

**Analyse der Funktion von  
Signaltransduktions-assoziierten Genen  
in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose  
von *Medicago truncatula***

**Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**M. Sc. Lisa Farina Czaja  
geboren am 06.04.1983 in Haan**

**2012**

Referent: Prof. Dr. Helge Küster

Korreferent: Prof. Dr. Christoph Peterhänsel

Tag der Promotion: 14.09.2012



## ZUSAMMENFASSUNG

Die arbuskuläre Mykorrhiza (AM) ist eine symbiontische Wechselwirkung, die zwischen im Boden lebenden Pilzen der Ordnung *Glomeromycota* und den meisten Landpflanzen ausgebildet wird. In dieser Gemeinschaft profitieren beide Symbiosepartner durch einen gegenseitigen Nährstoffaustausch voneinander. AM-Pilze versorgen ihre Wirtspflanze mit Wasser und Nährstoffen wie beispielsweise Phosphat aus dem Boden und erhalten im Gegenzug dafür Photosyntheseprodukte. Obwohl es sich bei der AM um eine der am weitesten verbreiteten pflanzlichen Symbiosen überhaupt handelt, sind die molekularen Mechanismen, die zu ihrer Ausbildung führen, bislang erst ansatzweise verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die frühe Signaltransduktion der AM anhand der Interaktionen der Modell-Leguminose *Medicago truncatula* mit dem AM-Pilz *Glomus intraradices* untersucht. Dabei lag der Fokus auf der Identifizierung und funktionellen Analyse Signaltransduktions-assoziiierter Pflanzengene. Hierfür erfolgten zunächst umfassende Analysen von Genexpressionsdaten aus verschiedenen Stadien der AM-Symbiose mit *M. truncatula*. Diese führten zur Auswahl und anschließenden Untersuchung von insgesamt 17 Genen, deren Expressionsprofil eine potentielle Bedeutung für die frühe Signaltransduktion der AM nahe legte. Für die funktionellen Analysen dieser Kandidatengene wurden spezifische RNAi(RNA Interferenz)-Konstrukte erstellt und mit dem Retrotransposon Tnt1 erzeugte Insertionsmutanten selektioniert, um ein gezieltes *knockdown* bzw. *knockout* der entsprechenden Gene zu erhalten. Hierfür wurde eine Methodik zur molekularen Identifizierung von Tnt1-Insertionsmutanten in den Kandidatengenomen etabliert. Zudem wurden für einige der untersuchten Gene Promotor-GUS-Konstrukte zur Bestimmung der zellulären Expression in verschiedenen AM-Stadien erstellt. Die Analysen dieser Konstrukte und Mutanten ergaben für die Genprodukte von neun der untersuchten Gene Hinweise auf eine potentiell AM-assoziierte Funktion. Dabei wiesen die Ergebnisse der funktionellen Analysen von sechs dieser Gene auf eine mögliche Rolle in der AM-Symbiose hin, schlossen jedoch aufgrund der beobachteten Effekte eine zentrale Bedeutung dieser Gene in der Signaltransduktion der AM aus. Schließlich konnten drei Gene identifiziert werden, deren funktionelle Analysen auf eine wichtige Funktion für die Ausbildung der AM-Symbiose hindeuteten. Diese Gene kodieren ein Calcium-bindendes Protein, einen GRAS-Transkriptionsfaktor und einen ERF-Transkriptionsfaktor. In allen drei Fällen wurden die betreffenden Gene bereits in frühen AM-Stadien induziert und ein *knockdown* bzw. *knockout* dieser Gene führte zu deutlichen Beeinträchtigungen in der Expression von AM-Markergenen bzw. in der Ausbildung der AM-Symbiose. Die möglichen Funktionen dieser Signaltransduktions-assoziierten Komponenten in der frühen Signaltransduktion, die zur Ausbildung der AM-Symbiose führt, werden diskutiert.

Schlagworte: Arbuskuläre Mykorrhiza, *Medicago truncatula*, Signaltransduktion

## ABSTRACT

The arbuscular mycorrhiza (AM) is a symbiotic association formed between soil fungi belonging to the order *Glomeromycota* and most land plants. The mutualistic benefit of this symbiosis is based upon the nutrient exchange between both symbiotic partners. While AM-fungi supply their host plant with water and nutrients from soils, such as phosphate, they receive photosynthetic products in return. Although the AM symbiosis probably is the most widespread terrestrial plant symbiosis, the molecular mechanisms leading to the establishment of this relationship are only poorly understood. In the scope of this thesis, the early signal transduction of the AM symbiosis was analysed on the basis of the interaction between the model legume *Medicago truncatula* and the AM-fungus *Glomus intraradices*. Here, the key aspect was the identification and functional analysis of plant genes involved in signal transduction. For this purpose, extensive analyses of *M. truncatula* gene expression data from different AM stages were performed. This led to the identification and further investigation of 17 genes whose expression profiles indicated a potential role in early signal transduction of AM symbioses. For the functional analyses of these candidate genes specific RNAi(RNA interference) constructs were generated and insertion mutants carrying the retrotransposon Tnt1 were selected for a targeted knockdown or knockout of the corresponding genes. Therefore, a methodology for the molecular identification of the Tnt1 insertion mutants in the candidate genes was established. In addition, promoter-GUS constructs were generated for some of the selected genes to determine the cellular expression of these genes in different AM stages. Altogether, the analyses of these constructs and mutants revealed an AM-associated function for the gene products of nine of the selected genes. For six of these genes the results of the functional analyses indicated a potential role in AM symbioses, but simultaneously excluded a central role of these genes in the AM signal transduction according to the observed outcome. Finally, the functional analyses of three genes indicated an important role in the establishment of the AM symbiosis. Those genes encode a calcium-binding protein, a GRAS transcription factor and an ERF transcription factor. In all three cases the corresponding genes were induced in early AM stages and a knockdown or knockout of these genes resulted in considerable impairments in the expression of AM marker genes and in the establishment of the AM symbiosis, respectively. The potential functions of these signal transduction associated components in the early signal transduction, leading to the establishment of the AM symbiosis, are discussed.

Keywords: arbuscular mycorrhiza, *Medicago truncatula*, signal transduction

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Abstract</b>	<b>2</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>10</b>
<b>I. Einleitung</b>	<b>15</b>
I.1 Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen des Bodens	15
I.1.1 Die Symbiose – eine vorteilhafte Lebensgemeinschaft	15
I.1.2 Die Knöllchensymbiose	15
I.1.2.1 Die Verbreitung der Knöllchensymbiose	15
I.1.2.2 Die Entwicklung der Knöllchensymbiose	15
I.1.3 Die Mykorrhiza-Symbiose	16
I.1.3.1 Verbreitung und Formen der Mykorrhiza	17
I.1.3.2 Die Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza (AM)	18
I.1.3.3 Das Prinzip des Nährstoffaustauschs in der arbuskulären Mykorrhiza	19
I.2 Modellorganismen zur Untersuchung der arbuskulären Mykorrhiza	20
I.2.1 Die Modell-Leguminose <i>Medicago truncatula</i>	20
I.2.2 Der AM-Pilz <i>Glomus intraradices</i>	21
I.3 Die frühe Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose und der arbuskulären Mykorrhiza	22
I.3.1 Die frühe Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose	22
I.3.2 Die frühe Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza	24
I.3.3 Der evolutionäre Zusammenhang zwischen der Knöllchensymbiose und der arbuskulären Mykorrhiza	25
I.4 Methoden zur funktionellen Genanalyse	26
I.4.1 RNA-Interferenz (RNAi)	26
I.4.2 Insertionsmutagenese	28
I.5 Vorarbeiten zur funktionellen Analyse von AM-relevanten Genen	29
I.6 Zielsetzung	30
<b>II. Material und Methoden</b>	<b>33</b>
II.1 Material	33
II.1.1 Pflanzen- und Pilzmaterialien	33
II.1.2 Bakterienstämme	33
II.1.3 Plasmide	33
II.1.4 Primer/Oligonukleotide	33
II.1.5 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze	39
II.1.5.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterienstämmen	39
II.1.5.2 Nährmedien zur Anzucht transgener Wurzelkulturen	40
II.1.5.3 Antibiotika	41

II.1.5.4 Zusätze	41
II.1.6 Puffer und Lösungen	42
II.1.6.1 Puffer für Bakteriensuspensionen mit physiologischen Ionenkonzentrationen	42
II.1.6.2 Puffer zur Aufnahme von DNA	42
II.1.6.3 Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen	42
II.1.6.4 Puffer und Lösungen für die PCR	43
II.1.6.5 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese	43
II.1.6.6 Puffer und Lösungen für die Gesamt-DNA Extraktion	43
II.1.6.7 Puffer und Lösungen für die HB-Lyse	43
II.1.6.8 Puffer und Lösungen zur Erzeugung hitzekompetenter Zellen	44
II.1.6.9 Puffer und Lösungen für histochemische Analysen	44
II.1.7 Düngelösungen zur Pflanzenanzucht	45
II.1.7.1 ½ strength Hoagland's solution	45
II.1.7.2 NH-Mix	45
II.1.8 Enzyme	46
II.1.9 Kits	46
II.1.10 Chemikalien	47
II.1.11 Verbrauchsmaterialien	48
II.1.12 Geräte	49
II.1.13 Software	50
II.2 Methoden	50
II.2.1 Anzucht und Konservierung von Bakterienstämmen	50
II.2.1.1 Anzucht von Bakterienstämmen	50
II.2.1.2 Konservierung von Bakterienstämmen	50
II.2.2 Molekularbiologische Arbeiten	51
II.2.2.1 Isolierung bakterieller Nukleinsäuren	51
II.2.2.1.1 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit	51
II.2.2.1.2 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels HB-Lyse	51
II.2.2.1.3 Aufreinigung bakterieller Plasmid-DNA mittels NucleoSpin® Extract II Kit	51
II.2.2.2 Isolierung pflanzlicher Nukleinsäuren	52
II.2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus <i>M. truncatula</i>	52
II.2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA nach der CTAB-Methode	52
II.2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit	52
II.2.2.2.4 Isolierung von pflanzlicher RNA mittels RNeasy® Plant Mini Kit	53
II.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	53
II.2.2.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	53
II.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	53
II.2.2.5.1 Standard PCR	54
II.2.2.5.2 Direct Multiplex PCR	55

II.2.2.5.3 <i>real time</i> RT-PCR	56
II.2.2.6 Sequenzierungen	57
II.2.3 Klonierungsexperimente	58
II.2.3.1 Restriktionsspaltung von DNA	58
II.2.3.2 Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment	58
II.2.3.3 Dephosphorylierung von Kloniervektoren	59
II.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten	59
II.2.3.5 Erstellung von RNAi-Konstrukten mittels Gateway®-Klonierung	59
II.2.4 Transformationsexperimente in Bakterien	61
II.2.4.1 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen für Hitzeschock-Transformationen	61
II.2.4.2 Hitzeschocktransformation in <i>E. coli</i>	61
II.2.4.3 Herstellung kompetenter <i>A. rhizogenes</i> -Zellen für Transformationen via Elektroporation	61
II.2.4.4 Elektroporation in <i>A. rhizogenes</i>	62
II.2.5 Pflanzenarbeiten	62
II.2.5.1 Skarifizierung und Sterilisierung von <i>M. truncatula</i> Samen	62
II.2.5.2 Anzucht von <i>M. truncatula</i>	62
II.2.5.3 Mykorrhizierung von <i>M. truncatula</i>	63
II.2.5.4 Bestimmung der Kolonisationsrate mykorrhizierter Pflanzenwurzeln	64
II.2.5.5 Wurzeltransformation von <i>M. truncatula</i>	65
II.2.5.6 Erzeugung von <i>hairy root cultures</i> (HRCs)	66
II.2.5.7 Myc-/Nod-LCO <i>Induction Assays</i>	66
II.2.6 Histochemische Analysen	67
II.2.6.1 Nachweis des Reportergens <i>dsRed</i>	67
II.2.6.2 Färbenachweis der $\beta$ -Glucuronidase(GUS)-Aktivität	67
II.2.6.3 Färbenachweis arbuskulärer Mykorrhizastrukturen in Pflanzenwurzeln	67
II.2.6.3.1 Tintenfärbung	67
II.2.6.3.2 Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488	68
<b>III. Ergebnisse</b>	<b>69</b>
III.1 Auswahl von Kandidatengen für die frühe Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza	69
III.2 Erzeugung von Reportergen- und RNAi-Konstrukten sowie Selektion von Mutantenlinien für funktionelle Analysen	73
III.2.1 Klonierung von Promotor-GUS-Konstrukten	73
III.2.1.1 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das <i>Mtr.12220</i> Gen	73
III.2.1.2 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das <i>Mtr.49618</i> Gen	74
III.2.1.3 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das <i>Mtr.10067</i> Gen	75
III.2.2 Klonierung von RNAi-Konstrukten	75
III.2.3 Anzucht, Selektion und Genotypisierung von Tnt1-Insertionsmutanten	77
III.3 Funktionelle Analyse ausgewählter Kandidatengene	83

III.3.1 Funktionelle Analyse von Kinasen und sonstigen Signaltransduktionskomponenten	83
III.3.1.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.20292</i>	83
III.3.1.1.1 Die Zellwand-assoziierten Rezeptorkinase <i>Mtr.20292</i>	83
III.3.1.1.2 Für die Analyse von <i>Mtr.20292</i> mittels <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden	85
III.3.1.1.3 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.20292</i> beeinträchtigt die Expression von AM-Markergenen	85
III.3.1.2 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>MtMKS1</i>	87
III.3.1.2.1 Das Map-Kinase Substrat <i>MtMKS1</i>	87
III.3.1.2.2 Identifikation und Verifikation homozygoter <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten für das Gen <i>MtMKS1</i>	90
III.3.1.2.3 <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>MtMKS1</i> zeigen keine Auffälligkeiten im phänotypischen Erscheinungsbild oder Mykorrhizierungsgrad	91
III.3.1.2.4 In <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>MtMKS1</i> ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt	92
III.3.1.3 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.12220</i>	94
III.3.1.3.1 Das Elicitor-induzierte Protein <i>Mtr.12220</i>	94
III.3.1.3.2 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.12220</i> hat keine Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen	97
III.3.1.3.3 Eine Mykorrhizierung mit <i>G. intraradices</i> induziert die Promotoraktivität von <i>Mtr.12220</i>	98
III.3.1.3.4 <i>Myc</i> -LCOs induzieren nicht die Promotoraktivität von <i>Mtr.12220</i>	101
III.3.1.4 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>MtSK1</i>	103
III.3.1.4.1 Die Serin/Threonin-Kinase <i>MtSK1</i>	103
III.3.1.4.2 <i>Myc</i> - und <i>Nod</i> -LCOs induzieren die Promotoraktivität von <i>MtSK1</i>	105
III.3.2 Funktionelle Analyse von Komponenten aus der $Ca^{2+}$ -/ <i>CaM</i> -Signaltransduktion	107
III.3.2.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.40638</i>	107
III.3.2.1.1 Das $Ca^{2+}$ -bindende Protein <i>Mtr.40638</i>	107
III.3.2.1.2 Identifikation und Verifikation homozygoter <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten für das Gen <i>Mtr.40638</i>	109
III.3.2.1.3 <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.40638</i> weisen ein retardiertes Wachstum auf	111
III.3.2.1.4 In <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.40638</i> ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt	114
III.3.2.1.5 In <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.40638</i> ist die Ausbildung von AM-Pilzstrukturen beeinträchtigt	116
III.3.3 Funktionelle Analyse von Transkriptionsfaktoren	120
III.3.3.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.11570</i>	120
III.3.3.1.1 Das <i>Mtr.11570</i> Gen spielt keine offensichtliche Rolle in der AM-Symbiose	120

III.3.3.2 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.43223</i>	120
III.3.3.2.1 Das <i>Mtr.43223</i> Gen spielt keine offensichtliche Rolle in der AM-Symbiose	120
III.3.3.3 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.49618</i>	121
III.3.3.3.1 Der DREB-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.49618</i>	121
III.3.3.3.2 Für das Kandidatengens <i>Mtr.49618</i> konnte kein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> erzielt werden	122
III.3.3.3.3 Weder eine Mykorrhizierung mit <i>G. intraradices</i> noch eine Behandlung mit Myc-LCOs induziert die Promotoraktivität von <i>Mtr.49618</i>	123
III.3.3.4 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.9126</i>	126
III.3.3.4.1 Der GRAS-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.9126</i>	126
III.3.3.4.2 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.9126</i> ist abhängig von der Anzuchtmethode	128
III.3.3.4.3 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.9126</i> hat keine Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen	130
III.3.3.4.4 Identifikation und Verifikation homozygoter <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten für das Gen <i>Mtr.9126</i>	131
III.3.3.4.5 <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.9126</i> weisen eine erhöhte Biomasse auf	132
III.3.3.4.6 In <i>Tnt1</i> -Insertionmutanten von <i>Mtr.9126</i> ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt	133
III.3.3.5 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.25945</i>	135
III.3.3.5.1 Der MYB-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.25945</i>	135
III.3.3.5.2 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.25945</i> zeigt keinerlei Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen und die Kolonisation durch <i>G. intraradices</i>	137
III.3.3.5.3 Identifikation homozygoter <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten für das Gen <i>Mtr.25945</i>	139
III.3.3.6 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.38547</i>	139
III.3.3.6.1 Der MYB-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.38547</i>	139
III.3.3.6.2 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.38547</i> zeigt keine Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen	141
III.3.3.6.3 Identifikation und Verifikation homozygoter <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten für das Gen <i>Mtr.38547</i>	142
III.3.3.6.4 <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.38547</i> unterscheiden sich phänotypisch nur geringfügig von Wildtyp-Pflanzen	144
III.3.3.6.5 AM-Markergene zeigen eine verringerte Expression in <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten von <i>Mtr.38547</i>	145
III.3.3.7 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.7264</i>	146
III.3.3.7.1 Der GRAS-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.7264</i>	146
III.3.3.7.2 Die Expression von <i>Mtr.7264</i> nimmt in einer Mykorrhizierungszeitreihe stetig zu	148

III.3.3.7.3 Für die funktionelle Analyse von <i>Mtr.7264</i> mittels Tnt1-Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden	149
III.3.3.7.4 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.7264</i> resultiert in eine verminderte Expression wichtiger AM-Markergene	150
III.3.3.7.5 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.7264</i> zeigt keine Auswirkungen auf die Kolonisation durch <i>G. intraradices</i>	152
III.3.3.8 Funktionelle Analyse des Kandidatengens <i>Mtr.10987</i>	154
III.3.3.8.1 Der ERF-Transkriptionsfaktor <i>Mtr.10987</i>	154
III.3.3.8.2 Weder eine Mykorrhizierung mit <i>G. intraradices</i> noch eine Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs führen zu einer Induktion von <i>Mtr.10987</i>	156
III.3.3.8.3 Für die funktionelle Analyse von <i>Mtr.10987</i> mittels Tnt1-Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden	157
III.3.3.8.4 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.10987</i> resultiert in eine verminderte Expression wichtiger AM-Markergene	158
III.3.3.8.5 Ein RNAi-vermittelter <i>knockdown</i> von <i>Mtr.10987</i> beeinträchtigt die Ausbildung von Pilzstrukturen in der AM-Symbiose	163
<b>IV. Diskussion</b>	<b>167</b>
IV.1 Gene ohne offensichtlichen Bezug zur AM-Symbiose	168
IV.2 Signalverarbeitungs-assoziierte Gene mit potentieller Bedeutung für die AM-Symbiose	169
IV.2.1 Die Rolle der Zellwand-assoziierten Rezeptorkinase <i>Mtr.20292</i> in der AM-Symbiose	169
IV.2.2 Die Rolle des Map-Kinase Substrats 1 in der AM-Symbiose	170
IV.2.3 Die Rolle des Elicitor-induzierten Proteins <i>Mtr.12220</i> in der AM-Symbiose	170
IV.2.4 Die Rolle der Stress Kinase 1 in der AM-Symbiose	172
IV.2.5 Die Rolle des Ca <sup>2+</sup> -bindenden Proteins <i>Mtr.40638</i> in der AM-Symbiose	172
IV.3 Transkriptionsfaktor-Gene mit potentieller Bedeutung für die AM-Symbiose	174
IV.3.1 Die Rolle des MYB-Transkriptionsfaktors <i>Mtr.38547</i> in der AM-Symbiose	174
IV.3.2 Die Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors <i>Mtr.9126</i> in der AM-Symbiose	175
IV.3.3 Die Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors <i>Mtr.7264</i> in der AM-Symbiose	176
IV.3.4 Die Rolle des ERF-Transkriptionsfaktors <i>Mtr.10987</i> in der AM-Symbiose	177
IV.4 Die potentielle Beteiligung von drei neuen Symbiose-assoziierten Genen an der frühen AM-Signaltransduktion	179
<b>V. Ausblick</b>	<b>181</b>
<b>VI. Literaturverzeichnis</b>	<b>183</b>
<b>VII. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>201</b>
VII.1 Abbildungsverzeichnis	201
VII.2 Tabellenverzeichnis	205
<b>Wissenschaftlicher Werdegang</b>	<b>207</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>208</b>



---

<b>Posterpräsentationen dieser Arbeit</b>	<b>208</b>
<b>Danksagung</b>	<b>209</b>
<b>Anhang</b>	<b>211</b>
Anhang A: Sequenzdaten	211
Anhang B: Plasmidkarten	213
Anhang C: Expressionsdaten	217
Anhang D: Mykorrhizierungsdaten	233

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenosin
<i>ad</i>	auffüllen auf
AM	arbuskuläre Mykorrhiza
Amp	Ampicillin
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>att</i>	<i>attachment site</i>
Aug	Augmentin
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BPB	Bromphenolblau
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaM	Calmodulin
cDNA	<i>copy DNA</i>
CSP	<i>common symbiotic pathway</i> (gemeinsamer Symbiose-Signaltransduktionsweg)
cv.	Cultivar
DFCI	<i>Dana-Farber Cancer Institute</i>
DREB	<i>dehydration responsive element binding protein</i>
dATP	2'-Desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	2'-Desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
deTILLING	<i>deletion TILLING</i>
dGTP	2'-Desoxy-Guanin-5'-Triphosphat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpi	<i>days past inoculation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERF	<i>ethylene response factor</i>
EST	<i>expressed sequence tag</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EVC	<i>empty vector control</i> (Leervektorkontrolle)
g	Gramm

G	Guanosin
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GiaTub	<i>Glomus intraradices</i> $\alpha$ -Tubulin
GmTefa	<i>Glomus mossae</i> Translations-Elongationsfaktor $\alpha$
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
<i>gusA</i> int	Intronhaltiges <i>gusA</i> Gen
HRC	<i>hairy root culture</i> (transgene Wurzelkultur)
IPTG	Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare (1.000 bp)
l	Liter
LB	<i>left border</i>
LB	Luria Broth
LCO	Lipochitooligosaccharid
LTR	<i>long terminal repeat</i>
LysM	<i>Lysine motif</i> (Lysin Motiv)
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare (1.000 kb)
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-N-Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MtANN2	<i>Medicago truncatula</i> Annexin 2
MtBCP1	<i>Medicago truncatula</i> blue copper binding protein 1
MtCBF1	<i>Medicago truncatula</i> CAAT-box binding transcription factor 1
MtCBF2	<i>Medicago truncatula</i> CAAT-box binding transcription factor 2
MtDMI1	<i>Medicago truncatula</i> doesn't make infection 1
MtDMI2	<i>Medicago truncatula</i> doesn't make infection 2
MtDMI3	<i>Medicago truncatula</i> doesn't make infection 3
MtENOD11	<i>Medicago truncatula</i> early nodulin 11
MtGEA	<i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas
MtHA1	<i>Medicago truncatula</i> H <sup>+</sup> -ATPase 1
MtIPD3	<i>Medicago truncatula</i> interacting protein of DMI3
MtMKS1	<i>Medicago truncatula</i> Map-Kinase Substrat 1
MtNFP	<i>Medicago truncatula</i> Nod factor perception
MtNSP1	<i>Medicago truncatula</i> nodulation signalling pathway 1

---

MtNSP2	<i>Medicago truncatula nodulation signalling pathway 2</i>
MtPT4	<i>Medicago truncatula Phosphat Transporter 4</i>
MtSK1	<i>Medicago truncatula Stress Kinase 1</i>
MtTEFa	<i>Medicago truncatula Translations-Elongationsfaktor <math>\alpha</math></i>
Myc-Faktor	Mykorrhizierungs-Faktor
m/s	Meter pro Sekunde
NLS	<i>nuclear localization signal</i> (Kernlokalisierungssignal)
nm	Nanometer
NF	<i>Noble Foundation</i>
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> (Nonsense-vermittelter mRNA-Abbau)
Nod	Nodulation
Nod-Faktor	Nodulations-Faktor
o. D.	optische Dichte
PA	Penassay Broth
PAM	periarbuskuläre Membran
PAS	<i>periarbuscular space</i> (periarbuskulärer Raum)
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PPA	<i>prepenetration apparatus</i>
PPF	<i>photosynthetic photon flux</i>
RB	<i>right border</i>
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Spec	Spectinomycin
Std	Stunde
Strep	Streptomycin
T	Thymin
T-DNA	<i>transfer DNA</i>
TILLING	<i>targeting induced local lesions in genomes</i>
Tnt1	<i>transposable element of Nicotiana tabacum 1</i>
U	unit (Enzymeinheit)
üN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute

---

UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>
Vol	Volumen
WGA	<i>wheat germ agglutinin</i>
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
X-Gluc	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronid
z. B.	zum Beispiel
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent



## I. EINLEITUNG

### I.1 Symbiosen zwischen Pflanzen und Mikroorganismen des Bodens

#### I.1.1 Die Symbiose – eine vorteilhafte Lebensgemeinschaft

Allgemein versteht man unter einer Symbiose das temporäre oder dauernde Zusammenleben von Organismen verschiedener Arten, die von dieser Gemeinschaft profitieren (Weiler & Nover, 2008). Führt eine solche Verbindung für alle Beteiligten zu einer Verbesserung ihrer Lebensumstände, spricht man von einer mutualistischen Symbiose (Weiler & Nover, 2008). Symbiotische Interaktionen sind in großer Vielfalt unter Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen verbreitet. Pflanzen sind zur Verbesserung ihrer Nährstoffversorgung vielfach in der Lage, unterschiedliche Wurzelsymbiosen mit im Boden lebenden Mikroorganismen auszubilden. Dazu zählen die Knöllchensymbiose, eine Verbindung mit Stickstoff-fixierenden Bodenbakterien, sowie die Mykorrhiza-Symbiose, eine Lebensgemeinschaft mit im Boden vorkommenden Pilzen, deren Verbreitung und Entwicklung in den folgenden Abschnitten beschrieben werden.

#### I.1.2 Die Knöllchensymbiose

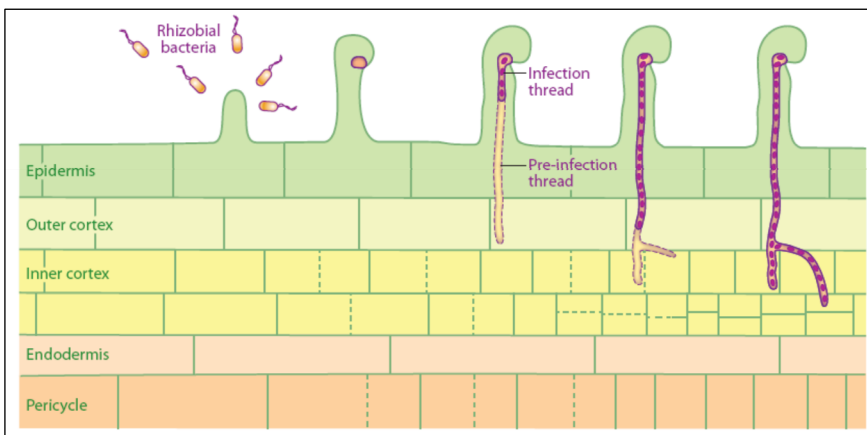
##### I.1.2.1 Die Verbreitung der Knöllchensymbiose

Stickstoff ist ein wesentlicher Bestandteil vieler Biomoleküle, die essentiell für das Wachstum und die Entwicklung aller Organismen sind (Kneip *et al.*, 2007). Für Eukaryoten ist der größte Teil des terrestrischen Stickstoffs jedoch nicht zugänglich, denn lediglich einige Bakterien haben die Fähigkeit entwickelt, atmosphärischen Stickstoff in Form von Ammonium zu fixieren (Kneip *et al.*, 2007). Hierzu gehören die Gattungen *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* und *Sinorhizobium*, die allgemein lediglich als *Rhizobien* bezeichnet werden (Talukdar, 2009). Diese sind in der Lage, mit Pflanzen der Leguminosen-Familie (*Fabaceae*) eine so genannte Knöllchensymbiose einzugehen. Dabei bilden die Wirtspflanzen im Wurzelbereich Verdickungen, die als Wurzelknöllchen bezeichnet werden. Diese werden von *Rhizobien* besiedelt, um mit der Pflanze Stickstoffverbindungen gegen Photosyntheseprodukte austauschen. Obwohl auch einige andere Pflanzenfamilien zu einer solchen Interaktion fähig sind, ist die Symbiose zwischen Leguminosen und *Rhizobien* aus agrarwirtschaftlicher Sicht die bedeutendste (Perret *et al.*, 2000).

##### I.1.2.2 Die Entwicklung der Knöllchensymbiose

Die Entwicklung der Knöllchensymbiose beginnt als molekularer Dialog zwischen *Rhizobien* und Leguminosen (Brewin, 1991). Dabei sondern Leguminosen zunächst Botenstoffe in Form von Flavonoiden in den Boden ab, die je nach Pflanzenart variieren können (Perret *et al.*, 2000;

Oldroyd & Downie, 2004). Die Antwort der *Rhizobien* auf dieses Signal besteht in der Synthese und Freisetzung als Nod(Nodulations)-Faktoren bezeichneter Lipochitooligosaccharide (LCOs), die wiederum an Rezeptoren der pflanzlichen Epidermiszellen binden können und in diesen zu einer Oszillation des Calcium( $\text{Ca}^{2+}$ )-Spiegels, dem so genannten  $\text{Ca}^{2+}$ -spiking, führen (Ehrhardt *et al.*, 1996; Sieberer *et al.*, 2009; Oldroyd & Downie, 2004). Die *Rhizobien* lagern sich an die Wurzelhaare der Wirtspflanze an (Abbildung 1.1) und werden durch eine Verformung der Wurzelhaare, die als *root hair curling* bezeichnet wird, von diesen umschlossen (Heidstra *et al.*, 1994; Esseling *et al.*, 2003; Gage, 2004). Von diesem Punkt aus bildet sich ein Infektionsschlauch (Abbildung 1.1), der vom Wurzelhaar bis in den inneren Kortex der Pflanzenwurzel führt (Timmers *et al.*, 1999; Veereshlingam *et al.*, 2004; Miwa *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007). Parallel zu diesem Infektionsprozess wird im inneren Kortex der Pflanzenwurzel die Zellteilung initiiert (Foucher & Kondorosi, 2000; Heidstra *et al.*, 1997; Wasson *et al.*, 2006), die letztlich zur Bildung von Wurzelknöllchen führt (Oldroyd & Downie, 2004; Oldroyd *et al.*, 2011). Sobald die Infektionsschläuche diese Region erreichen (Abbildung 1.1), werden die Bakterien in das Cytoplasma der Zellen des parallel gebildeten Knöllchenmeristems entlassen und von einer Membran umschlossen (Brewin, 2004). Hier wachsen und differenzieren die Bakterien zu einer Stickstoff-fixierenden Form, die man als Bakterioide bezeichnet (Robertson & Lyttleton, 1984; Vasse *et al.*, 1990; Szczyglowski *et al.*, 1998; Cermola *et al.*, 2000). Sie werden von der Pflanze mit einem sorgfältig regulierten Angebot an Sauerstoff und Kohlenstoff versorgt, so dass sie sehr effizient atmosphärischen Stickstoff fixieren und diesen im Gegenzug in Form von Aminosäuren an die Pflanze abgeben (Fischer, 1994; Day *et al.*, 2001; Oldroyd & Downie, 2004; Prell & Poole, 2006).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Entwicklung der Knöllchensymbiose in frühen Stadien.** Stickstoff-fixierende Bodenbakterien (*Rhizobien*), die sich an die Wurzelhaare einer Pflanze aus der Leguminosen-Familie angelagert haben, werden durch das *root hair curling* von den Wurzelhaaren umschlossen. Von hier bildet sich ein Prä-Infektionsschlauch aus, gefolgt von einem Infektionsschlauch, der die Bakterien in

den inneren Kortex der Wurzel leitet. Parallel dazu beginnt bereits mit dem *root hair curling* eine in der Abbildung durch gestrichelte Linien angedeutete Zellteilung im Perizykel und inneren Kortex. Aus den neuen Zellen des inneren Kortex formt sich mit Eintreffen des Infektionsschlauchs das Knöllchenmeristem (Quelle: Oldroyd *et al.*, 2011).

### 1.1.3 Die Mykorrhiza-Symbiose

Als Mykorrhiza bezeichnet man eine symbiotische Wechselwirkung zwischen im Boden lebenden Mykorrhiza-Pilzen und den Wurzeln fast aller Landpflanzen. Den Begriff der Mykorrhiza prägte Albert B. Frank bereits im 19. Jahrhundert. Der aus den griechischen Worten *mykes* (Pilz) und *rhiza*

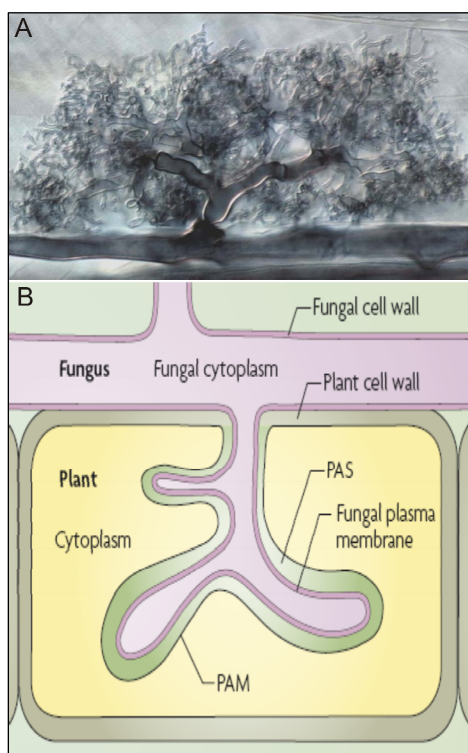


(Wurzel) geschaffene Begriff (Frank, 1885), umschreibt diese Symbiose als „Pilzwurzel“ dabei sehr zutreffend. Durch einen engen Kontakt von Pilzhypen und Pflanzenwurzeln versorgt der Mykorrhiza-Pilz in dieser Symbiose die Wirtspflanze mit Wasser und Nährstoffen aus dem Boden, während er im Gegenzug pflanzliche Photosyntheseprodukte erhält.

### I.1.3.1 Verbreitung und Formen der Mykorrhiza

Die Mykorrhiza wird allgemein als die am weitesten verbreitete terrestrische Symbiose überhaupt angesehen, da es nur sehr wenige Pflanzenarten gibt, die nicht in der Lage sind, eine solche Verbindung einzugehen (Parniske, 2008). Es gibt eine Vielzahl von Mykorrhiza-Formen, die sich generell in Endo- und Ektomykorrhiza unterteilen lassen. Während der Mykorrhiza-Pilz in der Ektomykorrhiza außerhalb der Wurzelzellen der Wirtspflanze verbleibt, wachsen die Pilzstrukturen in der Endomykorrhiza sowohl extra- als auch intrazellulär (Harrison, 1999). Dabei werden ausschließlich epidermale und kortikale Wurzelzellen kolonisiert, die Pilzhypen dringen aber nicht in das vaskuläre System oder das Meristem der Wurzel ein (Smith & Read, 2008). Die am häufigsten auftretende Form der Mykorrhiza ist eine Endomykorrhiza, die als arbuskuläre Mykorrhiza (AM) bezeichnet wird (Harrison, 1999; Smith & Read, 2008). Charakteristisch und zugleich namensgebend für diese ist die Bildung so genannter Arbuskeln in den kolonisierten Wirtszellen. Dabei handelt es sich um stark verzweigte Strukturen, die in den inneren kortikalen

Zellen der Wirtspflanze ausgebildet werden und vermutlich dem Nährstoffaustausch zwischen den beiden Symbiosepartnern dienen (Parniske, 2008; Smith & Read, 2008). Obwohl sich die Arbuskeln in den Pflanzenzellen entwickeln, bleiben sie apoplastisch, da sie von der Plasmamembran der Pflanzenzelle, der periarbuskulären Membran (PAM), umschlossen werden (Harrison, 1999).



**Abbildung 1.2: Mikroskopische und schematische Darstellung einer Arbuskel.** A: Mikroskopische Aufnahme einer reifen Arbuskel des Arum-Typs von *Glomus intraradices*. Deutlich zu unterscheiden sind die Pilzhyphe und der Arbuskelstamm von den feinen Verästelungen der Arbuskel (Quelle: *Glomus database*; <http://mycor.nancy.inra.fr/IMG/GlomusGenome/index3.html>). B: Schematische Darstellung einer Arbuskel. Das in violett dargestellte Pilzgewebe wird in der pflanzlichen Zelle von der periarbuskulären Membran (PAM) umgeben, die den Pilz vom Cytoplasma der Pflanze abgrenzt. Den in grün dargestellten Raum zwischen der PAM und der Plasmamembran des Pilzes bezeichnet man als *periarbuscular space* (PAS) (Quelle: Parniske, 2008).

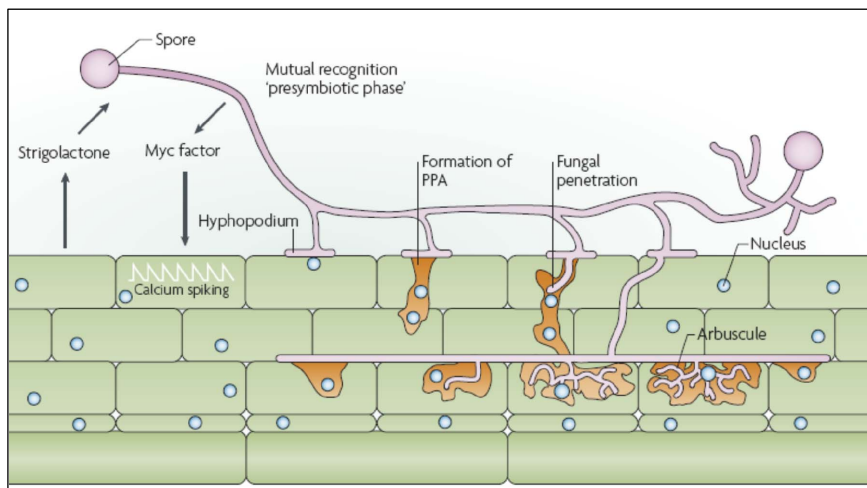
Abhängig vom besiedelnden AM-Pilz, werden Arbuskeln weiterhin in Paris- und Arum-Typen unterschieden (Brundett, 2004). Während der Arum-Typ einer Arbuskel der klassischen, bäumchenartigen Struktur entspricht (Abbildung 1.2 A), zeichnet sich der Paris-Typ durch weniger auffällige Knäuel intrazellulärer Hyphen aus (Smith & Read, 2008). Neben den Arbuskeln bilden

AM-Pilze zudem in der Regel extra- oder intrazelluläre Speicherorgane aus, die als Vesikel bezeichnet werden (Smith & Gianinazzi-Pearson, 1988).

Die AM ist eine sehr alte, und wie man heute vermutet, die ursprünglichste Form der Mykorrhizasymbiose (Smith & Read, 2008). Anhand von fossilen Funden konnte sie auf ein Alter von 400 Millionen Jahren zurück datiert werden (Remy *et al.*, 1994). Aufgrund ihrer weiten Verbreitung und ihrer wichtigen Rolle in der Nährstoffversorgung von Pflanzen, wird vielfach vermutet, dass die AM in der Besiedlung der Erde durch Landpflanzen eine wichtige Rolle spielte (Pirozynski & Malloch, 1975; Simon *et al.*, 1993; Remy *et al.*, 1994, Heckman *et al.*, 2001).

### 1.1.3.2 Die Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza (AM)

Die Entwicklung der AM beginnt mit der Abgabe pflanzlicher Signalmoleküle in den Boden (Abbildung 1.3), die als Strigolactone identifiziert werden konnten (Akiyama *et al.*, 2005). Im Gegenzug sondert der AM-Pilz nun ebenfalls einen molekularen Botenstoff in den Boden ab, der analog zu den für die Knöllchensymbiose beschriebenen Nod-Faktoren allgemein als Myc-Faktor bezeichnet wird. Die Struktur dieser Myc-Faktoren konnte erst kürzlich als LCO identifiziert werden (Maillet *et al.*, 2011). Dieser Signalaustausch induziert in den Epidermiszellen der Wirtspflanze ein  $Ca^{2+}$ -spiking, das zur Aktivierung Symbiose-relevanter Pflanzengene führt (Gough & Cullimore, 2011). Sobald die wachsenden Pilzhyphen eine Pflanzenwurzel erreichen, formen sie auf deren Oberfläche eine Art abgeflachter Hyphen (Abbildung 1.3), die als Hyphopodien bezeichnet werden und das Eindringen des AM-Pilzes in die Wirtspflanze erleichtern (Bastmeyer *et al.*, 2002; Parniske, 2008).



**Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien einer AM-Symbiose.** Pflanzenwurzeln sekretieren Strigolactone in die Rhizosphäre, die eine erhöhte physiologische Aktivität von AM-Pilzsporen und -hyphen induzieren und zur verstärkten Verzweigung von Pilzhyphen führen. Zudem reagieren AM-Pilze mit einer Abgabe von Myc-Faktoren, die zu einer Calcium-Oszillation und einer anschließenden Aktivierung Symbiose-relevanter Gene in den Epidermiszellen der

Wurzel führen. Bei Kontakt mit der Wurzel formen die Pilzhyphen Hyphopodien und dringen mit Hilfe des von der Pflanze gebildeten *prepenetration apparatus* (PPA) durch die Epidermis in die Wurzel ein. Dabei dringen die Pilzhyphen bis in den inneren Kortex vor, wo sie entlang der Längsachse der Wurzel weiter wachsen und in den inneren kortikalen Zellen Arbuskeln bilden. Neue AM-Pilzsporen werden typischerweise an den Spitzen der Hyphen außerhalb der Wurzel gebildet (Quelle: modifiziert nach Parniske, 2008).

Die Invasion des AM-Pilzes in die Pflanzenwurzel wird jedoch maßgeblich von der Wirtspflanze gesteuert (Abbildung 1.3). Dabei leitet die Pflanze die Pilzhyphen durch eine cytoplasmatische Brücke, dem so genannten *prepenetration apparatus* (PPA), durch die einzelnen Zellen, von der

Epidermis in den inneren Kortex der Wurzel (Genre *et al.*, 2005; Genre *et al.*, 2008). Dort angekommen, verbreiten sich AM-Pilze des Arum-Typs durch interzelluläres Hyphenwachstum und die intrazelluläre Ausbildung von Arbuskeln entlang der Längsachse der Wurzel (Smith & Read, 2008; Parniske, 2008). In dieser Umgebung durchläuft jede Arbuskel zunächst eine Wachstumsphase bis zum Erreichen einer bestimmten Maximalgröße und wird anschließend in einem Degradationsprozess erst abgeschnürt, um dann nach und nach abgebaut zu werden (Javot *et al.*, 2007a; Parniske, 2008). Die durchschnittliche Lebensdauer einer Arbuskel beträgt nur 8 - 9 Tage, die Wirtszelle besitzt danach jedoch die Fähigkeit zur erneuten Aufnahme von Arbuskeln (Alexander *et al.*, 1988; Alexander *et al.*, 1989).

### 1.1.3.3 Das Prinzip des Nährstoffaustauschs in der arbuskulären Mykorrhiza

Die Bedeutung der Mykorrhiza für die Nährstoffversorgung von Pflanzen lässt sich mit dem Zitat „*Mycorrhizas, not roots, are the chief organs of nutrient uptake by land plants*“ (Smith & Read, 2008) sehr gut verdeutlichen. Noch deutlicher wird der Stellenwert dieser Symbiose bei der Überlegung, dass alle für den Menschen wichtigen Nutzpflanzen eine Mykorrhiza ausbilden können (Sanders & Croll, 2010).

In der AM findet der Nährstoffaustausch zwischen Pilz und Pflanze in den Arbuskeln statt, genauer gesagt über die periarbuskuläre Membran (PAM) und im *periarbuscular space* (PAS), dem Raum zwischen den Plasmamembranen von Pilz und Pflanze (Abbildung 1.2). Obgleich sie mit der übrigen pflanzlichen Plasmamembran kontinuierlich ist, besitzt die PAM eine von dieser abweichenden Zusammensetzung, die dem Nährstoffaustausch dient (Harrison *et al.*, 2002; Pumplun & Harrison, 2009). So lassen sich hier beispielsweise der pflanzliche Phosphattransporter MtPT4 (Harrison *et al.*, 2002) oder die H<sup>+</sup>-ATPase MtHA1 (Krajinski *et al.*, 2002) finden, die an Arbuskel-spezifischen Transportvorgängen beteiligt sind.

AM-Pilze versorgen ihre Wirtspflanze über diese Schnittstelle mit Wasser, Phosphat, Stickstoffverbindungen, Sulphat und Spurenelementen wie Kupfer oder Zink aus dem Boden (Egerton-Warburton *et al.*, 2007; Javot *et al.*, 2007b; Finlay, 2008; Tian *et al.*, 2010). Eine bedeutende Rolle nimmt dabei vor allem die Versorgung mit Phosphat und Stickstoff ein, da diese für das Pflanzenwachstum limitierend sind (Javot *et al.*, 2007b). Diese Nährstoffe werden vom AM-Pilz in Form von anorganischem Phosphat bzw. Ammonium, Nitrat oder Aminosäuren aus dem Boden aufgenommen (Javot *et al.*, 2007b; Parniske, 2008). Bei der Nährstoffaufnahme profitieren AM-Pilze nicht nur davon, dass sie bestimmte Nährstoffe besser aus dem Boden lösen können als ihr Symbiosepartner, sondern auch von der größeren Oberfläche ihrer Hyphen im Vergleich zu den Pflanzenwurzeln (Javot *et al.*, 2007b). Diese können eine Dichte von 100 m Hyphengeflecht pro Kubikzentimeter Erde erreichen (Miller *et al.*, 1995). Der aufgenommene Stickstoff wird hauptsächlich in Form von Arginin zur Pflanze transportiert, anschließend aber in einer Kohlenstoff-freien Form, in der Regel als Ammonium, an diese abgegeben (Govindarajulu *et al.*, 2005; Cruz *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2010). Der Phosphat-Transport innerhalb der Hyphen erfolgt in Form von Polyphosphat und wird von der Pflanze als anorganisches Phosphat über die PAM durch Phosphattransporter, wie den bereits erwähnten MtPT4, aufgenommen (Harrison *et al.*,

2002; Javot *et al.*, 2007a; Javot *et al.*, 2007b). Aufgrund der verbesserten Nährstoffversorgung erhöht die AM-Symbiose nicht nur Vitalität und Wachstum von Pflanzen, sondern bewirkt darüber hinaus auch eine erhöhte Resistenz gegenüber biotischem (Liu *et al.*, 2007; Finlay, 2008) und abiotischem (Feng *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011) Stress. Dabei geht man davon aus, dass die erhöhte Resistenz mykorrhizierter Pflanzen gegenüber Pathogenen und Parasiten („*bioprotection*“) auf eine Art Präkonditionierung der Abwehr dieser Pflanzen zurückgeht (Pozo & Azcón-Aguilar, 2007).

Im Gegenzug für die umfangreiche Nährstoffversorgung wird der AM-Pilz von der Pflanze mit Kohlenstoff beliefert, in der Regel erfolgt dies in Form von Saccharose (Solaiman & Saito, 1997; Bago *et al.*, 2000; Bago *et al.* 2003). Diese wird in den PAS transportiert, dort in Hexosen aufgespalten (Hohnjec *et al.*, 2003; Baier *et al.*, 2010) und kann so vom Pilz aufgenommen werden (Schüßler *et al.*, 2006). Die Versorgung ihrer Symbiosepartner mit Photosyntheseprodukten kann dabei bis zu 20 % der gesamten Photosyntheseleistung einer Pflanze ausmachen (Bago *et al.*, 2000).

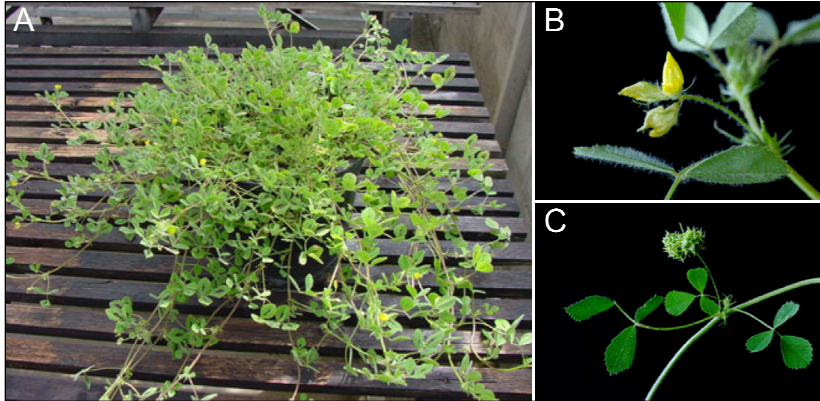
Von dem beschriebenen Nährstoffaustausch profitieren beide Symbiosepartner gleichermaßen. Um dies dauerhaft zu gewährleisten, ist jedoch eine kontinuierliche gegenseitige Kontrolle notwendig. So können Pflanzen ihre Symbiosepartner wahrnehmen, unterscheiden und bei Bedarf den besten Pilzpartner mit mehr Kohlenhydraten belohnen (Kiers *et al.*, 2011). Der Mykorrhiza-Pilz kann auf der anderen Seite steuern, dass vermehrt Nährstoffe an Wurzeln geliefert werden, die ihrerseits viele Kohlenhydrate abgeben (Kiers *et al.*, 2011; Fellbaum *et al.*, 2012). Dadurch wird die Symbiose im Gleichgewicht gehalten und keiner der beiden Partner ausgenutzt.

## 1.2 Modellorganismen zur Untersuchung der arbuskulären Mykorrhiza

### 1.2.1 Die Modell-Leguminose *Medicago truncatula*

Als Modell für viele genetische Studien an Pflanzen dient häufig die weit verbreitete Acker-Schmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Da diese jedoch nicht in der Lage ist, mikrobielle Symbiosen auszubilden, findet sie in diesem Forschungsfeld keine Anwendung (Rose, 2008). Eine Pflanzenfamilie, die hingegen nicht nur in der Lage ist, eine mikrobielle Symbiose mit Mykorrhizapilzen zu formen, sondern auch mit Stickstoff-fixierenden Bodenbakterien in Symbiose leben kann, ist die bereits erwähnte Familie der Leguminosen (*Fabaceae*). Direkt nach den Gräsern (*Graminaceae*) handelt es sich bei den Leguminosen um die Pflanzenfamilie mit der weltweit größten ökonomischen Bedeutung (Graham and Vance, 2003). Bekannte Leguminosen wie *Pisum sativum* (Erbsen), *Vicia faba* (Ackerbohne), *Cicer arietinum* (Kichererbsen) oder *Glycine max* (Soja) tragen aufgrund ihres hohen Proteingehalts maßgeblich zur menschlichen Ernährung bei. Doch auch in der Futtermittelproduktion und Gründüngung sind Leguminosen wie beispielweise *Medicago sativa* (Luzerne) oder *Trifolium repens* (Klee) weit verbreitet (Szczyglowski and Stougaard, 2008).

Als erste Leguminose wurde im Jahr 2008 eine Arbeitsversion des Genoms von *Lotus japonicus* (Sato et al., 2008) publiziert, gefolgt von der 2010 veröffentlichten genomischen Sequenz von *Glycine max* (Schmutz et al., 2010) und dem 2011 publizierten *Medicago truncatula* Genom (Young et al., 2011).



**Abbildung 1.4: Die Modellleguminose *Medicago truncatula*.** Dargestellt sind neben dem natürlichen Habitus (A) die Blüten (B), Blätter und Samenkapseln (C) von *M. truncatula* (Quelle: A: INRA Dijon: <http://www1.montpellier.inra.fr/BRC-MTR/accueil.php?menu=medicago&page=menu11>; B und C: *M. truncatula* homepage: <http://www.medicago.org>).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die ursprünglich aus dem mediterranen Raum stammende Leguminose *Medicago truncatula* (Abbildung 1.4) als Modellpflanze zur Untersuchung der AM-Symbiose verwendet. *M. truncatula* besitzt viele natürliche Eigenschaften, die sie zu einem verbreiteten Modellorganismus machen. Neben einem für Leguminosen verhältnismäßig kleinen (470 Mbp) und diploiden Genom (Young et al., 2011), das in acht Chromosomen organisiert ist, stellt *M. truncatula* eine autogame Pflanze dar und besitzt eine relativ kurze Generationszeit von etwa drei Monaten (Ané et al., 2008). Zudem stehen aufgrund der verbreiteten Forschung an dieser Modellpflanze viele Techniken und Ressourcen für die Arbeit mit *M. truncatula* zur Verfügung. Die unter [www.medicago-hapmap.org](http://www.medicago-hapmap.org) verfügbare genomische Sequenz von *M. truncatula* wird durch eine umfangreiche EST (*expressed sequence tag*) Datenbank mit über 250.000 Transkript-Sequenzen (*Medicago truncatula* Gene Index; <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>) ergänzt. Für Transkriptomsstudien von *M. truncatula* stehen sowohl Microarrays (Küster et al., 2004; Küster et al., 2007) als auch Affymetrix *GeneChips* (Benedito et al., 2008) zur Verfügung. Auf Grundlage publizierter *GeneChip* Daten existiert ein umfassender Genexpressionsatlas für *M. truncatula* Transkripte (Benedito et al., 2008). Darüber hinaus wurden im Laufe der Zeit eine Vielzahl von Techniken für *reverse genetics* Studien (wie beispielweise RNAi, TILLING, deTILLING und Retrotransposon-basierte Insertionsmutagenese) und Transformationsmethoden (Trinh et al., 1998; Kamaté et al., 2000; Chabaud et al., 2003; Vieweg et al., 2004; Zhou et al., 2004; Crane et al., 2006) für *M. truncatula* etabliert.

### 1.2.2 Der AM-Pilz *Glomus intraradices*

Alle bekannten AM-Pilze gehören dem Stamm der *Glomeromycota* an (Schüßler et al., 2001). Mit einem Alter von über 400 Millionen Jahren handelt es sich bei den AM-Pilzen um sehr ursprüngliche Lebewesen, die sich im Laufe der Zeit kaum verändert haben (Parniske, 2008). Die *Glomeromycota* sind einzigartig darin, dass in ihren Sporen und Hyphen mehrere Zellkerne in

einem gemeinsamen Cytoplasma vorkommen, was zu Ansammlungen hunderter Nuclei führen kann (Sanders & Croll, 2010). Da einzelne Zellkerne solcher Ansammlungen in einigen AM-Pilzarten auch noch genetisch verschieden sein können (Giovanetti *et al.*, 2001; Hijri & Sanders, 2005), erweist sich die Definition des Individuums hier als sehr schwierig (Pawłowska & Taylor, 2004; Rosendahl, 2008). Insgesamt ist über Genomgrößen, Ploidie und nicht zuletzt Genexpression dieser Organismen nur sehr wenig bekannt. Ob sich AM-Pilze sexuell fortpflanzen können, und welcher Art ein solcher Fortpflanzungsmechanismus sein könnte, ist nach wie vor umstritten (Gandolfi *et al.*, 2003; Rosendahl, 2008; Sanders & Croll, 2010). In Abwesenheit einer passenden Wirtspflanze können die Sporen von AM-Pilzen mehrfach keimen, zur Vollendung ihres Lebenszyklus sind die obligat biotrophen Pilze jedoch auf einen Wirt angewiesen (Parniske, 2008). Dabei besitzen AM-Pilze in der Regel keine sonderlich ausgeprägte Wirtsspezifität (Smith & Read, 2008), vielmehr werden die meisten Pflanzen zeitgleich von verschiedenen AM-Pilzarten kolonisiert (Fitter, 2005; Santos-Gonzalez *et al.* 2007).

*Glomus intraradices* ist ein weit verbreiteter AM-Pilz, der in verschiedenen Ökosystemen auf der ganzen Welt auftritt (Lammers *et al.*, 2003). In der Symbiose mit Wirtspflanzen, zu denen auch *M. truncatula* gehört, bildet *G. intraradices* Arbuskeln des Arum-Typs aus (Feddermann *et al.*, 2008). Aufgrund seiner schnellen Kolonisation von Wirtspflanzen ist *G. intraradices* nicht nur einer der am häufigsten untersuchten AM-Pilze, sondern auch Hauptbestandteil vieler kommerzieller Mykorrhizasubstrate (Martin *et al.*, 2008). Die seit 2003 laufende Sequenzierung des *G. intraradices* Genoms (Lammers *et al.*, 2003) erwies sich als unerwartet komplex (Martin *et al.*, 2008) und ist bislang noch nicht abgeschlossen. Seit 2011 ist jedoch eine EST-Datenbank von *G. intraradices* verfügbar (Tisserant *et al.*, 2012). Im Rahmen einer phylogenetischen Umgruppierung von AM-Pilzen wurde *G. intraradices* kürzlich in *Rhizophagus irregularis* umbenannt (Krüger *et al.*, 2012). Da sich diese Bezeichnung jedoch bislang noch nicht in der Literatur durchgesetzt hat, wird im Rahmen dieser Arbeit die Bezeichnung *Glomus intraradices* beibehalten.

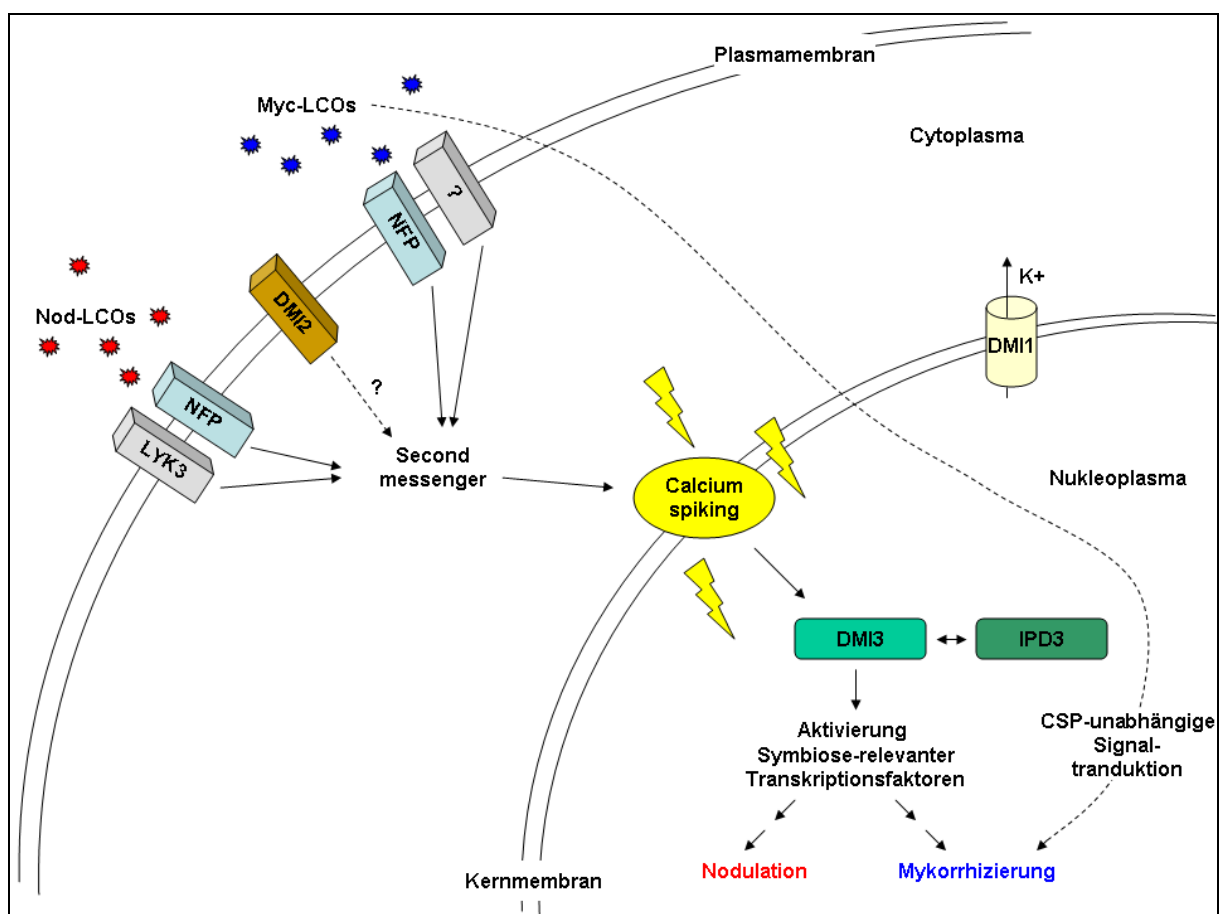
### **1.3 Die frühe Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose und der arbuskulären Mykorrhiza**

#### **1.3.1 Die frühe Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose**

Zur Ausbildung einer symbiotischen Verbindung ist ein komplexer Austausch von Signalmolekülen zwischen den beiden Symbiosepartnern erforderlich, der einer gegenseitigen Erkennung und der Ausbildung der symbiotischen Strukturen dient. Die frühe Signaltransduktion der Knöllchensymbiose wird im Folgenden beispielhaft anhand der Symbiose zwischen *M. truncatula* und *Sinorhizobium meliloti* beschrieben. Die Signaltransduktion beginnt mit der zuvor bereits erwähnten Sekretion von Flavonoiden in den Boden durch *M. truncatula* (Perret *et al.*, 2000). Diese aromatischen Verbindungen können so genannte NodD-Proteine von *S. meliloti* binden und induzieren über diese die Synthese der Nod-Faktoren (Peck *et al.*, 2006; Oldroyd & Downie, 2004). Hierbei handelt es sich um LCOs (Lerouge *et al.*, 1990; Dénarié *et al.*, 1996), die je nach



Rhizobienart unterschiedlichste Modifikationen tragen können, was vermutlich der Wirtsspezifität dient (Perret *et al.*, 2000; Oldroyd & Downie, 2004). Viele Rhizobien-Arten produzieren sogar mehr als eine Nod-LCO Variante (Jones *et al.*, 2007). Die Nod-LCOs werden in den Boden abgegeben und können dort von einem in der Wurzelhaarmembran von *M. truncatula* sitzenden (Haney *et al.*, 2011) Rezeptorkinase-Heterodimer (Radutoiu *et al.*, 2003), bestehend aus den beiden LysM(*lysine motif*)-Kinasen MtNFP (Arrighi *et al.*, 2006) und MtLYK3 (Smit *et al.*, 2007) erkannt werden (Abbildung I.5). Diese Perzeption löst in den entsprechenden Epidermiszellen eine Signalkaskade aus (Abbildung I.5). Diese beginnt in und um den Nukleus mit einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gefolgt von einer Oszillation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels, die man als *Ca<sup>2+</sup>-spiking* bezeichnet (Ehrhardt *et al.*, 1996; Sieberer *et al.*, 2009; Oldroyd & Downie, 2004; Oldroyd & Downie, 2006).



**Abbildung I.5: Schematische Darstellung der frühen Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose und arbuskulären Mykorrhiza von *Medicago truncatula*.** Nod- und Myc-LCOs werden von in der epidermalen Plasmamembran sitzenden Rezeptorkinase-Heterodimeren erkannt und lösen im und um den Zellkern eine als *calcium spiking* bezeichnete Oszillation des Calcium-Spiegels aus. In der Knöllchensymbiose setzt sich das Rezeptorkinase-Heterodimer aus den beiden LysM-Kinasen MtNFP und MtLYK3 zusammen. In der arbuskulären Mykorrhiza spielt MtNFP ebenfalls eine wichtige Rolle in der Signalperzeption, weitere Komponenten konnten bislang jedoch nicht identifiziert werden. Neben diesen ist auch die Rezeptorkinase MtDMI2 an der Transduktion der mikrobiellen Signale beteiligt. Der Kalium-durchlässige Ionenkanal MtDMI1 ist in der Kernmembran lokalisiert und kompensiert das in Folge des *calcium spiking* aufgetretene Ladungsungleichgewicht in der Zelle. Die Calcium-Signale werden im Nukleus durch die Calcium- und Calmodulin-anhängige Kinase MtDMI3 entschlüsselt und führen unter anderem durch Beteiligung von MtIPD3 zur Aktivierung Symbiose-relevanter Transkriptionsfaktoren, deren Aktivität wiederum letztlich zur Nodulation bzw. Mykorrhizierung führt. Neben der beschriebenen Signaltransduktionskaskade gibt es für die arbuskuläre Mykorrhiza Hinweise auf eine von diesem CSP (*common symbiotic pathway*) unabhängige Signaltransduktion.

Dieses Signal wird nun unter Beteiligung der Proteine MtDMI1, MtDMI2 und MtDMI3 weitergeleitet (Catoira *et al.*, 2000), die, wie ihre namentliche Abkürzung von „doesn` t make infection“ bereits verrät, alle essentiell für die Ausbildung der Knöllchensymbiose sind. Bei MtDMI2 handelt es sich zunächst um eine Rezeptorkinase (Stracke *et al.*, 2002), deren genaue Funktion in der Signaltransduktion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte. MtDMI1 ist ein Kalium-durchlässiger Kationen-Kanal in der Membran des Zellkerns (Abbildung 1.5), der dort das in Folge des  $Ca^{2+}$ -spiking aufgetretene Ladungsungleichgewicht kompensiert (Charpentier *et al.*, 2008). Das  $Ca^{2+}$ -spiking selbst spielt eine zentrale Rolle in der frühen Signaltransduktion der Knöllchensymbiose. Im Zellkern wird es von der  $Ca^{2+}$ -CaM(Calmodulin)-abhängigen Kinase MtDMI3 entschlüsselt (Gleason *et al.*, 2006). Hierbei wird diese zunächst durch Autophosphorylierung selbst aktiviert und kann in diesem Zustand durch weitere Phosphorylierungen Symbiose-spezifische Transkriptionsfaktoren aktivieren (Mitra *et al.*, 2004; Gleason *et al.*, 2006). Bei diesem Prozess spielt auch das mit MtDMI3 interagierende Protein MtIPD3 (*interacting protein of DMI3*) eine Rolle, denn dieses Gen ist ebenfalls essentiell für die Ausbildung der Knöllchensymbiose (Messinese *et al.*, 2007; Yano *et al.*, 2008; Horváth *et al.*, 2011). Zu den aktivierten Transkriptionsfaktoren gehören die GRAS-Transkriptionsfaktoren MtNSP1 (*nodulation signalling pathway 1*; Smit *et al.*, 2005) und MtNSP2 (*nodulation signalling pathway 2*; Kaló *et al.*, 2005) sowie der ERF-Transkriptionsfaktor MtERN1 (*ERF required for nodulation 1*; Middleton *et al.*, 2007), die an die Promotoren Symbiose-relevanter Gene binden können (Hirsch *et al.*, 2009). Diese wiederum lösen in den pflanzlichen Zellen symbiose-spezifische Antworten aus (Mitra *et al.*, 2004; Combier *et al.*, 2008), woraufhin die Symbiose wie in Absatz 1.1.2.2 beschrieben ausgebildet wird.

### 1.3.2 Die frühe Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza

Die frühe Signaltransduktion der AM-Symbiose zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices* ist dem molekularen Dialog mit *S. meliloti* sehr ähnlich. Wie in Abschnitt 1.1.3.2 beschrieben, beginnt die Kommunikation der beiden Symbiosepartner mit der Abgabe pflanzlicher Signalmoleküle in den Boden. Hierbei handelt es sich um Strigolactone, die in AM-Pilzen zu einer allgemeinen Stimulation des Metabolismus, sowie zu vermehrtem Wachstum und Verzweigung der Pilzhyphen führt (Akiyama *et al.*, 2005; Akiyama & Hayashi, 2006; Besserer *et al.*, 2006). In einigen AM-Pilzen führt der Kontakt mit Strigolactonen sogar zur Keimung von Sporen (Parniske, 2008). Im Gegenzug sondert der AM-Pilz nun ebenfalls einen molekularen Botenstoff in den Boden ab, der analog zu den für die Knöllchensymbiose beschriebenen Nod-Faktoren, allgemein als Myc-Faktor bezeichnet wird. Im Gegensatz zu den schon länger bekannten Nod-Faktoren, wurde die Existenz und genaue Zusammensetzung von Myc-Faktoren lange Zeit nur vermutet, diese konnten jedoch kürzlich als eine Mischung sulfatierter und nicht-sulfatierter LCOs identifiziert werden (Maillet *et al.*, 2011), die im weiteren Verlauf als sMyc-LCOs und nsMyc-LCOs bezeichnet werden. Dabei weisen vor allem sMyc-LCOs starke strukturelle Ähnlichkeiten zu den ebenfalls sulfatierten Nod-LCOs von *S. meliloti* auf (Maillet *et al.*, 2011). Bereits vor der chemischen Identifikation dieser



Botenstoffe konnte durch Behandlungen von Pflanzenwurzeln mit Überständen keimender AM-Sporen oder extraradikaler Hyphen mehrfach gezeigt werden, dass dies zu Symbiose-spezifischen Reaktionen in den Pflanzenwurzeln führt (Kosuta *et al.*, 2003; Weidmann *et al.*, 2004; Oláh *et al.*, 2005; Navazio *et al.*, 2007; Kuhn *et al.*, 2009; Chabaud *et al.*, 2011). Für die Perzeption der Myc-LCOs konnte bislang kein Mykorrhiza-spezifischer Rezeptor identifiziert werden (Abbildung 1.5), allerdings scheint auch hier die für die Knöllchensymbiose beschriebene LysM-Kinase MtNFP eine Rolle zu spielen (Maillet *et al.*, 2011, Czaja *et al.*, 2012). Der Austausch von Botenstoffen induziert in den Epidermiszellen der Wirtspflanze ein  $Ca^{2+}$ -spiking (Gough & Cullimore, 2011). Dabei unterscheidet sich das durch Nod-LCOs induzierte  $Ca^{2+}$ -spiking in seiner Signatur jedoch deutlich von den Signalen, die nach einer Behandlung von Pflanzenwurzeln mit dem Überstand keimender AM-Sporen gemessen wurden (Kosuta *et al.*, 2008; Bonfante & Requena, 2011). Eine gängige Erklärung für diese Unterschiede im  $Ca^{2+}$ -spiking ist die Vorbereitung der Pflanzenwurzel auf die beiden verschiedenen symbiotischen Interaktionen (Kosuta *et al.*, 2008). Interessanterweise zeigt sich die unterschiedliche  $Ca^{2+}$ -Signatur jedoch nur in der Prä-Kontaktphase der beiden Symbiosen, nach dem ersten Kontakt mit dem jeweiligen Symbiosepartner konnten in *M. truncatula* Wurzeln sehr ähnliche  $Ca^{2+}$ -Signale gemessen werden (Sieberer *et al.*, 2012). In Übereinstimmung mit der Knöllchensymbiose erfolgt die weitere Signaltransduktion anhand der bereits beschriebenen Proteine MtDMI1, MtDMI2, MtDMI3 und IPD3 (Abbildung 1.5). Durch MtDMI3 werden bislang größtenteils noch unbekannte AM-spezifische Transkriptionsfaktoren aktiviert, deren Aktivität die Pflanzenzellen auf eine Besiedlung mit AM-Pilzen vorbereiten.

Neben der beschriebenen Signaltransduktionskaskade gibt es für die arbuskuläre Mykorrhiza Hinweise auf eine von dieser unabhängigen Signaltransduktion (Kosuta *et al.*, 2003; Gutjahr *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2009). Daher wird vermutet, dass es neben den Myc-LCOs noch andere Signalmoleküle geben könnte (Bonfante & Requena, 2011), die eine Rolle in der frühen Signaltransduktion der AM spielen. Ein Beispiel hierfür sind die erst kürzlich identifizierten sekretierten Effektorproteine von *G. intraradices*, die pflanzlichen Abwehrmechanismen entgegenwirken (Kloppholz *et al.*, 2011).

### **1.3.3 Der evolutionäre Zusammenhang zwischen der Knöllchensymbiose und der arbuskulären Mykorrhiza**

Anhand der Beschreibungen der frühen Signaltransduktion der Knöllchensymbiose und der AM wird deutlich, dass diesen eine gemeinsame Signalkaskade, die als CSP (*common symbiotic pathway*) bezeichnet wird (Gough & Cullimore, 2011), zugrunde liegt. In *M. truncatula* konnten mit MtDMI1, MtDMI2, MtDMI3 und IPD3 vier Gene identifiziert werden, die für beide Symbiosen gleichermaßen essentiell sind und daher dem CSP angehören (Gough & Cullimore, 2011). Aus *Lotus japonicus* sind darüber hinaus zwei dem CSP angehörende Nukleoporine bekannt (Kistner *et al.*, 2005), deren Homologe in *M. truncatula* bislang jedoch nicht identifiziert wurden. Die Existenz des CSP führte zu der Hypothese, dass die ursprünglich für die AM-Symbiose etablierten Signalkomponenten (Remy *et al.*, 1994) im Laufe der Evolution von der wesentlich jüngeren

Knöllchensymbiose adaptiert wurden (Kistner & Parniske, 2002). Dabei geht man davon aus, dass eine 58 Millionen Jahre zurückliegende Genomduplikation von *M. truncatula* entscheidend für die Entwicklung der Knöllchensymbiose auf Basis der duplizierten Signalkomponenten der AM-Symbiose war (Young *et al.*, 2011). Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass sowohl Nod- als auch Myc-LCOs das Wachstum und die Verzweigung von Wurzeln in Abhängigkeit des CSP stimulieren (Oláh *et al.*, 2005; Maillet *et al.*, 2011), was ein Hinweis darauf sein könnte, dass die den beiden Symbiosen zugrunde liegende Signaltransduktion ursprünglich der Wurzelentwicklung diene.

## 1.4 Methoden zur funktionellen Genanalyse

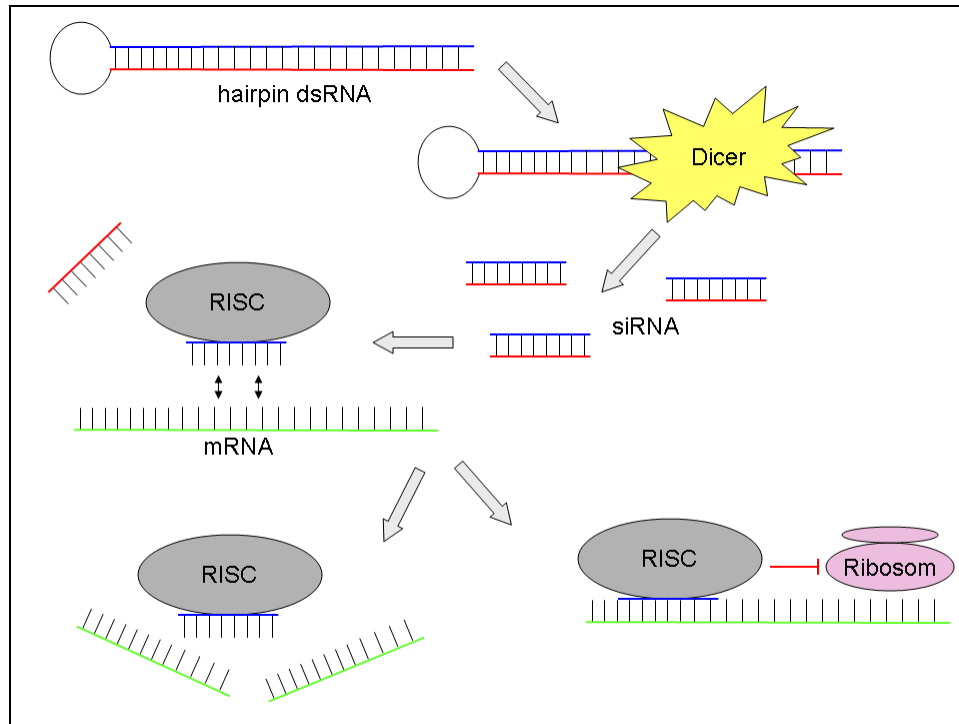
Funktionelle Genanalysen können generell über *forward* oder *reverse genetics* Ansätze erfolgen. Dabei versteht man unter *forward genetics* die klassische Genetik, die versucht zu einem vorhandenen Phänotyp die genetische Grundlage zu bestimmen. Im Gegensatz dazu wird durch *reverse genetics* versucht, zu einem bestimmten Gen den Phänotyp zu bestimmen. Dabei wird die biologische Funktion eines Gens durch dessen differentielle Expression (wie zum Beispiel *knockout*, *knockdown* oder Überexpression des Gens) unter definierten Bedingungen untersucht. In Pflanzen wurden bislang eine Vielzahl von *reverse genetics* Methoden wie beispielsweise *virus-induced gene silencing* (VIGS), RNA-Interferenz (RNAi), Insertionsmutagenese, chemische Mutagenese (TILLING: *targeting induced local lesions in genomes*) oder *fast neutron* Mutagenese (deTILLING: *deletion TILLING*) etabliert (Gilchrist & Haughn, 2010). Im Folgenden werden die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden der RNA-Interferenz und der Insertionsmutagenese beschrieben.

### 1.4.1 RNA-Interferenz (RNAi)

Kleine RNA-Moleküle können die Genexpression in Pflanzen auf verschiedene Arten auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebene beeinflussen (McGinnis, 2010). Generell unterscheiden sich dabei die Hemmung der Transkription (*transcriptional silencing*), die Hemmung der Translation (*translational silencing*) und die RNAi-vermittelte spezifische Inaktivierung von mRNAs (*messenger RNAs*). Der RNAi-Mechanismus bei Pflanzen wurde erst Anfang der 90er Jahre mehr oder weniger unbeabsichtigt in Petunien entdeckt (Napoli *et al.*, 1990). Hierbei handelt es sich um einen nicht nur in Pflanzen weit verbreiteten und evolutionär konservierten Mechanismus zur Genregulation (McGinnis, 2010), der ursprünglich möglicherweise zur Abwehr von Viren und Transposons entstanden ist (Mühlhardt, 2006).

Die Grundlage des RNAi-Prozesses bilden doppelsträngige RNA-Moleküle (dsRNA). Diese werden von einer spezifischen RNase namens Dicer erkannt und in 21 - 23 Nukleotide lange Fragmente zerschnitten (Abbildung 1.6), die als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet werden (Mühlhardt, 2006). Diese siRNAs können nun von einem so genannten RISC-Komplex (*RNA induced silencing complex*) gebunden werden, der spezifisch einen der beiden RNA-Stränge entfernt (Mühlhardt,

2006). Nun bindet der RISC-Komplex an mRNAs, die eine zu dem gebundenen einzelsträngigen RNA-Fragment komplementäre Sequenz besitzen (Abbildung I.6), und spaltet diese mRNA oder inhibiert ihre Translation (McGinnis, 2010). Dabei reichen bereits wenige RISC-Komplexe aus, um eine große Anzahl von mRNA-Molekülen zu inaktivieren (Mühlhardt, 2006).



**Abbildung I.6: Schematische Darstellung des RNAi-Prozesses.** Doppelsträngige RNA in Haarnadelstruktur (*hairpin dsRNA*) wird von der RNase Dicer in kurze RNA-Fragmente (*siRNA*) zerschnitten. Der RISC-Komplex bindet die *siRNA* und entfernt spezifisch einen der beiden RNA-Stränge. mRNAs mit komplementären Sequenzen zu der im RISC-Komplex verbleibenden RNA werden von diesem gespalten oder ihre Translation inhibiert.

Als genetisches Werkzeug wurde der RNAi-Mechanismus bereits in einer Vielzahl von Pflanzen verwendet (McGinnis, 2010). Dazu wird in der Regel ein Teil der Kodiersequenz des *Target*-Gens in einen RNAi-Expressionsvektor kloniert und anschließend in der Pflanze exprimiert. Diese Expressionsvektoren sind in der Regel so konstruiert, dass sie die *Target*-Sequenz durch eine Intron-Sequenz getrennt zwei mal in revers komplementärer Orientierung tragen, so dass die dsRNA als Haarnadelstruktur mit einem Intron-loop (Abbildung I.6) exprimiert wird (McGinnis, 2010). Lässt sich durch ein spezifisches RNAi-Konstrukt ein *knockdown* des entsprechenden *Target*-Gens messen, so spricht man von einem RNAi-Effekt. Das Level eines RNAi-Effekts ist in der Regel abhängig von der verwendeten *Target*-Sequenz, aber generell nicht vorhersagbar (McGinnis, 2010). Durch die gezielte Auswahl von *Target*-Sequenzen ist es möglich, sowohl einzelne Gene als auch ganze Genfamilien durch RNAi zu regulieren (Gilchrist & Haughn, 2010). Die Funktionalität und Effektivität von RNAi-Analysen in Wurzelsymbiosen von *M. truncatula* konnte bereits mehrfach gezeigt werden (Limpens *et al.*, 2004; Floß *et al.*, 2008a; Floß *et al.*, 2008b; Kuhn *et al.*, 2009).

## I.4.2 Insertionsmutagenese

Das Prinzip der Insertionsmutagenese basiert auf der Insertion eines genetischen Elements in der Kodierregion des *Target*-Gens, so dass keine nativen Transkripte dieses Gens mehr entstehen können. Typischerweise führt die Insertionsmutagenese damit zum kompletten Funktionsverlust des entsprechenden Genprodukts (Gilchrist & Haughn, 2010), denn die Insertion einer beliebigen, längeren Sequenz führt mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem verfrühten Stopcodon. Ein solches verfrühtes Stopcodon wird von einem zelleigenen Qualitätskontroll-Mechanismus namens *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) erkannt und das fehlerhafte Transkript daraufhin abgebaut (Stalder & Mühlemann, 2008). Als genetische Elemente für die Insertionsmutagenese eignen sich dabei vor allem Transposons und Retrotransposons sowie die Agrobakterien-vermittelte T-DNA (*transfer DNA*). Da sich solche Elemente nicht gezielt in ein bestimmtes Gen inserieren lassen, erfordert die Insertionsmutagenese in der Regel einen sehr hohen organisatorischen, zeitlichen und finanziellen Aufwand (Gilchrist & Haughn, 2010). Um das Genom eines Modellorganismus abzudecken werden große Populationen von Insertionsmutanten benötigt, in denen die jeweiligen Insertionen über PCR-basierte *screening*-Ansätze nachgewiesen werden können (Gilchrist & Haughn, 2010). Da ein solcher Aufwand für einzelne Forschungsgruppen nicht realistisch ist, wurden bereits für viele Modellorganismen Insertionsmutanten-Datenbanken, wie beispielsweise das SALK-Projekt für *A. thaliana* (Alonso *et al.*, 2003), gegründet. Auch für *M. truncatula* ist unter Federführung der *Noble Foundation* (Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) eine solche Datenbank verfügbar, in der das Retrotransposon *Tnt1* für die Insertionsmutagenese verwendet wird (Tadege *et al.*, 2008).

Das ursprünglich in Tabak identifizierte *transposable element of Nicotiana tabacum 1* (*Tnt1*) war eines der ersten charakterisierten pflanzlichen Retrotransposons überhaupt (Grandbastien *et al.*, 1989). Die 5,3 kb lange Sequenz von *Tnt1* (Anhang A.1) setzt sich aus zwei identischen *long terminal repeats* (LTRs) an beiden Enden, sowie einem dazwischen liegenden Kodierbereich zusammen (Grandbastien *et al.*, 1989). Dieser kodiert für ein Polyprotein, das alle notwendigen Funktionen für eine autonome Transposition besitzt (Grandbastien *et al.*, 1989). Dabei kopieren Retrotransposons sich selbst über ein mRNA-Intermediat und inserieren sich nach einer reversen Transkription an einem neuen Ort im Genom (Wessler, 2006).

Zur Erstellung der Insertionsmutanten wurde in eine *M. truncatula* Wildtyp R108 Pflanze zunächst fünf *Tnt1*-Kopien separat über Agrobakterien-vermittelte Transformation eingebracht (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Von dieser Elternlinie wurden Blatt-Explantate entnommen, aus denen durch Zugabe entsprechender Hormone Kalli erzeugt wurden. Über somatische Embryogenese wurden aus den Kalli pflanzliche Embryos erzeugt und zu Pflanzen regeneriert (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Ausschließlich während der somatischen Embryogenese bewegen sich *Tnt1*-Kopien an neue Insertionsorte innerhalb des Genoms (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Dabei wird aus jedem Blatt-Explantat nur eine Pflanze regeneriert, damit die einzelnen *Tnt1*-Linien vollständig unabhängig voneinander bleiben (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die *Tnt1*-Insertionen in nachfolgenden Generationen

stabil sind und keine weiteren Kopien ihrer selbst hervor bringen, die vorhandenen aber separat segregieren können (d'Erfurth *et al.*, 2003; Tadege *et al.*, 2008).

Die Tnt1-Insertionen konzentrieren sich vornehmlich auf die Exon-Regionen des Genoms (Tadege *et al.*, 2008). Eine mögliche Erklärung hierfür ist der hier vorherrschende höhere GC-Gehalt, der Mechanismus mit welchem Insertionen in kodierenden Regionen bevorzugt werden, ist jedoch unbekannt (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Innerhalb der kodierenden Bereiche konnten keine Insertions *hot spots* detektiert werden, hier sind die Tnt1-Insertionen gleichmäßig verteilt, so dass jede Insertionslinie im Durchschnitt 25 verschiedene Tnt1-Insertionen besitzt (Tadege *et al.*, 2008; Tadege *et al.*, 2009). Derzeit sind über 19.000 unabhängige *M. truncatula* Tnt1-Linien verfügbar, was einer Abdeckung von etwa 90 % aller bekannten *M. truncatula* Gene entspricht (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/index.php>).

Anhand von Tnt1-Insertionsmutanten konnte bereits die Funktionen einer Reihe von *M. truncatula* Genen aufgeklärt werden (Benlloch *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Tadege *et al.*, 2011; Uppalapati *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2012). Ein Beispiel hierfür ist das Gen *MtPIM* (*M. truncatula* *proliferating inflorescence meristem*), für das die Kontrolle der Identität des Blütenmeristems und der Blütenentwicklung anhand von Insertionsmutanten nachgewiesen werden konnte (Benlloch *et al.*, 2006).

## I.5 Vorarbeiten zur funktionellen Analyse von AM-relevanten Genen

Im Vorfeld dieser Arbeit standen aus unterschiedlichen Quellen eine große Anzahl AM-bezogener Transkriptionsdaten von *M. truncatula* zur Verfügung. Dabei handelte es sich um *Medicago* GeneChip Hybridisierungen verschiedener früher und reifer AM-Stadien in *M. truncatula* Wildtyp Pflanzen und *dmi3* Mutanten. Die frühen Stadien wurden durch *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gigaspora margarita* (Ortu *et al.*, 2012) und nach 5-tägiger Mykorrhizierung mit *G. intraradices* (V. Gianinazzi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich, unpublizierte Daten) repräsentiert, während bei den späten Stadien eine 28-tägige Mykorrhizierung mit *G. intraradices* bzw. *Glomus mossae* (Hogekamp *et al.*, 2011) erfolgte. Des Weiteren deckten diese Datensätze auch die Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose ab. Hierfür wurden Expressionsdaten aus mit keimenden *G. intraradices* Sporen und mit filtrierte Überständen keimender *G. intraradices* Sporen behandelte *M. truncatula* Wurzeln (N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, unpublizierte Daten) einbezogen. Detaillierte Beschreibungen der einzelnen Datensätze sind Tabelle I.1 zu entnehmen.

**Tabelle I.1: Übersicht der zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden *Medicago truncatula* Transkriptionsdaten.** Für die auf *Medicago GeneChip* basierenden Datensätze sind entsprechende Kurzbeschreibungen der Behandlungen und Kontrollen angegeben. Eine ausführliche Auflistung der einzelnen *GeneChip* Datensätze ist Tabelle C.1 im Anhang zu entnehmen.

<b>Datensatz</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>Referenz</b>
Sporenüberstand Wildtyp-Wurzeln	<i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit dem filtrierten Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen.	<i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen nach 6- bzw. 24-stündiger Kontrollinkubation.	N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, unpublizierte Daten
Sporenüberstand <i>dmi3</i> -Wurzeln	<i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit dem filtrierten Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen.	<i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten nach 6- bzw. 24-stündiger Kontrollinkubation.	N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, unpublizierte Daten
Sporen Wildtyp-Wurzeln	<i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen.	<i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen nach 6- bzw. 24-stündiger Kontrollinkubation.	N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, unpublizierte Daten
Sporen <i>dmi3</i> -Wurzeln	<i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten nach 6- bzw. 24-stündiger Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen.	<i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten nach 6- bzw. 24-stündiger Kontrollinkubation.	N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, unpublizierte Daten
PPA Wildtyp-Wurzeln	<i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen im Stadium der PPA-Bildung mit <i>Gigaspora margarita</i> .	Nicht-mykorrhizierte <i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen.	Ortu et al. (2012)
PPA <i>dmi3</i> -Wurzeln	<i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten im Stadium der Hyphopodien-Bildung mit <i>Gigaspora margarita</i> .	Nicht-mykorrhizierte <i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten.	Ortu et al. (2012)
Frühe Mykorrhiza Wildtyp	Für 5 Tage mit <i>G. intraradices</i> mykorrhizierte <i>M. truncatula</i> Wildtyp J5 Pflanzen.	Nicht-mykorrhizierte <i>M. truncatula</i> Wildtyp J5 Pflanzen.	V. Gianinazzi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich, unpublizierte Daten
Frühe Mykorrhiza <i>dmi3</i>	Für 5 Tage mit <i>G. intraradices</i> mykorrhizierte <i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten.	Nicht-mykorrhizierte <i>M. truncatula dmi3</i> Mutanten.	V. Gianinazzi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich, unpublizierte Daten
Reife Mykorrhiza	Für 28 Tage mit <i>G. intraradices</i> bzw. <i>Glomus mossae</i> mykorrhizierte <i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen.	Nicht-mykorrhizierte und mit 20 µM Phosphatdüngung supplementierte <i>M. truncatula</i> Wildtyp A17 Pflanzen.	Hogekamp et al. (2011)

## I.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die transkriptionelle und funktionelle Analyse von Pflanzengenen, die für die symbiotische Interaktion zwischen *M. truncatula* und AM-Pilzen benötigt werden, wobei ein Fokus auf der frühen Signaltransduktion lag. Dafür wurden insgesamt 17 Kandidatengene (Tabelle III.2) auf Grundlage AM-bezogener Transkriptionsdaten von *M. truncatula* ausgewählt (vgl. Tabelle I.1) und analysiert. Die Analysen erfolgten hauptsächlich als *reverse genetics* Ansätze, für einige der Kandidatengene aber auch auf Ebene der Promotoraktivität. Für die *reverse genetics* Ansätze wurden sowohl RNAi-Konstrukte als auch Tnt1-Insertionsmutanten verwendet, da sich beide Methoden gut ergänzen und durch ihre Kombination die Chancen auf die Identifizierung von geeigneten *knockdown*- bzw. *knockout*-Mutanten steigen. Im Rahmen der RNA-Interferenz wird häufig nur ein *knockdown* des *Target*-Gens erreicht, was zu einem nicht sichtbaren oder nur schwach sichtbaren Phänotyp führen kann. Andererseits eröffnet dies auch die Möglichkeit zur Analyse essentieller Gene. In Insertionsmutanten auf der anderen Seite lassen sich essentielle Gene nicht immer analysieren, da diese in der Regel letal sind, dafür weisen sie für nicht-essentiellen Gene häufig einen deutlicheren Phänotyp auf. Durch die Verknüpfung dieser Methoden sollen neue Einblicke in die frühe Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza von *M. truncatula* gewonnen werden.





## II. MATERIAL UND METHODEN

### II.1 Material

#### II.1.1 Pflanzen- und Pilzmaterialien

Für die Extraktion von Gesamt-DNA und die Induktion von transgenen haarigen Wurzeln für RNAi- oder Promoter-GUS-Experimente wurde die Modellleguminose *Medicago truncatula* Gaertn cv. Jemalong A17 (T. Huguet, INRA Toulouse, Frankreich), die im Folgenden lediglich als *M. truncatula* bezeichnet wird, verwendet. Im Rahmen der Analyse von Insertionsmutanten wurden die Tnt1-Insertionslinien NF0075, NF0160, NF4095, NF4409, NF4499, NF5196, NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF11181, NF11397, NF11581, NF11714 und NF12449 (J. Wen, Samuel Robert Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) verwendet. Da die Tnt1-Linien diesem genetischen Hintergrund entstammen (Tagede *et al.*, 2008), diente *Medicago truncatula* Gaertn cv. R108-1 (Hoffmann *et al.*, 1997), die im Folgenden lediglich als *M. truncatula* R108 bezeichnet wird, als Wildtyp-Kontrolle für die Tnt1-Insertionsmutanten.

Zur Mykorrhizierung wurden die Sporen des AM-Pilzes *Glomus intraradices* Isolat 49 (Maier *et al.*, 1995) verwendet und in Form eines Inokulums appliziert. Die vorangehende Co-Kultivierung des AM-Pilzes zur Inokulum-Produktion erfolgte mit Lauchpflanzen (*Allium porrum* cv. Elefant).

#### II.1.2 Bakterienstämme

Sämtliche Klonierungen erfolgten in *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mcr (Grant *et al.*, 1990) mit Ausnahme der Klonierung von RNAi-Konstrukten, diese erfolgten in *E. coli* Omnimax<sup>TM</sup> 2-T1<sup>R</sup> (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). ccdB-exprimierende Plasmide für die Gateway<sup>®</sup>-Klonierung wurden in dem ccdB-resistenten Stamm *E. coli* DB3.1 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) angezogen und vermehrt. Für die Induktion transgener haariger Wurzeln in *M. truncatula* wurde *Agrobacterium rhizogenes* ARqua1 (Quandt *et al.*, 1993) verwendet.

#### II.1.3 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind Tabelle II.1 zu entnehmen. Zusätzliche Plasmidkarten der Kloniervektoren pK18, pGUSINT, pRedRoot, pDONR221 und pK7GWIWG2(II) befinden sich in Abbildung B.1 - B.5 im Anhang.

#### II.1.4 Primer/Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden als Primer für die PCR (siehe Abschnitt II.2.2.5) verwendet und von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) bezogen.

Primer für die Amplifikation von Promotorfragmenten sind in Tabelle II.2 aufgelistet, Primer für die Amplifikation von RNAi-Targetsequenzen in Tabelle II.3 und Primer für die Genotypisierung von Tnt1-Insertionsmutanten in Tabelle II.4. Die Auflistung der für die *real time* RT-PCR verwendeten Primer ist in Tabelle II.5 zu finden. Bei Lieferung lagen sämtliche Primer lyophilisiert vor. Die für die *real time* RT-PCR verwendeten Primer wurden nach Herstellerangaben in RNase-freien Wasser gelöst und alle anderen Primer entsprechend in TE-Puffer.

**Tabelle II.1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide.** Angegeben sind die Größe, vermittelte Resistenz, sonstige Eigenschaften und Referenz der jeweiligen Plasmide. Abkürzungen: Amp: Ampicillin, Kan: Kanamycin, Spec: Spectinomycin, Strep: Streptomycin

Name	Größe	Resistenz	Beschreibung	Referenz
pK18	2,7 kb	Kan	Klonier- und Sequenziervektor mit <i>lacZ</i> -Gen (blau/weiß selektionierbar)	Pridmore (1987)
pK18:p12220	4,2 kb	Kan	pK18-Derivat; trägt die Promotorsequenz (-1/-1.486) von <i>Mtr.12220</i> als <i>SmaI/HindIII</i> -Konstrukt einkloniert	diese Arbeit
pK18:p10067	3,6 kb	Kan	pK18-Derivat, trägt die Promotorsequenz (-1/-996) von <i>MtSK1</i> als <i>EcoRI/HindIII</i> -Konstrukt einkloniert	diese Arbeit
pGUSINT	5,4 kb	Amp	Kloniervektor mit <i>gusAint</i> -Reportergen-Kassette	Küster et al. (1995)
pGUSINT:p12220	6,9 kb	Amp	pGUSINT-Derivat; trägt die Promotorsequenz (-1/-1.486) von <i>Mtr.12220 blunt end</i> über <i>SmaI</i> einkloniert	diese Arbeit
pGUSINT:p49618	6,5 kb	Amp	pGUSINT-Derivat; trägt die Promotorsequenz (-19/-1.097) von <i>Mtr.49618 blunt end</i> über <i>SmaI</i> einkloniert	diese Arbeit
pGUSINT:p10067	6,4 kb	Amp	pGUSINT-Derivat, trägt die Promotorsequenz (-1/-996) von <i>MtSK1</i> als <i>EcoRI/HindIII</i> -Konstrukt einkloniert	diese Arbeit
pRedRoot	13,5 kb	Kan	binäres Plasmid mit einer Ubiquitin-Promotor- <i>dsRed</i> -Kassette	Limpens et al. (2003)
pRR:p12220-GUS	17,5 kb	Kan	pRedRoot-Derivat; trägt die <i>Spel</i> aus pGUSINT:p12220 ausklonierte und Klenow-aufgefüllte Promoter-GUS-Kassette als <i>SmaI</i> einkloniertes Fragment	diese Arbeit
pRR:p49618-GUS	17,1 kb	Kan	pRedRoot-Derivat; trägt die <i>Spel</i> aus pGUSINT:p49618 ausklonierte und Klenow-aufgefüllte Promoter-GUS-Kassette als <i>SmaI</i> einkloniertes Fragment	diese Arbeit
pRR:p10067-GUS	17 kb	Kan	pRedRoot-Derivat, trägt die <i>XhoI/XbaI</i> aus pGUSINT:p10067 ausklonierte und Klenow-aufgefüllte Promoter-GUS-Kassette als <i>SmaI</i> einkloniertes Fragment	diese Arbeit
pDONR221	4,7 kb	Kan	leerer Kloniervektor aus dem Gateway®-Klonierkit, trägt attP-sites für homologe Rekombination zwischen denen das <i>ccdB</i> -Gen liegt	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

pDONR221: Mtr.9126	2,9 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+1.238/+1.669) gegen Mtr.9126 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.9513	2,9 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+301/+745) gegen Mtr.9513 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.10987	2,8 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+550/+883) gegen Mtr.10987 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.25945	2,9 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+470/+854) gegen Mtr.25945 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.32288	2,9 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+237/+609) gegen Mtr.32288 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.37966	3 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+350/+822) gegen Mtr.37966 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pDONR221: Mtr.43223	2,9 kb	Kan	pDONR221-Derivat; trägt die RNAi-Targetsequenz (+1.844/+2.218) gegen Mtr.43223 flankiert von attL-sites	diese Arbeit
pK7GWIWG2(II)	15,3 kb	Spec	binärer RNAi-Kloniervektor, trägt eine Ubiquitin-Promotor-dsRed-Kassette und zwei in inverser Orientierung angeordnete ccdB-Gene flankiert von attR-sites für die homologe Rekombination von RNAi-Targetsequenzen der Gateway®-Klonierung	E. Limpens, Wageningen University & Research Center, Wageningen, Niederlande
pK7GWIWG2: Mtr.9126	14,1 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über att-sites einklonierte Targetsequenzen (+1.238/+1.669) gegen Mtr.9126 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.9513	14,1 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über att-sites einklonierte Targetsequenzen (+301/+745) gegen Mtr.9513 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.10987	13,9 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über att-sites einklonierte Targetsequenzen (+550/+883) gegen Mtr.10987 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.25945	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über att-sites einklonierte Targetsequenzen (+470/+854) gegen Mtr.25945 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.32288	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über att-sites einklonierte Targetsequenzen (+237/+609) gegen Mtr.32288 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit

pK7GWIWG2: Mtr.37966	14,2 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+350/+822) gegen Mtr.37966 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.43223	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+1.844/+2.218) gegen Mtr.43223 als RNAi-Konstrukt	diese Arbeit
pK7GWIWG2: Mtr.20292	14,2 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+66/+502bp) gegen Mtr.20292 als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)
pK7GWIWG2: Mtr.12220	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+601/+888) gegen Mtr.12220 als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)
pK7GWIWG2: Mtr.49618	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+351/+597) gegen Mtr.49618 als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)
pK7GWIWG2: MtGras1	13,9 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+151/+529) gegen Mtr.7264 als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)
pK7GWIWG2: MtMyb2	13,9 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+502/+686) gegen Mtr.38547 als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)
pK7GWIWG2: GUS	14,0 kb	Spec	pK7GWIWG2(II)-Derivat; trägt zwei in inverser Orientierung über <i>att-sites</i> einklonierte Targetsequenzen (+920/+1182) gegen das GUS-Gen als RNAi-Konstrukt	Schaepe (2011)

**Tabelle II.2: Auflistung der Primersequenzen für die Amplifikation der Promotorregionen von Mtr.12220, Mtr.49618 und Mtr.10067.** Für die Primersequenzen sind native Sequenzen und für die Klonierung essentielle *extensions* getrennt angegeben. *Sma*I-Schnittstellen sind in Großbuchstaben dargestellt, *Hind*III-Schnittstellen unterstrichen und *Eco*RI-Schnittstellen fett gedruckt. Die Amplifikatgröße jedes Primerpaars ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Primerbezeichnung	Sequenz ( <i>extension</i> )	Sequenz ( <i>nativ</i> )	Amplifikat
Mtr.12220_for	aaaCCCGGG	tcttgtaaagttaagtcgtttctgat	1.503 bp
Mtr.12220_rev	aaaaagcctt	ttgggatagtattgagatagaaca	
Mtr.49618_for	aaagaattc	gtccaaaagtgcattaagcctata	1.115 bp
Mtr.49618_rev	aaaaagcctt	ctcaaacggctacttagatatctca	
p10067_for	aaagaattc	acgattgagatgtaggaagg	1.014 bp
p10067_rev	aaaaagcctt	tttcagtgcctagctatttca	

**Tabelle II.3: Auflistung der Primersequenzen für die Amplifikation der RNAi-Targetsequenzen von Mtr.9126, Mtr.9513, Mtr.10987, Mtr.25945, Mtr.32288, Mtr.37966 und Mtr.43223.** Die Primersequenzen umfassen neben den nativen Sequenzabschnitten die fett gedruckten attB1- (in forward-Primern) bzw. attB2- (in reverse-Primern) Sequenzen für die homologe Rekombination der Gateway®-Klonierung. Die für jedes Primerpaar angegebene Amplifikatgröße in Basenpaaren (bp) versteht sich inklusive der attB-Sequenzen (2 x 29 bp = 58 bp).

