dient möglicherweise dazu, funktionslose Arbuskel aus den Wurzelcortexzellen zu beseitigen, um deren Neubesiedlung einhergehend mit der Entwicklung von funktionsfähigen Strukturen zu ermöglichen.

Der Schwerpunkt weiterführender Arbeiten liegt in der endgültigen Aufklärung der Bedeutung der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate für die AM-Symbiose. Hierfür bietet das in der Arbeit aufgezeigte Spaltungsschema des C₄₀-Vorläufercarotinoids einen viel versprechenden Ansatzpunkt für weitere *loss of function*-Ansätze bzw. für die Untersuchung verfügbarer Mutanten.

Summary

During the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis plant roots frequently accumulate mycorradicin and cyclohexenone derivatives, which are thought to be produced by the oxidative cleavage of a still unknown plant C₄₀ carotenoid. The precursors for carotenoid biosynthesis, isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), are produced in the plastidial methylerythritol phosphate (MEP) pathway. To elucidate the functional significance of mycorradicin and cyclohexenone derivatives in the AM symbiosis, the isogene *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphat synthase2* (*DXS2*), encoding the first enzyme of the MEP pathway, was the main focus of this work. Alterations in *DXS2* transcript levels correlate with the accumulating mycorradicin and cyclohexenone derivatives in mycorrhizal roots (Walter *et al.*, 2002). As experimental setup, transgenic hairy roots of the model legume *Medicago truncatula* were generated by the *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation and colonized by the AM-fungus *Glomus intraradices*. The following results were obtained:

- Analysis of the *MtDXS2* promoter fused to the β -glucuronidase reporter gene revealed its activity in arbusculated cortex cells, which reflects a cell-specific regulation of *DXS2* expression.
- The suppression of *MtDXS2* by an RNAi approach led to a significant reduction of mycorradicin and cyclohexenone levels to 5 - 20% and 3 - 18%, respectively, in mycorrhizal roots harboring the RNAi-constructs in comparison to plants transformed with the empty vector (EV). The *MtDXS1* transcript levels and the phenotype of the RNAi plants were unaltered. Therefore it could be concluded that mycorradicin and cyclohexenone derivatives are produced via the *DXS2*-dependent MEP pathway.
- To elucidate the function of mycorradicin and cyclohexenone derivatives in the AM symbiosis, mycorrhizal *MtDXS2* RNAi roots have been characterized. A microarray-based transcriptome analysis revealed that many normally AM-induced marker genes, e.g. *MtPT4*, *MtSCP1*, *MtGST1*, *MtGLP1*, *MtLEC7* and *MtBCP1*, show a strong decrease in their transcript levels in RNAi roots, but only when residual *MtDXS2-1* transcript levels were below approximately 10% (srRNAi). The mycorrhization degree and the arbuscule abundance were unaltered, but a significant increase in the relative number of degenerating arbuscules could be observed in these roots. Important alterations in the transcript levels of normally AM-induced marker genes could not be detected in RNAi roots with moderately reduced *MtDXS2-1* transcript levels (mrRNAi). However, an increase in degenerating arbuscules was also observed in mrRNAi roots from an earlier mycorrhization stage.
- In order to clarify whether the revocation of AM-induced gene expression in srRNAi roots is caused by the reduced mycorradicin and cyclohexenone levels, an RNAi approach of a late step in their biosynthesis was initiated targeting a putative carotenoid cleavage

dioxygenase (CCD1). The heterologous expression of *MtCCD1* in *Escherichia coli* cells engineered to produce β -carotene and zeaxanthin revealed carotenoid cleavage activity of the recombinant protein. The RNAi-mediated suppression of *MtCCD1* led to a yellow-orange coloration of mycorrhizal roots, which coincides with a dramatic decrease in the levels of mycorradicin (5% residual levels) and a only moderate reduction of cyclohexenone derivatives (about 50% residual levels). Concomitantly, the accumulation of C₂₇ apocarotenoids has been detected in these roots. The data obtained from the *MtCCD1* RNAi experiment are contradictory to the hitherto proposed carotenoid cleavage scheme for mycorradicin and cyclohexenone biogenesis. Instead, the results suggest the cleavage of the C₄₀ carotenoid in two consecutive steps, in which CCD1 catalyzes only the second step in the cytosol.

- The analysis of the *MtCCD1* RNAi roots with respect to the effects of the reduced mycorradicin and cyclohexenone derivatives on the AM symbiosis did not show any alterations in the transcript levels of normally AM-induced marker genes albeit an increase in degenerating arbuscules.
- Together with published data, the increase in degenerating arbuscules in *MtDXS2* RNAi roots as well as in *MtCCD1* RNAi roots could be a first hint that cyclohexenone derivatives are involved in a plant-controlled arbuscule degradation process. This process might eliminate the non-functional structures from the cortex cells and thus allow the recolonization of the cells with functional arbuscules.

Future work will focus on finally elucidating the function of mycorradicin and cyclohexenone derivatives for the AM symbiosis. The revised cleavage scheme of the C₄₀ carotenoid proposed in this work represents a promising perspective for further ‘loss of function’ approaches or the analysis of mutants available for enzymes involved in the carotenoid cleavage process.

VI Literatur

- Akiyama K., Matsuzaki K. & Hayashi H.** (2005) Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* **453**: 824-827
- Akiyama K. & Hayashi H.** (2006) Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots. *Ann. Bot.* **97**: 925-931
- Akiyama K.** (2007) Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 1405-1414
- Alexander T., Meier R., Toth R. & Weber H. C.** (1988) Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* L. with reference to *Zea mays* L. *New Phytol.* **110**: 363-370
- Altschul S. F., Madden T. L., Schäffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. & Lipman D. J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Arimura G., Garms S., Maffei M., Bossi S., Schulze B., Leitner M., Mithofer A. & Boland W.** (2008) Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta* **227**: 453-464
- Arite T., Iwata H., Ohshima K., Maekawa M., Nakajima M., Kojima M., Sakakibara H. & Kyojuka J.** (2007) DWARF10, an RMS1/MAX4/DAD1 ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *Plant J.* **51**: 1019-1029
- Augé R.** (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3-42
- Auldridge M. E., Block A., Vogel J. T., Dabney-Smith C., Mila I., Bouzayen M., Magallanes-Lundback M., DellaPenna D., McCarty D. R. & Klee H. J.** (2006a) Characterization of three members of the Arabidopsis carotenoid cleavage dioxygenase family demonstrates the divergent roles of this multifunctional enzyme family. *Plant J.* **45**: 982-993
- Auldridge M. E., McCarty D. R. & Klee H. J.** (2006b) Plant carotenoid cleavage oxygenases and their apocarotenoid products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 315-321
- Bago B., Pfeffer P. & Shachar-Hill Y.** (2000) Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **124**: 949-957
- Barker S. J., Tagu D. & Delp G.** (1998) Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbioses. *Plant Physiol.* **116**: 1201-1207
- Bécard G., Taylor L. P., Douds D. D., Pfeffer P. E. & Doner L. W.** (1995) Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 252-258
- Bennett R. N. & Wallsgrove R. M.** (1994) Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New Phytol.* **127**: 617-633
- Blume B. & Grierson D.** (1997) Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J.* **12**: 731-746
- Bonanomi A., Wiemken A., Boller T. & Salzer P.** (2001) Local induction of a mycorrhiza-specific class III chitinase gene in cortical root cells of *Medicago truncatula* containing developing or mature arbuscules. *Plant Biol.* **3**: 194-200
- Booker J., Auldridge M., Wills S., McCarty D., Klee H. & Leyser O.** (2004) MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Curr. Biol.* **14**: 1232-1238
- Booker J., Sieberer T., Wright W., Williamson L., Willett B., Stirnberg P., Turnbull C., Srinivasan M., Goddard P. & Leyser O.** (2005) MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Dev. Cell* **8**: 443-449
- Bouvier F., d'Harlingue A., Suire C., Backhaus R. A. & Camara B.** (1998) Dedicated roles of plastid transketolases during the early onset of isoprenoid biogenesis in pepper fruits. *Plant Physiol.* **117**: 1423-1431

- Bouvier F., Isner J.-C., Dogbo O. & Camara B.** (2005) Oxidative tailoring of carotenoids: a prospect towards novel functions in plants. *Trends Plant Sci.* **10**: 187-194
- Bouwmeester H. J., Matusova R., Sun Z. & Beale M. H.** (2003) Secondary metabolite signalling in host-parasitic plant interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 358-364
- Bouwmeester H. J., Roux C., Lopez-Raez J. A. & Becard G.** (2007) Rhizosphere communication of plants, parasitic plants and AM fungi. *Trends Plant Sci.* **12**: 224-230
- Bowles D., Lim E.-K., Poppenberger B. & Vaistij F. E.** (2006) Glycosyltransferases of lipophilic small molecules. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 567-597
- Brundrett M., Piché Y. & Peterson R.** (1984) A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Can J. Bot.* **62**: 2128-2134
- Bucher M.** (2007) Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces. *New Phytol.* **173**: 11-26
- Budziszewski G. J., Lewis S. P., Glover L. W., Reineke J., Jones G., Ziemnik L. S., Lonowski J., Nyfeler B., Aux G., Zhou Q., McElver J., Patton D. A., Martienssen R., Grossniklaus U., Ma H., Law M. & Levin J. Z.** (2001) Arabidopsis genes essential for seedling viability: isolation of insertional mutants and molecular cloning. *Genetics* **159**: 1765-1778
- Camara B. & Bouvier F.** (2004) Oxidative remodeling of plastid carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **430**: 16-21
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R. V., Journet E.-P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C. & Denarie J.** (2000) Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647-1666
- Cavagnaro T. R., Gao L.-L., Smith F. A. & Smith S. E.** (2001) Morphology of arbuscular mycorrhizas is influenced by fungal identity. *New Phytol.* **151**: 469-475
- Chabaud M., Boisson-Dernier A., Zhang J., Taylor C. G., Yu O. & Barker D. G.** (2006) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. In: *Medicago truncatula* handbook: Mathesius U., Journet E.-P. & Sumner L. W., <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>
- Cheng W. H., Endo A., Zhou L., Penney J., Chen H. C., Arroyo A., Leon P., Nambara E., Asami T., Seo M., Koshiba T. & Sheen J.** (2002) A unique short-chain dehydrogenase/reductase in Arabidopsis glucose signaling and abscisic acid biosynthesis and functions. *Plant Cell* **14**: 2723-2743
- Chilton M.-D., Tepfer D. A., Petit A., David C., Casse-Delbart F. & Tempé J.** (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* **295**: 432-434
- Cooper C. M., Davies N. W. & Menary R. C.** (2003) C-27 apocarotenoids in the flowers of *Boronia megastigma* (Nees). *J. Agric. Food Chem.* **51**: 2384-2389
- Corradi N., Kuhn G. & Sanders I. R.** (2004) Monophyly of beta-tubulin and H⁺-ATPase gene variants in *Glomus intraradices*: consequences for molecular evolutionary studies of AM fungal genes. *Fungal Genet. Biol.* **41**: 262-273
- Cox G. & Sanders F.** (1974) Ultrastructure of the host-fungus interface in a vesicular-arbuscular mycorrhiza. *New Phytol.* **73**: 901-912
- Cunningham F. X., Pogson B., Sun Z., McDonald K. A., DellaPenna D. & Gantt E.** (1996) Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of Arabidopsis reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell* **8**: 1613-1626
- Cunningham F. X. & Gantt E.** (1998) Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 557-583
- de la Pena E., Echeverria S. R., van der Putten W. H., Freitas H. & Moens M.** (2006) Mechanism of control of root-feeding nematodes by mycorrhizal fungi in the dune grass *Ammophila arenaria*. *New Phytol.* **169**: 829-840
- Demchenko K., Winzer T., Stougaard J., Parniske M. & Pawlowski K.** (2004) Distinct roles of *Lotus japonicus* SYMRK and SYM15 in root colonization and arbuscule formation. *New Phytol.* **163**: 381-392
- Dickson S., Schweiger P., Smith F. A., Söderström B. & Smith S.** (2003) Paired arbuscules in the *Arum*-type arbuscular mycorrhizal symbiosis with *Linum usitatissimum*. *Can. J. Bot.* **81**: 457-463