Primerbezeichnung	Primersequenz	Amplifikat
Mtr.9126_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctagggatcacaagagaggattaatg	489 bp
Mtr.9126_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttgtgacaaagtttaggatgctct	
Mtr.9513_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctctatcagattgtttataggtccac	502 bp
Mtr.9513_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttgaagagtcatatagccaattagt	
Mtr.10987_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctcagggtgaagaggaggggggcat	391 bp
Mtr.10987_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggttcctttctcaacttaaatcaaat	
Mtr.25945_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgtctctttgacatggttgtagtgg	442 bp
Mtr.25945_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtggccaataagaaatgaacttgatg	
Mtr.32288_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgagaacaatgtggaccttctaatg	430 bp
Mtr.32288_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgtgtctcttgagtcagtacaacca	
Mtr.37966_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctcatttaagctcggtaggaaatcg	530 bp
Mtr.37966_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtttgtatttcttagacgttggg	
Mtr.43223_attB1_for	ggggacaagtttgtaaaaaagcaggctgagttctcagtgatgcattctgtc	432 bp
Mtr.43223_attB2_rev	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtgtacgttactcatctcaatcagtta	

**Tabelle II.4: Auflistung der Primersequenzen für die Genotypisierung von Tnt1-Insertionsmutanten.** Angegeben sind die Primersequenzen zur Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinien NF0075, NF0160, NF4095, NF4409, NF4499, NF5196, NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF11181, NF11397, NF11581, NF11714 und NF12449 mittels direct Multiplex PCR. Die Amplifikatgröße jedes Primerpaars ist in Basenpaaren (bp) angegeben.

Tnt1-Linie	Primerbezeichnung	Primersequenz	Amplifikat
NF0075	Mtr.21216_for	agtttcgatgcttgctatggcggat	400 bp
	Mtr.21216_rev	tgaacattttctcaggagtttctt	
NF0160	Mtr.20292_for	agaccagcaagttctcagtgaaag	614 bp
	Mtr.20292_rev	tcaatcgaatttccgggtctacat	
NF4095	NF4095_for	catggagtcagaagaagacagaat	441 bp
	NF4095_rev	tcaccaaccatttctcctctatctt	
NF4409	Mtr.11570_for	gtgggattgaagatgttgacatga	527 bp
	Mtr.11570_rev	ctttacacaaaaggaattaccaact	
NF4499	Mtr.24351_for	gcaccaccttcataaattctac	530 bp
	Mtr.24351_rev	gcaacaacaacaatatcaacaaccg	
NF5196	NF5196_for	ctccttctatgccagtgtatctc	794 bp
	NF5196_rev	ctctacaatcgaagtctccacc	
NF8500	NF8500_for	gaatcatgaatctcgtgttccaa	318 bp
	NF8500_rev	gaacttcttctgtccatggcctg	
NF8710	NF8710_for	atggaccaagaagaagttcgaaga	420 bp
	NF8710_rev	catcttaggagcgactcatctctt	
NF8882	NF8882_for	agatggtaataacgtacaagatg	508 bp
	NF8882_rev	aactatcttgatccaagtcttca	
NF9470	NF9470_for	agactagttgtgaacatggtgtct	479 bp
	NF9470_rev	attaactggagccatctgcatatag	
NF9488	NF11020_NF9488_for	tagatgcaaggtacacaaaagcac	508 bp
	NF9488_rev	catcatctgcttagtttcttcttg	
NF9704	NF10424_NF9704_for	ggaacacattcaacaatccttctt	479 bp
	NF10424_NF9704_rev	gctaattgttaagtaggtcaacca	
NF10142	NF12449_NF10142_for	tgtcacaataattaagtagctattca	619 bp
	NF12449_NF10142_rev	atattattaattcaatgacaaggat	
NF10424	NF10424_NF9704_for	ggaacacattcaacaatccttctt	479 bp
	NF10424_NF9704_rev	gctaattgttaagtaggtcaacca	

NF11020	NF11020_NF9488_for	tagatgcaaggtacacaaaaagcac	349 bp
	N11020_rev	gagctccttcaacatcttcatag	
NF11181	NF11181_for	agctggaatctgttatcgaggacc	528 bp
	NF11181_rev	cgagcaagagcctggattagactca	
NF11397	NF11397_for2	atcatggtggccgaaaaatcttctt	447 bp
	NF11397_rev2	atacatcgaaaaccaattgtttcc	
NF11581	NF11581_for	gctcttcaacaacaacatcatcatc	402 bp
	NF11581_rev	gcaaccgtaacagaaccaccacaac	
NF11714	NF11714_for2	ttcagatggtctcatagttcgtaca	525 bp
	NF11714_rev2	tccaagcttctcaagtccaacaagg	
NF12449	NF12449_NF10142_for	tgtcacaatattaagtagctattca	619 bp
	NF12449_NF10142_rev	atattattaattcaatgacaaggat	
Tnt1-spezifisch	Tnt1-F (Tagede et al., 2008)	gcattcaaactagaagacagtgtacc	
Tnt1-spezifisch	LTR6 (Tagede et al., 2008)	gctaccaaccaaccaagtcaa	

**Tabelle II.5: Auflistung der Primersequenzen für real-time RT-PCR Messungen.** In einzelnen Abschnitten getrennt angegeben sind Primersequenzen zur Normalisierung, für AM-Markergene, für RNAi-Konstrukte und für Tnt1-Insertionslinien. Zusätzlich aufgeführt wird für jedes Primerpaar die Größe (in Basenpaaren) des amplifizierten Fragments und die Temperatur des Höhepunktes der spezifischen Schmelzkurve dieses Amplifikats.

Gen	Primerbezeichnung	Primersequenz	Amplifikat	Schmelzkurve
<b>real-time RT-PCR Primer zur Normalisierung:</b>				
MtTEF $\alpha$	Tefa_for	actgtgcagtagtacttgggtg	179 bp	~ 81,5 °C
	Tefa_rev	aagctaggaggtattgacaag		
<b>real-time RT-PCR Primer für AM-Markergene:</b>				
Gi $\alpha$ TUB (Pumplin et al., 2010)	Gi_a-Tub_for	tgtccaaccggttttaaagt	173 bp	~ 82,5 °C
	Gi_a-Tub_rev	aaagcacgtttggcgtagat		
GmTEF $\alpha$ (Baier et al., 2010)	Gm Tef1_L	ttgacaaaactgacaatagagaa	272 bp	~ 81,0 °C
	Gm Tef1_R	gcagcaataattaaatagca		
MtANN2	TC95776_L	gcaaaagttaccatgtgatta	309 bp	~ 81,5 °C
	TC95776_R	attgattcatgaagaatgtca		
MtBCP1	TC96500_L	catctttgcatgagagactta	220 bp	~ 76,0 °C
	TC96500_R	aatgaatgggagagttacaat		
MtCBF1	Mtr.51511_a_stop_hin	taattctgattccactgatga	115 bp	~ 76,0 °C
	Mtr.51511_a_stop_rev	agctgaattagaagtgcacgat		
MtCBF2	TC136186b_hin	agctgaagctacctcatatt	119 bp	~ 77,0 °C
	TC136186b_rev	taggtcttgtttaacatgcag		
MtENOD11	2-EN11-RT-AT21for	gcgtatttgcaagcaacaag	174 bp	~ 77,5 °C
	3-EN11-RT-Rev2	ccacatgcaagatgggacg		
MtHA1	TC95400_L	agggtctaactctattggga	202 bp	~ 80,0 °C
	TC95400_R	gacaacttatgtgaaccaatg		
MtPT4	PT4-L	ttcacatcttctcagttcttg	160 bp	~ 82,0 °C
	PT4-R	aatttgataggattcttttgc		
<b>real-time RT-PCR Primer für RNAi-Konstrukte:</b>				
Mtr.7264	Mtr.7264_RT_for	cttatttcagtgagcacttg	251 bp	~ 79,0 °C
	Mtr.7264_RT_rev	aagatttatccattgtgctg		
Mtr.9126	Mtr.9126_RT_for	caacaacagtttaccttacca	252 bp	~ 80,0 °C
	Mtr.9126_RT_rev	agcagattcttcttgaacttt		
Mtr.9513	Mtr.9513_RT_for	tcacattgtggaagatagga	274 bp	~ 81,0 °C
	Mtr.9513_RT_rev	gggtggacctataaacaatct		
Mtr.10987	Mtr.10987_RT_for	ataccactactctttcctcca	282 bp	~ 82,0 °C
	Mtr.10987_RT_rev	aactctagcaccattctttt		
Mtr.12220	Mtr.12220_RT_for	ctgaatcagaccaacaactta	262 bp	~ 80,5 °C
	Mtr.12220_RT_rev	gaacctagtgagagagctagg		

Mtr.20292	Mtr.20292_RT_for	tgattattgctttctggtaa	272 bp	~ 81,0 °C
	Mtr.20292_RT_rev	aagttctcgagtgaaagaatc		
Mtr.25945	Mtr.25945_RT_for	aagtgtagttttgtggagt	258 bp	~ 82,0 °C
	Mtr.25945_RT_rev	aacaaggaattttctatgctc		
Mtr.32288	Mtr.32288_RT_for	ggagaccacaaaatcatctat	263 bp	~ 80,0 °C
	Mtr.32288_RT_rev	aatttcaaatccctaaaaaga		
Mtr.37966	Mtr.37966_RT_for2	taacggttggaacaataaata	288 bp	~ 79,0 °C
	Mtr.37966_RT_rev2	cttctcatcttcaaggaagt		
Mtr.38547	Mtr.38547_RT_for	tggattgaaatgaattttg	299 bp	~ 83,5 °C
	Mtr.38547_RT_rev	gattgtttcatcttctgtga		
Mtr.43223	Mtr.43223_RT_for	aaatcttctgcataactaggg	270 bp	~ 81,5 °C
	Mtr.43223_RT_rev	gtttcgaagaaagatcagtt		
Mtr.49618	Mtr.49618_RT_for	tcttcatgtcatcttttgggt	297 bp	~ 81,0 °C
	Mtr.49618_RT_rev	taagagtaagtgcagcaacat		
<b>real-time RT-PCR Primer für Tnt1-Insertionslinien:</b>				
Mtr.9126 Tnt1-spez. Amplifikat	Mtr.9126_RT_B+D_for2	gaaagagatgctttatacttgtg	250 bp	~ 80,0 °C
	Mtr.9126_RT_B_rev	tggtgtcattgttactctttt		
Mtr.11570 genspez. Amplifikat	Mtr.11570_RT_D_for	aggaattaccaactgttttc	307 bp	~ 78,5 °C
	Mtr.11570_RT_D_rev	ctgaggctaagacattaggat		
Mtr.11570 Tnt1-spez. Amplifikat	Mtr.11570_RT_B_for	tttacacaaaaggaattacca	302 bp	~ 79,0 °C
	Mtr.11570_RT_B_rev	agagttgaagctctcctttta		
MtMKS1 genspez. Amplifikat	Mtr.24351_RT_D_for	tgaataagtgacatggaagg	259 bp	~ 80,0 °C
	Mtr.24351_RT_D_rev	aacaaaattgaaggactagg		
MtMKS1 Tnt1-spez. Amplifikat	Mtr.24351_RT_B_for	aaggatagacaacacacaat	298 bp	~ 79,5 °C
	Mtr.24351_RT_B_rev	agagttgaagctctcctttta		
Mtr.38547 genspez. Amplifikat	NF11581_RT_D_for	acgctatggattgaaatga	219 bp	~ 80,5 °C
	NF11581_RT_D_rev	cggaacgacctttatgtag		
Mtr.38547 Tnt1-spez. Amplifikat	NF11581_RT_B_for	acgctatggattgaaatga	239 bp	~ 80,0 °C
	NF11581_RT_B_rev	gtcaccaaaccaagaaaact		
Mtr.40638 genspez. Amplifikat 1	NF8500_RT_D_for2	aacaacaataacagcacaac	193 bp	~ 79,0 °C
	NF8500_RT_D_rev	ttgaggtggaataattacaaa		
Mtr.40638 genspez. Amplifikat 2	NF8710_RT_D_for	gttcgcaagatctttaacaaa	250 bp	~ 83,5 °C
	NF8710_RT_D_rev1	accattcttatccaaatcat		
Mtr.40638 Tnt1-spez. Amplifikat 2	NF8710_RT_B_for	gttcgcaagatctttaacaaa	236 bp	~ 81,0 °C
	NF8710_RT_B_rev	ttattcagaagggtttccac		
Mtr.43223 genspez. Amplifikat	NF5195_RT_D_for	aaagaagtcctcttgctatgt	260 bp	~ 81,0 °C
	NF5195_RT_D_rev	tatggacaaatctgatacagc		
Mtr.43223 Tnt1-spez. Amplifikat	NF5195_RT_B_for	gacaatgtattgggaagatg	217 bp	~ 81,0 °C
	NF5195_RT_B_rev	cattttctcaggagttttctt		

## II.1.5 Nährmedien, Antibiotika und Zusätze

### II.1.5.1 Nährmedien zur Anzucht von Bakterienstämmen

PA-Medium 17,5 g/l Penassay Broth (PA)

LB-Medium (Sambrook *et al.*, 1989) 10 g/l Trypton  
 5 g/l Hefeextrakt  
 5 g/l NaCl  
 → pH-Wert auf 7,4 eingestellt

TY-Medium (Beringer, 1974)	5 g/l Trypton 3 g/l Hefeextrakt 0,7 g/l $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ → pH-Wert auf 7,2 eingestellt
----------------------------	---

### II.1.5.2 Nährmedien zur Anzucht transgener Wurzelkulturen

M-Medium (Bécard & Fortin, 1988)	50 ml/l Macro-Stammlösung 1 50 ml/l Macro-Stammlösung 2 50 ml/l Macro-Stammlösung 3 50 ml/l Macro-Stammlösung 4 10 ml/l Macro-Stammlösung 5 1 ml/l Micro-Stammlösung 1 1 ml/l Micro-Stammlösung 2 10 ml/ Vitamin-Stammlösung 10 ml/ NaFe-EDTA-Stammlösung 10 g/l Saccharose → pH-Wert mit 100 mM KOH auf 5,5 einstellen → direkt vor dem Autoklavieren 5 g Phytigel zugegeben
Macro-Stammlösung 1	14,62 g/l $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$
Macro-Stammlösung 2	1,6 g/l $\text{KNO}_3$
Macro-Stammlösung 3	1,3 g/l $\text{KCl}$
Macro-Stammlösung 4	5,76 g/l $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$
Macro-Stammlösung 5	0,48 g/l $\text{KH}_2\text{PO}_4$
Micro-Stammlösung 1	4,9 g/l $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 1,5 g/l $\text{H}_3\text{BO}_3$ 2,66 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,0024 g/l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,13 g/l $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
Micro-Stammlösung 2	0,75 g/l $\text{KI}$



Vitamin-Stammlösung	0,3 g/l Glycin 0,01 g/l Thiamin-HCl 0,01 g/l Pyridoxin-HCl 0,05 g/l Nicotinsäure 5 g/l Myo-Inositol
NaFe-EDTA-Stammlösung	0,8 g/l NaFe-EDTA

### II.1.5.3 Antibiotika

Ampicillin (Amp)	Stammlösung: 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: 100 µg/ml Medium zur selektiven Anzucht Ampicillin-resistenter <i>E. coli</i> Stämme
Kanamycin (Kan)	Stammlösung: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: 50 µg/ml Medium zur selektiven Anzucht Kanamycin-resistenter <i>E. coli</i> Stämme; 100 µg/ml Medium zur selektiven Anzucht Kanamycin-resistenter <i>A. rhizogenes</i> Stämme
Streptomycin (Strep)	Stammlösung: 300 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: 600 µg/ml Medium zur selektiven Anzucht von <i>A. rhizogenes</i> Stämmen
Spectinomycin (Spec)	Stammlösung: 100 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: 100 µg/ml Medium zur selektiven Anzucht Spectinomycin-resistenter <i>E. coli</i> oder <i>A. rhizogenes</i> Stämme
Augmentin (Aug)	Stammlösung: 250 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: 1 mg/ml Medium zur Abtötung von <i>A. rhizogenes</i> Stämmen auf transgenen <i>M. truncatula</i> Wurzelkulturen

### II.1.5.4 Zusätze

Agar	Zur Herstellung von Festmedien für die Bakterienanzucht wurden pro Liter Flüssigmedium 15 g Agar zugesetzt.
------	---

Phytoagar	Zur Herstellung von Festmedien für die Pflanzenanzucht wurden pro Liter Flüssigmedium 25 g Phytoagar zugesetzt.
X-Gal	Stammlösung: 40 mg/ml in N,N-Dimethylformamid gelöst Anwendung: Für die blau-weiß-Selektion 30 µl pro Festmedienplatte ausplattiert.
IPTG	Stammlösung: 50 mg/ml in H <sub>2</sub> O gelöst und sterilfiltriert Anwendung: Für die blau-weiß-Selektion 30 µl pro Festmedienplatte ausplattiert.

## II.1.6 Puffer und Lösungen

### II.1.6.1 Puffer für Bakteriensuspensionen mit physiologischen Ionenkonzentrationen

PS-Puffer	7 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2H <sub>2</sub> O 5 g/l NaCl 3 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → pH-Wert mit HCl auf 7,0 eingestellt
-----------	--

### II.1.6.2 Puffer zur Aufnahme von DNA

TE-Puffer (Mühlhardt, 2006)	10 mM Tris HCl (pH 7,4) 1 mM EDTA (pH 8,0)
-----------------------------	---

### II.1.6.3 Puffer und Lösungen für Enzymreaktionen

10 x TA-Restriktionspuffer	660 mM K-Acetat 330 mM Tris HCl 100 mM MgCl <sub>2</sub> 5 mM Dithiothreitol (DTT) 1 mg/ml BSA → pH-Wert mit Eisessig auf 7,5 eingestellt
TCM-Puffer	10 mM CaCl <sub>2</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM Tris HCl → pH-Wert auf 7,5 eingestellt

#### II.1.6.4 Puffer und Lösungen für die PCR

dNTP-Mix 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP

#### II.1.6.5 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese

TAE-Puffer (Mühlhardt, 2006) 40 mM Tris-HCl  
10 mM Na-Acetat  
1 mM EDTA  
→ pH-Wert mit Eisessig auf 7,8 eingestellt

BPB-Lösung 80 ml Glycerin  
10 ml TAE-Puffer  
2,5 g Bromphenolblau (BPB)

Ethidiumbromid-Färbelösung 20 µl Ethidiumbromid-Lösung auf 500 ml H<sub>2</sub>O

DNA-Marker GeneRuler™ 50 bp, 100 bp und 1 kb DNA Ladder  
(Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)  
250 bp DNA Marker (MBBL, Bielefeld, Deutschland)

#### II.1.6.6 Puffer und Lösungen für die Gesamt-DNA Extraktion

CTAB-Puffer (Stewart & Via, 1993) 2 % (w/v) CTAB  
1,4 M NaCl  
200 mM EDTA  
100 mM Tris-HCl (pH 8,0)  
0,33 % (v/v) PVP-25  
0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol (frisch zugesetzt)

PCI-Mix (Mühlhardt, 2006) 1 Volumen iso-Amylalkohol  
24 Volumen Chloroform  
25 Volumen Phenol (pH 7,0)

#### II.1.6.7 Puffer und Lösungen für die HB-Lyse

HB1-Puffer (Becker, 1993) 50 mM Tris HCl pH 8,0  
10 mM EDTA pH 8,0  
→ pH-Wert mit HCl auf 8,0 eingestellt

HB2-Puffer (Becker, 1993)	200 mM NaOH 1 % (w/v) SDS
HB3-Puffer (Becker, 1993)	2,55 M K-Acetat → pH-Wert mit Eisessig auf 4,8 eingestellt

### II.1.6.8 Puffer und Lösungen zur Erzeugung hitzekompetenter Zellen

Tbf1-Puffer	100 mM RbCl 10 mM MES 10 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 50 mM MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O → MnCl <sub>2</sub> -Lösung getrennt autoklaviert und nachträglich zugesetzt. Der pH-Wert wurde in beiden Teilkomponenten auf 6,0 eingestellt.
Tbf2-Puffer	10 mM MOPS 75 mM CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 10 mM RbCl 15 % (v/v) Glycerin (87 %) → pH-Wert auf 6,5 eingestellt

### II.1.6.9 Puffer und Lösungen für histochemische Analysen

Tris-HCl/NaCl-Puffer	100 mM Tris-HCl 50 mM NaCl
K-Ferri/Ferrocyanid-Stammlösung	100 mM K-Ferricyanid 100 mM K-Ferrocyanid → Lagerung bei -20 °C
X-Gluc-Stammlösung	25 mg X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl/beta-D-Glucosid) in 500 µl N,N-Dimethylformamid gelöst
GUS-Färbepuffer (Beeckmann & Engler, 1994)	960 µl Tris HCl/ NaCl-Puffer 20 µl K-Ferri-/Ferrocyanid-Stammlösung 20 µl X-Gluc-Stammlösung
Tintenfärbelösung	5 % (v/v) schwarze Tinte in 8 % (v/v) Essigsäure

Alexa-Stammlösung	1 mg/ml WGA-Alexa Fluor® 488 in H <sub>2</sub> O gelöst
Alexa-Färbelösung	20 µl/ml Alexa-Stammlösung in 1 x PBS-Puffer
10 x PBS-Puffer	1,4 M NaCl 27 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 18 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> → pH-Wert mit KOH auf 7,3 eingestellt

## II.1.7 Düngelösungen zur Pflanzenanzucht

### II.1.7.1 ½ strength Hoagland's solution

Als Düngelösung für mykorrhizierte Pflanzen diente ½ strength Hoagland's solution (Arnon & Hoagland, 1940). Die Düngelösung wurde aus den in Tabelle II.6 beschriebenen sechs Teilkomponenten in sterilen Wasser angesetzt und der pH-Wert auf 6 - 7 eingestellt.

Tabelle II.6: Zusammensetzung der Teilkomponenten der ½ strength Hoagland's solution Düngelösung.

Komponente	Nährsalz	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gießlösung	Stammlösung/ Gießlösung
1	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	1 M	2,5 mM	2,5 ml/l
2	KNO <sub>3</sub>	1 M	2,5 mM	2,5 ml/l
3	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	1 M	1 mM	1 ml/l
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 M	20 µM	0,2 ml/l
5	NaFe EDTA	0,01 M	50 µM	5 ml/l
6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,0002 M	0,2 µM	1 ml /l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,01 M	10 µM	
	NiCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0002 M	0,2 µM	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,001 M	1 µM	
	MnCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,002 M	2 µM	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,0005 M	0,5 µM	
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0002 M	0,2 µM	

### II.1.7.2 NH-Mix

Ursprünglich dient der NH-Mix (Baier *et al.*, 2007) als Düngelösung für nodulierte Pflanzen, im Rahmen dieser Arbeit wurde er jedoch ausschließlich für die Verdünnung von Nod-LCOs in den Myc- und Nod-LCO *induction assays* verwendet (siehe Abschnitt II.2.5.7). Die Düngelösung wurde aus den in Tabelle II.7 beschriebenen sieben Teilkomponenten in sterilen Wasser angesetzt und der pH-Wert auf 7,5 eingestellt.

Tabelle II.7: Zusammensetzung der Teilkomponenten der NH-Mix Düngelösung.

Komponente	Nährsalz	Konzentration Stammlösung	Konzentration Gießlösung	Stammlösung/ Gießlösung
1	CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	1 M	1 mM	1 ml/l
2	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,5 M	0,5 mM	1 ml/l
3	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 M	0,5 mM	1 ml/l
4	NaFe EDTA	0,05 M	50 µM	1 ml/l
5	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,76 M	2 mM	2 ml/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,34 M	2 mM	
6	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,001 M	1 µM	1 ml/l
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,015 M	15 µM	
	ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	0,001 M	1 µM	
	MnSO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	0,01 M	10 µM	
	CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	0,0032 M	3,2 µM	
	CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,0002 M	0,2 µM	
7	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1 M	0 - 7,5 mM	0 - 7,5 ml/l

## II.1.8 Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind Tabelle II.8 zu entnehmen. Alle enzymatischen Reaktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen und mit entsprechend mitgelieferten Puffern durchgeführt. Ausgenommen hiervon sind alle Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen, die allesamt mit TA-Puffer anstelle der unterschiedlichen mitgelieferten Puffer angesetzt wurden.

Tabelle II.8: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme.

Enzym	Hersteller
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Klenow Fragment	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Pfu-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Phire® Hot Start II DNA Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Restriktionsendonukleasen (EcoRI, EcoRV, HindIII, SmaI, SpeI, XbaI, XhoI)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
RNaseA	Serva, Heidelberg, Deutschland

## II.1.9 Kits

Tabelle II.9: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
DNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Gateway® Cloning Technology Kit	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Phire® Plant Direct PCR Kit	Finnzymes, Espoo, Finnland
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNeasy® Plant Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SensiMix™ SYBR Hi-ROX One-Step Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
RNase free DNase Set	Qiagen, Hilden, Deutschland

## II.1.10 Chemikalien

Tabelle II.10: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril	Merck, Darmstadt, Deutschland
Agar	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Agarose (peqGOLD Universal Agarose)	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumnitrat ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Augmentin	Duchefa Direct, St. Louis, Missouri, USA
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Bromphenolblau ( $\text{C}_{19}\text{H}_9\text{Br}_4\text{NaO}_5\text{S}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA ( <i>bovine serum albumin</i> )	Serva, Heidelberg, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumnitrat-Tetrahydrat ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CTAB (Cetrimoniumbromid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
dATP	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
dCTP	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
dGTP	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
di-Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
dTTP	Bioline, Luckenwalde, Deutschland
EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ) 100% (Eisessig)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol abs. ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glycin ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin 85 %	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, UK
IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Iso-Amylalkohol ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumacetat ( $\text{CH}_3\text{COOK}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumjodid (KI)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumnitrat ( $\text{KNO}_3$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Kaliumsulfat ( $\text{K}_2\text{SO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
K-Ferricyanid (Kaliumhexacyanooferrat(III)); $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$	Merck, Darmstadt, Deutschland
K-Ferrocyanid (Kaliumhexacyanooferrat(III)-Trihydrat; $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kanamycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Kobaltchlorid-Hexahydrat ( $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Kupfersulfat-Pentahydrat ( $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid-Dihydrat ( $\text{MnCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mangansulfat-Monohydrat ( $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland

MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Molybdänsäure ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
MOPS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Myo-Inositol	Sigma Aldrich, München, Deutschland
NaFe-EDTA ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{NaFeO}_8$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumacetat ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhypochloridlösung ( $\text{NaClO}$ ) 10 %	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Nickelchlorid-Hexahydrat ( $\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nicotinsäure ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
N,N-Dimethylformamid ( $\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Penassay Broth (PA) Medium	Oxoid, Basingstoke, UK
Phenol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phytigel	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Phytoagar	Duchefa, Haarlem, Niederlande
PVP(Polyvinylpyrrolidon)-25	Serva, Heidelberg, Deutschland
Pyridoxin-HCl ( $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Rubidiumchlorid ( $\text{RbCl}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Saccharose ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure ( $\text{HCl}$ ) 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 95 - 98 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS (sodium dodecyl sulfate; $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S} \cdot \text{Na}$ )	Serva, Heidelberg, Deutschland
Spectinomycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Stickstoff (flüssig)	Linde, München, Deutschland
Streptomycin	Serva, Heidelberg, Deutschland
Thiamin-HCl ( $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OS} \cdot \text{HCl}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Tinte (schwarz)	Sheaffer, Shelton, Connecticut, USA
Tris	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
WGA (wheat germ agglutinin) Alexa Fluor® 488	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
X-Gal	Roth, Karlsruhe, Deutschland
X-Gluc (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl/ $\beta$ -D-Glucosid)	X-Gluc Direct, UK
Zinksulfat-Heptahydrat ( $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ )	Sigma Aldrich, München, Deutschland

### II.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle II.11: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel.

Verbrauchsmittel	Hersteller
Aluminiumfolie	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Deckglas	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einwegfilterpipetten (10 ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einwegkanüle (5 ml)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Elektroporationsküvette	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Frischhaltefolie	Melitta, Minden, Deutschland
Insulinspritze (0,5 ml)	BD Medical, Le Pont de Claix Cedex, Frankreich
Lysing Matrix D tubes	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Nitrilhandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Objektträger	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Optische Klebefolien (für <i>real time</i> RT-PCR)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Parafilm	Pechiney, Menasha, Wisconsin, USA
Petrischale, rund, $\varnothing$ 35 mm	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, New York, USA
Petrischale, rund, $\varnothing$ 90 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland



Petrischale, eckig, 120 x 120 mm	Novodirekt, Kehl, Deutschland
Pikiererde P (Einheitserde)	Gebr. Patzor GmbH, Sinnatal-Jossa, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Pipettenfilterspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1250 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Polypropylen-Röhrchen (13 ml, 15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Präzisionswischtücher	Kimberley-Clark, Koblenz, Deutschland
Reaktionsgefäß (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß (RNase-frei, 1,5 ml)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß (0,2 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Seramis® Substrat	Mars, Mogendorf, Deutschland
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Universol Blue Dünger (N:P:K 18:11:18)	Scotts, Nordhorn, Deutschland
Vermiculite (Körnung 3 - 6 mm)	Deutsche Vermiculite Dämmstoff-GmbH, Sprockhövel, Deutschland
96-well Platte (für <i>real time</i> RT-PCR)	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland

## II.1.12 Geräte

Tabelle II.12: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.

Gerät	Typbezeichnung	Hersteller
Autoklav	VX-150	Systec, Wettengel, Deutschland
Brutschrank	B6, B20	Thermo, Langenselbold, Deutschland
Digitalkamera	XC50	Olympus, Hamburg, Deutschland
Eismaschine	AF-100	Scotsman, Mailand, Italien
Elektroporator	Cellject Uno	Thermo, Langenselbold, Deutschland
Feinwaage	Extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzbinokular	EL6000	Leica, Wetzlar, Deutschland
Gefrierschrank (-80 °C)	MDF-U73V	Sanyo, Osaka, Japan
Geldokumentationsanlage	UV Solo	Biometra, Göttingen, Deutschland
Homogenisator	FastPrep®-24	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
Inkubationsschüttler	Certomat® IS	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Klimakammer		ThermoTEC, Weilburg, Deutschland
Klimaschrank	KPS 1700	Weisshaar, Bad Salzflen, Deutschland
Kühl-Gefrier-Kombinationsgerät		Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Kühlzentrifuge	5810 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Laborspülmaschine	G7883	Miele, Gütersloh, Deutschland
Magnetrührer	RH basic 2	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop	BH-2	Olympus, Hamburg, Deutschland
Mikrowelle	R-26ST	Sharp, Hamburg, Deutschland
Multikanalpipette	10 µl, 100 µl, 1200 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Gerät	Mastercycler pro S	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	Basic Meter PB-11	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Photometer	BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipette	10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl Nichipet EX Professional	Süd-Laborbedarf, Ganting, Deutschland
Pipettenspüle		Hölzel, Hörlkofen, Deutschland
<i>real time</i> RT-PCR-Gerät	Mastercycler realplex <sup>2</sup>	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reinstwasseranlage	Arium® 611 UV	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Spannungsgeber für Gelelektrophorese	Power Pack P25T	Biometra, Göttingen, Deutschland
Spectrophotometer	Nanodrop 1000	Thermo, Langenselbold, Deutschland
Sterilbank	HERAsafe KS18	Thermo, Langenselbold, Deutschland
Sterilschrank	Heraeus	Thermo, Langenselbold, Deutschland

Tischzentrifuge	5424	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vibratom	VT1000S	Leica, Wetzlar, Deutschland
Vortexer	MS3 basic	IKA, Staufen, Deutschland
Waage	Extend	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	1002, 1003	GFL, Burgwedel, Deutschland

## II.1.13 Software

Tabelle II.13: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Softwareprogramme.

Programm	Anwendung	Hersteller/Referenz
Adobe Photoshop® CS4 Extended 11.0	Bildbearbeitung	Adobe Systems, München, Deutschland
Adobe Reader 8	Textverarbeitung	Adobe Systems, München, Deutschland
CLC DNA Workbench 5.5	Analyse von Sequenzdaten, Planung von Klonierungen	CLC bio, Katrinebjerg, Dänemark
Clone Manager 4.01	Analyse von Sequenzdaten, Planung von Klonierungen	Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA
CorelDRAW® X3	Bildbearbeitung	Corel, Fremont, Kalifornien, USA
dChip	Analyse von <i>GeneChip</i> Daten	Li & Wang (2003)
Emboss Package	Analyse von Sequenzdaten	Rice <i>et al.</i> (2000)
EndNote 7.0	Literaturmanagement	Thomson ISI ResearchSoft, Carlsbad, Kalifornien, USA
MapMan 3.5.OBETA	Analyse von <i>GeneChip</i> Daten	Usadel <i>et al.</i> (2005)
Microsoft Office Paket	Textverarbeitung, Datenanalyse	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Primer Designer 2.2	Primerdesign	Scientific & Educational Software, Cary, North Carolina, USA
Primer3	Primerdesign	Rozen & Skaletzky (2000)
realplex 2.2	Analyse von <i>real time</i> RT-PCR Daten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
SAMS 2.0	Analyse von <i>GeneChip</i> Daten	Bekel <i>et al.</i> (2009)

## II.2 Methoden

### II.2.1 Anzucht und Konservierung von Bakterienstämmen

#### II.2.1.1 Anzucht von Bakterienstämmen

Die Anzucht von *E. coli*-Stämmen erfolgte auf bzw. in PA- oder LB- Fest- bzw. Flüssigmedien bei 37 °C über Nacht. *A. rhizogenes* Stämme wurden für 48 h bei 30 °C auf bzw. in TY-Fest- bzw. Flüssigmedium angezogen. Eine selektive Anzucht auf resistenzvermittelnde Plasmide erfolgte durch Zugabe entsprechender Antibiotika (siehe Abschnitt II.1.5.3).

#### II.2.1.2 Konservierung von Bakterienstämmen

Die Konservierung von Bakterienstämmen erfolgte in Form von Glycerinkulturen die bei -20 °C gelagert wurden. Hierzu wurden entsprechende Bakterienstämme selektiv auf Platten angezogen

und in 500 µl LB-Medium (*E. coli* Stämme) bzw. 500 µl TY-Medium (*A. rhizogenes* Stämme) resuspendiert. Nach Zugabe von 600 µl Glycerin (87 %) wurde die Lösung gründlich gevortext und bei -20 °C gelagert. Eine erneute Anzucht der konservierten Stämme erfolgte durch den Ausstrich von 20 µl Glycerinkultur pro Platte entsprechenden Festmediums.

## II.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

### II.2.2.1 Isolierung bakterieller Nukleinsäuren

#### II.2.2.1.1 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels QIAprep® Spin Miniprep Kit

Die Isolierung hochreiner bakterieller Plasmid-DNA aus *E. coli* und *A. rhizogenes* Stämmen erfolgte mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) wie vom Hersteller beschrieben.

#### II.2.2.1.2 Isolierung bakterieller Plasmid-DNA mittels HB-Lyse

Die Plasmid-Isolierung mittels HB-Lyse (modifiziert nach Becker, 1993) diente zur schnellen Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*. Die nach dieser Methode isolierte Plasmid-DNA war stärker verunreinigt als die nach der vorherigen Methode gewonnenen Plasmid-DNA, daher diente sie ausschließlich zu Kontroll- und Nachweiszwecken und wurde nicht für Klonierungen verwendet.

Für die HB-Lyse wurden ca. 5 mm<sup>2</sup> *E. coli* Zellen vom Festmedium abgenommen und in 200 µl HB1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden nacheinander je 200 µl HB2- und HB3-Puffer hinzugegeben und das Gemisch anschließend jeweils invertiert. Nach einer zehnmütigen Zentrifugation bei 14.500 UpM wurde der Überstand auf 500 µl Isopropanol gekippt und invertiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 20 Minuten bei 13.000 UpM wurde der Überstand abgenommen und das Pellet mit 500 µl 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 13.000 UpM wurde der Überstand erneut abgenommen und das Pellet trocknen gelassen. Die anschließende Resuspension des getrockneten Pellets erfolgte in 40 - 50 µl TE-Puffer.

#### II.2.2.1.3 Aufreinigung bakterieller Plasmid-DNA mittels NucleoSpin® Extract II Kit

Die DNA-Aufreinigung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel). Aufgereinigt wurden PCR-Amplifikate und DNA-Fragmente deren 5'-Überhänge mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt wurden um überschüssige Nukleotide, Primer, Salze, kleine unspezifische Fehlampifikate oder das Klenow-Fragment zu entfernen, welche nachfolgende Reaktionen behindern können. Die Aufreinigung erfolgte je nach Anwendung separat oder in Kombination mit einer vorausgehenden Extraktion aus einem Agarosegel. Beides erfolgte entsprechend der Anweisungen des Herstellers.

## II.2.2.2 Isolierung pflanzlicher Nukleinsäuren

### II.2.2.2.1 Isolierung von Gesamt-DNA aus *M. truncatula*

Die Isolierung genomischer Gesamt-DNA aus *M. truncatula* erfolgte wahlweise nach der CTAB-Methode oder mittels des DNeasy® Plant Mini Kits. Während die aufwendigere CTAB-Methode deutlich höherer Konzentrationen genomischer DNA lieferte, war die Isolierung mit dem Kit wesentlich schneller und mit mehr parallelen Proben durchführbar.

### II.2.2.2.2 Isolierung von Gesamt-DNA nach der CTAB-Methode

Für die Extraktion nach der CTAB-Methode (modifiziert nach Stewart & Via, 1993) wurde zunächst frisches Pflanzengewebe in flüssigem Stickstoff gefroren und anschließend in Lysing Matrix D tubes in einem FastPrep®-24 Homogenisator bei 6,5 m/s homogenisiert. Insgesamt wurden die Proben fünf Mal 10 Sekunden homogenisiert, wobei sie nach jeweils zwei Durchgängen kurz in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden um eine Überhitzung zu vermeiden. Das so zerkleinerte Pflanzengewebe wurde mit auf 65 °C temperierten CTAB-Extraktionspuffer (4 ml/g Gewebe) versetzt und für 30 Minuten bei 60 °C inkubiert. Zwischenzeitlich wurde die Suspension mehrfach invertiert. Anschließend wurde das Gemisch mit 1 Volumen PCI-Mix versetzt, invertiert und für 15 Minuten bei 10.000 UpM zur Phasenbildung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation konnte die obere, wässrige Phase abgezogen und mit DNase-freier RNaseA versetzen werden. Der RNA-Verdau fand bei 37 °C für 15 Minuten statt. Im Anschluss fanden zwei weitere Extraktionsschritte statt, der erste mit 1 Volumen PCI-Mix und der zweite mit 1 Volumen Chloroform. In beiden Fällen konnte durch eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 10.000 UpM die obere, wässrige Phase separiert werden, die im jeweils nächsten Schritt weiter verwendet wurde. Anschließend wurde die DNA aus dieser Lösung mit 1/10 Volumen Natriumacetat (3 M Natriumacetat, pH 5,2) und 0,6 Volumen Isopropanol für 1 Stunde bei -20 °C gefällt. Durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 6.000 UpM wurde die DNA pelletiert, mit 75 % (v/v) Ethanol gewaschen und auf gleiche Weise erneut pelletiert. Das Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in TE-Puffer resuspendiert.

### II.2.2.2.3 Isolierung von Gesamt-DNA mittels DNeasy® Plant Mini Kit

Die Isolierung genomischer Gesamt-DNA aus *M. truncatula* erfolgte mit Hilfe des DNeasy® Plant Mini Kit wie vom Hersteller beschrieben. Die vorausgehende Homogenisation des Pflanzenmaterials erfolgte in Lysing Matrix D tubes in einem FastPrep®-24 Homogenisator bei 6,5 m/s. Insgesamt wurden die Proben fünf Mal 10 Sekunden homogenisiert, wobei sie nach jeweils zwei Durchgängen kurz in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden, um eine Überhitzung zu vermeiden.

#### II.2.2.2.4 Isolierung von pflanzlicher RNA mittels RNeasy® Plant Mini Kit

Die Isolierung von RNA aus *M. truncatula* erfolgte mit Hilfe des RNeasy® Plant Mini Kit erweitert durch einen DNaseI-Verdau mittels RNase free DNase Set. Die vorausgehende Homogenisation des Pflanzenmaterials erfolgte in Lysing Matrix D tubes in einem FastPrep®-24 Homogenisator bei 6,5 m/s. Insgesamt wurden die Proben fünf Mal 30 Sekunden homogenisiert, wobei sie nach jeweils zwei Durchgängen kurz in flüssigem Stickstoff gekühlt wurden, um eine Überhitzung zu vermeiden. Abweichend von der Beschreibung des Herstellers erfolgte die Homogenisation des Pflanzenmaterials in 600 µl anstelle von 450 µl RLT-Puffer.

#### II.2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte in der Gelelektrophorese mit 1 - 2 % (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989). Zur Beladung der Agarosegele wurden entsprechende DNA- bzw. RNA-Proben mit 0,5 - 2 µl Bromphenolblau-Lösung (BPB-Lösung) versetzt. Die anschließende Auftrennung erfolgte bei einer Spannung von 70 - 100 V. Die Färbung der Agarosegele erfolgte mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der mit den Nukleinsäure-Doppelsträngen interkaliert. Durch Anregung mit UV-Licht (254-366 nm) emittiert Ethidiumbromid Licht im orange-roten Bereich (590 nm), so dass die im Agarosegel aufgetrennte DNA- bzw. RNA-Fragmente durch UV-Bestrahlung sichtbar werden (Lottspeich, 1998).

#### II.2.2.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde im Rahmen dieser Arbeit je nach Anwendung aus der Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt oder nach Herstellerangaben durch eine photometrische Messung mittels Nanodrop 1000 bestimmt.

#### II.2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR: *polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur Herstellung zahlreicher Kopien eines bestimmten DNA-Abschnitts durch enzymatische Vervielfältigung (Mullis & Faloona, 1987). Die zu amplifizierende DNA (*template DNA*) wird zu einem Gemisch aus Puffer, Primern, Nukleotiden und einer hitzestabilen DNA-Polymerase gegeben. Die PCR läuft in Zyklen mit jeweils drei Schritten ab. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird der PCR-Ansatz stark erhitzt, so dass die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge zerfällt. Zu Beginn der PCR gibt es in der Regel noch eine initiale Denaturierung, bei der das Gemisch für längere Zeit erhitzt wird um anfängliche Sekundärstrukturen in der DNA aufzulösen (Lottspeich, 1998). Im zweiten PCR-Schritt, dem *Annealing* lagern sich die Primer bei einer Primer-abhängigen Temperatur an die einzelsträngige DNA an. Als drittes folgt der Polymerisationsschritt, der beim Temperatur-

Optimum der beigefügten hitzestabilen DNA-Polymerase statt findet. In diesem Schritt setzt die Polymerase an den Primern an und polymerisiert den jeweils zweiten, neuen DNA-Strang (Lottspeich, 1998). Für die meisten Anwendungen liegt nach 30 - 35 dieser Zyklen genügend PCR-Amplifikat für weitere Analysen vor (Lottspeich, 1998). Zuletzt folgt der PCR für gewöhnlich noch eine etwas längere finale Polymerisation.

### II.2.2.5.1 Standard PCR

Die Standard-PCR wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Amplifikation von Promotorsequenzen und RNAi-Targetsequenzen aus genomischer DNA von *M. truncatula* verwendet. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Polymerasen verwendet: die Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase für die Amplifikation der Promotorsequenzen von *Mtr.12220* und *Mtr.49618* und für die Amplifikation der RNAi-Targetsequenzen von *Mtr.9126*, *Mtr.9513*, *Mtr.10987*, *Mtr.25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966* und *Mtr.42332*, sowie die *Pfu*-Polymerase für die Amplifikation der Promotorsequenz von *Mtr.10067*. Die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionen erfolgte nach Herstellerangaben der jeweiligen Polymerasen. Die verwendeten PCR-Programme sind für die Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase Tabelle II.14 und für die *Pfu*-Polymerase Tabelle II.15 zu entnehmen.

**Tabelle II.14: PCR Programm für die Amplifikation von RNAi-Targetsequenzen und Promotorsequenzen mittels Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase.** Das Programm wurde zur Amplifikation der RNAi-Targetsequenzen von *Mtr.9126*, *Mtr.9513*, *Mtr.10987*, *Mtr.25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966*, *Mtr.42332* und der Promotorregionen von *Mtr.12220* und *Mtr.49618* verwendet. Die *Annealing*-Bedingungen weisen folgende Abweichungen für die einzelnen Gene auf: \*Zeit für das *Annealing* der RNAi-Targetsequenzen *Mtr.9126*, *Mtr.9513*, *Mtr.10987*, *Mtr.25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966*, und *Mtr.42332*; \*\*Zeit für das *Annealing* der Promotorsequenzen von *Mtr.12220* und *Mtr.49618*; <sup>1</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.9513* und *Mtr.10987*, <sup>2</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.42332*, <sup>3</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.25945*, <sup>4</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.32288* und *Mtr.37966*, <sup>5</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.9126*, <sup>6</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.12220*, <sup>7</sup>Annealingtemperatur für *Mtr.49618*.

PCR Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	98 °C
Denaturierung	15 sec	98 °C
Annealing	20*/30** sec	55 °C <sup>1</sup> /58 °C <sup>2</sup> /61 °C <sup>3</sup> /63 °C <sup>4</sup> /64 °C <sup>5</sup> /66 °C <sup>6</sup> /70 °C <sup>7</sup>
Polymerisation	1 min	72 °C
Finale Polymerisation	3 min	72 °C
Lagerung	∞	4 °C

**Tabelle II.15: PCR Programm für die Amplifikation der Promotorregion von *Mtr.10067* mittels *Pfu*-Polymerase.**

PCR Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C
Denaturierung	30 sec	95 °C
Annealing	30 sec	63 °C
Polymerisation	2 min	72 °C
Finale Polymerisation	7 min	72 °C
Lagerung	∞	4 °C

### II.2.2.5.2 Direct Multiplex PCR

Als *direct PCR* bezeichnet man eine PCR die direkt aus dem gewünschten Gewebe ohne eine vorherige Extraktion der *template* DNA erfolgt. Im Rahmen dieser Arbeit diente die *direct PCR* der schnellen Genotypisierung von Tnt1-Insertionslinien und erfolgte mit Hilfe des Phire® Plant Direct PCR Kits. Abweichend von den Herstellerangaben erfolgte die Aufbereitung des für die *direct PCR* eingesetzten Pflanzenmaterials nach folgendem Ablauf: Mit einer sterilen 1.000 µl Pipettenspitze wurde von der zu untersuchenden Pflanze ein Blattstück ausgestochen, in 20 µl TE-Puffer zerquetscht und anschließend für 3 Minuten bei 50 °C inkubiert. Von diesem *direct template* wurde je 1 µl in eine 20 µl *direct PCR*-Reaktion eingesetzt. In der Regel erfolgten die *direct PCR*-Reaktionen zudem als Multiplex-PCR, d. h. als PCR der mehrere Primerpaare gleichzeitig beigefügt werden (Mühlhardt, 2006). Dabei handelte es sich jeweils um ein genspezifisches Primerpaar sowie einem zusätzlichen Tnt1-spezifischen Primer. Die Zusammensetzung der einzelnen PCR-Reaktionen sowie die verwendeten Programme sind den Tabellen II.16, II.17 und II.18 zu entnehmen.

**Tabelle II.16: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes der mit Hilfe des Phire® Plant Direct PCR Kit durchgeführten *direct Multiplex PCR* Messungen.**

<i>direct Multiplex PCR</i> Komponente	Volumen
2 x Puffer	10 µl
<i>direct template</i>	1 µl
genspezifischer <i>forward</i> Primer (100 mM)	0,5 µl
genspezifischer <i>reverse</i> Primer (100 mM)	0,5 µl
Tnt1-spezifischer Primer (100 mM)	0,5 µl
Phire II Polymerase	0,4 µl
H <sub>2</sub> O	7,1 µl
Gesamtvolumen	20 µl

**Tabelle II.17: PCR Programm für die Genotypisierung der Tnt1-Insertionsmutanten NF0075, NF4095, NF4499, NF5196, NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF1181, NF11397, NF11581, NF11714 und NF12449 mittels *direct Multiplex PCR*.** Die angegebenen *Annealing*-Temperaturen entsprechen den einzelnen Multiplex-Primerkombinationen <sup>A</sup>(NF12449\_NF10142\_for + NF12449\_NF10142\_rev + Tnt1-F), <sup>B</sup>(NF11397\_for2 + NF11397\_rev2 + Tnt1-F), <sup>C</sup>(NF11020\_NF9488\_for + NF9488\_rev + Tnt1-F), <sup>D</sup>(Mtr.24351\_for + Mtr.24351\_rev + Tnt1-F), <sup>E</sup>(NF10424\_NF9704\_for + NF10424\_NF9704\_rev + Tnt1-F), <sup>F</sup>(NF10424\_NF9704\_for + NF10424\_NF9704\_rev + Tnt1-F), <sup>G</sup>(Mtr.21216\_for + Mtr.21216\_rev + Tnt1-F und NF8882\_for + NF8882\_rev + Tnt1-F), <sup>H</sup>(NF11020\_NF9488\_for + NF11020\_rev + Tnt1-F), <sup>I</sup>(NF11714\_for2 + NF11714\_rev2 + Tnt1-F), <sup>J</sup>(NF8710\_for + NF8710\_rev + Tnt1-F und NF11581\_for + NF11581\_rev + Tnt1-F), <sup>K</sup>(NF4095\_for + NF4095\_rev + Tnt1-F und NF5196\_for + NF5196\_rev + Tnt1-F) und <sup>L</sup>(NF1181\_for + NF1181\_rev + Tnt1-F und NF8500\_for + NF8500\_rev + Tnt1-F).

PCR Schritt	Zeit	Temperatur	
Initiale Denaturierung	5 min	98 °C	
Denaturierung	10 sec	98 °C	
<i>Annealing</i>	10 sec	51 °C <sup>A</sup> /54 °C <sup>B</sup> /55 °C <sup>C</sup> /60 °C <sup>D</sup> /61 °C <sup>E</sup> /62 °C <sup>F</sup> / 63 °C <sup>G</sup> /63,5 °C <sup>H</sup> / 64 °C <sup>I</sup> /65,5 °C <sup>J</sup> /66 °C <sup>K</sup> /70 °C <sup>L</sup>	40 x
Polymerisation	40 sec	72 °C	
Finale Polymerisation	2 min	72 °C	
Lagerung	∞	4 °C	

**Tabelle II.18: PCR Programm für die Genotypisierung der Tnt1-Insertionsmutanten NF0160 und NF4409 mittels direct Multiplex PCR.** Die angegebenen *Annealing*-Temperaturen entsprechen den einzelnen Multiplex-Primerkombinationen <sup>1</sup>(Mtr.20292\_for + Mtr.20292\_rev + Tnt1-F) und <sup>2</sup>(Mtr.11570\_for + Mtr.11570\_rev + Tnt1-F).

PCR Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	5 min	98 °C
Denaturierung	15 sec	98 °C
<i>Annealing</i>	40 sec	58 °C <sup>1</sup> /60 °C <sup>2</sup>
Polymerisation	1 min	72 °C
Finale Polymerisation	3 min	72 °C
Lagerung	∞	4 °C

### II.2.2.5.3 real time RT-PCR

Im Gegensatz zur Standard-PCR dient in einer RT-PCR (*reverse transcription PCR*) nicht DNA sondern RNA als *template*. Die RNA wird mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase in DNA umgeschrieben und diese dann wie in einer gewöhnlichen PCR-Reaktion amplifiziert (Mühlhardt, 2006). Die Echtzeitmessungen (*real-time*) der RT-PCR ermöglicht der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet, wodurch sein Fluoreszenzsignal deutlich verstärkt wird. Am Ende jeder Polymerisationsphase wird der Fluoreszenzfarbstoff auf entsprechender Wellenlänge angeregt und die emittierende Strahlung gemessen. Die Zunahme der Strahlung korreliert dabei mit der Zunahme des PCR-Produkts (Pfaffl, 2006). Den PCR-Zyklus, in dem ein bestimmter Fluoreszenz-Schwellwert (*threshold*) überschritten wird, bezeichnet man als  $C_t$  (*cycle of threshold*)-Wert einer Probe. Anhand dieser Werte können die einzelnen Proben nun miteinander verglichen werden. Je mehr *template* RNA eine Probe enthält, desto niedriger ist ihr  $C_t$ -Wert (Pfaffl, 2006).

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *real time* RT-PCR Reaktionen handelte es sich in allen Fällen um relative und semi-quantitative *real time* RT-PCRs, die jedoch der Einfachheit halber im Folgenden lediglich als *real time* RT-PCRs bezeichnet werden. Mit Hilfe der *real time* RT-PCR wurde die Expression der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene sowie von ausgewählten AM-Markergenen analysiert. Die RT-PCR Messungen erfolgten mit dem SensiMix™ SYBR Hi-ROX One-Step Kit (sowie dem Vorgängermodell: SensiMix™ SYBR One-Step Kit) mit je 50 ng RNA pro Reaktionsansatz. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze sowie die verwendeten PCR-Programme erfolgten in Anlehnung an die Empfehlungen des Herstellers und sind Tabelle II.19 und Tabelle II.20 im Detail zu entnehmen.

**Tabelle II.19: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die real time RT-PCR.** Die Zusammensetzung wurde für mit Hilfe des SensiMix™ SYBR Hi-ROX One-Step Kit durchgeführte *real time* RT-PCR Messungen verwendet.

<i>real time</i> RT-PCR Komponente	Volumen
RNA (10 ng/μl)	5 μl
<i>forward</i> - + <i>reverse</i> -Primermix (2,5 μM)	5 μl
2 x SensiMix SYBR Hi-ROX One-Step	12,5 μl
Reverse Transkriptase	0,25 μl
RNase Inhibitor	0,5 μl
RNase-freies H <sub>2</sub> O	1,75 μl
Gesamtvolumen	25 μl



**Tabelle II.20: Programm für die real time RT-PCR.** Das Programm wurde für mit Hilfe des SensiMix™ SYBR Hi-ROX One-Step Kit durchgeführte *real time* RT-PCR Messungen verwendet. Die angegebenen Annealingtemperaturen entsprechen den Messungen mit den *real time* RT-PCR Primern <sup>A</sup>2-EN11-RT-AT21for + 3-EN11-RT-Rev2, <sup>B</sup>Mtr.7264\_RT\_for + Mtr.7264\_RT\_rev, Mtr.12220\_RT\_for + Mtr.12220\_RT\_rev, Mtr.20292\_RT\_for + Mtr.20292\_RT\_rev, Mtr.38547\_RT\_for + Mtr.38547\_RT\_rev, Mtr.49618\_RT\_for + Mtr.49618\_RT\_rev, Mtr.24351\_RT\_D\_for + Mtr.24351\_RT\_D\_rev, NF5195\_RT\_D\_for + NF5195\_RT\_D\_rev, <sup>C</sup>Mtr.25945\_RT\_for + Mtr.25945\_RT\_rev, Mtr.11570\_RT\_B\_for + Mtr.11570\_RT\_B\_rev, NF5195\_RT\_B\_for + NF5195\_RT\_B\_rev, <sup>D</sup>Mtr.51511\_a\_stop\_hin + Mtr.51511\_a\_stop\_rev, TC136186b\_hin + TC136186b\_rev, NF11581\_RT\_D\_for + NF11581\_RT\_D\_rev, NF11581\_RT\_B\_for + NF11581\_RT\_B\_rev, NF8710\_RT\_D\_for + NF8710\_RT\_D\_rev1, NF8710\_RT\_B\_for + NF8710\_RT\_B\_rev und <sup>E</sup>allen übrigen Primerpaaren aus Tabelle II.5.

<i>real time</i> RT-PCR Schritt	Zeit	Temperatur
Reverse Transkription	10 min	45 °C
Aktivierung der Polymerase	10 min	95 °C
Denaturierung	15 sec	95 °C
Annealing	15 sec	63 °C <sup>A</sup> /57 °C <sup>B</sup> /56 °C <sup>C</sup> /55 °C <sup>D</sup> /53 °C <sup>E</sup>
Polymerisation	15 sec	72 °C
SYBR Green Detektion		
Vorbereitung auf die Schmelzkurvenanalyse	15 sec	95 °C
Schmelzkurvenanalyse	15 sec	40 °C
Schmelzkurvenanalyse	15 sec / 1 °C	40 °C → 95 °C
Lagerung	∞	10 °C

Im Anschluss an jede *real time* RT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Bestätigung des jeweils richtigen Amplifikats durchgeführt. Die Temperaturen der Höhepunkte der spezifischen Schmelzkurve der Amplifikate jedes verwendeten Primerpaars sind in Tabelle II.5 aufgelistet. Für jede durchgeführte *real time* RT-PCR wurde anhand der Schmelzkurven die Korrektheit der Amplifikate überprüft.

Die konstitutive Expression des Translations-Elongations-Faktors MtTEF $\alpha$  (TC178258 im DFCI *Medicago* Gene Index) wurde für die Normalisierung der *real time* RT-PCR Messergebnisse über verschiedene Bedingungen genutzt. Für jede Probe wurden der  $\Delta C_t$ -Wert und das relative Genexpressionslevel folgendermaßen berechnet (Livak & Schmittgen, 2001):

$$\Delta C_t = C_t(\text{Gen x}) - C_t(\text{MtTEF}\alpha)$$

$$\text{Relative Expression: } 2^{-\Delta C_t}$$

Die Signifikanz der gemessenen Expressionsunterschiede wurde mit Hilfe des in Microsoft® Excel® 2007 eingebundenen *Student's t-test* bestimmt. Dabei wurden für die Ergebnisse des zweiseitigen t-Tests die folgenden drei Signifikanzlevel unterschieden:

- 1) signifikant mit  $p \leq 0,1$  (Irrtumswahrscheinlichkeit: 10 %)
- 2) signifikant mit  $p \leq 0,05$  (Irrtumswahrscheinlichkeit: 5 %)
- 3) hochsignifikant mit  $p \leq 0,01$  (Irrtumswahrscheinlichkeit: 1 %).

### II.2.2.6 Sequenzierungen

Sämtliche Sequenzierreaktionen wurden als externe Auftragsarbeiten durch die Firma SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt.

## II.2.3 Klonierungsexperimente

### II.2.3.1 Restriktionsspaltung von DNA

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurden Restriktionsendonukleasen (kurz: Restriktionsenzyme) sowohl zur Herstellung der zur Klonierung verwendeten DNA-Fragmente als auch zur Charakterisierung und Identifizierung bestehender DNA-Konstrukte verwendet. Die Spaltungen erfolgten in der Regel nach folgendem Ansatz (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

Ansatz (20 µl):            1- 10 µl DNA  
                                  2 µl 10 x TA-Restriktionspuffer  
                                  1 µl Restriktionsenzym 1  
                                  (1 µl Restriktionsenzym 2 beim Doppelverdau)  
                                  ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die einzusetzende DNA-Menge wurde dabei aus einer zuvor durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Restriktionsspaltungen erfolgten für 1 - 4 h bei enzymespezifisch optimaler Temperatur nach Herstellerangaben. Die anschließende Inaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte wahlweise bei -20 °C über Nacht oder für 20 Minuten bei 70 °C.

### II.2.3.2 Auffüllen von 5'-Überhängen mit dem Klenow-Fragment

Beim Klenow-Fragment handelt es sich um die abgespaltene und aufgereinigte C-terminale Domäne der DNA-Polymerase I, welches eine 3'-5'-Exonuklease- und Polymerasefunktion besitzt (Seyffert, 2003). In Klonierungsarbeiten wurde das Klenow-Fragment dazu verwendet durch Restriktionsspaltungen erzeugte *sticky ends* mit einzelsträngige 5'-Überhängen aufzufüllen um *blunt ends* für nachfolgende Klonierungsschritte zu generieren. Die Reaktion erfolgte in der Regel nach folgendem Ansatz (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

Ansatz (20 µl):            1 - 10 µl DNA  
                                  2 µl 10 x Puffer für Klenow-Fragment  
                                  1 µl Klenow-Fragment  
                                  1 µl dNTP-Mix  
                                  ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die einzusetzende DNA-Menge wurde dabei aus einer zuvor durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Das Auffüllen der 5'-Überhänge erfolgten für 15 Minuten bei 37 °C

und die anschließende Inaktivierung des Klenow-Fragments durch Zugabe von 1 µl 200 mM EDTA (pH 8,0) und anschließender Inkubation bei 70 °C für 20 Minuten.

### II.2.3.3 Dephosphorylierung von Kloniervektoren

Die Dephosphorylierung mit Hilfe der *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) diente dazu die 5'-Phosphatgruppen linearisierter Kloniervektoren abzuspalten um eine Ligation des leeren Vektors zu verhindern. Die Dephosphorylierung erfolgte in der Regel nach folgendem Ansatz (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

Ansatz (20 µl):            1 - 10 µl DNA  
                                  2 µl 10 x SAP-Puffer  
                                  1 µl SAP  
                                  ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die einzusetzende DNA-Menge wurde dabei aus einer zuvor durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt. Die Dephosphorylierung erfolgte für 30 Minuten bei 37 °C. Die anschließende Inaktivierung der SAP fand bei 70 °C für 20 Minuten statt.

### II.2.3.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Mit Hilfe von Ligasen können DNA-Fragmente miteinander verknüpft werden, hier diente diese Reaktion dazu das gewünschte *Insert* in einen Zielvektor zu klonieren. Dabei wurden der Zielvektor und das gewünschte *Insert* im Verhältnis 1:3 in die Reaktion eingesetzt. Die Ligation erfolgte in der Regel nach folgendem Ansatz (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989):

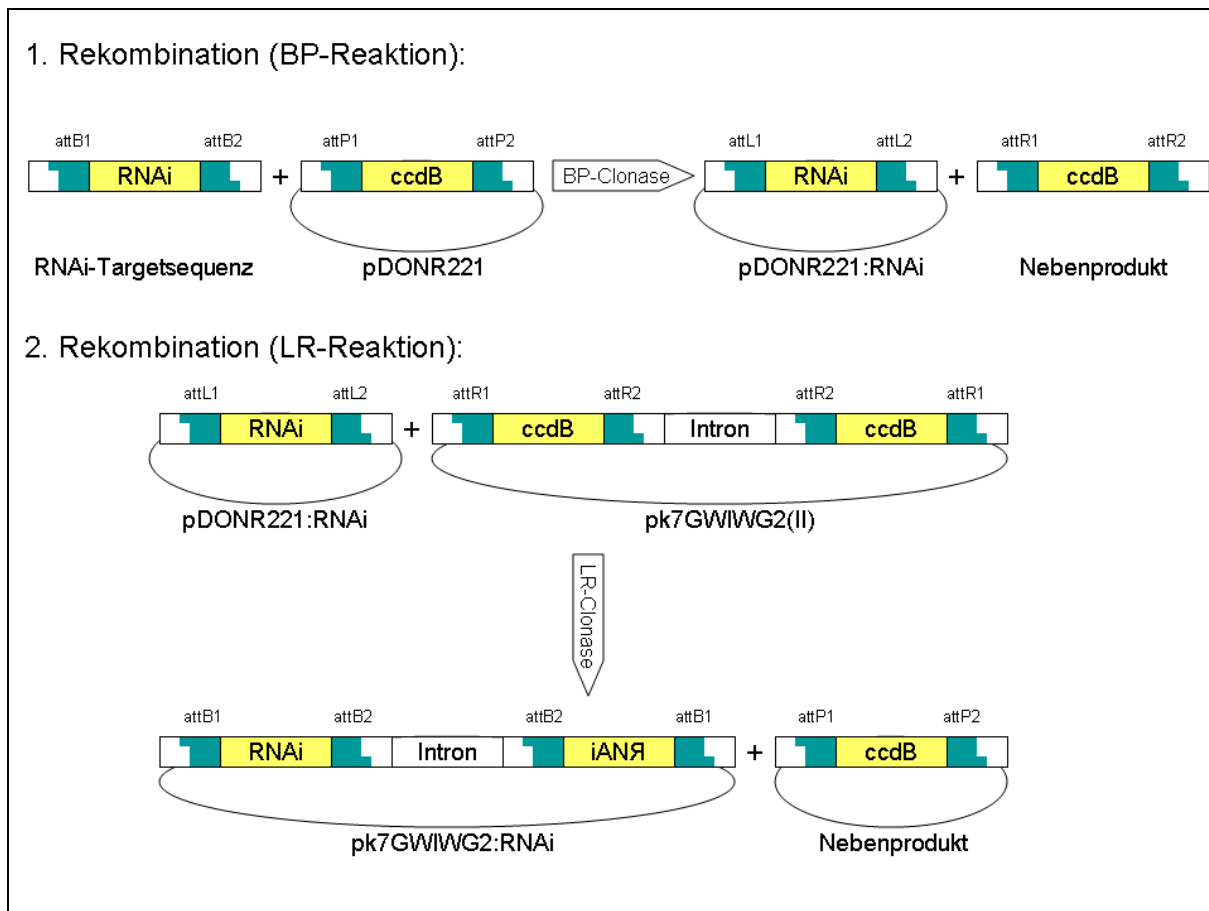
Ansatz (30 µl):            1 - 10 µl Zielvektor  
                                  1 - 10 µl *Insert*  
                                  2 µl 10 x Puffer für T4 DNA-Ligase  
                                  1 bzw. 3 µl T4 DNA-Ligase (*sticky* bzw. *blunt end* Klonierung)  
                                  ad 20 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktion erfolgte über Nacht bei einem Temperaturgradienten von 18 °C auf 4 °C.

### II.2.3.5 Erstellung von RNAi-Konstrukten mittels Gateway®-Klonierung

Für die Klonierung von RNAi-Konstrukten wurde das Gateway® Cloning Technology Kit verwendet. Die Gateway®-Klonierung basiert auf dem Rekombinationsprozess des Bakteriophagen λ, für den spezifische Rekombinationssequenzen, die so genannten *attachment(att)*-Sequenzen, sowie spezifische Rekombinationsenzyme, notwendig sind.

Ursprünglich vereinfachte dieses Rekombinationssystem die Integration von  $\lambda$  in das *E. coli* Chromosom und stellt somit den Wechsel vom lytischen in den lysogenen Zyklus dar (Landy, 1989; Ptashne, 1992).



**Abbildung II.1:** Schema der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gateway®-Klonierungen zur Erstellung von RNAi-Konstrukten. Im ersten Rekombinationsschritt wird die mit *attB*-Rekombinationssequenzen versehene RNAi-Targetsequenz mittels BP-Clonase in den Vektor pDONR221 eingefügt. Im zweiten Rekombinationsschritt wird die RNAi-Targetsequenz aus diesem Konstrukt mittels LR-Clonase doppelt in inverser Orientierung in den binären Zielvektor pk7GWIWG2(II) umklontiert.

Die Erstellung der RNAi-Konstrukte erfolgte über zwei Rekombinationsschritte. Im ersten Schritt, der sogenannten BP-Reaktion, werden mit Hilfe des BP Clonase™ II Enzym Mixes *attB*-flankierte Sequenzen gegen *attP*-flankierte Sequenzen ausgetauscht. So wurden die RNAi-Targetsequenzen durch spezifische Primer-extensions direkt mit den gewünschten *attB*-Sequenzen amplifiziert und in der BP-Reaktion gegen das für *E. coli* letale *attP*-flankierte *ccdB*-Gen im Gateway®-Vektor pDONR221 ausgetauscht (Abbildung II.1). Dabei entstanden aus den flankierenden *attP*-Sequenzen im Zielvektor die längeren *attL*-Sequenzen. Im zweiten Rekombinationsschritt, der LR-Reaktion, werden mit Hilfe des LR Clonase™ II Enzym Mixes *attL*-flankierte Sequenzen gegen *attR*-flankierte Sequenzen ausgetauscht. So konnten hier die RNAi-Targetsequenzen aus dem im ersten Rekombinationsschritt erhaltenen Konstrukt pDONR221:RNAi erneut gegen das *ccdB*-Gen des binären RNAi-Vektors pk7GWIWG2(II) ausgetauscht werden (Abbildung II.1). Im Gegensatz zur ersten Rekombination trug der Zielvektor der zweiten Rekombination zwei durch eine Intron

getrennte *attR*-flankierte *ccdB*-Gene in inverser Orientierung, so dass jeweils auch zwei RNAi-Targetsequenzen eingefügt wurden, um später die klassische RNAi-Haarnadelstruktur ausbilden zu können. Die BP- und LR-Reaktionen erfolgten jeweils nach Herstellerangaben.

## II.2.4 Transformationsexperimente in Bakterien

### II.2.4.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen für Hitzeschock-Transformationen

*E. coli* besitzt kein natürliches Transformationssystem und ist somit nicht in der Lage Plasmide aus der Umgebung aufzunehmen. Um dennoch Plasmid-DNA in *E. coli* transformieren zu können müssen die *E. coli*-Zellen daher zunächst durch die im Folgenden beschriebene Behandlung (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) mit Rubidiumchlorid für eine Aufnahme von DNA aus dem Medium kompetent gemacht werden.

Als Vorkultur wurde zunächst eine nicht-selektive *E. coli*-Flüssigkultur in 10 ml LB-Medium angesetzt und über Nacht im Schüttler bei 250 UpM und 37 °C inkubiert. Mit 2 ml dieser Vorkultur wurde am nächsten Tag in 200 ml LB-Flüssigmedium die Hauptkultur angeimpft und bei 250 UpM und 37 °C im Schüttler bis zum Erreichen einer o.D.<sub>580</sub> von 0,6 - 0,8 inkubiert. Die *E. coli*-Zellen wurden nun für 15 Minuten bei 2000 UpM und 4 °C pelletiert und der Überstand abgegossen. Anschließend wurde das Bakterienpellet auf Eis in 120 ml Tbf1-Puffer zunächst resuspendiert und anschließend erneut für 15 Minuten bei 2000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das abgetropfte Pellet in 15 ml Tbf2-Puffer auf Eis resuspendiert. Die so gewonnenen kompetenten *E. coli* Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

### II.2.4.2 Hitzeschocktransformation in *E. coli*

Die Hitzeschock-Transformation (modifiziert nach Sambrook *et al.*, 1989) diente dem Transfer rekombinanter Plasmide in *E. coli*. Hierzu wurde zunächst ein Aliquot kompetenter Zellen auf Eis angetaut und mit 0,5 Volumen TCM-Puffer und 1/10 Volumen der zu transformierenden Plasmid-DNA für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation erfolgte aufgrund eines Temperaturschocks von 42 °C für 75 Sekunden der bis dato auf Eis gekühlten *E. coli*-Zellen. Nach erneuter 5-minütiger Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 1 ml LB-Medium versetzt und zur Anregung des Bakterienstoffwechsels für eine Stunde drehend bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der transformierten Zellen auf Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### II.2.4.3 Herstellung kompetenter *A. rhizogenes*-Zellen für Transformationen via Elektroporation

Zur Transformation von Plasmid-DNA in *A. rhizogenes*-Zellen via Elektroporation mussten diese zunächst für die entsprechende Behandlung kompetent gemacht werden. Dazu wurden die zu

elektroporierenden Bakterien unter steter Kühlung in ein weitestgehend salzfreies Medium überführt werden. Zunächst erfolgte die Anzucht einer selektiven *A. rhizogenes* Vorkultur in 10 ml TY-Medium im Schüttler bei 250 UpM und 30 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden mit 2 ml der Vorkultur 200 ml TY-Medium für die Hauptkultur angeimpft und im Schüttler bei 250 UpM und 30 °C bis zum Erreichen einer o. D.<sub>600</sub> von 0,6 - 0,8 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 10 Minuten bei 2000 UpM bei 4 °C pelletiert, der Überstand abgegossen und das Pellet auf Eis in 50 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde drei Mal wiederholt und das Bakterienpellet zuletzt in 4 ml 10 % (v/v) Glycerin resuspendiert. Die so erhaltenen elektrokompetenten Zellen wurden aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

#### **II.2.4.4 Elektroporation in *A. rhizogenes***

Der Transfer rekombinanter DNA in *A. rhizogenes* erfolgte über Elektroporation, da für Agrobakterien eine Fremd-DNA-Aufnahme sonst nur durch relativ langwierige Konjugationsversuche möglich ist. Hierzu wurde zunächst ein Aliquot kompetenter *A. rhizogenes*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1 - 3 µl der zu transformierenden DNA versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt. Der durch die Elektroporation versetzte elektrische Impuls erfolgte bei 1.800 V. Im Anschluss an die Elektroporation wurde der Transformationsansatz mit 1 ml TY-Medium versetzt und für 2 Stunden drehend bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe der transformierten Zellen auf Festmedium mit entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

### **II.2.5 Pflanzenarbeiten**

#### **II.2.5.1 Skarifizierung und Sterilisierung von *M. truncatula* Samen**

Die Skarifizierung und Sterilisierung von *M. truncatula* Samen erfolgte modifiziert nach Hohnjec et al. (2003). Dazu wurden zunächst die Samen aus ihren Hülsen geholt, mit 2 Volumen 95 - 98% (v/v) Schwefelsäure versetzt und circa 10 - 15 Minuten invertiert. Anschließend wurde die Schwefelsäure vollständig abpipettiert und die Samen 6 - 8 Mal gründlich mit Wasser gespült. Um die Samen zu sterilisieren wurden sie für 90 Sekunden in 2 Volumen 2 % (v/v) Natriumhypochlorid-Lösung invertiert und anschließend wieder 6 - 8 Mal gründlich mit Wasser gespült. Zuletzt wurden die Samen vollständig mit Wasser bedeckt und 2 - 4 Stunden im Licht quellen gelassen. Danach wurden die Samen auf 0,8 % (w/v) Agarplatten ausgelegt und vier Tage bei 4 °C in Dunkelheit, einen Tag bei Raumtemperatur in Dunkelheit und einen Tag bei Raumtemperatur in Licht inkubiert.

#### **II.2.5.2 Anzucht von *M. truncatula***

Die Anzucht von *M. truncatula* Pflanzen erfolgte in einer Klimakammer mit einem 16-stündigen Lichtintervall (PPF (photosynthetic photon flux): 150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) bei 23 °C und einem 8-stündigen

Dunkelintervall bei 18 °C. Die durchgängigen Luftfeuchtigkeit betrug 70 %. Die Anzucht fand wahlweise in Seramis®-Substrat oder steril auf Agarplatten statt.

Die Anzucht in Seramis®-Substrat erfolgte in der Regel für die ersten 3 - 4 Wochen in 40er-Multitopfplatten (Abbildung II.2 A), anschließend wurden die *M. truncatula* Pflanzen jeweils zu zweit in 200 ml Töpfe umgesetzt (Abbildung II.2 B). Die Pflanzen wurden 2 - 3 Mal wöchentlich mit  $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution (supplementiert durch 2 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  für die ersten 3 - 4 Wochen des Wachstums) gedüngt. Das für die Anzucht verwendete Seramis®-Substrat wurde vor der Anzucht gründlich gewaschen (unter ständigen Rühren jeweils 15 Minuten unter fließendem kalten, heißen und zuletzt wieder kalten Wasser) um Düngerrückstände zu entfernen und für 14 h bei 200 °C sterilisiert.

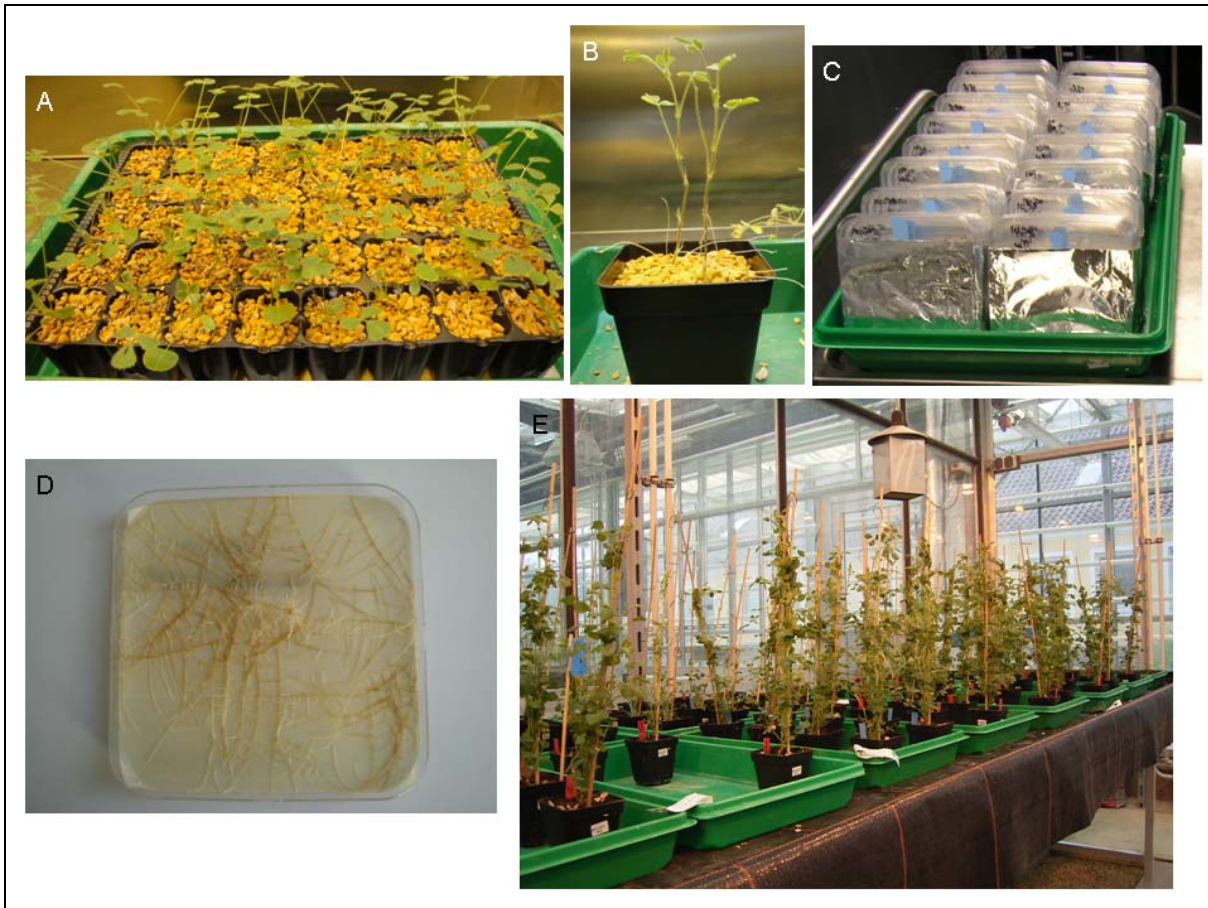
Die sterile Anzucht erfolgte auf Schrägagarplatten (eckig, 120 x 120 mm) mit  $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution (supplementiert durch 5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  für die ersten 3 - 4 Wochen des Wachstums) und 25 g/l Phytoagar. Um das Eindringen der Pflanzenwurzeln in das Festmedium zu verhindern, wurde dieses zudem mit sterilem Filterpapier (Whatman) bedeckt. Die Kanten von je drei Schrägagarplatten wurden gemeinsam mit Frischhaltefolie umwickelt um sie vor dem Austrocknen zu bewahren. An der oberen Kante wurde die Frischhaltefolie leicht angeritzt um dennoch einen Gasaustausch zu ermöglichen. Die untere Hälfte jedes dieser Dreierpacks wurde als Lichtschutz mit Aluminiumfolie umwickelt und die Schrägagarplatten im ca. 70 °C Winkel in der Klimakammer platziert (Abbildung II.2 C).

Die Anzucht von *hairy root cultures* (HRCs; siehe Abschnitt III.2.5.6) fand ebenfalls in der Klimakammer statt und erfolgte auf M-Medium. Auch hier wurde das Medium mit sterilem Filterpapier (Whatman) bedeckt um ein Eindringen der Wurzeln zu verhindern (Abbildung II.2 D). Wie die Schrägagarplatten wurden die HRC-Platten gegen Austrocknung mit Frischhaltefolie umwickelt, im Gegensatz zu diesen jedoch flach hingelegt und lichtdicht verpackt.

*M. truncatula* Pflanzen zur Samennachzucht wurden in einem Gewächshaus bei Tageslicht und zusätzlicher Beleuchtung (16 Stunden/Tag) durch Natriumdampflampen (3.000 - 4.000 Lux) angezogen. Die Anzucht erfolgte in einem 1:1:1 Pikierererde/Vermiculite/Sand-Gemisch in 650 ml Töpfen. Gedüngt wurde einmal wöchentlich mit 0,1 % (w/v) Universol Blue Dünger. Um eine gegenseitige Bestäubung zu verhindern wurden die einzelnen Pflanzen in einem ausreichenden Abstand zueinander platziert und hochgebunden (siehe Abbildung II.2 E).

### II.2.5.3 Mykorrhizierung von *M. truncatula*

Die Mykorrhizierung von *M. truncatula* erfolgte über die Zugabe von 10 - 15 % (v/v) von *G. intraradices* Inokulum in das Seramis®-Substrat.



**Abbildung II.2: Verschiedene Anzuchtvarianten von *Medicago truncatula*.** Die Anzucht in Seramis®-Substrat (A und B), auf Schrägagarplatten (C), in hairy root cultures (D) und im Gewächshaus zur Samennachzucht (E) erfolgten wie im Detail im Text beschrieben.

#### II.2.5.4 Bestimmung der Kolonisationsrate mykorrhizierter Pflanzenwurzeln

Die Bestimmung der Kolonisationsrate mykorrhizierter Wurzeln erfolgte mit Hilfe der von Giovannetti & Mosse (1980) beschriebenen *gridline intersections method*. Bei dieser Methode werden mykorrhizierte und entsprechend gefärbte (siehe Abschnitt II.2.6.3) Wurzeln in ca. 1 cm lange Fragmente geschnitten und in einer Petrischale ausgebreitet, deren Unterseite mit Gitternetzlinien versehen ist. Nun werden unter dem Mikroskop nacheinander die horizontalen und vertikalen Gitternetzlinien betrachtet und dabei die Schnittstellen mit den Wurzeln getrennt für mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Wurzeln gezählt. Aus diesen Werten lässt sich anschließend die Kolonisationsrate der Wurzeln bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Kolonisationsrate unter dem Fluoreszenzbinokular mit durch WGA Alexa Fluor® 488 gefärbten Wurzeln (siehe Abschnitt II.2.6.3.2). In Anlehnung an die zuvor beschriebene Methode wurde hier jedoch nicht nur die Kolonisationsrate (die unabhängig von den vorhandenen Pilzstrukturen ausschließlich zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln unterscheidet) sondern zudem auch die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (Hyphen, Arbuskeln und Vesikel) in den Wurzeln



bestimmt. Konkret wurde dabei jede Wurzelschnittstelle in eine der folgenden zehn Klassen eingeteilt:

- 1) mit externen Hyphen kolonisierte Wurzel (EV)
- 2) mit internen Hyphen kolonisierte Wurzel (IH)
- 3) mit externen und internen Hyphen kolonisierte Wurzel (EH/IH)
- 4) mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln kolonisierte Wurzel (EH/IH/A/V)
- 5) mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln kolonisierte Wurzel (EH/IH/A)
- 6) mit internen Hyphen und Arbuskeln kolonisierte Wurzel (IH/A)
- 7) mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln kolonisierte Wurzel (IH/A/V)
- 8) mit externen und internen Hyphen und Vesikeln kolonisierte Wurzel (EH/IH/V)
- 9) mit internen Hyphen und Vesikeln kolonisierte Wurzel (IH/V)
- 10) nicht-mykorrhizierte Wurzel (nm)

Aus diesen Daten konnten nun folgendermaßen die Kolonisationsrate und die Anteile der einzelnen Pilzstrukturen berechnet werden:

Kolonisationsrate (%):  $((\text{Summe von 1-9}) * 100) / (\text{Summe von 1-10})$

Anteil externer Hyphen in mykorrhizierten Wurzeln (%):

$((\text{Summe von 1, 3, 4, 5 und 8}) * 100) / (\text{Summe von 1-9})$

Anteil interner Hyphen in mykorrhizierten Wurzeln (%):

$((\text{Summe von 2-9}) * 100) / (\text{Summe von 1-9})$

Anteil von Arbuskeln in mykorrhizierten Wurzeln (%):

$((\text{Summe von 4, 5, 6 und 7}) * 100) / (\text{Summe von 1-9})$

Anteil von Vesikeln in mykorrhizierten Wurzeln (%):

$((\text{Summe von 4, 7, 8 und 9}) * 100) / (\text{Summe von 1-9})$

Da bei sehr jungen Wurzeln häufig das Wurzelvolumen zu gering für eine Bestimmung mit dieser Methode war, wurden hier mehrere Wurzeln zu einer Probe vereinigt und gemeinsam ausgezählt. Für jede Wurzel bzw. jede Probe aus mehreren Wurzeln wurden mindestens 300 *gridline intersections* ausgezählt um Zufallseffekte weitestgehend auszuschließen. Zudem wurden alle Proben blind ausgezählt, damit im Vorfeld erwartete oder vermutete Effekte keinen Einfluss auf die jeweiligen Ergebnisse hatten.

### II.2.5.5 Wurzeltransformation von *M. truncatula*

Als Methode zum Transfer rekombinanter DNA in Pflanzen wurde im Rahmen dieser Arbeit der Agrobakterien-vermittelten Gentransfer über die Induktion transgener haariger Wurzeln (*hairy roots*) mittels *A. rhizogenes* gewählt. Hierbei handelt es sich um eine relativ schnelle und einfache Transformations-Methode, die jedoch nur für transgenes Wurzelgewebe und nicht für eine vollständige Pflanzentransformation geeignet ist (Boisson-Dernier *et al.*, 2001). Die Bildung der so genannten haarigen Wurzeln basiert auf der Induktion transgener Wurzeln durch Infektion mit einem *A. rhizogenes* Stamm, der das Reporter-Konstrukt auf einem binären Plasmid und zusätzlich

ein Ri-Plasmid mit für die Induktion der haarigen Wurzeln nötigen Hormonbiosynthesegenen trägt.

Für die nach Vieweg *et al.* (2004) durchgeführte Wurzeltransformation in *M. truncatula* wurden zunächst der gewünschte Konstrukt-tragenden *A. rhizogenes*-Stamm auf Festmedium ausgestrichen und zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde der angewachsene Bakterienrasen in PS-Puffer resuspendiert und die Bakteriensuspension in eine sterile 0,5 ml Insulinspritze aufgezogen. Die Injektion der Bakteriensuspension in die nach Abschnitt II.2.5.1 behandelten *M. truncatula*-Keimlinge erfolgte im Bereich des Hypokolyts. Die Keimlinge wurden dann wahlweise in Multitopfplatten mit Seramis®-Substrat pikiert oder steril auf Schrägagarplatten ausgelegt. Nach der Induktion der transgenen Wurzeln fand zunächst eine 24-stündige Inkubation der angestochenen Keimlinge bei 18 °C im Dunkeln statt, bevor sie in die Klimakammer überführt wurden. Nach ca. einer Woche ließen sich die ersten Wurzelbildungen an der Anstichstelle beobachten. Im Falle der in Seramis®-Substrat pikierten Keimlinge wurden diese dann durch steriles, angefeuchtetes Seramis®-Substrat abgedeckt, um sie vor dem Austrocknen zu schützen.

#### II.2.5.6 Erzeugung von *hairy root cultures* (HRCs)

Aus den wie in Absatz II.2.5.5 beschrieben erzeugten transgenen Wurzeln wurden für die analysierten Promotor-GUS-Konstrukte zusätzlich *hairy root cultures* (HRCs) erzeugt. Diese transgenen Wurzelkulturen haben die durch *A. rhizogenes* übermittelten *rol*-Gene in ihr Genom integriert, die ihnen ein unbegrenztes Wurzelwachstum ermöglichen (Ono & Tian, 2011). Dank dieser Eigenschaft kann so aus einem kleinen Wurzelstück eine ganze HRC zu Analyse Zwecken angezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Anzucht von HRCs auf M-Medium. Pro Platte wurde mittig ein Stück einer transgenen Wurzel ausgelegt, die im Laufe der Zeit zu einer Wurzelkultur heranwuchs.

#### II.2.5.7 Myc-/Nod-LCO Induction Assays

Die Promotoren der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Promotor-GUS-Konstrukte wurden in *induction assays* auf ihre Aktivität bezüglich einer Inkubation mit Myc- und Nod-LCOs getestet. Im Anschluss an eine 24-stündige Inkubation von transgenen Wurzeln bzw. HRCs der jeweiligen Konstrukte in Myc-LCO, Nod-LCO oder Kontrollösungen folgte ein anschließender Färbenachweis der  $\beta$ -Glucuronidase-Aktivität (siehe Abschnitt II.2.6.2). Die jeweiligen Inkubationen fanden in sMyc-LCO Lösung ( $10^{-8}$  M sMyc-LCOs in  $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution pH 6,5), nsMyc-LCO Lösung ( $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs in  $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution pH 6,5), s/nsMyc-LCO Lösung ( $10^{-8}$  M sMyc-LCOs und  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs in  $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution pH 6,5), Myc-Kontrollösung ( $\frac{1}{2}$  strength Hoagland's solution pH 6,5), Nod-LCO Lösung ( $10^{-8}$  M Nod-LCOs in NH-Mix pH 7,5) und Nod-Kontrollösung (NH-Mix pH 7,5) statt. Die verwendeten Myc-LCOs stammten aus *E. coli* (Maillet *et al.*, 2011) und enthielten 90 % Tetramere (LCO-IV) und 10 % Pentamere (LCO-V). Sowohl

sMyc- als auch nsMyc-LCOs lagen als 1:1 Mischungsverhältnis von mit Palmitinsäure (C16:0) bzw. mit Ölsäure (C18:1Δ9Z) N-acetylierten Verbindungen vor. Die verwendeten Nod-LCOs setzten sich aus dem tetrameren *S. meliloti* Nod-Faktor NodSm-IV-Ac-S (C16:2Δ2EΔ9Z) und etwa 10 % des entsprechenden Pentamers mit den gleichen O- und N-Substitutionen zusammen. Sowohl Myc- als auch Nod-LCOs lagen als  $10^{-3}$  M Stammlösungen in 50 % (v/v) Acetonitril vor, weshalb die verwendeten Myc- und Nod-Kontrolllösungen mit einer entsprechenden Menge Acetonitril versetzt wurden.

## II.2.6 Histochemische Analysen

### II.2.6.1 Nachweis des Reportergens dsRed

Das Reportergen *dsRed* liegt in der T-DNA der binären Vektoren pRedRoot und pK7GWIWG2(II). Durch Bestrahlung mit einer Anregungswellenlänge von 556 nm fluoresziert das Protein rot und ermöglichte somit unter dem Fluoreszenzbinokular die Unterscheidung von transgenen und nicht-transgenen Pflanzenwurzeln.

### II.2.6.2 Färbenachweis der $\beta$ -Glucuronidase(GUS)-Aktivität

Der Nachweis der  $\beta$ -Glucuronidase(GUS)-Aktivität in Pflanzenwurzeln (modifiziert nach Küster *et al.*, 1995) erfolgte durch Inkubation in GUS-Färbepuffer bei 37 °C im Dunkeln für 2 - 24 Stunden. Um die Färbereaktion abzustoppen, wurden die Wurzeln gründlich mit Wasser gespült.

### II.2.6.3 Färbenachweis arbuskulärer Mykorrhizastrukturen in Pflanzenwurzeln

Zum Nachweis arbuskulärer Mykorrhizastrukturen in Pflanzenwurzeln verwendet man Farbstoffe die sich intensiv an das Chitin des Pilzgewebes anlagern, aber aus pflanzlichem Gewebe ausgewaschen werden können. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgten die Färbenachweise wahlweise durch Tintenfärbung oder durch Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei der Tintenfärbung lagert sich handelsübliche Tinte an das Pilzgewebe an. Diese Färbung ist schnell, einfach und kostengünstig, aber nicht länger als einige Stunden lagerbar. Im Falle der WGA-Alexa Fluor® 488 Färbung wurde der Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 488 an das *wheat germ agglutinin* (WGA) gekoppelt, welches an das Pilzgewebe bindet. Diese Färbung ist zeitaufwendiger und kostspieliger als die Tintenfärbung, dafür aber auch deutlich sensitiver und lässt sich zudem über Monate lagern.

#### II.2.6.3.1 Tintenfärbung

Für die Tintenfärbung (Vierheilig *et al.*, 1998) wurden die Wurzeln zunächst in einer volumenfüllenden Menge 10 % (w/v) KOH für 8 - 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend

gründlich mit Wasser gespült. Die eigentliche Färbung erfolgt durch die Zugabe von einer volumenfüllenden Menge Tintenfärbelösung in der die Wurzeln 2 - 3 Minuten bei 95 °C inkubiert wurden. Um die überschüssige Tinte aus dem Pflanzengewebe auszuspülen wurden die Wurzeln 3 - 4 Mal in 0,8 % (v/v) Essigsäure gewaschen.

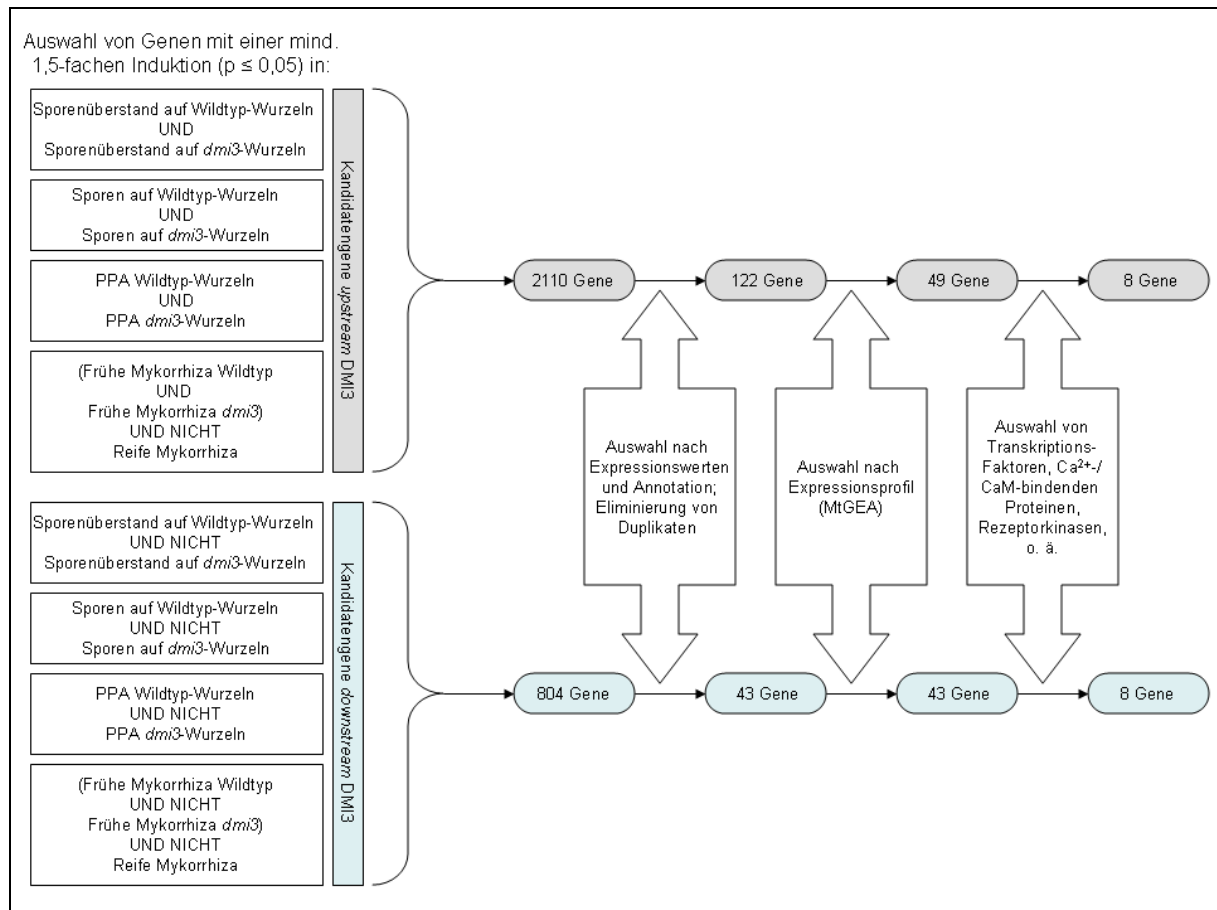
#### **II.2.6.3.2 Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488**

Für die Färbung mit WGA Alexa Fluor® 488 wurden die Wurzeln zunächst in einer volumenfüllenden Menge 10 % (w/v) KOH für 8 - 10 Minuten bei 95 °C inkubiert und anschließend gründlich mit Wasser gespült. Die eigentliche Färbung erfolgt durch die Zugabe von einer volumenfüllenden Menge Alexa-Färbelösung, in der die Wurzeln für 24 Stunden bei Raumtemperatur in Dunkeln inkubiert wurden. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff mit Wasser ausgewaschen. Die Detektion der WGA-Alexa Fluor® 488 Färbung erfolgte unter einem Fluoreszenzbinokular. Der Fluoreszenzfarbstoff besitzt ein Anregungsmaximum mit einer Wellenlänge 499 nm und ein Emissionsmaximum bei 520 nm.

### III. ERGEBNISSE

#### III.1 Auswahl von Kandidatengenen für die frühe Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza

Die in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene wurden über eine Analyse der Genexpressionsdaten von insgesamt 72 *Medicago GeneChip* Hybridisierungen identifiziert. Diese *GeneChip* Daten entstammten teilweise der MediPIEx Datenbank, einer integrative Datenbank für Sequenz- und Expressionsdaten von *M. truncatula* (Henckel et al., 2010), zum Teil wurden auch bisher unpublizierte Datensätze einbezogen. Die für die Analyse verwendeten Datensätze sind in Tabelle I.1 zusammengefasst sowie im Detail in Tabelle C.1 im Anhang aufgelistet.



**Abbildung III.1:** Schema zur Auswahl von Kandidatengenen in der frühen Signaltransduktion der arbuskulären Mykorrhiza von *Medicago truncatula*. Insgesamt wurden 72 *GeneChip* Hybridisierungen (Tabelle C.1 im Anhang) mit den in Tabelle I.1 beschriebenen experimentellen Ansätzen zur Analyse von entsprechenden Kandidatengenen verwendet. Die Selektion der Kandidatengene erfolgte wie in der Abbildung dargestellt schrittweise nach Induktion (bei entsprechendem *p-value*), Annotation und Expressionsprofil der jeweiligen Gene. Diese Schritte erfolgten getrennt für Kandidatengene, die *upstream* und *downstream* von DMI3 agieren.

Im Wesentlichen handelte es sich bei den für diese Hybridisierungen verwendeten experimentellen Ansätzen um Vergleiche von *M. truncatula* Wildtyp Pflanzen und *dmi3* Mutanten in verschiedenen AM-Stadien oder nach Behandlung mit keimenden AM-Pilzsporen bzw. deren Überständen (Tabelle I.1). Die Auswahl von Kandidatengenem erfolgte zunächst aufgrund einer mindestens 1,5-fachen Induktion (mit  $p \leq 0,05$ ) im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrolle und wurde schrittweise durch ihre charakteristische Expression in einzelnen *GeneChip* Experimenten, ihr Expressionsprofil im *Medicago truncatula Gene Expression Atlas* (MtGEA; Benedito *et al.*, 2008) und ihrer Annotation verfeinert. Insbesondere im Bezug auf letzteres galt die Aufmerksamkeit hauptsächlich Genen, die als in der  $Ca^{2+}$ -Signaltransduktion involviert annotiert waren oder Rezeptorkinasen bzw. Transkriptionsfaktoren kodieren. Der genaue Datenanalyse-Prozess ist Abbildung III.1 zu entnehmen.

Im Hinblick auf die Suche nach Kandidatengenem, die in der frühen AM-Signaltransduktion beteiligt sind, wurde separat nach Genen gesucht, die *upstream* und *downstream* von DMI3, einer der wichtigsten bekannten Komponenten der frühen Signaltransduktion, agieren. Insgesamt konnten 16 Kandidatengene identifiziert werden, für die weiterführende Analysen angestellt wurden. Von diesen waren acht Gene sowohl im Wildtyp als auch in *dmi3*-Mutanten induziert und spielen somit vermutlich eine Rolle *upstream* DMI3, während acht weitere Gene ausschließlich im Wildtyp induziert waren und somit vermutlich *downstream* DMI3 agieren (Abbildung III.1, Tabelle III.1). Von diesen 16 Genen waren neun als Transkriptionsfaktoren, drei als potentielle Komponenten der  $Ca^{2+}$ -Signaltransduktion und vier als sonstige Proteine annotiert (Tabelle III.2).

Diese Liste an Kandidatengenem wurde im Verlauf der Arbeit um ein Gen erweitert, das im Rahmen von Expressionsanalysen mit Myc- und Nod-LCOs behandelte *M. truncatula* Pflanzenwurzeln (wie beschrieben in Czaja *et al.* 2012) identifiziert wurde. Hierbei handelte es sich um eine Serin/Threonin-Kinase mit der *GeneChip* ID Nummer Mtr.10067.1.S1\_at, die bei einer insgesamt sehr geringen Hintergrundexpression mit hoher Intensität auf eine Behandlung mit Myc-LCOs reagierte.

Die funktionelle Analyse der insgesamt 17 Kandidatengene erfolgte anhand von Promotor-GUS-Konstrukten, RNAi-Konstrukten und Tnt1-Insertionsmutanten. Der Einfachheit halber werden für diese Gene des Weiteren die in Tabelle III.2 aufgelisteten Kurzbezeichnungen verwendet. Eine genaue Zuordnung der zur Analyse der einzelnen Gene verwendeten Methoden sowie deren prinzipielle Funktionalität sind ebenfalls Tabelle III.2 zu entnehmen. Dabei zeigte sich, dass für die vier Gene *Mtr.9513*, *Mtr.21216*, *Mtr.32288* und *Mtr.37966* keiner der verfolgten Ansätze funktionierte. Da hier keine geeigneten Insertionsmutanten identifiziert wurden bzw. kein signifikanter RNAi-Effekt gemessen werden konnte, konzentrieren sich die im Folgenden beschriebenen Analysen auf die übrigen Gene aus Tabelle III.2.

Tabelle III.1: Zusammenfassung von GeneChip Daten ausgewählter Kandidatengene. Angegeben sind die Induktionen im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrolle der in Tabelle I.1 beschriebenen *Medicago* GeneChip Datensätze. Signifikante Expressionsunterschiede (mit  $p \leq 0,05$ ) sind fett gedruckt.

Genechip ID	Sporenüberstand 6 h Wildtyp	Sporenüberstand 6 h dm13	Sporenüberstand 24 h Wildtyp	Sporenüberstand 24 h dm13	Sporen 6 h Wildtyp	Sporen 6 h dm13	Sporen 24 h Wildtyp	Sporen 24 h dm13	PPA Wildtyp	PPA dm13	Frühe Mykorrhiza Wildtyp	Frühe Mykorrhiza dm13	Reife Mykorrhiza <i>G. intraradices</i>	Reife Mykorrhiza <i>G. mossaese</i>
<b>Kandidatengene upstream DM13:</b>														
Mtr.12220.1.S1_at	5,28	4,66	0,69	1,74	7,17	3,87	1,03	1,47	3,90	3,57	0,81	0,60	1,11	1,18
Mtr.24351.1.S1_s_at	1,96	1,38	1,06	1,09	1,86	1,20	1,22	1,50	2,47	1,80	0,78	0,58	0,95	1,37
Mtr.32288.1.S1_at	1,05	1,15	0,83	1,06	1,18	1,17	1,00	0,83	3,58	3,13	0,52	0,14	0,65	0,93
Mtr.37966.1.S1_at	0,98	0,97	1,01	0,83	1,14	1,08	1,10	0,83	5,43	5,22	0,78	1,54	0,34	0,72
Mtr.38547.1.S1_at	1,53	2,69	1,18	1,14	3,83	3,50	1,45	1,57	1,92	2,20	0,78	0,47	1,07	1,19
Mtr.40638.1.S1_at	0,91	1,08	0,85	0,83	0,93	1,14	1,04	1,16	2,05	1,93	0,90	0,51	0,99	0,80
Mtr.43223.1.S1_at	0,88	1,05	1,03	0,95	0,93	1,18	1,23	1,08	2,78	2,22	0,66	0,23	0,60	0,80
Mtr.49618.1.S1_s_at	1,18	1,06	1,08	1,03	1,20	0,93	0,92	1,09	24,61	9,14	0,28	0,05	0,76	1,50
<b>Kandidatengene downstream DM13:</b>														
Mtr.7264.1.S1_at	1,11	0,98	0,97	0,95	0,95	1,11	1,04	1,02	1,85	1,02	0,99	0,85	41,72	8,28
Mtr.9126.1.S1_at	1,06	1,04	1,07	1,07	1,04	1,00	0,98	0,88	2,28	1,60	0,77	0,51	0,68	0,93
Mtr.9513.1.S1_at	2,12	0,51	0,45	0,51	1,12	0,59	1,12	1,29	2,86	1,03	1,86	0,83	1,75	1,57
Mtr.10987.1.S1_at	1,20	0,92	0,86	1,00	0,50	0,72	0,61	0,68	1,63	1,05	0,98	0,44	0,92	1,01
Mtr.11570.1.S1_at	2,10	1,03	1,65	0,99	0,71	1,40	1,13	1,39	0,68	0,55	0,78	1,36	0,49	1,27
Mtr.20292.1.S1_at	1,03	1,19	0,96	1,13	1,15	0,96	0,82	0,81	5,27	1,03	1,13	0,85	48,73	20,71
Mtr.21216.1.S1_at	2,97	1,22	2,16	0,82	1,10	0,92	1,25	0,92	2,01	1,36	0,86	0,90	0,63	1,27
Mtr.25945.1.S1_at	1,22	0,65	0,80	0,67	1,16	0,86	1,33	1,28	2,12	1,19	0,97	0,60	1,11	1,08

**Tabelle III.2: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene.** Für jedes Gen angegeben sind die *Medicago* GeneChip ID, die Nummern der EST (*expressed sequence tag*) und genomischen Sequenzen, die Annotation, die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Genbezeichnung sowie die gewählten Methoden zur funktionellen Analyse des jeweiligen Gens. Dabei ist zusätzlich angegeben ob der jeweilige methodische Ansatz prinzipiell funktionierte (+) oder nicht (-). \*ID Nummer der EST-Datenbank von *M. truncatula* (*DFCI Medicago Gene Index*); <sup>x</sup>GenBank accession number; <sup>#</sup>ID des *M. truncatula* Genoms (Version 3.5); <sup>°</sup>ID des *M. truncatula* BAC Klons

GeneChip ID	EST Sequenz	genomische Sequenz	Annotation	Bezeichnung	Methoden zur funktionellen Analyse
Mtr.7264.1.S1_at	TC197578*	Medtr3g022830 <sup>#</sup>	GRAS-Transkriptionsfaktor	Mtr.7264	1 RNAi-Konstrukt (+) 1 Tnt1-Linien (-)
Mtr.9126.1.S1_at	TC186725* + TC185239*	Medtr3g056110 <sup>#</sup>	GRAS-Transkriptionsfaktor	Mtr.9126	1 RNAi-Konstrukt (+) 1 Tnt1-Linien (+)
Mtr.9513.1.S1_at	TC173636*	Medtr8g101650 <sup>#</sup>	MYB-Transkriptionsfaktor	Mtr.9513	1 RNAi-Konstrukt (-) 2 Tnt1-Linien (-/-)
Mtr.10067.1.S1_at	TC172882*	mth2-17121 <sup>°</sup>	Stress Kinase 1 (SK1)	MtSK1	1 Promotor-GUS Konstrukt (+)
Mtr.10987.1.S1_at	TC178640*	nicht verfügbar	ERF-Transkriptionsfaktor	Mtr.10987	1 RNAi-Konstrukt (+) 2 Tnt1-Linien (-/-)
Mtr.11570.1.S1_at	TC182423*	mte1-13017 <sup>°</sup>	ERF-Transkriptionsfaktor	Mtr.11570	1 Tnt1-Linien (+)
Mtr.12220.1.S1_at	TC183573*	Medtr5g064360 <sup>#</sup>	Elicitor-induziertes Protein	Mtr.12220	1 Promotor-GUS Konstrukt (+) 1 RNAi-Konstrukt (+)
Mtr.20292.1.S1_at	TC194450*	Medtr7g116650 <sup>#</sup>	Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase	Mtr.20292	1 RNAi-Konstrukt (+) 1 Tnt1-Linie (-)
Mtr.21216.1.S1_at	TC174277*	Medtr4g062330 <sup>#</sup>	Untereinheit des Exocyst-Komplexes	Mtr.21216	1 Tnt1-Linie (-)
Mtr.24351.1.S1_s_at	TC200491*	Medtr3g090350 <sup>#</sup>	Map-Kinase Substrat 1 (MKS1)	MtMKS1	1 Tnt1-Linie (+)
Mtr.25945.1.S1_at	TC180543*	Medtr6g092540 <sup>#</sup>	MYB-Transkriptionsfaktor	Mtr.25945	1 RNAi-Konstrukt (+) 2 Tnt1-Linien (+/+)
Mtr.32288.1.S1_at	AW687218 <sup>x</sup>	Medtr3g083570 <sup>#</sup>	CaM-bindendes Protein	Mtr.32288	1 RNAi-Konstrukt (-) 1 Tnt1-Linien (-)
Mtr.37966.1.S1_at	BG582035 <sup>x</sup>	Medtr7g024890 <sup>#</sup>	Ca <sup>2+</sup> -bindendes Protein	Mtr.37966	1 RNAi-Konstrukt (-) 2 Tnt1-Linien (-/-)
Mtr.38547.1.S1_at	TC178504*	Medtr3g101290 <sup>#</sup>	MYB-Transkriptionsfaktor	Mtr.38547	1 RNAi-Konstrukt (+) 2 Tnt1-Linien (+/+)
Mtr.40638.1.S1_at	TC186238*	nicht verfügbar	Ca <sup>2+</sup> -bindendes Protein	Mtr.40638	2 Tnt1-Linien (+/+)
Mtr.43223.1.S1_at	TC177482* + TC177510*	Medtr4g133660 <sup>#</sup>	GRAS-Transkriptionsfaktor	Mtr.43223	1 RNAi-Konstrukt (-) 1 Tnt1-Linien (+)
Mtr.49618.1.S1_s_at	NP7262350*	Medtr5g010910 <sup>#</sup>	DREB-Transkriptionsfaktor	Mtr.49618	1 Promotor-GUS Konstrukt (+) 1 RNAi-Konstrukt (-)



## III.2 Erzeugung von Reporter- und RNAi-Konstrukten sowie Selektion von Mutantenlinien für funktionelle Analysen

### III.2.1 Klonierung von Promotor-GUS-Konstrukten

#### III.2.1.1 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das *Mtr.12220* Gen

Für die Klonierung eines Promotor-GUS Konstrukts für das Kandidatengen *Mtr.12220* wurde eine 1.486 bp lange Promotorsequenz (-1/-1.486) ausgewählt, die des Weiteren als p12220 bezeichnet wird. Mit Hilfe eines spezifischen Primerpaars (Tabelle II.2), das zusätzliche extensions mit den Restriktionsschnittstellen für *Sma*I und *Hind*III trägt, wurde das insgesamt 1.503 bp lange Fragment mittels Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase aus dem Genom von *M. truncatula* amplifiziert (Abbildung III.2). Über die Restriktionsschnittstellen *Sma*I und *Hind*III wurde p12220 zunächst in den Vektor pK18 (Pridmore, 1987; Abbildung B.1 im Anhang) einkloniert, woraus das Konstrukt pK18:p12220 entstand. Der fehlerfreie Einbau der Promotorsequenz konnte durch spezifische Restriktionsspaltungen und eine anschließende Sequenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Über die gleichen Restriktionsschnittstellen fand eine anschließende Umklonierung von p12220 in den Vektor pGUSINT (Küster *et al.*, 1995; Abbildung B.2 im Anhang) statt. Das so entstandene Konstrukt pGUSINT:p12220 trägt die Promotorsequenz von *Mtr.12220* gefolgt von einer *gusA*int-Reporterengenkassette (Abbildung III.3). Durch eine *Spe*I-Spaltung wurde die komplette Promotor-GUS-Kassette aus pGUSINT:p12220 heraus gespalten, die überhängenden 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend *blunt end* in den *Sma*I-gespaltenen binären Vektor pRedRoot (Limpens *et al.*, 2003; Abbildung B.3 im Anhang) ligiert. Spezifische Kontrollspaltungen und Sequenzierungen bestätigten den korrekten Einbau der Promotor-GUS-Kassette in das finale Konstrukt pRR:p12220-GUS (Daten nicht gezeigt). Im letzten Schritt wurde pRR:p12220-GUS in *A. rhizogenes* transformiert, um auf diesem Wege den Agrobakterien-vermittelten DNA-Transfer in *M. truncatula* zu ermöglichen.

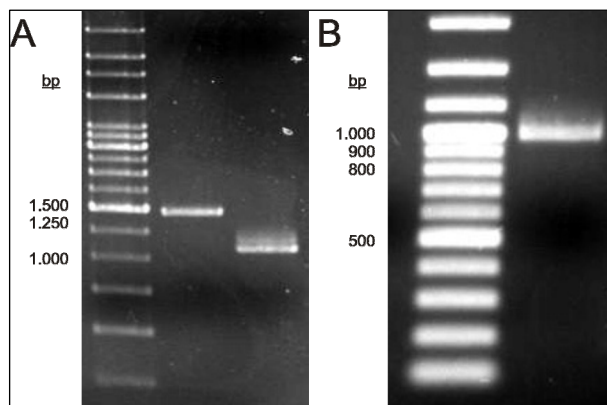
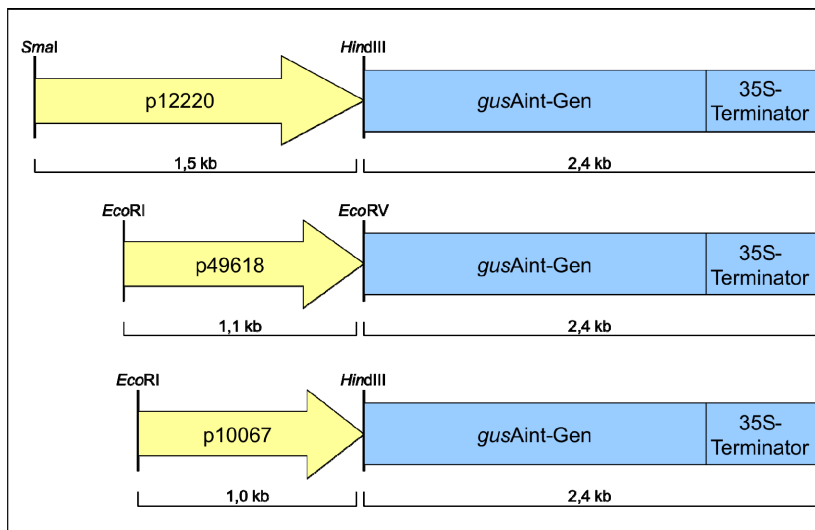


Abbildung III.2: Agarosegele der mittels PCR aus genomischer DNA von *Medicago truncatula* amplifizierten Promotorregionen von *Mtr.12220*, *Mtr.49618* und *Mtr.10067*. A: Neben einem 250 bp DNA Marker (linke Spur), sind die amplifizierten Promotorregionen von *Mtr.12220* (1.503 bp, mittlere Spur) und *Mtr.49618* (1.115 bp, rechte Spur) zu erkennen. B: Neben einem 100 bp DNA Marker (linke Spur), befindet sich die amplifizierte Promotorregion von *Mtr.10067* (1.014 bp, rechte Spur).

### III.2.1.2 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das *Mtr.49618* Gen

Für die Klonierung eines Promotor-GUS Konstrukts für *Mtr.49618* wurde eine 1.097 bp lange Promotorsequenz (-1/-1.097) ausgewählt, die des Weiteren als p49618 bezeichnet wird. Mit Hilfe eines spezifischen Primerpaars (Tabelle II.2) das zusätzliche extensions mit den Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* trägt, wurde das insgesamt 1.115 bp lange Fragment mittels Phire<sup>®</sup> Hot Start II DNA Polymerase aus dem Genom von *M. truncatula* amplifiziert (Abbildung III.2). Durch Spaltung mit *EcoRI* und *HindIII* wurde p49618 in den ebenso gespaltenen Vektor pK18 einkloniert. Eine Sequenzierung des so entstandenen Konstrukts pK18:p49618 zeigte zwar die korrekte Amplifikation von p49618, doch ebenfalls die während des Klonierungsprozesses aufgetretene Zerstörung der über den reverse-Primer eingeführten *HindIII*-Schnittstelle. Da diese Schnittstelle essentiell für die weiteren Klonierungsschritte war, musste die Klonierungsstrategie entsprechend angepasst werden. Um p49618 wieder aus dem Vektor pK18 ausklonieren zu können, wurde zunächst die noch intakte *EcoRI*-Schnittstelle gespalten und der resultierende 5'-Überhang mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt. Auf der anderen Seite des Promotorfragments wurde anstelle der defekten *HindIII*-Schnittstelle eine naheliegende *EcoRV*-Schnittstelle zur Spaltung genutzt. Dies zog allerdings eine Verkürzung des Promotorfragments (jetzt: -19/-1.097) von 1.097 bp auf 1.078 mit sich. Anschließend wurde p49618 *blunt end* in den *SmaI*-gespaltenen Vektor pGUSINT direkt vor die *gusAint*-Reportergenkassette kloniert. Durch spezifische Kontrollspaltungen und Sequenzierungen konnte die korrekte Insertion von p49618 in das Konstrukt pGUSINT:p49618 bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung III.3: Schematische Darstellung der Promotor-GUS-Fusionen von *Mtr.12220*, *Mtr.49618* und *Mtr.10067*.** Dargestellt sind die Fusionen der Promotorregionen von *Mtr.12220* (p12220, oben), *Mtr.49618* (p49618, mittig) und *Mtr.10067* (p10067, unten) mit der *gusAint*-Reportergenkassette. Die ungefähren Längen (in Kilobasenpaaren) der einzelnen Fragmente sowie die für die Klonierungen verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

Durch einer *SmaI*-Spaltung und der anschließenden Auffüllung der 5'-Überhänge mit Hilfe des Klenow-Fragments wurde die komplette Promotor-GUS-Kassette (Abbildung III.3) in den *SmaI*-gespaltenen binären Vektor pRedRoot umklontiert. Der korrekte Einbau in das finale Konstrukt pRR:p49618-GUS konnte durch spezifische Kontrollspaltungen und eine anschließende Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt), und zuletzt in *A. rhizogenes* transformiert werden.

### III.2.1.3 Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das *Mtr.10067* Gen

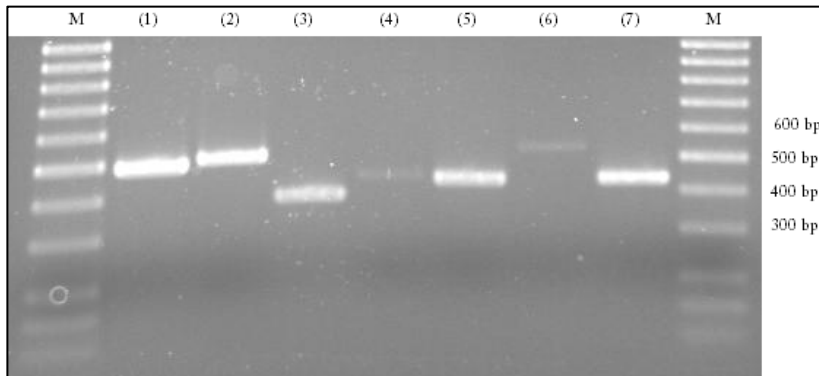
Für die Klonierung eines Promotor-GUS-Konstrukts für das Kandidatengen *Mtr.10067* wurde eine 996 bp lange Promotorsequenz (-1/-996) ausgewählt. Mit Hilfe eines spezifischen Primerpaars (Tabelle II.2), das zusätzliche extensions mit den Restriktionsschnittstellen für *EcoRI* und *HindIII* trägt, wurde das insgesamt 1.014 bp lange Fragment mittels *Pfu*-Polymerase aus dem Genom von *M. truncatula* amplifiziert (Abbildung III.2). Das amplifizierte Promotorfragment (p10067) wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaut und anschließend in den entsprechend gespaltenen Vektor pK18 inkloniert, wodurch das Konstrukt pK18:p10067 entstand. Der fehlerfreie Einbau der Promotorsequenz konnte durch spezifische Restriktionsspaltungen und eine anschließende Sequenzierung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe der *EcoRI*- und *HindIII*-Schnittstellen wurde p10067 aus dem Vektor pK18 in den Vektor pGUSINT umkloniert, wo es direkt vor der *gusA*-Reporterengenkassette eingesetzt wurde (Abbildung III.3). Erneut konnte durch spezifische Restriktionsspaltungen und eine anschließende Sequenzierung die korrekte Insertion von p10067 in das neue Konstrukt pGUSINT:p10067 gezeigt werden. Durch eine *XbaI/XhoI*-Spaltung wurde die komplette Promotor-GUS-Kassette aus pGUSINT:p10067 herausgespalten, die überhängenden 5'-Enden mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und anschließend *blunt end* in den *SmaI*-gespaltenen binären Vektor pRedRoot ligiert. Der korrekte Einbau in das finale Konstrukt pRR:p10067-GUS konnte durch spezifische Kontrollspaltungen und eine anschließende Sequenzierung bestätigt (Daten nicht gezeigt) und das Konstrukt zuletzt in *A. rhizogenes* transformiert werden.

### III.2.2 Klonierung von RNAi-Konstrukten

Für die sieben Kandidatengene *Mtr.9126*, *Mtr.9513*, *Mtr.10987*, *Mtr.25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966* und *Mtr.43223* (Tabelle III.2) wurden RNAi-Konstrukte mit Hilfe des Gateway® Cloning Technology Kits, eine auf dem Rekombinationsprozess des Bakteriophagen  $\lambda$  basierende Klonierungsmethode (Details siehe Abschnitt II.2.3.5), erstellt. Als RNAi-Targetsequenzen wurden jeweils 300 - 500 bp lange Sequenzen in den 3'-Regionen der Kandidatengene gewählt (Abbildung A.2 im Anhang). Diese Regionen flankierende Primerpaare mit spezifischen *attB*-Rekombinationssequenzen wurden entsprechend der Angaben des Gateway® Cloning Technology Kits erstellt. Mit Hilfe dieser spezifischen Primerpaare (Tabelle II.3) und der Phire® Hot Start II DNA Polymerase wurden die gewünschten Targetsequenzen mittels PCR aus genomischer DNA von *M. truncatula* (im Falle der Gene *Mtr.9126*, *Mtr. 25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966* und *Mtr.43223*) oder aus cDNA von mit *G. intraradices* mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln (im Falle der Gene *Mtr.9513* und *Mtr.10987*) amplifiziert (Abbildung III.4).

Im ersten Rekombinationsschritt (BP-Reaktion; siehe Abbildung II.1) wurden die *attB*-flankierten RNAi-Targetsequenzen mit Hilfe der Gateway®-Systems nach Herstellerangaben in den Donorvektor pDONR221 (Abbildung B.4 im Anhang) eingebracht. Die Insertion der korrekten RNAi-Targetsequenzen in die Konstrukte pDONR221:*Mtr.9126*, pDONR221:*Mtr.9513*,

pDONR221:Mtr.10987, pDONR221:Mtr.25945, pDONR221:Mtr.32288, pDONR221:Mtr.37966 und pDONR221:Mtr.43223 konnte über spezifische Restriktionsspaltungen bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung III.4:** Agarosegel der mittels PCR aus *Medicago truncatula* amplifizierten RNAi-Targetsequenzen von Mtr.9126, Mtr.9513, Mtr.10987, Mtr.25045, Mtr.32288, Mtr.37966 und Mtr.43223. Neben 100 bp DNA-Markern (M) sind die RNAi-Targetsequenzen von (1) Mtr.9126 (489 bp), (2) Mtr.9513 (502 bp), (3) Mtr.10987 (391 bp), (4) Mtr.25945 (442 bp), (5) Mtr.32288 (430 bp), (6) Mtr.37966 (530 bp) und (7)

Mtr.43223 (432 bp) abgebildet. Die Amplifikation der Targetsequenzen von Mtr.9126, Mtr. 25945, Mtr.32288, Mtr.37966 und Mtr.43223 erfolgte aus genomischer DNA von *M. truncatula*, während die Targetsequenzen von Mtr.9513 und Mtr.10987 aus cDNA von mit *G. intraradices* mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln statt fand.

Im zweiten Rekombinationsschritt (LR-Reaktion; siehe Abbildung II.1) wurden die RNAi-Targetsequenzen aus dem Vektor pDONR221 doppelt in inverser Orientierung in den binären RNAi-Kloniervektor pK7GWIWG2(II) (Abbildung B.5 im Anhang) umkloniert. Auch diese Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben des Gateway® Cloning Technology Kits. Die korrekte Position der RNAi-Targetsequenzen in den aus dem zweiten Rekombinationsschritt resultierenden RNAi-Konstrukten pK7GWIWG2:Mtr.9126, pK7GWIWG2:Mtr.9513, pK7GWIWG2:Mtr.10987, pK7GWIWG2:Mtr.25945, pK7GWIWG2:Mtr.32288, pK7GWIWG2:Mtr.37966 und pK7GWIWG2:Mtr.43223 konnte mit Hilfe spezifischer Kontrollspaltungen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

**Tabelle III.3:** Auflistung der Punktmutationen in den RNAi-Konstrukten pK7GWIWG2:Mtr.9126, pK7GWIWG2:Mtr.9513, pK7GWIWG2:Mtr.10987, pK7GWIWG2: Mtr.25945, pK7GWIWG2:Mtr.32288 und pK7GWIWG2:Mtr.37966. Aufgelistet ist jeweils die Art der Punktmutation sowie ihre Position (in bp) innerhalb der jeweiligen RNAi-Targetsequenzen.

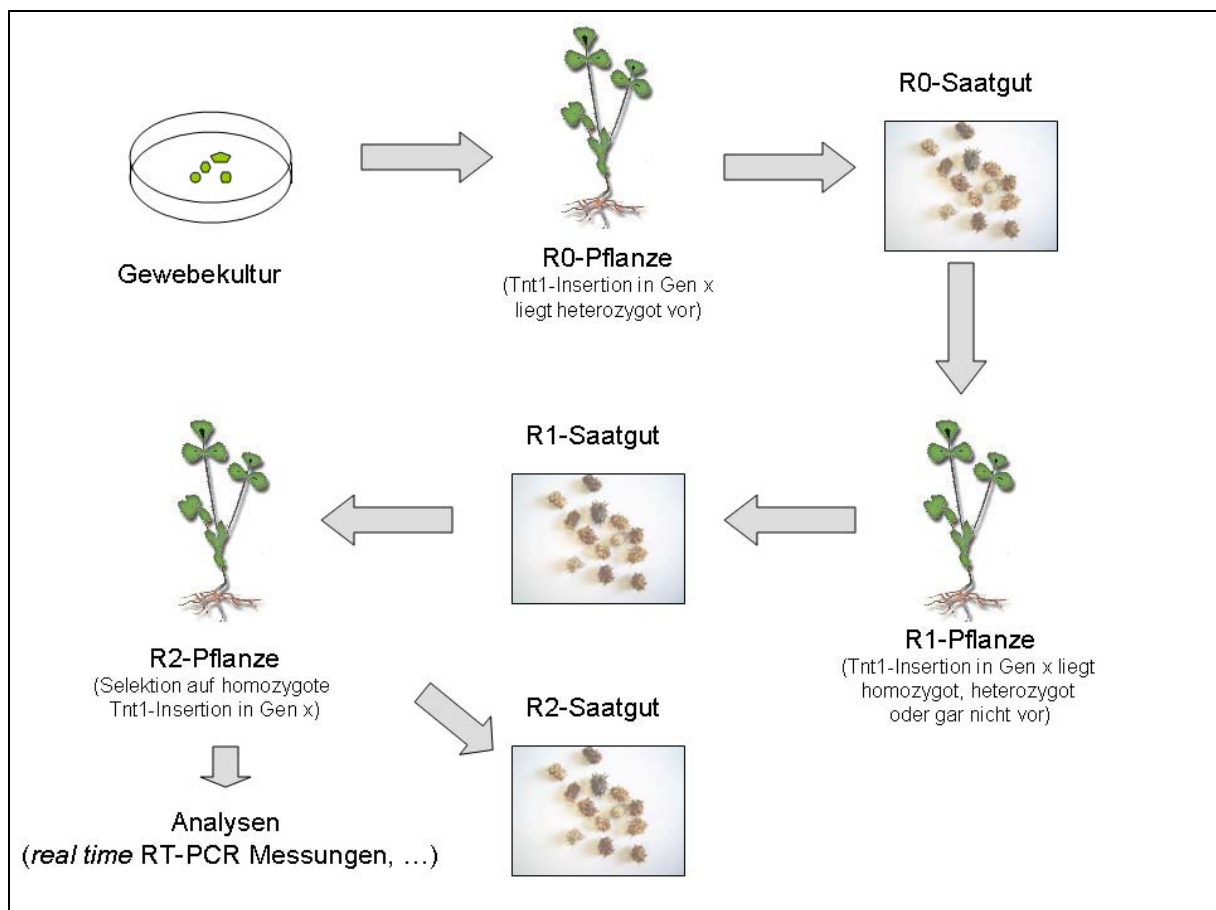
RNAi-Konstrukt	Punktmutation	Position in der RNAi-Targetsequenz
pK7GWIWG2:Mtr.9126	Insertion: A	300
pK7GWIWG2:Mtr.9513	Substitution: C → T	239
	Substitution: G → T	300
pK7GWIWG2:Mtr.10987	Deletion: T	303
pK7GWIWG2:Mtr.25945	Substitution: T → A	126
pK7GWIWG2:Mtr.32288	Insertion: A	345
	Substitution: T → A	348
pK7GWIWG2:Mtr.37966	Substitution: T → C	208

Eine anschließende Sequenzierung zeigte für sechs der sieben RNAi-Konstrukte Punktmutationen in beiden invers angeordneten RNAi-Targetsequenzen. Ob diese Punktmutationen, von denen ausschließlich das Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.43223 nicht betroffen war, aus der PCR Amplifikation oder aus dem Rekombinationsprozess stammten konnte nicht endgültig geklärt werden. Da in jeder der betroffenen RNAi-Targetsequenzen jedoch nur 1 - 2 Punktmutationen

vorlagen (Tabelle III.3), ließ sich annehmen, dass dies den ohnehin nicht vorhersagbaren RNAi-Effekt möglicherweise nicht bzw. nur wenig beeinträchtigen würde. Alle sieben RNAi-Konstrukte wurden im letzten Schritt in *A. rhizogenes* transformiert.

### III.2.3 Anzucht, Selektion und Genotypisierung von Tnt1-Insertionsmutanten

Für die 14 Kandidatengene *Mtr.7264*, *Mtr.9126*, *Mtr.9513*, *Mtr.1098*, *Mtr.11570*, *Mtr.20292*, *Mtr.21216*, *Mtr.24351*, *Mtr.25945*, *Mtr.32288*, *Mtr.37966*, *Mtr.38547*, *Mtr.40638* und *Mtr.43223* (Tabelle III.2) konnten insgesamt 20 Tnt1-Insertionslinien der *Noble Foundation* (Samuel Robert Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) identifiziert werden. Bei den für diese Linien erhaltenen Samen handelte es sich wahlweise um Samen der Generation R0 oder R1. R0-Samen sind die Samen der aus Gewebekulturen regenerierten Pflanzen (R0-Pflanzen) nach einer Selbstbestäubung (Abbildung III.5).

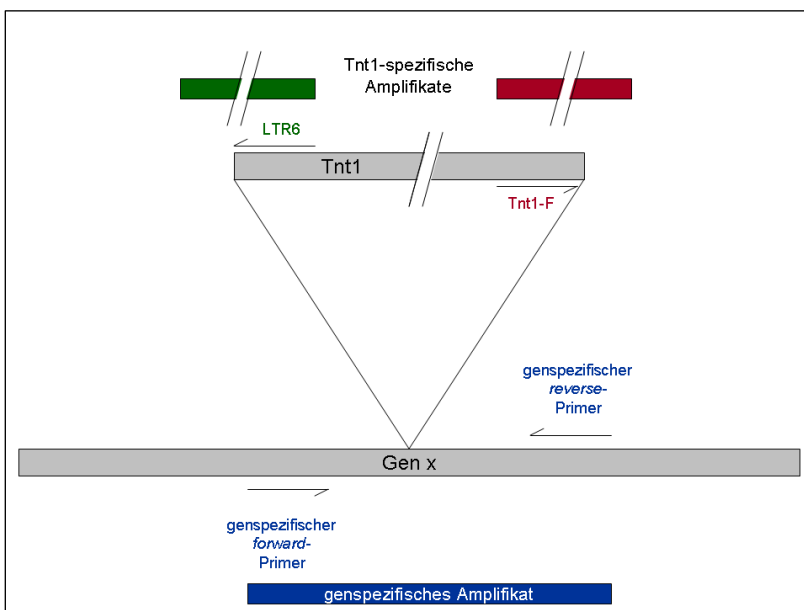


**Abbildung III.5: Prozess der Selektion für eine Tnt1-Insertionslinie zur Analyse eines ausgewählten Gens (Gen x).** Aus einer Gewebekultur wurden an der *Samuel Roberts Noble Foundation* zunächst im Hochdurchsatzverfahren R0-Pflanzen erzeugt, von denen eine hier beispielhaft gezeigt ist. In dieser R0-Pflanze liegt die gewünschte Tnt1-Insertion in Gen x heterozygot vor. Aus den durch Selbstbefruchtung gewonnenen R0-Samen werden R1-Pflanzen angezogen, in denen die Tnt1-Insertion im ausgewählten Gen segregiert und somit homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegen kann. Über eine Genotypisierung werden die für die gewünschte Tnt1-Insertion homozygoten R1-Pflanzen bestimmt und aus ihren Samen die ausschließlich homozygoten R2-Pflanzen angezogen. Die R2-Pflanzen können zum einen zur Nachzucht homozygoter Samen für die gewünschte Tnt1-Insertion und zum anderen für weitergehende Analysen bezüglich des ausgewählten Gens genutzt werden.

Ro-Pflanzen, und somit auch ihre Samen, sind heterozygot für alle Tnt1-Insertionen. Für einen vollständigen insertionsbedingten *knockout* eines Gens, muss die entsprechende Tnt1-Insertion jedoch homozygot vorliegen. So mussten für die 14 Linien NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF11181, NF11397, NF11581, NF12449 und NF11714, für die ausschließlich Ro-Samen vorlagen, zunächst R1-Pflanzen angezogen und die R1-Samen nach einer Selbstbefruchtung geerntet werden (Abbildung III.5). Für die sechs Linien NF0075, NF0160, NF4095, NF4409, NF4499 und NF5196 war dieser Schritt nicht notwendig, da bereits R1-Samen vorlagen.

Ab der Generation R1 segregierten die jeweiligen Tnt1-Insertionen, so dass sie entweder homozygot, heterozygot oder gar nicht vorlagen. Um die homozygoten Pflanzen für die jeweilige Tnt1-Insertion zu identifizieren, fand für die R1- bzw. R2-Pflanzen (R1-Pflanzen für den Fall dass ursprünglich Ro-Samen vorlagen und R2-Pflanzen für den Fall dass ursprünglich R1-Samen vorlagen) jeder Linie eine Genotypisierung statt. Hierfür wurden die Tnt1-Insertionen in dem jeweiligen Kandidatengen der einzelnen R1- bzw. R2-Pflanzen jeder Linien mittels *direct Multiplex PCR* (siehe Abschnitt II.2.2.5.2) nachgewiesen.

Stellvertretend für alle analysierten Tnt1-Linien wird dieser Prozess hier nur anhand der Linie NF4095 im Detail beschrieben. Für diese Linie lagen bereits R1-Samen vor, aus denen insgesamt 12 R2-Pflanzen angezogen wurden. Zur Genotypisierung dieser Pflanzen wurde zunächst ein genspezifisches Primerpaar (Tabelle II.4) für das Kandidatengen *Mtr.38547* designt dessen *forward*- und *reverse*-Primer jeweils unmittelbar *upstream* und *downstream* der Tnt1-Insertionsstelle liegen. Gemeinsam mit dem Tnt1-spezifischen, am 3'-Ende des Retrotransposon liegenden, Primer Tnt1-F (Tagede *et al.*, 2008) und den genspezifischen Primern wurde nun eine *direct Multiplex PCR* für jede der 12 Pflanzen durchgeführt (Abbildung III.6).

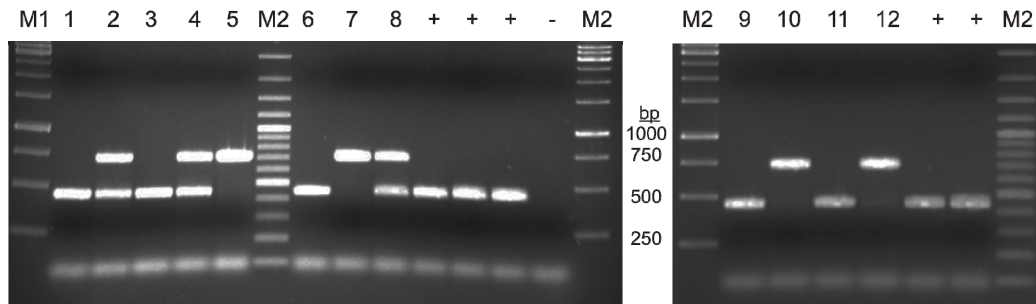


**Abbildung III.6: Schematische Darstellung der Genotypisierung von Tnt1-Insertionslinien mittels Multiplex PCR.** Durch Multiplex PCR-Reaktionen der Gen-spezifischen Primer mit jeweils einem der Tnt1-spezifischen Primer (LTR6 oder Tnt1-F) lässt sich über die unterschiedlichen Größen der entstehenden genspezifischen oder Tnt1-spezifischen Amplifikate erkennen ob die entsprechende Tnt1-Insertion homozygot, heterozygot oder gar nicht vorliegt.

Wie in Abbildung III.7 zu erkennen ist, wiesen die für die untersuchte Tnt1-Insertion heterozygoten Pflanzen (Nr. 2, 4, 8 und 12) dabei sowohl ein Tnt1-spezifisches Amplifikat (704 bp) als auch ein genspezifisches Amplifikat (441 bp) auf, die deutlich voneinander zu unterscheiden

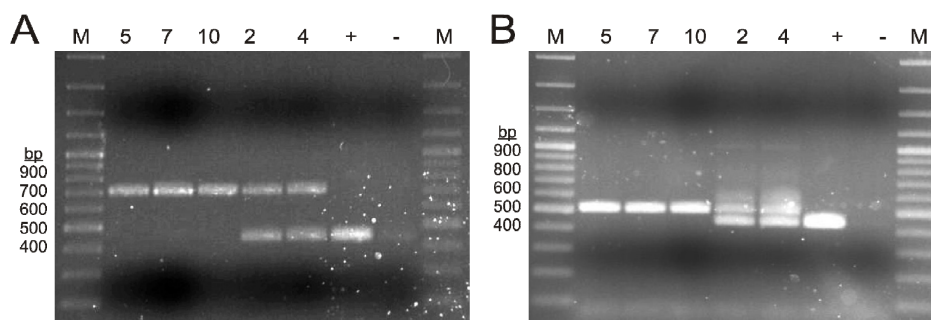


waren (Abbildung III.7). Die für die gewünschte Tnt1-Insertion homozygoten Pflanzen (Nr. 5, 7 und 10) zeigten nur das Tnt1-spezifische Amplifikat und die Pflanzen ohne die gewünschte Tnt1-Insertion (Nr. 1, 3, 6, 9 und 11) nur das genspezifische Amplifikat (Abbildung III.7).



**Abbildung III.7: Agarosegel der Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinie NF4095 mittels direct Multiplex PCR mit einem genspezifischen Primerpaar und einem zusätzlichen Tnt1-spezifischen Primer.** Das obere, Tnt1-spezifische Amplifikat ist mit einer Größe von 704 bp deutlich vom unteren genspezifischen Amplifikat mit einer Größe von 441 bp zu unterscheiden. Folglich handelt es sich bei Nr. 2, 4, 8 und 12 um heterozygote und bei Nr. 5, 7, und 10 um homozygote Pflanzen für die gewünschte Tnt1-Insertion. Die übrigen Pflanzen (Nr. 1, 3, 6, 9 und 11) tragen die gewünschte Tnt1-Insertion gar nicht mehr. 1 - 12: direct template von R2-Pflanze Nr. 1 - 12 der Tnt1-Insertionslinie NF4095; +: Positiv Kontrolle (direct template verschiedener *M. truncatula* R108 WT-Pflanzen); -: Negativ-Kontrolle (kein template); M1: 1 kb Marker; M2: 100 bp Marker

Um diese mittels direct PCR gewonnenen Erkenntnisse zu bestätigen, wurde für eine Auswahl von Pflanzen, in diesem Fall für die potentiell homozygoten Pflanzen Nr. 5, 7 und 10 sowie zur Kontrolle für die potentiell heterozygoten Pflanzen Nr. 2 und 4, genomische DNA isoliert und die PCR auf dieser Basis wiederholt. Neben der zuvor durchgeführten Multiplex-PCR aus den genspezifischen Primern und Tnt1-F wurde zudem eine zweite Multiplex PCR mit den genspezifischen Primern und dem Primer LTR6 (Tagede *et al.*, 2008) durchgeführt. LTR6 ist wie Tnt1-F ein Tnt1-spezifischer Primer, der im Gegensatz zu diesem jedoch am 5'-Ende des Retrotransposons sitzt (Abbildung III.6).



**Abbildung III.8: Agarosegel der Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinie NF4095 mittels PCR mit einem genspezifischen Primerpaar und zwei verschiedenen Tnt1-spezifischen Primern.** A: Das obere mit Hilfe des Tnt1-spezifischen Primers Tnt1-F generierte Amplifikat ist mit einer Größe von 704 bp deutlich vom unteren genspezifischen Amplifikat mit einer Größe von 441 bp zu unterscheiden. B: Das obere mit Hilfe des Tnt1-spezifischen Primers LTR6 generierte Amplifikat ist mit einer Größe von 506 bp deutlich vom unteren genspezifischen Amplifikat mit einer Größe von 441 bp zu unterscheiden. Folglich handelt es sich bei Nr. 2 und 4 um heterozygote und bei Nr. 5, 7 und 10 um homozygote Pflanzen für die gewünschte Tnt1-Insertion. 5, 7, 10, 2, 4: template von R2-Pflanze Nr. 5, 7, 10, 2, 4 der Tnt1-Insertionslinie NF4095; +: Positiv Kontrolle (template *M. truncatula* R108 WT-Pflanze); -: Negativ-Kontrolle (kein template); M: 100 bp Marker

Wie erwartet zeigten die Pflanzen Nr. 5, 7 und 10 ausschließlich die Tnt1-spezifischen Amplifikate (704 bp für Tnt1-F und 506 bp für LTR6), während die heterozygoten Pflanzen Nr. 2 und 4 zusätzlich das genspezifische Amplifikat (441 bp) aufwiesen (Abbildung III.8). Somit konnten für die Linie NF4095 insgesamt drei für die gewünschte Tnt1-Insertion homozygote Pflanzen identifiziert werden, von denen sich nach einer weiteren Selbstung jedoch zwei als steril erwiesen. Daher konnten im Fall der Linie NF4095 ausschließlich die Samen von Pflanze Nr. 7 geerntet und als Grundlage für weitere Analysen in der nächsten Generation verwendet werden.

**Tabelle III.4: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Tnt1-Insertionslinien.** Aufgelistet sind die Tnt1-Insertionslinien entsprechender Kandidatengene unter Angabe der Tnt1-Insertionsstelle (wobei sich +1 auf das erste Nukleotid des Startcodons der genomischen Sequenz bezieht) und der Anzahl der in der Generation R1 bzw. R2 identifizierten Pflanzen mit der gewünschten homozygoten oder heterozygoten Tnt1-Insertion oder ohne diese. Angaben in Klammern kennzeichnen die Anzahl steriler Pflanze in Bezug auf die vor der Klammer genannte Gesamtzahl.

Gen	Tnt1 Linie	Tnt1 Insertionsstelle	Pflanzen mit homozygoter Tnt1-Insertion	Pflanzen mit heterozygoter Tnt1-Insertion	Pflanzen ohne Tnt1-Insertion
Mtr.7264	NF8882	1.835 bp	0	2 (2 steril)	10
Mtr.9126	NF11181	655 bp	4 (1 steril)	3	6
Mtr.9513	NF10142	844 bp	0	0	18
	NF12449	1.051 bp	0	6	6
Mtr.10987	NF9704	192 bp	0	0	20
	NF10424	153 bp	0	27	23
Mtr.11570	NF4409	1.445 bp	3	5	6
Mtr.20292	NF0160	19 bp	0	0	12
Mtr.21216	NF0075	745 bp	3 (3 steril)	6	3
Mtr.24351	NF4499	513 bp	3	4	6
Mtr.25945	NF11397	1.257 bp	0	0	19
	NF11714	9 bp	7	1	10
Mtr.32288	NF9470	493 bp	1	10	9
Mtr.37966	NF9488	522 bp	0	0	11
	NF11020	211 bp	0	0	11
Mtr.38547	NF11581	166 bp	2	6	5
	NF4095	680 bp	3 (2 steril)	4	8
Mtr.40638	NF8500	- 274 bp	10 (2 steril)	4	3
	NF8710	111 bp	5 (2 steril)	1	2
Mtr.43223	NF5196	643 bp	4 (1 steril)	5	6

Die Ergebnisse der entsprechend durchgeführten Genotypisierungen der Tnt1-Insertionslinien NF0075, NF0160, NF4409, NF4499, NF5196, NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF11181, NF11397, NF11581, NF11714 und NF12449 sind Tabelle III.4 zu entnehmen. Dabei konnten ausschließlich für die elf Linien NF0075, NF4409, NF4499, NF11181, NF11714, NF9470, NF11581, NF4095, NF8500, NF8710 und NF5196 Pflanzen identifiziert werden, die homozygot für die jeweilige Tnt1-Insertion waren. Während die drei Linien NF8882, NF10424 und NF12449 zumindest heterozygote Pflanzen für die jeweiligen Tnt1-Insertionen aufwiesen, waren die gewünschten Insertionen in den sechs Linien NF0160, NF10142, NF9704, NF11397, NF9488 und



NF11020 überhaupt nicht nachweisbar. Im Falle der Linien, für die zumindest heterozygote Pflanzen der jeweiligen Tnt1-Insertion nachweisbar waren, besteht die geringe Möglichkeit, dass bei der Menge der genotypisierten Pflanzen (im Schnitt 16 pro Linie) rein zufällig keine homozygote Pflanze dabei war. Daher wurde im Falle der Tnt1-Insertionslinie NF10424 ein zweiter Genotypisierungsansatz durchgeführt. Von den ursprünglich 15 genotypisierten R1-Pflanzen dieser Linie erwiesen sich 8 Pflanzen als heterozygot und in den verbleibenden 7 war die gewünschte Tnt1-Insertion gar nicht nachweisbar. In einem zweiten Ansatz wurden nun weitere 35 R1-Pflanzen genotypisiert, von denen sich 19 als heterozygot für die gewünschte Tnt1-Insertion erwiesen und diese in den übrigen 16 Pflanzen nicht nachweisbar war. Interessanterweise war das Verhältnis zwischen den heterozygoten Pflanzen und den Pflanzen ohne die gewünschte Tnt1-Insertion in beiden Genotypisierungsansätzen der Linie NF10424 sehr konstant: im ersten Ansatz waren durchschnittlich 53,3 % aller Pflanzen heterozygot, im zweiten Ansatz waren es 54,3 %. Dies zeigt, dass die Aufspaltung der R1-Pflanzen dieser Linie zumindest nach einem konstanten Verhältnis erfolgte. Mit insgesamt 50 genotypisierten R1-Pflanzen der Linie NF10424 lässt sich feststellen, dass die Abwesenheit homozygoter Pflanzen vermutlich andere Gründe als die zu geringe Anzahl der getesteten Pflanzen hatte. Denkbar wäre hier beispielsweise, dass ein homozygoter *knockout* des jeweiligen Kandidatengens letal für die entsprechende Pflanze ist. So konnte für fast alle Tnt1-Linien beobachtet werden, dass einzelne Samen nicht keimten bzw. einzelne Keimlinge nicht lange überlebten. Dies kann, neben einer möglichen Letalität, natürlich aber auch andere Ursachen haben.

Im Falle der Linien NF0160, NF10142, NF9704, NF11397, NF9488 und NF11020, für die die gewünschte Tnt1-Insertion überhaupt nicht nachweisbar war, ist ein solcher Erklärungsansatz zwar ebenfalls vereinzelt denkbar, aber angesichts der hohen Anzahl dieser Linien längst nicht ausreichend. Mögliche weitere Erklärungsansätze hierfür wären beispielsweise das Vertauschen von Samen oder die falsche Zuordnung der Tnt1-Insertionsstelle im Rahmen der Hochdurchsatzproduktion einzelner Mutantenlinien.



**Abbildung III.9:** Vergleich eine *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanze mit einer Pflanze der Tnt1-Insertionslinie NF0075. Abgebildet ist jeweils ein Blatt einer *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanze (links) sowie einer Pflanze der Tnt1-Insertionslinie NF0075 (rechts).

Von den insgesamt 45 als homozygot identifizierten Pflanzen erwiesen sich circa 25 % als steril (Tabelle III.4). Ein Beispiel hierfür ist die Linie NF0075, in der zwar drei homozygote Pflanzen identifiziert werden konnten, die sich jedoch allesamt als steril erwiesen. Alle homozygoten Pflanzen dieser Linie waren zwergwüchsig und eine wies zudem eine starke phänotypische Abnormalität der Blattform auf, wie in Abbildung III.9 zu erkennen ist. Da Fertilität eine Grundvoraussetzung für die Analyse eines Kandidatengens mittels Tnt1-Insertionsmutanten ist, wurden anhand der Tnt1-Insertionslinie NF0075 keine weiteren Untersuchungen angestellt und

für die anderen Linien mit sterilen homozygoten Pflanzen (siehe Tabelle III.4) entsprechend eingeschränkt.

Von den fertilen Pflanzen mit homozygoten Tnt1-Insertionen in den jeweiligen Kandidatengenomen wurden routinemäßig Nachkommen herangezogen, von denen stets 4 - 5 Pflanzen zur Saatgutproduktion verwendet wurden, während die übrigen Nachkommen mit *G. intraradices* mykorrhiziert und für funktionelle Analysen der jeweiligen Kandidatengene verwendet wurden (Abbildung III.5). Als Kontrolle dienten hierbei jeweils unter gleichen Bedingungen angezogene *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden alle Tnt1-Insertionsmutanten zunächst phänotypisch charakterisiert. Hierzu wurde zunächst optisch beurteilt ob die Insertionsmutanten in Form, Farbe und Größe den Wildtyp-Kontrollen entsprachen, was, wie in Abbildung III.9 zu erkennen ist, nicht immer der Fall war. Da eine erfolgreiche Mykorrhizierung einen positiven Einfluss auf Biomasseproduktion und Wachstum von Pflanzen hat (Smith & Read, 2008), wurden als weitere Parameter das Frischgewicht von Spross und Wurzel sowie die Anzahl der Blätter, Blüten und Samenkapseln jeder einzelnen Pflanze festgehalten und mit entsprechenden Wildtyp-Kontrollen verglichen. Für weitere Analysen wurden die Wurzeln der Insertionsmutanten und Wildtyp-Kontrollen in 1 - 2 cm lange Fragmente geschnitten, gemischt, je zur Hälfte aliquotiert und bei -80° C gelagert. Mit Ausnahmen weniger Pflanzen wurde die erste Wurzelhälfte jeder Pflanze für eine Färbung der AM-Pilzstrukturen genutzt, während das restliche Wurzelgewebe einer RNA-Extraktion unterzogen wurde.

Mittels *real time* RT-PCR wurde in diesen RNA-Proben einerseits die relative Expression von AM-Markergenen bestimmt und andererseits die homozygote Tnt1-Insertion an der korrekten Stelle bestätigt. Für diesen Nachweis wurde für jede Tnt1-Insertionslinie ein genspezifisches und ein Tnt1-spezifisches Primerpaar designiert. Wie bereits im Rahmen der Genotypisierung der Tnt1-Linien beschrieben, lagen hierbei die genspezifischen Primer unmittelbar *up-* und *downstream* der Tnt1-Insertion und lieferten somit ausschließlich in den Wildtyp-Kontrollen das korrekte Amplifikat. Bei den Tnt1-spezifischen Primerpaaren lag der *forward*-Primer jeweils unmittelbar *upstream* der Tnt1-Insertion, während der *reverse* Primer auf dem Retrotransposon lag, so dass hier ausschließlich in den Tnt1-Insertionsmutanten das korrekte Amplifikat vorliegen konnte. Die Abwesenheit der genspezifischen Amplifikate in den Insertionsmutanten bestätigte zudem die Homozygotie dieser Pflanzen.

### III.3 Funktionelle Analyse ausgewählter Kandidatengene

#### III.3.1 Funktionelle Analyse von Kinasen und sonstigen Signaltransduktionskomponenten

##### III.3.1.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.20292*

###### III.3.1.1.1 Die Zellwand-assoziierten Rezeptorkinase *Mtr.20292*

Das Kandidatengen *Mtr.20292* kodiert für eine putative Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase. Das 1.584 bp lange Gen liegt randständig auf dem siebten Chromosom von *Medicago truncatula*. Neben der genomischen Sequenz von *Mtr.20292*, die in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms (Young et al., 2011) den Bezeichner Medtr7g116650 trägt, konnte in der EST-Datenbank von *M. truncatula* (DFCI *Medicago Gene Index*) zudem das *Mtr.20292* entsprechende EST-Cluster TC194450 identifiziert werden. Die genomische Sequenz von *Mtr.20292* beinhaltet insgesamt vier Introns und einen 80 bp lange 3'-UTR (*untranslated region*) Bereich, wodurch sich der Kodierbereich des Gens auf 1.082 bp reduziert (Abbildung III.10). Die Introns fast aller eukaryotischen Gene beginnen mit den Nukleotiden GT (bzw. GU auf RNA-Ebene) und enden auf AG, diese Sequenzen sind vermutlich Erkennungssequenzen für RNA-bindende Proteine, die beim Spleißen eine Rolle spielen (Brown, 2007). Dieses Muster trifft auch auf alle vier Introns von *Mtr.20292* zu (Abbildung III.10). In der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz von *Mtr.20292*, mit einer Länge von 360 Aminosäuren, konnte über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist et al., 2010) von Position 62 - 311 eine Proteinkinase-Domäne der Familie der Serin/Threonin-Kinasen identifiziert werden (Abbildung III.10). Diese umfasst zwei charakteristische Regionen: eine ATP-Bindestelle und eine funktionell wichtige Asparaginsäure (Abbildung III.10). Die ATP-Bindestelle liegt im N-terminalen Bereich von *Mtr.20292* und ist typischerweise gekennzeichnet durch einen Glycin-reichen Abschnitt in der Nähe eines Lysins (Hanks & Hunter, 1995). Das zweite charakteristische Merkmal, eine Asparaginsäure, die hochkonserviert im Zentrum der katalytischen Domäne liegt und eine wichtige Rolle in der katalytischen Aktivität des Enzyms spielt (Knighton et al., 1991), konnte ebenfalls in der Aminosäuresequenz von *Mtr.20292* identifiziert werden (Abbildung III.10).

Die Auswahl von *Mtr.20292* als Kandidatengen erfolgte neben der Annotation als potentielle Rezeptorkinase aufgrund der Induktion in verschiedenen Mykorrhiza-Stadien. So zeigte *Mtr.20292* eine 5,3-fachen Induktion in *M. truncatula* Wildtyp Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung, die in entsprechend behandelten Wurzeln einer *dmiz*-Mutante nicht beobachtet werden konnte (Tabelle III.1). Neben dieser Induktion in sehr frühen Mykorrhizastadien war in späteren Mykorrhizastadien eine noch viel stärkere Induktion nachweisbar. Im Detail war *Mtr.20292* nach 28-tägiger Mykorrhizierung mit *G. intraradices* bzw. *G. mossae* 48,7-fach bzw. 20,7-fach im Vergleich zu einer entsprechenden Kontrolle induziert (Tabelle III.1). Diese Daten lassen für das

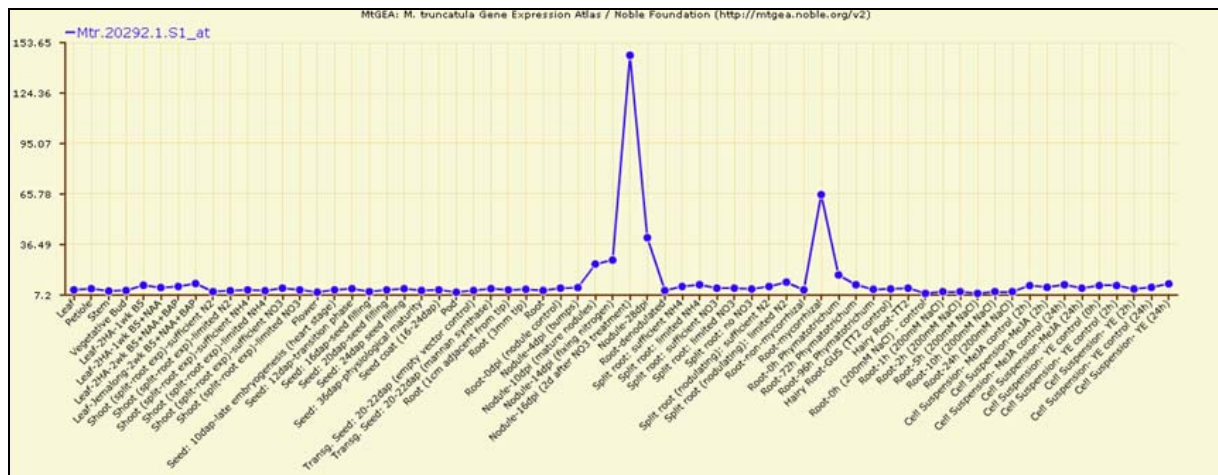
Genprodukt von *Mtr.2092* auf eine potentiell Symbiose-assoziierte Rolle downstream MtDMI3 in frühen und späten Mykorrhizastadien vermuten.



**Abbildung III.10: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Mtr.2092*.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von *Mtr.2092* im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 3'-UTR Bereich. Grau hinterlegte Bereiche kennzeichnen Introns. Das grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons *Tnt1* in der Insertionslinie *NF0160*. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich gelb markiert ist eine mittels Motivsuche identifizierte Proteinkinase-Domäne mit ATP-Bindestelle (ein unterstrichener Glycin-reicher Abschnitt in der Nähe eines fett gedruckten Lysins) und einer pink markierten und funktionell wichtigen Asparaginsäure (siehe Beschreibung im Text).

Das MtGEA-Expressionsprofil von *Mtr.2092* zeigte weiterhin, dass dieses Gen hochspezifisch in Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln exprimiert wird (Abbildung III.11). Dies legt die Vermutung nahe, dass *Mtr.2092* eine generelle Funktion in Wurzelsymbiosen von *M. truncatula* spielt. Aufgrund seiner Annotation als Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase wäre eine mögliche Rolle in der Verarbeitung und Weiterleitung mikrobieller Signale denkbar.

Um einen tieferen Einblick in die Funktion des *Mtr.2092* Proteins zu erlangen wurde, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, versucht durch RNAi bzw. Insertionsmutagenese ein gezieltes *knockdown* bzw. *knockout* der Expression von *Mtr.2092* zu erreichen um dessen phänotypische Folgen zu beobachten.



**Abbildung III.11:** Das Expressionsprofil von *Mtr.20292* aus dem *M. truncatula gene expression atlas (MtGEA)*. Das Expressionsprofil zeigt eine spezifische Expression von *Mtr.20292* in Wurzelknöllchen und mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*.

### III.3.1.1.2 Für die Analyse von *Mtr.20292* mittels *Tnt1*-Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden

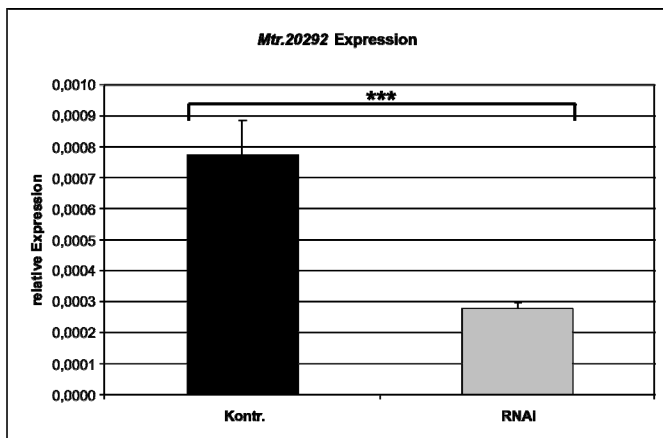
Für das Kandidatengen *Mtr.20292* konnte in der *Tnt1*-Datenbank der Noble Foundation die *Tnt1*-Insertionslinien NF0160 identifiziert werden. Anhand der in der Datenbank zur Verfügung gestellten Sequenzdaten ließen sich Position und Orientierung der *Tnt1*-Insertionen in *Mtr.20292* bestimmen. Die Insertion lag direkt am Anfang des Gens, zwischen dem 19. und 20. Basenpaar downstream des Startcodons in 5'-3'-Orientierung (Abbildung III.10). Für weiterführende funktionelle Analysen wurde versucht homozygote Pflanzen der Linien NF0160 zu identifizieren, was allerdings nicht gelang. Die gewünschte *Tnt1*-Insertion lies sich weder homo- noch heterozygot in Pflanzen dieser Linie nachweisen (Tabelle III.4). Angesichts dieser Ergebnisse wurden keine weiteren Analysen an der *Tnt1*-Insertionslinie NF0160 durchgeführt.

### III.3.1.1.3 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.20292* beeinträchtigt die Expression von AM-Markergenen

Parallel zur Analyse der Insertionsmutanten von *Mtr.20292* wurde im Rahmen einer Masterarbeit (Schaepe, 2011) ein gegen dieses Gen gerichtetes RNAi-Konstrukt erstellt. Mit Hilfe des RNAi-Konstrukts pK7GWIWG2:*Mtr.20292* sowie des Kontrollkonstrukts pK7GWIWG2:*GUS* wurden transgene, haarige Wurzeln in *M. truncatula* induziert, für 21 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert, und anschließend einer RNA-Extraktion unterzogen. Das Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:*GUS* trägt als RNAi-Targetsequenz einen Teil des *GUS* Gens, das auf Basis einer BLAST(*basic local alignment search tool*)-Suche (Altschul et al., 1990) keine signifikanten Entsprechung im bekannten Transkriptom von *M. truncatula* besitzt und im Vergleich zu einer Wildtyp-Kontrolle auch keinen Einfluss auf die Ausbildung der AM in *M. truncatula* hat (Schaepe, 2011).

Eine *real time* RT-PCR Analyse der RNAi- und Kontrollwurzeln zeigte einen deutlichen RNAi-Effekt mit einer hochsignifikanten ( $p = 0,002$ ) Reduktion der Transkriptmenge von *Mtr.20292* auf

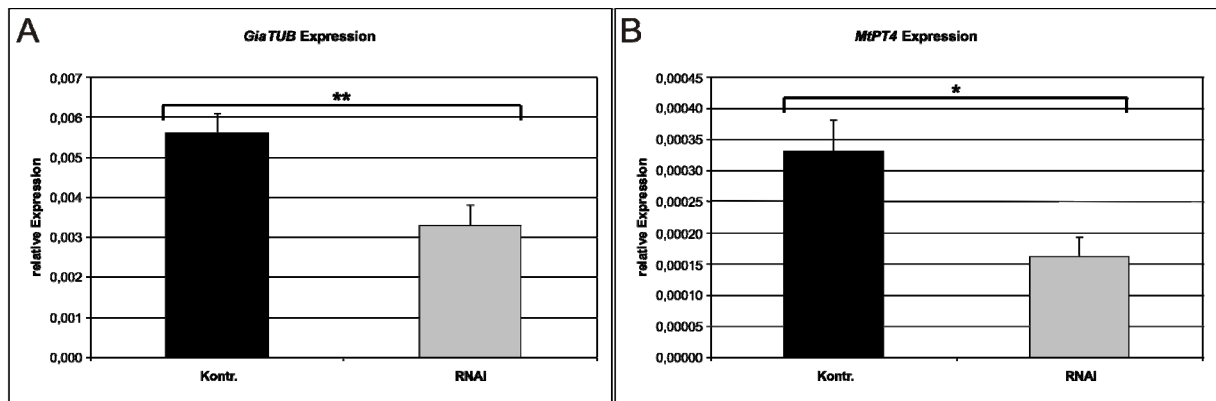
durchschnittlich 35,84 % (Abbildung III.12). Dies zeigte zunächst einmal, dass sich der RNAi-Mechanismus mit Hilfe des Konstrukts pK7GWIWG2:Mtr.20292 induzieren ließ. Um festzustellen ob der durch das RNAi-Konstrukt erzielte *knockdown* von *Mtr.20292* Auswirkungen auf die Ausbildung der AM in *M. truncatula* hat, wurde als nächstes die Expression der AM-Markergene *GiaTUB* (*Glomus intraradices*  $\alpha$ -Tubulin) und *MtPT4* (*Medicago truncatula phosphate transporter 4*; Harrison *et al.*, 2002) in den RNAi- und Kontrollwurzeln gemessen. Dabei zeigte sich in den RNAi-Wurzeln für beide Gene eine signifikante Reduktion der relativen Expression (Abbildung III.13). Im Detail war die Expression von *GiaTUB* auf im Mittel 58,79 % (mit  $p = 0,049$ ) und die Expression von *MtPT4* etwas stärker auf durchschnittlich 48,97 % (mit  $p = 0,088$ ) reduziert.



**Abbildung III.12:** Die relative Expression von *Mtr.20292* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.20292* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.20292* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2: Mtr.20292 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus zehn Kontroll- und zwölf RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind

Abbildung C.1 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

Bei *GiaTUB* handelt es sich um ein von *G. intraradices* konstant exprimiertes  $\alpha$ -Tubulin. Tubuline bilden als Bestandteile der Microtubuli die Basis des Cytoskeletts (McKean *et al.*, 2001) und werden daher in der Regel konstant exprimiert. So spiegelt die Menge der *GiaTUB*-Transkripte in mykorrhizierten Wurzeln die Menge des pilzlichen Gewebes in diesen Wurzeln wider. Daher lässt sich durch eine Reduktion der *GiaTUB* Expression in den RNAi-Wurzeln auf eine insgesamt geringere AM-Pilz Kolonisation im Vergleich zu den Kontrollwurzeln schließen, die aber keinerlei Hinweis darauf gibt, welcher Art die vorhandenen Pilzstrukturen sind. *MtPT4* ist ein Phosphattransporter, der spezifisch in der periarbuskuläre Membran exprimiert wird (Javot *et al.*, 2007a) und somit als Arbuskel-spezifischer Marker genutzt werden kann. Die Reduktion von *MtPT4* in den RNAi-Wurzeln lässt vermuten, dass hier entweder generell weniger Arbuskeln vorhanden sind oder die vorhandenen Arbuskeln zumindest funktionell beeinträchtigt sind.



**Abbildung III.13:** Die relative Expression der AM-Markergene *GαTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GαTUB* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.20292* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.20292 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus zehn Kontroll- und zwölf RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.2 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

Somit ließ sich zeigen, dass eine RNAi-vermittelte Reduktion der Transkriptmenge von *Mtr.20292* zu einer signifikant verminderten Expression zweier Markergene führt, die einerseits den pilzlichen Kolonisationsgrad und andererseits den Anteil reifer Arbuskeln widerspiegeln. Dieser Effekt legt eine Rolle der Rezeptorkinase *Mtr.20292* in der Ausbildung der AM in *M. truncatula* nahe, die jedoch durch weitere Analysen bestätigt werden müssten.

### III.3.1.2 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *MtMKS1*

#### III.3.1.2.1 Das Map-Kinase Substrat *MtMKS1*

Bei *MtMKS1* handelt es sich um das Map-Kinase Substrat 1 aus *M. truncatula*. Die Auswahl von *MtMKS1* als Kandidatengens erfolgte aufgrund seiner spezifischen Expression in sehr frühen Mykorrhizastadien. So konnte für dieses Gen eine signifikante Induktion nach einer 6-stündigen Inkubation mit gekeimten *G. intraradices* Sporen bzw. deren Überständen beobachtet werden (Tabelle III.1). Ebenso zeigte sich eine signifikante Induktion dieses Gens in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* (Tabelle III.1). Interessanterweise ließen sie die beschriebenen Induktionen nicht nur im Wildtyp, sondern auch in entsprechend behandelten *dmi3*-Mutanten nachweisen (Tabelle III.1). Sofern *MtMKS1* eine Rolle in der frühen AM-Symbiose spielt, lässt dies vermuten, dass es sich um eine Funktion *upstream* von *MtDMI3* oder um eine CSP-unabhängige Funktion handelt. In späteren Mykorrhizastadien konnte keine Induktion des *MtMKS1* Gens beobachtet werden.



```

ATGAATCAATTCCCAGACATTCCTACAGGAAGATCACCAAGAAGAGAAGTTCAAGGTCCA
CGTCCTACACCTCTTAGAATACACAAGGACTCTCACAAAATCAAGAAACCACCATTGGCC
CACAGCAGCAGCAGCAACAACAACAATATCAACAACCGCGCCAACCAATTATAATCTACA
CCGTCTCCCTAAGGTAATCCACACCACACCCGGGGACTTCATGAACCTCGTCCAACGTC
TCACCGGATCCTCCTCCTCCTCCTCCACCTCCTCCACCTCCTCGTCTTCATCATCAAATA
TTGATCCTTTCCGCGGGGATGGAACAATATCCCCGCGGCGTATGCCACCATGGAGA
AAGCTATGTCTCCTTTGGGGAAAAACAACAACAACAACAACAATAGTAGCACCAATAA
CAAGTTTTACTAGTGATGTAATAAGTGACATGGAAGGGATAGAACAACAACAATGATGA
ATCATGGAGTAGAGAGAGAAACATGATGTTTC AAGGGATTTGTCTCCGGGACCGGCT
TCACTATCTCCAATTCCTTCTAATTTTTTCTCGCCACCATCTTCGGATCCAAACATGTTT
AACAACTTCCTTCATGATTTAAGTCTGCACTTCATAGTGGTAGAAATTTTATGGAAGGT
GGTGCTAATTTCTTATTACCTAGTCTCCTCAAATTTTGTTCACCTATTACTCCTTCTATT
GATTTATCAACTATTTCTTAGGG TAA TAAATGGTTGCCATTTATTTGTAGCTAAGTTT
ATTATATTTTTCATTTTATATACAAATTTTTTAGATAGGGCATATGGTTTTTCTTACC
TTGAGTTATTTCTAGAGCTGGAATTTTGAATAATTTAATTGGATTTATTTTTGGGCAA
TTTTGTGCTCAAATTGTTT

MNQFPDIPTGRSPRRELQGPRTPLRIHKDSHKIKKPLAPQQQQQQQYQQPRQPIIIY
TVSPKVIHTTPGD FMNLVQRLTG SSSSSSTSTSSSSSSNIDPFRGDGTISPAARYATME
KAMSPLGKKQQQQQIVAPITSFTSDVISDMEGIEQTQLMNHGVERGNMMFQGILSPGPA
SLSPIPSNFFSPPSSDPNMFNNFLHDLSPALHSGRNFMEGGANFLLPSPSNFVSPITPSI
DLFNYFLG

```

**Abbildung III.14: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von MtMKS1.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von MtMKS1 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 3'-UTR Bereich. Das grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF4499. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich gelb markiert ist ein mittels Motivsuche identifiziertes VQ-Motiv.

Das MtMKS1 Gen liegt auf dem dritten Chromosom von *M. truncatula* und trägt in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms den Bezeichner Medtr3g090350. In der EST-Datenbank von *M. truncatula* konnte das dem Gen entsprechende EST-Cluster TC200491 identifiziert werden, dem jedoch ca. das erste Drittel der Gensequenz fehlt. Möglicherweise handelt es sich hier um eine unvollständige Assemblierung der EST-Sequenzen. In der genomischen Sequenz von MtMKS1 konnten keinerlei Introns identifiziert werden, so dass von einem zusammenhängenden Exon auszugehen ist. Die Nukleotidsequenz von MtMKS1 besitzt eine Gesamtlänge von 920 bp, von denen jedoch 170 bp auf den 3'-UTR Bereich entfallen, wodurch sich der Kodierbereich des Gens auf 750 bp verkürzt (Abbildung III.14).

In der 249 Aminosäuren langen, abgeleiteten Proteinsequenz von MtMKS1 konnte über einen Abgleich der CDD(*conserved domain database*)-Datenbank (Marchler-Bauer *et al.*, 2009) ein VQ-Motiv von Position 74 bis 83 identifiziert werden (Abbildung III.14). Hierbei handelt es sich um ein kurzes Motiv, das in einer Reihe von Pflanzenproteinen gefunden wurde, dessen Funktion bisher aber unbekannt ist (Marchler-Bauer *et al.*, 2009).

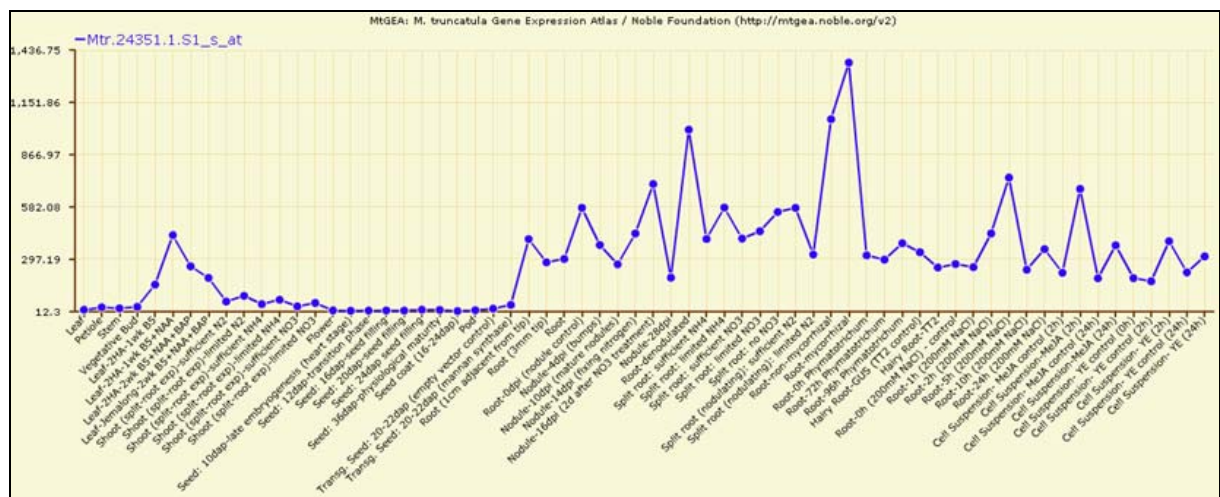
Ein Vergleich der MKS1-Proteinsequenz aus *M. truncatula* mit den entsprechenden Sequenzen aus *Glycine max* und *Arabidopsis thaliana* zeigte wie erwartet, eine deutlich höhere Sequenzähnlichkeit zwischen den nahen Verwandten *M. truncatula* und *G. max*, während die Sequenz von *A. thaliana* stärkere Abweichungen aufwies (Abbildung III.15). Dennoch gab es einige kürzere konservierte Bereiche zwischen allen drei Proteinen, zu denen auch das VQ-Motiv gehörte (Abbildung III.15), was eine funktionell wichtige Rolle dieses Motivs für das MKS1 Protein vermuten lässt.



MtMKS1	MN---QFPD-IPTGR-SPRR--ELQGPRTPLRIHKDSHKIKKPPLAPQQQQQQQY--Q
GmMKS1	MD---QFSHIIPTEP-SPRRELQLGPRPTPLRINKDSHKIKKPPLAPQQPSHPHQ---P
AtMKS1	MDPSEYFAGGNPSDQQNQKRQLQICGPRPSPLSVHKDSHKIKKPKHPAPPNRPDQPPPY
	*: * . *: : . : * :: ***:** : :***** * : . *
MtMKS1	QPRQPIIIYTVSPKVIHTTPGDFMNLVQRLTGS SSSSSSTSTSSSSSSNIDPFR-GDGTI
GmMKS1	PPRQPIIIYTVSPKVIHTTPSDFMNLVQRLTGS SSSSSSVVVPNNNN-THVDFNNGAGML
AtMKS1	IPREPVVIYAVSPKVVHATASEFMNVVQRLTGISSGVFLES-----GGGSDV
	**:*
MtMKS1	SPAARYATMEKAMSPLGKKQQQQQIVAPITSFTSDVISDMEGIEQTQLMNHGVERGN-M
GmMKS1	SPAARYATIEKAMSPMGKKH-----VLPSPG---DNIISDVQIEIN-IGDGLVRSQQN
AtMKS1	SPAARLASTENASPRGGKEP-----AARDETVEINTAMEEAAEFGG--
	***** *: *:* . *:* : : : * . : * .
MtMKS1	MFQGILSPGPASLSPIPSNFFSPSSDPNMFNNFLHDLSPALHSGRNFMEGGANFLLPSP
GmMKS1	MFQGILSPGPASLSPIPSNFFSPSSDPMSV-FLHDLSPMFQSGRNFMEG-SSFVLPSP
AtMKS1	YAPGILSPSPALLPTASTGIFSPMYHQGMFS---PAIPLGLFSPAGFMSP---FRSPGF
	***** . ** * . . : : : * * : . * . . : . : * . ** . * * .
MtMKS1	SN---FVSPITPSIDLFNYFLG--
GmMKS1	SSNFSFVSPHTPSMDLFNYFLD--
AtMKS1	TS---LVASPT-FADFFSHIWDQD
	: . : * : . * * * : * : . .

**Abbildung III.15: Alignment der MKS1-Proteinsequenzen aus *Medicago truncatula* (MtMKS1), *Glycine max* (GmMKS1) und *Arabidopsis thaliana* (AtMKS1).** Die im Einbuchstabencode dargestellten Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalW2 (Higgins et al., 1996) aligned. Es zeigen sich einige konservierte Bereiche, zu denen auch das mittels einer Motivsuche identifizierte VQ-Motiv (gelb hinterlegt) gehört.

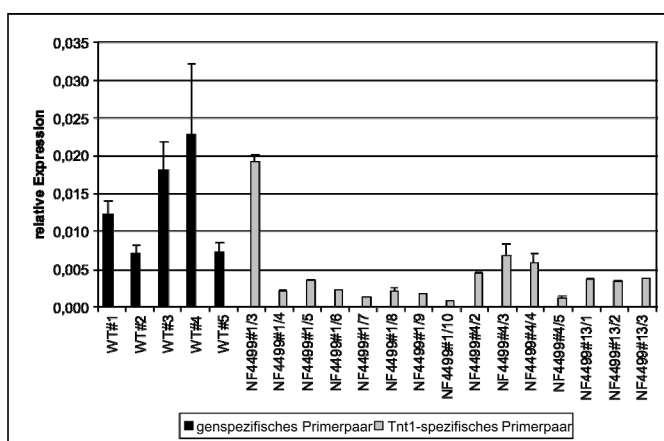
Das MtGEA-Expressionsprofil von MtMKS1 zeigte eine unspezifische Expression dieses Gens in Blättern, Wurzelknöllchen und Wurzeln von *M. truncatula* (Abbildung III.16). Die von allen untersuchten Geweben stärkste Expression ließ sich jedoch in mykorrhizierten Wurzeln beobachten (Abbildung III.16), was möglicherweise auf eine Rolle von MtMKS1 in dieser Symbiose hinweist.



**Abbildung III.16: Das Expressionsprofil von MtMKS1 aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von MtMKS1 in Blättern, Wurzeln und Wurzelknöllchen von *M. truncatula*. In mykorrhizierten Wurzeln lässt sich eine besonders starke MtMKS1-Expression beobachten.

### III.3.1.2.2 Identifikation und Verifikation homozygoter Tnt1-Insertionsmutanten für das Gen *MtMKS1*

Mittels einer BLAST-Suche der Tnt1-Datenbank (<http://bioinfo4.noble.org/blast/blast.html>) konnte für das Kandidatengen *MtMKS1* die Tnt1-Linie NF4499 identifiziert werden. Diese Linie besitzt insgesamt 16 Tnt1-Insertionsstellen, von denen sich die zehnte Insertion zwischen dem 513. und 514. Basenpaar *downstream* des Startcodons von *MtMKS1* befindet. Das Retrotransposon sitzt hier in 3'-5'-Orientierung mitten in der Kodierregion des Kandidatengens (Abbildung III.14). Durch die Tnt1-Insertion an dieser Stelle wird mit dem zehnten Nukleotid der Tnt1-Sequenz ein mit der Gensequenz von *MtMKS1* *in frame* liegendes frühzeitiges Stopcodon (TAA) erreicht. Dies führt aller Voraussicht nach zu einem frühzeitigen Transkriptionsstop des *MtMKS1* Transkripts und einem anschließenden NMD(*nonsense mediated mRNA decay*)-Abbau des verkürzten Transkripts. Selbst für den Fall, dass dieses dem NMD-Abbau entgehen sollte, ist die Funktionalität des entstehenden Genprodukts äußerst fraglich, da diesem durch die Tnt1-Insertion etwa ein Drittel der Sequenz fehlen würde. Daher ist bei einer homozygoten Tnt1-Insertion von einem vollständigen *knockout* von *MtMKS1* auszugehen. Durch eine Genotypisierung (siehe Abschnitt III.2.3) konnten insgesamt drei Pflanzen mit den Bezeichnungen NF4499#1, NF4499#4 und NF4499#13 mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in der Gensequenz von *MtMKS1* identifiziert werden (Tabelle III.4). Nachkommen dieser homozygoten Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen wie entsprechende *M. truncatula* R108 Wildtyp-Kontrollen angezogen und für 35 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Aus der Hälfte der Wurzel jeder Tnt1- und Wildtyp-Pflanze wurde die RNA extrahiert und für *real time* RT-PCR Messungen verwendet. Zunächst wurde dabei mittels genspezifischer und Tnt1-spezifischer Primerpaare die korrekte Insertion des Retrotransposons in *MtMKS1* verifiziert. Die genspezifischen Primer lagen unmittelbar *up-* und *downstream* der Tnt1-Insertion, während das Tnt1-spezifische Primerpaar mit je einem Primer auf dem Gen und auf dem Retrotransposon lagen. Dabei zeigte sich wie erwartet, dass das genspezifische Amplifikat ausschließlich in den Wildtyp-Pflanzen auftrat, während das Tnt1-spezifische Fragment nur in den Insertionsmutanten amplifiziert werden konnte (Abbildung III.17).



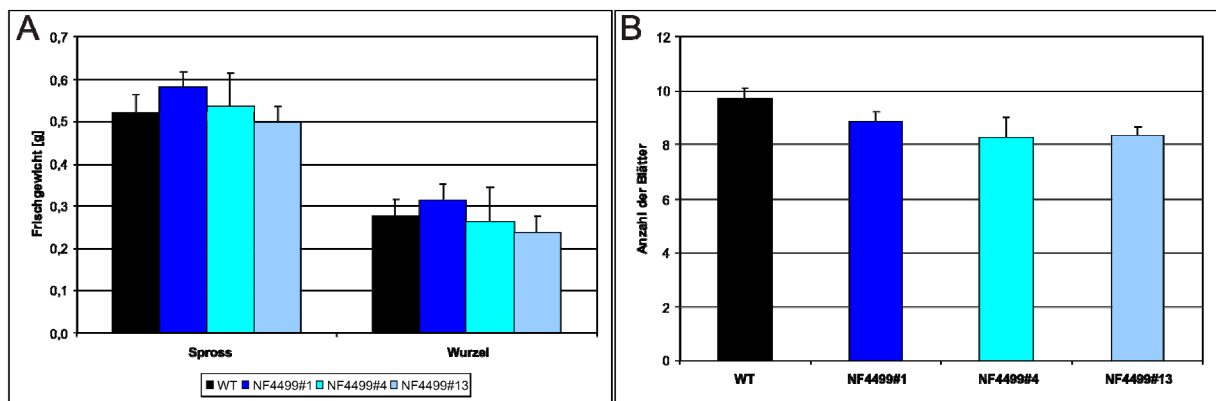
**Abbildung III.17:** Die relative Expression eines genspezifischen und eines Tnt1-spezifischen *MtMKS1*-Amplifikats in *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression eines genspezifischen (schwarze Balken) und eines Tnt1-spezifischen (graue Balken) *MtMKS1*-Amplifikats in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (WT#1-5) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF4499#1 (NF4499 #1/3-10), NF4499#4 (NF4499#4/2-5) und NF4499#13 (NF4499#13/1-3) nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je

zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Dies bestätigt, dass die Tnt1-Insertion in den Insertionsmutanten an der erwarteten Position sitzt, im Wildtyp jedoch nicht nachweisbar ist. Zudem tragen alle Mutanten diese Insertion homozygot, da sich aus ihrer RNA andernfalls das genspezifische und das Tnt1-spezifische Fragment amplifizieren lassen müssten. Somit konnte die homozygote Tnt1-Insertion in allen Tnt1-Insertionsmutanten von *MtMKS1* bestätigt werden.

### III.3.1.2.3 Tnt1-Insertionsmutanten von *MtMKS1* zeigen keine Auffälligkeiten im phänotypischen Erscheinungsbild oder Mykorrhizierungsgrad

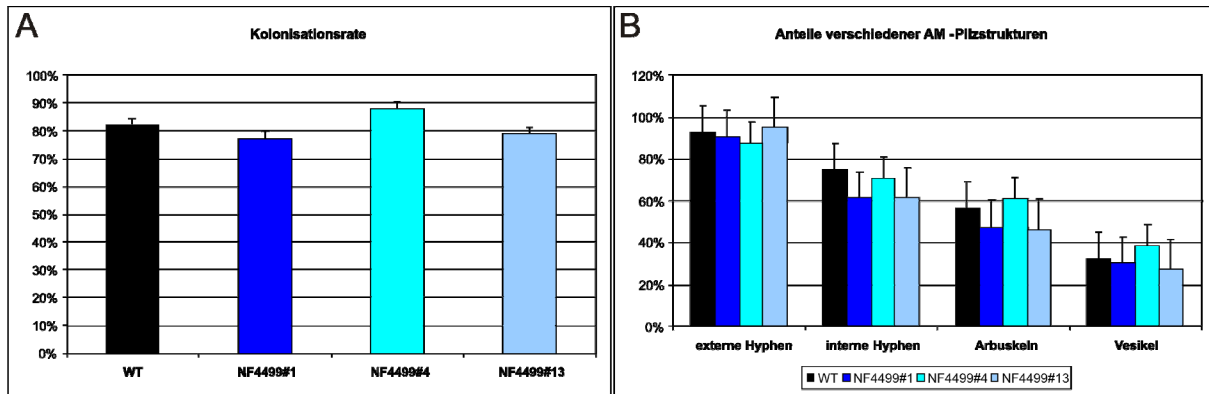
Im Anschluss an die Verifizierung der korrekten Tnt1-Insertion in den Insertionsmutanten wurden diese phänotypisch und bezüglich ihres Mykorrhizierungsgrades hin analysiert. Dabei dienten erneut die parallel angezogenen Wildtyp-Pflanzen als Kontrolle. Optisch war zunächst kein bemerkenswerter Unterschied zwischen den Insertionsmutanten und dem Wildtyp feststellbar und auch ein Vergleich des Frischgewichts des Sprosses und der Wurzeln sowie die Anzahl der Blätter jeder einzelnen Pflanze zeigten keinerlei signifikante Abweichungen (Abbildung III.18). Die durchschnittliche Pflanze hatte 8,8 Blätter, ein Sprossgewicht von ca. 0,5 g und ein etwas niedrigeres Wurzelgewicht von ca. 0,3 g.



**Abbildung III.18: Spross- und Wurzelgewicht sowie die Anzahl der Blätter von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.** Dargestellt ist das Frischgewicht von Spross und Wurzeln (A) sowie die Anzahl der Blätter (B) von *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und von Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF4499#1 (dunkelblaue Balken), NF4499#4 (mittelblaue Balken) und NF4499#13 (hellblaue Balken) nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus dreizehn Wildtyp-Pflanzen, acht NF4499#1-Nachkommen, vier NF4499#4-Nachkommen und drei NF4499#13-Nachkommen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Die jeweils verbliebene Hälfte der Wurzel jeder Insertionsmutante und Wildtyp-Kontrolle wurde mit WGA-Alexa Fluor® 488 angefärbt um die AM-Pilzstrukturen der mykorrhizierten Wurzeln sichtbar zu machen. Wie in Abschnitt II.2.5.4 beschrieben, wurde die Kolonisationsrate durch *G. intraradices* und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in den Wurzeln bestimmt. Dabei zeigten sich jedoch weder in der Kolonisationsrate noch in den Anteilen der Hyphen, Arbuskeln und Vesikel signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp-Kontrollen und den Tnt1-Insertionsmutanten (Abbildung III.19).

Folglich waren die Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499 im Vergleich zum Wildtyp in Bezug auf ihren Phänotypen und ihren Mykorrhizierungsgrad völlig unauffällig.

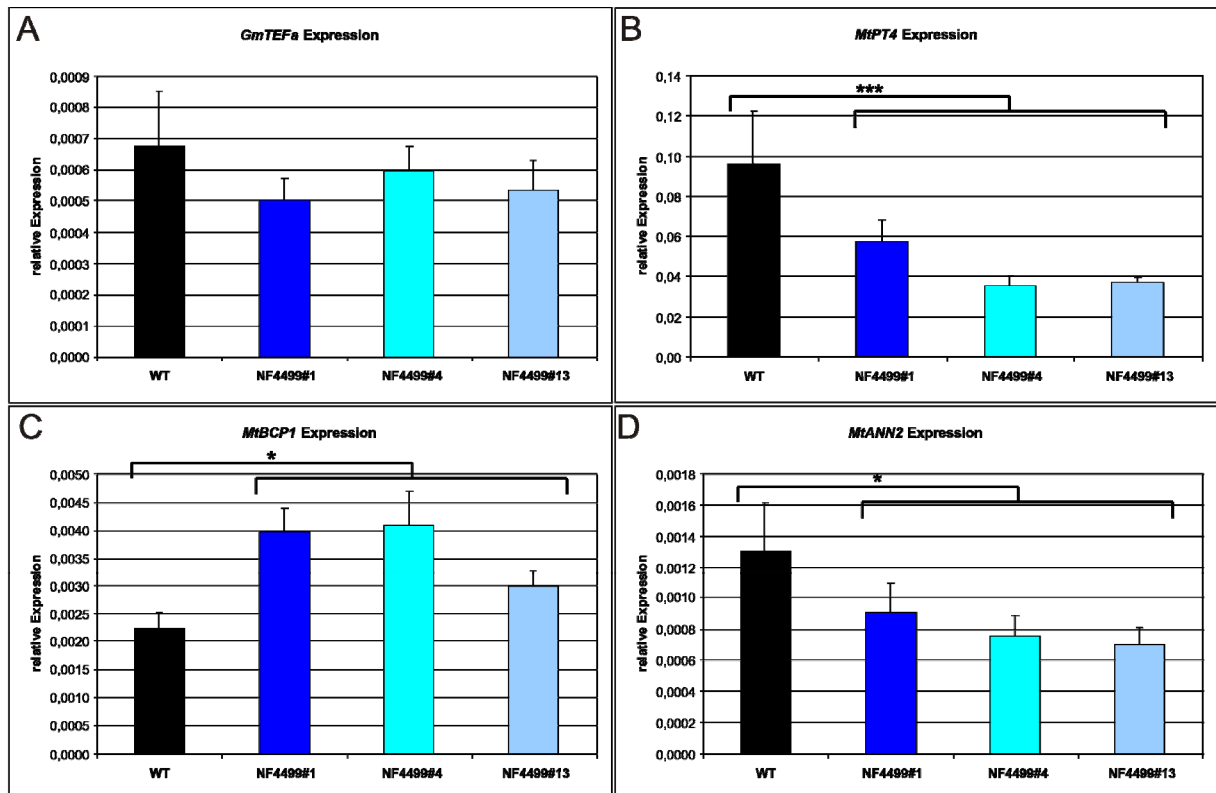


**Abbildung III.19:** Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499. Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF4499#1 (dunkelblaue Balken), NF4499#4 (mittelblaue Balken) und NF4499#13 (hellblaue Balken) nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zehn Wildtyp-Pflanzen, vier NF4499#1-Nachkommen, zwei NF4499#4-Nachkommen und einem NF4499#13-Nachkommen. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.1 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

#### III.3.1.2.4 In Tnt1-Insertionsmutanten von *MtMKS1* ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt

Als nächstes wurde die Expression der AM-Markergene *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* in den NF4499-Insertionsmutanten und Wildtyp-Kontrollen gemessen. Dabei zeigte sich, dass sich die relative Expression dieser Gene in den Nachkommen der drei homozygoten Pflanzen NF4499#1, NF4499#4 und NF4499#13 jeweils sehr einheitlich darstellte (Abbildung III.20). Im Vergleich aller Wildtypen mit allen Insertionsmutanten zeigte sich kein signifikanter Unterschied für die Expression von *GmTEF $\alpha$* , während *MtBCP1* in den Insertionsmutanten signifikant stärker und *MtPT4* und *MtANN2* signifikant schwächer als im Wildtyp exprimiert waren (Abbildung III.20), wobei die Expressionsunterschiede etwa 2 - 3-fach waren. Analog zu dem zuvor beschriebenen AM-Pilzgen *G $\alpha$ TUB* wird auch der Pilz-Translations-Elongationsfaktor *GmTEF $\alpha$*  (*Glomus mossae Tef $\alpha$* ) konstant exprimiert, wodurch er die Menge pilzlichen Gewebes in den Wurzeln widerspiegelt. Der geringe Expressionsunterschied von *GmTEF $\alpha$*  in Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten scheint darauf hinzudeuten, dass sich die Menge vorhandenen Pilzgewebes in Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten ähnlich ist, wie dies auch schon für die zuvor bestimmte Kolonisationsrate (Abbildung III.19 A) der Fall war. Neben dem zuvor bereits beschriebenen Arbuskel-spezifischen Gen *MtPT4*, wird das Annexin-Gen *MtANN2* (*Medicago truncatula Annexin 2*) in Arbuskel-haltigen Zellen stark induziert (Manthey et al., 2004). Die genaue Funktion des *MtANN2* Proteins in der AM-Symbiose wurde bislang nicht aufgeklärt. Auffällig ist die gemeinsame Reduktion der Expression beider Gene in den Insertionsmutanten (Abbildung

III.20), die für *MtANN2* signifikant (mit  $p = 0,077$ ) und für *MtPT4* sogar hochsignifikant (mit  $p = 0,001$ ) war. Unabhängig betrachtet lässt sich diese Reduktion als Hinweis auf eine verminderte Anzahl oder eine verminderte Funktionalität der Arbuskeln deuten. Zudem wurde jedoch für das AM-Markergen *MtBCP1* (*Medicago truncatula blue copper binding protein 1*; Hohnjec et al., 2005) eine signifikant ( $p = 0,098$ ) höhere relative Expression in den NF4499-Insertionsmutanten gemessen (Abbildung III.20). Für *MtBCP1* ist bekannt, dass es in der AM-Symbiose sowohl in Arbuskel-haltigen als auch in den benachbarten Zellen induziert wird (Hohnjec et al., 2005), die genaue Funktion des Genprodukts in der AM-Symbiose ist jedoch unbekannt. Eine sinnvolle Erklärung für dieses Expressionsmuster wäre eine Abnahme der arbuskelhaltigen Zellen (und der damit verbundenen Reduktion der Transkriptmengen von *MtPT4* und *MtANN2*) bei einer gleichzeitigen Zunahme der benachbarten Zellen (und der damit verbundenen Induktion der Transkriptmenge von *MtBCP1*), die sich in einem Stadium vor oder nach der Kolonisation durch Arbuskeln befinden. Obwohl ein solches Szenario prinzipiell denkbar wäre, spiegelt es sich allerdings nicht in einer Reduktion der zuvor bestimmten Arbuskelrate (Abbildung III.19) wider.