- Dickson S.** (2004) The *Arum-Paris* continuum of mycorrhizal symbioses. *New Phytol.* **163**: 187-200
- Dixon R., Achnine L., Kota P., Liu C.-J., Reddy M. S. S. & Wang L.** (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomic perspective. *Mol. Plant Pathol.* **3**: 371-390
- Doll J., Hause B., Demchenko K., Pawlowski K. & Krajinski F.** (2003) A member of the germin-like protein family is a highly conserved mycorrhiza-specific induced gene. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1208-1214
- Dondrup M., Goesmann A., Bartels D., Kalinowski J., Krause L., Linke B., Rupp O., Sczyrba A., Pühler A. & Meyer F.** (2003) EMMA: a platform for consistent storage and efficient analysis of microarray data. *J. Biotechnol.* **106**: 135-146
- Douds D. D.** (1994) Relationship between hyphal and arbuscular colonization and sporulation in a mycorrhiza of *Paspalum notatum* Flugge. *New Phytol.* **126**: 233-237
- Dubey V. S., Bhalla R. & Luthra R.** (2003) An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. *J. Biosci.* **28**: 637-646
- Dudareva N., Andersson S., Orlova I., Gatto N., Reichelt M., Rhodes D., Boland W. & Gershenzon J.** (2005) The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 933-938
- Enfissi E. M., Fraser P. D., Lois L. M., Boronat A., Schuch W. & Bramley P. M.** (2005) Metabolic engineering of the mevalonate and non-mevalonate isopentenyl diphosphate-forming pathways for the production of health-promoting isoprenoids in tomato. *Plant Biotechnol. J.* **3**: 17-27
- Erban A., Schauer N., Fernie A. R. & Kopka J.** (2007) Nonsupervised construction and application of mass spectral and retention time index libraries from time-of-flight gas chromatography-mass spectrometry metabolite profiles. In: *Methods in molecular biology*, vol. 358: *Metabolomics: methods and protocols*: Weckwerth W., Humana Press Inc., Totowa, NJ, USA
- Estevez J. M., Cantero A., Romero C., Kawaide H., Jimenez L. F., Kuzuyama T., Seto H., Kamiya Y. & Leon P.** (2000) Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **124**: 95-104
- Estevez J. M., Cantero A., Reindl A., Reichler S. & Leon P.** (2001) 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 22901-22909
- Eugster H. C. & Märki-Fischer E.** (1991) The chemistry of rose pigments. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **30**: 654-672
- Ezawa T., Smith S. & Smith F.** (2002) P metabolism and transport in AM fungi. *Plant Soil* **244**: 221-230
- Fester T., Maier W. & Strack D.** (1999) Accumulation of secondary compounds in barley and wheat roots in response to inoculation with an arbuscular mycorrhizal fungus and co-inoculation with rhizosphere bacteria. *Mycorrhiza* **8**: 241-246
- Fester T., Strack D. & Hause B.** (2001) Reorganization of tobacco root plastids during arbuscule development. *Planta* **213**: 864-868
- Fester T., Hause B., Schmidt D., Halfmann K., Schmidt J., Wray V., Hause G. & Strack D.** (2002a) Occurrence and localization of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal plant roots. *Plant Cell Physiol.* **43**: 256-265
- Fester T., Schmidt D., Lohse S., Walter M., Giuliano G., Bramley P., Fraser P., Hause B. & Strack D.** (2002b) Stimulation of carotenoid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots. *Planta* **216**: 148-154
- Fester T. & Hause G.** (2005) Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza* **15**: 373-379
- Fester T., Wray V., Nimtz M. & Strack D.** (2005) Is stimulation of carotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots a general phenomenon? *Phytochemistry* **66**: 1781-1786
- Frank B.** (1885) Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dtsch. bot. Ges.* **3**: 128-145
- Frenzel A., Manthey K., Perlick A., Meyer F., Pühler A., Küster H. & Krajinski F.** (2005) Combined transcriptome profiling reveals a novel family of arbuscular mycorrhizal-specific *Medicago truncatula* lectin genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **18**: 771-782

- Gaullaud I.** (1905) Etudes sur les mycorrhizes endotrophes. *Rév. Gen. Bot.* **17**: 5-48
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P. & Barker D. G.** (2005) Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection. *Plant Cell* **17**: 3489-3499
- Gianinazzi-Pearson V., Smith S. E., Gianinazzi S. & Smith F. A.** (1991) Enzymatic studies on the metabolism of vesicular-arbuscular mycorrhizas. V. Is H⁺-ATPase a component of ATP-hydrolysing enzyme activities in plant-fungus interface? *New Phytol.* **117**: 61-74
- Gianinazzi-Pearson V., Arnould C., Oufattole M., Arango M. & Gianinazzi S.** (2000) Differential activation of H⁺-ATPase genes by an arbuscular mycorrhizal fungus in root cells of transgenic tobacco. *Planta* **211**: 609-613
- Gianinazzi-Pearson V., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Weidmann S. & Harrison M. J.** (2006) Arbuscular Mycorrhiza. In: *Medicago truncatula* handbook: Mathesius U., Journet E.-P. & Sumner L. W., <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>
- Giri B., Kapoor R. & Mukerji K. G.** (2007) Improved tolerance of *Acacia nilotica* to salt stress by arbuscular mycorrhiza, *Glomus fasciculatum* may be partly related to elevated K/Na ratios in root and shoot tissues. *Microb. Ecol.* **54**: 753-760
- Gomez-Roldan V., Roux C., Girard D., Bécard G. & Puech-Pagés V.** (2007) Strigolactones: promising plant signals. *Plant Signal. Behav.* **2**: 163-164
- Guimil S., Chang H.-S., Zhu T., Sesma A., Osbourn A., Roux C., Ioannidis V., Oakeley E. J., Docquier M., Descombes P., Briggs S. P. & Paszkowski U.** (2005) Comparative transcriptomics of rice reveals an ancient pattern of response to microbial colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 8066-8070
- Guttenberger M.** (2000) Arbuscules of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi inhabit an acidic compartment within plant roots. *Planta* **211**: 299-304
- Hans H., Hause B., Strack D. & Walter M. H.** (2004) Cloning, characterization and immunolocalization of a mycorrhiza inducible 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) in arbuscule-containing cells of *Zea mays*. *Plant Physiol.* **134**: 614-624
- Harrison M. J. & Dixon R. A.** (1993) Isoflavonoid accumulation and gene expression of defense gene transcripts during the establishment of vesicular-arbuscular mycorrhizal associations in roots of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 643-654
- Harrison M. J.** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 361-389
- Harrison M. J., Dewbre G. R. & Liu J.** (2002) A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**: 2413-2429
- Harrison M. J.** (2005) Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **59**: 19-42
- Hause B. & Fester T.** (2005) Molecular and cell biology of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Planta* **221**: 184-196
- Hernández G., Ramírez M., Valdés-López O., Tesfaye M., Graham M. A., Czechowski T., Schlereth A., Wandrey M., Erban A., Cheung F., Wu H. C., Lara M., Town C. D., Kopka J., Udvardi M. K. & Vance C. P.** (2007) Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiol.* **144**: 752-767
- Hewitt E.** (1966) Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, UK
- Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M. & Korenaga T.** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**: 297-300
- Hirschberg J.** (2001) Carotenoid biosynthesis in flowering plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 210-218
- Hohnjec N., Vieweg M. F., Pühler A., Becker A. & Küster H.** (2005) Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol.* **137**: 1283-1301
- Huhman D. V., Berhow M. A. & Sumner L. W.** (2005) Quantification of saponins in aerial and subterranean tissues of *Medicago truncatula*. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 1914-1920

- Hunter W. N. (2007) The non-mevalonate pathway of isoprenoid precursor biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 21573-21577
- Ibdah M., Azulay Y., Portnoy V., Wasserman B., Bar E., Meir A., Burger Y., Hirschberg J., Schaffer A. A., Katzir N., Tadmor Y. & Lewinsohn E. (2006) Functional characterization of CmCCD1, a carotenoid cleavage dioxygenase from melon. *Phytochemistry* **67**: 1579-1589
- Isayenkov S., Fester T. & Hause B. (2004) Rapid determination of fungal colonization and arbuscule formation in roots of *Medicago truncatula* using real-time (RT) PCR. *J. Plant Physiol.* **161**: 1379-1383
- Isayenkov S., Mrosk C., Stenzel I., Strack D. & Hause B. (2005) Suppression of allene oxide cyclase in hairy roots of *Medicago truncatula* reduces jasmonate levels and the degree of mycorrhization with *Glomus intraradices*. *Plant Physiol.* **139**: 1401-1410
- Iuchi S., Kobayashi M., Taji T., Naramoto M., Seki M., Kato T., Tabata S., Kakubari Y., Yamaguchi-Shinozaki K. & Shinozaki K. (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant J.* **27**: 325-333
- Javot H., Penmetsa R. V., Terzaghi N., Cook D. R. & Harrison M. J. (2007a) A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 1720-1725
- Javot H., Pumplin N. & Harrison M. J. (2007b) Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles. *Plant Cell Environ.* **30**: 310-322
- Johnson X., Breich T., Dun E. A., Goussot M., Haurogne K., Beveridge C. A. & Rameau C. (2006) Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol.* **142**: 1014-1026
- Jomaa H., Wiesner J., Sanderbrand S., Altincicek B., Weidemeyer C., Hintz M., Turbachova I., Eberl M., Zeidler J., Lichtenthaler H. K., Soldati D. & Beck E. (1999) Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* **285**: 1573-1576
- Jones F. R. (1924) A mycorrhizal fungus in the roots of legumes and some other plants. *J. Agric. Res.* **29**: 459-470
- Karandashov V. & Bucher M. (2005) Symbiotic phosphate transport in arbuscular mycorrhizas. *Trends Plant Sci.* **10**: 22-29
- Kim S.-M., Kuzuyama T., Chang Y.-J., Song K.-S. & Kim S.-U. (2006) Identification of class2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis. *Planta Med.* **72**: 234-240
- Kim S.-M., Kuzuyama T., Kobayashi A., Sando T., Chang Y.-J. & Kim S.-U. (2008) 1-Hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl-4-diphosphat reductase (IDS) is encoded by multicopy genes in gymnosperms *Ginkgo biloba* and *Pinus taeda*. *Planta* **227**: 287-298
- Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb K. J., Szczygłowski K. & Parniske M. (2005) Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis. *Plant Cell* **17**: 2217-2229
- Kling M., Gianinazzi-Pearson V., Lherminier J. & Jakobsen I. (1996) The development and functioning of mycorrhizas in pea mutants. In: First International Conference on Mycorrhizae, Program and abstracts, Berkeley, CA, USA, p 71
- Klingner A., Bothe H., Wray V. & Marber F.-J. (1995a) Identification of a yellow pigment formed in maize roots upon mycorrhizal colonization. *Phytochemistry* **38**: 53-55
- Klingner A., Hundeshagen B., Kernebeck H. & Bothe H. (1995b) Localization of the yellow pigment formed in roots of gramineous plants colonized by arbuscular fungi. *Protoplasma* **185**: 50-57
- Kosuta S., Chabaud M., Lougnon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. & Bécard G. (2003) A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **131**: 952-962
- Krajinski F. & Frenzel A. (2007) Towards the elucidation of AM-specific transcription in *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **68**: 75-81

- Krajinski F., Hause B., Gianinazzi-Pearson V. & Franken P.** (2002) *Mth1*, a plasma membrane H⁺-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue. *Plant Biol.* **4**: 754-761
- Küster H., Schröder G., Frühling M., Pich U., Rieping M., Schubert I., Perlick A. M. & Pühler A.** (1995) The nodule-specific *VfENOD-GRP3* gene encoding a glycine-rich early nodulin is located on chromosome I of *Vicia faba* L. and is predominantly expressed in the interzone II-III of root nodules. *Plant Mol. Biol.* **28**: 405-421
- 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. & Becker A.** (2004) Construction and validation of cDNA-based Mt6k-RIT macro- and microarrays to explore root endosymbioses in the model legume *Medicago truncatula*. *J. Biotechnol.* **108**: 95-113
- Kuzuyama T., Takagi M., Takahashi S. & Seto H.** (2000) Cloning and characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Streptomyces* sp. Strain CL190, which uses both the mevalonate and nonmevalonate pathways for isopentenyl diphosphate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **182**: 891-897
- Laemmli U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lange B. M., Wildung M. R., McCaskill D. & Croteau R.** (1998) A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 2100-2104
- Larose G., Chênevert R., Moutoglis P., Gagné S., Piché Y. & Vierheilig H.** (2002) Flavonoid levels in roots of *Medicago sativa* are modulated by the developmental stage of the root colonizing arbuscular mycorrhizal fungus. *J. Plant Physiol.* **159**: 1329-1339
- Li H.-Y., Yang G.-D., Shu H.-R., Yang Y.-T., Ye B.-X., Nishida I. & Zheng C.-C.** (2006) Colonization by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus versiforme* induces a defense response against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* in the grapevine (*Vitis amurensis* Rupr.), which includes transcriptional activation of the class III chitinase gene *VCH3*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 154-163
- Lichtenthaler H. K.** (1999) The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 47-65
- Limpens E., Ramos J., Franken C., Raz V., Compaan B., Franssen H., Bisseling T. & Geurts R.** (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J. Exp. Bot.* **55**: 983-992
- Liu J., Blaylock L., Endre G., Cho J., Town C. D., VandenBosch K. A. & Harrison M. J.** (2003) Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Plant Cell* **15**: 2106-2123
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C. D. & Harrison M. J.** (2007) Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots. *Plant J.* **50**: 529-544
- Lohse S., Schliemann W., Ammer C., Kopka J., Strack D. & Fester T.** (2005) Organization and metabolism of plastids and mitochondria in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **139**: 329-340
- Lohse S., Hause B., Hause G. & Fester T.** (2006) FtsZ characterization and immunolocalization in the two phases of plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 1124-1134
- Lois L. M., Campos N., Putra S. R., Danielsen K., Rohmer M. & Boronat A.** (1998) Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxol biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 2105-2110
- Lois L. M., Rodríguez-Concepción M., Gallego F., Campos N. & Boronat A.** (2000) Carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: regulatory role of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase. *Plant J.* **22**: 503-513
- Long S. R.** (2001) Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **125**: 69-72