**Abbildung III.20:** Die relative Expression von *GmTEFα*, *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF4499. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A), *MtPT4* (B), *MtBCP1* (C) und *MtANN2* (D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutanten NF4499#1 (dunkelblaue Balken), NF4499#4 (mittelblaue Balken) und NF4499#13 (hellblaue Balken) nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus fünf Wildtyp-Pflanzen, acht NF4499#1-Nachkommen, vier NF4499#4-Nachkommen und drei NF4499#13-Nachkommen. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.3 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Insertionsmutanten des Kandidatengens *MtMKS1* sich weder phänotypisch noch in ihrer Mykorrhizierung signifikant von entsprechend behandelten Wildtyp-Pflanzen unterscheiden. Lediglich die Expression einiger AM-Markergene zeigt signifikante Unterschiede zum Wildtyp, die jedoch widersprüchlich erscheinen und zudem auch keinen konkreten Aufschluss darüber geben, ob und welche Rolle *MtMKS1* in der Signaltransduktion der AM spielt.

### III.3.1.3 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.12220*

#### III.3.1.3.1 Das Elicitor-induzierte Protein *Mtr.12220*

Das als Elicitor-induzierte annotierte Gen *Mtr.12220* wurde aufgrund seiner starken Induktion in sehr frühen Stadien der AM-Symbiose als Kandidatengens ausgewählt. So konnten eine 3,9-fache Induktion dieses Gens in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* beobachtet werden (Tabelle III.1). Zudem war eine 5,3-fache bzw. 7,2-fache Induktion nach einer 6-stündigen Inkubation mit Sporen bzw. Überständen gekeimter Sporen von *G. intraradices* nachweisbar (Tabelle III.1).

```

CTTACATTTCCATCAGCACATAACATTTCCACATTCCTTCTACTTCATACTTTGTTCTAT
CTCAATACATATCCCAAATGGCATCTTTAAGTTAAGTGCAATCTTTACTCTTTTTCTCA
CAATTCACTACTTCATTTAATCTCAGCTGCTAGAAAATTCAGTGAATCAGACCAACAAC
TTAAATTTCAATACCACAAAGGCCCTCTTCTCACCGAAAAATCTCAATCAACCTCATTT
GGTATGGAATAATCAAACCATCTCAACGAGCCATCATAACTGATTTCAACCTCCCTCT
CTTCTCCTAAACAAGGAACAACCACATCACAACCATCCGTTGCCACGTGGTGGAAATCAA
CCGAAAAATATTACCAACTCGCGAACAAATAAGAAATCAGTTAACCTAGCTCTCTACTAG
GTTCTCAAATTTCTCAATGAGAATTACTCATTAGGAAAAATCTCTCACAACCTAACCAATCC
TTAACTCGCATCAAAAGGACAACAACAAAACGCCATCAACGTTGTCCTAACAGCCGCTG
ATGTGTTAGTTGACGGTTTTTGTTCAGTAGGTGTGGAACACATGGTTCTTCTTATGGTG
CACTCGTAAATGGAAGAGAAACAAGTTCGCATACATTTGGGTTGGAAATCTGAAATC
AATGTGCTGGTCAATGCGCGTGGCCATTTACCAACCAATTTATGGTCCACAAAGTGCAC
CGTTGGTTGCACCAATAACGATGTGGTCTTGATGGAATGGTTATAAATGTTGCTAGTC
TTTTAGCTGGAACCGTAACCAATCTTTTGGTAATGGTTACTTTCAAGGACCAAAAGAAG
CTCCTTTGGAAGCTGCTTCGGCTTGACCCGGTGTATGCTAAAGGAGCTTATCCTGGTT
ATGCTGGGACCTTTTGGTGGATAAAACAAGTGGTGTAGCTACAATGCTAATGGTGATA
ATGGAAGGAAGTATTTGTTGCTGCTATTGTTGACCCCTAAAACCTCGGTTTGTCTACGT
TGGAATGCAAGAACTAAACAAAAGAATGTGAATGTGACGTCTCTTCGTGGTTCCACATGA
GATAAAATTTTCAAATGTGTTAATTAGTTTGTAGGCAATGAGATATCTTTTATTTGAT
TTGTTCAATTAATTTGTTATATAATAAAGTCAAACCTTATAGAAATATTGTCAAAAA
CCGTATTCGGG

MASFKLSAIFTLFLTISLLHLISAARKFTESDQQLKFOYHKGPLLTGKISINLIWYGKFK
PSQRAIITDFITSLSSPKQGTTSQPSVATWWKSTEKYYQLANNKKS VNLALSLSLGSQILN
ENYSLGKSLTTNQLKLSKQQQNAINVVLTAAADVLDVDFC SSRCGTHGSSYGALVNGK
RNKFAYIIVGNSETQCAGQCAWPFHQPIYGPQSAPLVAPNNDVGLDGMVINVASLLAGTV
TNPFNGYFQGPKEAPLEAASACTGVYAKGAYPGYAGDLLVDKTS GASYNANGDNGRKYL
LPAIVDPKTSVCS TLV

```

**Abbildung III.21: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Mtr.12220*.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von *Mtr.12220* im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte markieren die entsprechenden 5'- und 3'-UTR Bereiche. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich gelb markiert ist eine mittels Motivsuche identifizierte Domäne der Phi1-Superfamilie.

Diese Induktionen ließen sich nicht nur im Wildtyp, sondern im gleichen Maße auch in *dmj3*-Mutanten beobachten (Tabelle III.1). Anhand dieser Daten wäre eine Rolle des Elicitor-induzierten Proteins *downstream MtDMI3* sowohl in der Prä-Kontaktphase als auch in der frühen Kontaktphase der beiden Symbiosepartner denkbar.

Das *Mtr.12220* Gen weist Ähnlichkeiten zu dem in der Kartoffel identifizierten Pathogen-induzierten Gen *ERG-1* (Dellagi et al., 2000) sowie dem Phosphat-induzierten Gen *PHI-1* (Sano et al., 1999) aus Tabak auf. Bei beiden Genprodukten handelt es sich um ausschließlich in Pflanzen exprimierte Proteine (Dellagi et al., 2000).

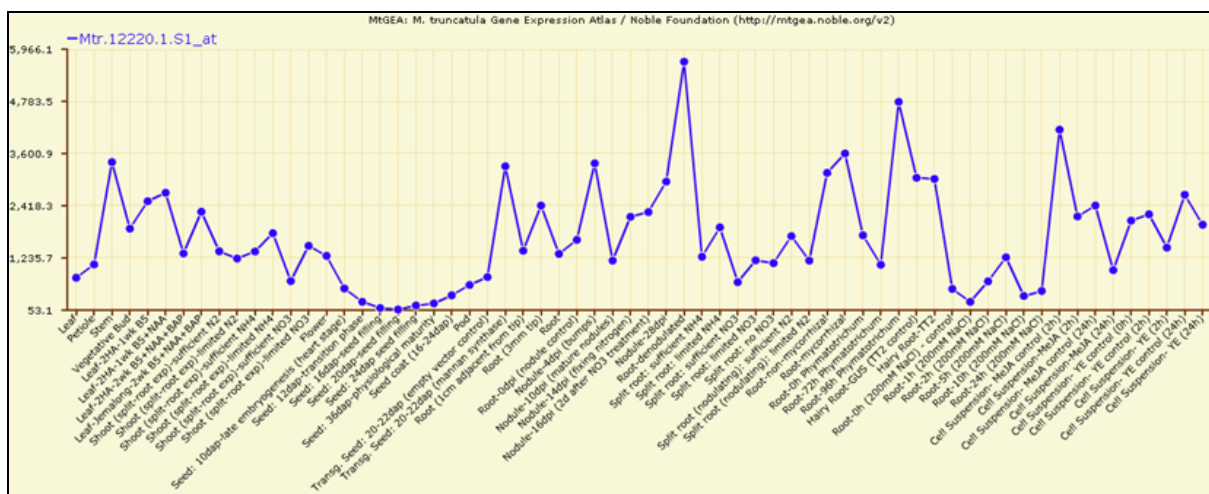
TC188991	MASFNKSAIFILFLTISLLQLSS-ARKLTESDQQL--KFQYHKGPLLTGKISVNLIWYGK
TC184547	MASFKLSVIFTLFLTISLLQLSS-ARKLTESDQQL--KFQFHKGPLLTGKISVNLIWYGK
TC183573	MASFKLSAIFTLFLTISLLHLSAARKFTESDQQL--KFQYHKGPLLTGKISINLIWYGK
TC184353	-----MTNNX-----KFQYHKGPLLTGKISINLIWYGK
TC187041	-----MTNNX-----KFQYHKGPLLTGKISINLVWYWGK
TC174952	-MASSFQSLLKFFLLISIFYLSSAARNLNELVQDQSQLLHYHNGPLLYGKISVNLIWYGN .: : : : : *
TC188991	FKPSQRAIITDFITSLSSEPIKPTTASQPSVATWWKSTEKYQLTNNKKSVDLALSLSGSQI
TC184547	FKPSQRAIITDFITSLSSEPIKPTTTQPSVATWWKSTEKYQLTNNKKSVDLALSLSGTQI
TC183573	FKPSQRAIITDFITSLSSEPKQGTTSQPSVATWWKSTEKYQLANNKKSVDLALSLSGSQI
TC184353	FNPTQRAIISDFIASISSP---TIKQPQSVAMWWKLTDKYYQLAN---SQNLVLTGSHV
TC187041	FNPSQRAIISDFITSISSP---TIKQPQSVATWWKLTDKYYHLAN---SQNLVLTGSHI
TC174952	FKPSQKAIITDFFTSLSSP-SSSKPNQPSVSAWWKTEKYHLTSKKKSTQLSLSLNKQI * : *
TC188991	LDEKYSLGKSLTNNQILNLASKGQQQNAINVVLTAAADVLDVDFGFCSSRCGTHGSSYGAR-V
TC184547	LDEKYSLGKSLTNNQILKLASKGQQQNAINVVLTAAADVLDVDFGFCSSRCGTHGSSYGAR-V
TC183573	LNENYSLGKSLTNNQILKLASKGQQQNAINVVLTAAADVLDVDFGFCSSRCGTHGSSYGAL-V
TC184353	LDENYSGKSLTNDQI IKLASKGQTNAINVVLTSAVVVDFGFCSSRCGTHGSS-----V
TC187041	LDENYSGKSLTNDQI IKLASKGQTNAINVVLTSAVVVDFGFCSSRCGTHGSS-----V
TC174952	LDENYSLGKSLTNKNI IQLASKGEHKDSINVVLTSSDVSVERFCMDRCGTHGSSSSLVPR * : *
TC188991	NGKRNKFAYIIVGNSETQCAGQCAWPFHQPIYGPQSAPLVAPNNDVGLDGMVINVASLLA
TC184547	NGKRNKFAYIIVGNSETQCAGQCAWPFHQPIYGPQSAPLVAPNNDVGLDGMVINVASLLA
TC183573	NGKRNKFAYIIVGNSETQCAGQCAWPFHQPIYGPQSAPLVAPNNDVGLDGMVINVASLLA
TC184353	N---HKFAYVWVGNSETQCPGQCAWPFHQPIYGPQSPPIVAPNNDVGLDGMVINVASWLA
TC187041	D---HKFAYVWVGNSETQCPGQCAWPFHQPIYGPQSPPIVAPNNDVGLDGMVINVASLLA
TC174952	KGKVAKFAYIIVGNSETQCPGLCAWPFHQPIYGPQSAPLVAPNNDVGLDGMVINLASLLA * : *
TC188991	GTVTNPFNGYFQGPKEAPLEAASACTGVYAKGAYPGYAGDLLLDKTSGASYNANGDNDR
TC184547	GTVTNPFNGYFQGPKEAPLEAASACTGVYAKGAYPGYAGDLLLDKTSGASYNANGDNDR
TC183573	GTVTNPFNGYFQGPKEAPLEAASACTGVYAKGAYPGYAGDLLLDKTSGASYNANGDNDR
TC184353	GALTNLFNGVLFQGPKEAPLEAASACTGVYKGGAYPGYAGNLLVDPTS GASYNANGINGR
TC187041	GVVTNPFNGYFQGPKEAPLEAASACTGFEFGKAYPGYAGNLLVDPTS GASYNANGVNGR
TC174952	GTATNPFNGYFQGPSEAPLEAASACPGYVYKGGAYPGYAGDLLVDSTTGASFNANGDNDR * . *
TC188991	KYLLPAIVDPK-----TSACSTLV-----
TC184547	KYLLPAIVDPK-----TSACFTLV-----
TC183573	KYLLPAIVDPK-----TSVCSTLV-----
TC184353	KYLLPALFDPX-----NLGLFYSSITKTWYSDVSHD-----
TC187041	KYLLPALFDPTTSVCSTQYKNKIELKSSSRCIKIIPRVPLPHCLLALFNIS
TC174952	KYLLPALYDPS-----TLSCSTLV----- * :

Abbildung III.22: Alignment der Aminosäuresequenzen von *Mtr.42888.1.S1\_s\_at* (TC188991), *Mtr.12226.1.S1\_at* (TC184547), *Mtr.12220.1.S1\_at* (TC183573), *Mtr.37494.1.S1\_at* (TC184353) *Mtr.37493.1.S1\_at* (TC187041) und *Mtr.12209.1.S1\_at* (TC174952) aus *Medicago truncatula*. Die im Einbuchstabencode dargestellten Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalW2 (Higgins et al., 1996) aligned.



*Mtr.12220* liegt auf dem fünften Chromosom von *M. truncatula*, die dem Kandidatengen entsprechende EST bzw. genomische Sequenz konnten als TC183573 bzw. Medtr5g064360 identifiziert werden. Die insgesamt 1.211 bp lange Gensequenz von *Mtr.12220* wird von einem 77 bp langen 5'-UTR Bereich und einem 183 bp langen 3'-UTR Bereich flankiert (Abbildung III.21). Der 951 bp lange Kodierbereich des Gens besteht aus einem zusammenhängenden Exon, das keine Introns aufweist (Abbildung III.21).

Die abgeleitete Proteinsequenz von *Mtr.12220* umfasst 317 Aminosäuren. Durch einen Abgleich dieser Sequenz mit der CDD-Datenbank (Marchler-Bauer et al., 2009) konnte von Position 37 - 316 eine Domäne der Phi1-Superfamilie identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um eine konservierte Region unbekannter Funktion in Pflanzenproteinen, die nach dem zuvor bereits erwähnten *PHI-1* Gen aus Tabak benannt wurde. In *M. truncatula* gehört *Mtr.12220* einer Genfamilie der Phi1-Superfamilie an, der neben diesem bislang fünf weitere Gene zugeordnet werden konnten: *Mtr.42888.1.S1\_s\_at* (TC188991), *Mtr.12226.1.S1\_at* (TC184547), *Mtr.12209.1.S1\_at* (TC174952), *Mtr.37494.1.S1\_at* (TC184353) und *Mtr.37493.1.S1\_at* (TC187041). Ein Alignment der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der sechs Gene zeigte, dass sich die einzelnen Sequenzen in jeweils etwa 40 Aminosäuren des äußersten N- bzw. C-terminalen Bereichs deutlich unterscheiden, ansonsten aber stark konserviert sind (Abbildung III.22).



**Abbildung III.23:** Das Expressionsprofil von *Mtr.12220* aus dem *Medicago truncatula gene expression atlas* (MtGEA). Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von *Mtr.12220* in fast allen untersuchten Geweben von *M. truncatula*.

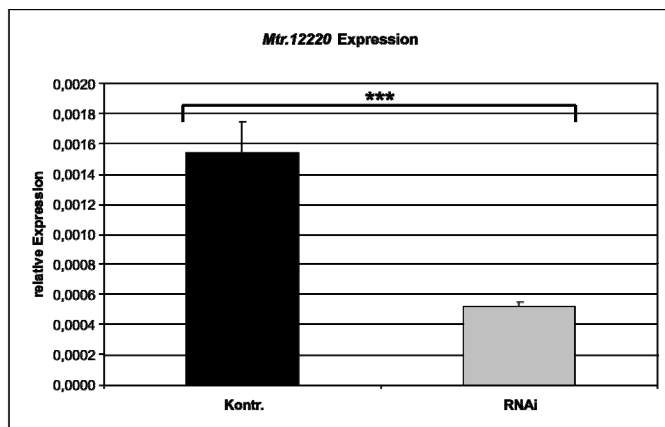
Dabei beschränkte sich diese Ähnlichkeit nicht nur auf Sequenzebene, sondern zeigte sich auch im Expressionsprofil dieser Genfamilie. Das in Abbildung III.23 exemplarisch für *Mtr.12220* dargestellte MtGEA-Expressionsprofil zeigt keine spezifische Expression, vielmehr scheint das Transkript des Kandidatengens mit variierender Stärke in fast allen untersuchten Geweben von *M. truncatula* exprimiert zu sein. Dieses Profil spiegelt sich sehr deutlich in den Expressionsprofilen der fünf anderen Gene dieser Genfamilie wider (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnte für *Mtr.42888.1.S1\_s\_at* und *Mtr.12226.1.S1\_at* eine mit *Mtr.12220* vergleichbare Induktion im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* und nach Inkubation mit Sporen bzw. Überständen gekeimter



Sporen von *G. intraradices* beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Übereinstimmungen lassen vermuten, dass die Gene dieser Genfamilie ähnliche Funktionen in *M. truncatula* erfüllen.

### III.3.1.3.2 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.12220* hat keine Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen

Um einen RNAi-vermittelten *knockdown* des Kandidatengens *Mtr.12220* zu bewirken, wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Schaepe, 2011) transgene *M. truncatula* Wurzeln mit dem gegen dieses Gen gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.12220* sowie dem bereits in Abschnitt III.3.1.1.3 beschriebenen Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:*GUS* erzeugt und für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Im Anschluss an eine RNA-Extraktion dieser Wurzeln wurde zunächst der angestrebte RNAi-Effekt mittels *real time* RT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich eine hochsignifikante Reduktion der Expression von *Mtr.12220* auf im Mittel 33,93 % (mit  $p = 0,001$ ) in den RNAi-Wurzeln (Abbildung III.24), womit ein durch das Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.12220* hervorgerufener RNAi-Effekt nachgewiesen werden konnte.

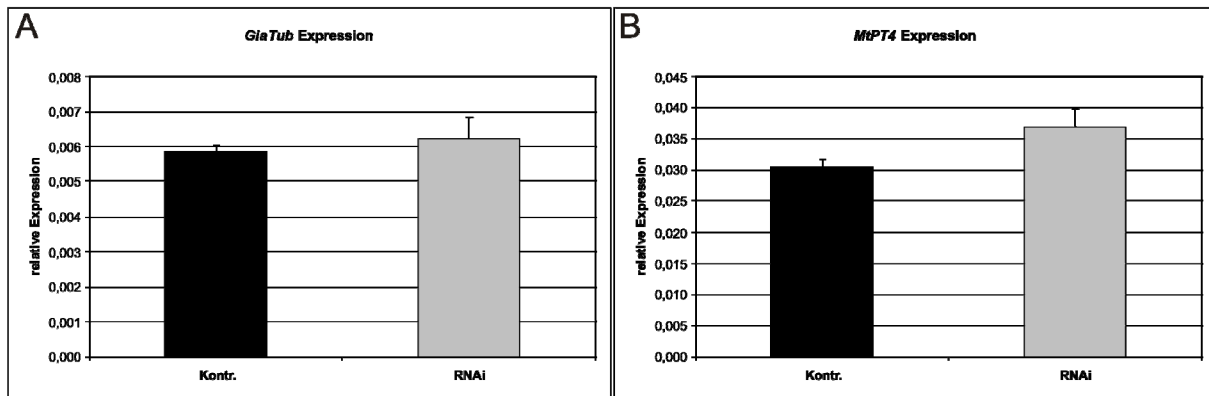


**Abbildung III.24:** Die relative Expression von *Mtr.12220* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.12220* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:*GUS* (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.12220* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.12220* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind

Abbildung C.4 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde anschließend die Expression von AM-Markergenen in RNAi- und Kontrollwurzeln mittels *real time* RT-PCR analysiert, um mögliche Auswirkungen der verminderten Expression des Elicitor-induzierten Proteins auf die AM-Symbiose zu untersuchen. Bei den hierfür gewählten Markergenen handelte es sich um die zuvor bereits beschriebenen Gene *GiaTUB* und *MtPT4*. Es zeigte sich jedoch, dass sich weder für das Pilzgen noch für den Phosphattransporter ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen RNAi- und Kontrollwurzel nachweisen ließ (Abbildung III.25). Dies lässt vermuten, dass sowohl die Kolonisationsrate durch *G. intraradices* als auch die Ausbildung funktioneller Arbuskeln nicht durch die reduzierte Transkriptmenge von *Mtr.12220* beeinträchtigt wird. Einerseits könnte dies bedeuten, dass das Elicitor-induzierte Protein keine essentielle Funktion in der AM-Symbiose spielt, andererseits ist aufgrund dieser Ergebnisse natürlich nicht auszuschließen, dass der *knockdown* der *Mtr.12220* Expression nicht stark genug war, um einen Effekt auszulösen oder ein anderes Protein der

Genfamilie seine Funktion übernimmt. Um dies weitergehend zu überprüfen, wurde eine Promotor-GUS Fusion dieses Gens analysiert.

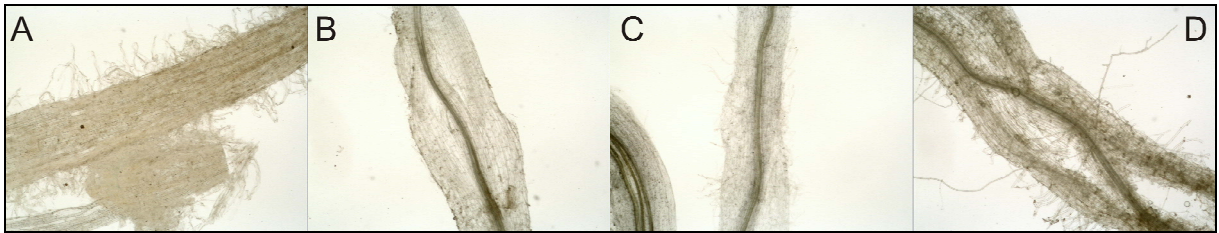


**Abbildung III.25:** Die relative Expression der AM-Markergene *Glatub* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Glatub* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.12220* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.12220* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.5 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

### III.3.1.3.3 Eine Mykorrhizierung mit *G. intraradices* induziert die Promotoraktivität von *Mtr.12220*

Um weitere Informationen bezüglich der Expression des Kandidatengens *Mtr.12220* zu erhalten wurde das Promotor-GUS Konstrukt pRR:p12220-GUS, wie in Abschnitt III.2.1.1 beschrieben, generiert. Die hierfür gewählte 1.486 bp lange Promotorsequenz p12220 beginnt unmittelbar *upstream* des Startcodons, umfasst also auch den in Abbildung III.21 dargestellten 5'-UTR Bereich des Gens.

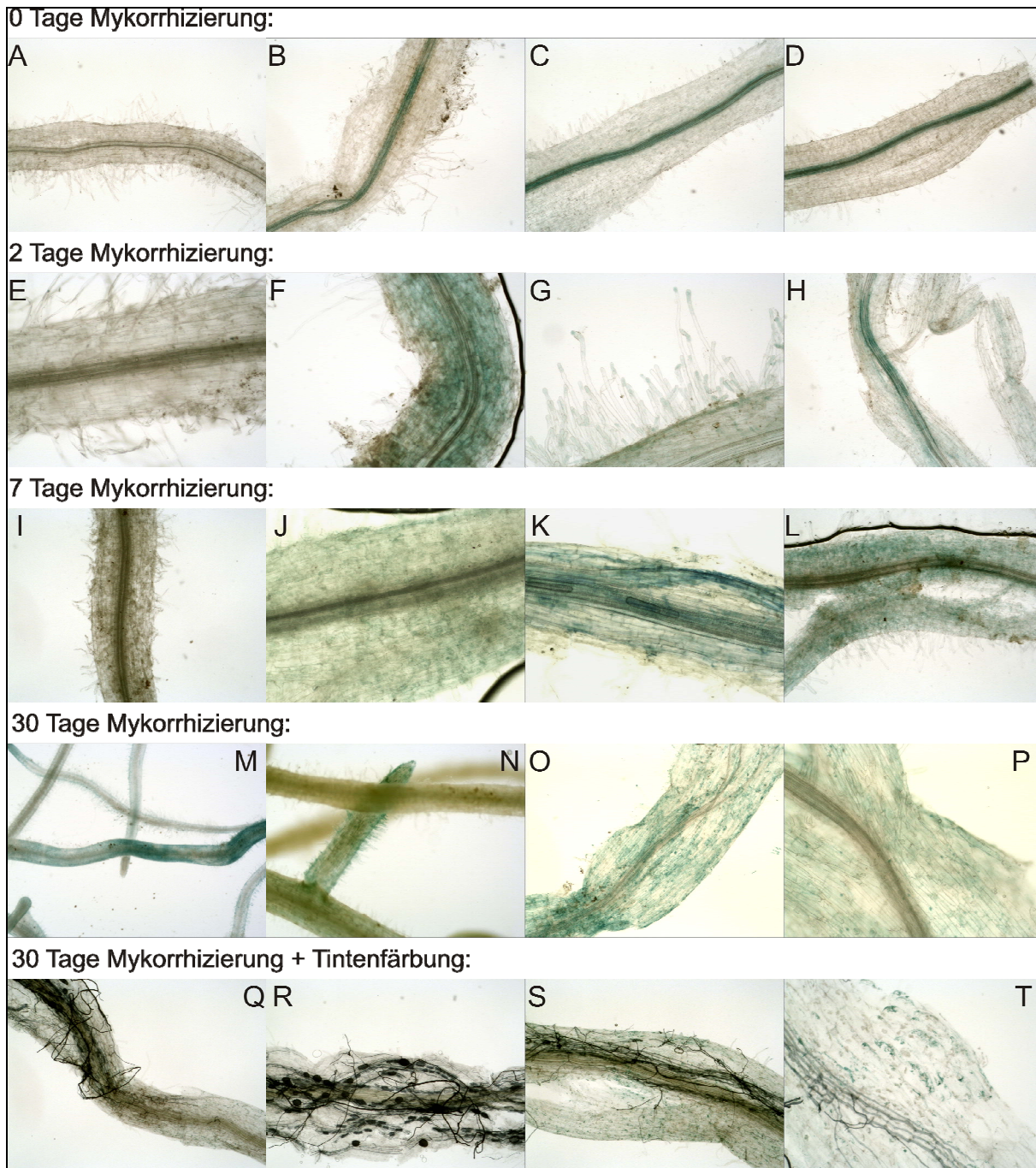
Um zunächst die Promotoraktivität von *Mtr.12220* in unterschiedlichen AM-Stadien zu analysieren, wurden in *M. truncatula* transgene Wurzeln mit diesem Promotor-GUS Konstrukt erzeugt, in einer Zeitreihe von 0, 2, 7 und 30 Tagen mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Bereits nach 1 - 2 Stunden ließen sich in den transgenen Wurzeln erste GUS-Aktivitäten erkennen, was für eine sehr frühe und starke Promoteraktivität von p12220 spricht. Als Kontrolle dienten jeweils entsprechend behandelte Wildtyp-Wurzeln, in denen zu keinem der vier Mykorrhizierungszeitpunkte eine GUS-Färbung erkennbar war (Abbildung III.26), was bedeutet, dass alle in den transgenen Wurzeln beobachteten Färbemuster auf die Aktivität von p12220 zurückzuführen sind. Des Weiteren dienten die Kontrollwurzeln auch zur Bestimmung des Kolonisationsgrades durch *G. intraradices* mittels der *gridline intersections* Methode (siehe Abschnitt II.2.5.4). Dabei zeigte sich eine durchschnittliche Kolonisationsrate von 70 % nach 30 Tagen, 5 % nach 7 Tagen und 0 % nach 2 und 0 Tagen Mykorrhizierung (Daten nicht gezeigt). Diese Werte sprechen für einen normalen Kolonisationsprozess.



**Abbildung III.26:** Als Kontrolle mit *Glomus intraradices* mykorrhizierte *Medicago truncatula* Wildtyp-Wurzeln nach einer GUS-Färbung. Die dargestellten *M. truncatula* Wildtyp-Wurzeln wurden für 0 (A), 2 (B), 7 (C) und 30 (D) Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dieses Kontrollexperiment (siehe Text) zeigt keinerlei GUS-Aktivität in den dargestellten Wurzeln, in (D) sind neben der Wurzel auch einige AM-Pilzhyphen zu erkennen.

Von den transgenen mit pRR:p12220-GUS induzierten Wurzeln wiesen die nicht-mykorrhizierten Wurzeln zu einem großen Teil gar keine GUS-Färbung auf (Abbildung III.27 A), in einigen Fällen war eine leichte bis mittelstarke GUS-Färbung erkennen, die sich jedoch ausschließlich auf das Leitgewebe der entsprechenden Wurzeln beschränkte (Abbildung III.27 B-D). Bereits nach einer zweitägigen Mykorrhizierung hatte sich die Promotoraktivität in den transgenen Wurzeln stark verändert. Nach wie vor waren viele Wurzeln völlig ungefärbt (Abbildung III.27 E), doch die Wurzeln in denen eine GUS-Aktivität zu erkennen war, zeigten eine Färbung in Epidermis, Kortex und in einigen Fällen auch in den Wurzelhaaren (Abbildung III.27 F und G). Die in den nicht-mykorrhizierten Wurzeln beobachtete Färbung des Leitgewebes war in nur sehr wenigen Fällen zu beobachten (Abbildung III.27 H). Nach sieben Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*, ließ sich in den transgenen Wurzeln eine ähnliche GUS-Aktivität wie nach zwei Tagen feststellen, nur dass dieses ausgeprägter und in deutlich mehr Wurzeln zu finden war. Nur wenige der transgenen Wurzeln zeigten gar keine Färbung (Abbildung III.27 I), in den meisten ließ sich ein diffuses Färbemuster im Wurzelkortex beobachten (Abbildung III.27 J - L). Im Gegensatz zum vorherigen Mykorrhizierungszeitpunkt waren nach sieben Tagen keinerlei Wurzeln mit GUS-Färbung im Leitgewebe mehr nachweisbar. Eine Tintenfärbung (siehe Abschnitt II.2.6.3.1) der GUS-gefärbten Wurzeln zeigte nur sehr wenige AM-Strukturen, diese überlappten nicht mit der beobachteten GUS-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Nach 30 Tagen Mykorrhizierung lag ein deutlich verbreiteteres, älteres und reiferes AM-Stadium vor. Völlig ungefärbte transgene Wurzeln waren auch zu diesem Zeitpunkt noch zu beobachten, bildeten aber die Ausnahme. Die bereits nach sieben Tagen Mykorrhizierung beobachtete diffuse GUS-Aktivität im Wurzelkortex war deutlich stärker und weiter verbreitet (Abbildung III.27 M, O und P). Eher selten zu beobachten, waren Färbungen von Wurzelhaaren und Epidermis (Abbildung III.27 M und N), während eine Färbung des Leitgewebes überhaupt nicht auftrat. Eine zusätzliche Tintenfärbung dieser Wurzeln zeigte keine Korrelation zwischen der Promotoraktivität und den AM-Pilzstrukturen (Abbildung III.27 Q - T). Reife AM-Pilzstrukturen überlappten nicht mit der Promotoraktivität (Abbildung III.27 Q und R), in ausschließlich mit Pilzhyphen besiedelten Wurzeln ließ sich dies zum Teil nachweisen (Abbildung III.27 S und T), korrelierte aber auch hier nicht auffällig mit dem Pilzgewebe.





**Abbildung III.27: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten transgenen *M. truncatula* Wurzeln wurden mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p12220-GUS generiert, für 0 (A-D), 2 (E-H), 7 (I-L) und 30 (M-T) Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dabei zeigen die nicht-mykorrhizierten Wurzeln (0 Tage Mykorrhizierung) keine Promotoraktivität (A) oder eine Promotoraktivität im Leitgewebe (B-D), während die mykorrhizierten Wurzeln eine diffuse Promotoraktivität variierende Stärke im Kortex (F, J, K, L, M, O und P) sowie in Epidermis und Wurzelhaaren (G, M und N) aufweisen. Wurzeln in Q-T wurden zusätzlich einer Tintenfärbung unterzogen und zeigen grau-schwarz angefärbte reife AM-Pilzstrukturen, die nicht mit einer GUS-Färbung überlappen (Q und R) bzw. mit Hyphen besiedelte Wurzeln, in denen eine Promotoraktivität nachweisbar ist, aber ebenfalls keine offensichtliche Korrelation zu der Pilzkolonisation zeigt (S und T).

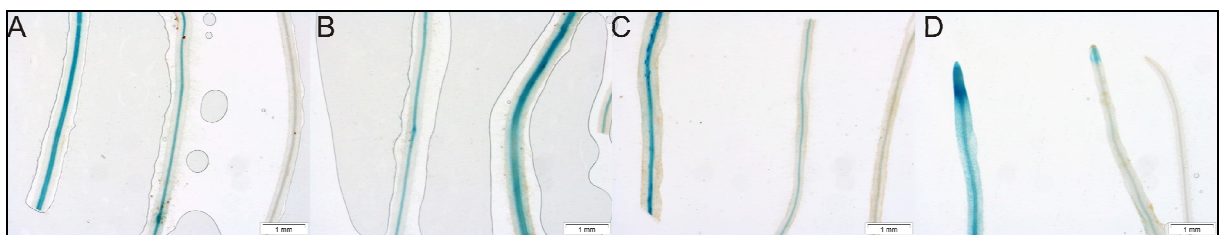
Insgesamt ließ sich feststellen, dass es sich bei p12220 um einen starken Promotor mit einer spezifischen Aktivität handelt. Das Expressionsmuster des Promotors in mykorrhizierten und

nicht-mykorrhizierten Wurzeln zeigte deutliche Unterschiede, die sich eigentlich nur durch die Interaktion mit dem AM-Pilz erklären lassen. Während sich die GUS-Aktivität in nicht-mykorrhizierten Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS ausschließlich auf das Leitgewebe beschränkt ist diese in entsprechenden mykorrhizierten Wurzeln dort nicht mehr nachweisbar und umfasst stattdessen Epidermis, Kortex und Wurzelhaare. Dieses mit der Mykorrhizierungsdauer zunehmende Färbemuster korreliert mit dem allgemeinen Kolonisationsgrad, überlappt aber kaum mit den nachweisbaren AM-Pilzstrukturen.

Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass der Promotor von *Mtr.12220* durch Mykorrhizierung mit *G. intraradices* induzierbar ist. Die Induktion scheint in sehr frühen Mykorrhizastadien zu erfolgen, da sie 1) bereits nach einer zweitägigen Mykorrhizierung nachweisbar ist und 2) auch nach längeren Mykorrhizierungszeiträumen keine Zuordnung reifer AM-Pilzstrukturen zur GUS-Aktivität möglich ist. Die Tatsache, dass die Promotoraktivität auch nach einer 30-tägigen Mykorrhizierung noch nachweisbar ist, ließe sich mit der ständigen Neu-Kolonisation der Wurzeln erklären. Um weiterhin herauszufinden ob diese Induktion einen direkten Kontakt mit *G. intraradices* erfordert oder gegebenenfalls bereits in der Prä-Kontaktphase der beiden Symbiosepartner auftritt, wurden mit pRR:p12220-GUS induzierte transgene Wurzeln in einem Myc-LCO *induction assay* getestet.

#### III.3.1.3.4 Myc-LCOs induzieren nicht die Promotoraktivität von *Mtr.12220*

Um herauszufinden, ob die Promotoraktivität von p12220 durch Myc-LCOs induzierbar ist, wurden zunächst erneut transgene Wurzeln mit pRR:p12220-GUS induziert und in Seramis® Substrat angezogen. Das Myc-LCO *induction assay* erfolgte wie in Abschnitt II.2.5.7 beschrieben mit  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs,  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs, einer Mischung aus beiden Myc-LCOs und einer entsprechenden Kontrolllösung ohne Myc-LCOs. Für die Inkubation wurden die transgenen Wurzeln abgeschnitten, für 24 Stunden vollständig in den zuvor beschriebenen Lösungen inkubiert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen.

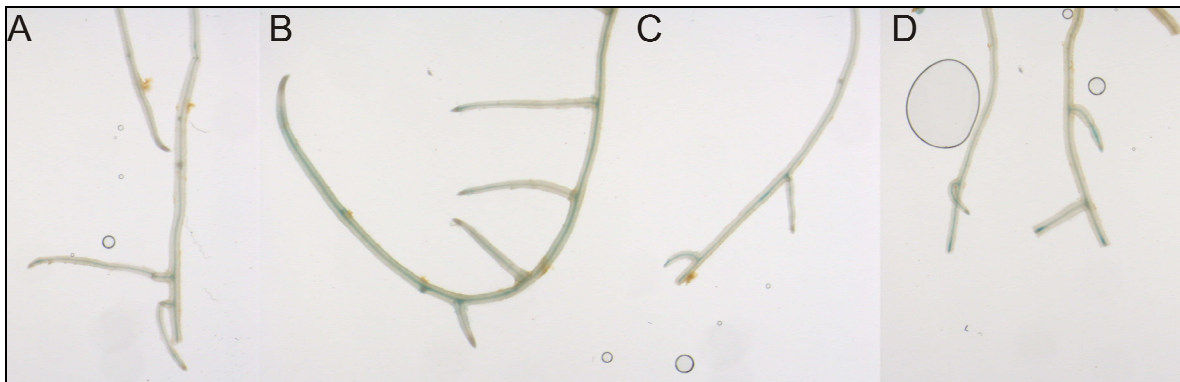


**Abbildung III.28: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit Myc-LCOs behandelten *Medicago truncatula* Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten transgenen *M. truncatula* Wurzeln wurden mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p12220-GUS generiert, für 24 Stunden in einer Kontrolllösung (A),  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (B),  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (C) und einer Mischung aus beiden Myc-LCOs (D) inkubiert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dabei zeigen die Wurzeln aller vier Behandlungen ein sehr ähnliches Färbemuster. Sofern vorhanden, ist die Promotoraktivität in variierender Stärke auf das Leitgewebe der Wurzeln beschränkt. Die Maßstabsskala entspricht 1 mm.



Dabei zeigte sich sowohl nach der Inkubation in der Kontrolllösung als auch nach den drei verschiedenen Myc-LCO Behandlungen eine sehr ähnliche Promotoraktivität. Ein Teil der transgenen Wurzeln war völlig ungefärbt und in den gefärbten Wurzelabschnitten war die GUS-Aktivität in variierender Intensität ausschließlich im Leitgewebe zu beobachten (Abbildung III.28). Die geringen Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit Myc-LCOs behandelten Wurzeln lassen vermuten, dass die Promotorregion von *Mtr.12220* offensichtlich nicht durch Myc-LCOs induzierbar ist. Die hier beobachtete GUS-Aktivität ist vergleichbar mit der Färbung nicht-mykorrhizierter Wurzeln im vorherigen Abschnitt (Abbildung III.27 A-D).

Um auszuschließen, dass die Ergebnisse durch den gewählten experimentellen Ansatz beeinflusst wurden, wurde das gleiche Experiment mit transgenen HRCs (siehe Abschnitt II.2.5.6) des Konstrukts pRR:p12220-GUS wiederholt. Diese völlig steril angezogenen Wurzelkulturen waren deutlich weniger Umwelteinflüssen ausgesetzt als die transgenen Wurzeln des zuvor beschriebenen semi-sterilen Ansatzes. Im Vergleich zum vorherigen Ansatz war die in den HRCs beobachtete GUS-Aktivität allgemein deutlich schwächer, wies jedoch auch hier keinen gravierenden Unterschiede zwischen der Kontrolle und den mit Myc-LCOs behandelten Wurzeln auf (Abbildung III.29).



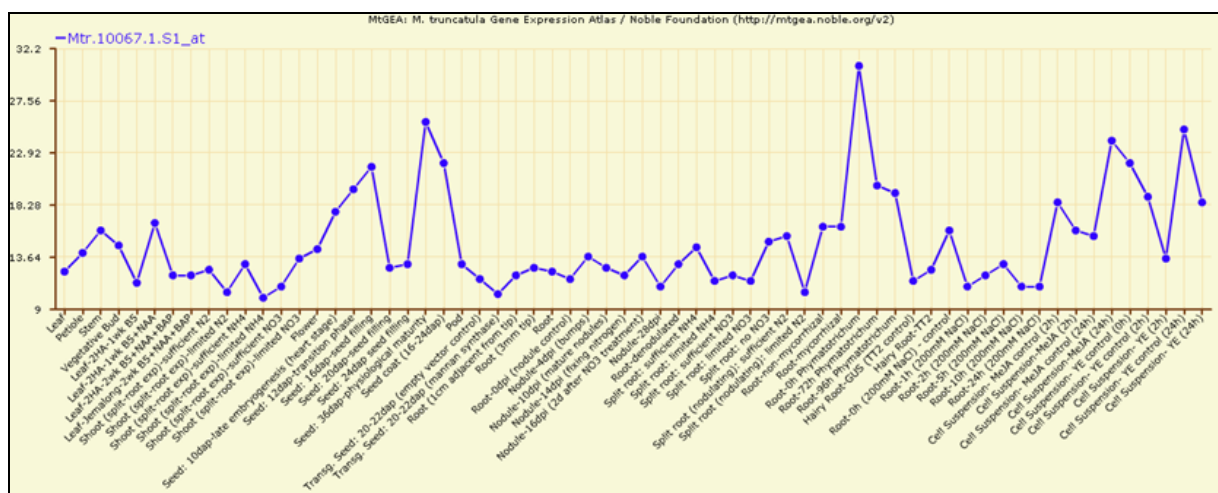
**Abbildung III.29: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten *Medicago truncatula* HRC (hairy root culture) unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten transgene *M. truncatula* HRC wurde mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p12220-GUS generiert, in vier Teilen für 24 Stunden in einer Kontrolllösung (A),  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (B),  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (C) und einer Mischung aus beiden Myc-LCOs (D) inkubiert und anschließend einer 4-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dabei zeigen die Wurzeln aller vier Behandlungen ein sehr ähnliches Färbemuster. Sofern vorhanden, ist die Promotoraktivität in variierender Stärke auf das Leitgewebe der Wurzeln beschränkt.

Im Anbetracht dieser Ergebnisse scheint die Promotoraktivität von *Mtr.12220* ausschließlich durch direkten AM-Pilzkontakt induzierbar zu sein. Im Rahmen der Auswahl von Kandidatengenem wurde zwar eine deutliche Induktion von *Mtr.12220* nach Behandlung mit Sporen bzw. Überständen gekeimter Sporen von *G. intraradices* beobachtet (Tabelle III.1), dies ließ sich hier anhand einer Behandlung mit aufgereinigten Myc-LCOs allerdings nicht zeigen.

### III.3.1.4 Funktionelle Analyse des Kandidatengens MtSK1

#### III.3.1.4.1 Die Serin/Threonin-Kinase MtSK1

Ursprünglich wurde das *Medicago truncatula* Stress Kinase 1 (MtSK1) Gen aufgrund seiner Induktion in frühen Stadien der somatischen Embryogenese von *M. truncatula* identifiziert (Nolan et al., 2006). Bei dem Genprodukt von MtSK1 handelt es sich um eine Serin/Threonin-Kinase, die den pflanzenspezifischen SnRK2-Kinasen, einer Untergruppe, die vermutlich eine Rolle in der Stressantwort von Pflanzen spielt, angehört (Nolan et al., 2006). MtSK1 ist in einer Vielzahl von Pflanzengewebe exprimiert (Nolan et al., 2006), was sich auch deutlich im MtGEA-Expressionsprofil des Gens widerspiegelt (Abbildung III.30).



**Abbildung III.30: Das Expressionsprofil von MtSK1 aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine schwache und unspezifische Expression von MtSK1 in allen untersuchten Geweben von *M. truncatula*.

Das 3.132 bp lange MtSK1 Gen liegt am Anfang des zweiten Chromosoms von *M. truncatula*. Neben einem 124 bp langen 5'-UTR und einem 203 bp langen 3'-UTR Bereich weist es insgesamt acht Introns auf, die alle mit den Intron-spezifischen Nukleotiden GT bzw. AG starten bzw. enden (Abbildung III.31). Die 1.382 bp lange mRNA Sequenz von MtSK1 ist unter der *Gen-Bank accession number* AY772417 verfügbar, außerdem konnte in der EST-Datenbank von *M. truncatula* (DFCI *Medicago Gene Index*) das MtSK1 entsprechende EST-Cluster TC172882 identifiziert werden. In der 351 Aminosäuren langen abgeleitete Proteinsequenz von MtSK1 wurden über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist et al., 2010) eine N-terminale Proteinkinase-Domäne (Position 4 - 260) und ein C-terminales coiled-coil Motiv (Position 316 - 349) identifiziert (Abbildung III.31).

Die Auswahl dieses Gens als Kandidatengen erfolgte im Rahmen der in Czaja et al. (2012) beschriebenen Behandlung von *M. truncatula* Pflanzen mit Myc- und Nod-LCOs. Im Rahmen einer globalen auf *Medicago* GeneChip Hybridisierungen basierenden Datenanalyse erwies sich MtSK1 als durch Myc-LCOs induzierbar, was in Kombination mit seiner Annotation als Serin/Threonin-Kinase auf eine mögliche Rolle des MtSK1 Genprodukts in der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose

hinweist. Mit Hilfe einer Promotor-GUS Fusion dieses Gens wurden Stärke und Ort der Promotoraktivität von MtSK1 analysiert.

```

ATAACCACCGCTTCAATGAATCTTTCTTTCTGTTTTCCAAATAATAAAATAATTAATCATTC
GTTTCATTATTATTATTATTCTCAGAGATCGATCCGGCGTTGAAATAGCTAGCACTGAAA
GGTGCATCGAGAAATACGAGGTGGTTAAGGATATAGGATCTGGAAATTTTGGTGTGCTAG
ACTCATGCGCCACAAGATACCAACAACCTTGTGGCCATGAAATACATCGAACGAGGTCA
CAAGGTTTTTTACTTACTCCTCTCACTTTCACTTTCAATTTTATTATTATTATTATTTT
AATCCAAATATCTTACATGTGCTTTATCATTATTATTATTATTATTATTATTATTATGTATT
CACGTGTTTTTGTCTTTTTGGAAATATTTGTTCTTGTGTTTTTTAATTCCAGATTGA
TGAGAATGTTGCAAGGAAATAATAAACCACAGAAGTCTTCGCCATCCTAATATTATTTCG
CTTCAAGGAGGTCTCTTATTATTATTACATTACCTTATGTTTTTAATTTGCGGTGGGT
TTGTCAGAATCACCCTGTCAATCCAAACGAACACTAGTTTTTTTTTAATATCATGTTTCA
GTTTTGCAGGTGGTTTTGACTCCTACACATCTTGGTATAGTTATGGAGTATGCTGCTGGT
GGAGAGCTCTTTGACCGAATTTGCTCTGCTGGAAGATTGAGTGAAGACGAGGTTTCATTTC
CTCTCATTTTACATAATTACCATTCCCTTCTAACTTCTTCACTTCTTTTTCATTTTCACCA
TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTATAGGCAAATGTTGTATATTAGTATTTTCTTTTTTCGC
CACATTTTGAACCCCCCGATCATTTAACCCTTAGCTCAAACCAGATGAGCGACTCAACC
CCCCATTTCTCCTACTTGTCAAAGGCTCAAACCTGCATATAACCTTTAAATTTATGCATTC
TTACTAACTCAACAGTTCTGAAAGATTGCTTGTATTTATTGACGAGCTCGATATTTCTTCCA
GCAGCTCATCTCAGGAGTTAGCTACTGTCATTCCATGTAATCTATTAAAAAATATTATC
TCAAATGCTGATGATTTCTTATTTTGCCTCTATGTTGGGGTTATATTTCTAAGTATTTT
CCTTCTTTTGCAGCAAATCTGCCATCGAGACTTGAAGCTCGAGAACACCTTATTGGATGG
CAGCCTGCCCCACGCTCAAAATTTGCGATTTTGGTATTCTAAGTTTAGTTATGGAC
TGATTTCAAATGCCAAATGCTTTGAGTAAATTTGAAGTCATACTTTACAAGTTTTATT
TCTGACAACATCTGTTTTTCTAGTCTTCTCTGCTTCACTCTAGGCCTAAGTCTACAGTG
GGAACCCAGCCTACATAGCACCGAGGTTCTTTTCAGTAGAGAATATGACGGAAGGTA
AATAATTCAGTTTCTTTCATGGAATAAGATTAACATGTGTTGGGATGGTTCAACACAGA
TACTTTTGTGTGTCGGAGGAAACTCAGAAATGGATGTAGCAATTTTATGGGTACGAGA
CCATGAAACAGCATGATTGTGCTTAAAGTTTTGCTAGTATTTAAAGAATGAGCATTATA
TTTGACGGCTTGATGTGTCCACATTTAACTGACATAAGAATATGGACAAAATAGCCATTA
CGAATTTGTGTAGCTGGAATGTAATTTGTGACAGTTCATGTAGCTTGTGTTGAATCATTG
TAATTTCAAAGCTCTAAACACTTGAGCCACATAAAGGAATTGATAAAATTTTTCTTT
ATCTCCAAATTTTTTATAAATGTCCAGAGGAAACATTTGAAGTATTTTCGTCCTTGAAGGA
CTAGTCTTACCTTGAGTTTTCCGTGTTTTTATGTTAATGATCATTTTCTTGGTCTTCT
ATTTTGTCTGCGGTGTTGATGTTCTCATCTTAGTCTTCTATTTCTGTTTGTCTGTA
AAGTTAGCGATGTTCTCATCTTCTTAGTCTATTTCTGTTTCTGTGGTGTAAATAATGTT
TGATTTTCCGTAGTTCTTATTCTGTTTTTGCCTCTTTCAGTTGGCAGATGTATGGTC
TTGTTGAGTGACTCTTATGTAATGCTGGTGGGAGCATACCCATTTGAGGACCAAGATGA
TCCCAAAAATTTTCAAGAAAACCATCAATGTAATTTTCTTGACATCATCTTAATTCACAG
TTTTGTA AACATATATAAATTTCTGACCCTTGTATTTCTTATACAGAGAATTATGGCTGTT
AATACAAGATTCAGATTACGTTACATATCTCAAGAAATGTAGACATCTGCTGTCTCGCA
TTTTTGTGGCAAGTCCAGCTAGGGTATGCACAATAGTTAACAGCACTTCAGAGTTATTGT
TTTTATCTAATAATTTATTCAAAGGAAACTAGTAAAGAAATTTGAGGCGCACGCATGTTA
GGTGCATGATGTCACCTTGAAGTGGCTCACAAGTGTATATAGATAGTTATAGTTATATAG
CTATGTAGTTATTTTCTGCTGTTAAGTTTCATTAAGGACAAGCTCATCTGTGGTCTA
CTAAAATGCCATTGTATGTTTTGATTTACTGACAGAGAATCACCATTAAGGAAATCAAGTC
CCATCCATGTTTTTAAAGAACTTGCCTAGAGAATTAACGAAATGGCTCAAGCTGTTTA
CTACAGAAAAGAAAATCCAATTTATCTCTACAGAGCATTGAAGACATATGAAGATTGT
TGAGGAAGCTAAAAACCCACCTCAGGCATCTAGGTCAGTTGGAGGATTTGGCTGGGGAG
AGAAGAAGATGACGACGAAATAAACGAAGCAGAGGCCGAGCTGGAAGAAGATGAGTATGA
AAAGAGAGTCAAGGAGGCCAGGAAAGCGGAGAAATCCATGTCAACTAAACAAGGGAA
CGTTTATGTTTAGATAGAGCTGCTATAGATTGTTGGTTTCTTCGCTCTCTGGTTAAGTT
CAAAC TAGGCAAGTGTGTATGTTCTCATGTATAAAATTAAGTTTTCTGCATAGGAAAT
AATAGTTAATAATGGCTGTAATTTTTAAAAATACTGTACAAGTTTGTAACTGAGCAT
ATTATAAGATAT

MEKYEYVVKDIGSGNFGVARLMRHKDKQLVAMKYIERGHKIDENVAREIINHRSLRHPNI
IRFKYEVVLTPTHLGIVMEYAAGGELFDRI CSAGRFSEDEARYFFQQLISGVSYCHSMQIC
HRDLKLENTLLDGS PAPRLKICDFGYSKSSLLHSRPKSTVGT PAYIAPEVLSRREYDGL
ADVWSCGVTLYVMLVGAYPFEDQDDPKNFRKTINRIMAVQYKIPDYVHISQECRHLLSRI
FVASFARRITIKEIKSHPWFLKNLPRELTEMAQAVYRKENPTYSLQSIEDIMKIVBEAK
NPPQASRSVGGFGWGGEDDDEINEAEAELEDEYEKRVKEAQESGEIHN
    
```



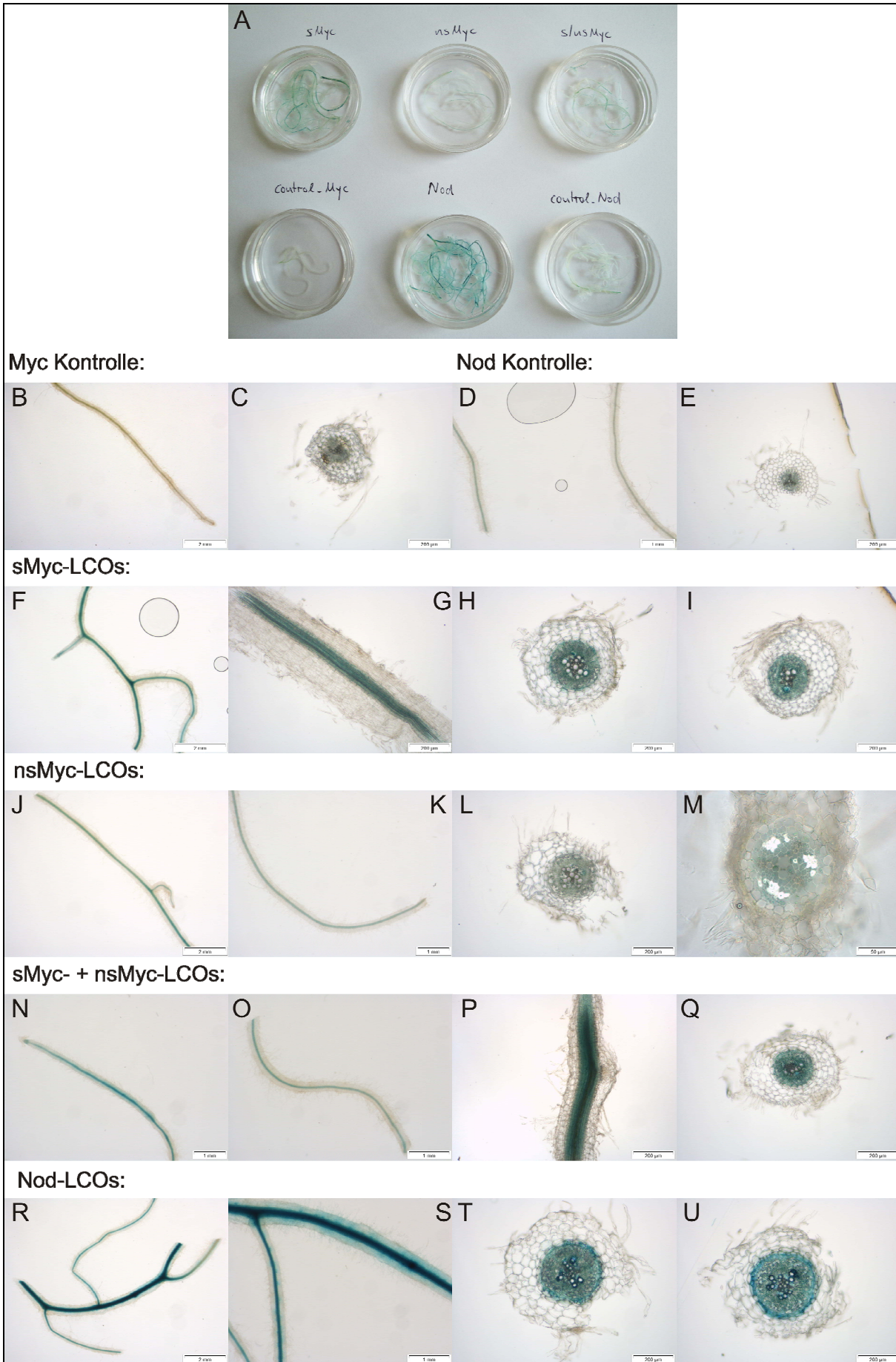
**Abbildung III.31: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von MtSK1.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von MtSK1 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 5'-UTR und 3'-UTR Bereich. Grau hinterlegte Bereiche kennzeichnen Introns. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt. In gelb markiert ist eine mittels Motivsuche identifizierte Proteinkinase-Domäne mit ATP-Bindestelle (ein unterstrichener Glycin-reicher Abschnitt in der Nähe eines fett gedruckten Lysins) und einer pink markierten und funktionell wichtigen Asparaginsäure (siehe Beschreibung in Abschnitt III.3.1.1.1) sowie ein in grün hinterlegtes Glutaminsäure-reiches *coiled-coil* Motiv.

### III.3.1.4.2 Myc- und Nod-LCOs induzieren die Promotoraktivität von MtSK1

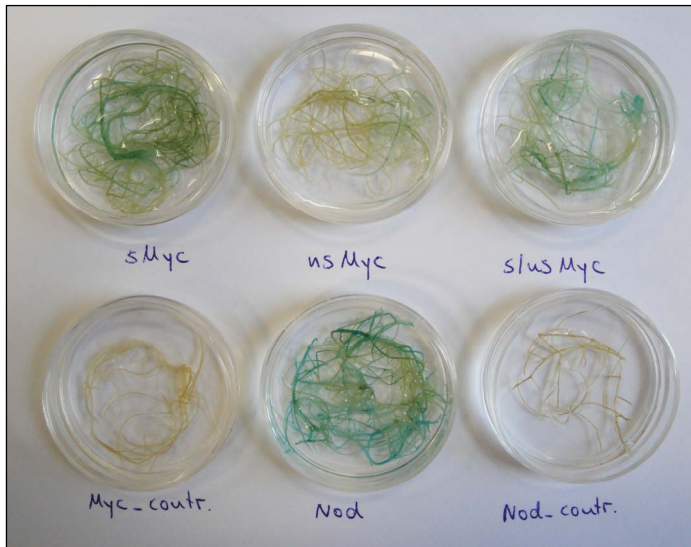
Wie in Abschnitt III.2.1.3 detailliert beschrieben, wurde zur Analyse der Promotoraktivität von MtSK1 das Promotor-GUS Konstrukt pRR:p10067-GUS erstellt. Mit Hilfe dieses Konstrukts wurden transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert, steril auf Platten angezogen und in einem 24-stündigen *induction assay* (siehe Abschnitt II.2.5.7) auf ihre Aktivität bezüglich einer Inkubation mit Myc- und Nod-LCOs getestet. Anschließend erfolgte eine 24-stündige GUS-Färbung, die eine deutliche Promotoraktivität im Leitgewebe der behandelten, transgenen Wurzeln offenbarte. Dabei wiesen die mit  $10^{-8}$  M Nod-LCOs behandelten Wurzeln die stärkste Promotoraktivität auf, gefolgt von den Behandlungen mit  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs, einer Mischung aus beiden Myc-LCOs und schließlich  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs, in denen die GUS-Färbung nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung III.32). Die Kontrollen zeigten großteils gar keine Promotoraktivität, in wenigen Fällen war ein leichte Färbung des Leitgewebes zu beobachten, die jedoch deutlich schwächer als in den mit Myc- und Nod-LCOs behandelten Wurzeln ausfiel (Abbildung III.32). Für eine bessere Lokalisation der Promotoraktivität wurden einige Wurzeln jeder Behandlung in 5 % (w/v) Agarose eingebettet und 60  $\mu$ M Vibratom-Dünnschnitte angefertigt. Anhand von Wurzelquerschnitten ließ sich dabei beobachten, dass die Promotoraktivität eindeutig auf das Leitgewebes beschränkt war (Abbildung III.32). Konkret schien sich die GUS-Färbung im Leitgewebe auf Phloem und Perizykel zu konzentrieren, während sie in Xylem und Endodermis nicht nachweisbar war (Abbildung III.32).

Eine Wiederholung des *induction assays* mit HRCs unter der Kontrolle von pRR:p10067-GUS konnte die zuvor getroffenen Beobachtungen bestätigen. Auch hier zeigte eine Behandlung mit Nod-LCOs und sMyc-LCOs die stärkste Promotoraktivität in den jeweiligen Wurzeln, während diese in mit beiden Myc-LCOs oder ausschließlich mit nsMyc-LCOs behandelten Wurzeln deutlich schwächer ausfiel (Abbildung III.33). Des Weiteren zeigt dieses Ergebnis, dass für die Induktion der Promotorregion von MtSK1 durch Myc- und Nod-LCOs eine Wurzelkultur ausreichend ist, und auch ohne den Pflanzenspross funktioniert.

Als Ergebnis der Promotoranalysen lässt sich festhalten, dass die Promotoraktivität von MtSK1 durch eine Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs im Leitgewebe von *M. truncatula* Wurzeln induzierbar ist. Dies unterstützt die Vermutung einer möglichen Rolle von MtSK1 in der Prä-Kontaktphase, allerdings nicht nur in der AM, sondern möglicherweise auch in der Knöllchensymbiose.



**Abbildung III.32: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit Nod- und Myc-LCOs behandelten *Medicago truncatula* Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p10067-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten transgenen *M. truncatula* Wurzeln wurden mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p10067-GUS generiert, für 24 Stunden in einer Myc-Kontrolllösung (B und C), Nod-Kontrolllösung (D und E),  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (F - I), in  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (J - M), einer Mischung aus beiden Myc-LCOs (N - Q) oder  $10^{-8}$  M Nod-LCOs (R - U) inkubiert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Bildausschnitt A zeigt eine Übersicht der beobachteten Promotoraktivität. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zeigen die behandelten Wurzeln eine deutliche Induktion der Promotoraktivität, die in mit Nod-LCOs behandelten Wurzeln am stärksten und in abnehmender Intensität aber auch in mit sMyc-LCOs, sMyc- und nsMyc-LCOs und zuletzt nsMyc-LCOs behandelten Wurzeln zu beobachten ist. Die Bildausschnitte B, D, F, J, K, N, O, R und S zeigen vollständige Wurzelausschnitte, während es sich bei G und P um  $60\mu\text{M}$  Längsschnitte und bei C, E, H, I, L, M, Q, T und U um  $60\mu\text{M}$  Querschnitte handelt. Die beobachtete Promotoraktivität beschränkt sich in den Myc- und Nod-LCO-behandelten Wurzeln auf Phloem und Perizykel des Leitgewebes.



**Abbildung III.33: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten *Medicago truncatula* HRC (hairy root culture) unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellte transgene *M. truncatula* HRC wurde mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p12220-GUS generiert, in sechs gleich großen Teilen für 24 Stunden in Myc-Kontrolllösung (unten links), Nod-Kontrolllösung (unten rechts),  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (oben links),  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (oben mitte), einer Mischung aus beiden Myc-LCOs (oben rechts) oder  $10^{-8}$  M Nod-LCOs (unten mitte) inkubiert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Die stärkste Promotoraktivität weisen die mit Nod-LCOs behandelten Wurzeln auf, gefolgt von den Behandlungen mit sMyc-LCOs, sMyc- und nsMyc-LCOs und nsMyc-LCOs. Die Kontrollen zeigen keinerlei Promotoraktivität.

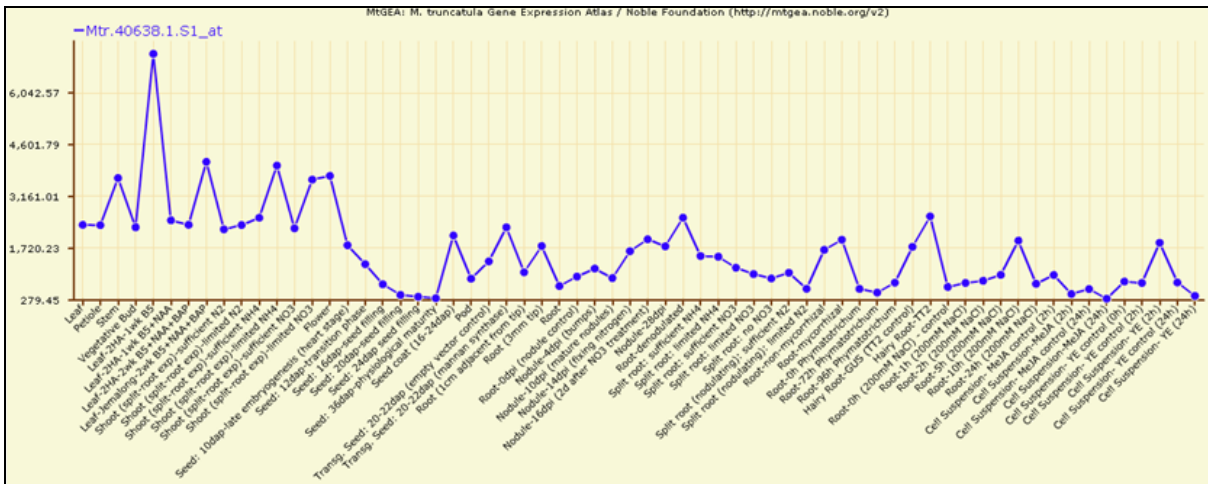
### III.3.2 Funktionelle Analyse von Komponenten aus der $\text{Ca}^{2+}$ -/CaM-Signaltransduktion

#### III.3.2.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.40638*

##### III.3.2.1.1 Das $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein *Mtr.40638*

Das als potentiell  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein annotierte Kandidatengens *Mtr.40638* wurde aufgrund seiner Induktion in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* für funktionelle Analysen ausgewählt. Die in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago* GeneChip Daten zeigten in diesem Stadium eine 2,05-fache Induktion im Wildtyp sowie eine 1,93-fach Induktion in einer *dmj3*-Mutante (Tabelle III.1), die auf eine mögliche Rolle dieses Gens in der AM-Signaltransduktion *upstream* MtDMI3 vermuten lässt. Eine Induktion dieses Gens in späteren Mykorrhizastadien konnte anhand der *Medicago* GeneChip Daten nicht nachgewiesen werden. Das MtGEA-Expressionsprofil von *Mtr.40638* zeigte eine unspezifische Expression des Kandidatengens in allen untersuchten Geweben von *M. truncatula* (Abbildung III.34).





**Abbildung III.34:** Das Expressionsprofil von *Mtr.40638* aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA). Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von *Mtr.40638* in allen untersuchten Geweben von *M. truncatula*.

Eine genomische Sequenz von *Mtr.40638* war in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms, welches etwa 94 % aller *M. truncatula* Gene abdeckt (Young et al., 2011), nicht verfügbar. Daher können keinerlei Aussagen bezüglich der Promotorregion oder Exon-Intron-Struktur des Gens getroffen werden. Die 1.005 bp lange EST-Sequenz (TC186238) von *Mtr.40638* umfasst einen mit 414 bp ungewöhnlich langen 5'-UTR Bereich sowie einen 113 bp langen 3'-UTR Bereich (Abbildung III.35).

```

AAAATAAAATTTGTAAGATTAATAAAATAAATATCTGTGCATACCAACTTTTAACTTAAC
CACAAAACTTATGATTGACGAACAAACAATAACAGCACAAACATAACATGCAATGAATCA
TGAATCTCGTGTGTTCCAACTTCCAACATAATTCAAACACGCTTCCTGTTTTCTTGT
GGTGTTTATCATAGTATCTACTTTCCTTCACTCCCAAACATAACATTTCACTTCACTTC
ACTCAAAAACCGGTTTTGTAATTAATTCACCTCAATATTTCTCTTTTTTCTTCAACTTT
TTACCTAAAAAACGCGTTTTCCGTGACCAAATCACGTTTTCTATAAATCACACATACAATA
CCAAACAACTGAACTCAAATCAGAAAGACATAAACTCTTCTATTTCTCAGGCCATGGA
CCAAGAAGAAGTTCGCAAGATCTTTAACAATAATCGACAAAAACGGCGACGGGAAGATCTC
ACGCACGGAGCTGAAGGAAATGATGACGGCGCTCGGATCTAAAACAAACGACGGAGGAAG
TTACTCGTATGATGGAGGAGCTTGATCGGAACGGGACGGTTACATTGATCTAAAGGAAT
TCCGGGAGTTACACAACGGCGGTGGTGATACTAAGGAGCTTAGAGAGCGTTTGAGATGT
ATGATTTGGATAAGAATGGGTGATTTCCGGCGAAAGAGCTTACCGCGGTGATGCGGCGGT
TGGGGGAGAAATGTTGCGCTTGGTGATTGCCGAAAATGATCGGAAACGTTGATGCTGATG
CTGATGGGAATGTGAATTTGAAGAGTTAAGAAGATGATGAGTCGCTCCTAAGATGTAA
TGGTGATTGGCTAAAATGTATTTACCTATACTTTTTTACTCAACCCTCTTAAATTTTAA
TCTTATCTTAATTTATATAGTGAATAGTTAATCTTATCCACAATAGTCCATAATCCATGA
ATGATTCGAATTTAAACTAACGTTTGATTGTGCATTTTGTAAAT

MDQEEVRKIFNKFDKNGDGKISRTELLKEMMTALGSKTTTTEEVTRMMEELDRNGDGYIDLK
EFGELHNGGGDTKFLREAFEMYDLDKNGLISAKELHAVMRRLGEKCSLGDCCRKMIGNVDA
DADGNVNFEEFKMMSRS
    
```

**Abbildung III.35:** Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Mtr.40638*. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von *Mtr.40638* im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 5'-UTR und 3'-UTR Bereich. Das erste grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF8500, das zweite die Tnt1-Insertionsstelle in der Insertionslinie NF8710. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt. Zur besseren Visualisierung alternierende unterstrichen und fett gedruckt sind vier mittels Motivsuche identifizierte EF-Hand Motive deren Ca<sup>2+</sup>-bindende Loop-Strukturen jeweils gelb hervorgehoben sind (siehe Beschreibung im Text).

In der 138 Aminosäuren langen, abgeleiteten Proteinsequenz des *Mtr.40638* Gens konnten über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist *et al.*, 2010) insgesamt vier EF-Hand Motive identifiziert werden. Jeweils zwei dieser Motive grenzen von Position 1-36 und 37-65 sowie von Position 70-105 und 106-138 direkt aneinander und umfassen somit fast die gesamte Aminosäuresequenz von *Mtr.40638* (Abbildung III.35). Beim EF-Hand Motiv handelt es sich um eine Ca<sup>2+</sup>-bindende Variante des *Helix-Loop-Helix* Motivs, in dem die eigentliche Ca<sup>2+</sup>-Bindung über den in der Regel zwölf Aminosäuren lange und konservierten *Loop*-Bereich des Motivs erfolgt (Grabarek, 2006).

### III.3.2.1.2 Identifikation und Verifikation homozygoter Tnt1-Insertionsmutanten für das Gen *Mtr.40638*

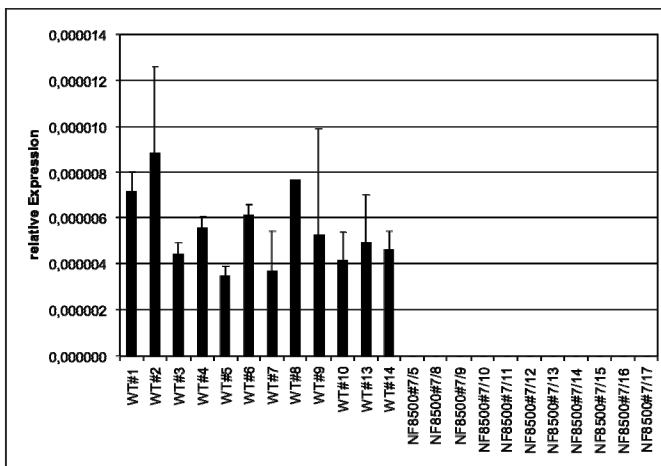
Mittels einer BLAST-Suche der Tnt1-Datenbank (<http://bioinfo4.noble.org/blast/blast.html>) konnte für das Kandidatengen *Mtr.40638* zunächst keine geeignete Tnt1-Linie gefunden werden. Ein als externe Auftragsarbeit der *Noble Foundation* (Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) durchgeführter PCR-basierter *reverse screening* Ansatz identifizierte jedoch die beiden unabhängigen Tnt1-Linien NF8500 und NF8710. In der Linie NF8500 liegt eine Tnt1-Insertion 274 bp *upstream* des Startcodons im 5'-UTR Bereich von *Mtr.40638* und in der Linie NF8710 111 bp *downstream* des Startcodons im Kodierbereich des Kandidatengens (Abbildung III.35). In beiden Linien sitzt das Retrotransposon in 3'-5'-Orientierung in der Sequenz von *Mtr.40638*. Angaben bezüglich weiterer Tnt1-Insertionen und ihrer Lage in diesen beiden Linien waren bis dato nicht in der Tnt1-Datenbank (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>) verfügbar, so dass diesbezüglich keine weiteren Aussagen getroffen werden können. Für NF8710 führt die Tnt1-Insertion an der angegebenen Stelle im Leseraster der Gensequenz von *Mtr.40638* zu einem frühzeitigen Stopcodon (TAA) an Position 80 der inserierten Tnt1-Sequenz. Dies wiederum führt voraussichtlich zu einem verfrühten Transkriptionsstop und einem anschließenden NMD-Abbau des verkürzten Transkripts, was bei einer homozygoten Tnt1-Insertion in einem vollständigen *knockout* von *Mtr.40638* resultieren müsste. Selbst für den Fall, dass das entstehende Transkript dem NMD-Abbau entgeht ist mit einer stark eingeschränkten Funktionalität des Genprodukts zu rechnen, da dieses nur ein anstelle von vier EF-Hand Motiven besitzen würde. Für die Linie NF8500 sind aufgrund der Tnt1-Insertion im 5'-UTR Bereich von *Mtr.40638* die Folgen bezüglich eines *knockout* des Kandidatengens nicht absehbar, ein NMD-Abbau des entstehenden Transkripts ist jedoch auch hier wahrscheinlich.

Wie Tabelle III.4 zu entnehmen ist, konnten für beide Insertionslinien eine hohe Anzahl von Pflanzen mit homozygoten Tnt1-Insertionen in dem Kandidatengen *Mtr.40638* identifiziert werden. Für die Linie NF8710 waren es fünf homozygote Pflanzen, von denen sich jedoch zwei als steril erwiesen, so dass sämtliche an dieser Linie durchgeführten Analysen auf den Nachkommen der verbliebenen drei homozygoten Pflanzen NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 basierten. Für die Linie NF8500 wurden insgesamt 10 Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in der Gensequenz von *Mtr.40638* identifiziert. Von diesen zehn Pflanzen waren zwei völlig steril und sieben weitere produzierten nur 1 - 3 Samenkapseln pro Pflanze. Einzig die homozygote Pflanze

NF8500#7 zeigte eine mit dem Wildtyp vergleichbare Fertilität, weshalb alle nachfolgenden Analysen der Linie NF8500 ausschließlich auf den Nachkommen dieser Pflanze basierten.

Für die funktionelle Analyse von *Mtr.40638* wurden die Nachkommen der homozygoten Pflanzen NF8710#2, NF8710#3, NF8710#10 und NF8500#7 für vier Wochen unter gleichen Bedingungen wie entsprechende *M. truncatula* R108 Wildtyp-Kontrollen angezogen und anschließend jeweils zur Hälfte für 14 und 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Wurzeln jeder Pflanze zwecks unterschiedlicher Analyseverfahren halbiert und eingefroren. Aus einer Hälfte jeder Wurzel wurde die RNA extrahiert und für *real time* RT-PCR Messungen verwendet. Dabei wurde zunächst mittels genspezifischer und Tnt1-spezifischer Primerpaare die korrekte Insertion des Retrotransposons in *Mtr.40638* für die Linien NF8500 und NF8710 bestätigt. Wie zuvor bereits beschrieben, lagen die genspezifischen Primer unmittelbar *up-* und *downstream* der Tnt1-Insertion, während die Tnt1-spezifischen Primerpaare mit je einem Primer auf dem Gen und auf dem Retrotransposon lagen.

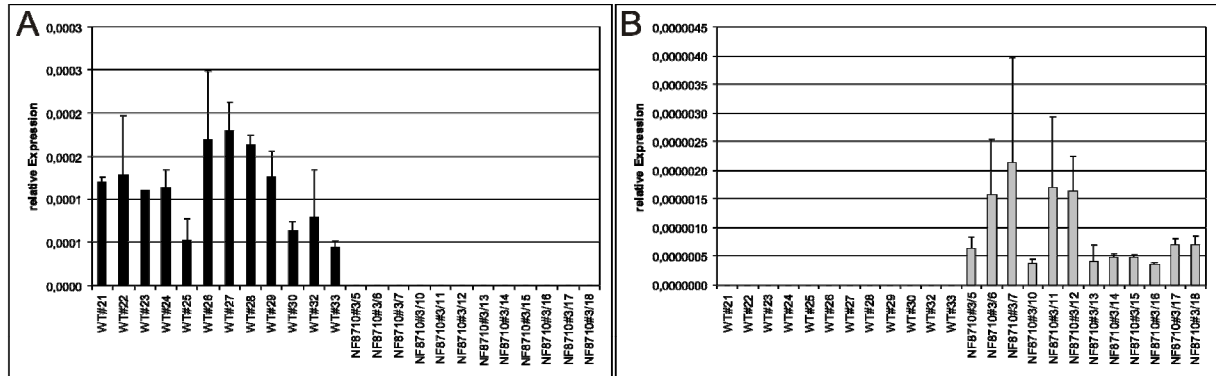
Für die Nachkommen von NF8500#7, erfolgten die *real time* RT-PCR Messungen ausschließlich mit einem genspezifischen Primerpaar, da kein ausreichend spezifisches Tnt1-spezifisches Primerpaar identifiziert werden konnte. Dabei zeigte sich in den für 14 Tagen mykorrhizierten Pflanzen wie erwartet, dass das genspezifische Amplifikat ausschließlich in den Wildtyp-Pflanzen und nicht in den Insertionsmutanten auftrat (Abbildung III.36). Dies konnte auch in den für 28 Tage mykorrhizierten Pflanzen gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Tnt1-Insertion in den Insertionslinie NF8500 an der erwarteten Position sitzt.



**Abbildung III.36:** Die relative Expression eines genspezifischen *Mtr.40638*-Amplifikats in *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8500. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression eines genspezifischen *Mtr.40638*-Amplifikats in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (WT#1-14) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF8500#7 (NF8500#7/5-17) nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Für die Tnt1-Insertionslinie NF8710 erfolgten sämtliche *real time* RT-PCR Messungen stellvertretend für die drei identifizierten homozygoten Pflanzen NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 ausschließlich anhand der Nachkommen von NF8710#3. Für diese konnten *real time* RT-PCR Messungen sowohl mit genspezifischen als auch mit Tnt1-spezifischen Primern durchgeführt werden. Auch hier zeigte sich in den für 14 Tagen mykorrhizierten Pflanzen wie erwartet, das genspezifische Amplifikat ausschließlich in den Wildtyp-Pflanzen und das Tnt1-spezifische Amplifikat ausschließlich in den Insertionsmutanten (Abbildung III.37). Dieses Ergebnis ließ sich auch in den für 28 Tage mykorrhizierten Pflanzen bestätigen (Daten nicht gezeigt). Diese

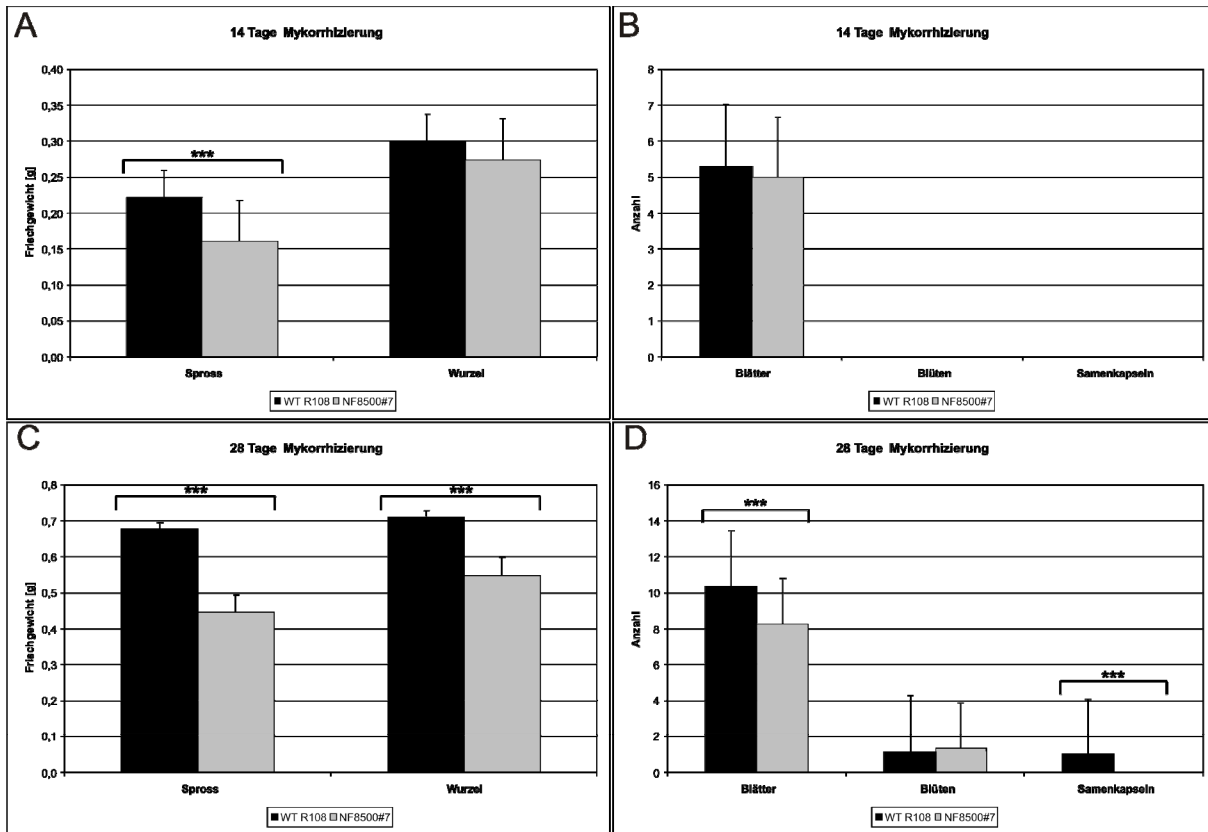
Messungen zeigen, dass die Tnt1-Insertion auch in der Insertionslinie NF8710 an der erwarteten Position sitzt. Zudem tragen alle NF8710-Mutanten diese Insertion homozygot, da sich aus ihrer RNA andernfalls das genspezifische und das Tnt1-spezifische Fragment amplifizieren lassen müssten.



**Abbildung III.37:** Die relative Expression eines genspezifischen und eines Tnt1-spezifischen *Mtr.40638*-Amplifikats in *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8710. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression eines genspezifischen (A) und eines Tnt1-spezifischen (B) *Mtr.40638*-Amplifikats in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (WT#21-33) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF8710#3 (NF8710#3/5-18) nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

### III.3.2.1.3 Tnt1-Insertionsmutanten von *Mtr.40638* weisen ein retardiertes Wachstum auf

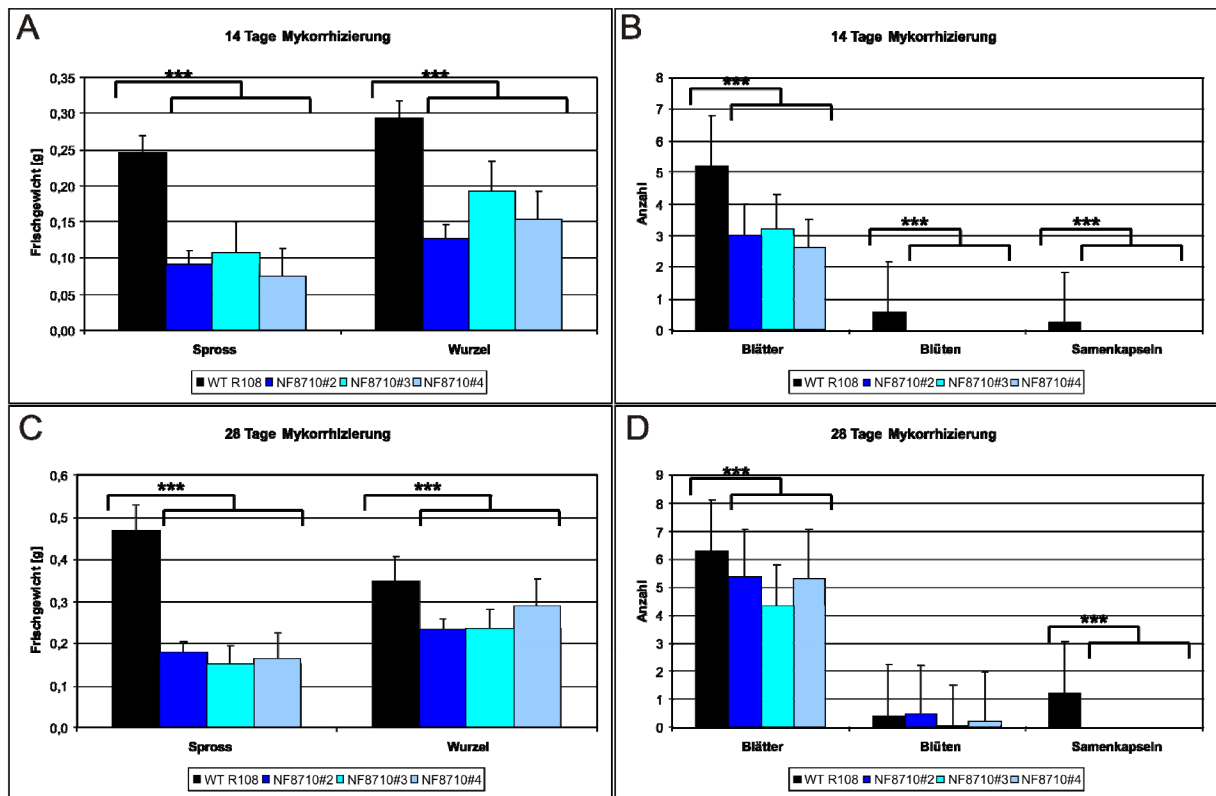
Zum Zeitpunkt der Wurzelernte wurden alle Insertionsmutanten und Wildtyp-Pflanzen im Alter von 6 (14 Tage Mykorrhizierung) und 8 (28 Tage Mykorrhizierung) Wochen phänotypisch charakterisiert. Diese Charakterisierung zeigte, dass die Nachkommen der homozygoten Tnt1-Insertionsmutante NF8500#7 im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant reduzierte Biomasse aufwiesen, die sich mit dem Alter und Mykorrhizierungszeitraum der Pflanzen verstärkte. Nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung war für diese Insertionsmutanten ein hochsignifikant niedrigeres Frischgewicht des Sprosses zu beobachten (Abbildung III.38 A), während sich jedoch die durchschnittliche Anzahl der Blätter und das Wurzelgewicht nicht signifikant von den Wildtyp-Pflanzen unterschied (Abbildung III.38 A und B). Blüten und Samenkapseln ließen sich in diesem Stadium weder für die Insertionsmutanten noch für die Wildtyp-Pflanzen beobachten (Abbildung III.38 B). Nach einer insgesamt 28-tägigen Mykorrhizierung hatte sich die reduzierte Biomasse in den NF8500#7-Nachkommen drastisch verstärkt: das Frischgewicht des Sprosses und der Wurzeln waren jeweils hochsignifikant auf im Mittel 65,76 % und 77,02 % reduziert (Abbildung III.38 C). Während entsprechende Wildtyp-Pflanzen durchschnittlich 10,33 Blätter und eine Samenkapsel besaßen, waren diese Werte in den Insertionsmutanten mit einer durchschnittlichen Reduktion um 2,5 Blätter und keiner einzigen Samenkapsel ebenfalls hochsignifikant geringer (Abbildung III.38 D). Lediglich die Anzahl der Blüten wies keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Pflanzen und Insertionsmutanten auf (Abbildung III.38 D).



**Abbildung III.38: Phänotypische Charakterisierung von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8500.** Dargestellt ist das Frischgewicht von Spross und Wurzeln (A und C) sowie die Anzahl der Blätter, Blüten und Samenkapseln (B und D) von *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und von Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF8500#7 (graue Balken) nach 14 (A und B) und 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vierzehn Wildtyp-Pflanzen und dreizehn NF8500#7-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung sowie zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF8500#7-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

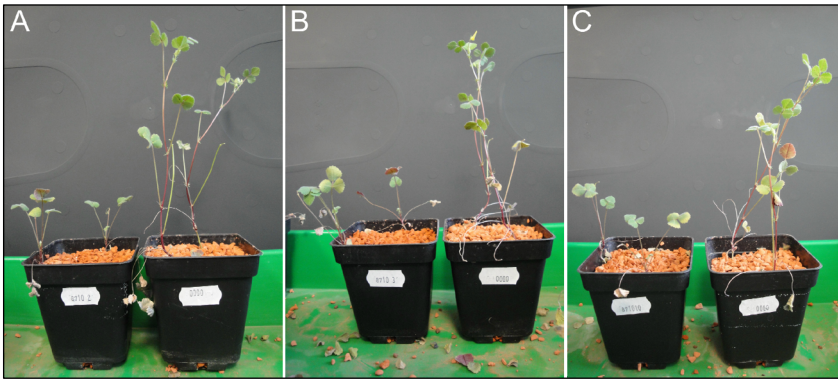
Für die Nachkommen der Linie NF8710 mit einer homozygoten *Tnt1*-Insertion in *Mtr.40638* zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die Linie NF8500, nur dass hier kein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Mykorrhizierungszeitpunkten zu beobachten war. Sowohl nach 14 als auch nach 28 Tagen Mykorrhizierung (d. h. im Alter von 6 und 8 Wochen) waren das Spross- und Wurzelfrischgewicht der Nachkommen von NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 hochsignifikant auf bis zu ein Drittel reduziert (Abbildung III.39 A und C). Während die Anzahl der Blätter der Insertionsmutanten zu beiden Zeitpunkten hochsignifikant niedriger als im Wildtyp war, traf dies für die Anzahl der Blüten ausschließlich für den früheren Mykorrhizierungszeitpunkt zu (Abbildung III.39 B und D). Besonders gravierend war der Unterschied zwischen Wildtyp-Pflanzen und NF8710-Insertionsmutanten in Bezug auf die Anzahl der Samenkapseln. Während im Wildtyp durchschnittlich 0,24 und 1,22 Samenkapseln nach 14- und 28-tägiger Mykorrhizierung vorhanden waren, ließ sich in diesem Zeitraum für keinen der Nachkommen der drei homozygoten Pflanzen NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 eine Samenkapsel beobachten (Abbildung III.39 B und D).





**Abbildung III.39: Phänotypische Charakterisierung von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8500.** Dargestellt ist das Frischgewicht von Spross und Wurzel (A und C) sowie die Anzahl der Blätter, Blüten und Samenkapseln (B und D) von *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und von Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF8710#2 (dunkelblaue Balken), NF8710#3 (mittelblaue Balken) und NF8710#10 (hellblaue Balken) nach 14 (A und B) und 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus 38 Wildtyp-Pflanzen, 9 NF8710#2-Nachkommen, 14 NF8710#3-Nachkommen und 11 NF8710#10-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung sowie 32 Wildtyp-Pflanzen, 8 NF8710#2-Nachkommen, 14 NF8710#3-Nachkommen und 9 NF8710#10-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Um herauszufinden ob die reduzierte Biomasse der Insertionsmutanten auf eine mangelnde Nährstoffversorgung aufgrund einer defekten oder nur eingeschränkt funktionierenden AM-Symbiose zurückzuführen ist, wurden Nachkommen der drei homozygoten Pflanzen NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 und *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen ohne Zugabe von AM-Pilzsporen angezogen. In Abbildung III.40 sind diese Insertionsmutanten neben entsprechenden Wildtyp-Kontrollen im Alter von sechs Wochen abgebildet. Das deutlich reduzierte Wachstum der Tnt1-Insertionsmutanten ist auf den ersten Blick zu erkennen und erfolgt scheinbar unabhängig vom Mykorrhizierungsgrad der Pflanzen. Über einen längeren Wachstumszeitraum ließ sich für die Insertionsmutanten zwar durchaus ein stetiges Wachstum und auch eine späte Samenproduktion beobachten, die gleiche Größe, Biomasse und Fertilität der Wildtyp-Pflanzen erreichten diese jedoch bis zuletzt nicht (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung III.40: *Medicago truncatula* Insertionsmutanten der Linie NF8710 im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen im Alter von sechs Wochen.** Abgebildet sind für sechs Wochen unter gleichen Bedingungen angezogenen Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF8710#2 (Bildausschnitt A links), NF8710#3 (Bildausschnitt B links) und NF8710#10 (Bildausschnitt C links) im Vergleich zu *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (jeweils

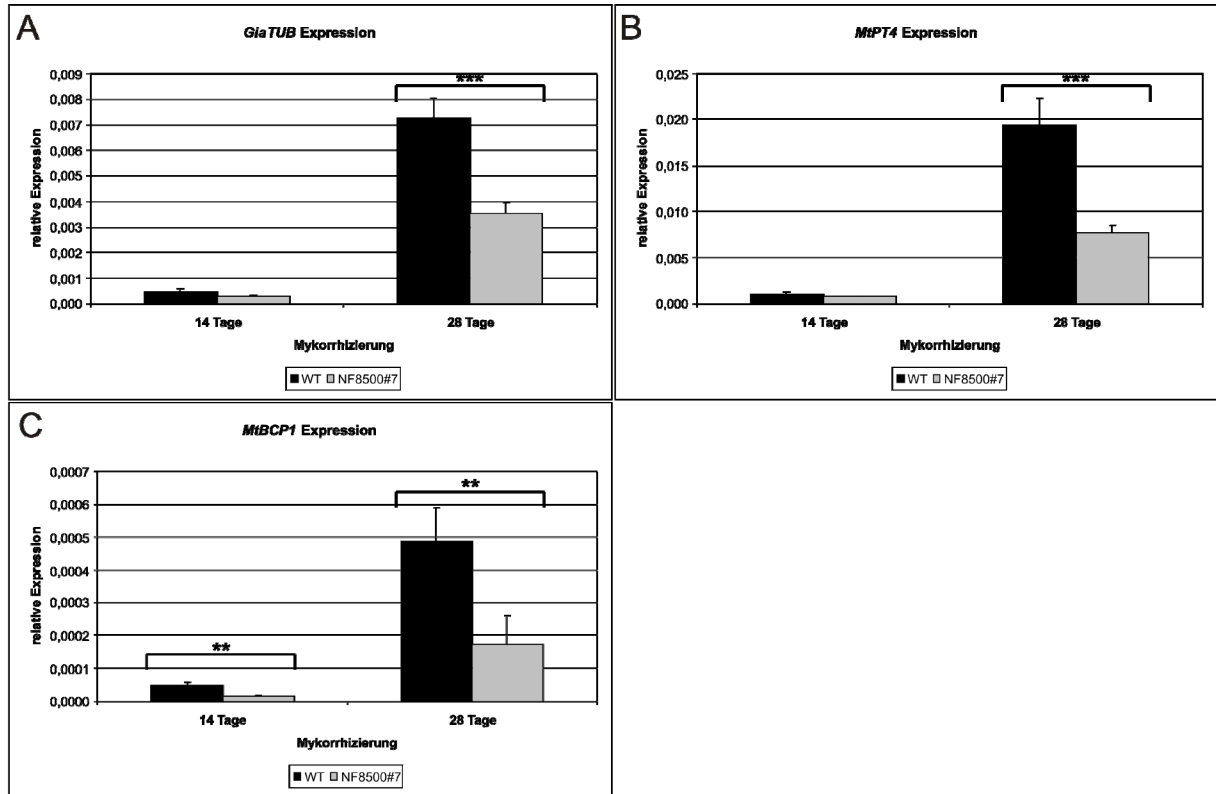
rechts in Bildausschnitt A, B und C). Der Vergleich zeigt ein deutlich retardiertes Wachstumsverhalten der Insertionsmutanten.

Insgesamt wiesen die homozygoten Nachkommen der Linien NF8500 und NF8710 ein sehr ähnliches Bild auf. In beiden Linien war die Biomasse der Insertionsmutanten hochsignifikant niedriger als in entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, wobei der Mykorrhizierungsgrad dafür nicht ausschlaggebend war. Außerdem scheinen beide Linien in ihrer Fertilität eingeschränkt zu sein. In einigen für die Samennachzucht zurückbehaltenen Nachkommen von NF8500#7, NF8710#2, NF8710#3 und NF8710#10 ließ sich eine im Verhältnis zum Wildtyp deutlich verspätete Samenproduktion beobachten. Dieses Phänomen war bereits in der anfänglich durchgeführten Genotypisierung von Pflanzen der Linien NF8500 und NF8710 auffällig, wo für beide Linien zwei völlig sterile homozygote Pflanzen identifiziert wurden (Tabelle III.4), sowie für die Linie NF8710 gleich mehrere homozygote Pflanzen mit verminderter Saatgutproduktion. Es ist davon auszugehen, dass der beobachtete Phänotyp auf die Insertion des Retrotransposons Tnt1 in das Gen *Mtr.40638* zurückzuführen ist. Theoretisch besteht zwar die Möglichkeit, dass beide Linien weitere Tnt1-Insertionen in einem gemeinsamen Gen besitzen, die Wahrscheinlichkeit, dass dies jedoch homozygot in zwei unabhängigen Linien auftritt, ist als sehr gering zu bewerten.

#### III.3.2.1.4 In Tnt1-Insertionsmutanten von *Mtr.40638* ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt

Um festzustellen, ob homozygote Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8500 einen Einfluss auf die Ausbildung der AM-Symbiose haben, wurde die Expression der zuvor bereits beschriebenen AM-Markergene *GiaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* mittels *real time* RT-PCR in den Wurzeln der Nachkommen von NF8500#7 untersucht. Nach 14-tägiger Mykorrhizierung waren sowohl *GiaTUB* als auch *MtPT4* in den Tnt1-Insertionsmutanten tendenziell geringer exprimiert als in den Wildtyp-Kontrollen, allerdings waren diese Reduktionen auf durchschnittlich 55,17 % für *GiaTUB* und 65,36 % für *MtPT4* nicht als signifikant zu bewerten (Abbildung III.41 A und B). Eine signifikant niedrigere relative Expression in diesem Mykorrhizierungsstadium zeigte hingegen *MtBCP1* mit einer durchschnittlichen Reduktion auf 30,2 % (mit  $p = 0,039$ ) im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle (Abbildung III.41 C). Nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung hatten sich die Unterschiede in der Expression von AM-Markergenen zwischen den Nachkommen von NF8500#7 und den Wildtyp-Pflanzen deutlich verstärkt. Die Expression von *GiaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* war in den

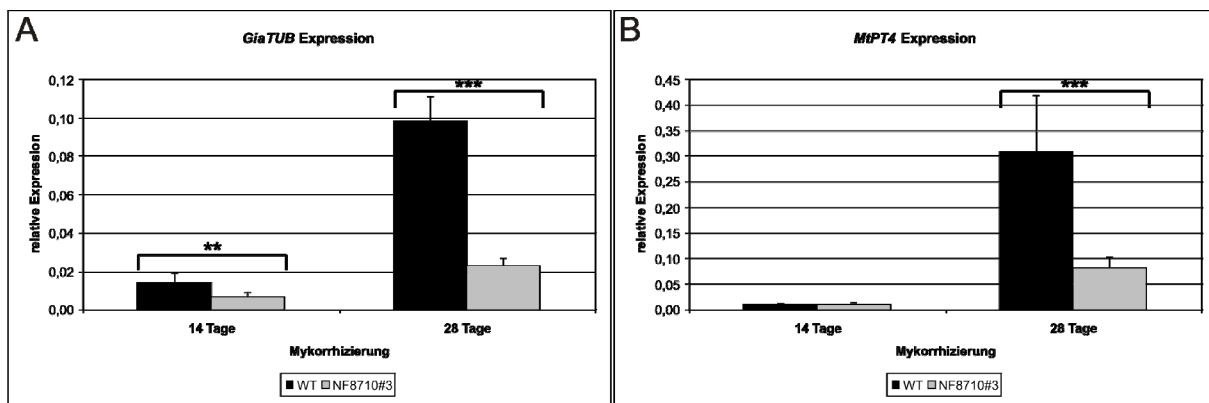
Insertionsmutanten signifikant auf 48,77 % (mit  $p = 8 \times 10^{-5}$ ), 39,53 % (mit  $p = 0,002$ ) und 35,1 % (mit  $p = 0,043$ ) zurückgegangen (Abbildung III.41). Die einheitliche Reduktion dieser AM-Markergene auf unter 50 % des Expressionsniveaus entsprechender Kontrollen lassen auf eine Beeinträchtigung der Ausbildung der AM-Symbiose in den Nachkommen von NF8500#7 schließen.



**Abbildung III.41:** Die relative Expression von *GiaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8500. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A), *MtPT4* (B) und *MtBCP1* (C) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF8500#7 (graue Balken) nach 14 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwölf Wildtyp-Pflanzen und elf NF8500#7-Nachkommen. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.6 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Um des Weiteren festzustellen ob die *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8710 ähnliche Auffälligkeiten wie die der Linie NF8500 zeigten, wurde auch hier die Expression der AM-Markergene *GiaTUB* und *MtPT4* mittels *real time* RT-PCR bestimmt. Dabei wurden jedoch nicht die Nachkommen aller drei als homozygot identifizierter Pflanzen untersucht, sondern lediglich die Nachkommen von NF8710#3. Nach 14-tägiger Mykorrhizierung war die Expression von *GiaTUB* in den Wurzeln der Insertionsmutanten signifikant um im Mittel 47,37 % (mit  $p = 0,015$ ) reduziert, während *MtPT4* nicht anders als in den Wildtyp-Kontrollen exprimiert war (Abbildung III.42). Nach 28-tägiger Mykorrhizierung war die Expression von sowohl *GiaTUB* als auch *MtPT4* in den Insertionsmutanten hochsignifikant auf 23,03 % (mit  $p = 3 \times 10^{-7}$ ) und 26,6 % (mit  $p = 5 \times 10^{-5}$ ) reduziert (Abbildung III.42). Diese Ergebnisse spiegeln die zuvor für die Linie NF8500 gemessenen Expressionsunterschiede nicht nur wider, sondern zeigen darüber hinaus eine noch viel stärkere

Reduktion der Markergenexpression. Damit übereinstimmend konnte bereits im Rahmen der phänotypischen Charakterisierung beobachtet werden, dass die Unterschiede zur Wildtyp-Kontrolle in der Linie NF8710 stets ausgeprägter waren als in der Linie NF8500 (Abschnitt III.3.2.1.3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tnt1-Insertion in der Kodierregion von *Mtr.40638* in der Linie NF8710, während diese in der Linie NF8500 lediglich im 5'-UTR-Bereich des Gens sitzt. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass beide Tnt1-Insertionslinien eine signifikant reduzierte Expression wichtiger AM-Markergene aufweisen, die sich nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung ansatzweise, und nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung hochsignifikant zeigte. Die reduzierte Expression von *GiaTUB* lässt auf einen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle verringerten Kolonisationsgrad vermuten, während die Reduktionen von *MtPT4* und *MtBCP1* möglicherweise auf eine in ihrer Anzahl oder Funktionalität eingeschränkte Arbuskelbildung hinweisen könnten. Zur Abklärung dieser Vermutungen wurden die Wurzeln von Insertionsmutanten der Linien NF8500 und NF8710 bezüglich der vorhandenen AM-Pilzstrukturen angefärbt und analysiert.

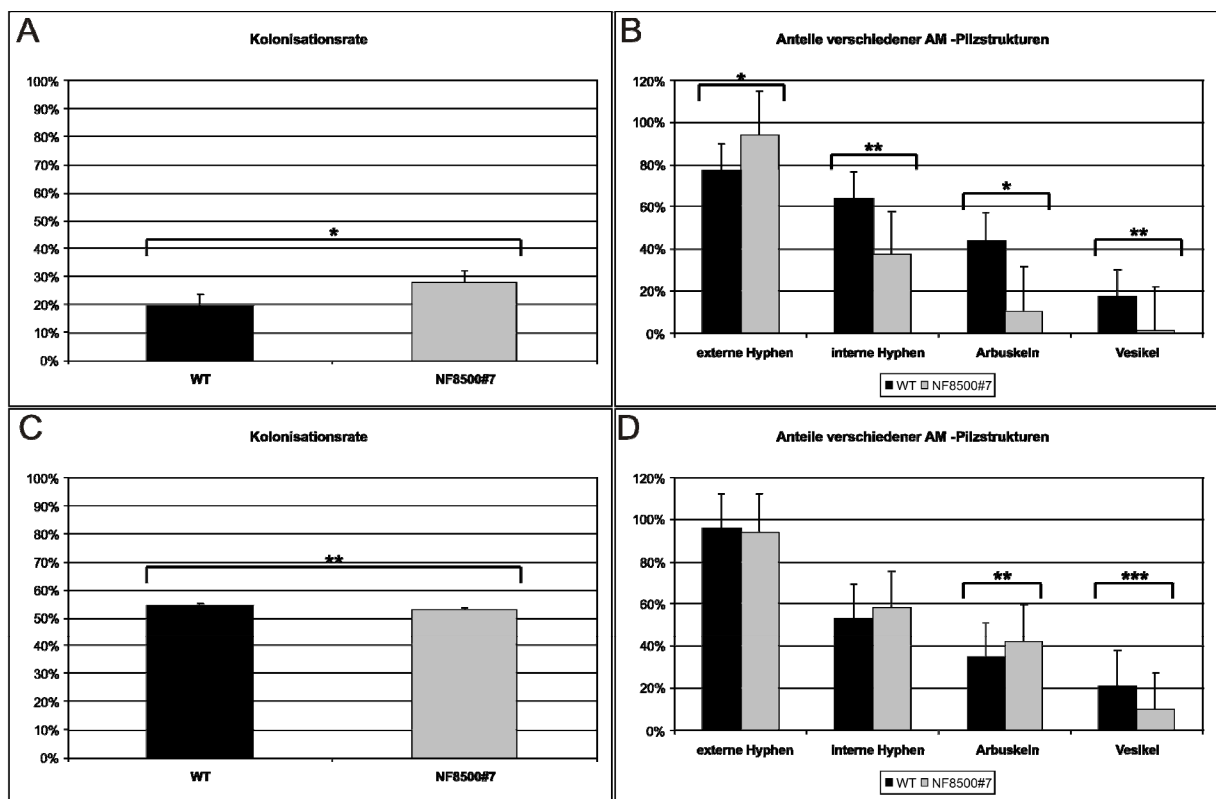


**Abbildung III.42:** Die relative Expression von *GiaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8710. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A) und *MtPT4* (B) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF8710#3 (graue Balken) nach 14 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF8710#3-Nachkommen. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.7 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

### III.3.2.1.5 In Tnt1-Insertionsmutanten von *Mtr.40638* ist die Ausbildung von AM-Pilzstrukturen beeinträchtigt

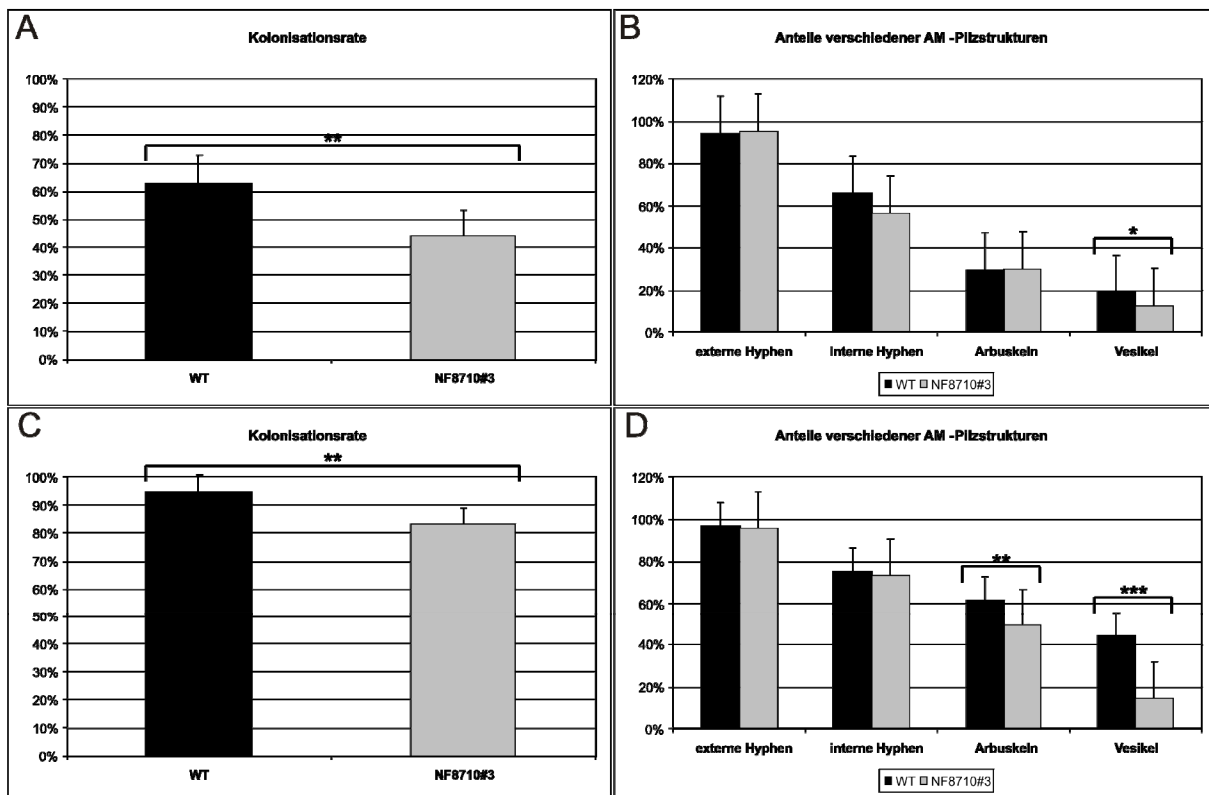
Für die Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF8500#7 und NF8710#3 sowie entsprechenden Wildtyp-Kontrollen wurde jeweils die nach der RNA-Extraktion verbliebene Hälfte der Wurzel mit WGA-Alexa Fluor® 488 angefärbt um die AM-Pilzstrukturen der mykorrhizierten Wurzeln sichtbar zu machen. Anschließend wurde, wie in Abschnitt II.2.5.4 beschrieben, die Kolonisationsrate durch *G. intraradices* und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in den Wurzeln bestimmt. Aufgrund der hohen Probenzahl geschah dies nicht für jede Pflanze separat, sondern es wurden stets einige Wurzeln einer Bedingung gemeinsam gefärbt und ausgewertet.

Für die NF8500#7-Nachkommen zeigte sich nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung eine überraschenderweise signifikant höhere Kolonisationsrate in den Insertionsmutanten (Abbildung III.43 A). Die Erklärung hierfür findet sich in der Betrachtung der Anteile der einzelnen AM-Pilzstrukturen. Während die Anteile interne Hyphen, Arbuskeln und Vesikel signifikant um 26,8 %, 33,6 % und 16,1 % niedriger als in entsprechenden Wildtyp-Wurzeln waren, wiesen die Wurzeln der Insertionsmutanten durchschnittlich 16,9 % mehr externe Hyphen auf (Abbildung III.43 B). Dieser signifikant höhere Anteil an mit externen Hyphen kolonisierten Wurzeln zieht die Gesamtkolonisationsrate nach oben, so dass die Kolonisation durch *G. intraradices* in den Insertionsmutanten rein mathematisch signifikant höher als in den Wildtyp-Pflanzen war. Vom biologischen Standpunkt aus betrachtet waren jedoch signifikant weniger funktionelle AM-Pilzstrukturen wie Arbuskeln in den Nachkommen von NF8500#7 zu beobachten, was mit der zuvor gemessenen signifikanten Reduktion von *MtBCP1* (Abbildung III.41 C) in diesem Stadium korreliert.



**Abbildung III.43:** Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8500. Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A und C) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B und D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und in Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF8500#7 (graue Balken) nach 14 (A und B) bzw. 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vierzehn Wildtyp-Pflanzen und zehn NF8500#7-Nachkommen nach 14 Tagen und zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF8500#7-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.2 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Nach 28-tägiger Mykorrhizierung war die Kolonisationsrate in den Wildtyp-Kontrollen signifikant höher als in den NF8500#7-Nachkommen (Abbildung III.43 C), was der zuvor gemessenen hochsignifikanten Reduktion von *GiaTUB* (Abbildung III.41 A) entspricht. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die Anteile externer und interner Hyphen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Insertionsmutanten und den Wildtyp-Kontrollen auf, während die Anteile an Vesikeln in den NF8500#7-Nachkommen nach wie vor hochsignifikant reduziert waren (Abbildung III.41 D). Überraschenderweise lagen die Anteile an Arbuskeln in den Insertionsmutanten signifikant um im Mittel 7,3 % höher als in den Wildtyp-Kontrollen (Abbildung III.41 D). Aufgrund der hochsignifikanten Reduktion von *MtPT4* (Abbildung III.41 B) in diesem Mykorrhizierungsstadium erscheint dieses Ergebnis zunächst widersprüchlich. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine funktionelle Beeinträchtigung der Arbuskeln, die eine verminderte *MtPT4*-Expression bei gleichem oder sogar höherem Arbuskel-Anteil erklären könnte.



**Abbildung III.44:** Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8710. Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A und C) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B und D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und in Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF8710#3 (graue Balken) nach 14 (A und B) bzw. 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus vierzehn Wildtyp-Pflanzen und zehn NF8500#7-Nachkommen nach 14 Tagen und zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF8710#3-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.3 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Für die NF8710#3-Nachkommen ließ sich sowohl nach 14-tägiger als auch nach 28-tägiger Mykorrhizierung eine signifikant geringere Kolonisationsrate im Vergleich zu den Wildtyp-



Kontrollen beobachten (Abbildung III.44). Dies korrelierte sehr gut mit der zu diesen beiden Zeitpunkten gemessenen signifikant niedrigeren *GiaTUB*-Expression in den Wurzeln der Insertionsmutanten (Abbildung III.42 A). Aus diesen Daten lässt sich übereinstimmend schließen, dass die Wurzeln der NF8710#3-Nachkommen weniger stark von *G. intraradices* besiedelt waren, als entsprechende Wildtyp-Kontrollen.

Auch die Anteile der verschiedenen AM-Pilzstrukturen wiesen einige Unterschiede zwischen Insertionsmutanten und Wildtyp-Kontrollen auf. Nach 14-tägiger bzw. 28-tägiger Mykorrhizierung war der Anteil der Vesikel in den NF8710#3-Nachkommen signifikant um etwa 7 % bzw. hochsignifikant um ca. 30 % niedriger als in den Wildtyp-Kontrollen (Abbildung III.44). Im Gegensatz dazu, wiesen die Anteile externer und interner Hyphen zu beiden Mykorrhizierungszeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Wildtyp-Kontrollen und den Tnt1-Insertionsmutanten auf (Abbildung III.44). Der Anteil der Arbuskeln war nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit durchschnittlich 29,5 % in den Wildtyp-Pflanzen und im Mittel 30,0 % in den NF8710#3-Nachkommen nahezu identisch (Abbildung III.44). Nach 28 Tagen Mykorrhizierung hatte sich dieses Bild jedoch deutlich verändert, die Arbuskelrate lag in den Insertionsmutanten nun signifikant um ca. 13 % niedriger als in den Wildtyp-Kontrollen (Abbildung III.44). Dabei deckten sich diese Beobachtungen erneut sehr gut mit der zuvor bestimmten Expression des arbuskel-spezifischen Markergens *MtPT4*. Auch hier war nach 14-tägiger Mykorrhizierung kein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten feststellbar, nach 28-tägiger Mykorrhizierung hingegen eine hochsignifikante Reduktion der *MtPT4* Transkriptmenge in den NF8710#3-Nachkommen messbar (Abbildung III.42 B).

Sowohl durch den verringerten Kolonisationsgrad als auch durch die verminderten Anteile an Vesikeln und Arbuskeln die sich sehr gut mit den zuvor durchgeführten *real time* RT-PCR Messungen decken, scheinen die NF8710#3-Nachkommen in ihrer Fähigkeit zur Ausbildung einer AM-Symbiose mit *G. intraradices* beeinträchtigt zu sein. Im Wesentlichen ließ sich dies auch für die NF8500#7-Nachkommen beobachten, obwohl die Mykorrhizierungsdaten für diese Linie teilweise etwas widersprüchlich im Vergleich mit den Ergebnissen der *real time* RT-PCR Messungen erscheinen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine homozygote Tnt1-Insertion des  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteins Mtr.40638 zu einer deutlichen Beeinträchtigungen in der Ausbildung der AM-Symbiose mit *G. intraradices* führt, wie hier anhand der Linien NF8500 und NF8710 gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse legen eine AM-assoziierte Rolle von Mtr.40638 nahe. Neben dieser hat das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein möglicherweise jedoch weitere Funktionen in Wachstums- und Entwicklungsprozessen von *M. truncatula*, wie sich aufgrund des retardierten Wachstums der untersuchten Insertionsmutanten vermuten lässt.

### III.3.3 Funktionelle Analyse von Transkriptionsfaktoren

#### III.3.3.1 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.11570*

##### III.3.3.1.1 Das *Mtr.11570* Gen spielt keine offensichtliche Rolle in der AM-Symbiose

Das *Mtr.11570* Gen ist als potentieller ERF(*ethylene respnose factor*)-Transkriptionsfaktor annotiert. Zur funktionellen Analyse von *Mtr.11570* konnte die Tnt1-Insertionslinie NF4409 in der Tnt1-Datenbank von *M. truncatula* (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>) ermittelt werden. Im Rahmen einer Genotypisierung von R1-Pflanzen dieser Linie, konnten insgesamt drei Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.11570* identifiziert werden (Tabelle III.4). Die Nachkommen dieser Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen wie entsprechende Wildtyp-Kontrollen angezogen und für 35 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Eine phänotypische Charakterisierung zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den Insertionsmutanten und den Wildtyp-Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Entsprechend verhielt es sich mit dem in den Wurzeln der NF4409-Nachkommen und Wildtyp-Pflanzen gemessenen Expressionsniveau der AM-Markergene *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* (Daten nicht gezeigt). Auch anhand einer Färbung und Analyse der AM-Pilzstrukturen in den Wurzeln der Insertionsmutanten konnten keinerlei Auffälligkeiten gegenüber dem Wildtyp festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Da ein *knockout* des Gens *Mtr.11570* keinerlei Auswirkungen auf die Entwicklung und Ausprägung der AM-Symbiose in den Wurzeln homozygoter Tnt1-Insertionsmutanten zeigte, ist davon auszugehen, dass die Expression dieses Gens nicht entscheidend für die AM-Symbiose ist.

#### III.3.3.2 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.43223*

##### III.3.3.2.1 Das *Mtr.43223* Gen spielt keine offensichtliche Rolle in der AM-Symbiose

Wie in Abschnitt III.2.2 beschrieben, wurde zur Analyse des Kandidatengens *Mtr.43223* das RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.43223* erstellt. Ein Vergleich der Expression von *Mtr.43223* in mit dem RNAi-Konstrukt oder dem leeren Kloniervektor generierten transgenen Wurzeln von *M. truncatula* zeigte jedoch keinerlei signifikante Unterschiede. Das Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.43223* war weder in mykorrhizierten noch in nicht-mykorrhizierten Wurzeln in der Lage ein RNAi-vermitteltes *knockdown* von *Mtr.43223* zu bewirken (Daten nicht gezeigt).

Allerdings konnte zur weiteren Analyse des als GRAS-Transkriptionsfaktor annotierten Gens die Tnt1-Insertionslinie NF5196 identifiziert werden. Eine Genotypisierung von R2-Pflanzen dieser Linie führte zur Identifikation von insgesamt vier Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.43223*, von denen sich jedoch eine später als steril erwies (Tabelle III.4). Die Nachkommen der drei verbliebenen homozygoten Pflanzen wurden unter gleichen Bedingungen wie entsprechende Wildtyp-Kontrollen angezogen und mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Eine phänotypische Charakterisierung zum Erntezeitpunkt zeigte keine signifikanten Unterschiede



zwischen den Insertionsmutanten und den Wildtyp-Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Über *real time* RT-PCR Messungen konnte die korrekte und homozygote Tnt1-Insertion in allen Insertionsmutanten bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Die AM-Markergene *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* waren in den Wurzeln der NF5196-Nachkommen jedoch nicht signifikant anders als in den Wildtyp-Wurzeln exprimiert (Daten nicht gezeigt). Da ein *knockout* von *Mtr.43223* keinerlei Auswirkungen auf die Expression wichtiger AM-Markergene zeigte, war davon auszugehen, dass das Genprodukt von *Mtr.43223* keine zentrale Rolle in der AM-Signaltransduktion spielt.

### III.3.3 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.49618*

#### III.3.3.1 Der DREB-Transkriptionsfaktor *Mtr.49618*

*Mtr.49618* ist als potentieller DREB (*dehydration responsive element binding*)-Transkriptionsfaktor annotiert, die eine Untergruppe der pflanzenspezifischen AP2/ERF-Transkriptionsfaktoren darstellen (Gutterson & Reuber, 2004). Das 675 bp lange, intronfreie Gen liegt auf dem fünften Chromosom von *M. truncatula* und trägt in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms (Young *et al.*, 2011) den Bezeichner Medtr5g010910. In der 225 Aminosäuren langen abgeleiteten Proteinsequenz von *Mtr.49618* konnte über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist *et al.*, 2010) von Position 48 - 111 eine AP2/ERF-Domäne identifiziert werden (Abbildung III.45). Die in ERF- und APETALA2-Proteinen konservierte Domäne, erlaubt diesen Proteinen eine Bindung an spezielle DNA-Motive (Hao *et al.*, 1998).

```

ATGGATTTCATGTCATCTTTTGGTGAGTACTCAGACACTTCTTCTTCAGAAACAAGT
TCCTCGGAAGTGATTTTGGCATCAGTTAATAAGCCAAAGAAGAGAGCAGGTAGAAGAGTG
TTCAAGGAGACAAGACATCCGGTGTACCGAGGAGTACGACGTAGGAAGAATAACAAGTGG
GTTTGTGAGATGAGAGTTCCTAACAATATCGTTAACAAAAATAATAAGTCAAGGATTTGG
CTTGGAACATATCCAACCTCTGAAATGGCTGCACGTGCACATGATGTTGCTGCACTTACT
CTTAAAGGAAAATCAGCTTGTCTTAATTTTGTGACTCTGCATGGCGGTTGAGGTTGCCG
GAGTCGAATGATGCGACGGAGATAAGGAGGGCGCGATGGAGGCTGCTCAGTTGTTTGGC
GTTGAAGACAAGCAATGTTGTGTTACCGTTGAAGATGGAGTGTTTATGGACATGGAAGAT
TCCAAGAAATATGCTAGAACACAGGTTCCAGTGGTGTATCAGAATTTGAAGACATGCAT
CATTTGCTTCTAAGTATTGCCAATGAGCCTTTACGTTACGCTCCTCCTCCCAACAAT
TATGGTAGTTATAACTGGGGTGACATGGAGATTTTGTACTCAATTAGTTTCACTTTGG
AACTTCTCTATT TGA

MDFMSSFGEYS DTS SSETSSSEVILASV NKP KKRAGRRVFKETRHPVYRGVRRRKNNKW
VCEMRVPNNIVNKNKSR IWLGTYPTEMAARAH DVAALTLK GKSA CLNFA DSAWRLRLP
ESNDATEIRRAAMEAAQLFAVEDKQCCVTVEDGVFMDMEDSKNMLEAQV PVSSEFEDMH
HLLLSIANEPLRSAPPSPTNYGSYNWGDMEIFDTQLVSLWNFSI

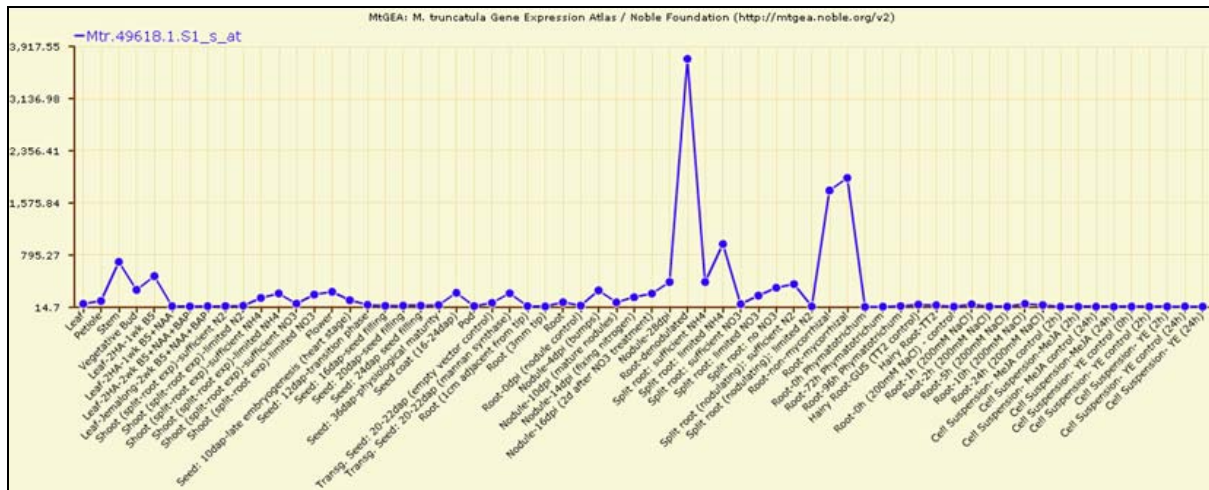
```

**Abbildung III.45: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von *Mtr.49618*.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von *Mtr.49618* im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind jeweils das Start- und Stoppcodon. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich in gelb markiert ist eine mittels Motivsuche identifizierte AP2/ERF-Domäne.

Wie in Abschnitt III.1 beschrieben, erfolgte die Auswahl von *Mtr.49618* als Kandidatengen sowohl aufgrund seiner Annotation als potentieller Transkriptionsfaktor, als auch aufgrund seiner spezifischen Induktion in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita*. Die

hier gemessene 24,6-fache bzw. 9,1-fache Induktion von *Mtr.49618* im Wildtyp bzw. in einer *dmj3*-Mutante war im Vergleich zu anderen Kandidatengenen dieses Stadiums extrem hoch und sehr spezifisch, da in keiner anderen der getesteten Bedingungen eine Induktion dieses Gen zu beobachten war (Tabelle III.1).

Laut seines MtGEA-Expressionsprofils wird *Mtr.49618* in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln exprimiert, wobei die Expression in ersteren etwas höher ist (Abbildung III.46). Neben einer geringen Expression in der Sprossachse war zudem eine starke Expression in Wurzelknöllchen zu beobachten (Abbildung III.46).



**Abbildung III.46: Das Expressionsprofil von *Mtr.49618* aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine spezifische Expression von *Mtr.49618* in Wurzelknöllchen, mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln sowie eine geringe Expression in der Sprossachse von *M. truncatula*.

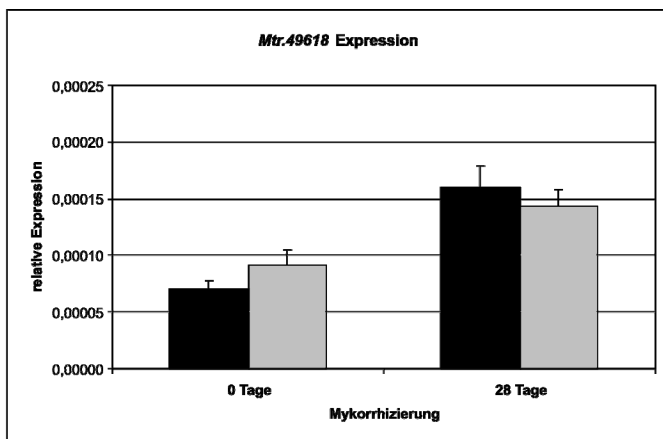
Im Anbetracht dieser Daten könnte es sich bei *Mtr.49618* um einen *downstream* MtDMI3 agierenden Transkriptionsfaktor handeln, der jedoch möglicherweise nicht nur in sehr frühen Stadien der AM-Symbiose sondern entsprechend seines MtGEA-Expressionsprofils (Abbildung III.46) vermutlich auch in der Knöllchensymbiose eine Rolle spielt. Für die funktionelle Analyse von *Mtr.49618* wurden eine RNAi- und eine Promotor-GUS-Konstrukte dieses Gens erstellt.

### III.3.3.3.2 Für das Kandidatengen *Mtr.49618* konnte kein RNAi-vermittelter *knockdown* erzielt werden

Im Rahmen einer Masterarbeit (Schaepe, 2011) wurde das gegen *Mtr.49618* gerichtete RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.49618* erstellt und analysiert. Hierzu wurden mit pK7GWIWG2:*Mtr.49618* sowie dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:*GUS* transgene, haarige Wurzeln in *M. truncatula* induziert. Ein Teil dieser Wurzeln wurde ohne Symbiosepartner angezogen, während die übrigen für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert wurden. Die in Anschluss an eine RNA-Extraktion erfolgte Analyse der *Mtr.49618* Genexpression mittels *real time* RT-PCR zeigte jedoch nicht den erwünschten RNAi-Effekt. Konkret war die relative Expression von *Mtr.49618* in den nicht-mykorrhizierten RNAi-Wurzeln im Mittel etwas höher und in den

mykorrhizierten RNAi-Wurzeln durchschnittlich etwas niedriger als in den entsprechenden Kontrollen (Abbildung III.47). In beiden Fällen war dieser Unterschied aber gering und nicht signifikant. Da kein mittels pK7GWIWG2:Mtr.49618 hervorgerufener RNAi-Effekt nachgewiesen werden konnte, erfolgten keine weiteren Analysen mittels dieses Konstrukts.

Anhand der zuvor gemessenen Kontrollen ließ sich jedoch feststellen, dass die durchschnittliche relative Expression von *Mtr.49618* in den mykorrhizierten Wurzeln 56,25% höher als in den nicht-mykorrhizierten Wurzeln war (Abbildung III.47). Dies ließ sich, wenn auch nicht so ausgeprägt, bereits im MtGEA-Expressionsprofil von *Mtr.49618* (Abbildung III.46) beobachten, und untermauert eine potentielle Rolle des *Mtr.49618* Proteins als Symbiose-assoziiertes Transkriptionsfaktor.

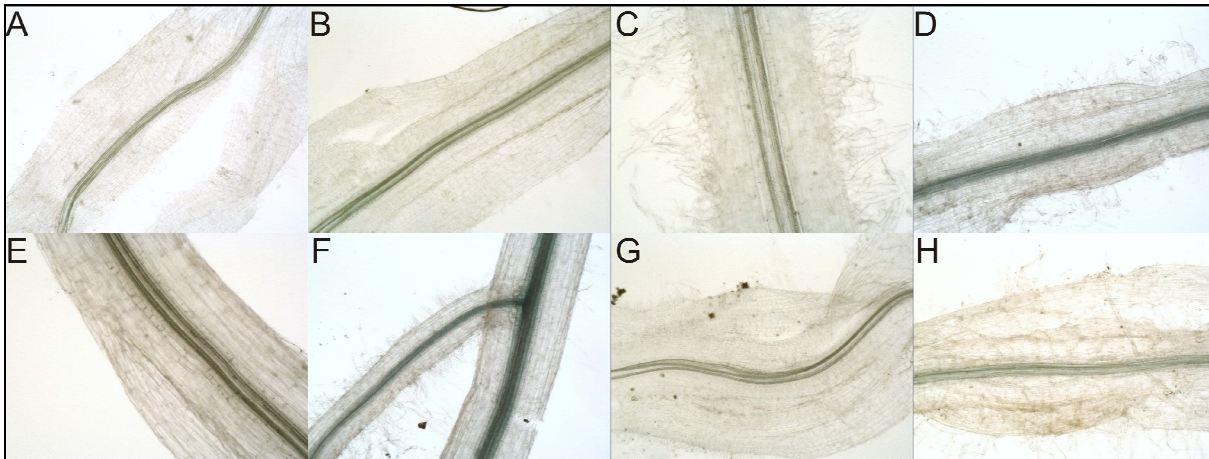


**Abbildung III.47:** Die relative Expression von *Mtr.49618* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.49618* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.49618* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2: *Mtr.49618* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde

liegende Einzelwerte sind Abbildung C.8 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

### III.3.3.3 Weder eine Mykorrhizierung mit *G. intraradices* noch eine Behandlung mit Myc-LCOs induziert die Promotoraktivität von *Mtr.49618*

Um einen Eindruck der Promotoraktivität von *Mtr.49618* zu bekommen, wurde, wie in Abschnitt III.2.1.1 beschrieben, das Promotor-GUS Konstrukt pRR:p49618-GUS generiert. Hierfür wurde eine 1.078 bp lange Promotorsequenz dieses Gens vor eine *gusAint*-Reportergen-kassette kloniert und in *M. truncatula* transgene Wurzeln mit diesem Konstrukt induziert. Um einen ersten Eindruck der Promotoraktivität in verschiedenen frühen aber auch einem späten AM-Stadium zu bekommen, wurden die transgenen Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS in einer Zeitreihe von 0, 2, 7 und 28 Tagen mit *G. intraradices* mykorrhiziert und zum Nachweis der GUS-Aktivität mit X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-inolyl/beta-D-Glucosid) gefärbt. Die GUS-Färbung erfolgte für insgesamt 24 Stunden, da die nachweisbare Promotoraktivität nicht besonders hoch war. Als Kontrolle dienen dabei jeweils entsprechend behandelte Wildtyp Wurzeln. In diesen zeigte sich nach der 24-stündigen GUS-Färbung großteils keine Promotoraktivität (Abbildung III.48 A, C, E und G), in einigen Fällen war jedoch das Leitgewebe der Kontrollwurzeln angefärbt (Abbildung III.48 B, D, F und H), was vermutlich auf die lange Inkubationszeit im Färbepuffer zurückzuführen ist.

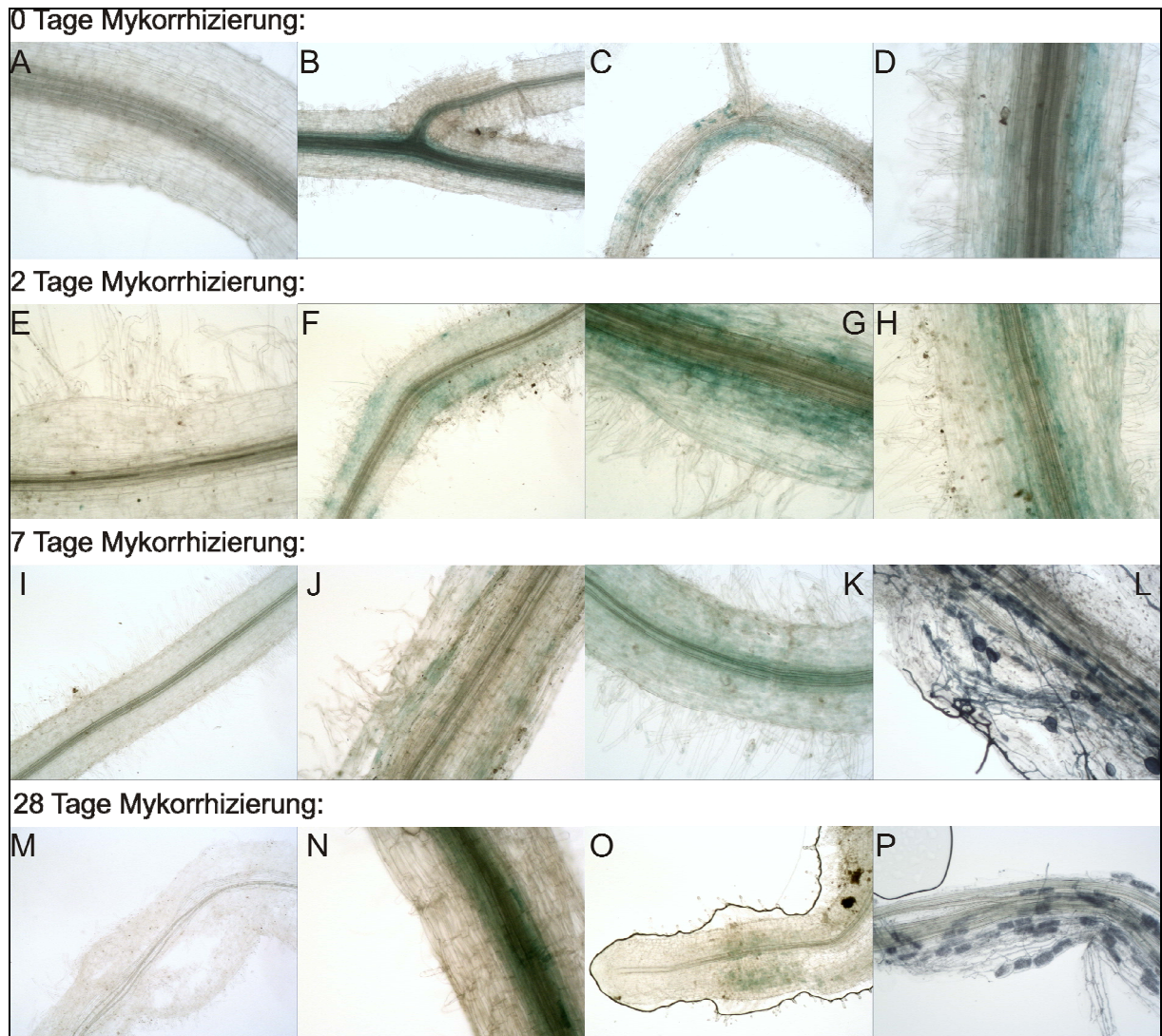


**Abbildung III.48: Als Kontrolle mit *Glomus intraradices* mykorrhizierte *Medicago truncatula* Wildtyp-Wurzeln nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten *M. truncatula* Wildtyp-Wurzeln wurden für 0 (A und B), 2 (C und D), 7 (E und F) und 30 (G und H) Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dieses Kontrollexperiment (siehe Text) zeigt großteils keinerlei GUS-Aktivität (A, C, E und G), in einigen Fällen jedoch eine leichte Färbung des Leitgewebes (B, D, F und H).

Neben der Bestimmung des allgemeinen Färbehintergrunds, dienten die Kontrollpflanzen auch zur Bestimmung des Kolonisationsgrades zu den vier verschiedenen Mykorrhizierungszeiträumen mittels der *gridline intersections* Methode (siehe Abschnitt II.2.5.4). Dabei zeigte sich eine durchschnittliche AM-Kolonisationsrate von 80 % nach 28 Tagen und von 3% nach 7 Tagen Mykorrhizierung (Daten nicht gezeigt). Nach 2 und 0 Tagen Mykorrhizierung waren keinerlei AM-Strukturen zu beobachten. Diese Werte sprechen für einen durchaus normalen Kolonisationsprozess.

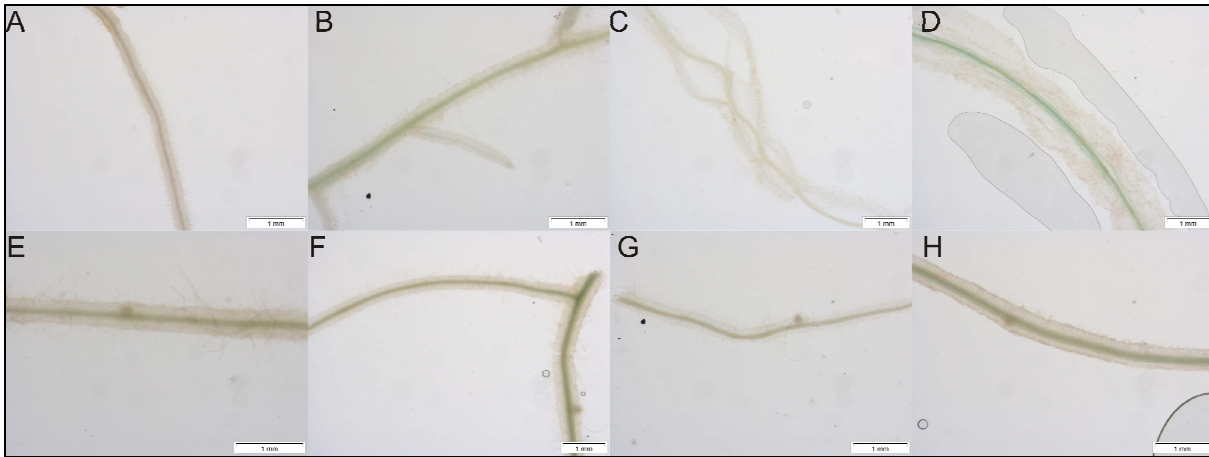
Die nicht-mykorrhizierten mit pRR:p49618-GUS induzierten Wurzeln wiesen häufig gar keine GUS-Färbung (Abbildung III.49 A) oder eine Färbung des Leitgewebes (Abbildung III.49 B) auf. Da dieses Muster jedoch auch in den Wildtyp-Kontrollen zu beobachten war, kann es als Hintergrund erachtet werden. Vielfach ließ sich in den nicht-mykorrhizierten, transgenen Wurzeln darüber hinaus eine diffuse Promotoraktivität im Wurzelkortex beobachten (Abbildung III.49 C und D). Diese diffuse GUS-Färbung im Kortex war auch nach einer 2-tägigen Mykorrhizierung in den transgenen Wurzeln nachweisbar (Abbildung III.49 F - H), wo jedoch nach wie vor auch völlig ungefärbte Wurzeln vorlagen (Abbildung III.49 E). Auch nach 7 und 28 Tagen Mykorrhizierung ließ sich stets das gleiche Färbemuster beobachten: ein großer Anteil der Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS zeigte keinerlei Promotoraktivität (Abbildung III.49 I und M) oder in einigen Fällen eine Hintergrund-Färbung des Leitgewebes (Abbildung III.49 K und N). In einigen Wurzeln ließ sich eine diffuse Färbung im Wurzelkortex beobachten, die jedoch keiner erkennbaren Regelmäßigkeit folgte (Abbildung III.49 J und O). Eine Tintenfärbung der GUS-gefärbten Wurzeln zeigte keinerlei augenscheinlichen Zusammenhang zwischen Promotoraktivität und AM-Pilzstrukturen (Abbildung III.49 L und P). Die ähnliche Promotoraktivität von *Mtr.49618* in nicht-mykorrhizierten und mykorrhizierten Wurzeln verschiedener Stadien legt nahe, dass die Expression dieses Gens offensichtlich nicht durch direkten AM-Pilzkontakt induziert wird.





**Abbildung III.49: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellten transgenen *M. truncatula* Wurzeln wurden mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p49618-GUS generiert, für 0 (A-D), 2 (E-H), 7 (I-L) und 28 (M-P) Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dabei zeigen die Wurzeln zu allen Mykorrhizierungszeitpunkten in einigen Wurzeln gar keine Promotoraktivität (A, E, I und M), sowie in anderen eine Promotoraktivität im Leitgewebe (B, K und N) oder eine diffuse GUS-Färbung im Wurzelkortex (C, D, F, G, H, J und O). Wurzeln in L und P wurden zusätzlich einer Tintenfärbung unterzogen und zeigen reife AM-Pilzstrukturen die nicht mit einer GUS-Färbung überlappen.

Mittels eines im Anschluss durchgeführten Myc-LCO *induction assay* (siehe Abschnitt II.2.5.7) sollte zudem getestet werden ob der Promotor von *Mtr.49618* möglicherweise auf diese mikrobiellen Signale reagiert. Hierzu wurden HRCs unter der Kontrolle von pRR:p49618-GUS für 24 Stunden in  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs,  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs, eine Mischung aus beiden und einer entsprechenden Myc-LCO-freien Kontrolle inkubiert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Die so gefärbten Wurzeln zeigten unter allen Inkubationsbedingungen großteils gar keine Promotoraktivität (Abbildung III.50 A, C, E und G). In einzelnen Wurzeln war lediglich eine leichte GUS-Färbung des Leitgewebes zu beobachten (Abbildung III.50 B, D, F und H), die sich in der Kontrolle jedoch nicht von den Myc-LCO behandelten Wurzeln unterschied.



**Abbildung III.50: Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten *Medicago truncatula* HRC (hairy root culture) unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS nach einer GUS-Färbung.** Die dargestellte transgene *M. truncatula* HRC wurden mit dem Promotor-GUS Konstrukt pRR:p49618-GUS generiert, in vier Teilen für 24 Stunden in je einer Kontrolllösung (A und B), in  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (C und D), in  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (E und F) und einer Mischung aus beiden Myc-LCOs (G und H) inkubiert und anschließend einer 24-stündigen GUS-Färbung unterzogen. Dabei zeigen die Wurzeln aller vier Behandlungen ein sehr ähnliches Färbemuster. Die meisten Wurzeln sind völlig ungefärbt (A, C, D und F), sofern vorhanden, ist die Promotoraktivität auf das Leitgewebe der Wurzeln (B, D, E und G) beschränkt. Die Maßstabsskala entspricht 1 mm.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Promotoraktivität von *Mtr.49618* weder durch eine Kolonisation mit *G. intraradices* noch durch Myc-LCOs beeinflusst wird. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die anfänglich getroffene Hypothese bezüglich einer Symbiose-assoziierten Rolle des Transkriptionsfaktors *Mtr.49618* eher unwahrscheinlich, lässt sich aufgrund nicht durchführbarer weiterer funktioneller Analysen (Abschnitt III.3.3.2.2) und speziell auch in Hinblick auf die Knöllchensymbiose jedoch auch nicht mit Sicherheit ausschließen.

### III.3.3.4 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.9126*

#### III.3.3.4.1 Der GRAS-Transkriptionsfaktor *Mtr.9126*

Das als potentieller GRAS-Transkriptionsfaktor annotierte Kandidatengens *Mtr.9126* liegt auf dem dritten Chromosom von *M. truncatula*. Die genomische Sequenz von *Mtr.9126* trägt in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms (Young *et al.*, 2011) den Bezeichner Medtr3g056110. Die Gensequenz setzt sich aus einer 1.629 bp langen intronfreien Kodiersequenz und einem 182 bp langen 3'-UTR Bereich zusammen (Abbildung III.51). In der EST-Datenbank von *M. truncatula* (DFCI *Medicago Gene Index*) konnten kein EST-Cluster identifiziert werden, dass die Kodiersequenz von *Mtr.9126* in der gesamten Länge abdeckt. Die besten Treffer lieferten TC186725 und TC185239, die jeweils mit dem vorderen bzw. dem hinteren Teil des Gens übereinstimmen.

In der 542 Aminosäuren langen abgeleiteten Proteinsequenz des *Mtr.9126* Gens konnte über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist *et al.*, 2010) von Position 146 - 523 eine in GRAS-Proteinen hochkonservierte Domäne identifiziert werden (Abbildung III.51).

```

ATGCAAACATCTCAGAACCATGAAATTTCTTACGGCTCTGACAGGTTCTACGTTGAGCCT
GTGCAGAATCTCGAGTCGTATTGCTTACCCCTCAATTGAGAATCTAGACAATTATCTTCC
TCTGATAACAGCTGCCAAACATTTTATCCTTCTCATCAAACCTAGAACCATACAACACC
CTTGAATCTGCTTCAACAAGCAACAACAGTTTACCTTACCAAAAATCTCCCCTACTCAC
AGTTTTTACCTAACAATAGTCCAGGTTCTACGTTAAGGCCGCAACATTCACCTGAATTT
GTCAATGGTTACCTGAGGAGGAGGATTCTTACTTGATATATCATGATCATGATGACCTA
AGGCATAAGATGAGTGAGCTGGAATCTGTTATGCGAGGACCTAACGTAGAGATGCTAGAG
ATGTATGATACCAAAGTTCAAGAAGAATCTGCTTCATTCTTATTAGAGGCAGAGAAGTGG
AAGAAAAACGTGGAGATGGTATCTAGAGGGGATTTGAAAGAGATGCTTTATACTTGTGCA
AAAGCAGTGGATGAGAATGATATCGAGACAATTGAATGGATGGTAACTGAGTTACGCAAA
ATAGTATCCGTTTCAGGCAGTCCAATTGAACGATGCGGAGCGTACATGTTGGAGGCACT
TGTTTTCAAAGATTGCCTCTTCTGGAAGTACAATCTACAAATCGTTAAAATGCAGCGGCC
TACTGGTAATGAACTGCTTTCCCTACATGCATGTACTTTATGAAATATGTCCGTACTTTAA
GTTTGGATACATGCTGCAAATGGGGCCATTGCGGAAGCTATGAAGGAGGAAAATGAAGT
CCATATAAATGATTTTTCAGATTGGACAAGGAACCTCAGTGGGTGAGTCTAATCCAGGCTCT
TGCTCGCCGCCCTGGAGGACCTCCAAAGATTAGAATAACAGGTATTGATGACTCTTATTC
ATCTAATGTCCGCGGTGGGGCGTTGATATAGTAGGGGAAAAGTTATTGACGCTTGGCGA
GTCATGTCCATGTACCCTTTGAGTTCATGCTGTAGAGGTATCCCTTCTGAAGTGCAGACT
CGAAGACTTTGAACTTCGACCTAATGAAGCTGTGGCGGTGAATTTTGCCATTATGCTACA
CCATGTACCAGATGAAAGTGTGAACATTCATAATCATCGTGATAGGTTGCTGCGATTGGC
TAAACACATGTCTCCTAAGGTGGTGACTCTAGTTGAGCAAGAATCAACACCAATAACGC
TCCGTTCTTGCAGCGTTTCCCTCGAGACAATGAACTACTACTCAGCAGTTTATGAATCGAT
TGATGTTGTTCTTCCAAGGGATCACAAGAGAGGATTAATGTCGAACAACATGTTTGGC
TCGTGAAGTTGTGAACCTAGTAGCTTGCAGAGGGGAAGAAAGAGTGAACGTCACGAGCT
TCTGAGTAAGTGGAGAATGCGTTTACGATGGCTGGATTTACGCCTTATCCATTGAGCTC
CTTCATCAATCTTCAATCAAGAATCTTCTCGAGAGCTACCGTGGACATTACACCCTAGA
AGAGAGAGATGGTGCAGTCTTCTTGGTTGGATGAATCAAGATCTTATTGCTTCTTGTGC
TTGGAGATGAAAATATAATGACAGTTTCACTTTTGTACTGCAGGTTTTATGTTAGGCT
ATATGTATCATCATCCTATTTAGATTTACTCTTTTATTATACTCAAATAACTGTTTTGT
AAAAGAGCATCCTAAAACCTTGTACAAATACTAGTAACAGGCCTGATGGATTATATAG
CAGAATTTGTCT

```

```

MQTSQNHEISYGSDFRYVEPVQNLESYCLPSIENLDNYSSSDNSCQTFYPSHQTLFYPNT
LESASTSNNSLPYQNSPSTHSFSPNNSPGSTLRPQHSLEFVNGSPEEEDSYLIYHDHDL
RHKMSELESVMRGNVEMLEMYDTKVOEESASFLLLEAEKWKKNVEMVSRGDLKEMLYTCA
KAVDENDIETIENVMTELKIVSVSGSPIERLGAYMLEALVSKIASSGSTIYKSLKCEP
TGNELLSYMHVLYEICPYFKFGYMSANGAIAEAMKEENEVHIIDFQIGQGTQWVSLIQAL
ARRPGGPKIRITGIDDSYSSNVRGGVDIVGEKLLTLAQSCHVPFEFHAVRVYPSEVRL
EDFELRPNEAVAVNFAIMLHHVPDESJNIHNHRDRLRLAKHMSPKVVTLVEQEFNTNNA
PFLQRFLQFLETMNYYSAVYESIDVVLPRDHKERINVEQHCLAREVVNLVACEGEEERVERHEL
LSKWRMRFTMAGFTPYPLSSFINSSIKNLLSYRGHYTLEERD GALFLGWMNQDLIASCA
WR

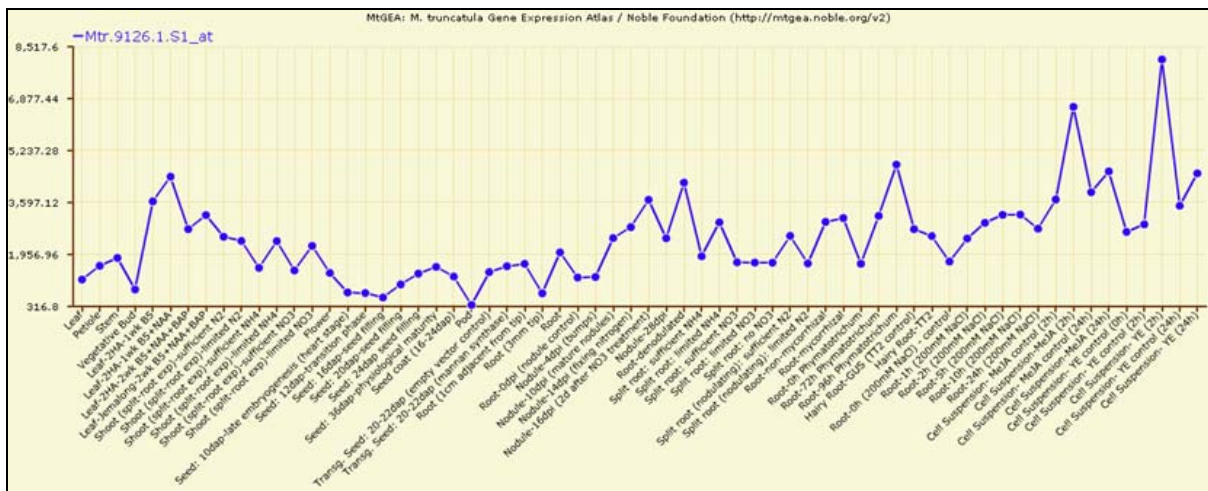
```

**Abbildung III.51: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Mtr.9126.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von Mtr.9126 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 3'-UTR Bereich. Das grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF11181. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich gelb markiert ist eine in GRAS Proteinen konservierte Domäne. Diese setzt sich zusammen aus dem ersten Leucin-reichen Abschnitt (kursiv und blau gedruckt), dem VHID-Motiv (grün hinterlegt), dem zweiten Leucin-reichen Abschnitt (kursiv und blau gedruckt), dem PHYRE-Motiv (grau hinterlegt und konservierte Aminosäuren fett gedruckt) und dem dreiteiligen SAW-Motiv (unterstrichen und konservierte Aminosäuren fett gedruckt), die im Detail im Text beschrieben werden.

Bei GRAS Proteinen handelt es sich um eine pflanzenspezifische Gruppe potentieller Transkriptionsfaktoren, die in verschiedenste Prozesse wie beispielsweise der Signaltransduktion involviert sind (Bolle, 2004). GRAS Proteine besitzen im C-terminalen Bereich eine etwa 350 Aminosäuren lange konservierte Domäne die sich in dieser Reihenfolge in fünf einzelne Motive unterteilen lässt: Leucin-reicher Abschnitt I, VHID-Motiv, Leucin-reicher Abschnitt II, PHYRE-Motiv und SAW-Motiv (Pysh et al., 1999; Bolle, 2004). Die Leucin-reichen Abschnitte variieren in ihrer Länge und können so genannten *heptad repeats* (Konsensussequenz: LX<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>L) enthalten, die



jedoch nicht in allen GRAS-Proteinen auftreten (Bolle, 2004). Das VIIHD- und das PHYRE-Motiv setzten sich ihrem Namen entsprechend aus den Konsensussequenzen VIIHD und PHYRE zusammen, wobei diese im ersten zusammenhängend und im zweiten durch andere Aminosäuren getrennt auftreten (Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2004). Das SAW-Motiv besteht aus drei einzelnen Untereinheiten mit den Konsensussequenzen  $RX_4E$ ,  $WX_7G$  und  $WX_{10}W$  (Bolle, 2004). In der Aminosäuresequenz von *Mtr.9126* konnten alle fünf für GRAS Proteine typischen Motive identifiziert werden (Abbildung III.51), wobei in den Leucin-reichen Abschnitten jedoch keine *heptad repeats* gefunden wurden. Des Weiteren erstreckt sich das SAW-Motiv in der Aminosäuresequenz von *Mtr.9126* bis Position 541, womit die GRAS-Domäne länger als bis zur von der PROSITE-Datenbank vorhergesagten Position 523 erscheint.



**Abbildung III.52:** Das Expressionsprofil von *Mtr.9126* aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA). Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von *Mtr.9126* in allen untersuchten Geweben von *M. truncatula*.

Das MtGEA-Expressionsprofil von *Mtr.9126* zeigte eine unspezifische Expression des Kandidatengens in allen untersuchten Geweben von *M. truncatula* (Abbildung III.52). Die Auswahl dieses Gens als Kandidatengens erfolgte ursprünglich aufgrund seiner Induktion in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita*. Die in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago* GeneChip Daten zeigten eine 2,3-fache Induktion in Wildtyp-Wurzeln dieses Stadiums, während in keinem anderen Mykorrhizastadium oder Mutante eine signifikante Induktion von *Mtr.9126* gemessen werden konnte (Tabelle III.1).

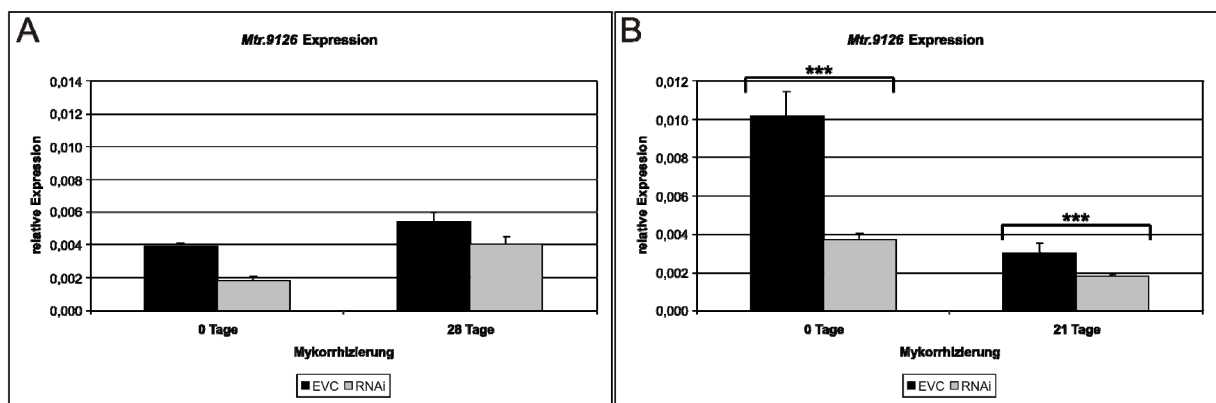
Um festzustellen, ob das *Mtr.9126* Genprodukt möglicherweise eine Rolle als *downstream* MtDMI3 agierender Transkriptionsfaktor in der AM-Symbiose spielt, wurde zunächst ein *knockdown* bzw. *knockout* des Kandidatengens mittels RNAi bzw. Insertionsmutagenese angestrebt, und bezüglich seiner Auswirkungen auf die AM-Symbiose untersucht.

### III.3.3.4.2 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.9126* ist abhängig von der Anzuchtmethode

Wie bereits in Abschnitt III.2.2 beschrieben, wurde zur Analyse von *Mtr.9126* mittels RNAi-*knockdown* das RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.9126* erstellt. Mit diesem Konstrukt sowie dem



leeren Kloniervektor pK7GWIWG2(II) als Kontrolle (EVC: *empty vector control*) wurden zunächst transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert und diese bezüglich eines RNAi-Effekts untersucht. Dies erfolgte parallel in transgenen, nicht-mykorrhizierten Wurzeln beider Konstrukte sowie in entsprechenden für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhizierten Wurzeln. Die Anzucht der Pflanzen fand routinemäßig in Seramis®-Substrat statt. *Real time* RT-PCR Messungen der transgenen Wurzeln zeigten, dass die relative Expression von *Mtr.9126* in den RNAi- im Vergleich zu den EVC-Wurzeln im Mittel zwar etwas niedriger war, dieser Effekt jedoch weder in den nicht-mykorrhizierten (mit  $p = 0,455$ ) noch in den mykorrhizierten (mit  $p = 0,188$ ) Wurzeln als signifikant bewertet werden konnte (Abbildung III.53 A).



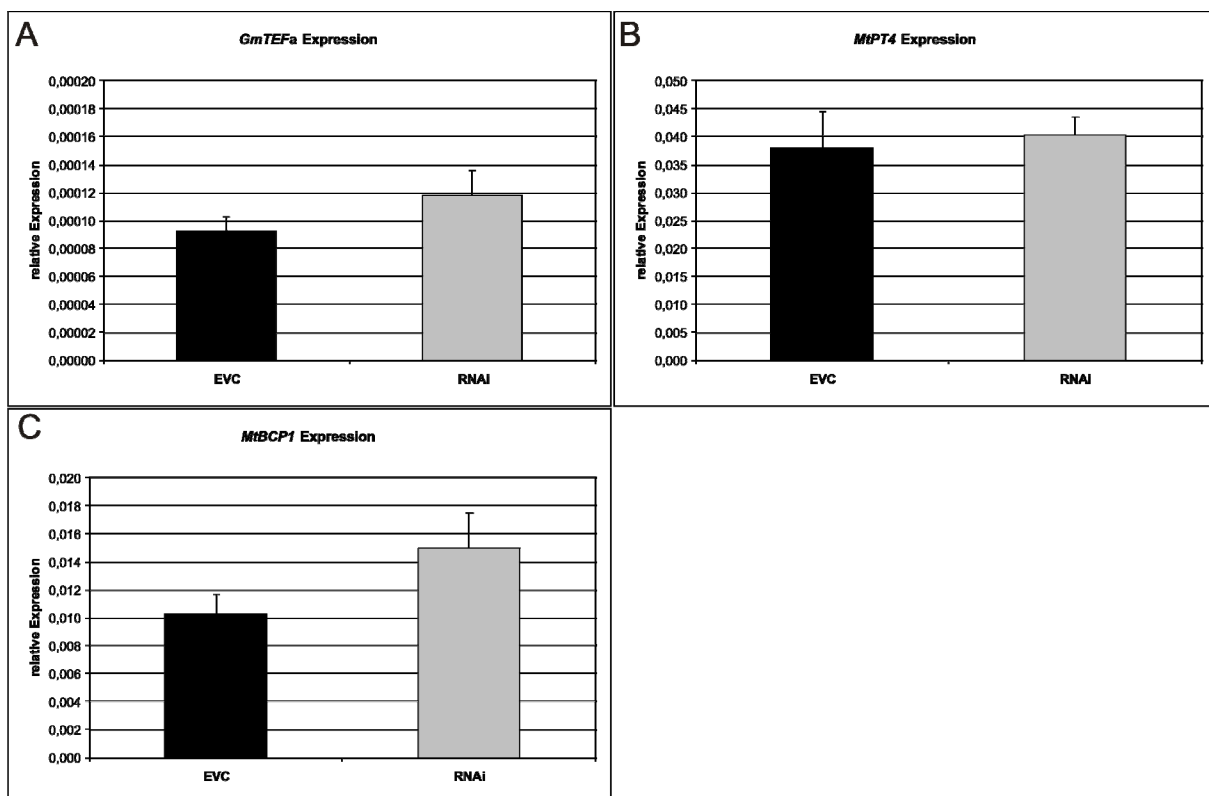
**Abbildung III.53:** Die relative Expression von *Mtr.9126* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.9126* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.9126* (graue Balken: RNAi) generiert wurden. Die Anzucht erfolgte wahlweise in Seramis® Substrat (A) oder steril auf Schrägagarplatten (B), wonach ein Teil der Pflanzen für 21 (B) bzw. 28 Tage (A) mit *G. intraradices* mykorrhiziert wurde. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus acht bzw. sieben unabhängigen Kontroll- und sieben bzw. elf unabhängigen RNAi-Wurzeln nach 0 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung nach der Anzucht in Seramis® Substrat sowie um Mittelwerte aus jeweils zwölf unabhängigen Kontroll- und zwölf bzw. zehn unabhängigen RNAi-Wurzeln nach 0 bzw. 21 Tagen Mykorrhizierung nach der sterilen Anzucht auf Schrägagarplatten. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.9 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Um eine mögliche Abhängigkeit des RNAi-Effekts von der Anzuchtmethode zu untersuchen, wurden in einem weiteren Ansatz erneut mit dem leeren Kloniervektor und dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert, wobei die Anzucht diesmal jedoch steril auf Schrägagarplatten (siehe Abschnitt II.2.5.2) erfolgte. Nach einer vierwöchigen Anzuchtphase wurde ein Teil der Pflanzen von den Schrägagarplatten in Seramis®-Substrat umgetopft und dort für 21 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert, da eine Mykorrhizierung auf Schrägagarplatten nicht möglich ist. Eine Untersuchung des RNAi-Effekts mittels *real time* RT-PCR zeigte in den Wurzeln der ausschließlich auf Schrägagarplatten angezogenen und nicht-mykorrhizierten Pflanzen eine hochsignifikante Reduktion der Transkriptmenge von *Mtr.9126* auf durchschnittlich 36,68 % (Abbildung III.53 B). In den Wurzeln der steril angezogenen aber zur Mykorrhizierung in Seramis®-Substrat umgetopften RNAi-Pflanzen war ebenfalls eine hochsignifikante wenn auch weniger starke Reduktion der *Mtr.9126*-

Expression auf im Mittel 58,31 % feststellbar (Abbildung III.53 B). Aus dem Vergleich der beiden Anzuchtmethoden lässt sich schließen, dass die sterile Anzucht die Ausprägung eines durch das Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.9126 ausgelösten RNAi-Effekts begünstigt. Der Einfluss der Anzuchtmethode auf die Ausprägung des RNAi-Effekts wurde auch für die anderen im Rahmen dieser Arbeit erstellte RNAi-Konstrukte untersucht, in keinem anderen Fall konnte jedoch ein so deutlicher Unterschied festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

### III.3.3.4.3 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.9126* hat keine Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen

Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte in den auf Schrägagarplatten angezogenen und anschließend für 21 Tage in Seramis®-Substrat mit *G. intraradices* mykorrhizierten RNAi-Wurzeln des Konstrukts pK7GWIWG2:Mtr.9126 eine im Mittel etwa 40 % niedrigere *Mtr.9126* Expression als in entsprechend behandelten EVC-Wurzel gemessen werden. Um den Einfluss der Reduktion der *Mtr.9126* Transkriptmenge auf die Ausbildung der AM-Symbiose zu untersuchen, wurde die Expression der zuvor bereits beschriebenen AM-Markergene *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4* und *MtBCP1* mittels *real time* RT-PCR in diesen Wurzeln bestimmt.



**Abbildung III.54:** Die relative Expression von *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEF $\alpha$*  (A), *MtPT4* (B) und *MtBCP1* (C) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.9126 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus zwölf Kontroll- und zehn RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.10 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

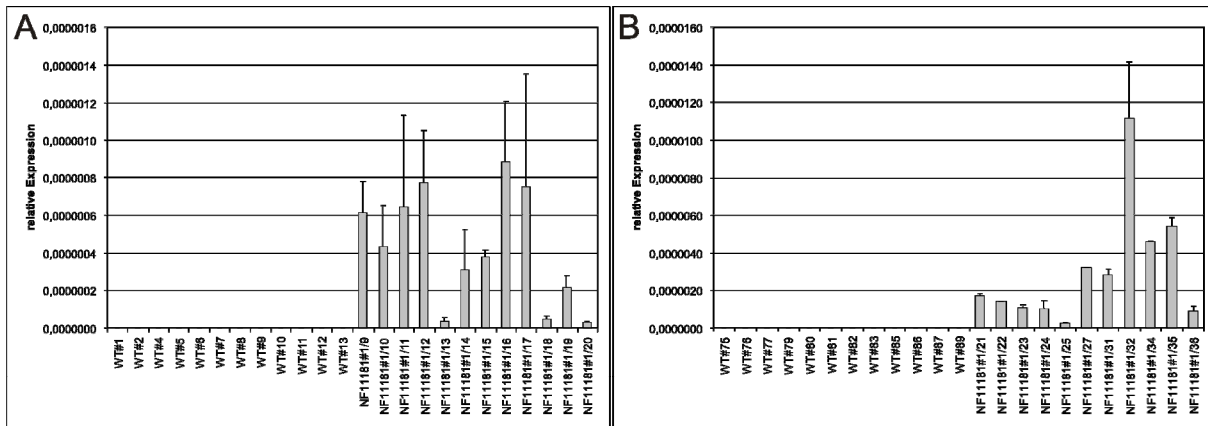
Dabei zeigte sich jedoch für keines der drei Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen RNAi- und EVC-Wurzeln (Abbildung III.54).

Dies könnte einerseits darauf hindeuten, dass das Genprodukt von *Mtr.9126* keine entscheidende Rolle in der AM-Signaltransduktion spielt oder andererseits lediglich darauf hinweisen, dass eine Reduktion der *Mtr.9126* Transkriptmenge um durchschnittlich etwa 40 % nicht ausreichend ist um diesbezügliche Auswirkungen beobachten zu können. Um dies zu klären, wurden neben dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt, Insertionsmutanten des Kandidatengens untersucht.

#### **III.3.3.4.4 Identifikation und Verifikation homozygoter Tnt1-Insertionsmutanten für das Gen *Mtr.9126***

Ein von der *Noble Foundation* (Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) durchgeführter *reverse screening* Ansatz konnte für das Kandidatengen *Mtr.9126* die Tnt1-Insertionslinie NF11181 identifizieren. In dieser Linie sitzt das Retrotransposon Tnt1 655 bp *downstream* des Startcodons in 3'-5'-Orientierung im Kodierbereich des Kandidatengens (Abbildung III.51). Durch die Insertion des Retrotransposons an dieser Stelle wird im Leseraster der *Mtr.9126* Gensequenz an Position 27 der Tnt1-Insertion ein vorzeitiges Stopcodon (TAA) erreicht, was voraussichtlich zu einem verfrühten Transkriptionsstop und einem anschließenden NMD-Abbau des verkürzten Transkripts führt. Selbst für den Fall, dass dieses verkürzte Transkript dem NMD-Abbau entgeht, ist von keinem funktionellen Genprodukt auszugehen, da das entstehende Transkript durch die Tnt1-Insertion bereits im ersten Leucin-reichen Abschnitt der GRAS-Domäne abbrechen würde. Daher ist bei einer homozygoten Tnt1-Insertion an dieser Stelle von einem vollständigen *knockout* von *Mtr.9126* auszugehen. Angaben bezüglich der Lage weiterer Tnt1-Insertionen waren für die Linie NF11181 bis dato nicht in der Tnt1-Datenbank (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>) verfügbar.

Über eine, analog zu der in Abschnitt III.2.3 beschriebenen durchgeführte, Genotypisierung von R1-Pflanzen der Line NF11181 konnten insgesamt vier Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.9126* identifiziert werden (Tabelle III.4). Eine dieser Pflanzen (NF11181#11) blühte zwar, produzierte daraufhin aber keine Samen, so dass alle weiteren für diese Linie durchgeführten Analysen auf den Nachkommen der drei verbliebenen homozygoten Pflanzen NF11181#1, NF11181#2 und NF11181#9 basierten. Nachkommen dieser Pflanzen wurden für vier Wochen unter gleichen Bedingungen wie entsprechende *M. truncatula* R108 Wildtyp-Kontrollen angezogen und anschließend jeweils zur Hälfte für 14 und 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert.

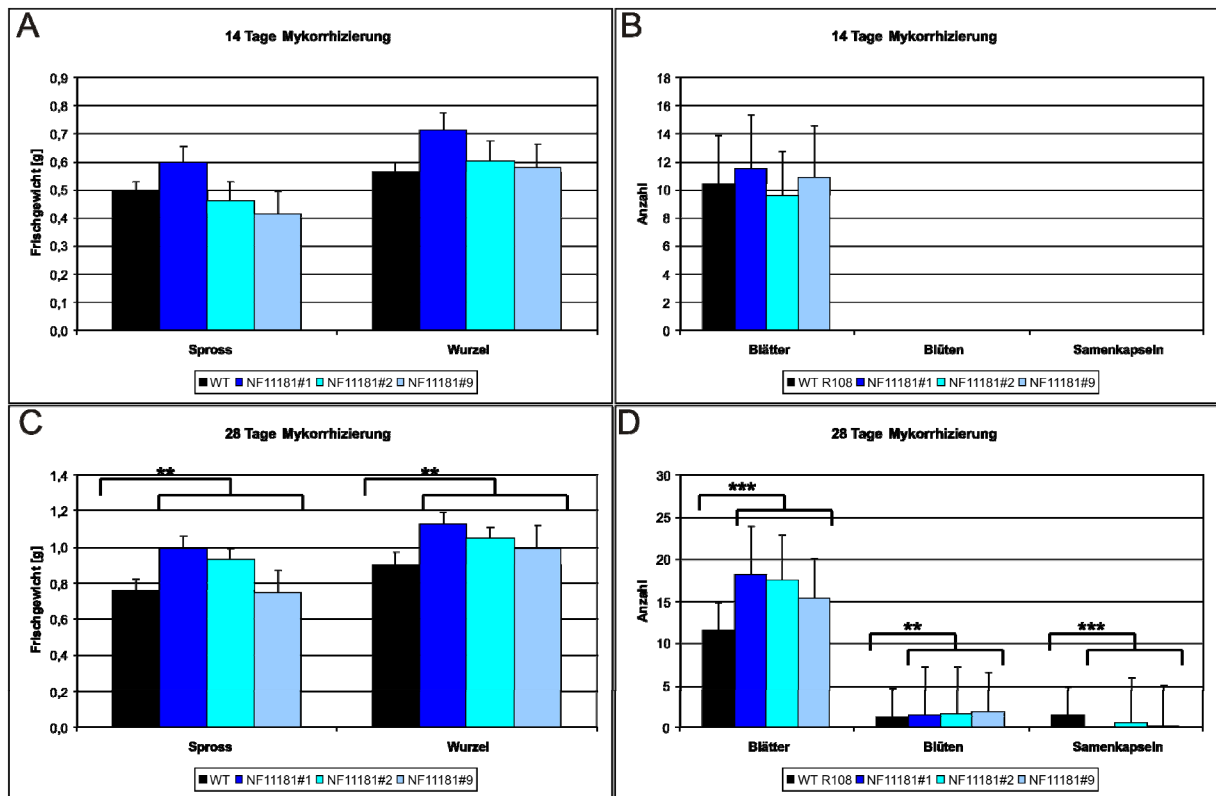


**Abbildung III.55:** Die relative Expression eines Tnt1-spezifischen *Mtr.9126*-Amplifikats in *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11181. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression eines Tnt1-spezifischen (graue Balken) *Mtr.9126*-Amplifikats in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (WT#1-13, WT#75-89) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF11181#1 (NF11181#1/9-36) nach 14 (A) und 28 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Zur Bestätigung der korrekten Tnt1-Insertion in den Insertionsmutanten und zur anschließenden Messung von AM-Markergenen wurden die Wurzeln der homozygoten NF11181#1-Nachkommen einer RNA-Extraktion unterzogen. Zunächst sollte mittels *real time* RT-PCR mit genspezifischen und Tnt1-spezifischen Primerpaaren die korrekte Insertion des Retrotransposons in *Mtr.9126* bestätigt werden. Allerdings konnte für die genspezifische Messung trotz mehrerer Versuche kein ausreichend spezifisches Primerpaar identifiziert werden, so dass diese letztendlich entfiel. Für das Tnt1-spezifische Primerpaar, mit je einem Primer auf dem Gen und auf dem Retrotransposon, konnte wie erwartet ein spezifisches Fragment in den Insertionsmutanten, nicht aber im Wildtyp, amplifiziert werden (Abbildung III.55). Dies bestätigte, dass die Tnt1-Insertion in allen Insertionsmutanten an der erwarteten Position sitzt.

### III.3.3.4.5 Tnt1-Insertionsmutanten von *Mtr.9126* weisen eine erhöhte Biomasse auf

Zum Zeitpunkt der Wurzelernte wurden alle Insertionsmutanten und Wildtyp-Pflanzen im Alter von 6 (14 Tage Mykorrhizierung) und 8 (28 Tage Mykorrhizierung) Wochen zunächst phänotypisch charakterisiert. Dabei zeigte sich nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung zunächst kein signifikanter Unterschied zwischen den Insertionsmutanten und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen. Blüten und Samenkapseln ließen sich in diesem Stadium nicht beobachten, die Anzahl der Blätter sowie das Frischgewicht von Spross und Wurzeln der Nachkommen von NF11181#1, NF11181#2 und NF11181#9 waren den Wildtyp-Pflanzen im Mittel sehr ähnlich (Abbildung III.56 A und B).



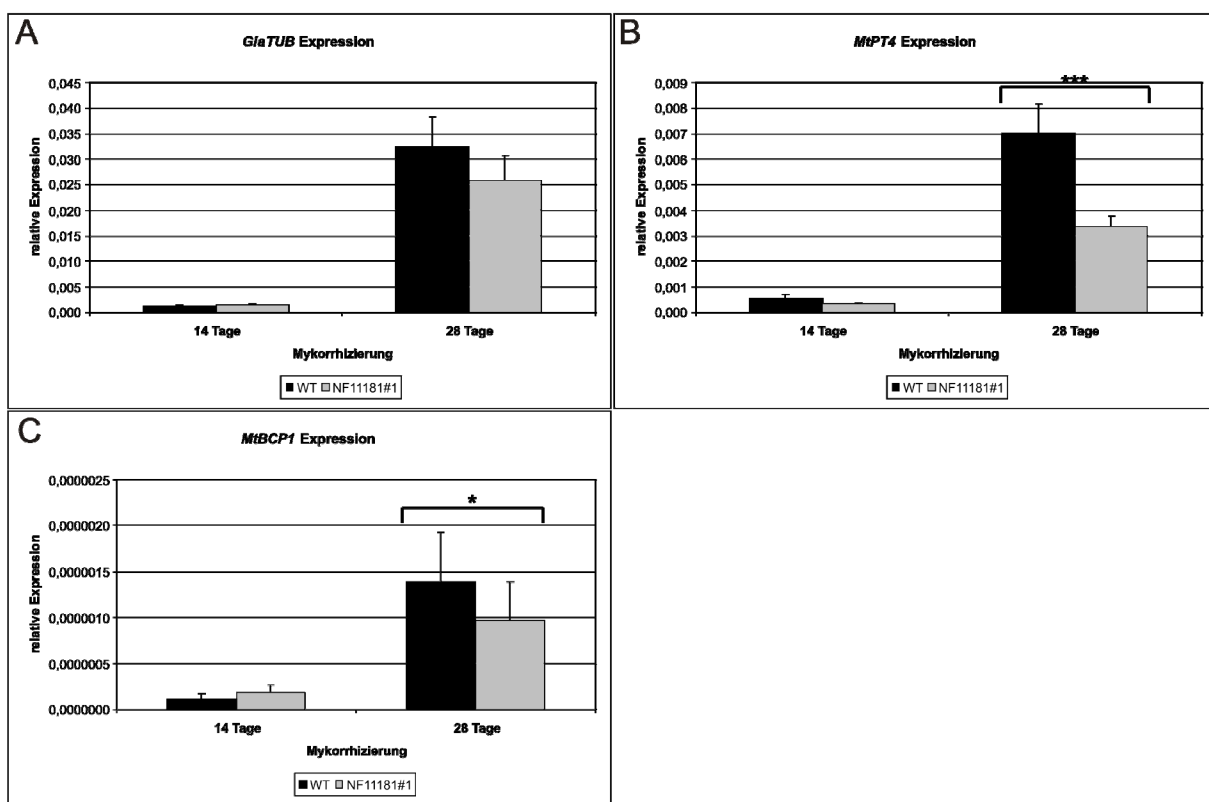
**Abbildung III.56:** Phänotypische Charakterisierung von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF1181. Dargestellt ist das Frischgewicht von Spross und Wurzeln (A und C) sowie die Anzahl der Blätter, Blüten und Samenkapseln (B und D) von *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken) und von Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutanten NF1181#1 (dunkelblaue Balken), NF1181#2 (mittelblaue Balken) und NF1181#9 (hellblaue Balken) nach 14 (A und B) und 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus 42 Wildtyp-Pflanzen, 16 NF1181#1-Nachkommen, 14 NF1181#2-Nachkommen und 12 NF1181#9-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung sowie 45 Wildtyp-Pflanzen, 18 NF1181#1-Nachkommen, 14 NF1181#2-Nachkommen und 14 NF1181#9-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung wiesen die Insertionsmutanten eine signifikant höhere Biomasse als die Wildtyp-Pflanzen auf. Die durchschnittliche Wildtyp-Pflanze hatte ein um 0,14 g und 0,16 g geringeres Spross- und Wurzelgewicht als die Insertionsmutanten (Abbildung III.56 C). Zudem besaßen die Nachkommen von NF1181#1, NF1181#2 und NF1181#9 hochsignifikant mehr Blätter und signifikant mehr Blüten als der Wildtyp (Abbildung III.56 D). Allein die Anzahl der Samenkapseln war in den Wildtyp-Kontrollen hochsignifikant höher als in den *Tnt1*-Insertionsmutanten (Abbildung III.56 D). Während die Wildtyp-Pflanzen zu diesem Zeitpunkt im Mittel 1,46 Samenkapseln besaßen, waren es für die durchschnittliche Insertionsmutante lediglich 0,28.

### III.3.4.6 In *Tnt1*-Insertionsmutanten von *Mtr.9126* ist die Expression von AM-Markergenen beeinträchtigt

Anhand der zuvor isolierten RNA wurde mittels *real time* RT-PCR die Expression der AM-Markergene *GiaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* in den für 14 und 28 Tagen mykorrhizierten Wurzeln der

NF11181#1-Nachkommen und entsprechender Wildtyp-Kontrollen bestimmt. Dabei zeigte sich nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung zunächst für keines der drei Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen den Wildtyp-Pflanzen und den Insertionsmutanten (Abbildung III.57). Nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung war die Expression von *GiaTUB* in den NF11181#1-Nachkommen durchschnittlich etwas geringer als in den Wildtyp-Pflanzen, dieser Unterschied erwies sich jedoch mit  $p = 0,253$  als nicht signifikant (Abbildung III.57 A). Die in Arbuskeln induzierten Markergene *MtPT4* und *MtBCP1* hingegen, waren hochsignifikant auf im Mittel 47,93 % (mit  $p = 0,001$ ) und signifikant auf durchschnittlich 69,64 % (mit  $p = 0,081$ ) des in den Wildtyp-Kontrollen gemessenen Expressionsniveaus reduziert (Abbildung III.57 B und C). Dies könnte möglicherweise auf reduzierte Anzahl oder Funktionalität der Arbuskeln in den Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF11181#1 hinweisen.



**Abbildung III.57:** Die relative Expression von *GiaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11181. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A), *MtPT4* (B) und *MtBCP1* (C) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken: WT) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF11181#1 (graue Balken: NF11181) nach 14 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF11181#1-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung und zwölf Wildtyp-Pflanzen und elf NF11181#1-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.11 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Zusammenfassend lässt sich die Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktor Mtr.g126 in der AM-Symbiose anhand der erzielten Daten nicht eindeutig klären. Auffällig ist zunächst einmal die erhöhte Biomasse der NF11181-Insertionsmutanten. Zugleich zeigten sie jedoch auch eine

signifikant niedrigere Expression der AM-Markergene *MtPT4* und *MtBCP1*, so dass die erhöhte Biomasse vermutlich nicht auf eine verbesserte Mykorrhizierung der Insertionsmutanten zurückzuführen ist. Dies deutet darauf hin, dass *Mtr.9126* möglicherweise eine Rolle in der AM-Symbiose, aber darüber hinaus vermutlich auch in anderen Bereichen, spielt.

### III.3.3 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.25945*

#### III.3.3.1 Der MYB-Transkriptionsfaktor *Mtr.25945*

Das als potentieller MYB-Transkriptionsfaktor annotierte Kandidatengen *Mtr.25945* liegt auf dem sechsten Chromosom von *M. truncatula*. Neben der 2.318 bp langen genomischen Sequenz von *Mtr.25945*, die in der Version 3.5 des *M. truncatula* Genoms (Young *et al.*, 2011) den Bezeichner *Medtr6g092540* trägt, konnte in der EST-Datenbank von *M. truncatula* (*DFCI Medicago Gene Index*) zudem das *Mtr.25945* entsprechende EST-Cluster *TC180543* identifiziert werden.

```

AACCAATTAATAGTGTGGTGTGCGTCCAATTTTCACAAATCCACTGCTCACACCCAT
CAATCATCATATATATCACCAGACACATAAGTTCTTTTGTGTGGATCTCTAATTTCAAT
TTCTCCCTCTAAGAGACAATAAACACAAGTTTAAAGGTTAAGGTTTGTGTCGGTTCAAAA
AATGGGCAGAAAGTGCTCACATGTGGAAACATAGGTCATAATCAAGACTTGTAAAT
CATTAAGAGGAAGTGGTAGTTTGTGGAGTTAGACTTTTGGTGTCAACTTGATTTAT
CTTCTTCTGTGTTCCATGAAAAAGAGTTTAGCATGGATCTTTTCTACTTCATCTT
CTTCTCCTACTTCTTCTTTTCTTCTTCAAGATTAACCATTGATGATAGAGCCTCTATTG
GTTATCTTTCAGATGGTCTCATAGTTCGTACACAAGAAAGGAAAAAAGGTACATATATTG
TAATACATTTGTAAATTTTTAATTTAGATTCAAATTTTATCAAGACATCGGATGCAGGAT
ACACATAAGATACAGTGCATCCATTTTAAAGTATATGGATTTCAAAGAAAGCCTATG
ATGTATTTATTAAGACACTTATTAATACTACTATTTATTTCTTGTCTCAATCAATT
CTAGGTGGTTCATCTATAATTTAAATTTATGATTTAGAATGTTAAATGAAATTAACATC
TAACAAGTTTTTTTTGATATTTTGTATTTTATTCATTAGGAGTCCATGGACAGAAGAA
GAGCATAGAAAATTCCTTGGTGGACTTGAGAAGCTTGAAAAGGAGATTGGAGGGGTATC
TCTAGAAACTATGTGACTACAAGAACCAACACAAGTTGCAAGCCATGCTCAAAAGTAT
TTTATTCGACTTGCAACCTGGAATAAGAAGAAGAGACGTTCAAGTCTCTTTGACATGGA
TATATTATATAATTTTCATGACCAACTAAGTACACTCCTTTCTAATTTATATATATA
AAAAAATTCCTCGTTCCTAATCATGAAATATGCATTTTCAATGAAATTAATGAAATGCAT
ACTTCATGTTTCATTCATATTTAAAAGTCTCACATTTAATAAAATCAGGTTTATAAAAG
AGTTTGTAGGTGGAAAAATTTTACTTCTTTACAAGCCATTTTATAAAAGAGTTTTTTT
TATTCTCTGATTTCTTAAAAGCATAACCCTCCAAATTTGAAAAGGCACGAATGCGTTT
GATGTATAATCCATAAAATGTGTTTTTCCGTTAAATGACGAAATTCATGTGAGTGGT
TTTTAAGAATCATGGTGGCCGAAAAATCTTCTTTTATGATTGTGGATTAGGAACAAC
CAAAATCTAAAATAACATTAAGCCTATAAAAAATTTACCCGATGACTCTAAGATCACTT
GAAGTCATGCTTGAGATAGTCAATCTTAGCTATAAGGGGTGTGTTAAGAGTTCCAAATAT
GCTTAGAGGAAACAAATTTGGTTTTCGATGTATAGAGACTTATTTGTCTATGACAAATAA
AAAACATCAAATGTCAGTGAATTAGTCCTTATGAGACTAATTTAACCAGTCAATTAATA
TTTTTTAGTTATTTTAGTTTTTCAAAAACATGACAATTTTTTCAATAATGTTTTTTT
TCTCAACAAACCAATTTGGATATTTACATTTTATACAATGAAAAACAAGTATTAATCTCT
TAAATGGAATGATATTGTGGAATTTTTTTAGGTTGGTAGTGGCAAGACAAAACAAACAGT
TGATCCAAATAACAGTTCTAAAAGCAAGTCAGGAGATTAGTTTGTAGACATGATCATGA
AGTTGAGAAAGATGCAACTTTGCTACTACTAATAAACTCACTTCAACAACAACCAAAATC
AGATGATTATGATATGCAAAAAATTTGAAGATGATCTGAAGAAGCAGAACATAAAGATGT
TCCAGATTGGCTACATCCTCTAACAAAGTCTTTAAATATGACATGGTGATACCAAAATC
TTCAAATGTAGCACCACCTGATCTTGAACCTAAGTCACTTGGCAGGGTCTAAGTCAAATAAC
GGAACAAGATAAAAACATCAAGTTCATTTCTTATTGGGCCAATTAGTGTCACTTAATTT
AGCTTAAATTTATATAAAATGTTTATATATTACTCCTTATGTATGTAATTTATGAGAAA
AATTTTGTTTTTTATTTACCTGTCAATTTTTTTAAAGTGTAGTGCAAATTAACATAAGTT
TGAACATGATATGTAATGCAAAGAAAGAAATAAGTGGAA

```

```

MGRKCSHCNIGHNSRTCNSLRGSGSFVGVRLFGVQLDLSSSCVSMKKSFSMDSFPTSSS
SPTSSSFSSRLTIDDRASIGYLSDLIVRTQERKKGVWPWTEEEHRKFLVGLKLGKGDWR
GISRNYVTRTPQVASHAQKYFIRLATLNKKRRSSLFDMVGSKTNKTVDPNNSKSK
SGDSVCRHDHEVEKDATLSLLINSLQQQTKSDDYDMQKIEDDSEEAHKDVPDLHLPLTK
SLNMTLVI PNSSNVAPPDLELTLAGSKSNMEQDKTSSSSFLIGPISVT*

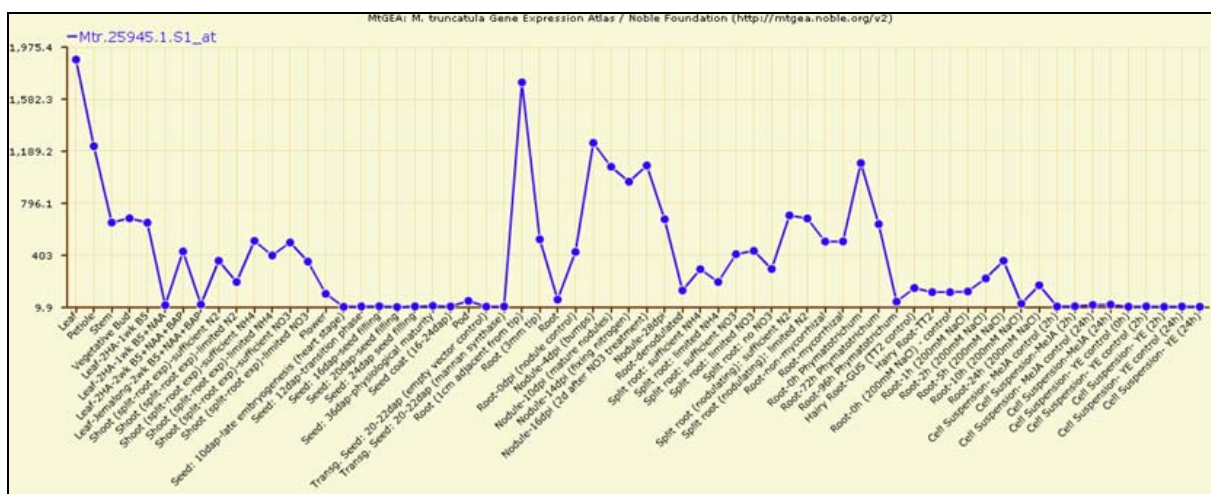
```



**Abbildung III.58: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Mtr.25945.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von Mtr.25945 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 5'-UTR und 3'-UTR Bereich. Grau hinterlegte Bereiche kennzeichnen Introns. Das erste grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF11714, das zweite die Tnt1-Insertionsstelle in der Insertionslinie NF11397. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt. Die mittels einer Motivsuche identifizierte Zinkfinger-Domäne und DNA-bindende MYB-Domäne sind pink und gelb hinterlegt.

Die genomische Sequenz von Mtr.25945 umfasst neben einem 181 bp langen 5'-UTR Bereich und einem 162 bp langen 3'-UTR Bereich zwei Introns, die beide von den für den Spleißvorgang wichtigen Nucleotiden GT und AG flankiert werden (Abbildung III.58).

In der 289 Aminosäuren langen abgeleiteten Proteinsequenz des Mtr.25945 Gens konnten über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist et al., 2010) eine Zinkfinger-Domäne und eine DNA-bindende MYB-Domäne identifiziert werden. Die Zinkfinger Domäne sitzt am äußersten N-terminalen Ende des Proteins von Position 3 - 18 (Abbildung III.58). Zinkfinger-Domänen ermöglichen Proteinen die Bindung oder Interaktion mit DNA und RNA Molekülen (Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008). In eukaryotischen Zellen spielen Zinkfinger-Proteine eine wichtige Rolle, unter anderem sind sie in Signaltransduktions- und Kontrollprozessen involviert (Ciftci-Yilmaz & Mittler, 2008). Bei der von Position 91 - 148 identifizierte DNA-bindenden MYB-Domäne (Abbildung III.58), handelt es sich um ein *helix-turn-helix* Motiv, das an spezifische DNA-Sequenzen binden kann (Stracke et al., 2001).



**Abbildung III.59: Das Expressionsprofil von Mtr.25945 aus dem Medicago truncatula gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von Mtr.25945 in Blättern, Spross, Wurzeln und Wurzelknöllchen von *M. truncatula*.

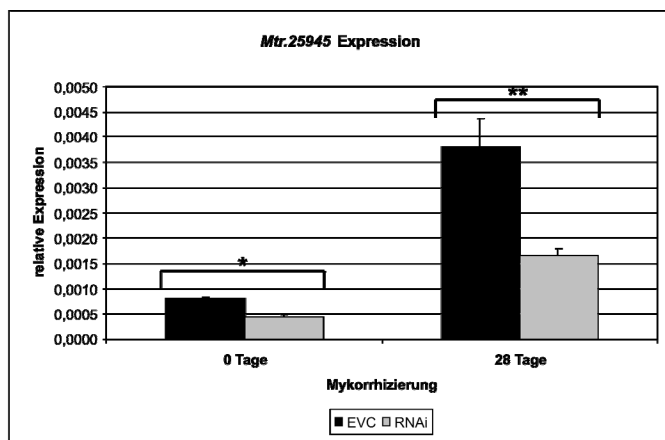
Die Auswahl von Mtr.25945 als Kandidatengen erfolgte, neben seiner Annotation als putativer Transkriptionsfaktor, aufgrund seiner Induktion in frühen Mykorrhiza-Stadien. So ließ sich für Mtr.25945 anhand von *Medicago GeneChip* Daten eine 2,1-fache Induktion in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* feststellen (Tabelle III.1). In entsprechend behandelten Wurzeln einer *dmj3*-Mutante konnte diese Induktion nicht beobachtet werden, was darauf schließen lässt, dass das Genprodukt von Mtr.25945 eine Rolle *downstream* von MtDMI3



spielt. Das MtGEA-Expressionsprofil von *Mtr.25945* zeigt eine unspezifische Expression des Kandidatengens in Blättern, Spross, Wurzeln und Wurzelknöllchen von *M. truncatula* (Abbildung III.59). Eine spezifische Induktion in mykorrhizierten Wurzeln ließ sich nicht erkennen.

### III.3.3.5.2 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.25945* zeigt keinerlei Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen und die Kolonisation durch *G. intraradices*

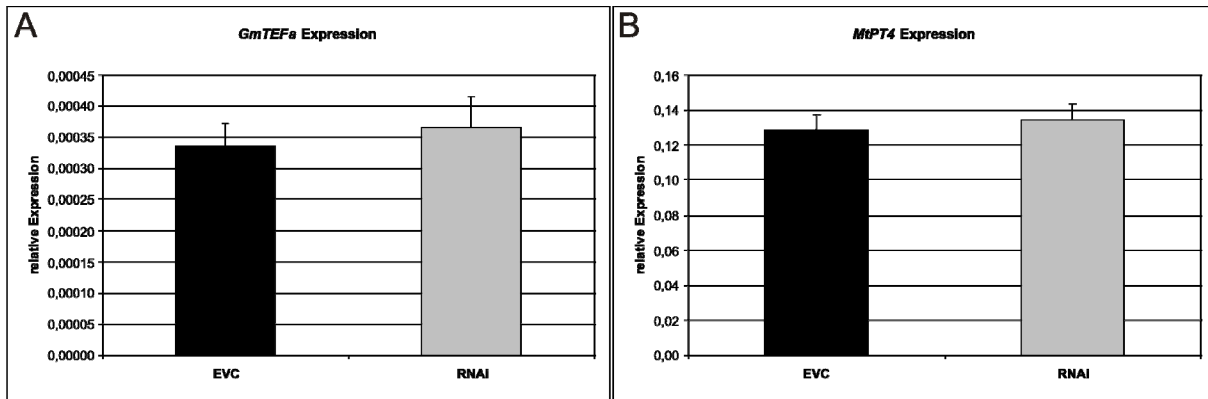
Zur Analyse von *Mtr.25945* mittels RNAi wurde das RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.25945* erstellt (Abschnitt III.2.2). Mit diesem Konstrukt, sowie dem leeren Kloniervektor pK7GWIWG2(II) (EVC: *empty vector control*) als Kontrolle, wurden zunächst transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert und diese bezüglich eines RNAi-Effekts untersucht. Dies erfolgte parallel in transgenen, nicht-mykorrhizierten Wurzeln beider Konstrukte sowie in entsprechenden für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhizierten Wurzeln. *Real time* RT-PCR Messungen zeigten, dass die relative Expression von *Mtr.25945* in den RNAi-Wurzeln signifikant niedriger als in vergleichbaren EVC-Wurzeln war (Abbildung III.60). Im Detail war eine durchschnittliche Reduktion der *Mtr.25945* Transkriptmenge auf 55,05 % (mit  $p = 0,058$ ) bzw. auf 42,93 % (mit  $p = 0,018$ ) in nicht-mykorrhizierten bzw. mykorrhizierten RNAi-Wurzeln nachweisbar. Dies zeigte, dass eine RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.25945* um ca. 50 % mit Hilfe des Konstrukts pK7GWIWG2:*Mtr.25945* erzielt werden konnte.



**Abbildung III.60:** Die relative Expression von *Mtr.25945* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.25945* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.25945* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils acht EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.12 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

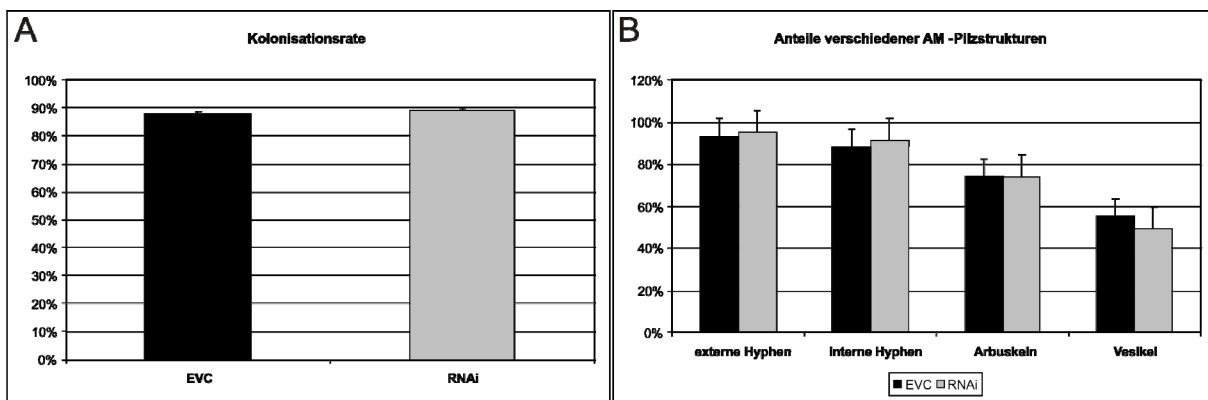
Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.12 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Um festzustellen ob die Reduktion der *Mtr.25945* Transkriptmenge Auswirkungen auf die Ausbildung der AM-Symbiose zeigte, wurde als nächstes die Expression der zuvor bereits beschriebenen AM-Markergene *GmTEF $\alpha$*  und *MtPT4* sowie die Kolonisationsrate durch *G. intraradices* in den für 28 Tagen mykorrhizierten RNAi-Wurzeln bestimmt. Für die anhand von *real time* RT-PCR Messungen ermittelte relative Expression von *GmTEF $\alpha$*  und *MtPT4* konnte dabei kein signifikanter Unterschied zwischen RNAi- und EVC-Wurzeln festgestellt werden (Abbildung III.61).