- Lüdemann A., Strassburg K., Erban A. & Kopka J.** (2008) TagFinder for the quantitative analysis of gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolite profiling experiments. *Bioinformatics* **24**: 732-737
- Maeda D., Ashida K., Iguchi K., Chechetka S. A., Hijikata A., Okusako Y., Deguchi Y., Izui K. & Hata S.** (2006) Knockdown of an arbuscular mycorrhiza-inducible phosphate transporter gene of *Lotus japonicus* suppresses mutualistic symbiosis. *Plant Cell Physiol.* **47**: 807-817
- Maier W., Peipp H., Schmidt J., Wray V. & Strack D.** (1995) Levels of a terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in cereal mycorrhizas. *Plant Physiol.* **109**: 465-470
- Maier W., Hammer K., Dammann U., Schulz B. & Strack D.** (1997) Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the Poaceae. *Planta* **202**: 36-42
- Maier W., Schneider B. & Strack D.** (1998) Biosynthesis of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives in mycorrhizal barley roots proceeds via the glyceraldehyde 3-phosphate/pyruvate pathway. *Tetrahedron Lett.* **39**: 521-524
- Maier W., Schmidt J., Wray V., Walter M. & Strack D.** (1999) The arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, induces the accumulation of cyclohexenone derivatives in tobacco roots. *Planta* **207**: 620-623
- Maier W., Schmidt J., Nimtze M., Wray V. & Strack D.** (2000) Secondary products in mycorrhizal roots of tobacco and tomato. *Phytochemistry* **54**: 473-479
- Mandel M., Feldmann K., Herrera-Estrella L., Roche-Sosa M. & Leon P.** (1996) *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant J.* **9**: 649-658
- Manthey K., Krajinski F., Hohnjec N., Firnhaber C., Pühler A., Perlick A. & Küster H.** (2004) Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**: 1063-1077
- Mathieu S., Terrier N., Procureur J., Bigey F. & Gunata Z.** (2005) A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C13-norisoprenoid accumulation. *J. Exp. Bot.* **56**: 2721-2731
- Matusova R., Rani K., Verstappen F. W., Franssen M. C., Beale M. H. & Bouwmeester H. J.** (2005) The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.* **139**: 920-934
- Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L. & Lukyanov S. A.** (1999) Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nat. Biotechnol.* **17**: 969-973
- Miller B., Heuser T. & Zimmer W.** (1999) A *Synechococcus leopoliensis* SAUG 1402-1 operon harboring the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase gene and two additional open reading frames is functionally involved in the dimethylallyl diphosphate synthesis. *FEBS Lett.* **460**: 485-490
- Morandi D.** (1996) Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control. *Plant Soil* **185**: 241-251
- Mullis K. B. & Faloona F. A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* **155**: 335-350
- Munoz-Bertomeu J., Arrillaga I., Ros R. & Segura J.** (2006) Up-regulation of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase enhances production of essential oils in transgenic spike lavender. *Plant Physiol.* **142**: 890-900
- Nambara E. & Marion-Poll A.** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* **56**: 165-185
- Nilsson O. & Olsson O.** (1997) Getting to the root: the role of the *Agrobacterium rhizogenes* rol genes in the formation of hairy roots. *Physiol Plant.* **100**: 463-473
- Okada A., Shimizu T., Okada K., Kuzuyama T., Koga J., Shibuya N., Nojiri H. & Yamane H.** (2007) Elicitor induced activation of the methylerythritol phosphate pathway toward phytoalexins biosynthesis in rice. *Plant Mol. Biol.* **65**: 177-187

- Olah B., Briere C., Becard G., Denarie J. & Gough C.** (2005) 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.* **44**: 195-207
- Ouziad F., Hildebrandt U., Schmelzer E. & Bothe H.** (2005) Differential gene expressions in arbuscular mycorrhizal-colonized tomato grown under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **162**: 634-649
- Park S., Takano Y., Matsuura H. & Yoshihara T.** (2004) Antifungal compounds from the root and root exudate of *Zea mays*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 1366-1368
- Parniske M.** (2004) Molecular genetics of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 414-421
- Paszkowski U.** (2006) A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses 2006. *New Phytol.* **172**: 35-46
- Pfaffl M. W. & Hageleit M.** (2001) Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR. *Biotechnol. Lett.* **23**: 275-282
- Phillips M., Walter M., Ralph S., Dabrowska P., Luck K., Urós E., Boland W., Strack D., Rodríguez-Concepción M., Bohlmann J. & Gershenzon J.** (2007) Functional identification and differential expression of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase in induced terpenoid resin formation of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Mol. Biol.* **65**: 243-257
- Quandt H. J., Pühler A. & Broer I.** (1993) Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.* **6**: 699-706
- Ramakers C., Ruijter J. M., Deprez R. H. & Moorman A. F.** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62-66
- Rasmussen R.** (2001) Quantification on the LightCycler. In: Rapid cycle real-time PCR, methods and applications: Meuer S., Wittwer C. & Nakagawara K., Springer Press, Heidelberg, Deutschland
- Redecker D., Kodner R. & Graham L. E.** (2000) Glomalean fungi from the Ordovician. *Science* **289**: 1920-1921
- Reinhardt D.** (2007) Programming good relations - development of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 98-105
- Remy W., Taylor T. N., Hass H. & Kerp H.** (1994) Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 11841-11843
- Requena N., Serrano E., Ocon A. & Breuninger M.** (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**: 33-40
- Rodríguez-Concepción M. & Boronat A.** (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol.* **130**: 1079-1089
- Rodríguez-Concepción M.** (2006) Early steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Rev.* **5**: 1-15
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B. & Sahn H.** (1993) Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**: 517-524
- Rombauts S., Florquin K., Lescot M., Marchal K., Rouze P. & van de Peer Y.** (2003) Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant Physiol.* **132**: 1162-1176
- Salzer P., Corbière H. & Boller T.** (1999) Hydrogen peroxide accumulation in *Medicago truncatula* roots colonized by the arbuscular mycorrhiza-forming fungus *Glomus intraradices*. *Planta* **208**: 319-325
- Sambrook J. & Russell D. W.** (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Sanchez-Hernandez C., Lopez M. G. & Delano-Frier J. P.** (2006) Reduced levels of volatile emissions in jasmonate-deficient *spr2* tomato mutants favour oviposition by insect herbivores. *Plant Cell Environ.* **29**: 546-557
- Sandmann G.** (2001) Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. *Arch. Biochem. Biophys.* **385**: 4-12

- Scervino J. M., Ponce M. A., Erra-Bassells R., Vierheilig H., Ocampo J. A. & Godeas A. (2005a) Arbuscular mycorrhizal colonization of tomato by *Gigaspora* and *Glomus* species in the presence of root flavonoids. *J. Plant Physiol.* **162**: 625-633
- Scervino J. M., Ponce M. A., Erra-Bassells R., Vierheilig H., Ocampo J. A. & Godeas A. (2005b) Flavonoids exhibit fungal species and genus specific effects on the presymbiotic growth of *Gigaspora* and *Glomus*. *Mycol. Res.* **109**: 789-794
- Schaarschmidt S., Roitsch T. & Hause B. (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *J. Exp. Bot.* **57**: 4015-4023
- Schliemann W., Schmidt J., Nimtz M., Wray V., Fester T. & Strack D. (2006) Accumulation of apocarotenoids in mycorrhizal roots of *Ornithogalum umbellatum*. *Phytochemistry* **67**: 1196-1205
- Schliemann W., Ammer C. & Strack D. (2008a) Metabolite profiling of mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. *Phytochemistry* **69**: 112-146
- Schliemann W., Kolbe B., Schmidt J., Nimtz M. & Wray V. (2008b) Accumulation of apocarotenoids in mycorrhizal roots of leek (*Allium porrum*). *Phytochemistry* **69**: 1680-1688
- Schmidt H., Kurtzer R., Eisenreich W. & Schwab W. (2006) The carotenase AtCCD1 from *Arabidopsis thaliana* is a dioxygenase. *J. Biol. Chem.* **281**: 9845-9851
- Schröder S., Hildebrandt U., Bothe H. & Niehaus K. (2001) Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Nicotiana tabacum* and *Medicago sativa* cell cultures by corticocin but not by mycorradicin. *Mycorrhiza* **11**: 101-106
- Schüssler A., Schwarzott D. & Walker C. (2001) A new fungal phylum, the *Glomeromycota*: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* **105**: 1413-1421
- Schwartz S., Tan B., Gage D., Zeevaart J. & McCarty D. (1997) Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* **276**: 1872-1874
- Schwartz S. H., Qin X. & Zeevaart J. A. (2001) Characterization of a novel carotenoid cleavage dioxygenase from plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 25208-25211
- Schwartz S. H., Qin X. & Loewen M. C. (2004) The biochemical characterization of two carotenoid cleavage enzymes from *Arabidopsis* indicates that a carotenoid-derived compound inhibits lateral branching. *J. Biol. Chem.* **279**: 46940-46945
- Simkin A. J., Schwartz S. H., Auldridge M., Taylor M. G. & Klee H. J. (2004a) The tomato carotenoid cleavage dioxygenase 1 genes contribute to the formation of the flavor volatiles β -ionone, pseudoionone, and geranylacetone. *Plant J.* **40**: 882-892
- Simkin A. J., Underwood B. A., Auldridge M., Loucas H. M., Shibuya K., Schmelz E., Clark D. G. & Klee H. J. (2004b) Circadian regulation of the PhCCD1 carotenoid cleavage dioxygenase controls emission of β -ionone, a fragrance volatile of petunia flowers. *Plant Physiol.* **136**: 3504-3514
- Simon L., Bousquet J., Lévesque C. R. & Lalonde M. (1993) Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants. *Nature* **363**: 67-69
- Smith F. & Smith S. (1997) Structural diversity in (vesicular)-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytol.* **137**: 373-388
- Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G. & Waterhouse P. M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320
- Smith S. E. & Read D. J. (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. Academic Press, San Diego, CA, USA
- Snowden K. C., Simkin A. J., Janssen B. J., Templeton K. R., Loucas H. M., Simons J. L., Karunairetnam S., Gleave A. P., Clark D. G. & Klee H. J. (2005) The *decreased apical dominance1/Petunia hybrida CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8* gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *Plant Cell* **17**: 746-759
- Sorefan K., Booker J., Haurogné K., Goussot M., Bainbridge K., Foo E., Chatfield S., Ward S., Beveridge C., Rameau C. & Leyser O. (2003) *MAX4* and *RMS1* are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Gene Dev.* **17**: 1469-1474

- Sprenger G. A., Schorken U., Wiegert T., Grolle S., de Graaf A. A., Taylor S. V., Begley T. P., Bringer-Meyer S. & Sahm H.** (1997) Identification of a thiamin-dependent synthase in *Escherichia coli* required for the formation of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate precursor to isoprenoids, thiamin, and pyridoxol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 12857-12862
- Steinkeller S., Lenzemo V., Langer I., Schweiger P., Khaosaad T., Toussaint J.-P. & Vierheilig H.** (2007) Flavonoids and strigolactones in root exudates as signals in symbiotic and pathogenic plant-fungus interactions. *Molecules* **12**: 1290-1306
- Stirnberg P., van De Sande K. & Leyser H. M.** (2002) MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 1131-1141
- Stirnberg P., Furner I. J. & Ottoline Leyser H. M.** (2007) MAX2 participates in an SCF complex which acts locally at the node to suppress shoot branching. *Plant J.* **50**: 80-94
- Strack D., Fester T., Hause B., Schliemann W. & Walter M. H.** (2003) Arbuscular mycorrhiza: biological, chemical, and molecular aspects. *J. Chem. Ecol.* **29**: 1955-1979
- Strack D. & Fester T.** (2006) Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytol.* **172**: 22-34
- Sun Z., Gantt E. & Cunningham F. X., Jr.** (1996) Cloning and functional analysis of the β -carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **271**: 24349-24352
- Sun Z., Hans J., Walter M. H., Matusova R., Beekwilder J., Verstappen F. W. A., Ming Z., van Echelt E., Strack D., Bisseling T. & Bouwmeester H. J.** (2008) Cloning and characterisation of a maize carotenoid cleavage dioxygenase (ZmCCD1) and its involvement in the biosynthesis of apocarotenoids with various roles in mutualistic and parasitic interactions. *Planta* **228**: 789-801
- Tambasco-Studart M., Titiz O., Raschle T., Forster G., Amrhein N. & Fitzpatrick T. B.** (2005) Vitamin B6 biosynthesis in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 13687-13692
- Tan B. C., Schwartz S. H., Zeevaart J. A. & McCarty D. R.** (1997) Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 12235-12240
- Tan B. C., Joseph L. M., Deng W. T., Liu L., Li Q. B., Cline K. & McCarty D. R.** (2003) Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-cis epoxy-carotenoid dioxygenase gene family. *Plant J.* **35**: 44-56
- Taussky H. H. & Shorr E.** (1953) A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. *J. Biol. Chem.* **202**: 675-685
- Tellström V., Usadel B., Thimm O., Stitt M., Küster H. & Niehaus K.** (2007) The lipopolysaccharide of *Sinorhizobium meliloti* suppresses defense-associated gene expression in cell cultures of the host plant *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **143**: 825-837
- Tretner C., Huth U. & Hause B.** (2008) Mechanostimulation of *Medicago truncatula* leads to enhanced levels of jasmonic acid. *J. Exp. Bot.* **59**: 2847-2856
- Trouvelot A., Kough J. L. & Gianinazzi-Pearson V.** (1986) Mesure du taux de mycorrhization VA d'un système racinaire. Recherche des méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle. In: *The mycorrhizae: physiology and genetics*: Gianinazzi-Pearson V. & Gianinazzi S., INRA Presse, Paris, Frankreich
- Turnbull C. G. N., Booker J. P. & Leyser H. M. O.** (2002) Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **32**: 255-262
- Vierheilig H., Alt M., Mohr U., Boller T. & Wiemken A.** (1994) Ethylene biosynthesis and activities of chitinase and β -1,3-glucanase in the roots of host and non-host plants of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi after inoculation with *Glomus mosseae*. *J. Plant Physiol.* **143**: 337-343.
- Vierheilig H., Iseli B., Alt M., Raikhel N., Wiemken A. & Boller T.** (1996) Resistance of *Urtica dioica* to mycorrhizal colonization: a possible involvement of *Urtica dioica* agglutinin. *Plant Soil* **183**: 131-136
- Vierheilig H., Coughlan A. P., Wyss U. & Piché Y.** (1998) Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular-mycorrhizal fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 5004-5007
- Vierheilig H., Gagnon H., Strack D. & Maier W.** (2000) Accumulation of cyclohexenone derivatives in barley, wheat and maize roots in response to inoculation with different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **9**: 291-293