**Abbildung III.61:** Die relative Expression von *GmTEFα* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.25945 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils acht EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.13 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Die mit WGA-Alexa Fluor® 488 gefärbten EVC- und RNAi-Wurzeln wiesen starke Ähnlichkeiten auf. Sowohl die Kolonisationsrate als auch die Anteile der Hyphen, Arbuskeln und Vesikel zeigten keinerlei signifikante Unterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln (Abbildung III.62). Demzufolge wies die AM-Symbiose in den RNAi-Wurzeln keinerlei erkennbare Defizite auf. Dies bedeutet, dass der MYB-Transkriptionsfaktor *Mtr.25945* entweder keine entscheidende Rolle in der AM-Symbiose spielt, oder ein *knockdown* der *Mtr.25945* Transkriptmenge um 50 % nicht stark genug war um einen sichtbaren Effekt auszulösen. Daher wurde im Folgenden ein kompletter *knockout* des Gens mittels Insertionsmutagenese angestrebt.



**Abbildung III.62:** Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.25945 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils sechs EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.4 im Anhang zu entnehmen.

### III.3.5.3 Identifikation homozygoter Tnt1-Insertionsmutanten für das Gen *Mtr.25945*

Für die funktionelle Analyse von *Mtr.25945* wurde zunächst die Tnt1-Insertionslinie NF11397 identifiziert. In dieser Linie war das Retrotransposon Tnt1 1.257 bp *downstream* des Startcodons in 3'-5'-Orientierung inseriert (Abbildung 25945.1). Dieser Insertionsort liegt etwa mittig im zweiten Intron des Gens. Prinzipiell ließ sich nicht vorhersagen, welche Auswirkungen eine solche Insertion in einer Intronsequenz auf das *knockout* des entsprechenden Gens haben würde. Weitere Analysen dieser Insertionslinie waren allerdings auch nicht möglich, da für die Linie NF11397 keinerlei Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.25945* identifiziert werden konnten (Tabelle III.4).

Im Anschluss an die für NF11397 durchgeführten Analysen stand in einem weiteren Ansatz eine zweite Tnt1-Insertionslinie für *Mtr.25945* zur Verfügung. In der Linie NF11714 sitzt das Retrotransposon Tnt1 in 3'-5'-Orientierung zwischen dem 9. und 10. Basenpaar *downstream* des Startcodons im Kodierbereich von *Mtr.25945* (Abbildung III.58). Anhand einer, analog zu der in Abschnitt III.2.3 beschriebenen, durchgeführten Genotypisierung von R1-Pflanzen der Linie NF11714, konnten sieben Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.25945* identifiziert werden (Tabelle III.4), deren Saatgut geerntet wurde und für künftige Analysen zur Verfügung steht.

### III.3.3.6 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.38547*

#### III.3.3.6.1 Der MYB-Transkriptionsfaktor *Mtr.38547*

Das als potentieller MYB-Transkriptionsfaktor annotierte Kandidatengens *Mtr.38547* liegt auf dem dritten Chromosom von *M. truncatula*. Die 934 bp lange genomische Sequenz des Gens trägt den Bezeichner Medtr3g101290.

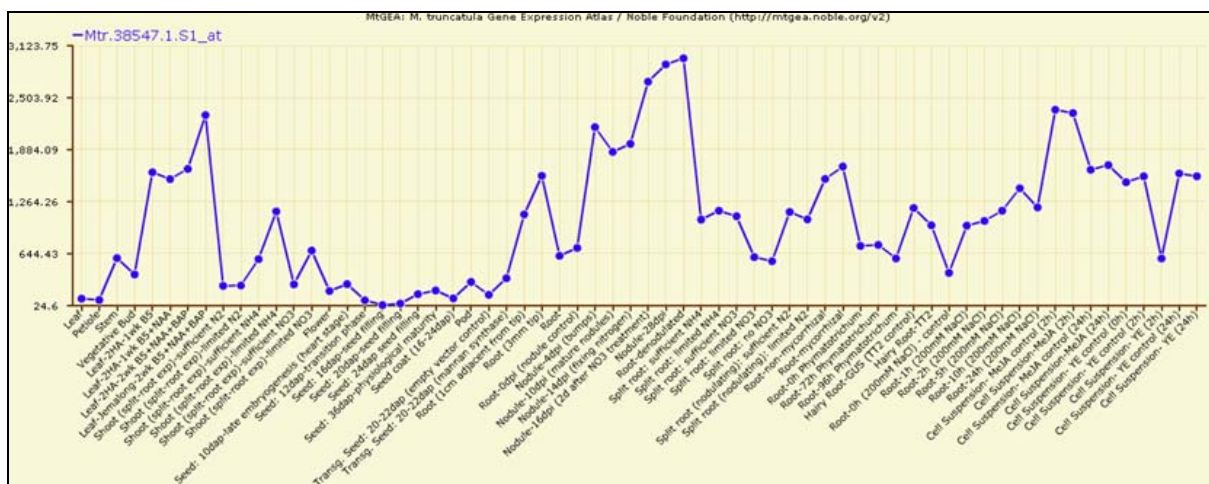
```
GCTACTATACTTTCTAACATATATCATATCAAACATTCACTATTACTATATACTCAAATA
ATAACGCTATG GATTTGAATATGAATTTTGAAGCTATTAATAGAAGCTCTCAACAACAA
CATCATCATCAGACTCATGTTCCCTCAGAAACAAACCAAAACAACTAGACAGAATCAAAG
GTCCATGGAGTGCAGAAGAAGACAGAATTTTAACACGACTGGTTGAACAACAT GGAGCA
AGAACTGGTCACTCATCAGCCGTACATAAAAAGGTCGTCCGGCAAGTCATGTCGTCTC
CGGTGGTGTAATCAGCTGAGTCCCACCGTGGAACACCGTCCATTTTCTTCAAGAAGAT
GAAACAATCATAGCGGCATGCTCAATATGGTAACCGTTGGGCTACCATTGCAAGGCTT
TTACCTGGTAGAAGTATAATGCTGTCAAGAATCATTTGGAAGTCTACGCTTAAGCGTAGA
GCGGGTTGTGGTGGTTCTGTTACGGTTGCTGGAGGTGGCAACGAAGGTGGTCAGTTTACT
TTTCCGTTGGAAGATGATCCGTTGACCGGTTGACTCTTGCTCCTCCGGGG AATGGTGT
GGAAGATAGGGAGGAAATGGTTGGTGATCATCGGTTTCCCTCGCCGAAAATGTTCCGAC
TGAGTTTGGGATGTGATGAGAGGTGTTATTGCAAGAGAAGTTAGGGAATATGTTTCTTC
TAATTTTCTCATAACTCTAGTTTTTCAT TGAATTGAATTAGTTAACGATATCAATAATCA
TGTTACACAAAAAAAAAAAAATGTATTAATAATCATGATCATATTTTTTTCTTTCTGT
TATTACTTTAGTTTAAGGAAATTTATATAATTACTCTGCACTTGGATTTTGCTACAAA
CTCAGATTTCAATTCTCTTTCTGGATTATTATTAGT
```

```
MDLNMNFEAINRSSSTTTSSSDSCSSETNQN KLDRIKGPWSAEEDRILTRLVEQHARNW
SLISRYIKGRSGKSCRLRWCNQLSPTVE HRPFSSQEDETI IAAHAQYGNRWAT IARLLPG
RTDNAVKNHWNSTLKRRA GCGGSVTVAGGGNEGGQFTFPLEDDPLTALT LAPPGNGVEDR
EEMVGDHRRFPSPENVPTEFWDMRGMVIAREVREYVSSNFSHNSFFH
```

**Abbildung III.63: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Mtr.38547.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von Mtr.38547 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte markieren den entsprechenden 5'-UTR und 3'-UTR Bereich. Das erste grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF11581, das zweite die Tnt1-Insertionsstelle in der Insertionslinie NF4095. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich in gelb markiert sind zwei mittels Motivsuche identifizierte DNA-bindende MYB-Domänen.

Neben der genomischen Sequenz konnte in der EST-Datenbank von *M. truncatula* (DFCI *Medicago Gene Index*) zudem das Mtr.38547 entsprechende EST-Cluster TC178504 identifiziert werden. Das intronfreie Gen wird von einem 68 bp langen 5'-UTR Bereich und einem 185 bp langen 3'-UTR Bereich flankiert, die die Kodiersequenz von Mtr.38547 auf insgesamt 681 bp verkürzen (Abbildung III.63). Die abgeleitete Proteinsequenz von Mtr.38547 umfasst 226 Aminosäuren. Über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist et al., 2010) konnten in dieser Sequenz zwei benachbarte DNA-bindenden MYB-Domänen von Position 32 - 87 und 89 - 138 identifiziert werden (Abbildung III.63).

Das MtGEA-Expressionsprofil von Mtr.38547 zeigt eine unspezifische Expression des Kandidatengens in Spross, Wurzeln und Wurzelknöllchen von *M. truncatula* (Abbildung III.64).



**Abbildung III.64: Das Expressionsprofil von Mtr.38547 aus dem *Medicago truncatula* gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine unspezifische Expression von Mtr.38547 in Spross, Wurzeln und Wurzelknöllchen von *M. truncatula*.

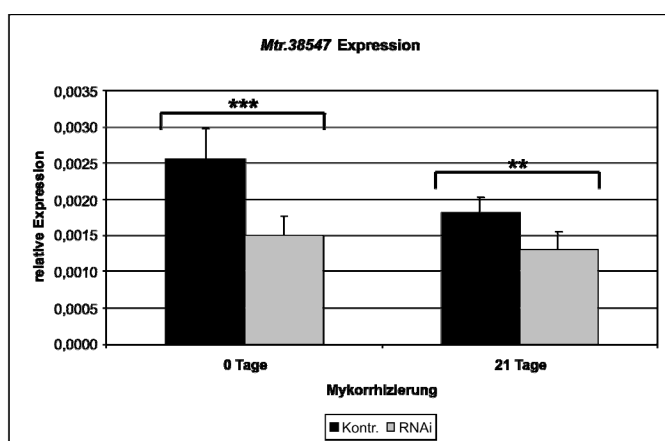
Die Auswahl von Mtr.38547 als Kandidatengen erfolgte aufgrund seiner spezifischen Expression in der Prä-Kontaktphase und der frühen Kontaktphase der AM-Symbiose, wie sich anhand der in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago* GeneChip Daten beobachten ließ. So konnte in der Prä-Kontaktphase für dieses Gen in Wildtyp-Pflanzen eine 3,8-fache bzw. 1,5-fache Induktion nach einer 6-stündigen Inkubation mit Sporen bzw. Überständen gekeimter Sporen von *G. intraradices* beobachtet werden, die nach einer entsprechend durchgeführten 24-stündigen Inkubation bereits nicht mehr nachweisbar waren (Tabelle III.1). In *M. truncatula* Wildtyp-Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* zeigte Mtr.38547 eine 1,9-fache Induktion, was zudem auf eine Aktivität des Genprodukts in der frühen Kontaktphase der AM hinweisen könnte (Tabelle III.1). Sämtliche dieser Induktionen konnten in einem dem Wildtyp entsprechenden

Expressionsniveau auch in *dmi3*-Mutanten nachgewiesen werden (Tabelle III.1). Sofern das *Mtr.38547* Protein eine Rolle in der Signaltransduktion der AM spielt, lässt dies vermuten, dass es sich um eine CSP-unabhängige Funktion handelt, da für einen Transkriptionsfaktor eine Rolle *upstream* *MtDMI3* nur schwer vorstellbar ist. In späteren Mykorrhizastadien konnte keine Induktion des *Mtr.38547* Gens beobachtet werden (Tabelle III.1).

Eine im Rahmen einer Masterarbeit durchgeführte Analyse der Promotorregion von *Mtr.38547* zeigte eine generell sehr starke Promotoraktivität dieses Gens, für die jedoch kein offensichtlicher Bezug zur AM-Symbiose hergestellt werden konnte (Schaepe, 2011). Zur weiterführenden Untersuchung einer potentiell Symbiose-assoziierte Funktion des Genprodukts von *Mtr.38547* wurde daher ein RNAi-vermitteltes *knockdown* bzw. ein *knockout* durch Tnt1-Insertionsmutanten dieses Gens untersucht.

### III.3.3.6.2 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.38547* beeinträchtigt die Expression von AM-Markergenen nicht

Im Rahmen einer Masterarbeit (Schaepe, 2011) wurden mit Hilfe des gegen das Kandidatengen *Mtr.38547* gerichteten RNAi-Konstrukts pK7GWIWG2:*MtMyb2* sowie des Kontrollkonstrukts pK7GWIWG2:*GUS* transgene, haarige Wurzeln in *M. truncatula* induziert, teilweise für 21 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert, und anschließend einer RNA-Extraktion unterzogen. Ein Teil der Pflanzen verblieb dabei nicht-mykorrhiziert. *Real time* RT-PCR Messungen der extrahierten RNA zeigten einen signifikanten RNAi-Effekt in mykorrhizierten und einen hochsignifikanten RNAi-Effekt in nicht-mykorrhizierten Wurzeln (Abbildung III.65). Im Mittel war die Expression von *Mtr.38547* in nicht-mykorrhizierten RNAi-Wurzeln auf 59,23 % (mit  $p = 0,006$ ) und in mykorrhizierten RNAi-Wurzeln auf 71,49 % (mit  $p = 0,046$ ) des in den entsprechenden Kontrollwurzeln gemessenen Expressionsniveaus reduziert.

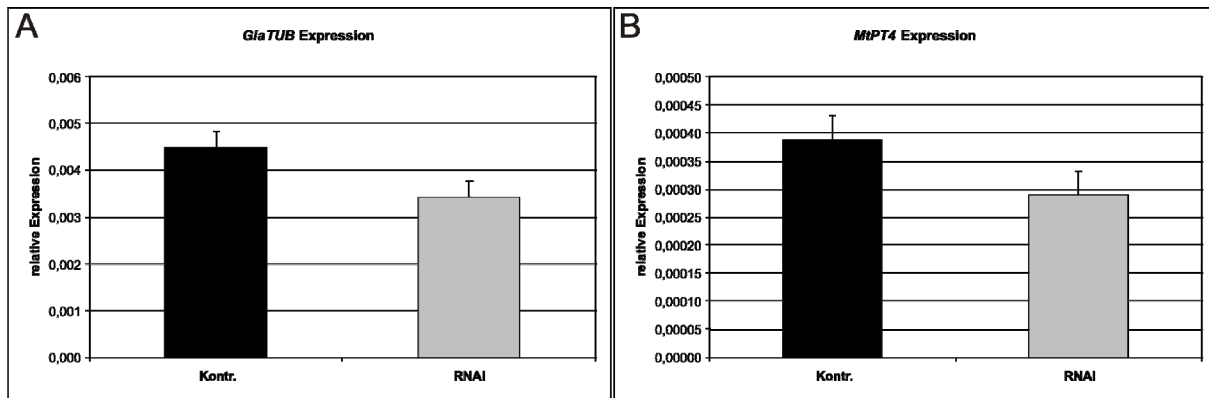


**Abbildung III.65:** Die relative Expression von *Mtr.38547* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.38547* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:*GUS* (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.38547* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2: *MtMyb2* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 bzw. 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils neun nicht-mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln sowie

jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln nach 21-tägiger Mykorrhizierung. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.14 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

Somit lag in den mykorrhizierten RNAi-Wurzeln eine durchschnittlich etwa 30 % niedrigere *Mtr.38547* Transkriptmenge vor, was zwar ein eindeutiger RNAi-Effekt, aber kein besonders

starkes *knockdown* des Gens ist. Um die Auswirkungen dieser Reduktion auf die AM-Symbiose zu analysieren, wurde in den mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln die relative Expression der zuvor bereits beschriebenen AM-Markergene *GiaTUB* und *MtPT4* mittels *real time* RT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich in den RNAi-Wurzeln für beide Gene eine durchschnittlich niedrigere Expressionsrate als in den Kontrollen, allerdings war diese Tendenz zu schwach um als signifikant bewertet zu werden (Abbildung III.66). Um auszuschließen dass es sich hierbei um einen zufälligen Effekt handelte, wurden parallel *Tnt1-knockout* Mutanten von *Mtr.38547* analysiert.

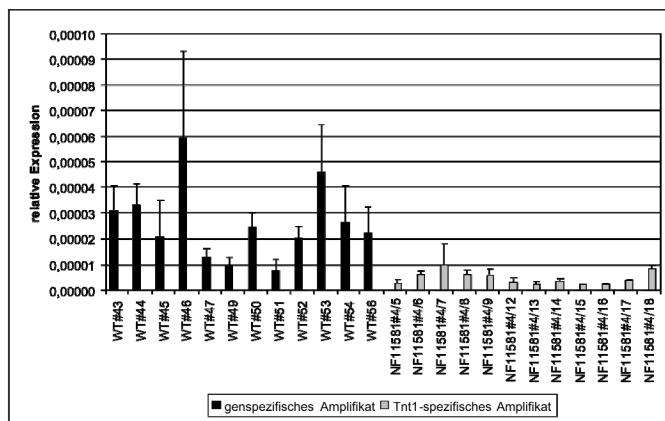


**Abbildung III.66:** Die relative Expression der AM-Markergene *GiaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.38547* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtMyb2 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.15 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

### III.3.3.6.3 Identifikation und Verifikation homozygoter *Tnt1*-Insertionsmutanten für das Gen *Mtr.38547*

Für die funktionelle Analyse von *Mtr.38547* standen die beiden *Tnt1*-Insertionslinien NF11581 und NF4095 zur Verfügung, die im Rahmen eines PCR-basierten *reverse screening* Ansatzes als externe Auftragsarbeit der *Noble Foundation* (Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA) identifiziert wurden. Angaben bezüglich der Lage weitere *Tnt1*-Insertionen in diesen beiden Linien waren bis dato nicht in der *Tnt1*-Datenbank (<http://bioinfo4.noble.org/mutant/database.php>) verfügbar. Sowohl in der Linie NF11581 als auch in der Linie NF4095 sitzt eine *Tnt1*-Insertion in 5'-3'-Orientierung im Kodierbereich von *Mtr.38547*. Der *Tnt1*-Insertionsort liegt für die Linie NF11581 166 bp und für die Linie NF4095 680 bp *downstream* des Startcodons (Abbildung III.63). Eine analog zu der in Abschnitt III.2.3 beschriebenen durchgeführte Genotypisierung von R2-Pflanzen der Linie NF4095 identifizierte drei Pflanzen mit einer homozygoten Insertion in *Mtr.38547* (Tabelle III.4). Die Tatsache, dass sich zwei dieser drei homozygoten Pflanzen als steril erwiesen, sprach für ein ernstzunehmendes Fertilitätsproblem dieser Linie, so dass sich alle weiteren Analysen auf die andere verfügbare *Tnt1*-Insertionslinie konzentrierten. Für die Linie NF11581 konnten die zwei Pflanzen NF11581#4 und NF11581#9 mit einer homozygoten *Tnt1*-

Insertion in *Mtr.38547* identifiziert werden (Tabelle III.4). In der Linie NF11581 wird durch die Insertion des Retrotransposons an der in Abbildung III.63 gekennzeichneten Stelle direkt mit dem ersten *in frame* liegenden Codon der Tnt1-Sequenz ein vorzeitiges Stopcodon (TGA) erreicht, was unweigerlich zu einem verfrühten Transkriptionsstop führt. Selbst für den Fall, dass dieses verkürzte Transkript dem NMD-Abbau entgeht, ist von keinem funktionellen Genprodukt auszugehen. Bis zu diesem Punkt wäre nicht einmal die Hälfte der ersten MYB-Domäne transkribiert worden, was die Funktionalität des entstehenden Transkripts ausschließt, so dass bei einer homozygoten Tnt1-Insertion von einem vollständigen *knockout* von *Mtr.38547* auszugehen ist.



**Abbildung III.67:** Die relative Expression eines genspezifischen und eines Tnt1-spezifischen *Mtr.38547*-Amplifikats in *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11581. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression eines genspezifischen (schwarze Balken) und eines Tnt1-spezifischen (graue Balken) *Mtr.38547*-Amplifikats in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (WT#43-56) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF11581#4 (NF11581#4/5-18) nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die

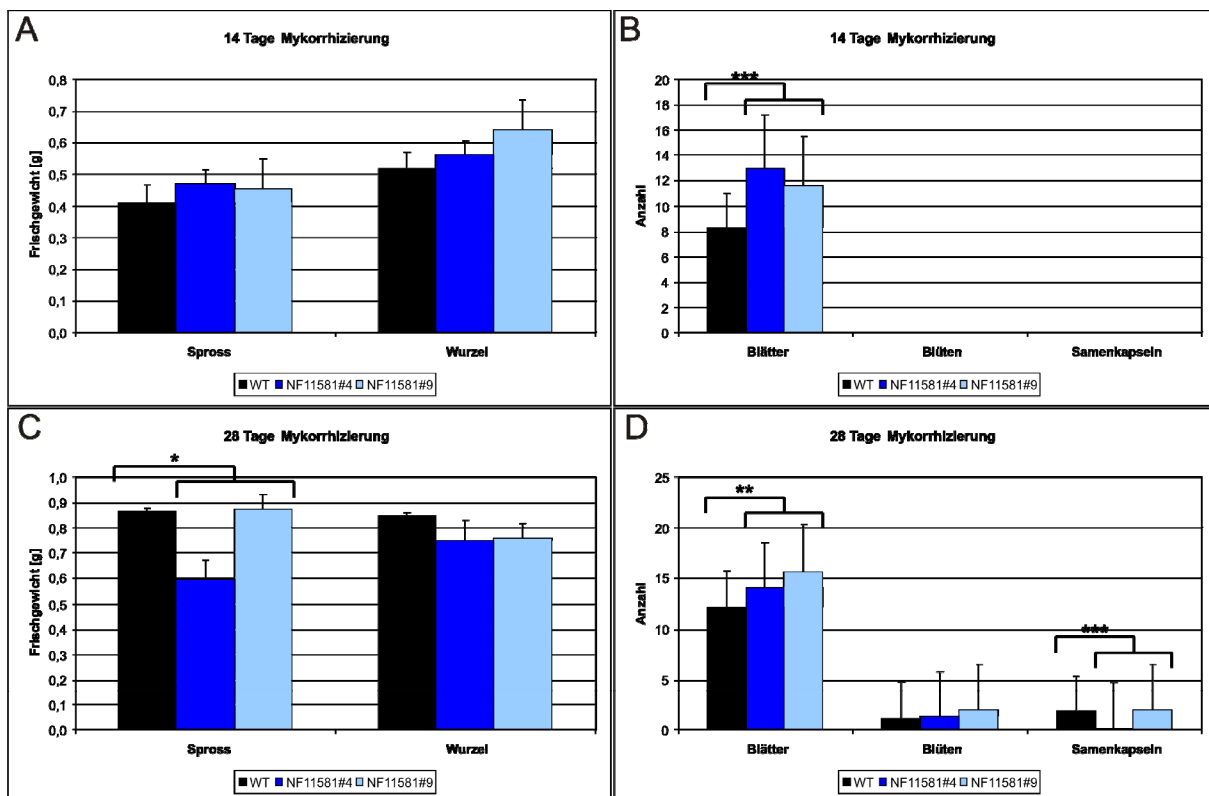
dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Nachkommen der homozygoten Pflanzen NF11581#4 und NF11581#9 wurden für vier Wochen unter gleichen Bedingungen wie entsprechende *M. truncatula* R108 Wildtyp-Kontrollen angezogen und anschließend jeweils zur Hälfte für 14 und 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert. Zum Zeitpunkt der Ernte wurden die Wurzeln jeder Pflanze zwecks unterschiedlicher Analyseverfahren halbiert und eingefroren. Aus einer Hälfte jeder Wurzel der NF11581#4-Nachkommen und entsprechender Wildtyp-Kontrollen wurde die RNA extrahiert und für *real time* RT-PCR Messungen verwendet. Dabei wurde zunächst mittels genspezifischer und Tnt1-spezifischer Primerpaare die korrekte Insertion des Retrotransposons in *Mtr.38547* bestimmt. Wie zuvor bereits beschrieben, lagen die genspezifischen Primer unmittelbar *up-* und *downstream* der Tnt1-Insertion, während die Tnt1-spezifischen Primerpaare mit je einem Primer auf dem Gen und auf dem Retrotransposon lagen. Wie erwartet, ließ sich in den für 14 Tagen mykorrhizierten Pflanzen das genspezifische Amplifikat ausschließlich in den Wildtyp-Pflanzen messen, und das Tnt1-spezifische Amplifikat war ausschließlich in den Insertionsmutanten nachweisbar (Abbildung III.67). Dieses Ergebnis ließ sich auch in den für 28 Tage mykorrhizierten Pflanzen bestätigen (Daten nicht gezeigt). Diese Messungen zeigen, dass die Tnt1-Insertion in der Insertionslinie NF11581 an der erwarteten Position sitzt. Zudem tragen alle NF11581#4-Nachkommen diese Insertion homozygot, da sich aus ihrer RNA andernfalls das genspezifische und das Tnt1-spezifische Fragment amplifizieren lassen müssten.



### III.3.3.6.4 Tnt1-Insertionsmutanten von *Mtr.38547* unterscheiden sich phänotypisch nur geringfügig von Wildtyp-Pflanzen

Zum Zeitpunkt der Wurzelernte wurden alle Insertionsmutanten der Linie NF11581 und Wildtyp-Pflanzen im Alter von 6 (14 Tage Mykorrhizierung) und 8 (28 Tage Mykorrhizierung) Wochen zunächst phänotypisch charakterisiert. Nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung wiesen die Nachkommen der homozygoten Pflanzen NF11581#4 und NF11581#9 hochsignifikant mehr Blätter als die vergleichbaren Wildtyp-Pflanzen auf, wobei dies jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf das Frischgewicht der Pflanzen hatte (Abbildung III.68). Blüten und Samenkapseln ließen sich in diesem Stadium überhaupt nicht beobachten. Nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* hatten die Insertionsmutanten durchschnittlich immer noch 2,7 Blätter mehr als die Wildtyp-Pflanzen, auch dieser Unterschied war signifikant (Abbildung III.68). Allerdings war hier zudem ein signifikant niedrigeres Sprossgewicht der Insertionsmutanten zu beobachten, was, wie aus Abbildung III.68 deutlich hervorgeht, auf die Nachkommen von NF11581#4 zurückzuführen ist.



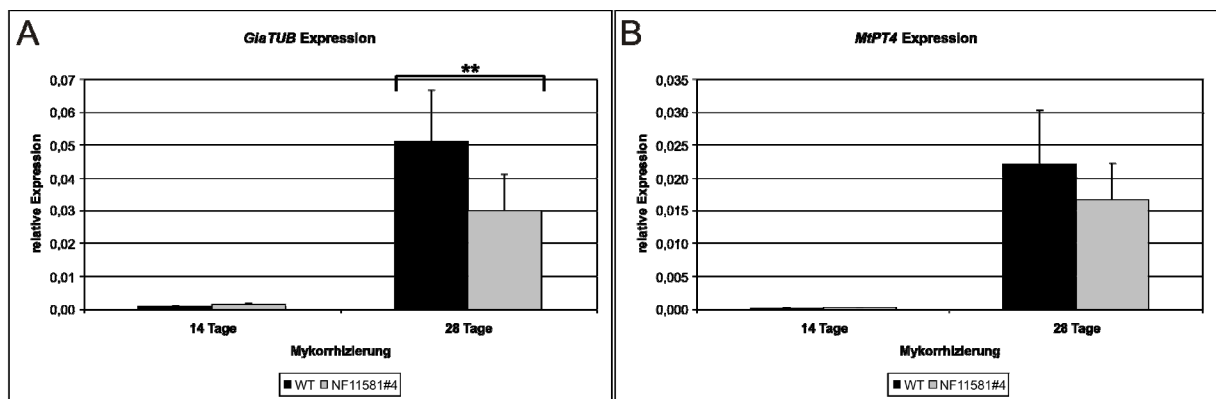
**Abbildung III.68: Phänotypische Charakterisierung von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11581.** Dargestellt ist das Frischgewicht von Spross und Wurzeln (A und C) sowie die Anzahl der Blätter, Blüten und Samenkapseln (B und D) von *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen (schwarze Balken: WT) und von Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF11581#4 (dunkelblaue Balken: NF11581#4) und NF11581#9 (hellblaue Balken: NF11581#9) nach 14 (A und B) und 28 (C und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus 31 Wildtyp-Pflanzen, 14 NF11581#4-Nachkommen und 17 NF11581#9-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung sowie 36 Wildtyp-Pflanzen, 18 NF11581#4-Nachkommen und 18 NF11581#9-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .



Neben dem geringeren Sprossgewicht zeigten diese Pflanzen zudem eine hochsignifikant geringere Menge an Samenkapseln, die sich für die Nachkommen von NF11581#9 nicht beobachten ließ (Abbildung III.68). Abgesehen von diesen Auffälligkeiten waren die Insertionsmutanten den Wildtyp-Pflanzen in Wachstum und Entwicklung sehr ähnlich und optisch nicht von diesen zu unterscheiden.

### III.3.3.6.5 AM-Markergene zeigen eine verringerte Expression in Tnt1-Insertionsmutanten von Mtr.38547

Mittels *real time* RT-PCR Messungen wurde in den Wurzeln der für 14 und 28 Tage mykorrhizierten NF11581#4-Nachkommen und Wildtyp-Kontrollen die relative Expression der zuvor bereits beschriebenen AM-Markergene *GiaTUB* und *MtPT4* bestimmt. Nach 14-tägiger Mykorrhizierung zeigte sich dabei für keines der beiden Gene ein signifikanter Expressionsunterschied zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten (Abbildung III.69). Nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung hingegen waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Expression von *GiaTUB* war in den NF11581#4-Nachkommen signifikant auf im Mittel 58,78 % (mit  $p = 0,018$ ) der in den Wildtyp-Kontrollen gemessenen Expression reduziert (Abbildung III.69 A), was auf eine geringere Kolonisation durch *G. intraradices* hinweisen könnte. Auch *MtPT4* zeigte in den Insertionsmutanten eine Reduktion auf durchschnittlich 75,09 % des Expressionsniveaus der entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, dieser Unterschied war mit  $p = 0,174$  allerdings nur als tendenziell vorhanden und nicht als signifikant zu bewerten (Abbildung III.69 B).



**Abbildung III.69:** Die relative Expression von *GiaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11581. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A) und *MtPT4* (B) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken: WT) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF11581#4 (graue Balken: NF11581#4) nach 14 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus zwölf Wildtyp-Pflanzen und zwölf NF11581#4-Nachkommen nach 14 Tagen Mykorrhizierung und zehn Wildtyp-Pflanzen und vierzehn NF11581#4-Nachkommen nach 28 Tagen Mykorrhizierung. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.16 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Zusammenfassend lässt sich eine mögliche Rolle des Mtr.38547 Genprodukts in der AM-Symbiose anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig bestimmen. Ein RNAi-vermittelter *knockdown* der

Mtr.38547 Trankriptmenge um ca. 30 % wies keine signifikanten Expressionsunterschiede von AM-Markergenen auf, in einer *knockout* Mutante von Mtr.38547 hingegen waren diese eindeutig nachweisbar. Dies legt eine potentielle Rolle des MYB-Transkriptionsfaktors Mtr.38547 in der AM-Symbiose nahe, von einer zentralen Funktion in der frühen AM-Signaltransduktion ist aufgrund der beobachteten Auswirkungen allerdings nicht auszugehen.

### III.3.3.7 Funktionelle Analyse des Kandidatengens Mtr.7264

#### III.3.3.7.1 Der GRAS-Transkriptionsfaktor Mtr.7264

Die Auswahl des als GRAS-Transkriptionsfaktors annotierten Gens Mtr.7264 als Kandidatengen erfolgte aufgrund seiner Induktion sowohl in frühen als auch in späten AM-Stadien. Die in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago GeneChip* Daten zeigten für Mtr.7264 eine 1,8-fache Induktion in *M. truncatula* Wildtyp-Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita*, nicht jedoch in einer entsprechenden *dmi3*-Mutante (Tabelle III.1). Neben diesem frühen Stadium, ließ sich eine deutlich stärkere Induktion in späten AM-Stadien feststellen. So war Mtr.7264 nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* bzw. *G. mossae* 41,7-fach bzw. 8,3-fach stärker exprimiert als in entsprechend nicht-mykorrhizierten Wurzeln (Tabelle III.1). Zudem zeigte das MtGEA-Expressionsprofil von Mtr.7264 eine hochspezifische Expression dieses Gens in mykorrhizierten Wurzeln von *M. truncatula*, aber in keinem anderen der untersuchten Gewebe (Abbildung III.70). Diese Daten lassen auf eine potentielle Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors *downstream* MtDMI3 mit einer spezifischen Funktion sowohl in frühen als auch in späten AM-Stadien vermuten.

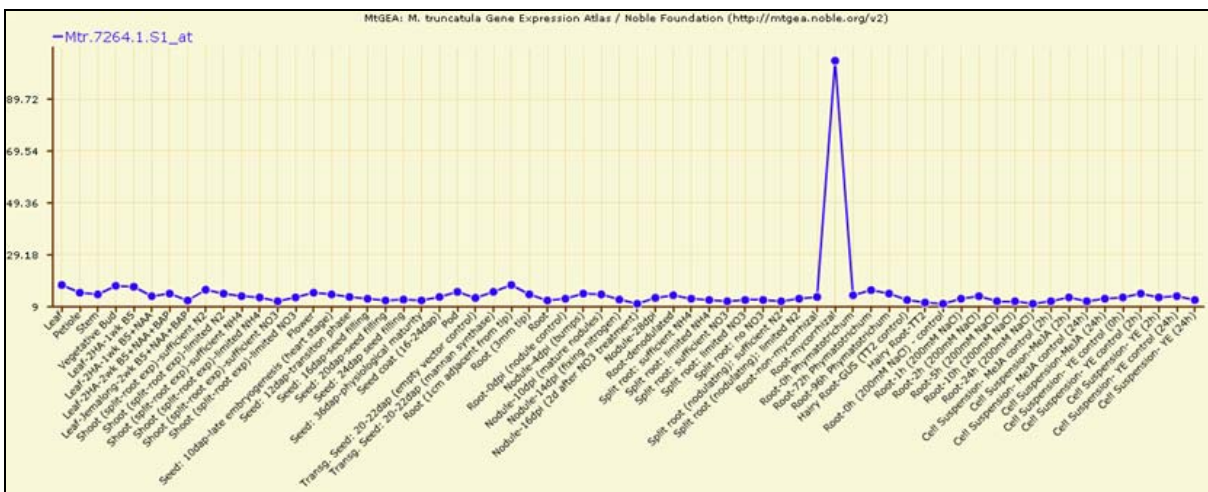


Abbildung III.70 Das Expressionsprofil von Mtr.7264 aus dem *Medicago truncatula gene expression atlas* (MtGEA). Das Expressionsprofil zeigt eine spezifische Expression von Mtr.7264 in mykorrhizierten Wurzeln.

```

AGGGACCTTTCTTTGGTTGCTCATTGAGGCCTTTAGGCCCTTACAAGATTACCTACT
GTTGATAGTTTGAAGTTGGAGGTTTGCTTAACCAATTCTTCAAGATAAATCACCATATGG
ATTCAGGTAATAACATTCTTGGCCACAATTTTCTTCTTTATCCTTCAAGAAATTCAT
GGCTATAGAATATGCTGCATTAATAATCAGACATGAAAAAATATTAGAAATTTCAAATGT
TCGTATGGATCACTTATTTTAAATAGAGATTAAGGCATGTACTGGTAGTGTAAAGAATA
TGGCTAAAGAATATGCTGCATTAATAATCAGACAGAAAAAATATTAGAGATTAGAAGGCT
TGACTCATTGTTACTCAACTCAACGATTCAAATCCATATAAGAATCCAAAACAGGAAA
ATTCTTAGTAAAATTGCACAAAATCGTGAAATTCATATGGGATTTTAAAGGATTCGTCT
ATTTTTATGATACGGGTCAATTTTAAATTTGGTTCTTCAATTGGCTTGGTCTATACATGTG
ACCCGGTCTGTAAATACATAAATGACCAAGTTTTTTTTTATACTTTCACGCCACACAATC
TCTTCACCTTAAGAGATTGATGAAGACGAATTTGTGAAGTGATGGAGGATAATCAATAT
AATTGACGATTTATATTGCATCTAGACTTTGCCTTTATGTATTTTGTAGGCATCTAGT
CTCTTACTTTGAAATTTAATAGTCACTTAATCACTTATGATCAAGTGTTTTGTGACAGAT
CTAGGATTCGCCCTTTGAGTATTTGTCTAGGTTGTTAGCATTATPATGATTACAAATA
ATATTTGGCATCTAGGTTTTGAGTCATATATGTATAAATGTTTTGTGCACTTTAACTTC
GAATCATTTATGACTATAGACAATTTATAACATATAGTTAGCTTTATTTTTGTTTTGGTA
GAATCCATCGATTTTGATTGCGATTTTATGATTTTACTATTCCCTTTCGACCTGAAGCAA
AATCCCAATTTTGACAACCTTTTACAACCTTGTCAAGACAACAAACAAATGCATAACCTCT
TCTTGAGTTTTTGTGAAAAAATAATAATATGATGTGGCGAATTGAAGAGTTGTAATTG
GATGCCAGATTAAGTAACCTTACTGAAAGGCATATCCTCAATCTCTTAACATAAAA
GATTATTTCAATAGTAGTTAAAAATTTGAGTTCACCAAAAACCTAAACAAAAATCAAAGC
TAACATAGGGAGAAGTGTGAAAAATATATCAGAAAAATAGTAAACCAAAGTCATCACTAAA
ACACAAAACCTAAGCTTGGTCATCATACTTTGGAGATTATTTTATGATATATACTTGAATT
GTCAAATGAAAAAGTGATACCATAGATACAGTTTCTTCAATCATAGACGTCAATACTATA
TCTGAACAAATCTATAACAAAATAACACTGCATGATACTGATAAGTTGATCAATTACC
TAAGGAGAGATATCCAGCATTAAAAATGTTTATCCTTTTCTATTCAATTTTCATGAACA
TTTAAATATATCTCTTCAACAACTTTCATTTTATAGTCATTACATTAGATCAAAATAGAC
TTCAAATAGGCGGTTAATTACATTTAGTAGATGGTTAATGAACGTACAAGATGTCAAAC
TCATGAACCACGTCCAAGTTCGGGGTTAATGAAGTTACCTTGGAAATTAATGAGTTTTGA
CACCTTGTAAATTAACCACCTATTTGAATTGTACTAACCAATTAATAATTTGTGCGAAAAG
TTGTCTAAAGTTAGTTGCACAAAATCATTTATCTGTCTAATAGGGAGATTATATATAG
ATGCTTTAAGTGAATGAGCATCTTTGTTTTGCTTCATCCATATCAATCTTACTTATG
CAACTCAGCTGTTATGCACCTAGGTTCCGCATATCACTGGCTGAGGGAATTGAGATATGA
CTCTCATGGCTCAAATCCAATGATCCCTCTTATGAGTGTGCAAAATGTGTTGCATCTGG
AAGCATAAAAACTGCTGATATTGGACTTGAGTATATTTCTCAGATTTTCATCACCTCATGG
TAATGGTGTACAAAGAATGGTCACCTATTTTCAAGTGAAGCACTTGGATACAAGATAGTTAA
ACATTTACCTGGCGTATACAAAGCTCTCAATTCCTCGAAAATATCATTGTCTTCAGACGA
CATCCTTGTTCAAAAACTTCTATGATCTGTGTCTTTTTTGAAGTTTTTCATACCTGAT
CACAAATCAAGCAATTAATCGAATCGATGGAACGTGAAAAGGTGGTGCATATTATGATCT
CCATTGTTCCGAGCCAGCACAAATGGATAAATCTTATACAACTTTAAAGAAAACGTCGGGG
AGGTCCGCCCTTTCTGAAAATTAAGGAATTAATGAAAAGAAAAGAGGCATTGGAGCAAAT
GAGCTTTCATTTGACAACCGAAGCAGGGATTTTGGATTTTCTTTACAGTTCAATCCAAT
AATTAGCAAACCTGAAGATGTCGATTTTGAAACTTGCCTGTCAAGACAGGAGATGCTGT
TGCAATTTCTTCTGTTCTTCAGCTGCATTCTCTCTTGTACTGATGATGAAATGGTCTC
CTCATCAGGTGCAGCATCTTTCAATATGCAGAGAGCAGCGCACTTGGGTGAGAGGACTTT
TGCAGAGTGGCTAGAGAGAGACATGATCAATGCATATATCTTGAAGTCCGGATTGAGCATT
ATCACCTCTTTTTTTAGGTGCTTACCTAAGATGGGGATCTTTCTTAACGTTATGCGAAA
ACTACAACCAAACCTTTTAGTGATTACTGAACAGGAATCAAATCTGAATGGATGTAATTT
AACGGAGAGAATCGACCGAGCATTGTACTTTTACGGTTCACCTTTTACTGCTTGGAAATC
TACTGTTACAAGAATCAGTCGAGAGACAAAACCTCGAGAGCATGCTTCTTGGAGAGCA
AATAAAGAATCATTACTTGTGAGGGAGTCGATAGAAAGGAAAGGCATGAGAAGCTCGA
GCAATGGATTCAAAGACTTAAATGGCTGGATTTGTGAAGGTACCTTTGAGTTACAATGG
GAGGATAGAAGCGACAAATCTATTGCAGCGATATAGTCATAAATACAAGTTTAAAGAAGA
AAATGATTGTTTACTTGTGTTGTTGGAGTGACAGACCCTTTTTTCTGTATCGGCCTGGA
ATTTAGGTGA

```

```

MDSGSPYHWLRELRYDSHGSNPMIPLIECAKCVASGSIKTADIGLEYISQISSPHNGVQ
RMVTFSEALGYKIVKHLPQVYKALNSSKISTSSDDILVQKYFYDLCFFLKFSYLITNQA
IIESMEREKVVHIIIDLHCSEPAQWINLIQTLLKRPGGPPFLKITGINEKKEALQMSFHL
TPEAGTIDFPLOFNPIISKLEVDVFENLPVKTGDAVAISSVLQLHSLLATDDEMVSSSGA
ASFNMQRAAHLGQRTFAEWLERDMINAYILSPDSALSPLFLGASPKMGIFLNAMRKLQPK
LLVITEQESNLNGCNLTERIDRALYFYGSLFDCELESTVTRTSVERQKLESMLLGEQIKNI
ITCEGVDRKERHEKLEQWIQRLKMAGFVKVPLSYNGRIEATNLLQRYSHKYKFKREENDCL
LVCWSDRPLFSVSAWKFR

```

Abbildung III.71: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Mtr.7264. Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von Mtr.7264 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind das Start- und Stoppcodon, blau gedruckte Abschnitte markieren den 5'-UTR Bereich. Grau hinterlegte

Bereiche kennzeichnen ein Intron. Das grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF8882. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich gelb markiert ist eine in GRAS Proteinen konservierte Domäne. Diese setzt sich zusammen aus dem ersten Leucin-reichen Abschnitt (kursiv und blau gedruckt) inklusive eines *heptad repeats* (pink hinterlegt), dem VHID-Motiv (grün hinterlegt), dem zweiten Leucin-reichen Abschnitt (kursiv und blau gedruckt) inklusive eines *heptad repeats* (pink hinterlegt), dem PHYRE-Motiv (grau hinterlegt und konservierte Aminosäuren fett gedruckt) und dem dreiteiligen SAW-Motiv (unterstrichen und konservierte Aminosäuren fett gedruckt). Ein potentielles Kernlokalisierungssignal ist schwarz umrahmt.

Die unter dem Bezeichner Medtr3g022830 geführte 3.250 bp lange genomische Sequenz von *Mtr.7264*, liegt auf dem dritten Chromosom von *M. truncatula*. Das Gen besitzt einen 116 bp langen 5'-UTR Bereich, sowie zwei Exons, die von Position 129 - 1.944 von einem langen Intron unterbrochen werden (Abbildung III.71). In der EST-Datenbank von *M. truncatula* konnte kein EST-Cluster identifiziert werden, dass die gesamte Länge der Kodiersequenz von *Mtr.7264* abdeckt. Die höchsten Übereinstimmungen lieferte das EST-Cluster TC197578, welches jedoch ausschließlich das erste Drittel des Kodierbereichs umfasst.

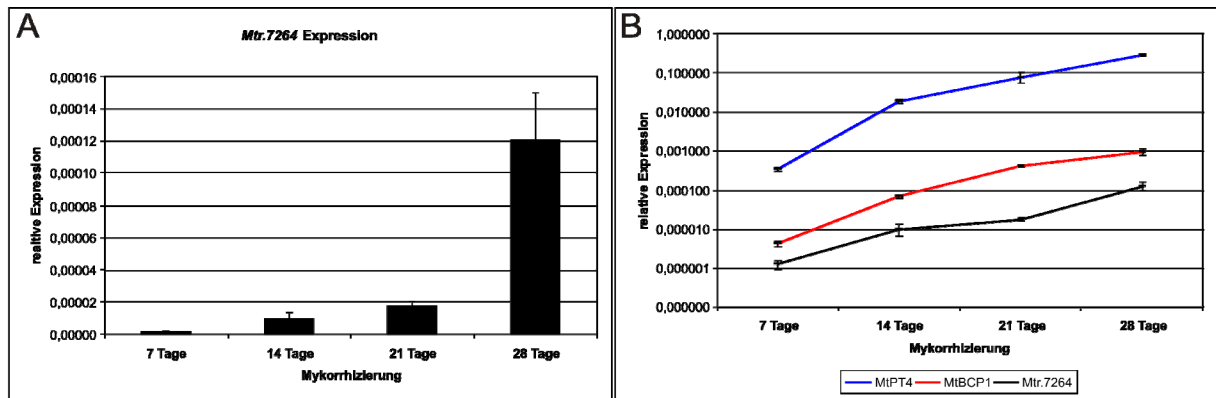
Die abgeleitete Proteinsequenz des *Mtr.7264* Gens umfasst 438 Aminosäuren. Über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist *et al.*, 2010) konnte in dieser Sequenz von Position 1 - 417 eine in GRAS-Proteinen konservierte Domäne identifiziert werden (Abbildung III.71). Wie bereits in Abschnitt III.3.3.4.1 detailliert beschrieben, zeichnet sich diese Domäne durch den Leucin-reichen Abschnitt I, das VHID-Motiv, den Leucin-reichen Abschnitt II, das PFYRE-Motiv und das SAW-Motiv aus (Pysh *et al.*, 1999; Bolle, 2004). Sämtliche dieser Motive konnten in der Aminosäuresequenz von *Mtr.7264* identifiziert werden, die beiden Leucin-reichen Abschnitt umfassen zudem jeweils einen *heptad repeat* mit der Konsensussequenz LX<sub>6</sub>LX<sub>6</sub>L (Abbildung III.71).

Neben den für GRAS-Proteinen typischen Motiven konnte von Position 61 - 77 mit der Sequenz RMVTYFSEALGYKIVKH (in Abbildung III.71 schwarz umrandet) zudem ein potentielles Kernlokalisierungssignal (NLS: *nuclear localization signal*) identifiziert werden. Die Konsensussequenz eines solchen *bipartite* NLS besteht aus zwei aufeinanderfolgenden Blöcken basischer Aminosäuren die durch zehn beliebige Aminosäuren voneinander getrennt liegen. Klassischerweise umfasst der erste Block zwei basische Aminosäuren und der zweite Block fünf Aminosäuren von denen mindestens drei basisch sein müssen (Dingwall & Laskey, 1991; Robbins *et al.*, 1991). Die in der Aminosäuresequenz von *Mtr.7264* identifizierte Region erfüllt das NLS-Konsensusmotiv mit der Einschränkung, dass hier der erste basische Block aus nur einer basischen Aminosäure besteht. Für eine perfekte Übereinstimmung mit der NLS-Konsensussequenz müsste anstelle des Methionins (M) an Position 62 eine der basischen Aminosäuren Lysin (K) oder Arginin (R) sitzen.

### III.3.7.2 Die Expression von *Mtr.7264* nimmt in einer Mykorrhizierungszeitreihe stetig zu

Da anhand der in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago* GeneChip Daten bereits bekannt war, dass *Mtr.7264* in verschiedenen AM-Stadien induzierbar ist, war es zunächst einmal interessant zu sehen wie sich die Expression von *Mtr.7264* in einer Mykorrhizierungszeitreihe verhielt. Zu diesem Zweck wurde in für 7, 14, 21 und 28 Tagen mit *G. intraradices* mykorrhizierten

*M. truncatula* Wurzeln (wie beschrieben in Hoge Kamp *et al.*, 2011) die relative Expression von *Mtr.7264* mittels *real time* RT-PCR bestimmt. Dabei zeigte sich für das Kandidatengen eine mit dem Mykorrhizierungszeitraum kontinuierlich ansteigende relative Expression (Abbildung III.72 A). Ein Vergleich der relativen Expression von *Mtr.7264* mit den beiden AM-Markergenen *MtPT4* und *MtBCP1* zeigte für alle drei Gene einen vergleichbaren Trend (Abbildung III.72 B). Ähnlich wie die beiden AM-Markergene scheint *Mtr.7264* bei einer sich ausbreitenden Kolonisation durch *G. intraradices* verstärkt exprimiert zu werden.



**Abbildung III.72: Die relative Expression von *Mtr.7264* in einer Zeitreihe von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln.** A: Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.7264* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei unabhängigen Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.17 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. B: Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.7264* und zum Vergleich von *MtPT4* und *MtBCP1* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei unabhängigen Wurzeln. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Zur besseren Darstellbarkeit sind die Expressionsdaten in B logarithmisch aufgetragen. Die zum Vergleich herangezogenen Expressionsdaten für *MtPT4* und *MtBCP1* stammen aus Hoge Kamp *et al.* (2011).

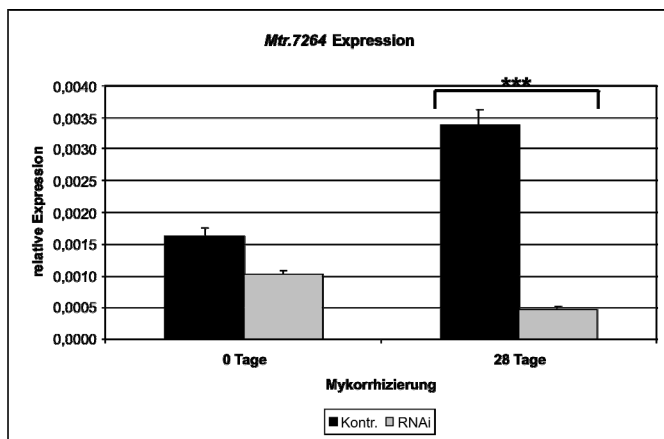
### III.3.3.7.3 Für die funktionelle Analyse von *Mtr.7264* mittels *Tnt1*-Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden

Mit der Linie NF8882 konnten zunächst potentielle *Tnt1*-Insertionsmutanten für das Kandidatengen *Mtr.7264* identifiziert werden. Anhand der von der Noble Foundation zur Verfügung gestellten Sequenzdaten ließen sich Position und Orientierung der *Tnt1*-Insertion in *Mtr.7264* bestimmen. Das Retrotransposon lag in dieser Linie 1.835 bp *downstream* des Startcodons in 5'-3'-Orientierung vor (Abbildung III.71). Eine Genotypisierung von R1-Pflanzen der Linie NF8882 führte ausschließlich zur Identifikation von für die *Tnt1*-Insertion heterozygoten Pflanzen, entsprechend homozygote Pflanzen wurden nicht gefunden (Tabelle III.4). Zudem stellte sich später heraus, dass sämtliche der heterozygoten Pflanzen steril waren. Da bereits die Pflanzen mit einem heterozygoten *knockout* von *Mtr.7264* massiv beeinträchtigt waren, lässt sich vermuten, dass ein homozygoter *knockout* des Kandidatengens möglicherweise letal. Demzufolge konnten keine funktionellen Analysen anhand von *Tnt1*-Insertionsmutanten

durchgeführt werden und alle weiteren Analysen erfolgten mittels eines RNAi-knockdowns von *Mtr.7264*.

### III.3.3.7.4 Ein RNAi-vermittelter knockdown von *Mtr.7264* resultiert in einer verminderten Expression wichtiger AM-Markergene

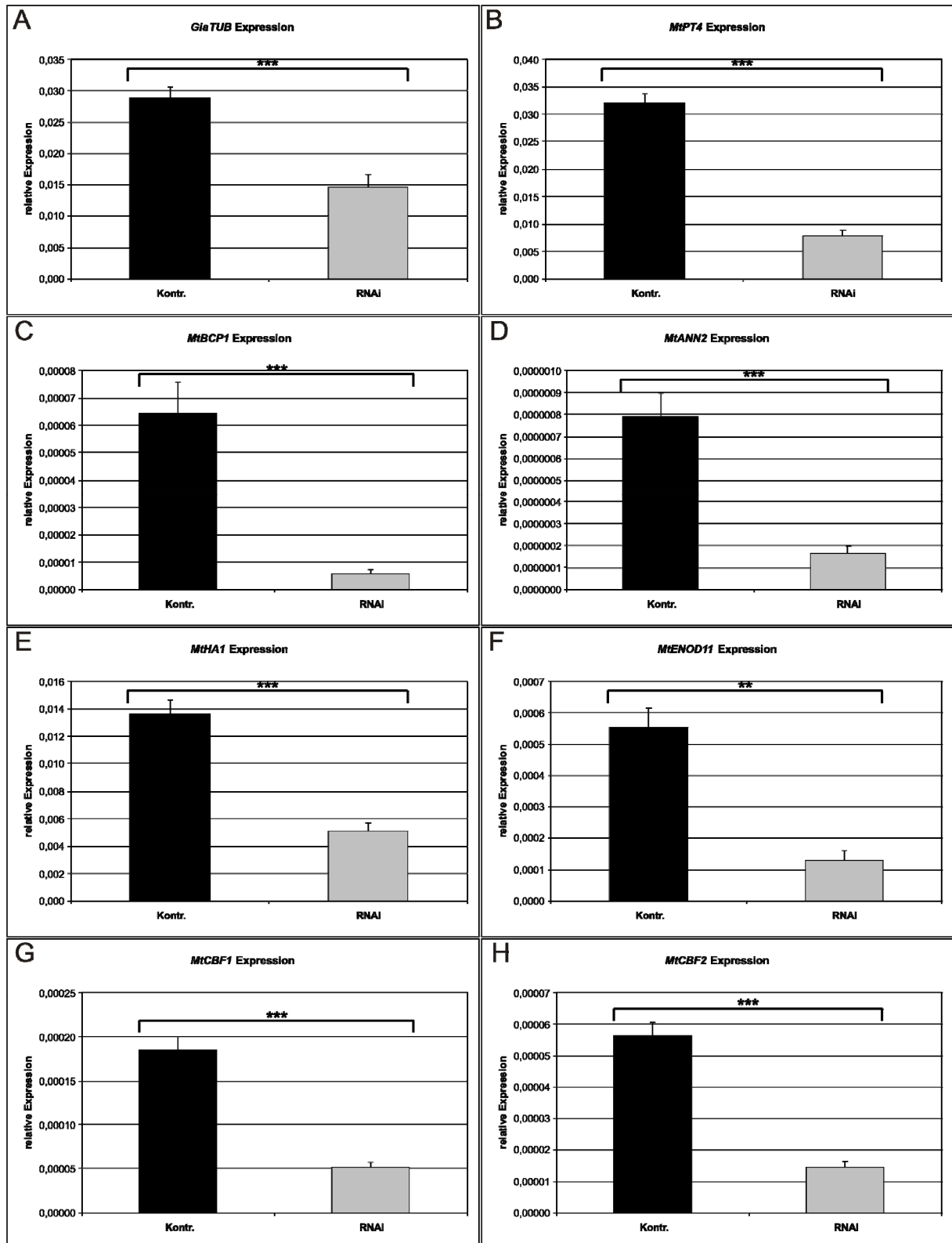
Zur funktionellen Analyse von *Mtr.7264* wurden im Rahmen einer Masterarbeit (Schaepe, 2011) mit dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:GUS und dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert. Jeweils die Hälfte der Wurzeln jedes Konstrukts wurde für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert, während die verbliebenen Pflanzen ohne Symbiosepartner angezogen wurden. Eine RNA-Extraktion und anschließende *real time* RT-PCR Messungen der transgenen Wurzeln dienten zunächst zur Bestimmung des RNAi-Effekts. Dabei zeigte sich in den nicht-mykorrhizierten RNAi-Wurzeln eine durchschnittliche Reduktion der *Mtr.7264* Transkriptmenge um etwa ein Drittel, was mit  $p = 0,138$  als tendenziell aber nicht signifikant zu bewerten war (Abbildung III.73). Nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung ließ sich ein hochsignifikanter RNAi-Effekt mit einer durchschnittlichen Reduktion der *Mtr.7264* Expression auf lediglich 13,66 % (mit  $p = 6 \times 10^{-8}$ ) messen (Abbildung III.73). Dies zeigte ganz deutlich, dass sich der RNAi-Mechanismus mit Hilfe des Konstrukts pK7GWIWG2:MtGras1 induzieren ließ. Der deutlichere RNAi-Effekt in den mykorrhizierten Wurzeln lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass *Mtr.7264* in nicht-mykorrhizierten Wurzeln generell nur sehr schwach exprimiert wird (Abbildung III.70 und III.72).



**Abbildung III.73:** Die relative Expression von *Mtr.7264* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.7264* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde

liegende Einzelwerte sind Abbildung C.18 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

Um die Auswirkungen des RNAi-vermittelten *Mtr.7264* knockdowns auf die AM-Symbiose zu bestimmen, wurde als nächstes die relative Expression der acht AM-Markergenen *GiaTUB*, *MtPT4*, *MtBCP1*, *MtANN2*, *MtHA1*, *MtENOD11*, *MtCBF1* und *MtCBF2* mittels *real time* RT-PCR in den mykorrhizierten RNAi- und Kontrollwurzeln untersucht. Dabei zeigte sich für die Transkripte aller untersuchten Gene eine signifikante Reduktion in den RNAi- im Vergleich zu den Kontrollwurzeln (Abbildung III.74). Unabhängig von der spezifischen Funktion der einzelnen AM-Markergene



**Abbildung III.74:** Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real-time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A), *MtPT4* (B), *MtBCP1* (C), *MtANN2* (D), *MtHA1* (E), *MtENOD11* (F), *MtCBF1* (G) und *MtCBF2* (H) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken: RNAi) generiert wurden 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils zehn Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.19 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$  (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).



weist diese einheitlich verminderte Expression in RNAi-Wurzeln von *Mtr.7264* auf eine starke Beeinträchtigung der AM-Symbiose in diesen Wurzeln hin.

Im Detail war in den RNAi-Wurzeln eine durchschnittliche Reduktion der Transkriptmenge des pilzlichen *housekeeping* Gens *GiaTUB* auf 50,83 % (mit  $p = 3 \times 10^{-4}$ ) messbar, was auf eine geringere Kolonisation im Vergleich zu den Kontrollwurzeln hinweisen könnte. Neben dem zuvor bereits beschriebenen *MtPT4* Gen wurde die Expression von *MtHA1*, einem ebenfalls Arbuskel-spezifisch exprimierten Gen, bestimmt. Bei *MtHA1* handelt es sich um einen  $H^+$ -ATPase, die möglicherweise eine Rolle in der Entwicklung von Arbuskeln spielt (Krajinski et al., 2002). Die Expression der Arbuskel-spezifischen Gene *MtPT4* und *MtHA1* waren im Mittel auf 24,21 % (mit  $p = 5 \times 10^{-5}$ ) und 37,49 % (mit  $p = 3 \times 10^{-4}$ ) reduziert, während die zuvor bereits beschriebenen Arbuskel-induzierten Gene *MtBCP1* und *MtANN2* lediglich 9,23 % (mit  $p = 10^{-4}$ ) und 20,38 % (mit  $p = 10^{-4}$ ) der in den Kontrollwurzeln gemessenen Transkriptmenge aufwiesen (Abbildung III.74). Derart starke Reduktionen von in Arbuskeln exprimierten Genen deuten möglicherweise auf eine beeinträchtigte Funktionalität der Arbuskeln in den RNAi-Wurzeln hin.

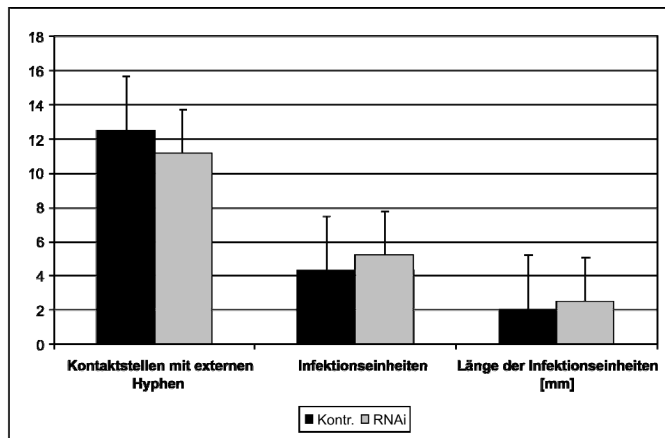
Neben den zuvor genannten in Arbuskeln exprimierten Markergenen waren auch die in frühen AM-Stadien induzierten Gene *MtENOD11*, *MtCBF1* und *MtCBF2* in den RNAi-Wurzeln signifikant geringer als in den Kontrollwurzeln exprimiert. Im Detail war eine durchschnittliche Reduktion von *MtENOD11* auf 23,11 % (mit  $p = 0,02$ ), von *MtCBF1* auf 27,52 % (mit  $p = 2 \times 10^{-4}$ ) und von *MtCBF2* auf 25,23 % (mit  $p = 2 \times 10^{-4}$ ) nachweisbar (Abbildung III.74). Bei *MtCBF1* und *MtCBF2* handelt es sich um CAAT-Box bindende Transkriptionsfaktoren, die mit dem ersten physikalischen Kontakt zwischen den Partnern der AM-Symbiose aktiviert werden (Hogekamp et al., 2011). *MtENOD11* ist ein Marker für die frühe AM- und Knöllchensymbiose, der bereits in der Prä-Kontaktphase beider Symbiosen aktiv ist (Journet et al., 2001; Kosuta et al., 2003; Maillet et al., 2011). Die genaue Symbiose-assoziierten Funktion aller drei Gene ist bislang unbekannt.

### **III.3.3.7.5 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.7264* zeigt keine Auswirkungen auf die Kolonisation durch *G. intraradices***

Um festzustellen ob sich die auf Expressionsebene gemessenen Reduktionen verschiedener AM-Markergene auch in der konkreten Ausbildung der Symbiose widerspiegeln, wurden Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Mtr.7264* für 7, 14 und 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert und anschließend mit WGA-Alexa Fluor® 488 gefärbt und bezüglich der vorhandenen AM-Pilzstrukturen analysiert. Die für 7 Tage mykorrhizierten Wurzeln konnten aufgrund des hier untersuchten frühen Mykorrhizastadiums und der damit verbundenen geringen Kolonisation der Wurzeln nicht mittels der *gridline intersections* Methode ausgewertet werden. Stattdessen wurde für jede Wurzel einzeln gezählt an wie vielen Stellen sich externe Hyphen an die Wurzeln angelagert hatten und an wie vielen Stellen der AM-Pilz bereits in die Wurzeln eingedrungen war und eine Infektionseinheit ausbildete. Zudem wurde mit Hilfe eines Längenstandards die Länge jeder Infektionseinheit abgeschätzt. Nach der Analyse jeweils 20 unabhängiger Kontroll- und RNAi-Wurzeln war im Mittel jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen beiden feststellbar



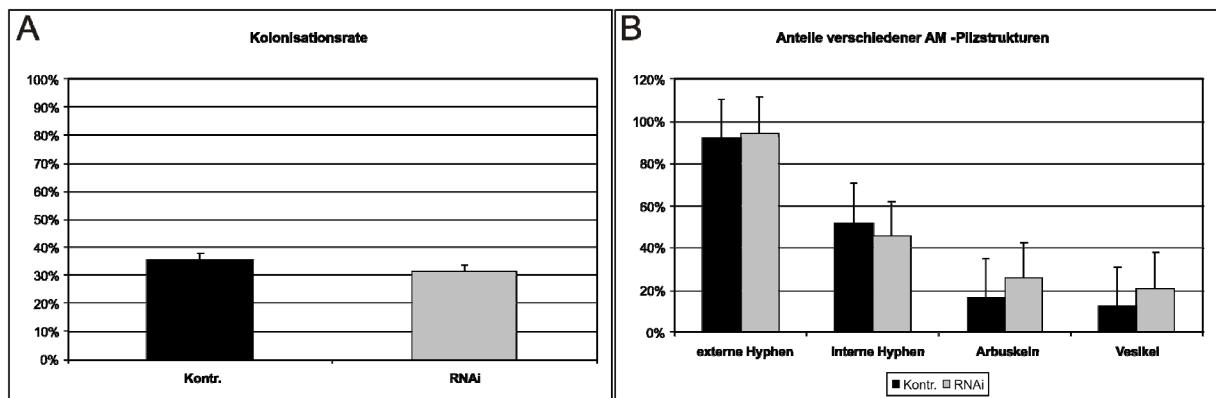
(Abbildung III.75). Die RNAi-Wurzeln wiesen weniger Kontaktstellen mit externen Hyphen, dafür aber geringfügig mehr und längere Infektionseinheiten auf (Abbildung III.75).



**Abbildung III.75: Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Dargestellt ist die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge (in mm) von Infektionseinheiten in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 7 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils 20

Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.5 im Anhang zu entnehmen.

Auch nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung war die in den RNAi-Wurzeln beobachtete AM-Symbiose nicht anders ausgeprägt als die in den Kontrollwurzeln beobachtete. Die Kolonisationsrate der RNAi-Wurzeln war geringfügig niedriger als in den Kontrollwurzeln, dieser Unterschied erwies sich jedoch als nicht signifikant (Abbildung III.76 A). Für die Anteile der verschiedenen AM-Pilzstrukturen konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abbildung III.76 B). Ebenso verhielt es sich mit Kontroll- und RNAi-Wurzeln die für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert wurden (wie beschrieben in Schaepe, 2011).



**Abbildung III.76: Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken: Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils 15 Kontroll- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzeldaten sind Tabelle D.6 im Anhang zu entnehmen.

Insgesamt ließ sich in Wurzeln mit verminderter *Mtr.7264*-Expression weder in frühen noch in reifen AM-Stadien eine verringerte AM-Kolonisationsrate nachweisen. Angesichts der zuvor

gemessenen Reduktion der *GiαTub* Expression um rund 50 % in diesen Wurzeln ist dieses Ergebnis eher verwunderlich. Auch für die Anteile der verschiedenen AM-Pilzstrukturen konnte in den untersuchten AM-Stadien kein signifikanter Unterschied zwischen RNAi- und Kontrollwurzeln ermittelt werden. In Kombination mit der zuvor beobachteten Reduktion Arbuskel-spezifischer Gene spricht dieses Ergebnis eher für eine funktionelle als für eine zahlenmäßige Beeinträchtigung der Arbuskeln in den RNAi-Wurzeln.

Zusammenfassend ließ sich eine Beteiligung des putativen GRAS-Transkriptionsfaktors *Mtr.7264* an der Regulation der Expression von AM-Markergenen anhand der einheitlichen und massiven Reduktion der Expression acht unterschiedlicher AM-Markergene in RNAi-Wurzeln von *Mtr.7264* eindeutig zeigen.

### III.3.3.8 Funktionelle Analyse des Kandidatengens *Mtr.10987*

#### III.3.3.8.1 Der ERF-Transkriptionsfaktor *Mtr.10987*

Das Kandidatengens *Mtr.10987* ist als potentieller ERF-Transkriptionsfaktor annotiert. Die Auswahl von *Mtr.10987* als Kandidatengens erfolgte sowohl aufgrund seiner Annotation als auch aufgrund seiner Induktion in einem sehr frühen Mykorrhizastadium. So zeigten die in Abschnitt III.1 beschriebenen Analysen der *Medicago* GeneChip Daten, dass *Mtr.10987* in *M. truncatula* Wurzeln im Stadium der PPA-Bildung mit *Gi. margarita* im Wildtyp 1,6-fach induziert war, nicht jedoch in der *dmi3*-Mutante (Tabelle III.1). Eine Induktion von *Mtr.10987* in späteren Mykorrhizastadien konnte anhand der *Medicago* GeneChip Daten nicht nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass es sich bei dem Genprodukt von *Mtr.10987* um einen in frühen Mykorrhizastadien aktiven Transkriptionsfaktor handelt, der *downstream* MtDMI3 agiert.

Eine genomische Sequenz von *Mtr.10987* ist in der Version 3,5 des *M. truncatula* Genoms (Young *et al.*, 2011) nicht verfügbar, so dass keinerlei Aussagen bezüglich der Exon-Intron-Struktur oder der Promotersequenz von *Mtr.10987* getroffen werden können. In der EST-Datenbank von *M. truncatula* (DFCI *Medicago* Gene Index) konnte jedoch das *Mtr.10987* entsprechende EST-Cluster TC178640 identifiziert werden. Die Nukleotidsequenz von *Mtr.10987* umfasst 885 bp, wovon jedoch 80 bp auf den 5'-UTR Bereich und 180 bp auf den 3'-UTR Bereich entfallen (Abbildung III.77). In der aus dieser Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit einer Länge von 207 Aminosäuren konnte über eine Motivsuche der PROSITE-Datenbank (Sigrist *et al.*, 2010) von Position 60 - 118 eine AP2/ERF-Domäne identifiziert werden (Abbildung III.77). Diese etwa 60 Aminosäuren lange Domäne lässt sich in ERF- und APETALA2-Proteinen finden (Weigel, 1995), die diesen Proteinen eine Bindung an spezielle DNA-Motive (GCC-Box) erlaubt (Hao *et al.*, 1998). Des Weiteren konnte innerhalb der AP2/ERF-Domäne von *Mtr.10987* von Position 65 - 81 ein potentielles Kernlokalisierungssignal (NLS: *nuclear localization signal*) identifiziert werden (Abbildung III.77), das alle Anforderungen der in Abschnitt III.3.3.7.1 beschriebenen NLS-Konsensussequenz erfüllt.

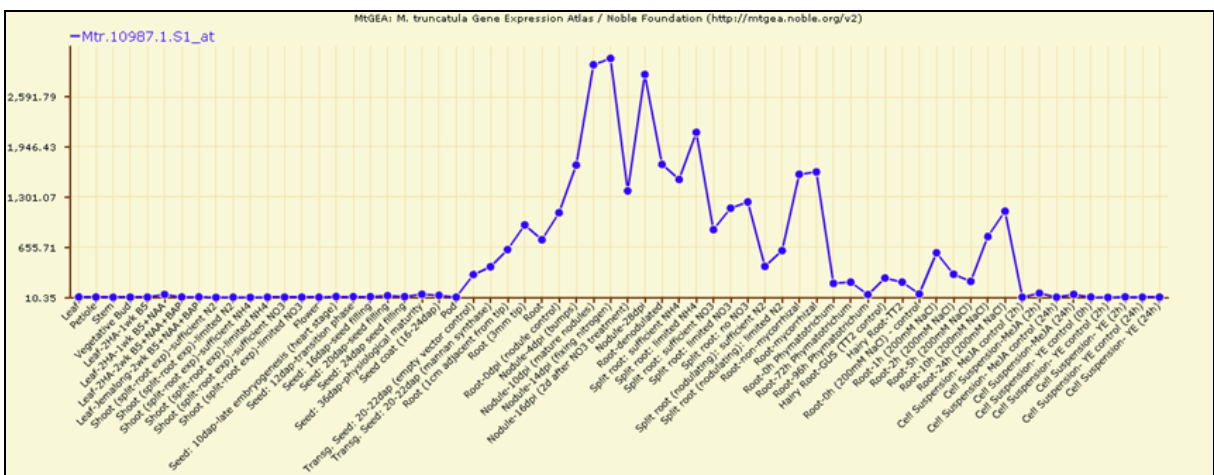
```

GGTAGAGAGAGAAGCTAGTCTCATTGCTTCCACAAACGGTAGACTTTAGATCCAAAATACC
ACTACTCTTTCCTCCAAAACATGGCTTCAACCACCAAAGACTCAGATTTGGAATATTGCG
AACACATTCACAATAACCTTCTTTTGGATGATTCTAGCATGCTGAAATCTCATCAACCTT
TTCCAAGCCCTAAAAGTGACAATGATTTAGACACAAGTGTAGAGGCGCGTGAAAGTAAGC
ATGCCTCTGTATGGAAGCGGTACAAGGGAGTGAGGCGTAGGCCATGGGGGAAGTTCGC
AGCTGAGATAAGAGATCCAAAAAGAATGGTGTAGAGTTTGGCTTGGAAAGTATGTGAC
TGAGGAGGAAGCAGCTTTGGCTTACGACAAAAGCTGCTTTTAAAGATGCGAGGCCGAAAGGC
CAAGCTTAATTTTCCCCACCTCATTGGCTCTGATGTGTCTACATCTGAGCCAGAGAGGGG
AGGTGGTTTTGAAAAGGGAATCACCCGAGCCTTCTTCTTCTTTCATCGGAGGGAAGTTGTG
AGTCAGTGTCAACAGGGTTGAAGAGGAGGAGGGGCATGGTTGACCTACTTAACAAATTAG
CCAAGAATAGAAGCCAAGTAGCCACGGTGGTTGGCGTTGAAAAGGCCTCACAAGCAAATG
ATTTTGAGCAGTGGGTGAATGAGTTGAATGATTGCACTCTAATCTACAGCTCATAGTGTA
GTTGCATTTATTTTATTTTCTTCTAATTTGTGCAGTTCTCTAATATTTTTCATCAC
CCTTTTGATATTAATCAAGGCGTGTGTTAAGCAAAACAAAACAATATGCTTTTGTAT
TTTTCCAAAATTTTCTTTGGATTTGATTTAAGTTGAAGAAAAGGAT

MASTTKDSDLEYLEHIQQYLLFDDSSMLKSHQFPSPKSDNDLDTTVEAREVSMPPVWKR
YKGVRRRPWGKFAAEIRDPKKNGARVWLGTYVTEEEAALAYDKAAFKMRGRKAKLNFPHL
IGSDVSTSEPERGGGFEGGITEPSSSSSEGSCEVSPGLKRRRGMVDLLNKLAKNRSQVA
TVVGVKASQANDFEQWVNELNDCTLI
    
```

**Abbildung III.77: Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Mtr.10987.** Dargestellt ist die Nukleotidsequenz (oben) und die abgeleitete Aminosäuresequenz (unten) von Mtr.10987 im Einbuchstabencode. In der Nukleotidsequenz blau und rot hinterlegt sind jeweils das Start- und Stoppcodon, blau und rot gedruckte Abschnitte repräsentieren den entsprechenden 5'-UTR und 3'-UTR Bereich. Das erste grün hinterlegte Pfeilsymbol markiert die Insertionsstelle des Retrotransposons Tnt1 in der Insertionslinie NF10424, das zweite die Tnt1-Insertionsstelle in der Insertionslinie NF9704. In der Aminosäuresequenz sind Start und Stop ebenfalls blau und rot hinterlegt, zusätzlich in gelb markiert ist eine mittels Motivsuche identifizierte AP2/ERF-Domäne. Unterstrichen ist ein potentielles Kernlokalisationsignal dessen basische Aminosäuren fett gedruckt sind.

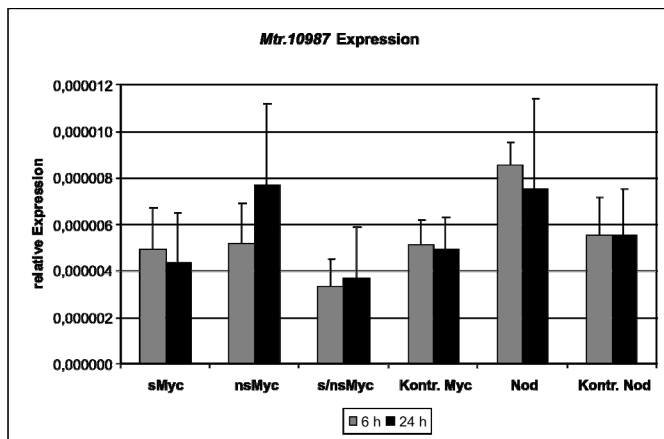
Das MtGEA-Expressionsprofil von Mtr.10987 zeigt eine wurzelspezifische Expression des Kandidatengens (Abbildung III.78). Anhand des Expressionsprofils lässt sich weiterhin erkennen, dass Mtr.10987 in nodulierten Wurzeln und Wurzelknöllchen stark induziert ist, in mykorrhizierten Wurzeln aber etwa genauso stark wie in nicht-mykorrhizierten (Abbildung III.78). Da es sich bei den im Expressionsprofil gemessenen mykorrhizierten Wurzeln vermutlich um Wurzeln in einem reifen Mykorrhizastadium handelt, steht dies nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen der *Medicago GeneChip* Daten, die ebenfalls keine Induktion von Mtr.10987 in späteren Mykorrhizastadien zeigten.



**Abbildung III.78: Das Expressionsprofil von Mtr.10987 aus dem Medicago truncatula gene expression atlas (MtGEA).** Das Expressionsprofil zeigt eine wurzelspezifische Expression von Mtr.10987, die sowohl nodulierte als auch mykorrhizierte Wurzeln von M. truncatula umfasst.

### III.3.3.8.2 Weder eine Mykorrhizierung mit *G. intraradices* noch eine Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs führen zu einer Induktion von *Mtr.10987*

Aufgrund der ausschließlich frühen Induktion von *Mtr.10987* war es aus experimenteller Sicht zunächst einmal interessant festzustellen ob sich die Expression von *Mtr.10987* durch eine Behandlung mit mikrobiellen Botenstoffen, die in der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose abgesondert werden, verändert. Hierzu wurde zunächst die Expression von *Mtr.10987* in mit Myc-LCOs und - aufgrund der starken Induktion in nodulierten Wurzeln im Expressionsprofil - auch mit den sehr ähnlichen Nod-LCOs behandelten Wurzeln gemessen. Details zur Durchführung des *induction assays* sind Czaja et al. (2012) zu entnehmen. Die mittels *real time* RT-PCR ermittelte relative Expression von *Mtr.10987* in mit  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs,  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs, einer Mischung aus  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs und  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs, einer Myc-Kontrolllösung,  $10^{-8}$  M Nod-LCOs und einer Nod-Kontrolllösung für 6 h und 24 h behandelten Wurzeln ist in Abbildung III.79 dargestellt. Insgesamt lässt sich feststellen, dass die Expression von *Mtr.10987* sowohl nach 6 Stunden als auch nach 24 Stunden recht stabil ist. Im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen lässt sich keine signifikante Expressionsänderung von *Mtr.10987* in den mit Nod- und Myc-LCOs behandelten Proben feststellen, was darauf schließen lässt, dass *Mtr.10987* nicht direkt durch diese mikrobiellen Signale induzierbar ist.

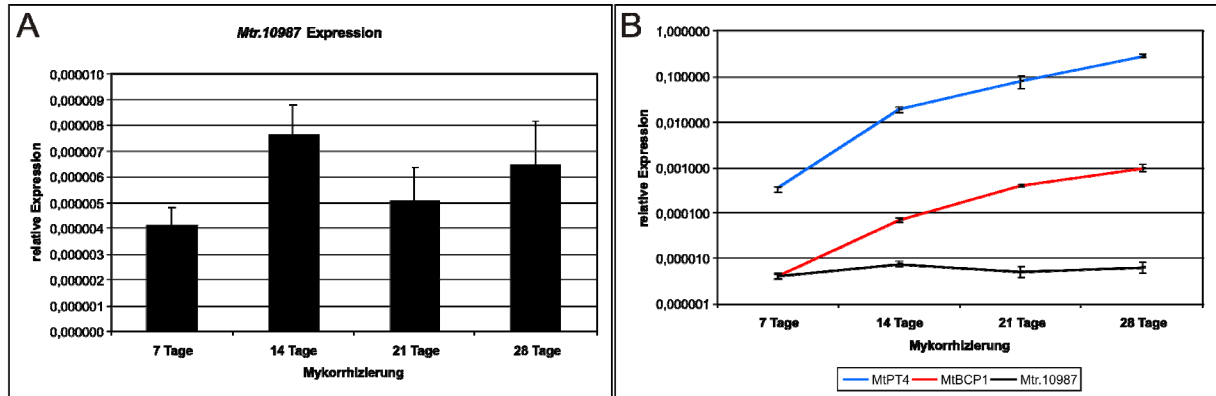


**Abbildung III.79:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in mit Myc- und Nod-LCOs behandelten *Medicago truncatula* Wurzeln. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* nach einer 6-stündigen und einer 24-stündigen Behandlung mit  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (sMyc),  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (nsMyc), einer Mischung aus  $10^{-8}$  M sMyc- und  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (s/nsMyc),  $10^{-8}$  M Nod-LCOs (Nod) sowie entsprechenden Kontrollen (Kontr. Myc und Kontr. Nod). Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei unabhängigen Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.20 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten

Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

Des Weiteren war es von Interesse herauszufinden, wie sich die Expression von *Mtr.10987* in verschiedenen Mykorrhizastadien verhielt. Zu diesem Zweck wurde die relative Expression von *Mtr.10987* in einer Zeitreihe von für 7, 14, 21 und 28 Tagen mit *G. intraradices* mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln (wie beschrieben in Hogeekamp et al., 2011) mittels *real time* RT-PCR gemessen. Dabei zeigte sich dass die relative Expression von *Mtr.10987* von 7 auf 14 Tage anstieg, dann nach 21 Tagen leicht absank und zuletzt nach 28 Tagen wieder etwas anstieg (Abbildung III.80 A). Die höchste relative Expression von *Mtr.10987* ließ sich nach 14-tägiger Mykorrhizierung messen (Abbildung III.80 A). Ein Vergleich der relativen Expression von *Mtr.10987* mit den beiden AM-Markergenen *MtPT4* und *MtBCP1* zeigte, dass es sich bei den unterschiedlichen Expressionswerte von *Mtr.10987* im Rahmen der Zeitreihe lediglich um vergleichsweise geringe Schwankungen handelte. Während sowohl *MtPT4* als auch *MtBCP1* eine über die gesamte Zeitreihe ansteigende

relative Expression zeigten, blieb *Mtr.10987* bei einer verhältnismäßig niedrigen relativen Expression die lediglich eine tendenzielle Zunahme im Verlauf der Mykorrhizierung zeigte (Abbildung III.80 B). Im Gegensatz zu diesen beiden AM-Markergenen wird *Mtr.10987* bei einer sich ausbreitenden Kolonisation durch *G. intraradices* nicht signifikant verstärkt exprimiert.



**Abbildung III.80:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in einer Zeitreihe von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln. A: Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei unabhängigen Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.21 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. B: Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* und zum Vergleich von *MtPT4* und *MtBCP1* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei unabhängigen Wurzeln. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Zur besseren Darstellbarkeit wurden die Expressionsdaten in B logarithmisch aufgetragen. Die zum Vergleich herangezogenen Expressionsdaten für *MtPT4* und *MtBCP1* stammen aus Hogekamp *et al.* (2011).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es sich bei *Mtr.10987* um einen wurzelspezifischen Transkriptionsfaktor mit AP2/ERF-Bindedomäne handelt, der in mykorrhizierten Wurzeln verschiedener Stadien relativ konstant exprimiert wird, nicht auf eine Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs reagiert und vermutlich *downstream* DMI3 in der frühen Kontaktphase der AM-Symbiose agiert. Um einen tieferen Einblick in die Funktion des *Mtr.10987* Genprodukts zu erlangen wurde im Folgenden versucht ein gezieltes *knockout* durch Insertionsmutanten bzw. RNAi-vermitteltes *knockdown* der *Mtr.10987* Expression zu erzielen, um dessen phänotypische Auswirkungen auf die AM-Symbiose zu beobachten.

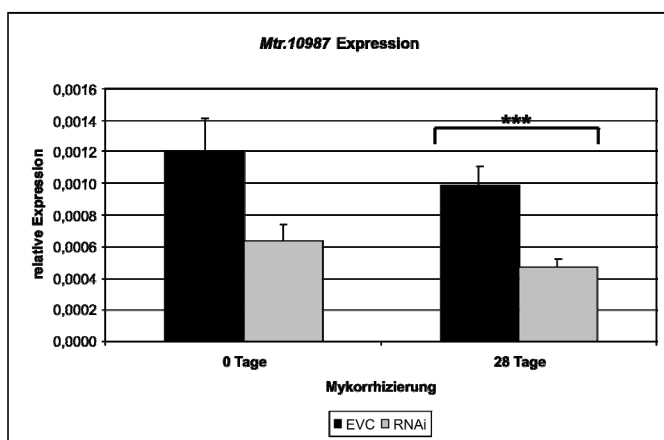
### III.3.3.8.3 Für die funktionelle Analyse von *Mtr.10987* mittels Tnt1-Insertionsmutanten konnten keine homozygoten Pflanzen identifiziert werden

Für das Kandidatengen *Mtr.10987* konnten insgesamt zwei Tnt1-Insertionslinien mit den Bezeichnungen NF9704 und NF10424 identifiziert werden. Anhand der von der Noble Foundation zur Verfügung gestellten Sequenzdaten ließen sich Position und Orientierung der Tnt1-Insertionen in *Mtr.10987* bestimmen. Beide Insertionen lagen in 5'-3'-Orientierung mitten in der Kodierregion des Kandidatengens, im Falle von NF9704 192 bp und im Falle von NF10424 153 bp vom Genstart entfernt (Abbildung III.77). Wie in Abschnitt III.2.3 beschrieben, wurde versucht Pflanzen mit homozygoten Tnt1-Insertionen in *Mtr.10987* für weiterführende Analysen beider Linien zu

identifizieren, was allerdings nicht gelang. Für die Linie NF9704 konnte in keiner der 20 mittels PCR genotypisierten R1-Pflanzen die gewünschte Tnt1-Insertion nachgewiesen werden (Tabelle III.4). Für die Linie NF10424 konnten zumindest heterozygote Pflanzen für die gewünschte Tnt1-Insertion identifiziert werden, homozygote Pflanzen ließen sich jedoch trotz eines besonders umfangreichen Genotypisierungsansatzes von 50 Pflanzen (siehe Abschnitt III.2.3) nicht ermitteln (Tabelle III.4). Demzufolge konnten keine funktionellen Analysen von *Mtr.10987* mittels Tnt1-Insertionsmutanten durchgeführt werden.

#### III.3.3.8.4 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.10987* resultiert in einer verminderten Expression wichtiger AM-Markergene

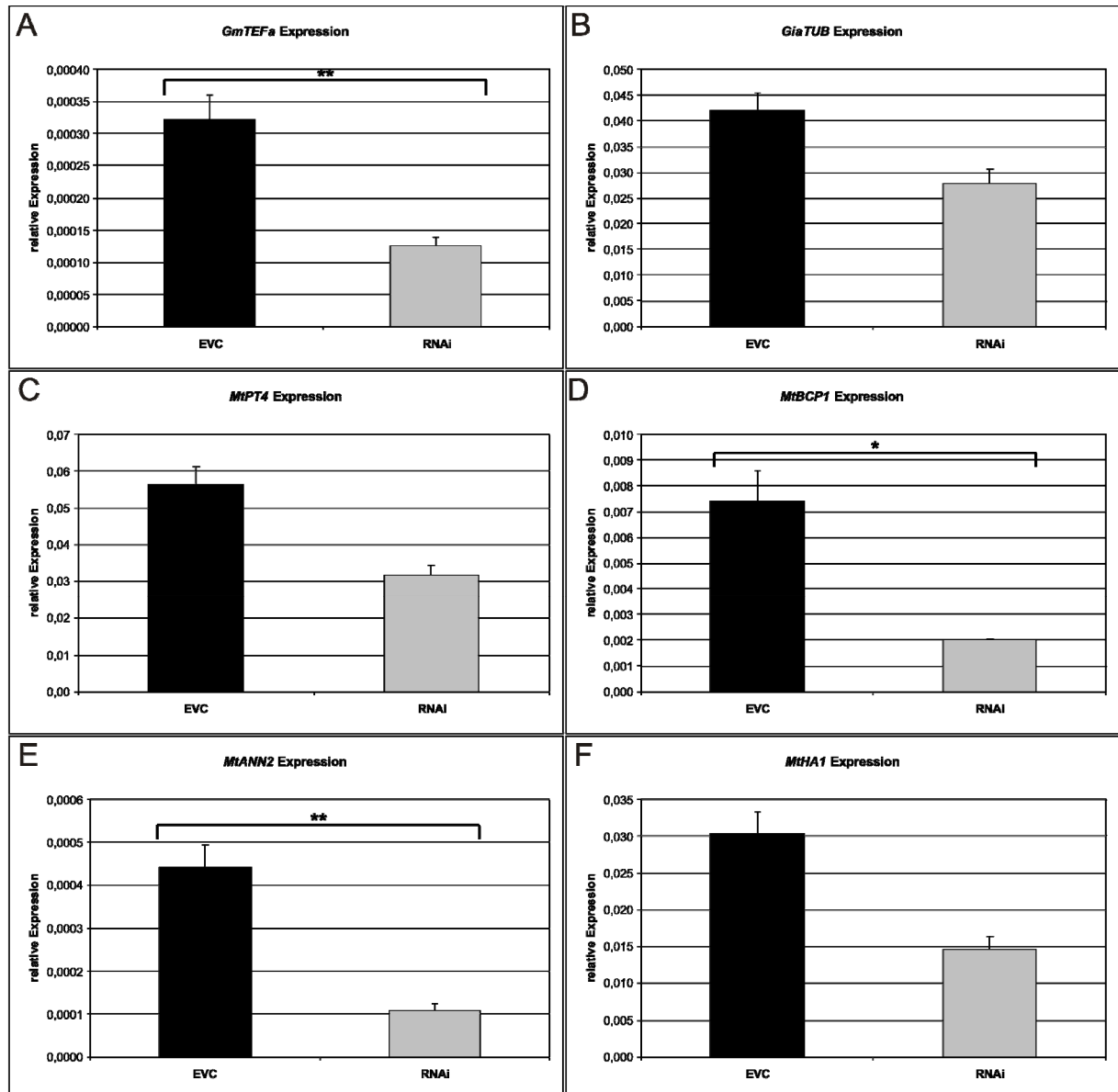
Zur Analyse von *Mtr.10987* mittels RNAi-*knockdown* wurde das RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987*, wie in Abschnitt III.2.2 beschrieben, erstellt. Mit diesem Konstrukt sowie dem leeren Kloniervektor pK7GWIWG2(II) als Kontrolle (EVC: *empty vector control*) wurden zunächst transgene Wurzeln in *M. truncatula* induziert und diese bezüglich eines RNAi-Effekts untersucht. Dies erfolgte parallel in transgenen, nicht-mykorrhizierten Wurzeln beider Konstrukte sowie in entsprechenden für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhizierten Wurzeln. *Real time* RT-PCR Messungen zeigten, dass die relative Expression von *Mtr.10987* in den RNAi- im Vergleich zu den EVC-Wurzeln sowohl in mykorrhizierten als auch in nicht-mykorrhizierten Wurzeln auf 48,04 % bzw. auf 52,66 % reduziert war (Abbildung III.81). Als hochsignifikant ließ sich diese Reduktion zwar nur in den mykorrhizierten Wurzeln (mit  $p = 5 \times 10^{-4}$ ) nachweisen, tendenziell war sie aber auch in den nicht-mykorrhizierten (mit  $p = 0,14$ ) Wurzeln zu beobachten. Des Weiteren ließ sich anhand eines Vergleichs der beiden EVC-Kontrollen miteinander feststellen, dass *Mtr.10987* in mykorrhizierten Wurzeln nicht signifikant (mit  $p = 0,52$ ) anders exprimiert ist als in nicht-mykorrhizierten. Dieses Ergebnis entspricht der in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln etwa gleich starken *Mtr.10987* Expression des MtGEA-Expressionsprofils (Abbildung III.78).



**Abbildung III.81:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 bzw. 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils sieben EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen

Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.22 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

In den für 28 Tage mykorrhizierten EVC- und RNAi-Wurzeln wurde mittels weiterer *real time* RT-PCR Messungen überprüft ob sich die Expression ausgewählter AM-Markergene durch die hochsignifikante Reduktion der *Mtr.10987* Transkriptmenge verändert hatte. Dabei zeigten alle sechs gemessenen Markergene eine verminderte relative Expression in den RNAi- im Vergleich zu den Kontroll-Wurzeln (Abbildung III.82).



**Abbildung III.82:** Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A), *GiaTUB* (B), *MtPT4* (C), *MtBCP1* (D), *MtANN2* (E) und *MtHA1* (F) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils sieben EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Abbildung C.23 im Anhang zu entnehmen. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Für die Transkriptmenge der AM-Markergene *GmTEF $\alpha$* , *MtBCP1* und *MtANN2* konnte eine signifikante Reduktion auf im Mittel 38,87 % (mit  $p = 0,014$ ), 27,02 % (mit  $p = 0,074$ ) und 24,61 % (mit  $p = 0,032$ ) festgestellt werden (Abbildung III.82). Für die Markergene *Gi $\alpha$ TUB*, *MtPT4* und *MtHA1* war dieser Effekt mit einer Reduktion der Expression auf durchschnittlich 65,8 % (mit  $p = 0,214$ ), 56,47 % (mit  $p = 0,218$ ) und 48,59 % (mit  $p = 0,152$ ) tendenziell ebenfalls vorhanden, konnte aber nicht als signifikant eingestuft werden (Abbildung III.82). Die in den RNAi-Wurzeln gemessene signifikante Reduktion von *GmTEF $\alpha$*  und die tendenzielle Reduktion von *Gi $\alpha$ TUB* könnte auf eine verminderte Menge an AM-Pilzgewebe in den RNAi-Wurzeln hinweisen. Die Transkriptmenge der Arbuskel-spezifisch exprimierten Gene *MtPT4* und *MtHA1* ist in den RNAi-Wurzeln tendenziell, aber nicht signifikant reduziert, während die Arbuskel-induzierten Gene *MtBCP1* und *MtANN2* in den RNAi-Wurzeln signifikant geringer exprimiert werden. Insgesamt deuten diese Daten auf eine mögliche Beeinträchtigung der Arbuskelfunktionalität in Wurzeln mit einer reduzierten Menge des *Mtr.10987* Transkripts hin.

Um festzustellen in welchen AM-Stadien die Reduktion des *Mtr.10987* Transkripts die Expression von AM-Markergenen am meisten beeinflusst, wurden als nächstes die Auswirkungen des RNAi-Konstrukts in einer Mykorrhizierungszeitreihe untersucht. Hierfür wurden *M. truncatula* Pflanzen mit entsprechend transgenen RNAi- und EVC-Wurzeln für 5, 10, 16 und 22 Tage mit *G. intraradices* mykorrhiziert, die transgenen Wurzeln geerntet und einer RNA-Extraktion unterzogen. Real time RT-PCR Messungen zeigten für alle vier Zeitpunkte einen hochsignifikanten RNAi-Effekt in RNAi im Vergleich zu entsprechenden Kontrollwurzeln (Abbildung III.83 A). Mit einer Reduktion der *Mtr.10987* Transkriptmenge auf 56,50 %, 43,52 %, 56,07 % und 45,75 % nach jeweils 5, 10, 16 und 22 Tagen Mykorrhizierung (Abbildung III.83 A) ließ sich auf einen im Mittel etwa 50%igen RNAi-Effekt durch das Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* schließen, was den zuvor bereits gemessenen Werten (Abbildung III.81) entsprach.

Neben den zuvor bereits gemessenen AM-Markergenen *GmTEF $\alpha$* , *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* wurden in dieser Zeitreihe zusätzlich die relativen Expressionen der AM-Markergene *MtENOD11*, *MtCBF1* und *MtCBF2* bestimmt. Im Wesentlichen zeigte die Expression aller gemessenen Markergene - mit Ausnahme von *MtENOD11* - das gleiche Muster: Die Markergene wiesen eine mit der Zeit ansteigende relative Expression auf, die nach 22-tägiger Mykorrhizierung ihren Höhepunkt erreichte. Nach 5, 10 und 16 Tagen Mykorrhizierung war zunächst kein starker Expressionsunterschied zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln zu erkennen (Abbildung III.83). Nach 22 Tagen Mykorrhizierung hingegen ließ sich eine einheitliche Reduktion aller gemessenen Markergene in den RNAi-Wurzeln erkennen, signifikant war dieser Effekt allerdings nur für *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtCBF2* (Abbildung III.83). Die einzige Ausnahme von diesem Muster stellte *MtENOD11* dar, da dieses Gen nach 22-tägiger Mykorrhizierung in den RNAi-Wurzeln nicht niedriger als in den EVC-Wurzeln exprimiert war (Abbildung III.83 F).

*GmTEF $\alpha$*  wird als *housekeeping* Gen konstant in *G. intraradices* exprimiert. Die mit der Zeit zunehmende Expression von *GmTEF $\alpha$*  in den Kontrollwurzeln spiegelt die zunehmende Kolonisation der Pflanzenwurzeln durch *G. intraradices* wieder. Obwohl dieser Effekt nicht signifikant ( $p = 0,15$ ) ist, war tendenziell zu erkennen, dass nach 22-tägiger Mykorrhizierung die



*GmTEFα* Expression in den RNAi-Wurzeln deutlich niedriger als in EVC-Wurzeln ist (Abbildung III.83 B), wie es bereits nach 28-tägiger Mykorrhizierung (Abbildung III.82) zu beobachten war.

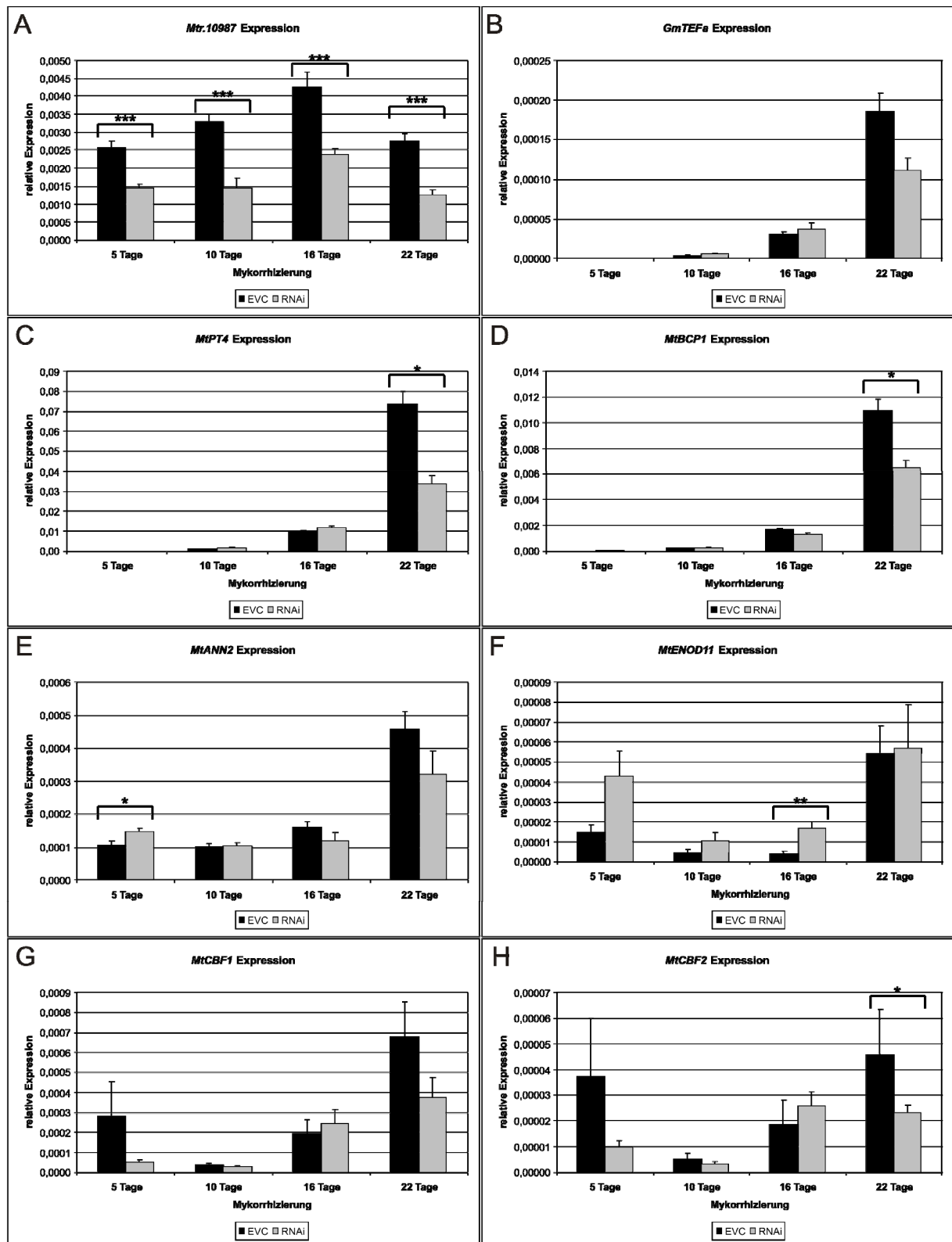


Abbildung III.83: Die relative Expression des Kandidatengens *Mtr.10987* und verschiedener AM-Markergene in einer Zeitreihe von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real-time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* (A), *GmTEFα* (B), *MtPT4* (C), *MtBCP1* (D), *MtANN2* (E), *MtENOD11* (F), *MtCBF1* (G) und *MtCBF2* (H) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987*

gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.10987 (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 5, 10, 16 und 22 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils sieben EVC- und RNAi-Wurzeln für jeden Zeitpunkt. Abweichend davon standen nach 10 Tagen Mykorrhizierung acht RNAi-Wurzeln und nach 16 Tagen Mykorrhizierung nur sechs RNAi-Wurzeln zur Verfügung. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler. Signifikante Expressionsunterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Wie zuvor bereits beschrieben wird *MtPT4* Arbuskel-spezifisch exprimiert (Javot *et al.*, 2007a), während es sich bei *MtANN2* und *MtBCP1* um Arbuskel-induzierte Gene handelt (Manthey *et al.*, 2004; Hohnjec *et al.*, 2005) Wie erwartet zeigen diese drei Markergene in den Kontrollwurzeln eine mit der Zeit ansteigende relative Expression (Abbildung III.83 C, D und E). Nach 22-tägiger Mykorrhizierung ließen sich für die Transkriptmengen dieser Gene deutliche Unterschiede zwischen RNAi- und Kontrollwurzeln feststellen. Zu diesem Zeitpunkt war in den RNAi-Wurzeln eine für *MtPT4* und *MtBCP1* signifikant (Abbildung III.83 C und D) und für *MtANN2* tendenziell (Abbildung III.83 E) niedrigere Expression messbar. Dies deutet auf eine verminderte Anzahl bzw. verminderte Funktionalität der Arbuskeln in reifen Mykorrhizierungsstadien der RNAi-Wurzeln hin, wie es auch bereits anhand der *real time* RT-PCR Messungen nach 28-tägiger Mykorrhizierung beobachtet wurde (Abbildung III.82).

Aufgrund der Induktion von *Mtr.10987* in frühen AM-Stadien (Tabelle III.1), wurde neben der Expression der zuvor beschriebenen AM-Markergene, die vornehmlich in reifen AM-Stadien exprimiert werden, auch die Expression der Gene *MtCBF1* und *MtCBF2*, von denen bekannt ist, dass sie mit dem ersten physikalischen Kontakt zwischen den Partnern der AM-Symbiose aktiviert werden (Hogekamp *et al.*, 2011), untersucht. Beide Gene wiesen in den Kontrollwurzeln nach 5-tägiger Mykorrhizierung eine höhere Expression als nach 10 oder 16 Tagen auf, die höchste Expression wurde aber auch hier nach 22 Tagen Mykorrhizierung erreicht (Abbildung III.83 G und H). Für die frühen Zeitpunkte zeigten sich zwar tendenzielle aber keine signifikanten Unterschiede zwischen RNAi- und EVC-Wurzeln, nach 22-tägiger Mykorrhizierung jedoch war in den RNAi-Wurzeln die Expression von *MtCBF1* tendenziell und von *MtCBF2* signifikant reduziert (Abbildung III.83 G und H).

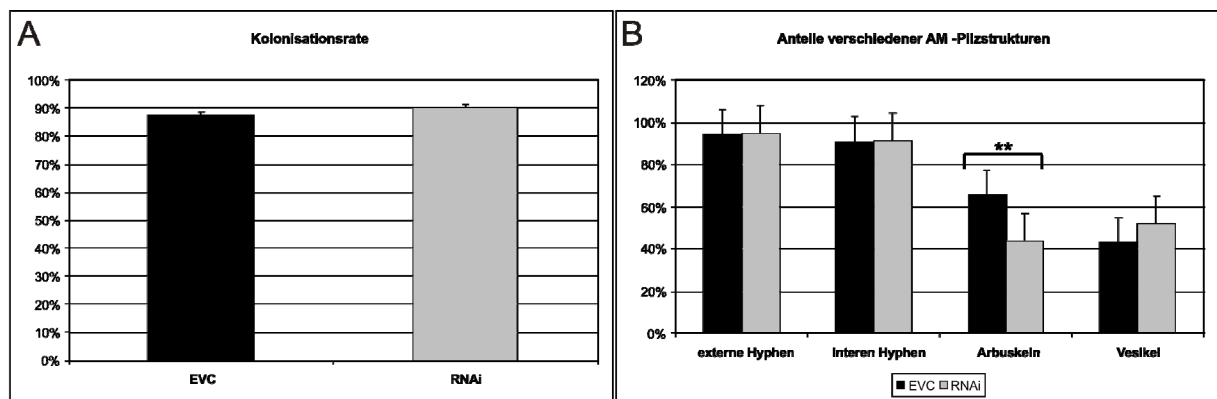
Zudem wurde die relative Expression von *MtENOD11* untersucht, einem Markergen das bereits in der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose aber auch in reifen Arbuskeln exprimiert wird (Journet *et al.*, 2001; Kosuta *et al.*, 2003; Maillet *et al.*, 2011). Die höchste *MtEnod11* Expression ließ sich in den EVC-Wurzeln nach 22 Tagen Mykorrhizierung messen, gefolgt von den Mykorrhizierungen für 5, 10 und 16 Tagen (Abbildung III.83 F). Während *MtEnod11* zu den ersten drei Zeitpunkten in den RNAi-Wurzeln jeweils stärker als in den EVC-Wurzeln exprimiert wurde, war nach der 22-tägigen Mykorrhizierung kein nennenswerter Unterschied zwischen beiden zu erkennen (Abbildung III.83 F).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die reduzierte Expression von AM-Markergenen in RNAi-Wurzeln mit verminderter *Mtr.10987* Transkriptmenge vornehmlich in späten (22 und 28 Tage Mykorrhizierung) Mykorrhizastadien zu beobachten war. Die reduzierten Expressionen in diesen späten Stadien deuten auf einen verminderten Menge an AM-Pilzgewebe sowie eine verringerte Anzahl bzw. Funktionalität von Arbuskeln hin. Neben den erzielten Ergebnissen zeigten sich anhand der *real time* RT-PCR Messungen dieser Mykorrhizierungszeitreihe jedoch

auch einige methodische Probleme. Die Expression vieler AM-Markergene in sehr frühen AM-Stadien (wie hier nach 5-tägiger Mykorrhizierung) ist sehr niedrig und lag daher häufig unterhalb der Nachweisgrenze der *real time* RT-PCR. Das bedeutet, dass sich Unterschiede zwischen RNAi- und EVC-Wurzeln in sehr frühen Mykorrhizastadien mittels *real time* RT-PCR möglicherweise nicht ausreichende detektieren lassen. Um daher feststellen zu können ob die Reduktion von *Mtr.10987* auch Auswirkungen auf die Ausbildung der Symbiose in frühe und späten AM-Stadien hat, wurden die AM-Pilzstrukturen in entsprechenden RNAi-Wurzeln angefärbt und im Vergleich zu entsprechenden Kontrollwurzeln analysiert.

### III.3.3.8.5 Ein RNAi-vermittelter *knockdown* von *Mtr.10987* beeinträchtigt die Ausbildung von Pilzstrukturen in der AM-Symbiose

Um festzustellen ob sich die auf Expressionsebene gemessenen Reduktionen verschiedener AM-Markergene in späten Mykorrhizastadien auch in der konkreten Ausbildung der Symbiose widerspiegelt, wurden jeweils sechs der für 28 Tage mit *G. intraradices* mykorrhizierten RNAi- und EVC-Wurzeln mit WGA-Alexa Fluor® 488 gefärbt um die AM-Pilzstrukturen in den Wurzeln sichtbar zu machen. Wie in Abschnitt II.2.5.4 beschrieben, wurde die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in diesen Wurzeln bestimmt.

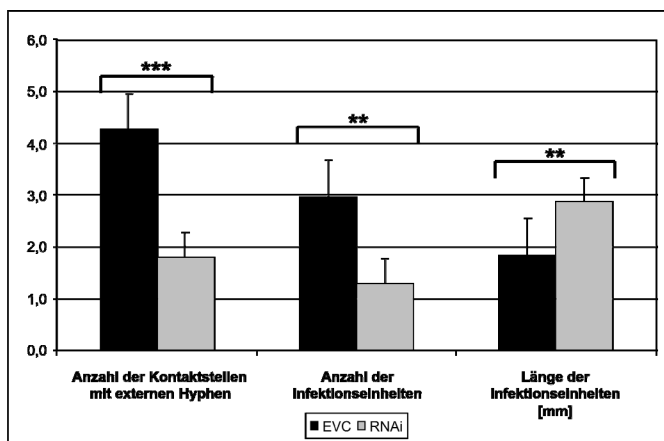


**Abbildung III.84:** Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Kolonisationsrate (A) und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte aus jeweils sechs EVC- und RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Tabelle D.7 im Anhang zu entnehmen. Signifikante Unterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ , \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Dabei zeigte sich, dass sich die Kolonisationsrate mit im Mittel 87,5 % in EVC-Wurzeln und durchschnittlich 90 % in RNAi-Wurzeln nicht signifikant voneinander unterschied (Abbildung III.84 A). Dasselbe traf für die Anteile externer Hyphen, interner Hyphen und Vesikel in den mykorrhizierten EVC- und RNAi-Wurzeln zu (Abbildung III.84 B). Der Anteil an Arbuskeln hingegen, war in den RNAi-Wurzeln mit im Mittel 43,5 % (mit  $p = 0,025$ ) signifikant niedriger als in

den EVC-Wurzeln mit einem Mittelwert von 65,5 % (Abbildung III.84 B). Die bereits anhand der *real-time* RT-PCR Daten aus Abschnitt III.3.3.8.4 vermutete Reduktion von Arbuskeln in den RNAi-Wurzeln, stimmt sehr gut mit der verminderten Expression von *MtPT4* (Abbildung III.83 C und Abbildung III.82 C), *MtBCP1* (Abbildung III.83 D und III.82 D) und *MtANN2* (Abbildung III.83 E und III.82 E) nach 22-tägiger bzw. 28-tägiger Mykorrhizierung überein. Des Weiteren könnte der verrinderte Arbuskel-Anteil die in Abbildung III.82 dargestellte signifikant niedrigere *GmTef $\alpha$*  Expression erklären, da diese keinen Hinweis darauf gibt welcher Art das vermindert vorhandenen Pilzgewebe ist.

Zur Analyse früher AM-Stadien wurden für 7 Tage mit *G. intraradices* mykorrhizierte, transgene EVC- und RNAi-Wurzeln mit WGA-Alexa Fluor® 488 gefärbt und bezüglich der vorhandenen Pilzstrukturen analysiert. Aufgrund des hier untersuchten frühen Mykorrhizastadiums und der damit verbundenen geringen Kolonisation der Wurzeln konnten diese nicht mittels der *gridline intersections* Methode ausgewertet werden. Stattdessen wurde für jede Wurzel einzeln gezählt an wie vielen Stellen sich externe Hyphen an die Wurzeln angelagert hatten und an wie vielen Stellen der AM-Pilz bereits in die Wurzeln eingedrungen war und eine Infektionseinheit ausbildete. Zudem wurde mit Hilfe eines Längenstandards die Länge jeder Infektionseinheit abgeschätzt. Nach der Analyse von 27 unabhängigen EVC- und 25 RNAi-Wurzeln zeigte sich ganz klar, dass die Ausbildung früher AM-Stadien in den RNAi-Wurzeln signifikant beeinträchtigt war. Hier gab es 57,74 % weniger Kontaktstellen zwischen Wurzeln und externen Hyphen sowie 56,8 % weniger Infektionseinheiten. Die in den RNAi-Wurzeln vorhandenen Infektionseinheiten waren dafür signifikant um durchschnittlich 1,02 mm länger als in den EVC-Wurzeln (Abbildung III.85). Anhand dieser Ergebnisse lässt sich vermuten, dass die Fähigkeit mit AM-Pilzen in Kontakt zu kommen und Infektionseinheiten auszubilden in Wurzeln mit reduzierter *Mtr.10987* Expression beeinträchtigt ist. Es ist daher denkbar, dass *Mtr.10987* eine Rolle in diesem Prozess spielt. Die signifikant längeren Infektionseinheiten der RNAi-Wurzeln lassen sich vermutlich dadurch erklären, dass die geringere Anzahl an Infektionseinheiten in den zur besseren Mykorrhizierung unter Phosphat-Mangel angezogenen Pflanzen einem höheren Wachstumsdruck unterlagen, während sich in den Kontrollwurzeln signifikant mehr Infektionseinheiten parallel entwickelten.



**Abbildung III.85:** Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge (in mm) von Infektionseinheiten in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 7 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten Werten handelt es sich um

Mittelwerte aus 27 EVC-Wurzeln und 25 RNAi-Wurzeln. Diesen Mittelwerten zugrunde liegende Einzelwerte sind Tabelle D.8 im Anhang zu entnehmen. Signifikante Unterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Zusammenfassend ließ sich mittels eines gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukts zeigen, dass dieses Gen eine Rolle in der Ausbildung der AM-Symbiose in *M. truncatula* zu spielen scheint. Bereits durch eine Reduktion der *Mtr.10987* Transkriptmenge um durchschnittlich 50 % war sowohl die Expression wichtiger AM-Markergene als auch die Ausbildung der AM in frühen und reifen Stadien maßgeblich beeinträchtigt. Obwohl ein vollständiger *knockout* dieses Gens mittels Insertionsmutagenese (Abschnitt III.3.3.7.3) nicht untersucht werden konnte, legen die erzielten Ergebnisse eine regulatorische Funktion des ERF-Transkriptionsfaktors in der AM-Symbiose nahe.



## IV. DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt 17 *M. truncatula* Gene bezüglich einer potentiellen Rolle in der AM-Symbiose mit *G. intraradices* untersucht. Die funktionellen Analysen erfolgten durch Promotorstudien sowie durch ein *knockdown* bzw. *knockout* der entsprechenden Gene mittels RNAi bzw. Insertionsmutanten. Um methodische Probleme von vornherein zu minimieren, erfolgten die funktionellen Analysen für die meisten der untersuchten Gene durch eine Kombination zweier verschiedener *reverse genetics* Ansätze (Tabelle III.2). Dennoch ließ sich nicht verhindern, dass für vier der untersuchten Gene kein RNAi-vermittelter *knockdown* erzielt werden konnte (Tabelle III.2) bzw. keine fertilen, homozygoten *knockout*-Mutanten identifiziert wurden (Tabelle III.4). Daher konnten die Gene *Mtr.9513*, *Mtr.21216*, *Mtr.32288* und *Mtr.37966* nicht näher charakterisiert werden und eine Aussage bezüglich ihrer möglichen Rolle in der AM-Symbiose lässt sich nicht machen. Insgesamt konnte für sieben der zwölf im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen RNAi-Konstrukte ein signifikanter RNAi-Effekt gemessen werden, was einem Anteil von rund 58 % entspricht. Da der durch eine bestimmte *Target*-Sequenz erzielte RNAi-Effekt im Vorfeld generell nicht vorhersagbar ist (McGinnis, 2010), ist die Tatsache, dass nicht alle der hier beschriebenen RNAi-Konstrukte in der Lage waren einen signifikanten RNAi-Effekt hervorzurufen, grundsätzlich nicht überraschend. Eine Möglichkeit diesen Anteil zu erhöhen, besteht darin, für jedes Gen mehrere RNAi-Konstrukte mit verschiedenen *Target*-Sequenzen zu generieren (McGinnis, 2010). Da dies im Rahmen dieser Arbeit zugleich eine Einschränkung der Anzahl der untersuchten Gene bedeutet hätte, wurde, gerade im Hinblick auf die parallel untersuchten Insertionsmutanten dieser Gene, bewusst darauf verzichtet. Von den insgesamt 20 untersuchten Tnt1-Linien konnten für nur 11 Linien Pflanzen mit einer homozygoten Tnt1-Insertion im gewünschten Gen identifiziert werden (Tabelle III.4). Darüber hinaus ließ sich auch ein generelles Fertilitätsproblem der Tnt1-Insertionsmutanten feststellen. Von den für das jeweilige Kandidatengen als homozygot identifizierten Tnt1-Insertionsmutanten waren etwa 25 % steril (Tabelle III.4). Fast alle phänotypisch charakterisierten Nachkommen fertiler Pflanzen mit homozygoter Tnt1-Insertion im jeweiligen Kandidatengen besaßen zudem signifikant weniger Samenkapseln als entsprechende Wildtyp-Pflanzen (Abschnitt III.3.2.2.3, III.3.3.4.5 und III.3.3.6.4). In publizierten Arbeiten mit Tnt1-Insertionsmutanten von *M. truncatula* (Benlloch *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2011; Tadege *et al.*, 2011; Uppalapati *et al.*, 2012) konnten keinerlei Hinweise auf ähnliche Beobachtungen gefunden werden. Eine mögliche Ursache für derartige Fertilitätsprobleme könnten die bislang größtenteils unbekanntes Hintergrundinsertionen des Retrotransposons Tnt1 und der Fokus auf Gene sein, die für wichtige Komponenten wie Transkriptionsfaktoren kodieren.

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen der übrigen untersuchten Gene werden in den folgenden Abschnitten diskutiert. Dabei ergaben die Analysen von vier Genen (*Mtr.11570*, *Mtr.25945*, *Mtr.43223* und *Mtr.49618*) keine konkreten Anhaltspunkte auf eine Rolle dieser Gene in der AM-Symbiose. Für die Genprodukte der verbliebenen neun Kandidatengene hingegen, gab es Hinweise auf eine potentiell AM-assoziierte Funktion. Dabei wiesen die Ergebnisse der

funktionellen Analysen von sechs dieser Gene (*Mtr.20292*, *MtMKS1*, *Mtr.12220*, *MtSK1*, *Mtr.38547* und *Mtr.9126*) auf eine mögliche Rolle in der AM-Symbiose hin, schlossen jedoch aufgrund der beobachteten Effekte eine zentrale Bedeutung dieser Gene in der Signaltransduktion der AM aus. Die funktionellen Analysen der drei Kandidatengene *Mtr.40638*, *Mtr.7264* und *Mtr.10987* zeigten die deutlichsten und stärksten Beeinträchtigungen der AM-Symbiose, so dass eine wichtige Funktion dieser Gene für die AM-Symbiose diskutiert wird.

#### IV.1 Gene ohne offensichtlichen Bezug zur AM-Symbiose

Für 4 der 17 untersuchten Kandidatengene konnte kein direkter Bezug zur AM-Symbiose nachgewiesen werden. Die Analysen der Gene *Mtr.11570*, *Mtr.25945*, *Mtr.43223* und *Mtr.49618* lieferten keinerlei konkrete Anhaltspunkte für die essentielle Beteiligung ihrer Genprodukte in der Ausbildung der AM-Symbiose.

Die funktionelle Analyse des ERF-Transkriptionsfaktors *Mtr.11570* erfolgte anhand von *Tnt1*-Insertionsmutanten. Dabei zeigten homozygote Insertionsmutanten dieses Gens jedoch weder phänotypisch noch in der Mykorrhizierung durch *G. intraradices* oder in der Expression verschiedener AM-Markergene signifikante Unterschiede zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen (Abschnitt III.3.3.1). Entsprechend verhielt es sich mit dem GRAS-Transkriptionsfaktor *Mtr.43223*. Auch hier waren homozygote Insertionsmutanten des Gens weder im Phänotyp noch in der Expression von AM-Markergenen von entsprechenden Wildtyp-Kontrollen zu unterscheiden (Abschnitt III.3.3.2). Da ein *knockout* der Gene *Mtr.11570* und *Mtr.43223* keinerlei Auswirkungen auf die Ausbildung der AM-Symbiose in den Wurzeln homozygoter *Tnt1*-Insertionsmutanten zeigte, ist davon auszugehen, dass die Expression dieser Gene nicht entscheidend für die Symbiose ist. Völlig auszuschließen ist dies aufgrund der vorliegenden Daten andererseits nicht, da für beide Gene die Möglichkeit besteht, dass ein anderes Gen ihre Rolle in den *knockout* Mutanten übernommen hatte.

Da für den DREB-Transkriptionsfaktor *Mtr.49618* keine *Tnt1*-Insertionsmutanten zur Verfügung standen, und mit einem für dieses Gen generiertem RNAi-Konstrukt kein signifikanter RNAi-Effekt erzeugt werden konnte (Abbildung III.47), erfolgten die Analysen dieses Gens mit Hilfe eines Promotor-GUS-Konstrukts. Dabei zeigte sich jedoch, dass die Promotoraktivität von *Mtr.49618* weder durch eine Kolonisation mit *G. intraradices* in verschiedenen Stadien (Abbildung III.49) noch durch Myc-LCOs (Abbildung III.50) beeinflusst wurde. Zwar lässt sich allein aufgrund dieser Beobachtungen eine Rolle von *Mtr.49618* in der Signaltransduktion der AM-Symbiose nicht ausschließen, zumindest in Bezug auf Myc-LCOs ist sie jedoch eher unwahrscheinlich.

Mit Hilfe eines spezifischen RNAi-Konstrukts konnte die Transkriptmenge des Gens *Mtr.25945* um durchschnittlich 50 % reduziert werden (Abbildung III.60), was allerdings keinerlei Auswirkungen auf die Mykorrhizierung (Abbildung III.62) oder die Expression von AM-Markergenen (Abbildung III.61) in entsprechend transgenen *M. truncatula* Wurzeln zeigte. Um auszuschließen, dass der erzeugte RNAi-Effekt zu schwach war, um einen messbaren Effekt hervorzurufen, wurden zudem homozygote *Tnt1*-Insertionsmutanten des MYB-Transkriptionsfaktors *Mtr.25945* identifiziert,



deren funktionelle Analysen jedoch noch ausstehen (Abschnitt III.3.3.5.3). Auch für das Gen *Mtr.25945* ist eine Rolle in der AM-Symbiose somit eher unwahrscheinlich, kann anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. Hierzu wären weitere Analysen der Insertionsmutanten notwendig, die zugunsten der im Folgenden diskutierten Kandidatengene zurückgestellt wurden.

## IV.2 Signalverarbeitungs-assoziierte Gene mit potentieller Bedeutung für die AM-Symbiose

### IV.2.1 Die Rolle der Zellwand-assoziierten Rezeptorkinase *Mtr.20292* in der AM-Symbiose

Für das als Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase annotierte und Symbiose-spezifisch (Abbildung III.11) exprimierte Gen *Mtr.20292* konnte anhand eines RNAi-vermittelten *knockdowns* auf durchschnittlich 36 % der in entsprechenden Kontrollen gemessenen Transkriptmenge (Abbildung III.12; Schaepe, 2011) eine signifikante Reduktion der Expression zweier AM-Markergene bestimmt werden. Diese verminderte Expression der Gene *MtPT4* und *GiaTUB* (Abbildung III.13; Schaepe, 2011) lässt vermuten, dass sowohl die funktionelle Ausbildung von Arbuskeln als auch die Besiedlung der RNAi-Wurzeln durch *G. intraradices* beeinträchtigt sind. Ein vollständiger *knockout* von *Mtr.20292* könnte Klarheit darüber verschaffen, ob es sich bei diesem Gen um ein für die AM-Symbiose essentielles Gen handelt. Bisher konnten aber keine Insertionsmutanten mit einer homozygoten *Tnt1*-Insertion in *Mtr.20292* identifiziert werden (Abschnitt III.3.1.1.2).

Allgemein handelt es sich bei Zellwand-assoziierten Rezeptorkinasen um Transmembranproteine mit einer cytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinase Domäne und einer extrazellulären Rezeptor-Domäne (Verica & He, 2002). Als physikalisches Bindeglied zwischen der extrazellulären Matrix und dem Cytoplasma dienen sie der Signaltransduktion zwischen diesen beiden (He et al., 1996; Kohorn, 2000). Dabei spielen sie unter anderem eine Rolle in der pflanzlichen Immunantwort (Tena et al., 2011) und werden durch Verwundung oder Pathogene induziert (Kohorn, 2001). Für *Mtr.20292* wäre eine Rolle als Zellwand-assoziierte Rezeptorkinase im Rahmen der Transduktion mikrobieller Signale über die Plasmamembran somit durchaus denkbar. Dabei wird *Mtr.20292* in frühen und späten AM-Stadien in Wildtyp-Pflanzen, nicht aber in *dmi3*-Mutanten induziert (Tabelle III.1). Dies legt für das *Mtr.20292* Genprodukt eine Rolle *downstream* MtDMI3 nahe, denkbar wäre hier beispielsweise eine Lokalisation in der Membran des PPA. Dabei muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die Auswirkungen der reduzierten *Mtr.20292* Expression auch als sekundärer Effekt aufgetreten sein könnten. So konnten beispielsweise Lally et al. (2001) zeigen, dass der *knockdown* einer Zellwand-assoziierten Rezeptorkinase aus *A. thaliana* auch einen Effekt auf andere Zellwandproteine hatte.

Letztlich lässt sich anhand der bisher vorliegenden Daten keine abschließende Aussage zur Funktion von *Mtr.20292* in der AM-Symbiose von *M. truncatula* machen.

### IV.2.2 Die Rolle des Map-Kinase Substrats 1 in der AM-Symbiose

Die funktionelle Analyse des ausschließlich in frühen AM-Stadien induzierten Gens *MtMKS1* erfolgte anhand von *Tnt1*-Insertionsmutanten. Dabei ließ sich feststellen, dass homozygote Insertionsmutanten des *MtMKS1* Gens sich weder phänotypisch (Abbildung III.18) noch in ihrer Mykorrhizierung (Abbildung III.19) signifikant von entsprechend behandelten Wildtyp-Pflanzen unterscheiden. Lediglich die Expression einiger AM-Markergene zeigte signifikante Unterschiede zum Wildtyp (Abbildung III.20). So war die Expression von *MtPT4* und *MtANN2* in den Wurzeln der Insertionsmutanten signifikant niedriger und von *MtBCP1* signifikant höher als in vergleichbaren Wildtyp-Wurzeln (Abbildung III.20), was zunächst sehr widersprüchlich erschien. Bei näherer Betrachtung sind jedoch gerade *MtPT4* und *MtBCP1* in verschiedenen Abschnitten der PAM lokalisiert. Betrachtet man Arbuskeln als „Bäumchen“-Strukturen, so ist *MtPT4* ausschließlich in den „Verästelungen“ und *MtBCP1* ausschließlich im „Stamm“ der Arbuskel-umspannenden PAM lokalisiert (Pumplin & Harrison, 2009). Diese regional begrenzten Lokalisationen spiegeln zugleich den transienten Übergang zwischen der PAM und der „normalen“ Plasmamembran wider, die mit der Expression spezifischer Proteine einhergeht (Pumplin & Harrison, 2009). Somit könnten die vorliegenden Daten darauf hindeuten, dass die „Verästelungen“ der Arbuskeln in Insertionsmutanten von *Mtr.20292* funktionell eingeschränkt sind, was wiederum ein Hinweis auf die mögliche Beteiligung des *MtMKS1* Genprodukts in der AM-Symbiose darstellt. Wie die *Medicago GeneChip* Daten für dieses Gen nahe legen (Tabelle III.1), ist eine mögliche Rolle für *MtMKS1* dabei im Rahmen der MAP Kinase Signalkaskade *upstream* *MtDMI3* oder unabhängig des CSP zu sehen. Generell handelt es sich bei der MAP-Kinase Signalkaskade um einen schnellen und konservierten Signaltransduktionsweg, der beispielsweise bei Abwehrreaktionen eine wichtige Rolle spielt (Tena *et al.*, 2011). Für das homologe *MKS1*-Protein aus *A. thaliana* konnte gezeigt werden, dass es an der Pathogenabwehr und pflanzlichen Immunantwort beteiligt ist (Andreasson *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2010). Dort wird *AtMKS1* durch die für die Pathogenabwehr notwendige *A. thaliana* Map Kinase 4 (*AtMK4*) aktiviert, wodurch es wiederum spezifisch mit zwei Transkriptionsfaktoren interagieren kann (Andreasson *et al.*, 2005). Eine ähnliche Rolle für *MtMKS1* wäre, sowohl im Rahmen der pflanzlichen Immunantwort als auch in abgewandelter Form im Rahmen der AM-Signaltransduktion, denkbar. Sollte dies zutreffen, ist jedoch davon auszugehen, dass das *MtMKS1* Genprodukt keine zentrale Rolle in der AM-Signalkaskade spielt, da bei einem *knockout* eines für die AM-Symbiose essentiellen Gens drastischere Beeinträchtigungen der Mykorrhizierung zu erwarten wären. Alternativ ist es möglich, dass die Auswirkungen des *MtMKS1* *knockouts* auf die AM-Symbiose indirekter Natur sind und durch Beeinträchtigungen anderer Prozesse entstehen.

### IV.2.3 Die Rolle des Elicitor-induzierten Proteins *Mtr.12220* in der AM-Symbiose

Die funktionellen Analysen des Kandidatengens *Mtr.12220* erfolgten mittels eines RNAi-Konstrukts sowie eines Promotor-GUS-Konstrukts. Mit Hilfe des RNAi-Konstrukts ließ sich zwar ein

signifikanter RNAi-Effekt in entsprechend transgenen Wurzeln messen (Abbildung III.24; Schaepe, 2011), Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen hatte dies jedoch nicht (Abbildung III.25; Schaepe, 2011). Da keine Insertionsmutanten für *Mtr.12220* zur Verfügung standen, konnte nicht ermittelt werden, ob ein vollständiger *knockout* des Gens deutlichere Auswirkungen zur Folge gehabt hätte. Durch ein Promotor-GUS-Konstrukt ließ sich jedoch eindeutig zeigen, dass *Mtr.12220* einen starken Promotor besitzt, der in mykorrhizierten Wurzeln ein spezifisches Expressionsmuster aufweist. Während die GUS-Aktivität in nicht-mykorrhizierten Wurzeln ausschließlich auf das Leitgewebe beschränkt war, ließ sich diese in mykorrhizierten Wurzeln in diesem Bereich nicht mehr nachweisen und umfasst stattdessen Epidermis, Kortex und Wurzelhaare (Abbildung III.27). In mykorrhizierten Wurzeln war diese Promotoraktivität bereits in sehr frühen Stadien nachweisbar, konnte durch eine Behandlung entsprechend transgener Wurzeln mit Myc-LCOs jedoch nicht beobachtet werden (Abbildung II.28 und III.29). Im Rahmen der *Medicago* GeneChip Analysen wurde eine signifikante Induktion von *Mtr.12220* nach Behandlung mit Sporen bzw. Überständen gekeimter Sporen von *G. intraradices* beobachtet (Tabelle III.1), die eine Aktivität dieses Gens in der Prä-Kontaktphase der Symbiose nahe legten. Dass sich dies durch eine Behandlung mit Myc-LCOs nicht bestätigen ließ, schließt jedoch die Möglichkeit, dass der Promotor von *Mtr.12220* auf Myc-LCOs in einem anderen Mischungsverhältnis oder einer anderen Konzentration oder auf bislang unbekannte pilzliche Signalmoleküle reagiert, nicht aus. Insgesamt zeigte die Promotoraktivität von *Mtr.12220* jedoch einen deutlichen Bezug zur Symbiose zwischen *M. truncatula* und *G. intraradices*.

Das Gen *Mtr.12220* weist Ähnlichkeiten zu dem Phosphat-induzierten Gen *PHI-1* (Sano *et al.*, 1999) aus Tabak, sowie dem Pathogen-induzierten Gen *ERG-1* (Dellagi *et al.*, 2000) aus der Kartoffel auf. *PHI-1* (*phosphate-induced gene 1*) wurde ursprünglich aufgrund seiner Induktion in unter Phosphatmangel angezogenen Tabak-Zellkulturen nach Zugabe von Phosphat identifiziert (Sano *et al.*, 1999). Im N-terminalen Bereich des Gens ließen sich Ähnlichkeiten mit einer Plasmamembran-ATPase identifizieren, die darauf hindeuten, dass *PHI-1* an einem Phosphorylierungsprozess beteiligt sein könnte; möglicherweise spielt es eine Rolle im Wiedereintritt in den Zellzyklus nach Phosphatmangel-bedingtem Stillstand (Sano *et al.*, 1999). Kurz darauf wurde in Kartoffeln das sehr ähnliche Gen *ERG-1* (*Eca response gene 1*) identifiziert (Dellagi *et al.*, 2000). Für *ERG-1* konnte gezeigt werden, dass es in mit dem Bakterium *Erwinia carotovora* (*Eca*) infizierten Kartoffeln induziert wird, und daher möglicherweise eine Rolle in der Pathogenabwehr spielt (Dellagi *et al.*, 2000). Sowohl bei *PHI-1* als auch bei *ERG-1* handelt es sich um ausschließlich in Pflanzen exprimierte Proteine (Dellagi *et al.*, 2000), deren genaue Funktion bislang unbekannt ist. Dennoch scheinen beide Proteine an der Transduktion externer Signale beteiligt zu sein, was auch für das *Mtr.12220* Protein im Rahmen der AM-Symbiose denkbar wäre. Eine konkrete Rolle des Elicitor-induzierten Proteins in der AM-Symbiose lässt sich anhand der vorliegenden Daten jedoch nicht ableiten.

#### IV.2.4 Die Rolle der Stress Kinase 1 in der AM-Symbiose

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Promotoraktivität von *MtSK1* nach Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs untersucht, da entsprechende *Medicago GeneChip* Daten (Czaja *et al.*, 2012) auf eine potentielle Rolle dieses Gens in der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose hinwiesen. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Promotoraktivität von *MtSK1* durch eine Behandlung mit Myc- und Nod-LCOs im Leitgewebe von *M. truncatula* Wurzeln induzierbar war. Die stärkste Promotoraktivität zeigten die mit Nod-LCOs behandelten Wurzeln, gefolgt von den Behandlungen mit sMyc-LCOs, einer Mischung aus beiden Myc-LCOs und nsMyc-LCOs (Abbildung III.32). Unter allen untersuchten Bedingungen war die Promotoraktivität hauptsächlich in Phloem und Perizykel des Leitgewebes nachweisbar, nicht aber in Xylem und Endodermis (Abbildung III.32).

*MtSK1* gehört einer Gruppe pflanzenspezifischer Kinasen an, die der SnRK (*SNF1-related kinase*) Gruppe zugeordnet werden (Nolan *et al.*, 2006). Kinasen der SnRK-Gruppe spielen eine Rolle in der Stress-Antwort von Pflanzen, einige von ihnen sind durch Abscisinsäure induzierbar (Nolan *et al.*, 2006). Das *MtSK1* Gen wurde ursprünglich aufgrund seiner Induktion in frühen Stadien der somatischen Embryogenese von *M. truncatula* identifiziert (Nolan *et al.*, 2006). Zudem ließen sich Induktionen dieses Gens durch Verwundung in Gewebekulturen und durch Salzstress *in vivo* beobachten (Nolan *et al.*, 2006). Als mögliche Rolle der vermutlich cytoplasmatisch lokalisierten Kinase *MtSK1* wurde daher die Stress-induzierte Signaltransduktion vermutet (Nolan *et al.*, 2006). Dafür stehen *MtSK1* eine N-terminale Proteinkinase-Domäne (Abbildung III.31) für die Aktivierung anderer Proteine sowie ein C-terminales *coiled-coil* Motiv für mögliche weitere Protein-Protein-Interaktionen zur Verfügung (Nolan *et al.*, 2006). Darüber hinaus gibt es Hinweise auf ein alternativ gespleißtes *MtSK1* Transkript (Nolan *et al.*, 2006), so dass weitere Funktionen für das alternative Genprodukt denkbar sind.

Im Rahmen des durchgeführten *induction assays* ist es eher unwahrscheinlich, dass die Promotoraktivität von *MtSK1* im Rahmen der Inkubation stressbedingter Natur war. In einem solchen Fall wäre von einer vergleichbaren Promotoraktivität unter allen Inkubationsbedingungen auszugehen, während im Rahmen des durchgeführten *induction assays* spezifische Reaktionen in zwei unabhängigen Ansätzen erzielt werden konnten (Abschnitt III.3.1.4.2). Einen Hinweis auf eine mögliche Funktion von *MtSK1* gibt die Lokalisation der Promotoraktivität dieses Gens in Phloem und Perizykel des Leitgewebes entsprechend behandelter Wurzeln. Das Perizykel ist der Ort, an dem die Bildung neuer Seitenwurzeln initiiert wird (De Smet, 2012). Im Anbetracht der Tatsache, dass sowohl Nod- als auch Myc-LCOs das Wachstum und die Verzweigung von Wurzeln stimulieren (Oláh *et al.*, 2005; Maillet *et al.*, 2011), wäre somit auch eine Rolle für *MtSK1* in der Signaltransduktion dieses Prozesses denkbar.

#### IV.2.5 Die Rolle des Ca<sup>2+</sup>-bindenden Proteins Mtr.40638 in der AM-Symbiose

In Pflanzen ist Ca<sup>2+</sup> ein verbreiteter intrazellulärer Botenstoff um Informationen diverser Entwicklungs- oder Umweltstimuli auf die Ebene zellulärer Regulationsprozesse zu übertragen

(Perochon *et al.*, 2011). Wie in der Einleitung beschrieben, spielen  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auch in der Signaltransduktion der AM-Symbiose eine wichtige Rolle. Die meisten  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensoren in der Zelle besitzen EF-hand Motive, die wiederum häufig als Paare auftreten (Perochon *et al.*, 2011). Das EF-Hand Motiv ist ein *Helix-Loop-Helix* Motiv, in dem die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung über den in der Regel 12 Aminosäuren langen *Loop*-Bereich des Motivs erfolgt (Grabarek, 2006). Zwei gepaarte EF-Hand Motive konnten auch im Rahmen einer Sequenzanalyse des als  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein annotierten Gens *Mtr.40638* identifiziert werden (Abbildung III.35). Im Rahmen dieser Arbeit wurde *Mtr.40638* aufgrund seiner Induktion in der frühen AM-Symbiose (Tabelle III.1) untersucht. Diese Induktion war sowohl in Wildtyp-Pflanzen als auch in *dmi3*-Mutanten nachweisbar (Tabelle III.1), was für eine potentielle Symbiose-assoziierte Rolle des *Mtr.40638* Genprodukts *upstream* MtDMI3 spricht. Zudem konnten keinerlei Induktionen des *Mtr.40638* Gens in der Prä-Kontaktphase oder in reifen AM-Stadien gemessen werden (Tabelle III.1), womit sich die Aktivität dieses Gens vermutlich auf die frühe Kontaktphase der AM-Symbiose beschränkt. Die funktionellen Analysen von *Mtr.40638* wurden anhand zweier unabhängiger Linien von Tnt1-Insertionsmutanten durchgeführt. Pflanzen beider *Mtr.40638* *knockout* Linien wiesen im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Pflanzen ein deutlich retardiertes Wachstum und eine eingeschränkte Fertilität auf (Abbildung III.38 und III.39), die unabhängig vom Mykorrhizierungsstatus der Pflanzen waren (Abbildung III.40). Aufgrund dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein *Mtr.40638* neben einer potentiellen Rolle in der AM-Symbiose in weitere Prozesse involviert ist, die die Entwicklung und das Wachstum von *M. truncatula* betreffen. In mykorrhizierten Wurzeln der Insertionsmutanten beider Linien konnten hochsignifikante Reduktionen wichtiger AM-Markergene (Abbildung III.41 und III.42) sowie eine verringerte Mykorrhizierung (Abbildung III.43 und III.44) festgestellt werden, die auf eine deutliche Beeinträchtigung der AM-Symbiose hinweisen. Dabei muss jedoch berücksichtigt werden, dass sich das retardierte Wachstum der Insertionsmutanten auch auf die Wurzeln auswirkte, so dass diese eine signifikant niedrigere Biomasse als vergleichbare Wildtyp-Wurzeln aufwiesen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Beeinträchtigungen der AM-Symbiose in den Insertionsmutanten durch die geringere Wurzelmenge erklärbar sind. In diesem Fall wäre jedoch bei einer kurzen Mykorrhizierungsdauer mit sehr starken Unterschieden zwischen Wildtyp- und Mutanten-Wurzeln zu rechnen, während diese Unterschiede in einem längeren Mykorrhizierungszeitraum durch die zunehmende Verbreitung der AM-Pilze abnehmen müssten. Tatsächlich konnte jedoch genau der umgekehrte Fall beobachtet werden: Gerade in Bezug auf die Expression von AM-Markergenen waren nach einer 14-tägigen Mykorrhizierung teilweise noch gar keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp-Wurzeln und den Wurzeln der Insertionsmutanten messbar; nach einer 28-tägigen Mykorrhizierung hingegen zeigten sich hochsignifikante Reduktionen in den Mutanten (Abbildung III.41 und III.42). Daher ist davon auszugehen, dass die Beeinträchtigungen der AM-Symbiose in *Mtr.40638* *knockout* Mutanten unabhängig vom retardierten Wachstum dieser Mutanten erfolgt. Aufgrund der ähnlichen Ergebnisse beider Tnt1-Linien und der Tatsache, dass es sich um unabhängige Linien mit unterschiedlichen Hintergrundinsertionen handelt, sind die Beeinträchtigungen der AM-Symbiose jedoch eindeutig auf das *knockout* von *Mtr.40638* zurückzuführen.

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des *Mtr.40638* Gens weist Ähnlichkeiten zu den in *M. sativa* identifizierten CaM-ähnlichen Proteinen PPRG1 (*plant parasite responsive gene 1*; Borsics & Lados, 2001) und PPRG2 (Borsics & Lados, 2002) auf. Die *MsPPRG1* und *MsPPRG2* Gene zeigen eine schnelle Induktion durch biotische und abiotische Einflüsse wie Parasiten, Regen, Berührung, Verwundung, Kälte, osmotischen Stress und Salzstress, was nahe legt, dass ihre Genprodukte eine Rolle in der Transduktion von Signalen aus der Umgebung spielen (Borsics & Lados, 2001; Borsics & Lados, 2002). Für das *Mtr.40638* Protein ist eine ähnliche Rolle bezüglich der Transduktion Symbiose-relevanter Signale vorstellbar. Zudem scheint für die Induktion von *MsPPRG1* und *MsPPRG2* ein direkter Kontakt notwendig zu sein, was auch für *Mtr.40638*, das erst in der frühen Kontaktphase und nicht bereits in der Prä-kontaktphase der AM-Symbiose induziert wird (Tabelle III.1), beobachtet werden konnte. Eine vorstellbare Rolle für das Ca<sup>2+</sup>-bindende Protein *Mtr.40638* in der AM-Signaltransduktion ist die Weiterleitung des Ca<sup>2+</sup>-Signals *upstream* MtDMI3. Vermutlich agiert *Mtr.40638* hier nicht allein, sondern in Kombination mit anderen Proteinen, da in *knockout* Mutanten des *Mtr.40638* Gens nach wie vor AM-Strukturen ausgebildet werden können.

### IV.3 Transkriptionsfaktor-Gene mit potentieller Bedeutung für die AM-Symbiose

Transkriptionsfaktoren sind DNA-bindende Proteine, die die Transkription der meisten Gene regulieren (Riechmann *et al.*, 2000) und somit eine der wichtigsten Klassen regulatorischer Proteine darstellen (Kakar *et al.*, 2008). In der Modellpflanze *A. thaliana* kodieren rund 5 % aller Gene für Transkriptionsfaktoren (Riechmann *et al.*, 2000), was die große Bedeutung dieser Proteine widerspiegelt.

#### IV.3.1 Die Rolle des MYB-Transkriptionsfaktors *Mtr.38547* in der AM-Symbiose

Die Analysen für das Gen *Mtr.38547* erfolgten mittels RNAi und Insertionmutanten. Mit Hilfe eines RNAi-Konstrukts konnte eine um durchschnittlich etwa 30 % verringerte Transkriptmenge von *Mtr.38547* nachgewiesen werden (Abbildung III.65; Schaepe, 2011). Dieser als eher niedrig einzustufende RNAi-Effekt hatte keinerlei Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen in den RNAi-Wurzeln (Abbildung III.66; Schaepe, 2011). Homozygote *Mtr.38547* Insertionsmutanten zeigten im Vergleich mit entsprechenden Wildtyp-Pflanzen geringfügige phänotypische Unterschiede, wie beispielsweise eine signifikant höhere Anzahl an Blättern (Abbildung III.68). Dies könnte auf eine pleiotrophe Rolle des Genprodukts von *Mtr.38547* als negativer Regulator in Wachstum und Entwicklung von *M. truncatula* hindeuten. Zudem war in den Wurzeln der Insertionsmutanten die Expression des pilzlichen *housekeeping* Gens *GiaTUB* signifikant reduziert (Abbildung III.69), was auf eine geringere Kolonisationsrate der Insertionsmutanten durch *G. intraradices* hinweisen könnte. Dabei muss berücksichtigt werden, dass mögliche weitere Tnt1-Hintergrundinsertionen in den *knockout* Mutanten bislang unbekannt

sind. Um für die signifikante Reduktion von *GiaTub* verantwortlich zu sein, müsste eine *Tnt1*-Hintergrundinsertion jedoch in einem Großteil der untersuchten Pflanzen möglichst homozygot vorliegen, was eher unwahrscheinlich ist. Viel naheliegender ist daher der homozygote *knockout* des *Mtr.38547* Gens als Ursache für diese Expressionsunterschiede, was für eine mögliche Rolle des MYB-Transkriptionsfaktors in der AM-Symbiose spricht. Anhand von *Medicago* *GeneChip* Daten ließ sich feststellen, dass *Mtr.38547* in der Prä-Kontaktphase und in der frühen Kontaktphase der AM-Symbiose induziert ist (Tabelle III.1). Die Tatsache, dass diese Induktionen sowohl in Wildtyp-Pflanzen als auch in *dmi3*-Mutanten nachgewiesen werden konnten (Tabelle III.1), spricht für eine Rolle des MYB-Transkriptionsfaktors *upstream* oder unabhängig von MtDMI3. Da für einen Transkriptionsfaktor eine Rolle *upstream* MtDMI3 wenig sinnvoll erscheint, ist eine CSP-unabhängige Rolle von *Mtr.38547* naheliegend. In jedem Fall besitzt das Genprodukt von *Mtr.38547* vermutlich keine essentielle Funktion für die Ausbildung der AM-Symbiose, da diese in *knockout* Mutanten dieses Gens prinzipiell noch ausgebildet werden kann.

### IV.3.2 Die Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors *Mtr.9126* in der AM-Symbiose

Die funktionellen Analysen für *Mtr.9126* erfolgten mittels RNAi und Insertionsmutanten. Im Rahmen der RNAi-Analysen konnte festgestellt werden, dass ein signifikanter RNAi-Effekt ausschließlich in transgenen Wurzeln gemessen werden konnte, die steril auf Schrägagarplatten angezogen wurden, nicht aber nach einer Anzucht in Seramis® Substrat (Abbildung III.53). Offensichtlich begünstigte die sterile Anzucht die Ausprägung des RNAi-Effekts. Es lässt sich vermuten, dass dies einfach nur auf die sterile Umgebung mit weniger äußeren Einflüssen zurückzuführen ist, genauso gut kann dies jedoch auch von weiteren, bislang unbekanntem Faktoren abhängen. Die RNAi-vermittelte Reduktion der *Mtr.9126* Transkriptmenge um durchschnittlich 40 % zeigte keinerlei signifikante Auswirkungen auf die Expression von AM-Markergenen (Abbildung III.54).

Homozygote Insertionsmutanten des Gens *Mtr.9126* wiesen im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine signifikant höhere Biomasse auf (Abbildung III.56). Bei einer erhöhten Biomasse mykorrhizierter Pflanzen ist ein durch die AM-Symbiose hervorgerufener positiver Wachstumseffekt zunächst naheliegend. Die hochsignifikante Reduktion der in den Wurzeln der Insertionsmutanten gemessenen Expression von *MtPT4* und *MtBCP1* (Abbildung III.57) in diesem Stadium zeigte jedoch, dass die Symbiose vermutlich beeinträchtigt war und die erhöhte Biomasse der Insertionsmutanten daher andere Ursachen haben muss. Vorstellbar wäre beispielsweise eine pleiotrophe Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors *Mtr.9126* als negativer Regulator in Wachstum und Entwicklung von *M. truncatula*.

Die signifikante Reduktion der Expression von *MtPT4* und *MtBCP1* in den Wurzeln der Insertionsmutanten könnte auf eine mögliche Reduktion der Anzahl oder der Funktionalität der Arbuskeln in der AM-Symbiose hindeuten. Als mögliche Ursache hierfür kommen neben der bekannten homozygoten *Tnt1*-Insertion in *Mtr.9126* auch weitere Hintergrundinsertionen in Frage, deren Anzahl und Lage jedoch bislang unbekannt sind. In einem solchen Fall müsste eine *Tnt1*-

Hintergrundinsertion jedoch in einem Großteil der untersuchten Pflanzen möglichst homozygot vorliegen, was zwar nicht auszuschließen, aber unwahrscheinlich ist. Viel naheliegender ist daher die Menge des *Mtr.9126* Transkripts als Ursache für die reduzierte Expression der AM-Markergene. Während in RNAi-Wurzeln mit einem *knockdown* des *Mtr.9126* Transkripts um ca. 40 % keine Beeinträchtigung der AM-Markergenexpression vorlag, sind diese in den Tnt1-Insertionsmutanten mit einem *Mtr.9126* *knockout* signifikant messbar. Dies könnte auf eine mögliche Rolle des *Mtr.9126* Proteins in der AM-Symbiose hindeuten. Vorstellbar wäre eine Funktion des GRAS-Transkriptionsfaktors *downstream* der  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-abhängigen Kinase MtDMI3. Dabei ist jedoch davon auszugehen, dass das Genprodukt von *Mtr.9126* keine essentielle Rolle in der AM-Symbiose einnimmt, da die AM-Symbiose trotz eines *knockout* dieses Gens prinzipiell noch ausgebildet werden kann.

### IV.3.3 Die Rolle des GRAS-Transkriptionsfaktors *Mtr.7264* in der AM-Symbiose

Bei den GRAS-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um eine ausschließlich in Pflanzen vorkommende Proteinfamilie (Bolle, 2004). Der Name dieser Familie leitet sich von den ersten identifizierten GRAS-Transkriptionsfaktoren aus *A. thaliana* ab: GAI (Peng et al., 1997), RGA (Silverstone et al., 1998) und SCR (Di Lorenzo et al., 1996). In *M. truncatula* sind bislang 19 GRAS-Transkriptionsfaktoren bekannt (Kakar et al., 2008), von denen einer im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde.

Das als putativer GRAS-Transkriptionsfaktor annotierte *Mtr.7264* Genprodukt weist alle für GRAS-Proteine konservierten Sequenzmotive auf (Abbildung III.71). *Mtr.7264* wird sowohl in frühen als auch in reifen AM-Stadien induziert, während keine Induktion in der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose beobachtet werden konnte (Tabelle III.1). Da dieses Muster in entsprechenden *dmj3*-Mutanten nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle III.1), ist eine Funktion des *Mtr.7264* Proteins *downstream* MtDMI3 naheliegend. *Mtr.7264* wird spezifisch in mykorrhizierten Wurzeln exprimiert (Abbildung III.70), wobei die Expression mit der Mykorrhizierungsdauer ansteigt (Abbildung III.72). Eine Induktion von *Mtr.7264* in mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln wurde bereits mehrfach publiziert. Gomez et al. (2009) beschrieben die Induktion von fünf GRAS-Transkriptionsfaktoren in mit *G. intraradices* mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln. Bei einem dieser Transkriptionsfaktoren handelte es sich um *Mtr.7264*, der in dieser Publikation unter dem EST-Cluster Namen TC105118 beschrieben wurde. Hogeckamp et al. (2011) konnten zeigen, dass es sich bei *Mtr.7264* um ein Arbuskel-induziertes Gen handelt, dass in arbuskelhaltigen Zellen etwa 13-fach stärker als in den benachbarten Zellen exprimiert wird.

Mit Hilfe eines RNAi-vermittelten *knockdowns* der *Mtr.7264* Transkriptmenge um durchschnittlich 86 % (Abbildung III.73; Schaepe, 2011) konnte eine massive Beeinträchtigung der Expression von AM-Markergenen erzielt werden. Dabei waren die Gene *GiaTUB*, *MtPT4*, *MtBCP1*, *MtANN2*, *MtHA1*, *MtENOD11*, *MtCBF1* und *MtCBF2* stark in ihrer Expression reduziert (Abbildung III.74; Schaepe, 2011), was sich überraschenderweise überhaupt nicht in der Mykorrhizierung der RNAi-Wurzeln widerspiegelte. Mykorrhizierte RNAi-Wurzeln zeigten in verschiedenen AM-Stadien keinerlei



Unterschiede im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen (Abschnitt III.3.3.7.5). Ähnliches ließ sich bei den von Floss *et al.* (2008a) durchgeführten Analysen von mykorrhizierten RNAi-Wurzeln, in denen die Expression des *MtDXS2* (*M. truncatula* 1-Deoxy-D-xylulose-5-Phosphat Synthase 2) Gens reduziert war, beobachten. Auch hier konnte eine signifikante Reduktion von AM-Markergenen nachgewiesen werden, was jedoch keinerlei Auswirkungen auf den Mykorrhizierungsgrad der RNAi-Wurzeln hatte (Floss *et al.*, 2008a). Durch weitere Analysen konnte hier schließlich gezeigt werden, dass der *knockdown* der *MtDXS2* Expression zu einer Zunahme toter und degradierter Arbuskeln führte, die sich in der Kolonisationsrate jedoch nicht niederschlug (Floss *et al.*, 2008a). Obwohl in den RNAi-Wurzeln von *Mtr.7264* kein auffälliger Anstieg degenerierter Arbuskeln beobachtet werden konnte, wäre es dennoch möglich, dass die Funktionalität der Arbuskeln eingeschränkt ist, sich in optischen Phänotypisierungen aber nicht bemerkbar macht. Zusammenfassend konnte anhand der RNAi-Analysen gezeigt werden, dass der GRAS-Transkriptionsfaktor *Mtr.7264* eine wichtige Rolle in der Expression der oben genannten AM-Markergene spielt. Dabei drängt sich die Frage auf, welche Konsequenzen ein vollständiger *knockout* von *Mtr.7264* auf die Expression der Markergene hätte. Dieser konnte allerdings nicht untersucht werden, da keine Insertionsmutanten mit einer homozygoten *Tnt1*-Insertion in *Mtr.7264* identifiziert werden konnten und alle Pflanzen mit einer entsprechend heterozygoten *Tnt1*-Insertion steril waren (Tabelle III.4). Diese Kombination lässt vermuten, dass das Gen *Mtr.7264* in *M. truncatula* eine essentielle Funktion besitzt, so dass ein homozygoter *Mtr.7264* *knockout* letal ist. Somit kann nicht untersucht werden, ob das Genprodukt von *Mtr.7264* essentiell für die AM-Symbiose ist.

Ein prominentes Beispiel für die Funktion von Symbiose-spezifischen GRAS-Transkriptionsfaktoren in *M. truncatula* sind *MtNSP1* (Smit *et al.*, 2005) und *MtNSP2* (Kaló *et al.*, 2005), die viele Gemeinsamkeiten mit *Mtr.7264* aufweisen. *MtNSP1* und *MtNSP2* interagieren im Zellkern vermutlich mit *MtDMI3* und induzieren dort die Transkription Symbiose-relevanter Gene (Hirsch *et al.*, 2009). Während *MtNSP1* ein für die Knöllchensymbiose spezifischer Transkriptionsfaktor ist (Smit *et al.*, 2005), spielt *MtNSP2* vermutlich sowohl in der Knöllchen- als auch in der AM-Symbiose eine Rolle (Maillet *et al.*, 2011). Zudem sind *MtNSP1* und *MtNSP2* auch für das durch Nod-LCOs (*MtNSP1*) bzw. durch Myc- und Nod-LCOs (*MtNSP2*) stimulierte CSP-abhängige Wachstum und die Verzweigung von Wurzeln erforderlich (Maillet *et al.*, 2011).

Anhand der vorliegenden Daten wäre eine ähnliche Rolle für *Mtr.7264* denkbar, da es sich ebenfalls um einen *downstream* *MtDMI3* agierenden GRAS-Transkriptionsfaktor mit einem potentiellen Kernlokalisierungssignal handelt. So könnte das *Mtr.7264* Protein ebenfalls im Zellkern direkt oder indirekt durch *MtDMI3* aktiviert werden und daraufhin die Transkription von für die AM-Symbiose wichtigen Genen induzieren.

### IV.3.4 Die Rolle des ERF-Transkriptionsfaktors *Mtr.10987* in der AM-Symbiose

Die AP2/ERF-Familie stellt eine große Familie pflanzenspezifischer Transkriptionsfaktoren dar, die sich in vier Untergruppen aufteilen lässt: die AP2-, RAV-, DREB (*dehydration responsive element*

*binding protein*)- und ERF (*ethylene response factor*)-Transkriptionsfaktoren (Mizoi *et al.*, 2012). Die Expression vieler ERFs wird durch Pflanzenhormone wie Abscisinsäure, Jasmonsäure oder Ethylen sowie durch Kontakt mit Pathogenen reguliert (Gutterson & Reuber, 2004). Gemeinsam ist allen ERFs die in der gesamten AP2/ERF-Familie hochkonservierte und etwa 60 Aminosäuren lange AP2/ERF-Bindedomäne (Gutterson & Reuber, 2004; Mizoi *et al.*, 2012). Diese besitzt eine N-terminale  $\beta$ -Faltblattstruktur, die in der Lage ist ein als GCC-Box (Konsensussequenz: AGCCGCC) bezeichnetes Promotormotiv zu binden (Allen *et al.*, 1998).

In *M. truncatula* konnten bislang 55 Gene mit einer AP2/ERF-Bindedomäne identifiziert werden (Kakar *et al.*, 2008). Durch Untersuchungen der Knöllchensymbiose in *M. truncatula* konnten darunter auch einige ERF-Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die eine Rolle in dieser Symbiose spielen. So ist der ERF-Transkriptionsfaktor EFD (*ERF required for nodule differentiation*) in der Regulation der Anzahl und Differenzierung von Wurzelknöllchen involviert (Vernié *et al.*, 2008) und in mit Nod-LCOs behandelten *M. truncatula* Wurzeln aktivieren die drei ERF-Transkriptionsfaktoren MtERN1 (*ERF required for nodulation 1*), MtERN2 und MtERN3 Symbiosespezifische Gene (Middleton *et al.*, 2007; Andriankaja *et al.*, 2007). Kürzlich konnten Hogeckamp *et al.* (2011) zeigen, dass sechs ERF-Transkriptionsfaktoren, zu denen auch MtERN1 und MtERN2 gehören, in mit verschiedenen AM-Pilzen mykorrhizierten *M. truncatula* Wurzeln co-induziert werden, was vermuten lässt, dass ERF-Transkriptionsfaktoren auch eine Rolle in der AM-Symbiose spielen.

Das in *M. truncatula* wurzelspezifisch (Abbildung III.78) exprimierte Gen *Mtr.10987* ist als potentieller ERF-Transkriptionsfaktor annotiert, was im Rahmen einer Sequenzanalyse von *Mtr.10987* durch die Identifikation einer AP2/ERF-Bindedomäne und eines potentiellen Kernlokalisationssignals (Abbildung III.77) bestätigt werden konnte. Es handelt sich um ein ausschließlich in der frühen Kontaktphase der AM-Symbiose induziertes Gen, das in Abhängigkeit von MtDMI3 exprimiert wird (Tabelle III.1). In der Prä-Kontaktphase der AM-Symbiose konnten keinerlei Induktionen von *Mtr.10987* beobachtet werden (Tabelle III.1) und auch eine 6- und 24-stündige Behandlung von *M. truncatula* Wurzeln mit Myc- und Nod-LCOs zeigte keine Auswirkungen auf die Expression des Gens (Abbildung III.79). In einer 4-wöchigen Mykorrhizierungszeitreihe wies das *Mtr.10987* Transkript eine tendenzielle Zunahme auf, war durch die sich ausbreitende AM-Pilz Kolonisation jedoch nicht signifikant verstärkt nachweisbar (Abbildung III.80). Anhand dieser Daten lässt sich die Funktion des ERF-Transkriptionsfaktors *Mtr.10987* vermutlich auf die frühe Kontaktphase der AM-Symbiose einschränken.

Analysen mittels der für *Mtr.10987* angestrebten *knockout* Mutanten konnten nicht durchgeführt werden, da in zwei unabhängigen Tnt1-Insertionslinien keine Mutanten mit einer homozygoten Tnt1-Insertion in *Mtr.10987* identifiziert werden konnten (Abschnitt III.3.3.8.3). Angesichts seiner Annotation als Transkriptionsfaktor ist ein vollständiger *knockout* des *Mtr.10987* Gens in *M. truncatula* somit möglicherweise letal.

Mittels RNAi konnte allerdings ein *knockdown* der *Mtr.10987* Transkriptmenge um durchschnittlich 50 % erzielt werden (Abbildung III.81 und III.83), der deutliche Auswirkungen auf die Mykorrhizierung der RNAi-Wurzeln hatte. Es ließen sich signifikante Reduktionen der Expression verschiedener wichtiger AM-Markergene, wie etwa des Arbuskel-spezifisch

exprimierten Gens *MtPT4*, nachweisen, die sich jedoch im Wesentlichen auf reife AM-Stadien beschränkten (Abbildung III.82 und III.83). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten in RNAi-Wurzeln mit verminderter *Mtr.10987* Expression signifikant weniger Arbuskeln als in entsprechenden Kontrollwurzeln beobachtet werden (Abbildung III.84), was für die AM-Symbiose eine funktionelle Einschränkung dieser für den Nährstoffaustausch wichtigen Strukturen darstellt. In frühen AM-Stadien konnten für die meisten der getesteten AM-Markergene keine signifikanten Expressionsunterschiede in den RNAi-Wurzeln festgestellt werden (Abbildung III.83), was häufig jedoch daran lag, dass die Expression vieler Markergene in diesen Stadien unterhalb oder nahe der Nachweisgrenze war. Abhilfe schaffte hier das Anfärben und Auszählen von AM-Strukturen in frühen Stadien, wodurch sich in den RNAi-Wurzeln durchschnittlich 58 % weniger Kontaktstellen zwischen externen Hyphen und Wurzeln sowie im Mittel 57 % weniger Infektionseinheiten beobachten ließen (Abbildung III.85). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass Wurzeln mit einer verminderten *Mtr.10987* Expression in frühen AM-Stadien in der Fähigkeit, mit AM-Pilzen in Kontakt zu kommen und Infektionseinheiten auszubilden, beeinträchtigt sind. In reifen Stadien sind immer noch signifikant weniger Arbuskeln vorhanden. Dabei stellt sich die Frage, ob die Beeinträchtigungen der reifen AM-Stadien auf einen „verschleppten“ Effekt der Einschränkungen in den frühen Stadien zurückzuführen sind, oder ob *Mtr.10987* eine davon unabhängige und für die Ausbildung von Arbuskeln wichtige Funktion besitzt.

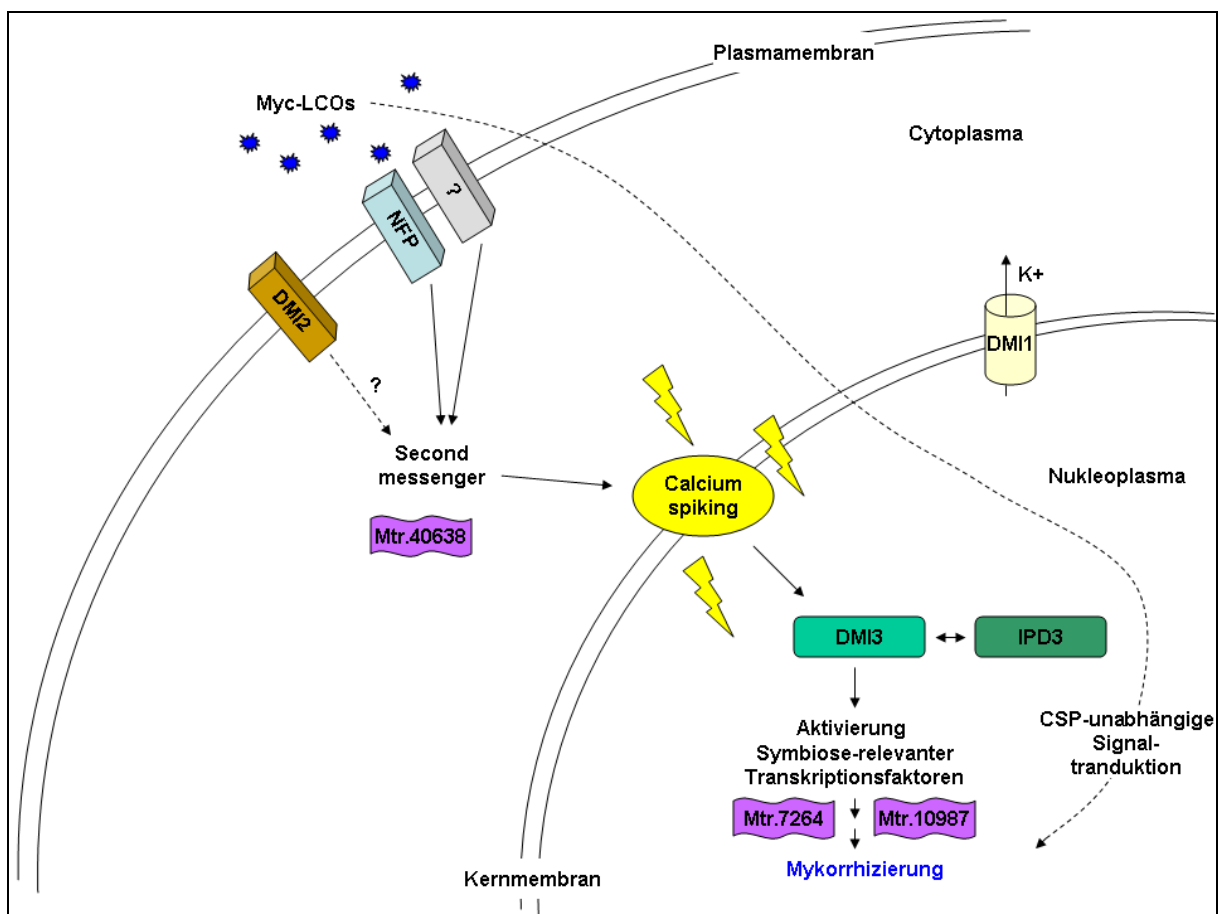
Zusammenfassend deuten die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Daten auf eine wichtige Rolle des Genprodukts von *Mtr.10987* in der AM-Symbiose hin, zumal hier lediglich eine Reduktion der Expression dieses Gens um ca. 50 % untersucht wurde. Im Wesentlichen lässt sich für den ERF-Transkriptionsfaktor *Mtr.10987* in der AM-Symbiose eine ähnliche Rolle wie die des zuvor beschriebenen GRAS-Transkriptionsfaktors *Mtr.7264* postulieren. So könnte *Mtr.10987* im Zellkern direkt oder indirekt durch *MtDMI3* aktiviert werden und dort die Transkription Symbiose-relevanter Gene induzieren.

#### **IV.4 Die potentielle Beteiligung von drei neuen Symbiose-assoziierten Genen an der frühen AM-Signaltransduktion**

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genen konnten drei Gene identifiziert werden, die eine wichtige, bei kompletter Inaktivierung möglicherweise sogar essentielle, Rolle in der AM-Symbiose spielen. Dabei handelt es sich um das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein *Mtr.40638* und die GRAS- und ERF-Transkriptionsfaktoren *Mtr.7264* und *Mtr.10987*. In allen drei Fällen werden die betreffenden Gene in frühen AM-Stadien induziert und ein *knockdown* bzw. *knockout* dieser Gene führt zu Beeinträchtigungen in der Ausbildung der AM-Symbiose. Dabei scheinen die Genprodukte von *Mtr.7264* und *Mtr.10987* unmittelbar *downstream* der  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM-abhängigen Kinase *MtDMI3* zu agieren, während das *Mtr.40638* Protein unmittelbar *upstream* *MtDMI3* aktiv ist. Als konkrete Rolle in der AM-Signaltransduktion ist für das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein *Mtr.40638* die Weiterleitung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals *upstream* *MtDMI3* vorstellbar (Abbildung IV.1). Die beiden

Transkriptionsfaktoren Mtr.7264 und Mtr.10987 könnten sehr ähnliche Funktionen in der frühen AM-Signaltransduktion besitzen. In beiden Fällen könnten die Transkriptionsfaktoren im Zellkern direkt oder indirekt durch MtDMI3 aktiviert werden und daraufhin die Transkription von für die AM-Symbiose wichtigen Genen induzieren (Abbildung IV.1).

Bislang konnten in *M. truncatula* bereits hunderte von Genen identifiziert werden, die in der AM-Symbiose induziert werden (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2007; Küster *et al.*, 2004; Manthey *et al.*, 2004; Hohnjec *et al.*, 2005; Guether *et al.*, 2009; Hogeckamp *et al.*, 2011; Gaude *et al.*, 2012), die Regulation dieser Gene *upstream* und *downstream* MtDMI3 ist allerdings weitestgehend unbekannt. In dieser Regulation könnten die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene Mtr.40638, Mtr.7264 und Mtr.10987 eine potentielle Rolle spielen, wie sich anhand weiterführender Analysen möglicherweise bestätigen lässt.



**Abbildung IV.1:** Schematische Darstellung der frühen Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza von *Medicago truncatula* unter potentieller Beteiligung dreier im Rahmen dieser Arbeit identifizierter Symbiose-assoziiierter Gene. Der konkrete Ablauf der frühen Signaltransduktion der arbuskulären Mykorrhiza entspricht dem für Abbildung I.5 bereits beschriebenen Schema. Hierbei könnten das  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Protein Mtr.40638 und die beiden Transkriptionsfaktoren Mtr.7264 und Mtr.10987 eine potentielle Rolle in der Signaltransduktion spielen (siehe Beschreibung im Text).

## V. AUSBLICK

Von den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Genen handelt es sich bei den Genprodukten der drei zuvor diskutierten Gene *Mtr.40638*, *Mtr.7264* und *Mtr.10987* um die vielversprechendsten Kandidaten für eine wichtige Funktion in der AM-Symbiose. Um Erkenntnisse über ihre konkrete Funktion in der Symbiose zu erlangen, sind weitere Analysen unabdingbar. Dabei ließe sich mittels entsprechender Promotor-GUS-Konstrukte aller drei Gene deren räumliche und zeitliche Aktivität ermitteln. Für die beiden Transkriptionsfaktoren *Mtr.7264* und *Mtr.10987* könnte zudem mittels GFP-Fusionen die potentielle Lokalisation im Zellkern bestätigt werden. Ebenfalls ließe sich überprüfen, ob das *knockout* von *Mtr.40638* bzw. das *knockdown* von *Mtr.7264* und *Mtr.10987* auch Auswirkungen auf die AM-Symbiose mit anderen AM-Pilzen als *G. intraradices* bzw. möglicherweise sogar auf die Knöllchensymbiose hat. Dabei wäre es für die Gene *Mtr.7264* und *Mtr.10987* mittelfristig sinnvoll, volltransgene RNAi-Linien zu erstellen, um die künftige Arbeit mit diesen Konstrukten zu erleichtern. Schließlich müsste das auf Transkriptebene gemessene *knockdown* bzw. *knockout* der Gene *Mtr.40638*, *Mtr.7264* und *Mtr.10987* auch auf Proteinebene nachgewiesen werden. Mittels *Medicago GeneChip* Hybridisierungen der *knockdown* bzw. *knockout* Mutanten von *Mtr.7264*, *Mtr.10987* und *Mtr.40638* ließe sich zudem genau ermitteln, in welchem Umfang andere für die AM-Symbiose wichtige Gene von den entsprechenden Reduktionen der Transkriptmenge beeinflusst werden. Da eine Suche nach *knockout*-Mutanten für *Mtr.7264* und *Mtr.10987* aufgrund der zuvor diskutierten möglichen Letalität dieser Mutanten wenig erfolgversprechend ist, wäre es sinnvoller, *Mtr.40638*, *Mtr.7264* und *Mtr.10987* in Wurzeln zu überexprimieren, wie es bereits für zwei Peptid-Regulatoren im Rahmen der Knöllchensymbiose gezeigt werden konnte (Combiere *et al.*, 2008). Dies kann dazu dienen, weitere Aufschlüsse über die konkrete biologische Funktion dieser Gene in der AM-Symbiose zu erhalten.



## VI. LITERATURVERZEICHNIS

Akiyama K., Matsuzaki M. & Hayashi H. "Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi." *Nature* 435: 824-7 (2005).

Akiyama K. & Hayashi H. "Strigolactones: chemical signals for fungal symbionts and parasitic weeds in plant roots." *Ann Bot* 97: 925-31 (2006).

Alexander T., Toth R., Meier R. & Weber H.C. "Dynamics of arbuscule development and degeneration in onion, bean, tomato, with reference to vesicular-arbuscular mycorrhiza in grasses." *New Phytol.* 110: 363-70 (1988).

Alexander T., Meier R., Toth R. & Weber H. C. "Dynamics of arbuscule development and degeneration in mycorrhizas of *Triticum aestivum* L. and *Avena sativa* with reference to *Zea mays* L." *Can. J. Bot.* 67: 2505-13 (1989).

Allen M. D., Yamasaki K., Ohme-Takagi M., Tateno M. & Suzuki M. "A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA." *EMBO J* 17: 5484-96 (1998).

Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadriab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C. & Ecker J. R. "Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*." *Science* 301: 653-7 (2003).

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W. & Lipman D.J. "Basic local alignment search tool." *J Mol Biol* 215: 403-10 (1990).

Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N.H., Zhu S., Qiu J.L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M.A., Bjørn Nielsen H., Hirt H., Somssich I., Mattsson O. & Mundy J. "The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses." *Embo J* 24: 2579-89 (2005).

Andriankaja A., Boisson-Dernier A., Frances L., Sauviac L., Jauneau A., Barker D.G. & de Carvalho-Niebel F. "AP2-ERF transcription factors mediate Nod factor dependent MtENOD11 activation in root hairs via a novel cis-regulatory motif." *Plant Cell* 19: 2866-85 (2007).

Ané, J. M., H. Zhu & Frugoli J. "Recent Advances in *Medicago truncatula* Genomics." *Int J Plant Genomics* 2008: 256597 (2008).

Arnon D.I. & Hoagland D.R. "Crop production in artificial culture solutions and in soils with special reference to factors influencing yields and absorption of inorganic nutrients." *Soil Sci* 50: 463-83 (1940).

Arrighi J. F., Barre A., Ben Amor B., Bersoult A., Soriano L. C., Mirabella R., de Carvalho-Niebel F., Journet E. P., Gherardi M., Huguet T., Geurts R., Denarie J., Rouge P. & Gough C. "The *Medicago truncatula* lysin motif-receptor-like kinase gene family includes NFP and new nodule-expressed genes." *Plant Physiol* 142: 265-79 (2006).

- Bago B., Pfeffer P. E. & Shachar-Hill Y. "Carbon metabolism and transport in arbuscular mycorrhizas." *Plant Physiol* 124: 949-58 (2000).
- Bago B., Pfeffer P. E., Abubaker J., Jun J., Allen J. W., Brouillette J., Douds D. D., Lammers P. J. & Shachar-Hill Y. "Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid." *Plant Physiol* 131: 1496-507 (2003).
- Baier M. C., Barsch A., Küster H. & Hohnjec N. "Antisense repression of the *Medicago truncatula* nodule-enhanced sucrose synthase leads to a handicapped nitrogen fixation mirrored by specific alterations in the symbiotic transcriptome and metabolome." *Plant Physiol* 145: 1600-18 (2007).
- Baier M. C., Keck M., Godde V., Niehaus K., Küster H. & Hohnjec N. "Knockdown of the symbiotic sucrose synthase MtSucS1 affects arbuscule maturation and maintenance in mycorrhizal roots of *Medicago truncatula*". *Plant Physiol* 152: 1000-14 (2010).
- Bastmeyer M., Deising H. B. & Bechinger C. "Force exertion in fungal infection." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 31: 321-41 (2002).
- Bécard G. & Fortin J. A. "Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots." *New Phytologist* 108: 211-218 (1988).
- Becker A. "Analyse der Succinoglukan-Biosyntheseregion von *Rhizobium meliloti* 2011: Untersuchungen zur Identifizierung des bakteriellen Infektionssignals in der Symbiose mit Luzerne." Dissertation, Universität Bielefeld, Lehrstuhl für Genetik (1993).
- Beeckmann T. & Engler G. "An easy technique for the clearing of histochemically stained plant tissue." *Plant Mol Biol Rep* 12: 37-42 (1994).
- Bekel T., Henckel K., Küster H., Meyer F., Mittard Runte V., Neuweger H., Paarmann D., Rupp O., Zakrzewski M., Puhler A., Stoye J. & Goesmann A. "The Sequence Analysis and Management System – SAMS-2.0: data management and sequence analysis adapted to changing requirements from traditional Sanger sequencing to ultrafast sequencing technologies." *J Biotechnol* 140: 3-12 (2009).
- Benedito V. A., Torres-Jerez I., Murray J. D., Andriankaja A., Allen S., Kakar K., Wandrey M., Verdier J., Zuber H., Ott T., Moreau S., Niebel A., Frickey T., Weiller G., He J., Dai X., Zhao P. X., Tang Y. & Udvardi M. K. "A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*." *Plant J* 55: 504-13 (2008).
- Benlloch R., d'Erfurth I., Ferrandiz C., Cosson V., Beltrán J. P., Cañas L. A., Kondorosi A., Madueño F. & Ratet P. "Isolation of mtpim proves Tnt1 a useful reverse genetics tool in *Medicago truncatula* and uncovers new aspects of AP1-like functions in legumes." *Plant Physiol* 142: 972-83 (2006).
- Beringer J. E. "R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*." *J Gen Microbiol* 84: 188-98 (1974).
- Besserer A., Puech-Pages V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A., Roy S., Portais J. C., Roux C., Becard G. & Sejalón-Delmas N. "Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria." *PLoS Biol* 4: e226 (2006).
- Boisson-Dernier A., Chabaud M., Garcia F., Becard G., Rosenberg C. & Barker D. G. "*Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Medicago truncatula* for the study of nitrogen-fixing and endomycorrhizal symbiotic associations." *Mol Plant Microbe Interact* 14: 695-700 (2001).



- Bolle C. "The role of GRAS proteins in plant signal transduction and development." *Planta* 218: 683-92 (2004).
- Bonfante P. & Requena N. "Dating in the dark: how roots respond to fungal signals to establish arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Curr Opin Plant Biol* 14: 451-7 (2011).
- Borsics T. & Lados M. "cDNA cloning of a mechanical/abiotic stress-inducible calmodulin-related gene from dodder-infected alfalfa." *Plant, Cell and Environment* 24: 649-56 (2001).
- Borsics T. & Lados M. "Dodder infection induces the expression of a pathogenesis-related gene of the family PR-10 in alfalfa." *Journal of Experimental Botany* 53: 1831-2 (2002).
- Brewin N. J. "Development of the legume root nodule." *Annu Rev Cell Biol* 7: 191-226 (1991).
- Brewin N. J. "Plant Cell Wall Remodelling in the Rhizobium–Legume Symbiosis." *Crit Rev Plant Sci* 23: 293-316 (2004).
- Brown T. A. "Genome und Gene" Springer-Verlag, Heidelberg (2007).
- Brundrett M. "Diversity and classification of mycorrhizal associations." *Biol Rev Camb Philos Soc* 79: 473-95 (2004).
- Catoira R., Galera C., de Billy F., Penmetsa R. V., Journet E. P., Maillet F., Rosenberg C., Cook D., Gough C. & Denarie J. "Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a nod factor transduction pathway." *Plant Cell* 12: 1647-66 (2000).
- Cermola M., Fedorova E., Tate R., Riccio A., Favre R. & Patriarca E. J. "Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis." *Mol Plant Microbe Interact* 13: 733-41 (2000).
- Chabaud M., de Carvalho-Niebel F. & Barker D. G. "Efficient transformation of *Medicago truncatula* cv. Jemalong using the hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain AGL1." *Plant Cell Rep* 22: 46-51 (2003).
- Chabaud M., Genre A., Sieberer B. J., Faccio A., Fournier J., Novero M., Barker D. G. & Bonfante P. "Arbuscular mycorrhizal hyphopodia and germinated spore exudates trigger Ca<sup>2+</sup> spiking in the legume and nonlegume root epidermis." *New Phytol* 189: 347-55 (2011).
- Charpentier M., Bredemeier R., Wanner G., Takeda N., Schleiff E. & Parniske M. "*Lotus japonicus* CASTOR and POLLUX are ion channels essential for perinuclear calcium spiking in legume root endosymbiosis." *Plant Cell* 20: 3467-79 (2008).
- Cheng X, Peng J, Ma J, Tang Y, Chen R, Mysore KS, Wen J. "NO APICAL MERISTEM (MtNAM) regulates floral organ identity and lateral organ separation in *Medicago truncatula*." *New Phytol* 195: 71-84 (2012)
- Ciftci-Yilmaz S. & Mittler R. "The zinc finger network of plants." *Cell Mol Life Sci* 65: 1150-60 (2008).
- Combiér J. P., Küster H., Journet E. P., Hohnjec N., Gamas P. & Niebel A. "Evidence for the involvement in nodulation of the two small putative regulatory peptide-encoding genes MtRALFL1 and MtDVL1." *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1118-27 (2008).

- Crane C., Wright E., Dixon R. A. & Wang Z. Y. "Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium tumefaciens*-transformed roots and *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots." *Planta* 223: 1344-54 (2006).
- Cruz C., Egsgaard H., Trujillo C., Ambus P., Requena N., Martins-Loucao M. A. & Jakobsen I. "Enzymatic evidence for the key role of arginine in nitrogen translocation by arbuscular mycorrhizal fungi." *Plant Physiol* 144: 782-92 (2007).
- Czaja L. F., Hogeckamp C., Lamm P., Maillet F., Martinez E. A., Samain E., Dénarié J., Küster H. & Hohnjec N. "Transcriptional responses towards diffusible signals from symbiotic microbes reveal MtNFP- and MtDMI3-dependent reprogramming of host gene expression by AM fungal LCOs." *Plant Physiol* 159: 1671-85 (2012)
- d'Erfurth I., Cosson V., Eschstruth A., Lucas H., Kondorosi A. & Ratet P. "Efficient transposition of the Tnt1 tobacco retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*." *Plant J* 34: 95-106 (2003).
- Day D. A., Poole P. S., Tyerman S. D. & Rosendahl L. "Ammonia and amino acid transport across symbiotic membranes in nitrogen-fixing legume nodules." *Cell Mol Life Sci* 58: 61-71 (2001).
- De Smet I. "Lateral root initiation: one step at a time." *New Phytol.* 193: 867-73 (2012).
- Dellagi A., Birch P. R. J., Heilbronn J., Avrova A.O., Montesano M., Palva E.T. & Lyon G.D. "A potato gene, *erg-1*, is rapidly induced by *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica*, *Phytophthora infestans*, ethylene and salicylic acid." *Plant Physiol* 157: 201-5 (2000).
- Dénarié J., Debelle F. & Prome J. C. "*Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis." *Annu Rev Biochem* 65: 503-35 (1996).
- Di Laurenzio L., Wysocker-Diller J., Malamy J. E., Pysh L., Helariutta Y., Freshour G., Hahn M. G., Feldmann K. A. & Benfey P. N. "The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root." *Cell* 86: 423-33 (1996).
- Dingwall C. & Laskey R. A. "Nuclear targeting sequences--a consensus?" *Trends Biochem Sci* 16: 478-81 (1991).
- Egerton-Warburton L. M., Querejeta J. I. & Allen M. F. "Common mycorrhizal networks provide a potential pathway for the transfer of hydraulically lifted water between plants." *J Exp Bot* 58: 1473-83 (2007).
- Ehrhardt D. W., Wais R. & Long S. R. "Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulation signals." *Cell* 85: 673-81 (1996).
- Esseling J. J., Lhuissier F. G. & Emons A. M. "Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application." *Plant Physiol* 132: 1982-8 (2003).
- Feddermann N., Boller T., Salzer P., Elfstrand S., Wiemken A. & Elfstrand M. "*Medicago truncatula* shows distinct patterns of mycorrhiza-related gene expression after inoculation with three different arbuscular mycorrhizal fungi." *Planta* 227: 671-80 (2008).

- Fellbaum C. R., Gachomo E. W., Beesetty Y., Choudhari S., Strahan G. D., Pfeffer P. E., Kiers E. T. & Bucking H. "Carbon availability triggers fungal nitrogen uptake and transport in arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 2666-71 (2012).
- Feng G., Zhang F. S., Li X. L., Tian C. Y., Tang C. & Rengel Z. "Improved tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhiza is related to higher accumulation of soluble sugars in roots." *Mycorrhiza* 12: 185-90 (2002).
- Finlay R. D. "Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium." *J Exp Bot* 59: 1115-26 (2008).
- Fischer H. M. "Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia." *Microbiol Rev* 58: 352-86 (1994).
- Fitter A. H. "Darkness visible: reflections on underground ecology." *J. Ecol.* 93: 231-43 (2005).
- Floss D. S., Hause B., Lange P. R., Küster H., Strack D. & Walter M. H. "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 (2008a).
- Floss D. S., Schliemann W., Schmidt J., Strack D. & Walter M. H. "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: 1267-82 (2008b).
- Foucher F. & Kondorosi E. "Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*." *Plant Mol Biol* 43: 773-86 (2000).
- Frank A. B. "Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze." *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 3: 128-45 (1885).
- Gage D. J. "Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes." *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 280-300 (2004).
- Gandolfi A., Sanders I. R., Rossi V. & Menozzi P. "Evidence of recombination in putative ancient asexuals." *Mol Biol Evol* 20: 754-61 (2003).
- Gaude N., Bortfeld S., Duensing N., Lohse M. & Krajinski F. "Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo a massive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development." *Plant J* 69: 510-28 (2012).
- Genre A., Chabaud M., Timmers T., Bonfante P. & Barker D. G. "Arbuscular mycorrhizal fungi elicit a novel intracellular apparatus in *Medicago truncatula* root epidermal cells before infection." *Plant Cell* 17: 3489-99 (2005).
- Genre A., Chabaud M., Faccio A., Barker D. G. & Bonfante P. "Prepenetration apparatus assembly precedes and predicts the colonization patterns of arbuscular mycorrhizal fungi within the root cortex of both *Medicago truncatula* and *Daucus carota*." *Plant Cell* 20: 1407-20 (2008).
- Gilchrist E. & Haughn G. "Reverse genetics techniques: engineering loss and gain of gene function in plants." *Brief Funct Genomics* 9: 103-10 (2010).

- Giovanetti M. & Mosse B. "An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots." *New Phytol.* 84: 489-500 (1980).
- Giovanetti M., Fortuna P., Citernes A. S., Morini S. & Nuti M. P. "The occurrence of anastomosis formation and nuclear exchange in intact arbuscular mycorrhizal networks." *New Phytol* 151: 717-24 (2001).
- Gleason C., Chaudhuri S., Yang T., Munoz A., Poovaiah B. W. & Oldroyd G. E. "Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition." *Nature* 441: 1149-52 (2006).
- Gough C. & Cullimore J. "Lipo-chitooligosaccharide signaling in endosymbiotic plant-microbe interactions." *Mol Plant Microbe Interact* 24: 867-78 (2011).
- Gomez S. K., Javot H., Deewatthanawong P., Torres-Jerez I., Tang Y., Blancaflor E. B., Udvardi M. K. & Harrison M. J. "*Medicago truncatula* and *Glomus intraradices* gene expression in cortical cells harboring arbuscules in the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *BMC Plant Biol* 9:10 (2009).
- Govindarajulu M., Pfeffer P. E., Jin H., Abubaker J., Douds D. D., Allen J. W., Bucking H., Lammers P. J. & Shachar-Hill Y. "Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Nature* 435: 819-23 (2005).
- Grabarek Z. "Structural basis for diversity of the EF-hand calcium-binding proteins." *J Mol Biol* 359: 509-25 (2006).
- Graham P. H. & Vance C. P. "Legumes: importance and constraints to greater use." *Plant Physiol* 131: 872-7 (2003).
- Grandbastien M. A., Spielmann A. & Caboche M. "Tnt1, a mobile retroviral-like transposable element of tobacco isolated by plant cell genetics." *Nature* 337: 376-80 (1989).
- Grant S. G., Jessee J., Bloom F. R. & Hanahan D. "Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants." *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4645-9 (1990).
- Guether M., Balestrini R., Hannah M., He J., Udvardi M. K. & Bonfante P. "Genome-wide reprogramming of regulatory networks, transport, cell wall and membrane biogenesis during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*." *New Phytol* 182: 200-212 (2009).
- Gutjahr C., Casieri L. & Paszkowski U. "*Glomus intraradices* induces changes in root system architecture of rice independently of common symbiosis signaling." *New Phytol* 182: 829-37 (2009).
- Gutterson N. & Reuber T. L. "Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors." *Curr Opin Plant Biol* 7: 465-71 (2004).
- Haney C. H., Riely B. K., Tricoli D. M., Cook D. R., Ehrhardt D. W. & Long S. R. "Symbiotic rhizobia bacteria trigger a change in localization and dynamics of the *Medicago truncatula* receptor kinase LYK3." *Plant Cell* 23: 2774-87 (2011).
- Hanks S. K. & Hunter T. "Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification." *Faseb J* 9: 576-96 (1995).

Hao D., Ohme-Takagi M. & Sarai A. "Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant." *J Biol Chem* 273: 26857-61 (1998).

Harrison M. J. "Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 361-89 (1999).

Harrison M. J., Dewbre G. R. & Liu J. "A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi." *Plant Cell* 14: 2413-29 (2002).

He Z.H., Fujiki M. & Kohorn B. D. "A cell wall-associated, receptor-like protein kinase." *J Biol Chem* 271: 19789-93 (1996).

Heckman D. S., Geiser D. M., Eidell B. R., Stauffer R. L., Kardos N. L. & Hedges S. B. "Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants." *Science* 293: 1129-33 (2001).

Heidstra R., Geurts R., Franssen H., Spaink H. P., van Kammen A. & Bisseling T. "Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*." *Plant Physiol* 105: 787-97 (1994).

Heidstra R., Yang W. C., Yalcin Y., Peck S., Emons A. M., van Kammen A. & Bisseling T. "Ethylene provides positional information on cortical cell division but is not involved in Nod factor-induced root hair tip growth in *Rhizobium*-legume interaction." *Development* 124: 1781-7 (1997).

Henckel K., Küster H., Stutz L. J. & Goesmann A. "MediPIEx - a tool to combine in silico & experimental gene expression profiles of the model legume *Medicago truncatula*." *BMC Res Notes* 3: 262 (2010).

Higgins D. G., Thompson J. D. & Gibson T. J. "Using CLUSTAL for multiple sequence alignments." *Methods Enzymol* 266: 383-402 (1996).

Hijri M. & Sanders I. R. "Low gene copy number shows that arbuscular mycorrhizal fungi inherit genetically different nuclei." *Nature* 433: 160-3 (2005).

Hirsch S., Kim J., Munoz A., Heckmann A. B., Downie J. A. & Oldroyd G. E. "GRAS proteins form a DNA binding complex to induce gene expression during nodulation signaling in *Medicago truncatula*." *Plant Cell* 21: 545-57 (2009).

Hoffmann B., Trinh T. H., Leung J., Kondorosi A. & Kondorosi E. "A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection." *Mol Plant Microbe Interact* 10: 307-15 (1997).

Hogekamp C., Arndt D., Pereira P. A., Becker J. D., Hohnjec N. & Küster H. "Laser Microdissection unravels cell-type-specific transcription in arbuscular mycorrhizal roots, including CAAT-Box transcription factor gene expression correlating with fungal contact and spread." *Plant Physiol* 157: 2023-43 (2011).

Hohnjec N., Perlick A. M., Pühler A. & Küster H. "The *Medicago truncatula* sucrose synthase gene *MtSucS1* is activated both in the infected region of root nodules and in the cortex of roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi." *Mol Plant Microbe Interact* 16: 903-15 (2003).

Hohnjec N., Vieweg M. F., Pühler A., Becker A. & Küster H. "Overlaps in the transcriptional profiles of *Medicago truncatula* roots inoculated with two different *Glomus* fungi provide insights into the genetic program activated during arbuscular mycorrhiza." *Plant Physiol* 137: 1283-301 (2005).

Horváth B., Yeun L. H., Domonkos A., Halász G., Gobbato E., Ayaydin F., Miró K., Hirsch S., Sun J., Tadege M., Ratet P., Mysore K.S., Ané J.M., Oldroyd G.E. & Kaló P. "*Medicago truncatula* IPD3 is a member of the common symbiotic signaling pathway required for rhizobial and mycorrhizal symbioses." *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1345-58 (2011).

Javot H., Penmetsa R. V., Terzaghi N., Cook D. R. & Harrison M. J. "A *Medicago truncatula* phosphate transporter indispensable for the arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 1720-5 (2007a).

Javot H., Pumplin N. & Harrison M. J. "Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles." *Plant Cell Environ* 30: 310-22 (2007b).

Jones K. M., Kobayashi H., Davies B. W., Taga M. E. & Walker G. C. "How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium* - *Medicago* model." *Nature* 5: 619-33 (2007).

Journet E. P., El-Gachtouli N., Vernoud V., de Billy F., Pichon M., Dedieu A., Arnould C., Morandi D., Barker D. G. & Gianinazzi-Pearson V. "*Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells." *Mol Plant Microbe Interact* 14: 737-48 (2001).

Kakar K., Wandrey M., Czechowski T., Gaertner T., Scheible W. R., Stitt M., Torres-Jerez I., Xiao Y., Redman J. C., Wu H. C., Cheung F., Town C. D. & Udvardi M. K. "A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*." *Plant Methods* 4: 18 (2008).

Kaló P., Gleason C., Edwards A., Marsh J., Mitra R. M., Hirsch S., Jakab J., Sims S., Long S. R., Rogers J., Kiss G. B., Downie J. A. & Oldroyd G. E. "Nodulation signaling in legumes requires NSP2, a member of the GRAS family of transcriptional regulators." *Science* 308: 1786-9 (2005).

Kamaté K., Rodriguez-Llorente I. D., Scholte M., Durand P., Ratet P., Kondorosi E., Kondorosi A. & Trinh T. H. "Transformation of floral organs with GFP in *Medicago truncatula*." *Plant Cell Reports* 19: 647-53 (2000).

Karimi M., De Meyer B. & Hilson P. "Modular cloning in plant cells." *Trends Plant Sci* 10: 103-5 (2005).

Kiers E. T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J. A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C. R., Kowalchuk G. A., Hart M. M., Bago A., Palmer T. M., West S. A., Vandenkoornhuyse P., Jansa J. & Bucking H. "Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis." *Science* 333: 880-2 (2011).

Kistner C. & Parniske M. "Evolution of signal transduction in intracellular symbiosis." *Trends Plant Sci* 7: 511-8 (2002).

Kistner C., Winzer T., Pitzschke A., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Webb K. J., Szczyglowski K. & Parniske M. "Seven *Lotus japonicus* genes required for transcriptional reprogramming of the root during fungal and bacterial symbiosis." *Plant Cell* 17: 2217-29 (2005).

- Kloppholz S., Kuhn H. & Requena N. "A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy." *Curr Biol* 21: 1204-9 (2011).
- Kneip C., Lockhart P., Voss C. & Maier U. G. "Nitrogen fixation in eukaryotes--new models for symbiosis." *BMC Evol Biol* 7: 55 (2007).
- Knighton D. R., Zheng J. H., Ten Eyck L. F., Ashford V. A., Xuong N. H., Taylor S. S. & Sowadski J. M. "Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase." *Science* 253: 407-14 (1991).
- Kohorn B. D. "Plasma membrane-cell wall contacts." *Plant Physiol* 124: 31-8 (2000).
- Kohorn B. D. "WAKs; cell wall associated kinases." *Curr Opin Cell Biol* 13: 529-33 (2001).
- Kosuta S., Chabaud M., Loughon G., Gough C., Dénarié J., Barker D. G. & Becard G. "A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific *MtENOD11* expression in roots of *Medicago truncatula*." *Plant Physiol* 131: 952-62 (2003).
- Kosuta S., Hazledine S., Sun J., Miwa H., Morris R. J., Downie J. A. & Oldroyd G. E. "Differential and chaotic calcium signatures in the symbiosis signaling pathway of legumes." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 9823-8 (2008).
- Krajinski F., Hause B., Gianinazzi-Pearson V. & Franken P. "*Mtha1*, a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase gene from *Medicago truncatula*, shows arbuscule-specific induced expression in mycorrhizal tissue." *Plant Biol* 4: 754-61 (2002).
- Krüger M., Krüger C., Walker C., Stockinger H. & Schüssler A. "Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level." *New Phytol* 193: 970-84 (2012).
- Kuhn H., Küster H. & Requena N. "Membrane steroid-binding protein 1 induced by a diffusible fungal signal is critical for mycorrhization in *Medicago truncatula*." *New Phytol* 185: 716-33 (2009).
- Küster H., Quandt H. J., Broer I., Perlick A. M. & Pühler A. "The promoter of the *Vicia faba* L. *VfENOD-GRP3* gene encoding a glycine-rich early nodulin mediates a predominant gene expression in the interzone II-III region of transgenic *Vicia hirsuta* root nodules." *Plant Mol Biol* 29: 759-72 (1995).
- 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. "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 (2004).
- Küster H., Becker A., Firnhaber C., Hohnjec N., Manthey K., Perlick A. M., Bekel T., Dondrup M., Henckel K., Goesmann A., Meyer F., Wipf D., Requena N., Hildebrandt U., Hampp R., Nehls U., Krajinski F., Franken P. & Pühler A. "Development of bioinformatic tools to support EST-sequencing, in silico- and microarray-based transcriptome profiling in mycorrhizal symbioses." *Phytochemistry* 68: 19-32 (2007).
- Lally D., Ingmire P., Tong H.Y. & He Z.H. "Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology." *Plant Cell* 13: 1317-31 (2001).