- Vieweg M., Frühling M., Quandt H.-J., Heim U., Bäumlein H., Pühler A., Küster H. & Perlick A.** (2004) The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **17**: 62-69
- Vogel-Mikus K., Pongrac P., Kump P., Necemer M. & Regvar M.** (2006) Colonisation of a Zn, Cd and Pb hyperaccumulator *Thlaspi praecox* Wulfen with indigenous arbuscular mycorrhizal fungal mixture induces changes in heavy metal and nutrient uptake. *Environ. Pollut.* **139**: 362-371
- Vogel J. T., Tan B. C., McCarty D. R. & Klee H. J.** (2008) The carotenoid cleavage dioxygenase 1 enzyme has broad substrate specificity, cleaving multiple carotenoids at two different bond positions. *J. Biol. Chem.* **283**: 11364-11373
- Walter M., Hans J. & Strack D.** (2002) Two distantly related genes encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthases: differential regulation in shoots and apocarotenoid-accumulating mycorrhizal roots. *Plant J.* **31**: 243-254
- Walter M. H., Fester T. & Strack D.** (2000) Arbuscular mycorrhizal fungi induce the non-mevalonate methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis correlated with accumulation of the 'yellow pigment' and other apocarotenoids. *Plant J.* **21**: 571-578
- Walter M. H., Floss D. S., Hans J., Fester T. & Strack D.** (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138
- Whipps J. M.** (2004) Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Can. J. Bot.* **82**: 1198-1227
- Wulf A., Manthey K., Doll J., Perlick A. M., Linke B., Bekel T., Meyer F., Franken P., Küster H. & Krajinski F.** (2003) Transcriptional changes in response to arbuscular mycorrhiza development in the model plant *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 306-314
- Xiang S., Usunow G., Lange G., Busch M. & Tong L.** (2007) Crystal structure of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase, a crucial enzyme for isoprenoids biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **282**: 2676-2682
- Yan H., Saika H., Maekawa M., Takamura I., Tsutsumi N., Kyojuka J. & Nakazono M.** (2007) Rice tillering dwarf mutant *dwarf3* has increased leaf longevity during darkness-induced senescence or hydrogen peroxide-induced cell death. *Genes Genet. Syst.* **82**: 361-366
- Yokoyama H. & White M. J.** (1966) Citrus carotenoids - VI. Carotenoid pigments in the flavedo of *Sinton citrangequat*. *Phytochemistry* **5**: 1159-1173
- Zou J., Zhang S., Zhang W., Li G., Chen Z., Zhai W., Zhao X., Pan X., Xie Q. & Zhu L.** (2006) The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of Arabidopsis *MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *Plant J.* **48**: 687-698

- VII Anhang**
- VII.1 Oligonucleotide**
- VII.2 p35*SuidA*-int**
- VII.3 Transkriptmengen und Apocarotinoidgehalte der chimären Pflanzen von Experiment IV**
- VII.4 Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Pflanzen des Experiments IV**
- VII.5 Differenziell regulierte Gene in mykorrhizierten Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen des Experiments I**

VII.1 Oligonucleotide

Die verwendeten Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Klonierungsarbeiten sowie für Real-Time RT-PCR-Untersuchungen sind in Tab. VII-1 und Tab. VII-2 gelistet.

Tab. VII-1: Sequenzen der Oligonucleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die durchgeführten Klonierungsarbeiten. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (*AscI*, *BamHI*, *HindIII*, *NcoI*, *SwaI*, *SpeI*, *XhoI*), die für die Klonierung verwendet wurden, sind hervorgehoben. fw: *forward*, rev: *reverse*, T_m : ermittelte Schmelztemperatur (MWG).

| Name | Sequenz | T_m |
|----------------------|--|--------|
| CCD1_fw | 5'-tat <u>cca tgg</u> agt ctg aga aaa tag gag g-3' | 63,7°C |
| CCD1-His_rev | 5'-tat <u>ctc gag</u> cag ttt agc ttg ttc ttg-3' | 61,9°C |
| CCD1_rev | 5'-tat <u>ctc gag</u> tta cag ttt agc ttg ttc ttg-3' | 62,7°C |
| P-60_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> cac act ata taa ctt aca aac agc-3' | 67,4°C |
| P-145_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> gca ttc aat att tta aat ata aga aac c-3' | 65,6°C |
| P-211_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> ttt gtt gtt ttc ctt tgg gc-3' | 67,1°C |
| P-332_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> tga tcc tct caa gtt aat ctt gg-3' | 68,4°C |
| P-510_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> ttg gtt gaa agg gaa gta agt c-3' | 68,4°C |
| P-782_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> tat taa gaa taa aat tag cgt ttt gtc-3' | 65,5°C |
| P-993_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> aat acg tcc gtc aat tta atc c-3' | 65,9°C |
| P-2723_fw | 5'-tat <u>ctc gag aag ctt</u> cag cct ttt tta tga ttg-3' | 64,5°C |
| P-2723_rev | 5'-tat <u>cca tgg</u> gat tgt aag aag gtc aga atg aat g-3' | 65,9°C |
| RNAi-I_fw | 5'-ata <u>cta gtc ggc gcg</u> cgt tgc ctc ctt aaa cca aac c-3' | 73,9°C |
| RNAi-I_rev | 5'-atg <u>gat cca ttt aaa ttc</u> agc aga gaa att gat ctt cc-3' | 66,2°C |
| RNAi-II_fw | 5'-ata <u>cta gtc ggc gcg</u> cag ttg cga ttt tgg gat acg-3' | 72,9°C |
| RNAi-II_rev | 5'-atg <u>gat cca ttt aaa tcg</u> aac acc aag aaa ata gga cc-3' | 67,3°C |
| RNAi-CCD1_fw | 5'-tat <u>act agt ggc gcg cct</u> ctg agg ctg ttt atg ttc c-3' | 72,8°C |
| RNAi-CCD1_rev | 5'-tat <u>gga tcc att taa atc</u> tct act gca ttg tag aat atc c-3' | 66,4°C |
| <i>uidA</i> -int_fw | 5'-tat <u>cca tgg</u> gtc agt ccc tta tgt tac g-3' | 65,1°C |
| <i>uidA</i> -int_rev | 5'-tat <u>act agt</u> gtt gtt gat tca ttg ttt gcc-3' | 61,3°C |

Tab. VII-2: Sequenzen der verwendeten Oligonucleotide für Real-Time RT-PCR-Untersuchungen. Zur spezifischen Amplifikation wurden Primer mit einer Schmelztemperatur zwischen 59 - 60°C mit Hilfe der Software Primer Express™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) abgeleitet. Die Größe der amplifizierten PCR-Produkte betrug zwischen 100 - 150 bp und deren Schmelztemperatur 75 - 80°C. fw: *forward*, rev: *reverse*.

| Name | Sequenz |
|----------------------|---|
| <i>GiBTUB1</i> _fw | 5'-cca act tat ggc gat ctc aac a-3' |
| <i>GiBTUB1</i> _rev | 5'-aag acg tgg aaa agg cac ca-3' |
| <i>MtCCD1</i> _fw | 5'-ttc ggt gtt cta ccc cgc tat-3' |
| <i>MtCCD1</i> _rev | 5'-agg cgg cat gtg atc aaa ac-3' |
| <i>MtDXS1</i> _fw | 5'-ccg att ccc aac aag atg ctt-3' |
| <i>MtDXS1</i> _rev | 5'-ggt cat agg ccc ttt gca aga-3' |
| <i>MtDXS2-1</i> _fw | 5'-cac ctt gga tac ata aat cat taa gtc tct-3' |
| <i>MtDXS2-1</i> _rev | 5'-ccg aat ctc ttc tct caa cca aga-3' |
| <i>MtEF</i> _fw | 5'-aga agg aag ctg ct gaga tga ac-3' |
| <i>MtEF</i> _rev | 5'-tga ctg tgc agt agt act tgg tg-3' |
| <i>MtPT4</i> _fw | 5'-aca aat ttg ata gga ttc ttt tgc acg t-3' |
| <i>MtPT4</i> _rev | 5'-tca cat ctt ctc agt tct tga gtc-3' |

Tab. VII-2 fortgesetzt

| Name | Sequenz |
|--------------|---------------------------------------|
| TC94508_fw | 5'-cac tga gtc aca ggg tat gg-3' |
| TC94508_rev | 5'-cgc cgc ctc ttt atc aag ttc-3' |
| TC94919_fw | 5'-tag agg cct ttc gat ggc ttc-3' |
| TC94919_rev | 5'-gct ttc ctt ctg aac atg gca-3' |
| TC95018_fw | 5'-atg ctg gaa cta ttt cac tcc ctg-3' |
| TC95018_rev | 5'-ccc atc acc aag cct tac taa gaa-3' |
| TC95567_fw | 5'-tct ttc gaa gtt gca cct gcc-3' |
| TC95567_rev | 5'-tcc gcg ttg aat agt cca agg-3' |
| TC95820_fw | 5'-aac ttg aaa cgc gcg aaa ctc-3' |
| TC95820_rev | 5'-agc tgg tta att tgc gtc atc c-3' |
| TC96500_fw | 5'-act gtt cta gcc gaa ggt gca-3' |
| TC96500_rev | 5'-acc atg att gcc atg aca act c-3' |
| TC100720_fw | 5'-gct tgg att aag agg agc ttg ca-3' |
| TC100720_rev | 5'-gtc cgg aaa tct tcc tga aat g-3' |
| TC100835_fw | 5'-tgg tga tgt gct cag ctt caa-3' |
| TC100835_rev | 5'-tga aca ctt tag cac ctc ccg-3' |
| TC100912_fw | 5'-gag gct gtt tat gtt ccg cgt-3' |
| TC100912_rev | 5'-gca cga atg att tcc cgg tat-3' |
| TC101060_fw | 5'-gga aaa gca caa cat ggt cag g-3' |
| TC101060_rev | 5'-atc caa atc cat ctt ggt ggc-3' |
| TC101502_fw | 5'-tgc aaa gct ctt caa gct tca c-3' |
| TC101502_rev | 5'-act agc agc tgg tag gaa tcg g-3' |
| TC106289_fw | 5'-cat acg aag aca ggt tcc cga-3' |
| TC106289_rev | 5'-gct cgc att tct tgt att ggc-3' |
| TC106842_fw | 5'-aat gcg gaa gag gac agg atg-3' |
| TC106842_rev | 5'-ggg gtc gat gga gtt gag gaa g-3' |
| TC106954_fw | 5'-aca tct tgt tcc aag ctg gca-3' |
| TC106954_rev | 5'-tgg atc atg ctg aaa acc ca-3' |
| TC109218_fw | 5'-aga tag ctg agg aac gcg gaa-3' |
| TC109218_rev | 5'-cac aag ctc gcc atg att ca-3' |
| TC111430_fw | 5'-atc ctg gtg aaa tta gca acc-3' |
| TC111430_rev | 5'-tgg aag taa gat cag tag gca gg-3' |
| TC112317_fw | 5'-cac aac aac tcg tcg ttg a-3' |
| TC112317_rev | 5'-ccc tct cta aca tct agt cta gat-3' |
| TC112474_fw | 5'-ttg tgc aga ccc aaa cta gtg g-3' |
| TC112474_rev | 5'-cac gaa taa cac caa cag tcc c-3' |

VII.2 p35SuidA-int

Der Vektor p35SuidA-int wurde zur Klonierung der Fusionskonstrukte des *MtDXS2-1*-Promotors und der Promotordelationen mit dem β -Glucuronidase-Gen verwendet. Abb. VII-1 zeigt eine schematische Darstellung des Vektors.

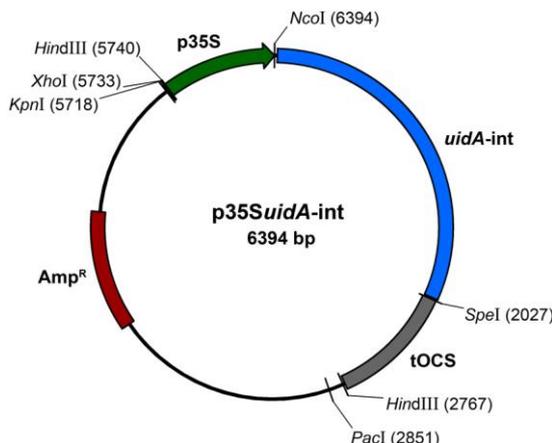


Abb. VII-1: Schematische Darstellung des Vektors p35SuidA-int. *uidA-int*: 17 - 2017 bp, β -Glucuronidase-Gen aus *E. coli* mit Intron; tOCS: 2028 - 2755 bp, Terminator des Octopinsynthesegens aus *A. tumefaciens*; Amp^R: 4185 - 4885 bp, Ampicillinresistenz, p35S: 5756 - 6364 bp, CaMV 35S-Promotor.

VII.3 Transkriptmengen und Apocarotinoidgehalte der chimären Pflanzen von Experiment IV

Die in Abb. VII-2 gezeigten Daten stammen teilweise aus dem Vorexperiment (vgl. Kapitel III.2), sind aber nach den Ordnungsprinzipien von Abb. III-12 neu kombiniert und zusätzlich um Pflanzen sowie um *MtPT4*- und *GiBTUB1*-Transkriptmessungen und Färbeanalysen erweitert worden. Sie werden daher an dieser Stelle präsentiert.

Anhand der ermittelten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen in RNAi-Wurzeln wurde die Einteilung in mrRNAi- bzw. srRNAi-Pflanzen vorgenommen. Die erhaltenen Resultate der *MtPT4*-Transkriptmessungen in EV-, mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln bestätigten das Ergebnis aus Experiment I (vgl. Abb. III-12 B). So konnten in srRNAi-Wurzeln deutlich geringere *MtPT4*-Transkriptmengen im Vergleich zu EV- oder mrRNAi-Wurzeln detektiert werden (Abb. VII-2 B). Auch in mrRNAi-Wurzeln trat im Vergleich zu den EV-Wurzeln eine Reduktion auf. Die Unterschiede der Mittelwerte waren jedoch nicht signifikant.

Die Bestimmung der *GiBTUB1*-Transkriptmenge zeigte keine Unterschiede zwischen EV- und mrRNAi-Wurzeln. Dahingegen wurde in srRNAi-Wurzeln eine geringere *GiBTUB1*-Transkriptakkumulation detektiert (Abb. VII-2 C).

Ähnliche Resultate wie in Experiment I, II und III wurden auch für die AM-induzierten Apocarotinoide der RNAi-Wurzeln erhalten (vgl. Abb. III-12 D und E). Die Reduktion der *MtDXS2-1*-Transkriptmenge in mykorrhizierten Wurzeln führte zu einer signifikanten Reduktion der Mycorradicin- und Cyclohexenonderivate (Abb. VII-2 D und E). Signifikante Unterschiede zwischen den Cyclohexenonderivatgehalten der mrRNAi- und srRNAi-Wurzeln konnten jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. VII-2 D).

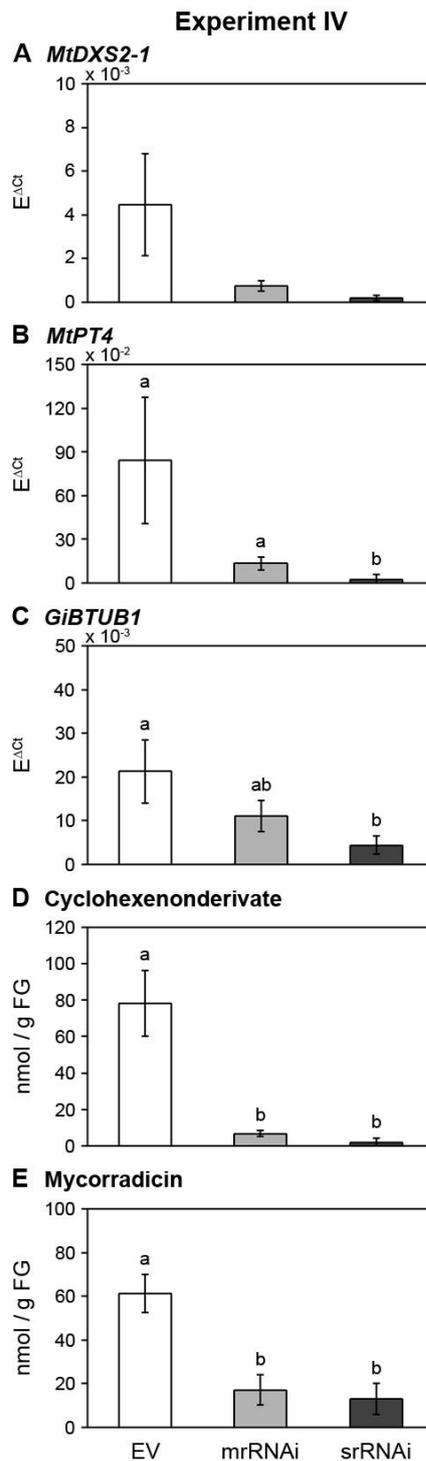


Abb. VII-2: Transkriptmengen und Apocarotinoidgehalte in mykorrhizierten Wurzelsystemen von EV- und RNAi-Pflanzen des Experiments IV. A: *MtDXS2-1*-Transkriptmenge. B: *MtPT4*-Transkriptmenge. C: *GiBTUB1*-Transkriptmenge. D: Cyclohexenonderivatgehalte. E: Mycorradicingehalte. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von fünf EV-Wurzeln (EV), drei RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (mrRNAi) bzw. sechs RNAi-Wurzeln mit stark reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (srRNAi) berechnet. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test bzw. Kruskal-Wallis-Test und Nemenyi-Test (*GiBTUB1* und Cyclohexenonderivate, aufgrund nicht normalverteilter Daten) wurde auf Signifikanz geprüft (a; b; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die Quantifizierung des Mycorradicins erfolgte anhand des externen Standards Crocetin und die Quantifizierung der Cyclohexenonderivate mit dem externen Standard ABA. $E^{\Delta Ct}$: Relative Transkriptmenge bezogen auf EF 1 α .

Mit den Transkript- bzw. Metabolitendaten aller RNAi-Pflanzen wurden ebenfalls Korrelationsanalysen durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptmenge, der bereits mit den Ergebnissen aus Experiment I gezeigt wurde, zu bestätigen. Die berechneten Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) sind in Tab. VII-3 als Korrelationsmatrix aufgeführt. Ein signifikanter Zusammenhang konnte zwischen *MtDXS2-1*- und *MtPT4*-Transkriptakkumulation sowie zwischen der *MtDXS2-1*-Transkriptakkumulation und den Cyclohexenonderivaten ermittelt werden.

Tab. VII-3: Korrelationsmatrix von Transkript- und Metabolitendaten aller RNAi-Wurzeln des Experiments IV. Dargestellt sind die berechneten Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s). Signifikante Korrelationskoeffizienten sind hervorgehoben.

| | <i>MtDXS2-1</i> | <i>MtPT4</i> | Cyclohexenonderivate | Mycorrhadizin |
|----------------------|-----------------|--------------|----------------------|---------------|
| <i>MtDXS2-1</i> | 1,00 | 0,87 | 0,73 | 0,20 |
| <i>MtPT4</i> | 0,87 | 1,00 | 0,68 | 0,05 |
| Cyclohexenonderivate | 0,73 | 0,68 | 1,00 | 0,63 |
| Mycorrhadizin | 0,20 | 0,05 | 0,63 | 1,00 |

VII.4 Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Pflanzen des Experiments IV

In Abb. VII-3 sind die Resultate der Untersuchungen zum Mykorrhizierungsgrad und dem Arbuskelvorkommen von Experiment IV dargestellt. Aus den abgebildeten Diagrammen geht hervor, dass keine Unterschiede in der Frequenz (F, Abb. VII-3 A), der Intensität der Mykorrhizierung (m, Abb. VII-3 B) und in dem Arbuskelvorkommen (a, Abb. VII-3 C) zwischen EV- und RNAi-Wurzeln vorlagen.

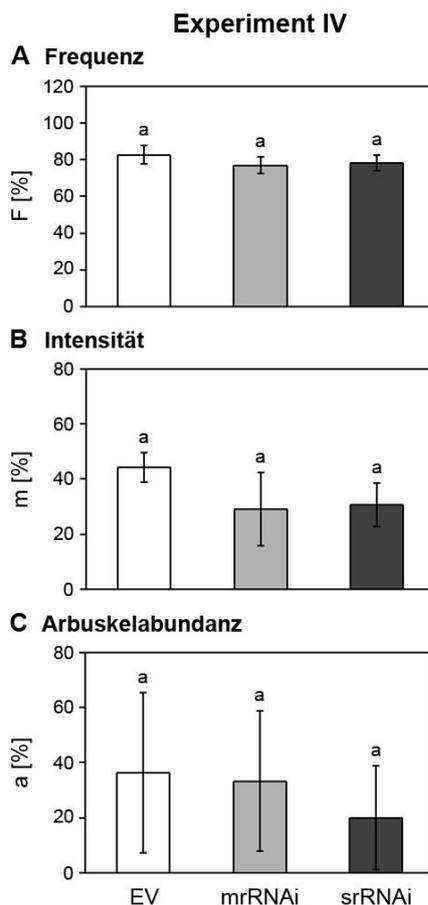


Abb. VII-3: Mykorrhizierungsgrad und Arbuskelvorkommen in Wurzelsegmenten von EV- und RNAi-Pflanzen des Experiments IV. **A:** Frequenz der Mykorrhizierung im gesamten Wurzelsystem, F. **B:** Intensität der AM-Kolonisierung in den Wurzelsegmenten, m. **C:** Arbuskelabundanz in den kolonisierten Wurzelsegmenten, a. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden von fünf EV-Wurzeln (EV), drei RNAi-Wurzeln mit moderat reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (mrRNAi) bzw. sechs RNAi-Wurzeln mit stark reduzierter *MtDXS2-1*-Transkriptmenge (srRNAi) berechnet. Mit *oneway.test* und Tukey-HSD-Test wurde auf Signifikanz geprüft (a; $P \leq 0,05$). Gleiche Buchstaben kennzeichnen Mittelwerte, die keine signifikanten Unterschiede zeigten.

VII.5 Differenziell regulierte Gene in mykorrhizierten Wurzeln mit stark reduzierten *MtDXS2-1*-Transkriptmengen des Experiments I

Die nachfolgenden Tabellen (Tab. VII-4 und Tab. VII-5) listen die erhaltenen \log_2 -Intensitätsverhältnisse (\log_2 -Wert, vgl. II.2.3.5) der Gene zwischen srRNAi- und EV-Wurzeln. Hierbei enthält Tab. VII-4 die ersten 100 Gene, die in srRNAi-Wurzeln eine erhöhte Transkriptakkumulation aufwiesen und Tab. VII-5 die ersten 100 Gene, die in diesen Wurzeln eine reduzierte Transkriptakkumulation im Vergleich zu den EV-Wurzeln besaßen. Die TCs wurden in beiden Tabellen nach absteigenden \log_2 -Werten angeordnet. Die Annotation erfolgte mit dem DFCI *M. truncatula* Gen Index 8.

Tab. VII-4: Log₂-Intensitätsverhältnisse der Gene mit erhöhter Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln des Experiments I. Hervorgehoben sind die log₂-Werte der AM-responsiven Gene, die eine mindestens zweifach erhöhte Transkriptakkumulation (log₂-Wert ≥ 1) mit einem P-Wert ≤ 0,05 zeigten. DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, Oligo ID: Bezeichnung des 70 bp-Oligonucleotids von *M. truncatula*, P: Signifikanzniveau (P-Wert).

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|-----------------------|-----------------|------------------------|---------------|---|
| TC100921 | MT000542 | 5,16 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC100921 <i>homologue to UP Q945Q7 (Q945Q7) Dehydrin-like protein, partial (72%)</i> |
| TC94389 | MT014312 | 4,97 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC94389 <i>similar to UP LEA1_CICAR (O49816) Late embryogenesis abundant protein 1 (CapLEA-1), partial (86%)</i> |
| TC94508 | MT007556 | 4,63 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC94508 <i>similar to UP Q9FDY1 (Q9FDY1) Seed maturation protein LEA 4, partial (45%)</i> |
| TC94388 | MT000274 | 4,40 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC94388 <i>similar to UP LEA1_CICAR (O49816) Late embryogenesis abundant protein 1 (CapLEA-1), partial (86%)</i> |
| TC112317 | MT005274 | 4,08 | 0,0009 | DFCI-MtG18: TC112317 <i>similar to UP LEA1_CICAR (O49816) Late embryogenesis abundant protein 1 (CapLEA-1), partial (25%)</i> |
| TC99967 | MT006873 | 3,88 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC99967 |
| TC109200 | MT010309 | 3,53 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC109200 <i>similar to UP Q8H0B8 (Q8H0B8) Cold-regulated protein, partial (71%)</i> |
| TC94387 | MT014313 | 3,48 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC94387 <i>similar to UP LEA1_CICAR (O49816) Late embryogenesis abundant protein 1 (CapLEA-1), partial (86%)</i> |
| TC112471 | MT013457 | 3,37 | 0,0002 | DFCI-MtG18: TC112471 <i>weakly similar to UP Q9SD98 (Q9SD98) N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein, partial (32%)</i> |
| TC94509 | MT007558 | 3,13 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC94509 <i>similar to UP Q9FNW7 (Q9FNW7) Seed maturation protein LEA 4, partial (50%)</i> |
| TC101956 | MT001804 | 3,07 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC101956 <i>weakly similar to UP Q9FKW8 (Q9FKW8) Senescence-associated protein sen1-like protein (AT5g66170/K2A18_25), partial (71%)</i> |
| TC107798 | MT008389 | 3,06 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC107798 <i>similar to UP Q9FED2 (Q9FED2) AtHVA22e (Abscisic acid-induced-like protein), partial (84%)</i> |
| TC108852 | MT002156 | 2,90 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC108852 <i>similar to UP Q9CAR8 (Q9CAR8) Nitrate transporter (NLT1); 53025-56402, partial (62%)</i> |
| TC102147 | MT001589 | 2,86 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC102147 <i>similar to UP Q940D1 (Q940D1) At1g64110/F22C12_22, partial (74%)</i> |
| TC94074 | MT015170 | 2,80 | 0,0004 | DFCI-MtG18: TC94074 <i>homologue to UP Q9AYM4 (Q9AYM4) VuP5CS protein, partial (32%)</i> |
| TC102703 | MT011453 | 2,76 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC102703 <i>similar to UP HSB7_MOUSE (P35385) Heat-shock protein beta-7 (HspB7) (Cardiovascular heat shock protein) (cvHsp) (Heat shock protein 25 kDa 2) (Protein p19/6.8), partial (9%)</i> |
| TC95254 | MT001082 | 2,73 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95254 <i>similar to PIR G96669 G96669 protein FIN19.23 [imported] - Arabidopsis thaliana {Arabidopsis thaliana}, partial (90%)</i> |
| TC108850 | MT004763 | 2,66 | 0,0008 | DFCI-MtG18: TC108850 |
| TC112217 | MT013585 | 2,66 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC112217 <i>homologue to GB BAB13743.1 10281006 AB046955 pseudo-response regulator 5 {Arabidopsis thaliana}, partial (5%)</i> |
| TC100264 | MT015129 | 2,54 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC100264 <i>homologue to UP Q9M603 (Q9M603) Cold acclimation responsive protein BudCAR5, partial (87%)</i> |
| TC109750 | MT002839 | 2,52 | 0,0006 | DFCI-MtG18: TC109750 <i>similar to UP Q6QB11 (Q6QB11) Little protein 1, partial (96%)</i> |
| TC103392 | MT003591 | 2,51 | 0,0003 | DFCI-MtG18: TC103392 <i>similar to UP Q93ZA3 (Q93ZA3) At1g30760/T5I8_22, partial (28%)</i> |
| TC104576 | MT004098 | 2,50 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC104576 |
| TC111356 | MT005704 | 2,46 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC111356 |
| BG454018 ^A | MT003368 | 2,45 | 0,0002 | DFCI-MtG18: BG454018 <i>similar to UP Q39919 (Q39919) Late embryogenesis abundant protein (Fragment), partial (79%)</i> |
| TC104390 | MT006043 | 2,40 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC104390 <i>similar to GB BAB13743.1 10281006 AB046955 pseudo-response regulator 5 {Arabidopsis thaliana}, partial (21%)</i> |
| TC95168 | MT000869 | 2,40 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95168 <i>weakly similar to UP ENL2_ARATH (Q9T076) Early nodulin-like protein 2 precursor (Phytocyanin-like protein), partial (35%)</i> |
| TC103554 | MT010733 | 2,40 | 0,0008 | DFCI-MtG18: TC103554 |
| TC111908 | MT005610 | 2,37 | 0,0071 | DFCI-MtG18: TC111908 <i>weakly similar to UP Q9FLD8 (Q9FLD8) Gb AAD55291.L, partial (22%)</i> |
| TC95539 | MT008432 | 2,37 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95539 <i>similar to UP Q84N16 (Q84N16) Alkaline alpha-galactosidase II, partial (52%)</i> |
| AW981132 ^A | MT016317 | 2,36 | 0,0595 | DFCI-MtG18: AW981132 <i>similar to UP Q8GTZ1 (Q8GTZ1) BZIP transcription factor, partial (47%)</i> |
| TC95490 | MT001597 | 2,35 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95490 <i>weakly similar to UP Q8LE45 (Q8LE45) Nodulin-like protein, partial (57%)</i> |
| TC107982 | MT001655 | 2,34 | 0,0032 | DFCI-MtG18: TC107982 <i>similar to UP Q94III (Q94III) ERD7 protein (Fragment), partial (57%)</i> |

Tab. VII-4 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|---------------------------------|-----------------|------------------------|---------------|--|
| TC93941 | MT014053 | 2,29 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC93941 similar to UP Q9AYM4 (Q9AYM4) VuP5CS protein, partial (95%) |
| TC105266 | MT011909 | 2,29 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC105266 |
| TC96963 | MT003716 | 2,28 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC96963 homologue to GB CAA51786.1 I052778 PSFERRI ferritin [Pisum sativum], partial (87%) |
| TC95538 | MT011739 | 2,24 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC95538 similar to UP Q39871 (Q39871) Maturation polypeptide, partial (57%) |
| TC94063 | MT007052 | 2,15 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC94063 similar to UP Q7XJH8 (Q7XJH8) Auxin-induced beta-glucosidase, partial (87%) |
| TC96666 | MT003628 | 2,13 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC96666 similar to UP Q9SW88 (Q9SW88) Amine oxidase, partial (48%) |
| TC107226 | MT007766 | 2,11 | 0,0057 | DFCI-MtGI8: TC107226 |
| BG452670^A | MT015128 | 2,08 | 0,0016 | DFCI-MtGI8: BG452670 UP O81392 (O81392) Cold acclimatization responsive protein CARI, partial (21%) |
| TC108431 | MT001499 | 2,07 | 0,0239 | DFCI-MtGI8: TC108431 |
| TC102369 | MT001661 | 2,07 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC102369 similar to PIR T47971 T47971 seven in absentia-like protein - Arabidopsis thaliana {Arabidopsis thaliana}, partial (83%) |
| TC101614 | MT008958 | 2,05 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC101614 similar to UP Q7Y231 (Q7Y231) At1g45150, partial (39%) |
| TC112128 | MT006046 | 2,04 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC112128 |
| TC94670 | MT014072 | 2,03 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC94670 similar to UP Q9XFW9 (Q9XFW9) Glucan-endo-1,3-beta-glucosidase precursor, partial (85%) |
| TC101239 | MT014540 | 2,03 | 0,2170 | DFCI-MtGI8: TC101239 |
| TC104615 | MT014876 | 2,02 | 0,3971 | DFCI-MtGI8: TC104615 similar to UP Q6DBQ2 (Q6DBQ2) At5g19070, partial (59%) |
| TC102663 | MT013224 | 2,01 | 0,0247 | DFCI-MtGI8: TC102663 |
| TC100157 | MT015094 | 2,01 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC100157 homologue to UP Q43437 (Q43437) Photosystem II type I chlorophyll a/b-binding protein precursor, complete |
| TC100133 | MT014051 | 2,01 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC100133 UP O81391 (O81391) Chlorophyll a/b binding protein, complete |
| TC110308 | MT011397 | 2,00 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC110308 similar to UP Q8RWP9 (Q8RWP9) De-etiolated 1-like protein, partial (43%) |
| TC95902 | MT009215 | 2,00 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC95902 similar to UP O80407 (O80407) Chalcone synthase, partial (95%) |
| TC100258 | MT007538 | 1,99 | 0,0105 | DFCI-MtGI8: TC100258 weakly similar to UP Q39801 (Q39801) 51 kDa seed maturation protein precursor, partial (65%) |
| TC101771 | MT002979 | 1,96 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC101771 similar to PIR A86347 A86347 branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase E1-alpha subunit [imported] - Arabidopsis thaliana {Arabidopsis thaliana};, partial (77%) |
| TC95237 | MT000967 | 1,95 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC95237 weakly similar to UP EXR1_ARATH (O23547) Expansin-related protein 1 precursor (AtEXPR1) (At-EXPR1) (Ath-ExpBeta-3.1), partial (82%) |
| No MtDFCI8 sequences below E-10 | MT010572 | 1,94 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: |
| TC108932 | MT002438 | 1,93 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC108932 similar to UP Q9LN68 (Q9LN68) F18014.2 (At1g19300/F18014_13), partial (72%) |
| TC112321 | MT006942 | 1,93 | 0,0078 | DFCI-MtGI8: TC112321 similar to UP Q84TD8 (Q84TD8) At1g67170, partial (30%) |
| TC96124 | MT001868 | 1,91 | NaN | DFCI-MtGI8: TC96124 similar to UP Q9LTS1 (Q9LTS1) Gb AAF21159.1, partial (25%) |
| TC106842 | MT007300 | 1,90 | 0,0007 | DFCI-MtGI8: TC106842 UP P93327 (P93327) Chitinase, complete |
| TC99747 | MT004984 | 1,90 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC99747 similar to UP Q9LIR6 (Q9LIR6) Beta-amylase (AT3g23920/F14O13_11), partial (8%) |
| TC101651 | MT001124 | 1,89 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC101651 similar to GB BAD16629.1 46401564 AB122149 cytochrome P450 monooxygenase [Arabidopsis thaliana], partial (88%) |
| TC101100 | MT002158 | 1,89 | 0,0008 | DFCI-MtGI8: TC101100 weakly similar to UP Q8LJW3 (Q8LJW3) ACR4, partial (76%) |
| TC101100 | MT008718 | 1,89 | 0,0044 | DFCI-MtGI8: TC101100 weakly similar to UP Q8LJW3 (Q8LJW3) ACR4, partial (76%) |
| TC112470 | MT013355 | 1,89 | NaN | DFCI-MtGI8: TC112470 weakly similar to UP Q84XH1 (Q84XH1) RCa12 (Fragment), partial (90%) |
| TC98007 | MT010148 | 1,86 | 0,0034 | DFCI-MtGI8: TC98007 similar to UP Q9ZPL9 (Q9ZPL9) Nodule-enhanced protein phosphatase type 2C, partial (40%) |
| BQ138617 ^A | MT014412 | 1,86 | 0,0009 | DFCI-MtGI8: BQ138617 homologue to GB AAM16209.1 20334906 AY094053 AT5g02020/T7H20_70 {Arabidopsis thaliana}, partial (31%) |

Tab. VII-4 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|---------------|---|
| TC111996 | MT013453 | 1,84 | 0,0162 | DFCI-MtGI8: TC111996 similar to UP/Q9FGQ2 (Q9FGQ2) MtN3-like protein, partial (23%) |
| BF632428^A | MT015140 | 1,83 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: BF632428 UP/Q84MZ5 (Q84MZ5) Galactinol synthase (EC 2.4.1.123), partial (3%) |
| TC102149 | MT010777 | 1,83 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC102149 similar to PIR/S11863/S11863 aldehyde dehydrogenase homologue - garden pea [Pisum sativum], partial (72%) |
| TC100395 | MT007075 | 1,82 | 0,0004 | DFCI-MtGI8: TC100395 |
| BG644406 ^A | MT016207 | 1,82 | 0,0235 | DFCI-MtGI8: BG644406 homologue to UP/Q40175 (Q40175) Transcription factor, partial (42%) |
| TC100287 | MT007019 | 1,81 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC100287 similar to UP/Q9FMK4 (Q9FMK4) Topoisomerase-like protein, partial (57%) |
| TC103486 | MT012947 | 1,80 | NaN | DFCI-MtGI8: TC103486 similar to UP/Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F6I1.30/F6I1.30) (At1g17020/F6I1.30), partial (59%) |
| TC96663 | MT009399 | 1,77 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC96663 similar to GB/AAM65968.1/21594050/AY088432 CONSTANS-like B-box zinc finger protein-like (Arabidopsis thaliana), partial (31%) |
| TC95846 | MT001400 | 1,75 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC95846 similar to UP/Q71QD5 (Q71QD5) Protein phosphatase 2C, partial (31%) |
| TC94110 | MT000029 | 1,74 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC94110 similar to UP/Q5UFQ8 (Q5UFQ8) Protein disulfide isomerase (Fragment), partial (94%) |
| TC100192 | MT015875 | 1,73 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC100192 similar to UP/GAE2_CYATE (O65781) UDP-glucose 4-epimerase GEPI48 (Galactowaldenase) (UDP-galactose 4-epimerase), partial (97%) |
| TC108073 | MT001594 | 1,73 | 0,0022 | DFCI-MtGI8: TC108073 |
| TC109860 | MT010223 | 1,73 | 0,0305 | DFCI-MtGI8: TC109860 similar to UP/Q8LDN3 (Q8LDN3) F-box protein AtFBL5, partial (26%) |
| TC111299 | MT005052 | 1,71 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC111299 similar to UP/O82244 (O82244) Not56-like protein, partial (45%) |
| TC107239 | MT004959 | 1,71 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC107239 similar to UP/Q7GAD9 (Q7GAD9) Expressed protein, partial (38%) |
| TC101513 | MT003446 | 1,70 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC101513 weakly similar to UP/O65373 (O65373) F12F1.7, partial (11%) |
| TC104024 | MT004754 | 1,70 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC104024 |
| TC102084 | MT005948 | 1,70 | 0,0703 | DFCI-MtGI8: TC102084 similar to OMNI/NTL01XC1359/AAM40678.1/21112441/ pili assembly chaperone [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913], partial (6%) |
| TC97429 | MT010064 | 1,68 | 0,0010 | DFCI-MtGI8: TC97429 similar to UP/O82468 (O82468) Protein phosphatase-2C, partial (44%) |
| TC97963 | MT004639 | 1,68 | 0,0004 | DFCI-MtGI8: TC97963 |
| TC107239 | MT001284 | 1,68 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC107239 similar to UP/Q7GAD9 (Q7GAD9) Expressed protein, partial (38%) |
| TC109737 | MT005637 | 1,68 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC109737 |
| TC94931 | MT007937 | 1,67 | 0,0005 | DFCI-MtGI8: TC94931 weakly similar to UP/Q9LUC5 (Q9LUC5) Cytochrome P450, partial (63%) |
| TC100181 | MT015097 | 1,66 | 0,0067 | DFCI-MtGI8: TC100181 homologue to UP/Q9LKI0 (Q9LKI0) LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein, complete |
| TC94044 | MT014873 | 1,65 | 0,1568 | DFCI-MtGI8: TC94044 |
| TC102017 | MT009304 | 1,65 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC102017 |
| TC101004 | MT001287 | 1,64 | 0,0033 | DFCI-MtGI8: TC101004 weakly similar to UP/ALB2_PEA (P08688) Albumin 2 (PA2), partial (96%) |
| TC107811 | MT001063 | 1,64 | 0,0007 | DFCI-MtGI8: TC107811 similar to UP/Q8LKG0 (Q8LKG0) Drm4, partial (86%) |
| TC97662 | MT012050 | 1,62 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC97662 similar to UP/Q5XMB7 (Q5XMB7) Peroxisomal acetoacetyl-coenzyme A thiolase, partial (6%) |
| TC101652 | MT001125 | 1,61 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC101652 similar to UP/Q9FH76 (Q9FH76) Cytochrome P450 monooxygenase (AT5g45340/K9E15_12), partial (31%) |
| TC110752 | MT016381 | 1,61 | 0,0158 | DFCI-MtGI8: TC110752 similar to UP/Q9LJX1 (Q9LJX1) DNA-binding protein-like, partial (73%) |
| TC106525 | MT013732 | 1,61 | 0,0211 | DFCI-MtGI8: TC106525 homologue to UP/Q7M213 (Q7M213) Metallothionein, partial (94%) |

^AGen-Bank ID

Tab. VII-5: Log₂-Intensitätsverhältnisse der Gene mit reduzierter Transkriptakkumulation in srRNAi-Wurzeln des Experiments I. Hervorgehoben sind die log₂-Werte der AM-responsiven Gene, die eine mindestens zweifach reduzierte Transkriptakkumulation (log₂-Wert ≤ -1) mit einem P-Wert ≤ 0,05 zeigten. DFCI ID: TC des DFCI *M. truncatula* Gen Index 8, Oligo ID: Bezeichnung des 70 bp-Oligonucleotids von *M. truncatula*, P: Signifikanzniveau (P-Wert).

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|-----------------------|----------|------------------------|--------|--|
| TC107197 | MT014644 | -5,92 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC107197 weakly similar to GB/CAA66109.3/48426429/CANST2PRO specific tissue protein 2 {Cicer arietinum}, partial (60%) |
| TC94753 | MT008095 | -5,42 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC94753 weakly similar to GB/AAS56884.1/45271006 AY558558 YKL202W {Saccharomyces cerevisiae}, partial (10%) |
| TC105993 | MT006630 | -5,21 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC105993 |
| TC107197 | MT002169 | -5,07 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC107197 weakly similar to GB/CAA66109.3/48426429/CANST2PRO specific tissue protein 2 {Cicer arietinum}, partial (60%) |
| TC105109 | MT012688 | -5,06 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC105109 |
| TC100812 | MT002208 | -4,90 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC100812 |
| TC101060 | MT014645 | -4,87 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC101060 weakly similar to PIR/S66221/S66221 defensin AMPI - Dahlia merckii {Dahlia merckii}, partial (88%) |
| TC100929 | MT007614 | -4,47 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC100929 weakly similar to UP/Q944X2 (Q944X2) 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Fragment), partial (21%) |
| TC99401 | MT006333 | -4,44 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC99401 weakly similar to GB/AAL31246.1/16974485 AY061919 AT4g32480/F8B4_180 {Arabidopsis thaliana}, partial (28%) |
| TC101124 | MT011611 | -4,36 | 0,0011 | DFCI-MtGI8: TC101124 weakly similar to GB/BAB03049.1/9294683 AP001305 syringomycin biosynthesis enzyme-like protein {Arabidopsis thaliana}, partial (24%) |
| TC106762 | MT007246 | -4,22 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC106762 similar to UP/Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F6I1.30/F6I1.30) (At1g17020/F6I1.30), partial (51%) |
| TC102881 | MT009557 | -4,11 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC102881 similar to UP Q6NLG8 (Q6NLG8) At4g33550, partial (27%) |
| TC106955 | MT009186 | -3,96 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC106955 similar to UP Q84P92 (Q84P92) Serine carboxypepsidase (Fragment), partial (33%) |
| TC99834 | MT013300 | -3,86 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC99834 |
| TC106694 | MT007192 | -3,83 | 0,0293 | DFCI-MtGI8: TC106694 similar to UP/O24482 (O24482) Sali3-2, partial (89%) |
| AW587092 ^A | MT015294 | -3,81 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: AW587092 similar to UP/O94597 (O94597) Dubious, partial (10%) |
| TC94481 | MT000394 | -3,80 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC94481 similar to UP/Q9ZWP8 (Q9ZWP8) Cytokinin-specific binding protein, partial (77%) |
| TC106954 | MT009185 | -3,77 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC106954 similar to UP PRTP_HUMAN (P10619) Lysosomal protective protein precursor (Cathepsin A) (Carboxypeptidase C) (Protective protein for beta-galactosidase), partial (16%) |
| TC101124 | MT009696 | -3,76 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC101124 weakly similar to GB/BAB03049.1/9294683 AP001305 syringomycin biosynthesis enzyme-like protein {Arabidopsis thaliana}, partial (24%) |
| TC98232 | MT006638 | -3,69 | 0,0008 | DFCI-MtGI8: TC98232 weakly similar to UP/Q39224 (Q39224) SRG1 protein (F6I1.30/F6I1.30) (At1g17020/F6I1.30), partial (26%) |
| TC100720 | MT009013 | -3,69 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC100720 UP Q8HIY6 (Q8HIY6) Glutathione-S-transferase-like protein, complete |
| TC105730 | MT006037 | -3,68 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC105730 homologue to UP/Q9FUB9 (Q9FUB9) Beta-carotene hydroxylase, partial (50%) |
| TC112474 | MT015000 | -3,68 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC112474 |
| TC106576 | MT007033 | -3,65 | 0,0002 | DFCI-MtGI8: TC106576 similar to UP/Q42487 (Q42487) Extensin-like protein, partial (97%) |
| TC105010 | MT012871 | -3,64 | 0,0007 | DFCI-MtGI8: TC105010 |
| TC106693 | MT015266 | -3,58 | 0,0010 | DFCI-MtGI8: TC106693 similar to UP/O24482 (O24482) Sali3-2, partial (89%) |
| TC101508 | MT002807 | -3,54 | 0,0003 | DFCI-MtGI8: TC101508 similar to UP/Q9ZRW6 (Q9ZRW6) Cytochrome P450, partial (44%) |
| TC109731 | MT003917 | -3,49 | 0,0032 | DFCI-MtGI8: TC109731 |
| TC100930 | MT015416 | -3,49 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: TC100930 weakly similar to UP/Q944Z0 (Q944Z0) 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Fragment), partial (26%) |
| AW329171 ^A | MT007595 | -3,47 | 0,0000 | DFCI-MtGI8: AW329171 weakly similar to GB AAO64923.1/29029088 BT005988 At3g21420 {Arabidopsis thaliana}, partial (10%) |
| TC100867 | MT008641 | -3,39 | 0,0001 | DFCI-MtGI8: TC100867 |

Tab. VII-5 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|-----------------------------|-----------------|------------------------|---------------|---|
| TC95760 | MT015632 | -3,39 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC95760</i> homologue to UP Q9SC38 (Q9SC38) Germin-like protein (Fragment), partial (39%) |
| TC106921 | MT002501 | -3,37 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC106921</i> homologue to UP Q9ARC5 (Q9ARC5) Membrane transporter, complete |
| TC106691 | MT007159 | -3,35 | 0,0010 | <i>DFCI-MtG18: TC106691</i> similar to PIR D86410 D86410 protein F3M18.16 [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i> [<i>Arabidopsis thaliana</i>], partial (22%) |
| TC98338 | MT004813 | -3,33 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC98338</i> similar to UP Q9B6H8 (Q9B6H8) ATP synthase A chain subunit 6, partial (7%) |
| TC107352 | MT007711 | -3,24 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC107352</i> weakly similar to UP Q9LJQ3 (Q9LJQ3) Lipid transfer protein (AT3g18280/MIE15_7), partial (83%) |
| TC108376 | MT002165 | -3,20 | 0,0001 | <i>DFCI-MtG18: TC108376</i> similar to UP Q9FMX9 (Q9FMX9) Serine carboxypeptidase II-like protein, partial (41%) |
| TC98916 | MT013518 | -3,13 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC98916</i> |
| TC109913 | MT010324 | -3,11 | 0,0005 | <i>DFCI-MtG18: TC109913</i> weakly similar to UP Q63079 (Q63079) Collagen alpha1 (Fragment), partial (4%) |
| TC111056 | MT010981 | -3,06 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC111056</i> similar to UP Q9ZTB2 (Q9ZTB2) Nodulin, partial (49%) |
| TC103371 | MT010097 | -3,05 | 0,0003 | <i>DFCI-MtG18: TC103371</i> similar to UP O81861 (O81861) Chitinase-like protein, partial (14%) |
| TC94919 | MT007813 | -3,03 | 0,0003 | <i>DFCI-MtG18: TC94919</i> homologue to UP Q76FS3 (Q76FS3) Beta-tubulin, partial (98%) |
| CB065323^A | MT014360 | -3,02 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: CB065323</i> similar to UP Q6NQ47 (Q6NQ47) At1g72060, partial (22%) |
| TC108095 | MT008464 | -3,02 | 0,0097 | <i>DFCI-MtG18: TC108095</i> similar to UP Q6H453 (Q6H453) Inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase-like protein, partial (62%) |
| TC97349 | MT003121 | -3,01 | 0,0039 | <i>DFCI-MtG18: TC97349</i> similar to UP Q9SAJ3 (Q9SAJ3) T8K14.2 protein, partial (32%) |
| TC95930 | MT014668 | -2,99 | 0,0049 | <i>DFCI-MtG18: TC95930</i> |
| TC98509 | MT003867 | -2,98 | 0,0026 | <i>DFCI-MtG18: TC98509</i> |
| TC104661 | MT005394 | -2,96 | 0,0036 | <i>DFCI-MtG18: TC104661</i> similar to PIR T51355 T51355 membrane protein [imported] - <i>Arabidopsis thaliana</i> (fragment) [<i>Arabidopsis thaliana</i>], partial (37%) |
| TC95018 | MT009704 | -2,95 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC95018</i> UP Q84XR7 (Q84XR7) Germin-like protein 1, complete |
| TC100804 | MT015421 | -2,93 | 0,0016 | <i>DFCI-MtG18: TC100804</i> weakly similar to UP Q7S011 (Q7S011) Predicted protein, partial (5%) |
| TC103212 | MT009454 | -2,92 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC103212</i> similar to UP Q6XAF4 (Q6XAF4) Ent-kaurene oxidase, partial (38%) |
| TC108256 | MT008857 | -2,91 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC108256</i> similar to UP Q9SCX8 (Q9SCX8) Acid phosphatase type 5 precursor (Purple acid phosphatase-like protein) (At3g17790), partial (79%) |
| TC94266 | MT015222 | -2,86 | 0,0005 | <i>DFCI-MtG18: TC94266</i> homologue to UP Q6JA03 (Q6JA03) Proline dehydrogenase, partial (63%) |
| TC106938 | MT014573 | -2,86 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC106938</i> similar to UP Q7XAU5 (Q7XAU5) Isoflavone synthase, partial (44%) |
| TC94219 | MT015106 | -2,85 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC94219</i> similar to UP Q7FNV7 (Q7FNV7) Class 10 PR protein, complete |
| TC102118 | MT001540 | -2,85 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC102118</i> weakly similar to UP Q8L466 (Q8L466) At1g24050/T23E23_11, partial (58%) |
| TC106831 | MT007717 | -2,84 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC106831</i> similar to UP MPPA_SOLTU (P29677) Mitochondrial processing peptidase alpha subunit, mitochondrial precursor (Alpha-MPP) (Ubiquinol-cytochrome-c reductase subunit II) , partial (93%) |
| TC103997 | MT015824 | -2,80 | 0,0010 | <i>DFCI-MtG18: TC103997</i> weakly similar to UP Q84MB3 (Q84MB3) At1g06620, partial (20%) |
| TC94963 | MT007307 | -2,80 | 0,0011 | <i>DFCI-MtG18: TC94963</i> UP Q22301 (Q22301) Phosphate transporter, complete |
| TC106939 | MT001636 | -2,72 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC106939</i> similar to UP Q7XAU5 (Q7XAU5) Isoflavone synthase, complete |
| TC104147 | MT004619 | -2,68 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC104147</i> |
| TC96315 | MT002163 | -2,65 | 0,0011 | <i>DFCI-MtG18: TC96315</i> similar to UP Q9SE01 (Q9SE01) Purple acid phosphatase precursor, partial (39%) |
| TC106479 | MT015052 | -2,63 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC106479</i> homologue to UP O04919 (O04919) Lipoxigenase , complete |
| TC101627 | MT001930 | -2,62 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC101627</i> weakly similar to UP Q9SJW0 (Q9SJW0) Transfactor-like protein, partial (35%) |

Tab. VII-5 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|-----------------------|-----------------|------------------------|---------------|--|
| TC108871 | MT015810 | -2,62 | 0,0038 | DFCI-MtG18: TC108871 similar to PIR/T00864/T00864 cytochrome P450 homologue F17K2.4 - Arabidopsis thaliana [Arabidopsis thaliana], partial (22%) |
| TC100649 | MT000344 | -2,61 | NaN | DFCI-MtG18: TC100649 weakly similar to UP/Q9M674 (Q9M674) Globulin-like protein (Fragment), partial (39%) |
| TC95564 | MT009536 | -2,59 | 0,0002 | DFCI-MtG18: TC95564 homologue to UP/Q84KA1 (Q84KA1) Alternative oxidase (Fragment), partial (9%) |
| TC97013 | MT005465 | -2,59 | 0,0037 | DFCI-MtG18: TC97013 similar to PIR/E96699/E96699 protein F12A21.27 [imported] - Arabidopsis thaliana [Arabidopsis thaliana], partial (88%) |
| TC106921 | MT009589 | -2,57 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC106921 homologue to UP/Q9ARC5 (Q9ARC5) Membrane transporter, complete |
| TC103618 | MT010541 | -2,56 | 0,0001 | DFCI-MtG18: TC103618 similar to UP/Q9ZR46 (Q9ZR46) P69C protein, partial (37%) |
| TC95097 | MT014064 | -2,56 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95097 UP/O22302 (O22302) Phosphate transporter, complete |
| TC96326 | MT001787 | -2,55 | 0,0022 | DFCI-MtG18: TC96326 similar to UP/Q9SCF5 (Q9SCF5) Potassium channel, partial (68%) |
| TC108175 | MT009281 | -2,55 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC108175 similar to UP/Q9SE01 (Q9SE01) Purple acid phosphatase precursor, partial (60%) |
| TC106559 | MT015144 | -2,54 | 0,0003 | DFCI-MtG18: TC106559 homologue to PDB/1BI5_A/5542119/1BI5_A Chain A, Chalcone synthase from alfalfa. [Medicago sativa], partial (35%) |
| TC112408 | MT006777 | -2,52 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC112408 weakly similar to UP/Q7QCU4 (Q7QCU4) ENSANGP00000016848 (Fragment), partial (4%) |
| TC106582 | MT007032 | -2,51 | 0,0092 | DFCI-MtG18: TC106582 similar to UP/Q8LK71 (Q8LK71) Extensin-like protein, partial (84%) |
| TC96034 | MT009715 | -2,48 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC96034 similar to UP/PDP1_ARATH (Q9LRZ5) Phospholipase D p1 (AtPLDp1) (Phospholipase D1 PHOX and PX containing domain) (Phospholipase D zeta 1) (PLDzeta1), partial (15%) |
| TC107501 | MT000870 | -2,47 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC107501 |
| TC98064 | MT013394 | -2,45 | 0,0002 | DFCI-MtG18: TC98064 weakly similar to UP/AFP2_RAPSA (P30230) Cysteine-rich antifungal protein 2 precursor (AFP2), partial (29%) |
| TC95102 | MT008112 | -2,45 | 0,0045 | DFCI-MtG18: TC95102 similar to UP/Q9LSQ5 (Q9LSQ5) 1,4-Benzoquinone reductase-like; Trp repressor binding protein-like (1,4-benzoquinone reductase-like protein), partial (96%) |
| TC97300 | MT004036 | -2,43 | 0,0002 | DFCI-MtG18: TC97300 weakly similar to UP/C901_ARATH (Q42569) Cytochrome P450 90A1, partial (8%) |
| TC96854 | MT010383 | -2,43 | 0,0021 | DFCI-MtG18: TC96854 weakly similar to UP/Q84MB3 (Q84MB3) AtIg06620, partial (59%) |
| TC109049 | MT012160 | -2,42 | 0,0010 | DFCI-MtG18: TC109049 weakly similar to UP/Q93WF7 (Q93WF7) 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase (Fragment), partial (7%) |
| TC104884 | MT004969 | -2,42 | NaN | DFCI-MtG18: TC104884 |
| BE941365 ^A | MT000209 | -2,41 | 0,0000 | DFCI-MtG18: BE941365 UP/Q6WNR0 (Q6WNR0) Isoflavone 2'-hydroxylase, partial (16%) |
| TC105359 | MT012569 | -2,41 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC105359 similar to GB/AAL57656.1/18086395/AY065011 AT5g13210/T31B5_30 [Arabidopsis thaliana], partial (45%) |
| TC106656 | MT000153 | -2,40 | 0,0027 | DFCI-MtG18: TC106656 Medicago truncatula beta glucosidase-like protein (Mtc424) mRNA, partial sequence |
| TC101910 | MT008722 | -2,39 | 0,0001 | DFCI-MtG18: TC101910 similar to UP/Q8LBH4 (Q8LBH4) Ids4-like protein, partial (83%) |
| TC102068 | MT008846 | -2,39 | 0,0002 | DFCI-MtG18: TC102068 |
| TC109456 | MT002377 | -2,37 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC109456 similar to PIR/T51355/T51355 membrane protein [imported] - Arabidopsis thaliana (fragment) [Arabidopsis thaliana], partial (27%) |
| TC106805 | MT007255 | -2,36 | 0,0016 | DFCI-MtG18: TC106805 similar to UP/Q9SP48 (Q9SP48) Homeodomain-leucine zipper protein 56, partial (75%) |
| AJ501421 ^A | MT008315 | -2,36 | 0,0004 | DFCI-MtG18: AJ501421 UP/CIN1_LOLBL (Q05973) Sodium channel protein I brain, partial (0%) |
| TC97195 | MT003543 | -2,36 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC97195 similar to UP/Q9LPR2 (Q9LPR2) F15H18.5, partial (55%) |
| TC100658 | MT000322 | -2,35 | 0,0001 | DFCI-MtG18: TC100658 Medicago truncatula MT4 mRNA sequence |
| TC95190 | MT014174 | -2,35 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC95190 UP/O24093 (O24093) L-Ascorbate oxidase precursor, complete |
| TC101269 | MT001549 | -2,34 | 0,0001 | DFCI-MtG18: TC101269 weakly similar to UP/O80443 (O80443) Expressed protein, partial (66%) |
| TC109576 | MT012101 | -2,33 | 0,0005 | DFCI-MtG18: TC109576 homologue to UP/Q9M5K5 (Q9M5K5) Lipoamide dehydrogenase (AT3g16950/K14A17_7), partial (9%) |
| TC107321 | MT000669 | -2,28 | 0,0000 | DFCI-MtG18: TC107321 similar to UP/E6_GOSHI (Q01197) Protein E6, partial (11%) |

Tab. VII-5 fortgesetzt

| DFCI ID | Oligo ID | log ₂ -Wert | P | Annotation |
|----------|----------|------------------------|--------|---|
| TC100522 | MT007208 | -2,28 | 0,0000 | <i>DFCI-MtG18: TC100522</i> homologue to UP/CFI1_MEDSA (P28012) Chalcone-flavanone isomerase 1 (Chalcone isomerase 1), complete |
| TC101722 | MT015658 | -2,28 | 0,0027 | <i>DFCI-MtG18: TC101722</i> weakly similar to UP/Q6ESL3 (Q6ESL3) DNA binding protein-like, partial (15%) |

^AGen-Bank ID

PUBLIKATIONSLISTE

Teile der vorliegenden Doktorarbeit sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen.

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

Walter M. H., Floß D. S., Hans J., Fester T. & Strack D. (2007) Apocarotenoid biosynthesis in arbuscular mycorrhizal roots: contributions from methylerythritol phosphate pathway isogenes and tools for its manipulation. *Phytochemistry* **68**: 130-138 (Review)

Floß D. S., Hause B., Lange P. R., Küster H., Strack D. & Walter M. H. (2008) Knock-down of the MEP pathway isogene *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2* inhibits formation of arbuscular mycorrhiza-induced apocarotenoids, and abolishes normal expression of mycorrhiza-specific plant marker genes. *Plant J.* **56**: 86-100

Floß D. S., Schliemann W., Schmidt J., Strack D. & Walter M. H. (2008) RNA interference-mediated repression of *MtCCD1* in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula* causes accumulation of C₂₇ apocarotenoids, shedding light on the functional role of CCD1. *Plant Physiol.* **148**: 1267-1282

TAGUNGSBEITRÄGE - VORTRÄGE

Floß D. S.: Suppression of apocarotenoid biosynthesis in mycorrhizal roots by RNA interference of *1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase 2*. 1st IPK Student Conference, 22. - 25.06.2005, Gatersleben, Deutschland

Floß D. S.: RNAi-mediated suppression of apocarotenoid biosynthesis in mycorrhizal roots. 5th Kurt-Mothes-Doktoranden-Workshop, 05. - 07.10.2005, Halle, Deutschland

Floß D. S.: Searching for the function of apocarotenoids in mycorrhizal roots via RNAi-mediated suppression of biosynthesis. 6th Colloquium of the Priority Programme SPP 1084 "Mykorrhiza", 31.10. / 01.11.2005, Neustadt/Weinstraße, Deutschland

Floß D. S.: Regulation of apocarotenoid production in arbuscular mycorrhizal roots. Final Colloquium of the Priority Programme SPP 1084 "Mykorrhiza", 01. - 03.10.2006, Tutzing, Deutschland

Floß D. S.: The importance of the plastid-located methylerythritol phosphate (MEP) pathway for the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis in *Medicago truncatula*. 3rd Plant Science Student Conference, 05. - 08.06.2007, Halle, Deutschland

Floß D. S.: Biosynthesis and function of apocarotenoids in arbuscular mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*. 6th Kurt Mothes Workshop, 18. - 19.09.2008, Jena, Deutschland

TAGUNGSBEITRÄGE - POSTER

Floß D. S., Strack D. & Walter M. H.: Suppression of apocarotenoid biosynthesis in mycorrhizal roots. Terpnets, 20. - 23.04.2005, Wageningen, Niederlande

Floß D. S., Strack D. & Walter M. H.: Evidence for a functional significance of apocarotenoids in the arbuscular mycorrhizal (AM) symbiosis. 2nd IPK Student Conference, 29.05. - 01.06.2006, Gatersleben, Deutschland

Floß D. S., Lohse S., Hans J., Strack D., Walter M. H. & Fester T.: Regulation of apocarotenoid production in arbuscular mycorrhizal roots. 5th International Conference on Mycorrhiza, 23. - 27.07.2006, Granada, Spanien

Floß D. S., Strack D. & Walter M. H.: Apocarotenoids: physiologically relevant compounds for the AM symbiosis or waste products? Botanikertagung, 03. - 07.09.2007, Hamburg, Deutschland

DANKSAGUNG

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und somit zum Gelingen beitrugen. Da es unmöglich ist, alle Namen an dieser Stelle aufzuführen, bitte ich die nicht namentlich genannten Personen vielmals um Verzeihung. Ich habe Sie/Euch nicht vergessen.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Dieter Strack für das Ermöglichen dieser Arbeit durch die Aufnahme in seine Abteilung. Weiterhin danke ich ihm für sein unermüdliches Interesse an meiner Arbeit sowie seine stete Diskussionsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn PD Dr. Michael H. Walter danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Betreuung und Unterstützung sowie das Interesse am Fortgang der Arbeit.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Ralf B. Klösigen vom Institutsbereich Pflanzenphysiologie für die Betreuung der Arbeit von Seiten der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Herrn PD Dr. Helge Küster von der Universität Bielefeld danke ich für die Durchführung der Microarray-Analysen und die Unterstützung bei der Datenauswertung.

Herrn Dr. Joachim Kopka und Alexander Erban vom Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie in Golm möchte ich für die Analysen von polaren Metaboliten, die Hilfestellung bei der Auswertung der Daten und die kurze Einführung in die Annotation von Metaboliten danken.

Frau Yvonne Pöschl vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie danke ich für die statistische Auswertung der Metabolitendaten.

Bei Herrn Dr. Jürgen Schmidt vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie bedanke ich mich für die massenspektrometrischen Untersuchungen.

Herrn Dr. Dr. Gerd Hause vom Biozentrum der Martin-Luther-Universität möchte ich für die Anfertigung von elektronenmikroskopischen Aufnahmen danken, die in der vorliegenden Arbeit leider nicht aufgeführt sind.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Dr. Bernhard Saal vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der Martin-Luther-Universität für die Einarbeitung in die Biostatistik.

Ich bedanke mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Leibniz-Instituts für Pflanzenbiochemie Halle, vor allem der Abteilung Sekundärstoffwechsel für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die gute Zusammenarbeit.

Hierzu zählen vor allem:

Frau PD Dr. Dr. Bettina Hause, der ich ganz herzlich für die Einarbeitung in zellbiologische Arbeitstechniken, die Hilfsbereitschaft beim Umgang mit dem Konfokalmikroskop, die ständige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung danken möchte;

Herr Dr. Peter R. Lange, bei dem ich mich ganz herzlich für die Einarbeitung in die Real Time RT-PCR-Technologie, die interessanten Diskussionen und die fachliche Unterstützung bedanke;

Herr Dr. Willibald Schliemann und Herr Dr. Alfred Baumert, bei denen ich mich für die Einarbeitung in die chemisch-analytischen Verfahren der Metabolitenanalyse, die Hilfsbereitschaft und Unterstützung bedanken möchte;

Die Mädels vom Labor A 116, besonders Kerstin Manke, denen ich ganz herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit danken möchte;

Herr Dr. Thomas Fester und Herr Dr. Joachim Hans, die mir den Beginn meiner Arbeit in der Abteilung Sekundärstoffwechsel in vielerlei Hinsicht erleichterten.

Mein größtes Dankeschön gilt meiner Familie, meinen Eltern, meiner Zwillingsschwester Doreen und meinem Freund René. Ihnen danke ich für die Liebe, das Verständnis und die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und all denen bedanken, die mich besonders in der letzten Phase meiner Doktorarbeit durch unentwegtes Korrekturlesen, intensive Diskussionen, den einen oder anderen Kaffee, abwechslungsreiche Unterhaltungen am Mittagstisch oder einfach nur Gespräche unterstützt haben.

- D A N K E -

LEBENS LAUF

Angaben zur Person

Name Daniela Sigrid Floß
Wohnort Fritz-Reuter-Straße 5
06114 Halle (Saale)
Geburtstag 26.06.1979
Geburtsort Plauen
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig

Schulbildung

1986 bis 1992 Polytechnische Oberschule Pausa
1992 bis 1998 Diesterweg-Gymnasium Plauen
Abschluss: Abitur (Note 1,4)

Studium

1998 bis 2004 Studium der Agrarwissenschaften an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Fachrichtung im Hauptstudium: Pflanzenwissenschaften
Diplomarbeit am damaligen Institut für Pflanzenzüchtung und Pflanzenschutz mit dem Thema: „Entwicklung eines *Agrobacterium tumefaciens*-vermittelten Transformationssysteme für das Mais-Pathogen *Colletotrichum graminicola* (CES.) WILS.“
Auszeichnung der Diplomarbeit durch die damalige Landwirtschaftliche Fakultät und die Gesellschaft der Freunde der Landwirtschaftlichen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg e.V.
Abschluss: Diplom-Agraringenieur (Note 1,0)

Berufstätigkeit

Seit 01.04.2004 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Abteilung Sekundärstoffwechsel, Arbeitsgruppe Molekulare Physiologie der Mykorrhiza, Halle (Saale)

Halle (Saale), Juli 2008

Daniela Floß

Daniela S. Floß

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Ferner erkläre ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrads bewerbe.

Halle (Saale), Juli 2008

Daniela Floß

Daniela S. Floß