- Lammers P., Tuskan G. A., DiFazio S. P., Podila G. K. & Martin F. "Mycorrhizal symbionts of *Populus* to be sequenced by the United States Department of Energy's Joint Genome Institute." *Mycorrhiza* 14: 63-4 (2003).
- Landy A. "Dynamic, structural, and regulatory aspects of Lambda site-specific recombination." *Ann. Rev. Biochem.* 58: 913-49 (1989).
- Lerouge P. R. P., Faucher C., Maillet F., Truchet G., Prome J. C. & Denarie J. "Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal." *Nature* 344: 781-4 (1990).
- Li C. & Wang W. H. "DNA-Chip Analyzer (dChip)." aus: "The analysis of gene expression data: methods and software." Springer-Verlag, New York: 120-41 (2003).
- Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T. & Geurts R. "LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection." *Science* 302: 630-3 (2003).
- Limpens E., Ramos J., Franken C., Raz V., Compaan B., Franssen H., Bisseling T. & Geurts R. "RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*." *J Exp Bot.* 55: 983-92 (2004).
- Liu J., Blaylock L., Endre G., Cho J., Town C., VandenBosch K. & Harrison M. J. "Transcript profiling coupled with spatial expression analyses reveals genes involved in distinct developmental stages of an arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Plant Cell* 15: 2106-23 (2003).
- Liu J., Maldonado-Mendoza I., Lopez-Meyer M., Cheung F., Town C. D. & Harrison M. J. "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: 529-44 (2007).
- Livak K. J. & Schmittgen T. D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method." *Methods* 25: 402-8 (2001).
- Lottspeich F. "Bioanalytik." Spektrum-Verlag, Heidelberg (1998).
- Maier W., Peipp H., Schmidt J., Wray V. & Strack D. "Levels of terpenoid glycoside (blumenin) and cell wall-bound phenolics in some cereal mycorrhizas." *Plant Physiol* 109: 465-70 (1995).
- Maillet F., Poinot V., Andre O., Puech-Pages V., Haouy A., Gueunier M., Cromer L., Giraudet D., Formey D., Niebel A., Martinez E. A., Driguez H., Becard G. & Denarie J. "Fungal lipochitooligosaccharide symbiotic signals in arbuscular mycorrhiza." *Nature* 469: 58-63 (2011).
- Manthey K., Krajinski F., Hohnjec N., Firnhaber C., Pühler A., Perlick A. M. & Küster H. "Transcriptome profiling in root nodules and arbuscular mycorrhiza identifies a collection of novel genes induced during *Medicago truncatula* root endosymbioses." *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1063-77 (2004).
- Marchler-Bauer A., Lu S., Anderson J. B., Chitsaz F., Derbyshire M. K., DeWeese-Scott C., Fong J. H., Geer L. Y., Geer R. C., Gonzales N. R., Gwadz M., Hurwitz D. I., Jackson J. D., Ke Z., Lanczycki C. J., Lu F., Marchler G. H., Mullokandov M., Omelchenko M. V., Robertson C. L., Song J. S., Thanki N., Yamashita R. A., Zhang D., Zhang N., Zheng C. & Bryant S. H. "CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins." *Nucleic Acids Res* 39: 225-9 (2009).



- Martin F., Gianinazzi-Pearson V., Hijri M., Lammers P., Requena N., Sanders I. R., Shachar-Hill Y., Shapiro H., Tuskan G. A. & Young J. P. W. "The long hard road to a completed Glomus intraradices genome." *New Phytologist* 180: 747-50 (2008).
- McGinnis K. M. "RNAi for functional genomics in plants." *Brief Funct Genomics* 9: 111-7 (2010).
- McKean P. G., Vaughan S. & Gull K. "The extended tubulin superfamily." *J Cell Sci* 114: 2723-33 (2001).
- Messinese E., Mun J. H., Yeun L. H., Jayaraman D., Rouge P., Barre A., Loughon G., Schornack S., Bono J. J., Cook D. R. & Ané J. M. "A novel nuclear protein interacts with the symbiotic DMI3 calcium- and calmodulin-dependent protein kinase of *Medicago truncatula*." *Mol Plant Microbe Interact* 20: 912-21 (2007).
- Middleton P. H., Jakab J., Penmetsa R. V., Starker C. G., Doll J., Kalo P., Prabhu R., Marsh J. F., Mitra R. M., Kereszt A., Dudas B., VandenBosch K., Long S. R., Cook D. R., Kiss G. B. & Oldroyd G. E. "An ERF transcription factor in *Medicago truncatula* that is essential for Nod factor signal transduction." *Plant Cell* 19: 1221-34 (2007).
- Miller R. M., Reinhardt D. R. & Jastrow J. D. "External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities." *Oecologia* 103: 17-23 (1995).
- Mitra R. M., Gleason C. A., Edwards A., Hadfield J., Downie J. A., Oldroyd G. E. & Long S. R. "A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: Gene identification by transcript-based cloning." *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 4701-5 (2004).
- Miwa H., Sun J., Oldroyd G. E. & Downie J. A. "Analysis of Nod-factor-induced calcium signaling in root hairs of symbiotically defective mutants of *Lotus japonicus*." *Mol Plant Microbe Interact* 19: 914-23 (2006).
- Mizoi J., Shinozaki K. & Yamaguchi-Shinozaki K. "AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses." *Biochim Biophys Acta* 1819: 86-96 (2012).
- Mühlhardt C. "Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics." Elsevier, Heidelberg (2006).
- Mullis K. B. & Falloona F. A. "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Methods Enzymol.* 155: 335-50 (1987).
- Napoli C., Lemieux C. & Jorgensen R. "Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans." *Plant Cell* 2: 279-89 (1990).
- Navazio L., Moscatiello R., Genre A., Novero M., Baldan B., Bonfante P. & Mariani P. "A diffusible signal from arbuscular mycorrhizal fungi elicits a transient cytosolic calcium elevation in host plant cells." *Plant Physiol* 144: 673-81 (2007).
- Nolan K. E., Saeed N. A. & Rose R. J. "The stress kinase gene *MtSK1* in *Medicago truncatula* with particular reference to somatic embryogenesis." *Plant Cell Rep* 25: 711-22 (2006).
- Oláh B., Briere C., Becard G., Dénarié J. & Gough C. "Nod factors and a diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi stimulate lateral root formation in *Medicago truncatula* via the DMI1/DMI2 signalling pathway." *Plant J* 44: 195-207 (2005).

- Oldroyd G. E. & Downie J. A. "Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 566-76 (2004).
- Oldroyd G. E. & Downie J. A. "Nuclear calcium changes at the core of symbiosis signalling." *Curr Opin Plant Biol* 9: 351-7 (2006).
- Oldroyd G. E., Murray J. D., Poole P. S. & Downie J. A. "The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis." *Annu Rev Genet* 45: 119-44 (2011).
- Ono N. N. & Tian L. "The multiplicity of hairy root cultures: prolific possibilities." *Plant Sci* 180: 439-46 (2011).
- Ortu G. B. R., Pereira P. A., Becker J. D., Küster H. & Bonfante P. "Plant genes related to gibberellin biosynthesis and signaling are differentially regulated during the early stages of AM fungal interactions." *Mol Plant* 5: 951-4 (2012).
- Paffl M. W. "Relative quantification." aus: "Real-time PCR." Taylor & Francis Group, New York: 63-82 (2006).
- Parniske M. "Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses." *Nat Rev Microbiol* 6: 763-75 (2008).
- Pawlowska T. E. & Taylor J. W. "Organization of genetic variation in individuals of arbuscular mycorrhizal fungi." *Nature* 427: 733-7 (2004).
- Peck M. C., Fisher R. F. & Long S. R. "Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to nod gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*." *J Bacteriol* 188: 5417-27 (2006).
- Peng J., Carol P., Richards D. E., King K. E., Cowling R. J., Murphy G. P. & Harberd N. P. "The Arabidopsis *GAI* gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses." *Genes Dev* 11: 3194-205 (1997).
- Perochon A., Aldon D., Galaud J. P. & Ranty B. "Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling." *Biochimie* 93: 2048-53 (2011).
- Perret X., Staehelin C. & Broughton W. J. "Molecular basis of symbiotic promiscuity." *Microbiol Mol Biol Rev* 64: 180-201 (2000).
- Petersen K., Qiu J. L., Lutje J., Fill B. K., Hansen S., Mundy J. & Petersen M. "Arabidopsis *MKS1* is involved in basal immunity and requires an intact N-terminal domain for proper function." *PLoS One* 5: e14364 (2010).
- Pirozynski K. A. & Malloch D. W. "The origin of land plants: a matter of microtrophism." *BioSystems* 6: 153-64 (1975).
- Pozo M. J. & Azcón-Aguilar C. "Unraveling mycorrhiza-induced resistance." *Curr Opin Plant Biol* 10: 393-8 (2007).
- Prell J. & Poole P. "Metabolic changes of rhizobia in legume nodules." *Trends Microbiol* 14: 161-8 (2006).
- Pridmore R. D. "New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker." *Gene* 56: 309-12 (1987).

- Ptashne M. "A genetic switch: Phage (Lambda) and higher organisms." MA: Cell Press, Cambridge (1992).
- Pumplin N. & Harrison M. J. "Live-cell imaging reveals periarbuscular membrane domains and organelle location in *Medicago truncatula* roots during arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Plant Physiol* 151: 809-19 (2009).
- Pumplin N., Mondo S. J., Topp S., Starker C. G., Gantt J. S. & Harrison M. J. "*Medicago truncatula* Vapyrin is a novel protein required for arbuscular mycorrhizal symbiosis." *Plant J* 61 482-94 (2010).
- Pysh L. D., Wysocka-Diller J. W., Camilleri C., Bouchez D. & Benfey P. N. "The GRAS gene family in Arabidopsis: sequence characterization and basic expression analysis of the SCARECROW-LIKE genes." *Plant J* 18: 111-9 (1999).
- Qiu J. L., Fiil B. K., Petersen K., Nielsen H. B., Botanga C. J., Thorgrimsen S., Palma K., Suarez-Rodriguez M. C., Sandbech-Clausen S., Lichota J., Brodersen P., Grasser K. D., Mattsson O., Glazebrook J., Mundy J. & Petersen M. "Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus." *Embo J* 27: 2214-21 (2008).
- Quandt H. J., Pühler A. & Broer I. "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 (1993).
- Radutoiu S., Madsen L. H., Madsen E. B., Felle H. H., Umehara Y., Gronlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N. & Stougaard J. "Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases." *Nature* 425: 585-92 (2003).
- Remy W., Taylor T. N., Hass H. & Kerp H. "Four hundred-million-year-old vesicular arbuscular mycorrhizae." *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 11841-3 (1994).
- Rice P., Longden I. & Bleasby A. "EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite." *Trends Genet* 16: 276-7 (2000).
- Riechmann J. L., Heard J., Martin G., Reuber L., Jiang C., Keddie J., Adam L., Pineda O., Ratcliffe O. J., Samaha R. R., Creelman R., Pilgrim M., Broun P., Zhang J. Z., Ghandehari D., Sherman B. K. & Yu G. "Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes." *Science* 290: 2105-10 (2000).
- Robbins J., Dilworth S. M., Laskey R. A. & Dingwall C. "Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence." *Cell* 64: 615-23 (1991).
- Robertson J.G. & Lyttleton P. "Division of peribacteroid membranes in root nodules of white clover." *J Cell Sci* 69: 147-57 (1984).
- Rose R. J. "*Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future." *Functional Plant Biology* 35: 253-64 (2008).
- Rosendahl S. "Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi." *New Phytol* 178: 253-66 (2008).

- Rozen S. & Skaletsky H. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* 132: 365-86 (2000).
- Sambrook J., Fritsch E. F. & Maniatis T. "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1989).
- Sanders I. R. & Croll D. "Arbuscular mycorrhiza: the challenge to understand the genetics of the fungal partner." *Annu Rev Genet* 44: 271-92 (2010).
- Sano T., Kuraya Y., Amino S. & Nagata T. "Phosphate as a limiting factor for the cell division of tobacco BY-2 cells." *Plant Cell Physiol* 40: 1-8 (1999).
- Santos-Gonzalez J. C., Finlay R. D. & Tehler A. "Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungal communities in roots in a seminatural grassland." *Appl Environ Microbiol* 73: 5613-23 (2007).
- Sato S., Nakamura Y., Kaneko T., Asamizu E., Kato T., Nakao M., Sasamoto S., Watanabe A., Ono A., Kawashima K., Fujishiro T., Katoh M., Kohara M., Kishida Y., Minami C., Nakayama S., Nakazaki N., Shimizu Y., Shinpo S., Takahashi C., Wada T., Yamada M., Ohmido N., Hayashi M., Fukui K., Baba T., Nakamichi T., Mori H. & Tabata S. "Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*." *DNA Res* 15: 227-39 (2008).
- Schaepe S. "RNAi-vermittelter knock-down Mykorrhiza-regulierter Gene aus *Medicago truncatula*." Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover, Institut für Pflanzengenetik (2011).
- Schmutz J., Cannon S. B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D. L., Song Q., Thelen J. J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G. D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M. K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tian Z., Zhu L., Gill N., Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X. C., Shinozaki K., Nguyen H. T., Wing R. A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R. C. & Jackson S. A. "Genome sequence of the palaeopolyploid soybean." *Nature* 463: 178-83 (2010).
- Schüßler A., Schwarzott D. & Walker C. "A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution." *Mycological Research* 105: 1413-21 (2001).
- Schüßler A., Martin H., Cohen D., Fitz M. & Wipf D. "Characterization of a carbohydrate transporter from symbiotic glomeromycotan fungi." *Nature* 444: 933-6 (2006).
- Seyffert W. "Lehrbuch der Genetik." Spektrum-Verlag, Heidelberg (2003).
- Sieberer B. J., Chabaud M., Timmers A. C., Monin A., Fournier J. & Barker D. G. "A nuclear-targetedameleon demonstrates intranuclear Ca<sup>2+</sup> spiking in *Medicago truncatula* root hairs in response to rhizobial nodulation factors." *Plant Physiol* 151: 1197-206 (2009).
- Sieberer B. J., Chabaud M., Fournier J., Timmers A. C. & Barker D. G. "A switch in Ca<sup>2+</sup> spiking signature is concomitant with endosymbiotic microbe entry into cortical root cells of *Medicago truncatula*." *Plant J* 69: 822-30 (2012).
- Sigrist C. J., Cerutti L., de Castro E., Langendijk-Genevaux P. S., Bulliard V., Bairoch A. & Hulo N. "PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation." *Nucleic Acids Res* 38: 161-6 (2010).

- Silverstone A. L., Ciampaglio C. N. & Sun T. "The Arabidopsis RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway." *Plant Cell* 10: 155-69 (1998).
- Simon L., Bousquet J., Levesque R. C. & Lalonde M. "Origin and diversification of endomycorrhizal fungi and coincidence with vascular land plants." *Nature* 363: 67-9 (1993).
- Singh L. P., Gill S. S. & Tuteja N. "Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance." *Plant Signal Behav* 6: 175-91 (2011).
- Smit P., Raedts J., Portyanko V., Debelle F., Gough C., Bisseling T. & Geurts R. "NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription." *Science* 308: 1789-91 (2005).
- Smit P., Limpens E., Geurts R., Fedorova E., Dolgikh E., Gough C. & Bisseling T. "*Medicago* LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling." *Plant Physiol* 145: 183-91 (2007).
- Smith S. E. & Gianinazzi-Pearson V. "Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants." *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39: 221-44 (1988).
- Smith S. E. & Read D. J. "Mycorrhizal Symbiosis." Elsevier Academic Press, New York (2008).
- Solaiman M. D. Z & Saito M. "Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry." *New Phytol* 136: 533-8 (1997).
- Stalder L. & Mühlemann O. "The meaning of nonsense." *Trends Cell Biol* 18: 315-21 (2008).
- Stewart C. N. & Via L. E. "A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications." *Biotechniques* 14: 748-751 (1993).
- Stracke R., Werber M. & Weisshaar B. "The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*." *Curr Opin Plant Biol* 4: 447-56 (2001).
- Stracke S., Kistner C., Yoshida S., Mulder L., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Sandal N., Stougaard J., Szczyglowski K. & Parniske M. "A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis." *Nature* 417: 959-62 (2002).
- Szczyglowski K., Saw R. S., Wopereis J., Copeland S., Hamburger D., Kasiborski B., Dazzo F. B. & de Bruijn F. J. "Nodule organogenesis and symbiotic mutants of the model legume *Lotus japonicus*." *MPMI* 11: 684-97 (1998).
- Szczyglowski K. & Stougaard J. "Lotus genome: pod of gold for legume research." *Trends Plant Sci* 13: 515-7 (2008).
- Tadege M., Wen J., He J., Tu H., Kwak Y., Eschstruth A., Cayrel A., Endre G., Zhao P. X., Chabaud M., Ratet P. & Mysore K. S. "Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*." *Plant J* 54: 335-47 (2008).
- Tadege M., Wang T. L., Wen J., Ratet P. & Mysore K. S. "Mutagenesis and beyond! Tools for understanding legume biology." *Plant Physiol* 151: 978-84 (2009).
- Tadege M., Lin H., Bedair M., Berbel A., Wen J., Rojas C. M., Niu L., Tang Y., Sumner L., Ratet P., McHale N. A., Madueno F. & Mysore K. S. "STENOFOLIA regulates blade outgrowth and leaf vascular patterning in *Medicago truncatula* and *Nicotiana glauca*." *Plant Cell* 23: 2125-42 (2011).

Talukdar T., Gorecka K. M., de Carvalho-Niebel F., Downie J. A., Cullimore J. & Pikula S. "Annexins - calcium- and membrane-binding proteins in the plant kingdom: potential role in nodulation and mycorrhization in *Medicago truncatula*." *Acta Biochim Pol* 56: 199-210 (2009).

Tena G., Boudsocq M. & Sheen J. "Protein kinase signaling networks in plant innate immunity." *Curr Opin Plant Biol* 14: 519-29 (2011).

Tian C., Kasiborski B., Koul R., Lammers P. J., Bucking H. & Shachar-Hill Y. "Regulation of the nitrogen transfer pathway in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: gene characterization and the coordination of expression with nitrogen flux." *Plant Physiol* 153: 1175-87 (2010).

Timmers A. C., Auriac M. C. & Truchet G. "Refined analysis of early symbiotic steps of the *Rhizobium-Medicago* interaction in relationship with microtubular cytoskeleton rearrangements." *Development* 126: 3617-28 (1999).

Tisserant E., Kohler A., Dozolme-Seddas P., Balestrini R., Benabdellah K., Colard A., Croll D., Da Silva C., Gomez S. K., Koul R., Ferrol N., Fiorilli V., Formey D., Franken P., Helber N., Hijri M., Lanfranco L., Lindquist E., Liu Y., Malbreil M., Morin E., Poulain J., Shapiro H., van Tuinen D., Waschke A., Azcon-Aguilar C., Becard G., Bonfante P., Harrison M. J., Kuster H., Lammers P., Paszkowski U., Requena N., Rensing S. A., Roux C., Sanders I. R., Shachar-Hill Y., Tuskan G., Young J. P., Gianinazzi-Pearson V. & Martin F. "The transcriptome of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* (DAOM 197198) reveals functional tradeoffs in an obligate symbiont." *New Phytol* 193: 755-69 (2012).

Trinh T. H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamaté K., Bauer P. & Kondorosi A. "Rapid and efficient transformation of diploid *Medicago truncatula* and *Medicago sativa* ssp. *falcata* lines improved in somatic embryogenesis." *Plant Cell Reports* 17: 345-55 (1998).

Uppalapati S. R., Ishiga Y., Doraiswamy V., Bedair M., Mittal S., Chen J., Nakashima J., Tang Y., Tadege M., Ratet P., Chen R., Schultheiss H. & Mysore K. S. "Loss of abaxial leaf epicuticular wax in *Medicago truncatula* *irg1/palm1* mutants results in reduced spore differentiation of anthracnose and nonhost rust pathogens." *Plant Cell* 24: 353-70 (2012).

Usadel B., Nagel A., Thimm O., Redestig H., Blaesing O. E., Palacios-Rojas N., Selbig J., Hannemann J., Piques M. C., Steinhäuser D., Scheible W. R., Gibon Y., Morcuende R., Weicht D., Meyer S. & Stitt M. "Extension of the visualization tool MapMan to allow statistical analysis of arrays, display of corresponding genes, and comparison with known responses." *Plant Physiol* 138: 1195-204 (2005).

Vasse J., de Billy F., Camut S. & Truchet G. "Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules." *J Bacteriol* 172: 4295-306 (1990).

Veereshlingam H., Haynes J., Penmetsa R. V., Cook D. R., Sherrier D. J. & Dickstein R. "nip, a symbiotic *Medicago truncatula* mutant that forms root nodules with aberrant infection threads and plant defense-like response." *Plant Physiol* 136: 3692-702 (2004).

Verica J. A. & He Z. H. "The cell wall-associated kinase (WAK) and WAK-like kinase gene family." *Plant Physiol* 129: 455-9 (2002).

Vernié T., Moreau S., de Billy F., Plet J., Combiér J.P., Rogers C., Oldroyd G., Frugier F., Niebel A. & Gamas P. "ERF is an ERF transcription factor involved in the control of nodule number and differentiation in *Medicago truncatula*." *Plant Cell* 20: 2696-713 (2008).

Vierheilig H., Coughlan A. P., Wyss U. & Piché Y. "Ink and vinegar, a simple staining technique for arbuscular mycorrhizal fungi." *Appl Environ Microbiol* 64: 5004–7 (1998).

Vieweg M. F., Frühling M., Quandt H. J., Heim U., Baumlein H., Pühler A., Küster H. & Andreas M. P. "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: 62-9 (2004).

Wasson A. P., Pellerone F. I. & Mathesius U. "Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia." *Plant Cell* 18: 1617-29 (2006).

Weidmann S., Sanchez L., Descombin J., Chatagnier O., Gianinazzi S. & Gianinazzi-Pearson V. "Fungal elicitation of signal transduction-related plant genes precedes mycorrhiza establishment and requires the *dmj3* gene in *Medicago truncatula*." *Mol Plant Microbe Interact* 17: 1385-93 (2004).

Weigel D. "The APETALA2 domain is related to a novel type of DNA binding domain." *Plant Cell* 7: 388-9 (1995).

Weiler E. & Nover L. "Allgemeine und molekulare Botanik." Georg Thieme Verlag, Stuttgart (2008).

Wessler S. R. "Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes." *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17600-1 (2006).

Xu P., Christie P., Liu Y., Zhang J. & Li X. "The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* can enhance arsenic tolerance in *Medicago truncatula* by increasing plant phosphorus status and restricting arsenate uptake." *Environ Pollut* 156: 215-20 (2008).

Yano K., Yoshida S., Muller J., Singh S., Banba M., Vickers K., Markmann K., White C., Schuller B., Sato S., Asamizu E., Tabata S., Murooka Y., Perry J., Wang T. L., Kawaguchi M., Imaizumi-Anraku H., Hayashi M. & Parniske M. "CYCLOPS, a mediator of symbiotic intracellular accommodation." *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 20540-5 (2008).

Young N. D., Debelle F., Oldroyd G. E., Geurts R., Cannon S. B., Udvardi M. K., Benedito V. A., Mayer K. F., Gouzy J., Schoof H., Van de Peer Y., Proost S., Cook D. R., Meyers B. C., Spannagl M., Cheung F., De Mita S., Krishnakumar V., Gundlach H., Zhou S., Mudge J., Bharti A. K., Murray J. D., Naoumkina M. A., Rosen B., Silverstein K. A., Tang H., Rombauts S., Zhao P. X., Zhou P., Barbe V., Bardou P., Bechner M., Bellec A., Berger A., Berges H., Bidwell S., Bisseling T., Choisne N., Couloux A., Denny R., Deshpande S., Dai X., Doyle J. J., Dudez A. M., Farmer A. D., Fouteau S., Franken C., Gibelin C., Gish J., Goldstein S., Gonzalez A. J., Green P. J., Hallab A., Hartog M., Hua A., Humphray S. J., Jeong D. H., Jing Y., Jocker A., Kenton S. M., Kim D. J., Klee K., Lai H., Lang C., Lin S., Macmill S. L., Magdelenat G., Matthews L., McCarrison J., Monaghan E. L., Mun J. H., Najjar F. Z., Nicholson C., Noirot C., O'Bleness M., Paule C. R., Poulain J., Prion F., Qin B., Qu C., Retzel E. F., Riddle C., Sallet E., Samain S., Samson N., Sanders I., Saurat O., Scarpelli C., Schiex T., Segurens B., Severin A. J., Sherrier D. J., Shi R., Sims S., Singer S. R., Sinharoy S., Sterck L., Viollet A., Wang B. B., Wang K., Wang M., Wang X., Warfsmann J., Weissenbach J., White D. D., White J. D., Wiley G. B., Wincker P., Xing Y., Yang L., Yao Z., Ying F., Zhai J., Zhou L., Zuber A., Denarie J., Dixon R. A., May G. D., Schwartz D. C., Rogers J., Quetier F., Town C. D. & Roe B. A. "The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses." *Nature* 480: 520-4 (2011).

Zhao Q., Gallego-Giraldo L., Wang H., Zeng Y., Ding S. Y., Chen F. & Dixon R. A. "An NAC transcription factor orchestrates multiple features of cell wall development in *Medicago truncatula*." *Plant J* 63: 100-14 (2010).

Zhou C., Han L., Pislariu C., Nakashima J., Fu C., Jiang Q., Quan L., Blancaflor E. B., Tang Y., Bouton J. H., Udvardi M., Xia G. & Wang Z. Y. "From model to crop: functional analysis of a STAY-GREEN gene in the model legume *Medicago truncatula* and effective use of the gene for alfalfa improvement." *Plant Physiol* 157: 1483-96 (2011).

Zhou X., Chandrasekharan M. B. & Hall T. C. "High rooting frequency and functional analysis of GUS and GFP expression in transgenic *Medicago truncatula* A17." *New Phytol* 162: 813-22 (2004).



## VII. ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

### VII.1 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung I.1:</b> Schematische Darstellung der Entwicklung der Knöllchensymbiose in frühen Stadien. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Annual Reviews of Genetics, Volume 45 © 2011 von Annual Reviews ( <a href="http://www.annualreviews.org">www.annualreviews.org</a> ).	16
<b>Abbildung I.2:</b> Mikroskopische und schematische Darstellung einer Arbuskel. B: Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Nature Reviews Microbiology, Volume 6 © 2008 von Macmillan Publishers Ltd. ( <a href="http://www.nature.com/reviews">www.nature.com/reviews</a> ).	17
<b>Abbildung I.3:</b> Schematische Darstellung der Entwicklungsstadien einer AM-Symbiose. Nachdruck mit freundlicher Genehmigung der Nature Reviews Microbiology, Volume 6 © 2008 von Macmillan Publishers Ltd. ( <a href="http://www.nature.com/reviews">www.nature.com/reviews</a> ).	18
<b>Abbildung I.4:</b> Die Modelleguminose <i>Medicago truncatula</i> .	21
<b>Abbildung I.5:</b> Schematische Darstellung der frühen Signaltransduktion in der Knöllchensymbiose und arbuskulären Mykorrhiza von <i>Medicago truncatula</i> .	23
<b>Abbildung I.6:</b> Schematische Darstellung des RNAi-Prozesses.	27
<b>Abbildung II.1:</b> Schema der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Gateway®-Klonierungen zur Erstellung von RNAi-Konstrukten.	60
<b>Abbildung II.2:</b> Verschiedene Anzuchtsvarianten von <i>Medicago truncatula</i> .	64
<b>Abbildung III.1:</b> Schema zur Auswahl von Kandidatengen in der frühen Signaltransduktion der arbuskulären Mykorrhiza von <i>Medicago truncatula</i> .	69
<b>Abbildung III.2:</b> Agarosegele der mittels PCR aus genomischer DNA von <i>Medicago truncatula</i> amplifizierten Promotorregionen von <i>Mtr.12220</i> , <i>Mtr.49618</i> und <i>Mtr.10067</i> .	73
<b>Abbildung III.3:</b> Schematische Darstellung der Promotor-GUS-Fusionen von <i>Mtr.12220</i> , <i>Mtr.49618</i> und <i>Mtr.10067</i> .	74
<b>Abbildung III.4:</b> Agarosegel der mittels PCR aus <i>Medicago truncatula</i> amplifizierten RNAi-Targetsequenzen von <i>Mtr.9126</i> , <i>Mtr.9513</i> , <i>Mtr.10987</i> , <i>Mtr.25045</i> , <i>Mtr.32288</i> , <i>Mtr.37966</i> und <i>Mtr.43223</i> .	76
<b>Abbildung III.5:</b> Prozess der Selektion für eine Tnt1-Insertionslinie zur Analyse eines ausgewählten Gens (Gen x).	77
<b>Abbildung III.6:</b> Schematische Darstellung der Genotypisierung von Tnt1-Insertionslinien mittels Multiplex PCR.	78
<b>Abbildung III.7:</b> Agarosegel der Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinie NF4095 mittels <i>direct</i> Multiplex PCR mit einem genspezifischen Primerpaar und einem zusätzlichen Tnt1-spezifischen Primer.	79
<b>Abbildung III.8:</b> Agarosegel der Genotypisierung der Tnt1-Insertionslinie NF4095 mittels PCR mit einem genspezifischen Primerpaar und zwei verschiedenen Tnt1-spezifischen Primern.	79
<b>Abbildung III.9:</b> Vergleich eine <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanze mit einer Pflanze der Tnt1-Insertionslinie NF0075.	81
<b>Abbildung III.10:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.20292</i> .	84
<b>Abbildung III.11:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.20292</i> aus dem <i>M. truncatula gene expression atlas</i> (MtGEA).	85
<b>Abbildung III.12:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.20292</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	86
<b>Abbildung III.13:</b> Die relative Expression der AM-Markergene <i>GiaTUB</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	87
<b>Abbildung III.14:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>MtMKS1</i> .	88

<b>Abbildung III.15:</b> Alignment der MKS1-Proteinsequenzen aus <i>Medicago truncatula</i> (MtMKS1), <i>Glycine max</i> (GmMKS1) und <i>Arabidopsis thaliana</i> (AtMKS1).	89
<b>Abbildung III.16:</b> Das Expressionsprofil von <i>MtMKS1</i> aus dem <i>Medicago truncatula gene expression atlas</i> (MtGEA).	89
<b>Abbildung III.17:</b> Die relative Expression eines genspezifischen und eines Tnt1-spezifischen <i>MtMKS1</i> -Amplifikats in <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.	90
<b>Abbildung III.18:</b> Spross- und Wurzelgewicht sowie die Anzahl der Blätter von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.	91
<b>Abbildung III.19:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.	92
<b>Abbildung III.20:</b> Die relative Expression von <i>GmTEF<math>\alpha</math></i> , <i>MtPT4</i> , <i>MtBCP1</i> und <i>MtANN2</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.	93
<b>Abbildung III.21:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.12220</i> .	94
<b>Abbildung III.22:</b> Alignment der Aminosäuresequenzen von <i>Mtr.42888.1.S1_s_at</i> (TC188991), <i>Mtr.12226.1.S1_at</i> (TC184547), <i>Mtr.12220.1.S1_at</i> (TC183573), <i>Mtr.37494.1.S1_at</i> (TC184353) <i>Mtr.37493.1.S1_at</i> (TC187041) und <i>Mtr.12209.1.S1_at</i> (TC174952) aus <i>Medicago truncatula</i> .	95
<b>Abbildung III.23:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.12220</i> aus dem <i>Medicago truncatula gene expression atlas</i> (MtGEA).	96
<b>Abbildung III.24:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.12220</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	97
<b>Abbildung III.25:</b> Die relative Expression der AM-Markergene <i>GiaTUB</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	98
<b>Abbildung III.26:</b> Als Kontrolle mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierte <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Wurzeln nach einer GUS-Färbung.	99
<b>Abbildung III.27:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.	100
<b>Abbildung III.28:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit Myc-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.	101
<b>Abbildung III.29:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> HRC ( <i>hairy root culture</i> ) unter Kontrolle von pRR:p12220-GUS nach einer GUS-Färbung.	102
<b>Abbildung III.30:</b> Das Expressionsprofil von <i>MtSK1</i> aus dem <i>Medicago truncatula gene expression atlas</i> (MtGEA).	103
<b>Abbildung III.31:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>MtSK1</i> .	104
<b>Abbildung III.32:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit Nod- und Myc-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p10067-GUS nach einer GUS-Färbung.	106
<b>Abbildung III.33:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> HRC ( <i>hairy root culture</i> ) unter Kontrolle von pRR:p10067-GUS nach einer GUS-Färbung.	107
<b>Abbildung III.34:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.40638</i> aus dem <i>Medicago truncatula gene expression atlas</i> (MtGEA).	108
<b>Abbildung III.35:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.40638</i> .	108

<b>Abbildung III.36:</b> Die relative Expression eines genspezifischen <i>Mtr.40638</i> -Amplifikats in <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8500.	110
<b>Abbildung III.37:</b> Die relative Expression eines genspezifischen und eines <i>Tnt1</i> -spezifischen <i>Mtr.40638</i> -Amplifikats in <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8710.	111
<b>Abbildung III.38:</b> Phänotypische Charakterisierung von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8500.	112
<b>Abbildung III.39:</b> Phänotypische Charakterisierung von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8500.	113
<b>Abbildung III.40:</b> <i>Medicago truncatula</i> Insertionsmutanten der Linie NF8710 im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen im Alter von sechs Wochen.	114
<b>Abbildung III.41:</b> Die relative Expression von <i>GiaTUB</i> , <i>MtPT4</i> und <i>MtBCP1</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8500.	115
<b>Abbildung III.42:</b> Die relative Expression von <i>GiaTUB</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8710.	116
<b>Abbildung III.43:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8500.	117
<b>Abbildung III.44:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF8710.	118
<b>Abbildung III.45:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.49618</i> .	121
<b>Abbildung III.46:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.49618</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	122
<b>Abbildung III.47:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.49618</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	123
<b>Abbildung III.48:</b> Als Kontrolle mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierte <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Wurzeln nach einer GUS-Färbung.	124
<b>Abbildung III.49:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS nach einer GUS-Färbung.	125
<b>Abbildung III.50:</b> Histochemische Lokalisation der Promotoraktivität in einer mit Myc-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> HRC ( <i>hairy root culture</i> ) unter Kontrolle von pRR:p49618-GUS nach einer GUS-Färbung.	126
<b>Abbildung III.51:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.9126</i> .	127
<b>Abbildung III.52:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.9126</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	128
<b>Abbildung III.53:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.9126</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	129
<b>Abbildung III.54:</b> Die relative Expression von <i>GmTEF<math>\alpha</math></i> , <i>MtPT4</i> und <i>MtBCP1</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	130
<b>Abbildung III.55:</b> Die relative Expression eines <i>Tnt1</i> -spezifischen <i>Mtr.9126</i> -Amplifikats in <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11181.	132
<b>Abbildung III.56:</b> Phänotypische Charakterisierung von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11181.	133

<b>Abbildung III.57:</b> Die relative Expression von <i>GlαTUB</i> , <i>MtPT4</i> und <i>MtBCP1</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11181.	134
<b>Abbildung III.58:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.25945</i> .	135
<b>Abbildung III.59:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.25945</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	136
<b>Abbildung III.60:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.25945</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	137
<b>Abbildung III.61:</b> Die relative Expression von <i>GmTEFα</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	138
<b>Abbildung III.62:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	138
<b>Abbildung III.63:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.38547</i> .	139
<b>Abbildung III.64:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.38547</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	140
<b>Abbildung III.65:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.38547</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	141
<b>Abbildung III.66:</b> Die relative Expression der AM-Markergene <i>GlαTUB</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	142
<b>Abbildung III.67:</b> Die relative Expression eines genspezifischen und eines <i>Tnt1</i> -spezifischen <i>Mtr.38547</i> -Amplifikats in <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11581.	143
<b>Abbildung III.68:</b> Phänotypische Charakterisierung von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11581.	144
<b>Abbildung III.69:</b> Die relative Expression von <i>GlαTUB</i> und <i>MtPT4</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wildtyp-Pflanzen und <i>Tnt1</i> -Insertionsmutanten der Linie NF11581.	145
<b>Abbildung III.70:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.7264</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	146
<b>Abbildung III.71:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.7264</i> .	147
<b>Abbildung III.72:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.7264</i> in einer Zeitreihe von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln.	149
<b>Abbildung III.73:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.7264</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	150
<b>Abbildung III.74:</b> Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	151
<b>Abbildung III.75:</b> Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	153
<b>Abbildung III.76:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	153
<b>Abbildung III.77:</b> Die Nukleotid- und Aminosäuresequenz von <i>Mtr.10987</i> .	155
<b>Abbildung III.78:</b> Das Expressionsprofil von <i>Mtr.10987</i> aus dem <i>Medicago truncatula</i> gene expression atlas (MtGEA).	155
<b>Abbildung III.79:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.10987</i> in mit Myc- und Nod-LCOs behandelten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln.	156

<b>Abbildung III.80:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.10987</i> in einer Zeitreihe von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten <i>Medicago truncatula</i> Wurzeln.	157
<b>Abbildung III.81:</b> Die relative Expression von <i>Mtr.10987</i> in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	158
<b>Abbildung III.82:</b> Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	159
<b>Abbildung III.83:</b> Die relative Expression des Kandidatengens <i>Mtr.10987</i> und verschiedener AM-Markergene in einer Zeitreihe von mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	161
<b>Abbildung III.84:</b> Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	163
<b>Abbildung III.85:</b> Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit <i>Glomus intraradices</i> mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von <i>Medicago truncatula</i> .	164
<b>Abbildung IV.1:</b> Schematische Darstellung der frühen Signaltransduktion in der arbuskulären Mykorrhiza von <i>Medicago truncatula</i> unter potentieller Beteiligung dreier im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Symbiose-assoziiierter Gene.	180

## VII.2 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle I.1:</b> Übersicht der zu Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stehenden <i>Medicago truncatula</i> Transkriptionsdaten.	30
<b>Tabelle II.1:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide.	34
<b>Tabelle II.2:</b> Auflistung der Primersequenzen für die Amplifikation der Promotorregionen von <i>Mtr.12220</i> , <i>Mtr.49618</i> und <i>Mtr.10067</i> .	36
<b>Tabelle II.3:</b> Auflistung der Primersequenzen für die Amplifikation der RNAi-Targetsequenzen von <i>Mtr.9126</i> , <i>Mtr.9513</i> , <i>Mtr.10987</i> , <i>Mtr.25945</i> , <i>Mtr.32288</i> , <i>Mtr.37966</i> und <i>Mtr.43223</i> .	37
<b>Tabelle II.4:</b> Auflistung der Primersequenzen für die Genotypisierung von Tnt1-Insertionsmutanten.	37
<b>Tabelle II.5:</b> Auflistung der Primersequenzen für <i>real-time</i> RT-PCR Messungen.	38
<b>Tabelle II.6:</b> Zusammensetzung der Teilkomponenten der $\frac{1}{2}$ strength Hoagland's solution Düngelösung.	45
<b>Tabelle II.7:</b> Zusammensetzung der Teilkomponenten der NH-Mix Düngelösung.	46
<b>Tabelle II.8:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme.	46
<b>Tabelle II.9:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits.	46
<b>Tabelle II.10:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien.	47
<b>Tabelle II.11:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmittel.	48
<b>Tabelle II.12:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte.	49
<b>Tabelle II.13:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Softwareprogramme.	50
<b>Tabelle II.14:</b> PCR Programm für die Amplifikation von RNAi-Targetsequenzen und Promotorsequenzen mittels Phire® Hot Start II DNA Polymerase.	54
<b>Tabelle II.15:</b> PCR Programm für die Amplifikation der Promotorregion von <i>Mtr.10067</i> mittels <i>Pfu</i> -Polymerase.	54
<b>Tabelle II.16:</b> Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes der mit Hilfe des Phire® Plant Direct PCR Kit durchgeführten <i>direct</i> Multiplex PCR Messungen.	55

<b>Tabelle II.17:</b> PCR Programm für die Genotypisierung der Tnt1-Insertionsmutanten NF0075, NF4095, NF4499, NF5196, NF8500, NF8710, NF8882, NF9470, NF9488, NF9704, NF10142, NF10424, NF11020, NF11181, NF11397, NF11581, NF11714 und NF12449 mittels <i>direct</i> Multiplex PCR.	55
<b>Tabelle II.18:</b> PCR Programm für die Genotypisierung der Tnt1-Insertionsmutanten NF0160 und NF4409 mittels <i>direct</i> Multiplex PCR.	56
<b>Tabelle II.19:</b> Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die <i>real time</i> RT-PCR.	56
<b>Tabelle II.20:</b> Programm für die <i>real time</i> RT-PCR.	57
<b>Tabelle III.1:</b> Zusammenfassung von <i>GeneChip</i> Daten ausgewählter Kandidatengene.	71
<b>Tabelle III.2:</b> Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene.	72
<b>Tabelle III.3:</b> Auflistung der Punktmutationen in den RNAi-Konstrukten pK7GWIWG2:Mtr.9126, pK7GWIWG2:Mtr.9513, pK7GWIWG2:Mtr.10987, pK7GWIWG2:Mtr.25945, pK7GWIWG2:Mtr.32288 und pK7GWIWG2:Mtr.37966.	76
<b>Tabelle III.4:</b> Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten Tnt1-Insertionslinien.	80

## WISSENSCHAFTLICHER WERDEGANG

### Schulbildung

- 08/1993 - 06/2002: Besuch des Evangelisch Stiftischen Gymnasiums in Gütersloh  
Abschluss: Abitur (Note: 1,6)
- 08/1999 - 02/2000: Besuch der Jay County High School in Portland, Indiana, USA

### Hochschulbildung

- 10/2002 - 06/2005: Bachelorstudium „Bioinformatik und Genomforschung“ an der Universität Bielefeld  
Abschluss: Bachelor of Science (Note: ausgezeichnet)  
Titel der Bachelorarbeit: „Bioinformatische Charakterisierung der corynebakteriellen SOS-Box und Identifizierung SOS-induzierter Gene“
- 10/2005 - 08/2007: Masterstudium „Genome based Systems Biology“ an der Universität Bielefeld  
Abschluss: Master of Science (Note: sehr gut)  
Titel der Masterarbeit: „Calmodulin-bindende Proteine und Calmodulin in der arbuskulären Mykorrhiza von *Medicago truncatula*: Genexpressionsstudien und subzelluläre Lokalisierung der Genprodukte“
- 10/2007 - 10/2008: Projektarbeit im Rahmen eines Stipendiums der *International NRW Graduate School in Bioinformatics and Genome Research* an der Universität Bielefeld

### Promotion

- 10/2008 - 04/2009: Promotionsstudium an der Universität Bielefeld
- ab 04/2009: Fortsetzung des Promotionsstudiums im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms 1212 „Plant-Micro“ an der Leibniz Universität Hannover  
Thema der Promotion: „Analyse der Funktion von Signaltransduktionsassoziierten Genen in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose von *Medicago truncatula*“

## VERÖFFENTLICHUNGEN

Czaja L. F., Hogeckamp C., Lamm P., Mailliet F., Martinez E. A., Samain E., Dénarié J., Küster H. & Hohnjec N. "Transcriptional responses towards diffusible signals from symbiotic microbes reveal *MtNFP*- and *MtDMI3*-dependent reprogramming of host gene expression by AM fungal LCOs." *Plant Physiol* 159: 1671-85 (2012)

Jochmann N., Kurze A. K., Czaja L. F., Brinkrolf K., Brune I., Hüser A. T., Hansmeier N., Pühler A., Borovok I. & Tauch A.: "Genetic makeup of the *Corynebacterium glutamicum* LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays." *Microbiology* 155:1459-77 (2009).

Baumbach J., Brinkrolf K., Czaja L. F., Rahmann S. & Tauch A. "CoryneRegNet: An ontology-based data warehouse of corynebacterial transcription factors and regulatory networks." *BMC Genomics* 7:24 (2006).

## POSTERPRÄSENTATIONEN DIESER ARBEIT

07/2009: Kongress: "Model Legume Congress 2009", Asilomar, USA

09/2010: Symposium: "Genetics of Plant Mineral Nutrition", Leibniz Universität Hannover, Hannover



## DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Personen bedanken, die zu dem Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt...

...Prof. Dr. Helge Küster für die Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Betreuung durchführen zu können. Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich für all die vielen Ratschläge, Gespräche und Diskussionen bedanken, für ein stets offenes Ohr und nicht zuletzt für die Geduld und Zeit die in diese Arbeit geflossen sind!

...Dr. Natalija Hohnjec für die fachliche Betreuung und Unterstützung, für die Nutzung unpublizierter Daten sowie für eine Vielzahl von Tipps und Ratschlägen. Danke für den Zuspruch und dafür, dass es an den vielen langen Tagen an der Sterilbank stets etwas zu lachen gab!

...der gesamten Arbeitsgruppe Pflanzengenomforschung für die angenehme, freundliche und lustige Arbeitsatmosphäre. Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei meiner Master-Studentin Sieke Schaepe für ihren Beitrag zu dieser Arbeit. Ich danke Claudia Hogeckamp ganz herzlich für die Freundschaft, den Humor, das Verständnis und die Unterstützung während der letzten Jahre!

... Prof. Dr. Paola Bonfante (Istituto Protezione Piante, Università di Torino) und Prof. Dr. Vivienne Gianinazzi-Pearson (INRA, Dijon) für die Nutzung unpublizierter *GeneChip* Daten.

...Dr. Jean Dénarié (INRA, Dijon) für die Bereitstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Myc- und Nod-LCOs.

...Dr. Jiangqi Wen (Noble Foundation, Ardmore) und Dr. Million Tagede (Noble Foundation, Ardmore) für die Bereitstellung der Samen von Tnt1-Insertionsmutanten.

...Dr. Colby G. Starker (Department of Plant Biology, University of Minnesota) für die Nutzung von RNAi-Konstrukten aus der *Medicago truncatula* RNAi Database – auch wenn die damit erzielten Ergebnisse letztlich nicht in diese Arbeit einfließen.

...Herrn H. Geyer und allen Mitarbeitern des Gewächshauses die Unterstützung bei der Pflanzenanzucht und für die schnelle und kompetente Hilfe im Kampf gegen den Parasitenbefall.

...den Mitarbeitern der Werkstatt für die Hilfe und Unterstützung bei allen Alltagsproblemen und Projekten die handwerkliches Geschick erforderten.

...dem Team der Graduiertenakademie für die exzellenten Möglichkeiten zur Fort- und Weiterbildung während meiner Promotion, die mir häufig einen Blick über den Tellerrand hinaus ermöglichten.

... allen Korrekturlesern und -leserinnen dieser Arbeit.

... meiner Familie für Zuspruch, Rückhalt und jede Menge moralischer Unterstützung!

...Andi für Liebe und Verständnis. Danke, dass du auch in den schwierigen Zeiten für mich da warst und niemals gezweifelt hast!

# ANHANG

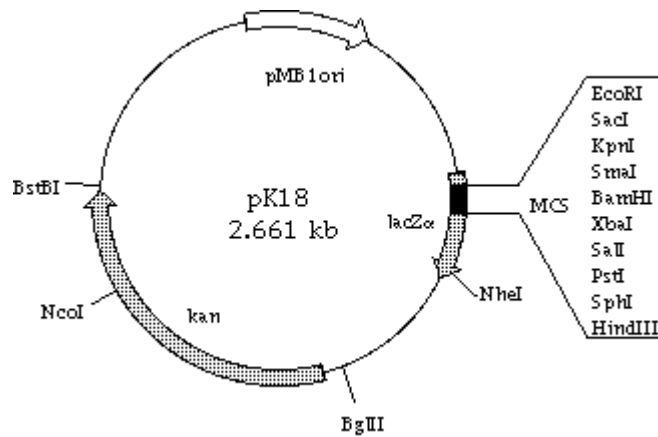
## Anhang A: Sequenzdaten

```
TGATGATGCCATCTCATTGAAGAAGTATTAGGCATGTGCCATAAAGAGTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACTTGTGACTTGGTTGGTTGGTAGCCAACTTGTGTAATCCTTGTGGATT
GGTAGCCAACCTTGTGTAATGTGAAAAATGTGTGATAAATGTCAAATATTGTAGGCTTTAGAGGGTGAAGCTTTGGCTATAAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTTCTCACACCAACAAGAGA
GAAAGAAAGAGTGAAGTTTACACAGCAAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAAATAGAGAGTGAAGCATATTGTAGTGAAGTGGGAATATCAAAAGAGGGTTATTTCTTTTGTAGTGTGTAGT
GGTCTTTGGAGTATTACCTCCGACCTACAAGGTGAAAAATCCTTACTATAGTATATCAGTGTCTCTCGGGTCTGGTGTGTTTTTTTCCCTTATTCCAGAAAGGGTTTCCACGTAAAAATCT
TGGTGTCAATTTACTCTTTTATTCTTGTAAATACCGTATCTCGGTGTACATTTATTTCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGTTTATTTCCCAACAACCTGGTATCAGAGCA
CAGGTTCTGCTCGTTCACTGAAATACTATTCACTGTCCGTAGTACTATACTTGGTAAAAAATAAAATGTCTGGAGTAAAGTACGAGGTAGCAAAAATCAATGGAGATAACGGTTTCTCAACATG
GCAAGAAGGATGAGAGATCTGCTCATCCAACAGGATTACACAAGGTTCTAGATGTGATTCAAAAAGCCGTGATACCATGAAAGCTGAGGATTGGGCTGACTGGATGAAAGAGCTGTAGT
CAATCAGGTTGCACTTATCAGATGATGTGTAATAACATCATTGATGAAGACACTGCACGTGGAATTTGGACAAGGTTGGAAGCCATATACATGTCCAAAACGCTGACAAAATAAATTTGTACCTG
AAGAAGCAGTTATACGCCCTACACATGAGTGAAGTACGAATTTTTTGTACATTTAAATGTGTTTAAACGGCAATAACACACAGCTTGCCAACTCGGAGTAAAAATCGAGGAAGAAGATAAAGC
CATCTTGTATTGAACCTGTTCCATCTTGTACAGATAATTTGGCAACAACCTCCTGCACGGTAAAGTACTATTGAGTTGAAAGATGTACATCGGCTTCTTACTCAATGAGAAGATGAGAA
AGAAGCTGAAAAATCAAGGACAGGCTCTCATCAGAGAAGTGAAGGAGGAGTATCAAAGGAGTTCGAAACAACATATGATAGTCCGGAGCTCGTGGGAAAGTCAAGAATCGATCCAAATCAAGA
GTCAGAAATGCTACAACCTGTAATCAACAGGTCACCTCAAAAAGAGATTGCCAAATCCAAGGAAGGGCAAAAGTGAACCAAGTGGCCAGAAAGTGAACGACGCAACACAGCCGCTATGGTCAAAAA
TAATGATAATGTTGCTCTTTATAAATGAGGAAGAGGAATGCATGCACCTGTCAAGTCCAGAGTCCGGAATGGTGGTTGACACAGCGGCATCTCACCATGCCACACCGGTAAGAGATCTTTTTT
GCAGATATGTAGCAGGTGATTTCCGACAGTGAAAAATGGGTAACACAAGTTACTCAAAGATTCCGGGGATTTGGTACATTTGTATCAAGACAAATTCGGATGCACATTTGTTTCAAAGGATGTG
CGGCATGTACTGATTTGCGGATGAACCTGATCTCGGGAATGCTTTAGACCGAGATGGATACGAGAGTTATTTTGCAAAATCAAAAAGTGGAGACTCACTAAGGGATCATTTGGTATTGCAAGGG
AGTTGCTCGTGGCAGTTGTACAGGACAAATGCAGAAATATGCCAAGTGAATGAACGCGGCACAAGATGAGATTTCTGTAGATTTATGGCACAAGAAATGGGTCATATGAGCGAGAAGGGAT
TGCAGATTTTCCCAAGAAATCACTATTCTTATGCCAAAGTACAACGTGAAAACTTGTGACTACTGTTTATTGGTAAGCAGCATAGAGTCTCATTTCAGACATCGTGTGAAAGAAAATG
AATATACTGATTTAGTATATTCTGATGTTGCGGCCAATGGAAATGAATCAATGGCGGTAACAAATATTGTTACTTTTATTGATGATGCTTACGAAAAATATGGGTTTATTTTGAA
AACCAAGATCAGGTGTTCAAGTTTTCCAGAAGTTTCTAGTCTAGTAGAAAGGGAGACGGGTCGAAAGCTAAAGCGTCTCCGAAGTGAACAATGGAGTGAATCACTCAAGGGAAATTTGAAG
AGTATTGTTCAAGTCATGGGATCAGACATGAAAGACAGTTCCTGGAACCCCAAGCACAATGGGCTAGCCGAGAGGATGAACCCGACCATTTGTGGAAGGTTGAGAAGCATGCTCAGATGGCT
AACTGCCCTAAGTCACTTCTGGGTTGAAGCAGTTACGACAGCCTGTACTCTGATCAATAGGAGTCCATCAGTTCGGCTTGAATCCAGAGAGAGTCTGGACCAACAAGGAGTGTCCCTA
CTCGCATCTGAAGGTGTTGCGTTGAGAGCTTTTGCACATGTACCAAAAAGAGCAGAGAAACAAAGCTGGATGATAAATCTATTCCCTGCATATTTATCGGATATGGAGATGAAGAGTTGCGGTACA
GACTGTGGGATCCTGTAAGAAGAAGGTCATCAGAAGTAGAGATGATGCTTCCGAGAAAGTGAAGTTAGAAGTGTGCTGATATGTCAGAAAAGTGAAGAATGGTATAATCTCAACTTTGTT
ACTATCTCTACTTCAAACTCCACAAAGTGCAGAAAGTACGACCGCAGAGGTTTCCGACAGGGGAGCAACCTGGTGAAGTTATTGAGCAGGGGAGCAACTTGTGAAGTGTGCGAGGA
AGTGGAGCACCCTCAGGGAGAAGAACACATCAACCTCTGAGGAGATCAGAGAGCCAAAGGTTAGATGACGAGGATACCTTCCACAGAGTATGCTCATCAGTATGATAGGGAGCCAG
AAAGCTTAAGGAGGTTGTTCCCATCCAGAAAAGAACCAGTTGATGAAAGCTATGCAAGAAGAGATGGAATCTCCAGAAAAATGGCACAATCAAGCTGGTTGAACCTCAAAAGGGTAAAAAGA
CCACTCAAAATGCAAAATGGGCTTTAACTCAAGAAAGATGGAGATTGCAAGCTGGTGCAGATACAAGCTCGATTTGGTGGTTAAAGGCTTCAAGCAGAAAGAAAGGATTTGATTTTGCAGAAATTTT
CTCCCCCGTTGTTAAAAATGACTCTTATTCGAACAATTTGAGCTTAGCAGCTAGCCTAGATCTTGAAGTGGAGCAGTTGGATGTGAAACTGCATTTCTCATGGAGATTTGGAAGAGGAGATT
ATATGGAGCAACCAAGAGATTGAAAGTAGCTGGAAGAAACACATGTTGTGCAAAATGAATAAGAGCTTTTATGAGATTGAAGCAGGCCAACAGGCAAGTGTACATGAAGTTGATTCATC
AAAAGTCAACATACCTAAAGACCTTCTGATCCATGTGTATACCTCAAAGATTTTCTGAGAATAACTTTATTATATTGTTGTATGTGGATGACATGCTAATTTGAGAAAAGACAAGGG
GTTGATAGCAAAAGTTGAAGGAGATCTGCTCAAAGTCAATTTGATATGAAGGACTTGGGCCAGCACAACAATTTAGGAGTGAAGATAGTTCCGAGAGAGAACAAGTAGAAAGTTGTGGCTATCTC
AGGAGAAGTACATTTGAACGTACTAGAACGCTTCAACATGAAGAATGCTAAGCCAGTCAAGCAGCTCTTGTGCTCATCTAAAGTTGAGTAAAAAGATGTGCTCTACAACAGTGAAGAGAGAAA
GGAAACATGGCTAAAGTTCTTATTTCTCAGCAGTCCGAAGCTTGTATGATGCAATGGTATGTACTAGACCTGATATTGCTCACGAGTGGTGTGTCAGCAGGTTTCTGAAAAATCCTGGAAA
GGAAACATGGGAAGCAGTCAAGTGGATACTCAGGTACCTGAGAGGTACCAGGGAGATTGTTTGTGCTTTGGAGGATCTGATCCAATCTTGAAGGCTATACAGATGCTGATATGGCAGGTGACA
TTGACAACAGAAAAATCCAGTACTGGATTTTGTACATTTTCAAGGGGAGCTATATATGGCAGTCTAAGTTGCAAAAGTGGCTTGCATTTCAACAACCTGAAGCAGAGTACATTTGCTGTACA
GAACTGGCAAGGAGATGATGCTCAAGCATTCTTCAAGAGCTTGGATTGCATCAGAAGGAGTATGCTGCTATTGTGACAGTCAAAGTGAATAGACCTTAGCAAGAAGTCTATGTACCA
TGCAAGGACCAACAACATTTGATGTGAGATATCATTTGGATTCGAGAAAATGGTAGATGATGAATCTTAAAGTCTTGAAGATTCTCAAAATGAGAAATCCCGCAGATATGCTGACCAAGTGGTAC
CAAGGAACAAGTTGAGCTATGCAAGAACTTGTGCGCATGCATTTCAAACCTAGAAGCAGTGTACCTCTCTGATGAATGAGACTGGAGGGGAGATGATGATGCTCATCTCATTGAAGAAG
TATTAGGCATGTGCCATAAAGAGTTTCTTTGGTTTGGTAGCCAACTTGTGACTTGGTTTGGTGGTAGCCAACTTGTGTAATCCTTGTGGATTGGTAGCCAACTTTGTTGAATTTGTGAA
AAATGTGTGTAATTTGCAAAATTTGAGGCTTTAGAGGGTGAAGCTTTGGCTATAAAAAGGAGAGCTTCAACTCTCATTTCTCACACCAACAAGAGAGAAAAGAAAGAGTGAAGTTTCCACAGAC
AAGGTATAAGAAAATAGTCTGTGAGGAAAAATAGAGAGTGAAGCAGATATTGTAGTGAAGTGGGAATATCAAAAAGAGGGTTATTTCTTTGAGTGTGTAGTGGCTTTGGAGTATTACCTCCGACC
TACAAAAGTAAAAATCCTTACTATAGTATATCAGTGTCTCTCGGGTCTGGTGTGTTTTTTTCCCTTATTCCAGAAAGGGTTTCCAGTAAAAATCTGGTGTCAATTTTACTCTTTTATCT
TGTTAATACCGTATCTCGGTGTACATTTATTACCGCTTTATTACCGTGAATATTATTTGGTAAGGGTTTATTCCCAACA
```

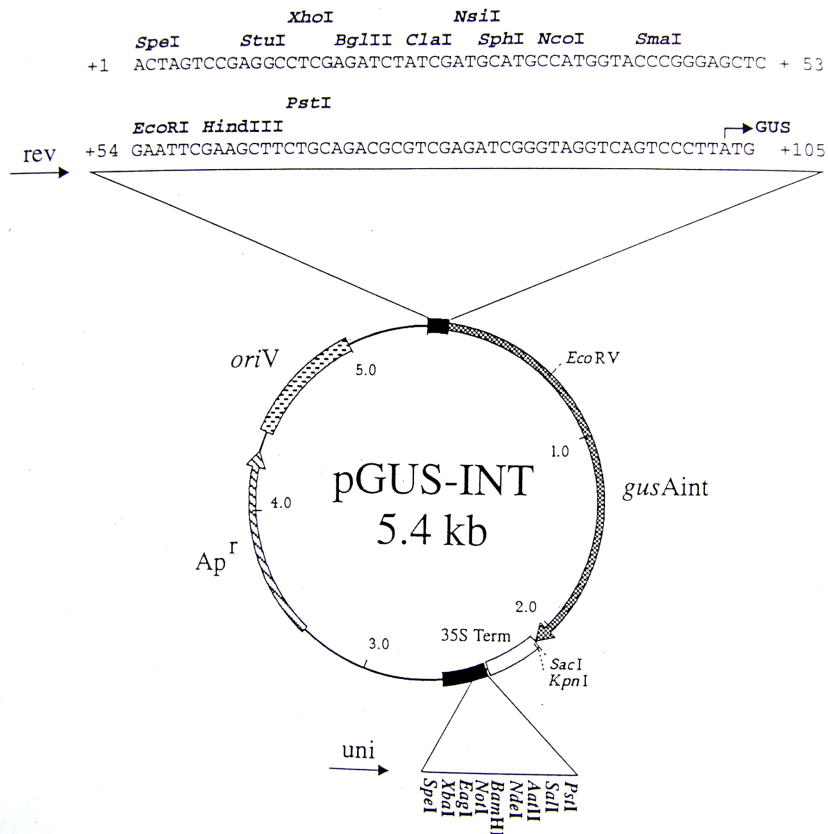
Abbildung A.1: Die Nukleotidsequenz des Retrotransposons Tnt1. Die 5.334 bp lange Tnt1-Sequenz ist unter der GenBank accession number X13777.1 verfügbar.



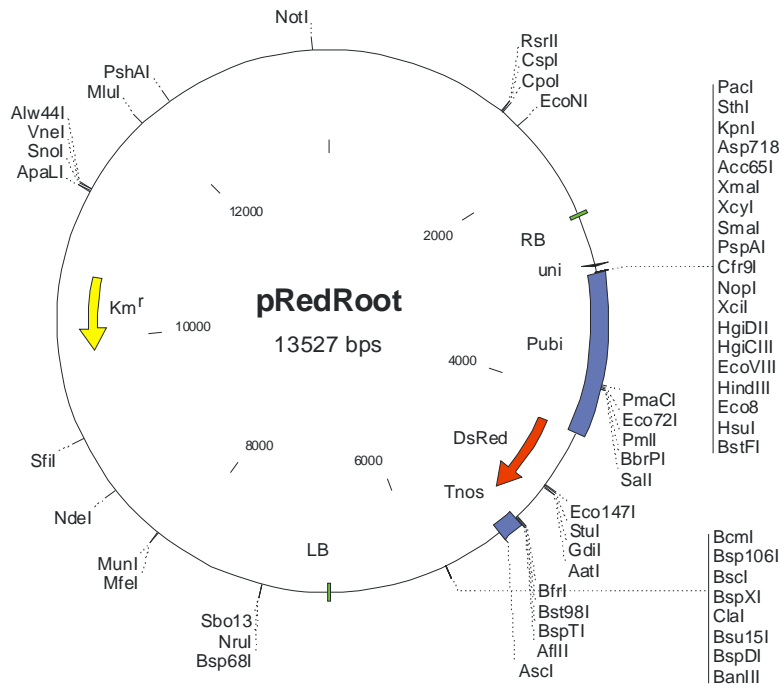
### Anhang B: Plasmidkarten



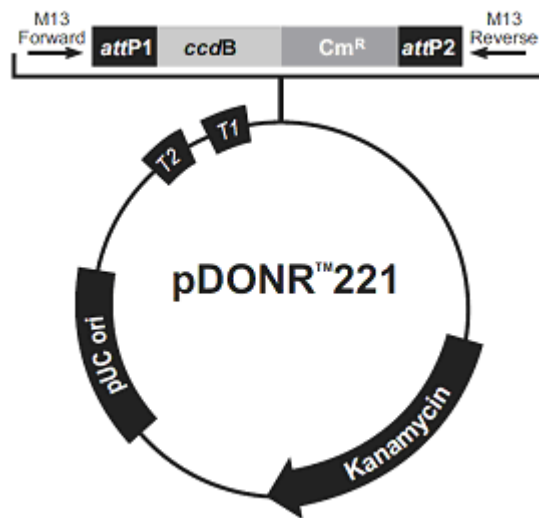
**Abbildung B.1: Darstellung des Kloniervektors pK18 (Pridmore et al., 1987).** Der Vektor trägt zur Replikation den Replikationsursprung pMB1ori und zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen (kan). Die MCS (multiple cloning site) wird von dem lacZ- $\alpha$ -Komplement umfasst, wodurch der Vektor blau-weiß selektionierbar ist. Alle relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.



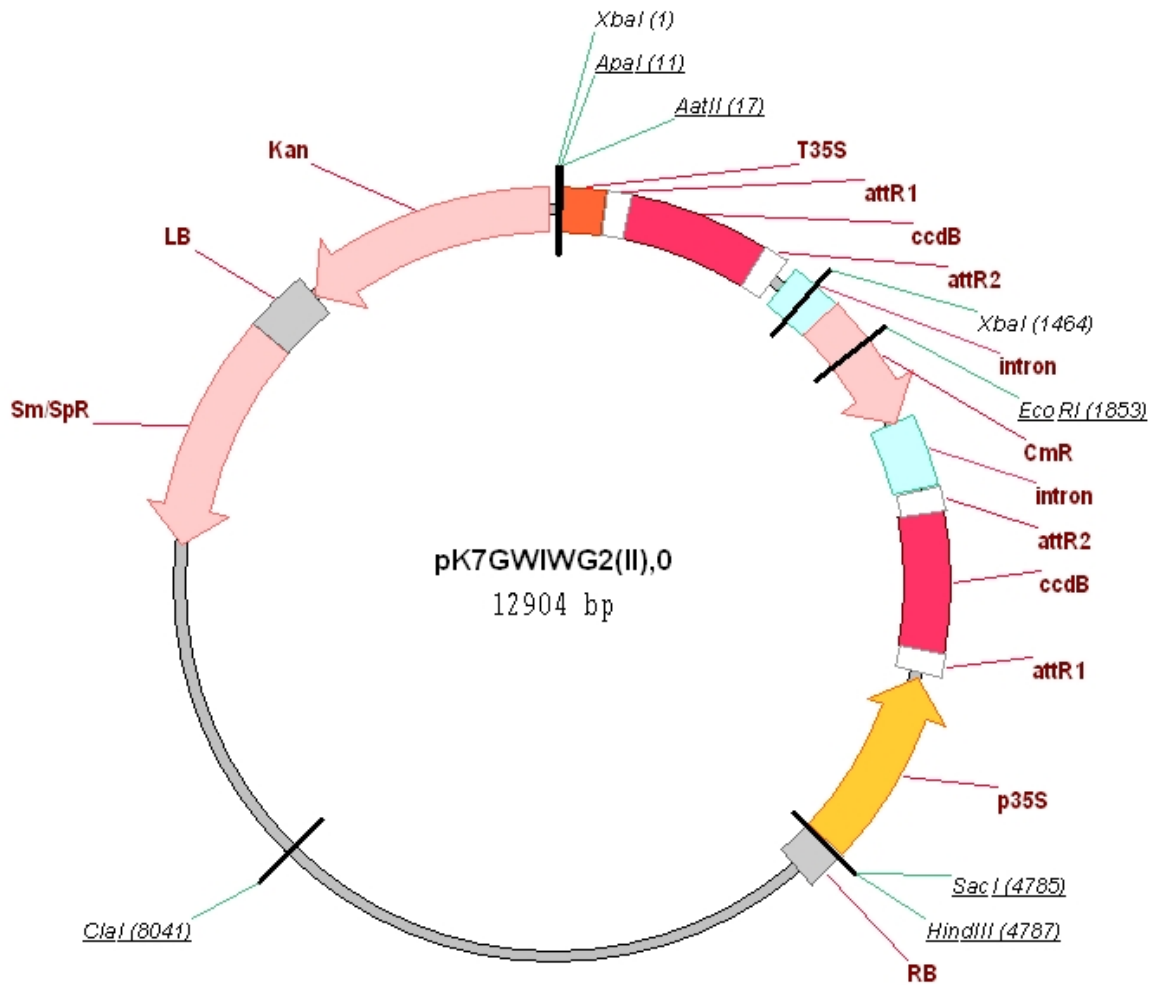
**Abbildung B.2: Darstellung des Kloniervektors pGUSINT (Küster et al., 1995).** Der Vektor trägt zur Replikation den Replikationsursprung oriV und zur Selektion ein Ampicillin-Resistenzgen (Ap<sup>r</sup>). Die MCS (multiple cloning site) liegt unmittelbar vor dem intronhaltigen gusA-Gen (gusAint) mit 35S Terminator (35S Term). Alle relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.



**Abbildung B.3:** Darstellung des binären Vektors pRedRoot (Limpens *et al.*, 2003). Der Vektor trägt zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen ( $Km^r$ ) und das *dsRed*-Gen unter Kontrolle des Ubiquitin-Promotors (Pubi). Die MCS (*multiple cloning site*) und die *dsRed*-Kassette liegen zwischen der für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wichtigen *right border* (RB) und *left border* (LB). Alle relevanten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.



**Abbildung B.4:** Darstellung des Gateway®-Kloniervektors pDONR<sup>TM</sup>221 (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Der Vektor trägt zur Replikation den pUC Replikationsursprung (pUC ori) und zur Selektion ein Kanamycin-Resistenzgen. Zudem trägt er die für die Rekombination wichtigen *attP*-sites die ein *ccdB*-Gen und ein Chloramphenicol-Resistenzgen ( $Cm^R$ ) flankieren. T1: Terminator 1; T2: Terminator 2; M13 Forward: Bindestelle für den M13 Forward Sequenzierprimer; M13 Reverse: Bindestelle für den M13 Reverse Sequenzierprimer (Quelle: Invitrogen, Darmstadt, Deutschland).



**Abbildung B.5:** Darstellung des binären Vektors pK7GWIWG2(II) (Limpens, Wageningen University & Research Center, Wageningen, Niederlande). Der Vektor trägt zur Selektion ein Spectinomycin-Resistenzgen (Sm/SpR) und ein Kanamycin-Resistenzgen (Kan). Zwischen der für den Agrobakterien-vermittelten Gentransfer wichtigen *right border* (RB) und *left border* (LB) liegen unter der Kontrolle des p35S-Promotors (p35S) zwei invers orientierte und von attR-sites flankierte ccdB-Gene getrennt durch ein Intron mit Chloramphenicol-Resistenzgen (CmR). Relevante Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete Vektor trägt zusätzlich zwischen dem Kanamycin-Resistenzgen und dem 35S-Terminator (T35S) noch eine dsRed-Reportergen-kassette, die in der Vektorkarte nicht eingezeichnet ist (Quelle: Karimi *et al.*, 2005).





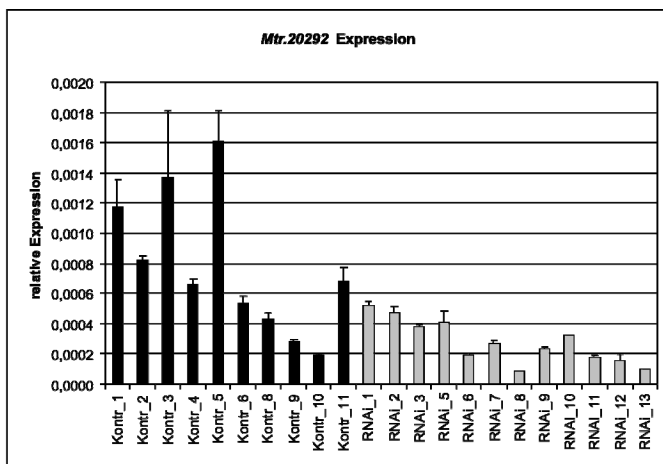
## Anhang C: Expressionsdaten

**Tabelle C.1:** Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit analysierten *Medicago GeneChip* Hybridisierungen zur Auswahl von Kandidatengenen der frühen Signaltransduktion der arbuskulären Mykorrhiza in *Medicago truncatula*. Angegeben sind die *GeneChip* ID sowie eine Kurzbeschreibung der Behandlung des für die *GeneChip* Hybridisierungen verwendeten biologischen Materials und der entsprechenden Referenz. Abkürzungen: WT: Wildtyp; dpi: *days past inoculation*; PPA: *prepenetration apparatus*; VGP: Vivienne Gianinazzi-Pearson, Institut national de la recherche agronomique (INRA), Dijon, Frankreich, unpublizierte Daten; NH: N. Hohnjec, Leibniz Universität Hannover, Hannover, Deutschland, unpublizierte Daten; CH: Hoge Kamp et al. (2011); GO: Ortu et al. (2012)

<b>GeneChip ID</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Referenz</b>
MtGeneChip0001	<i>M. truncatula</i> WT J5 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (1. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0002	<i>M. truncatula</i> WT J5 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (2. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0003	<i>M. truncatula</i> WT J5 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (3. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0004	<i>M. truncatula</i> WT J5 nicht-mykorrhiziert (1. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0005	<i>M. truncatula</i> WT J5 nicht-mykorrhiziert (2. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0006	<i>M. truncatula</i> WT J5 nicht-mykorrhiziert (3. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0019	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (1. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0020	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (2. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0021	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 5 dpi mit <i>G. intraradices</i> (3. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0022	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante nicht-mykorrhiziert (1. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0023	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante nicht-mykorrhiziert (2. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0024	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante nicht-mykorrhiziert (3. biologisches Replikat)	VGP
MtGeneChip0025	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Kontrollinkubation (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0041	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Kontrollinkubation (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0026	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Kontrollinkubation (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0042	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Kontrollinkubation (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0027	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Kontrollinkubation (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0028	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Kontrollinkubation (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0045	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Kontrollinkubation (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0033	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Kontrollinkubation (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0034	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Kontrollinkubation (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0035	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Kontrollinkubation (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0036	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Kontrollinkubation (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0046	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Kontrollinkubation (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0029	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0030	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0043	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0044	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0031	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand	NH

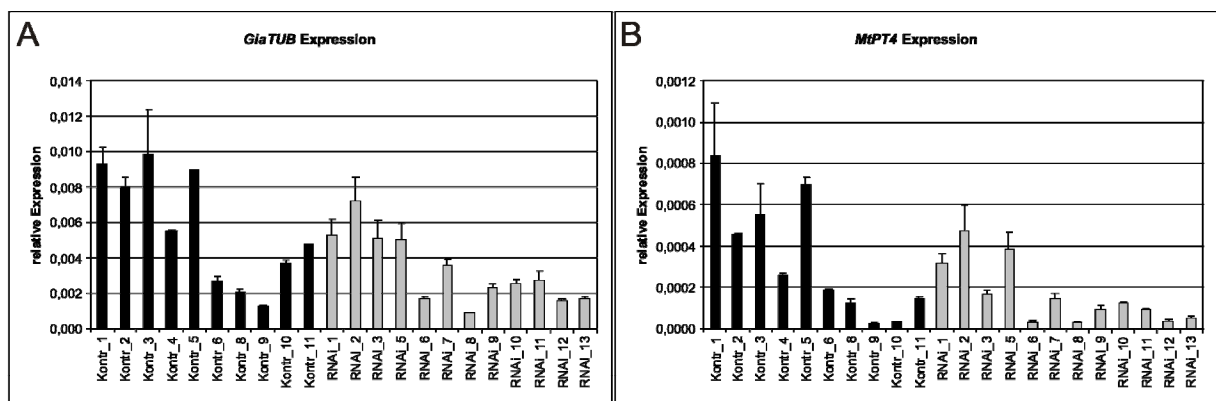
	gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	
MtGeneChip0032	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0037	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0047	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0038	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0040	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0039	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0048	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit filtriertem Überstand gekeimter <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0052	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0053	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0054	<i>M. truncatula</i> WT A17 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0055	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0056	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0057	<i>M. truncatula</i> WT A17 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0058	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0059	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0060	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 6 h Inkubation mit gekeimten <i>G. intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0061	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G.</i> <i>intraradices</i> Sporen (1. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0062	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G.</i> <i>intraradices</i> Sporen (2. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0063	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante 24 h Inkubation mit gekeimten <i>G.</i> <i>intraradices</i> Sporen (3. biologisches Replikat)	NH
MtGeneChip0148	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. intraradices</i> (1. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0149	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. intraradices</i> (2. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0150	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. intraradices</i> (3. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0151	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. mossae</i> (1. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0152	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. mossae</i> (2. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0153	<i>M. truncatula</i> WT A17 28 dpi mit <i>G. mossae</i> (3. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0154	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 µM P (1. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0155	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 µM P (2. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0156	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 µM P (3. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0157	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 mM P (1. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0158	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 mM P (2. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0159	<i>M. truncatula</i> WT A17 gedüngt mit 20 mM P (3. biologisches Replikat)	CH
MtGeneChip0163	<i>M. truncatula</i> WT A17 PPA-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (1. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0164	<i>M. truncatula</i> WT A17 PPA-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (2. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0165	<i>M. truncatula</i> WT A17 PPA-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (3. biologisches Replikat)	GO

MtGeneChip0166	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Apressorien-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (1. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0167	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Apressorien-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (2. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0168	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Apressorien-Bildung mit <i>G. intraradices</i> (3. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0169	<i>M. truncatula</i> WT A17 Kontrolle (1. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0170	<i>M. truncatula</i> WT A17 Kontrolle (2. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0171	<i>M. truncatula</i> WT A17 Kontrolle (3. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0172	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Kontrolle (1. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0173	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Kontrolle (2. biologisches Replikat)	GO
MtGeneChip0174	<i>M. truncatula dmi3</i> -Mutante Kontrolle (3. biologisches Replikat)	GO



**Abbildung C.1:** Die relative Expression von *Mtr.20292* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.20292* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.20292* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.20292* (graue Balken) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

modifiziert nach Schaepe, 2011).



**Abbildung C.2:** Die relative Expression der AM-Markergene *GαTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GαTUB* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.20292* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.20292* (graue Balken) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

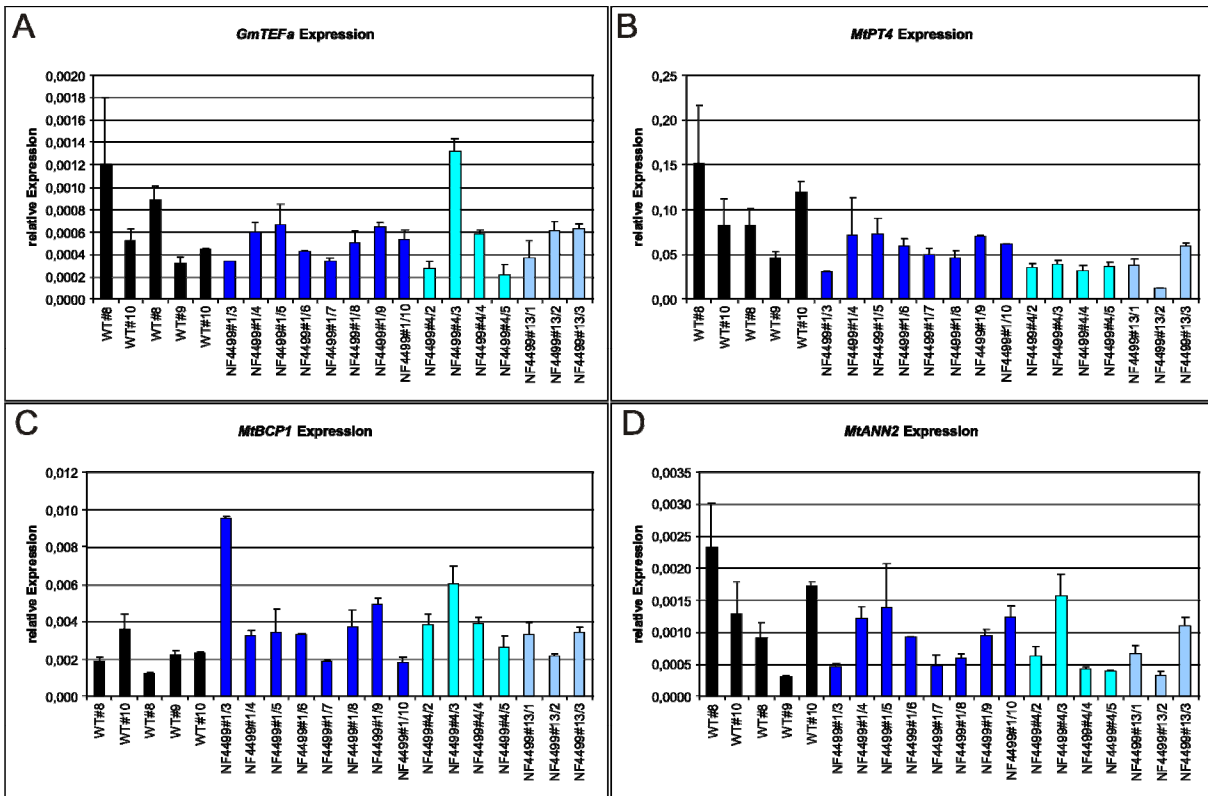


Abbildung C.3: Die relative Expression von *GmTEFα*, *MtPT4*, *MtBCP1* und *MtANN2* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF4499. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A), *MtPT4* (B), *MtBCP1* (C) und *MtANN2* (D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutanten NF4499#1 (dunkelblaue Balken), NF4499#4 (mittelblaue Balken) und NF4499#13 (hellblaue Balken) nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

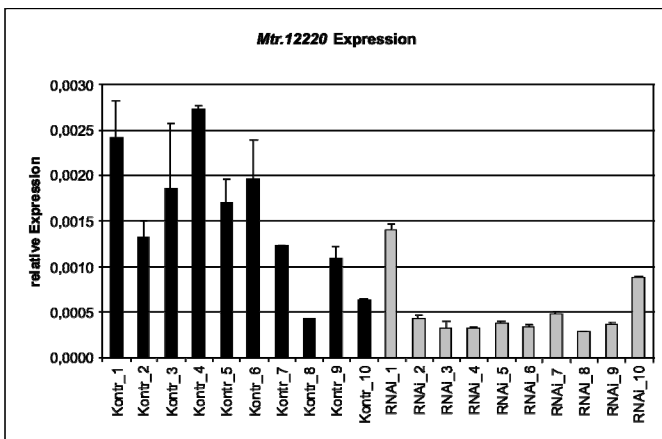
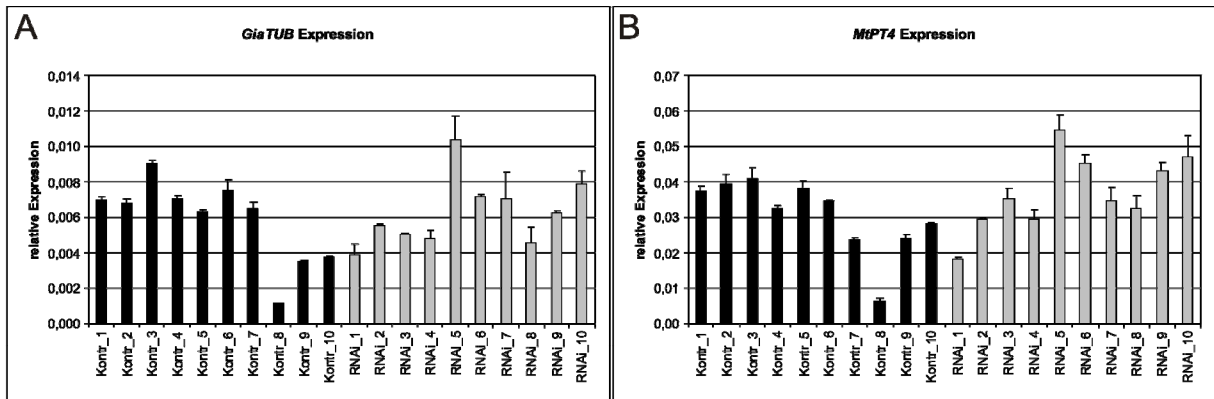


Abbildung C.4: Die relative Expression von *Mtr.12220* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.12220* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.12220* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.12220 (graue Balken) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).



**Abbildung C.5:** Die relative Expression der AM-Markergene *GiaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GiaTUB* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.12220* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.12220 (graue Balken) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

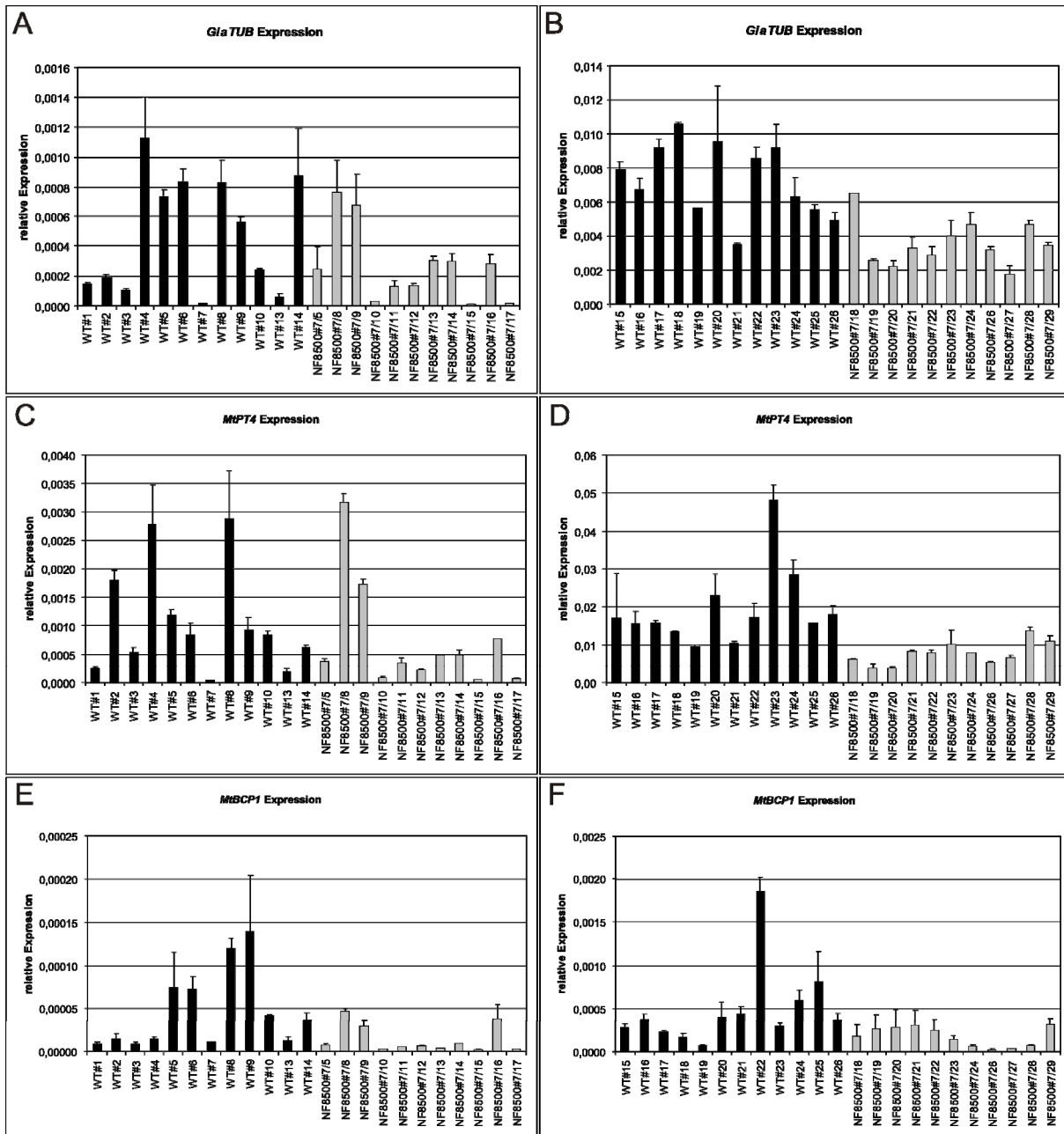
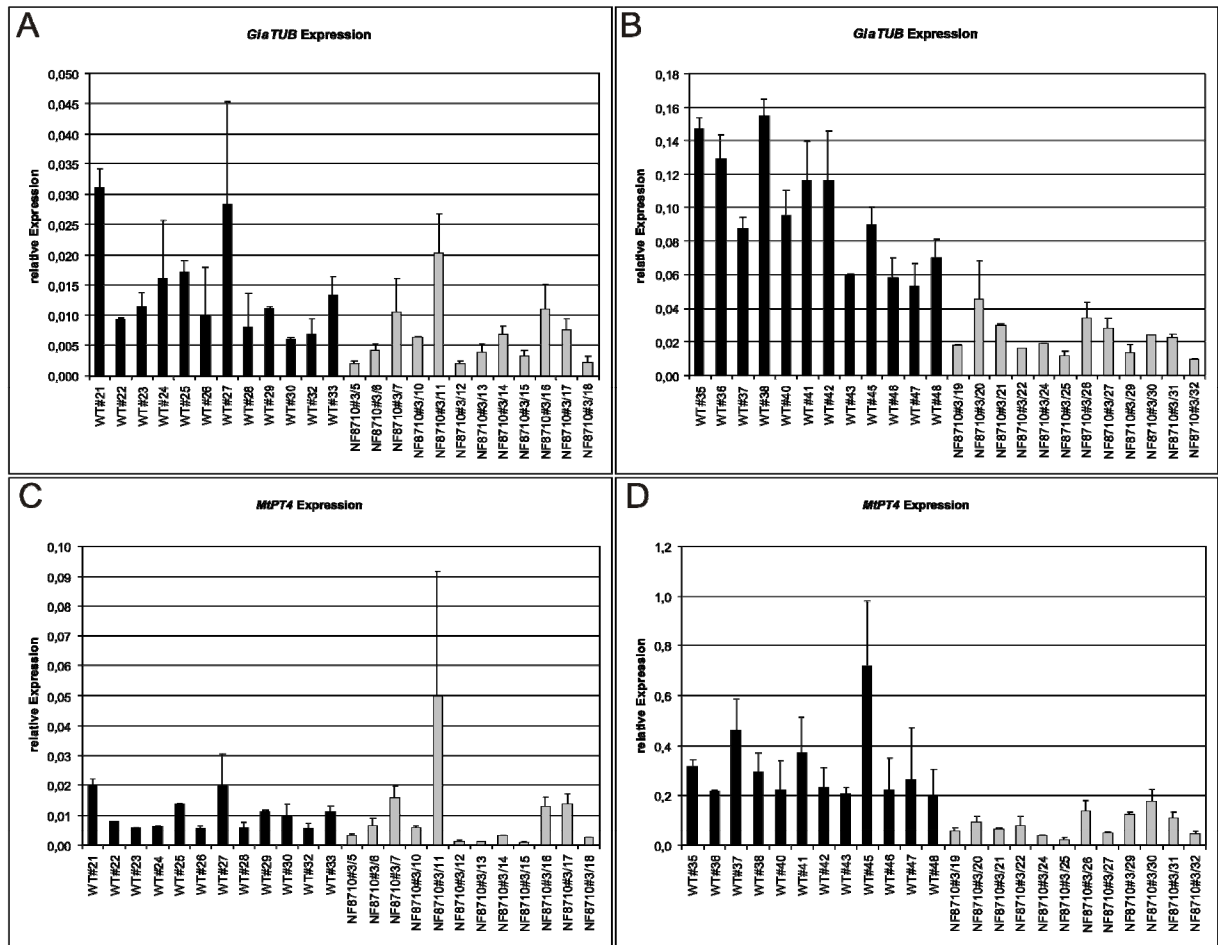
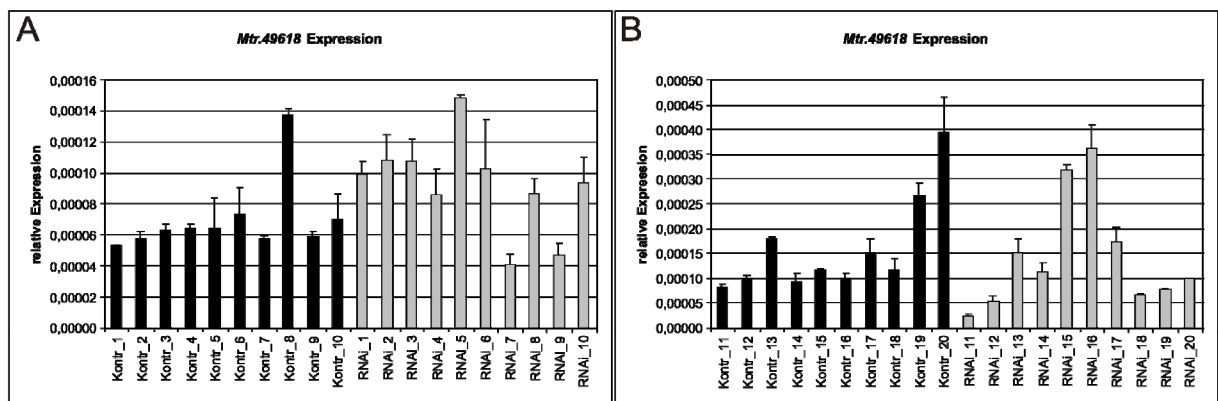


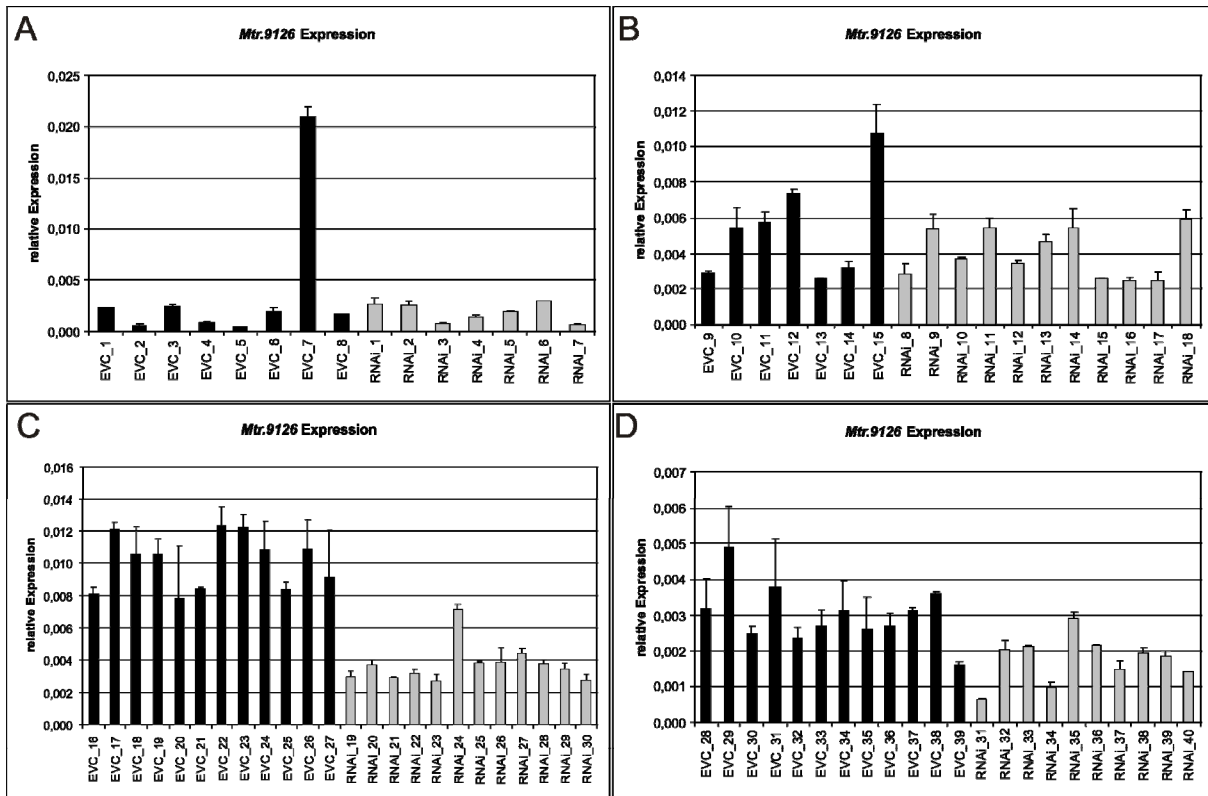
Abbildung C.6: Die relative Expression von *GliaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8500. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GliaTUB* (A und B), *MtPT4* (C und D) und *MtBCP1* (E und F) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF8710#3 (graue Balken) nach 14 (A, C und E) bzw. 28 (B, D und F) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.7:** Die relative Expression von *GliaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF8710. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GliaTUB* (A und B) und *MtPT4* (C und D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF8710#3 (graue Balken) nach 14 (A und C) bzw. 28 (B und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

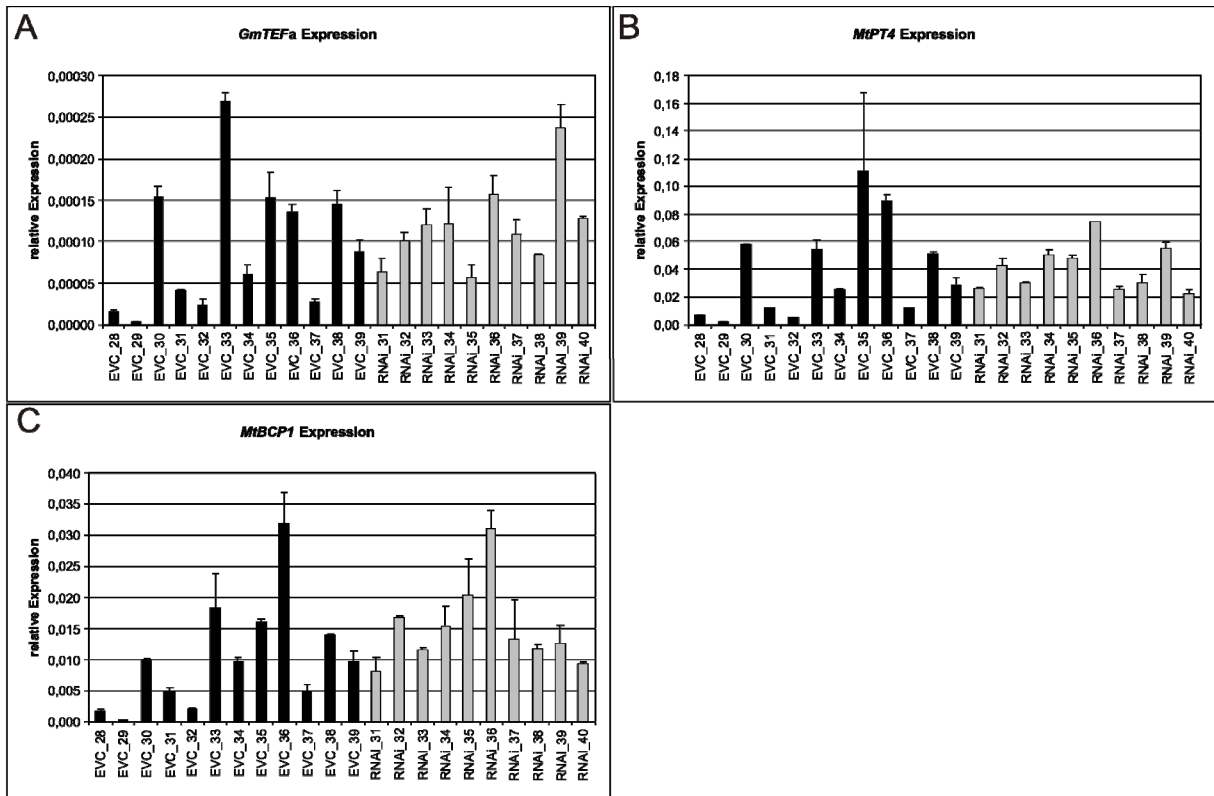


**Abbildung C.8:** Die relative Expression von *Mtr.49618* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.49618* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontrollkonstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.49618* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.49618* (graue Balken) generiert wurden nach 14 (A) bzw. 28 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).



**Abbildung C.9:** Die relative Expression von *Mtr.9126* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.9126* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2: *Mtr.9126* (graue Balken) generiert wurden. Die Anzucht erfolgte wahlweise in Seramis® Substrat (A und B) oder steril auf Schrägagarplatten (C und D), wonach ein Teil der Pflanzen für 21 (D) bzw. 28 Tage (B) mit *G. intraradices* mykorrhiziert wurde, während die übrigen Pflanzen (A und C) ohne Symbiosepartner angezogen wurden. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.





**Abbildung C.10:** Die relative Expression von *GmTEFα*, *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A), *MtPT4* (B) und *MtBCP1* (C) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.9126* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.9126 (graue Balken) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

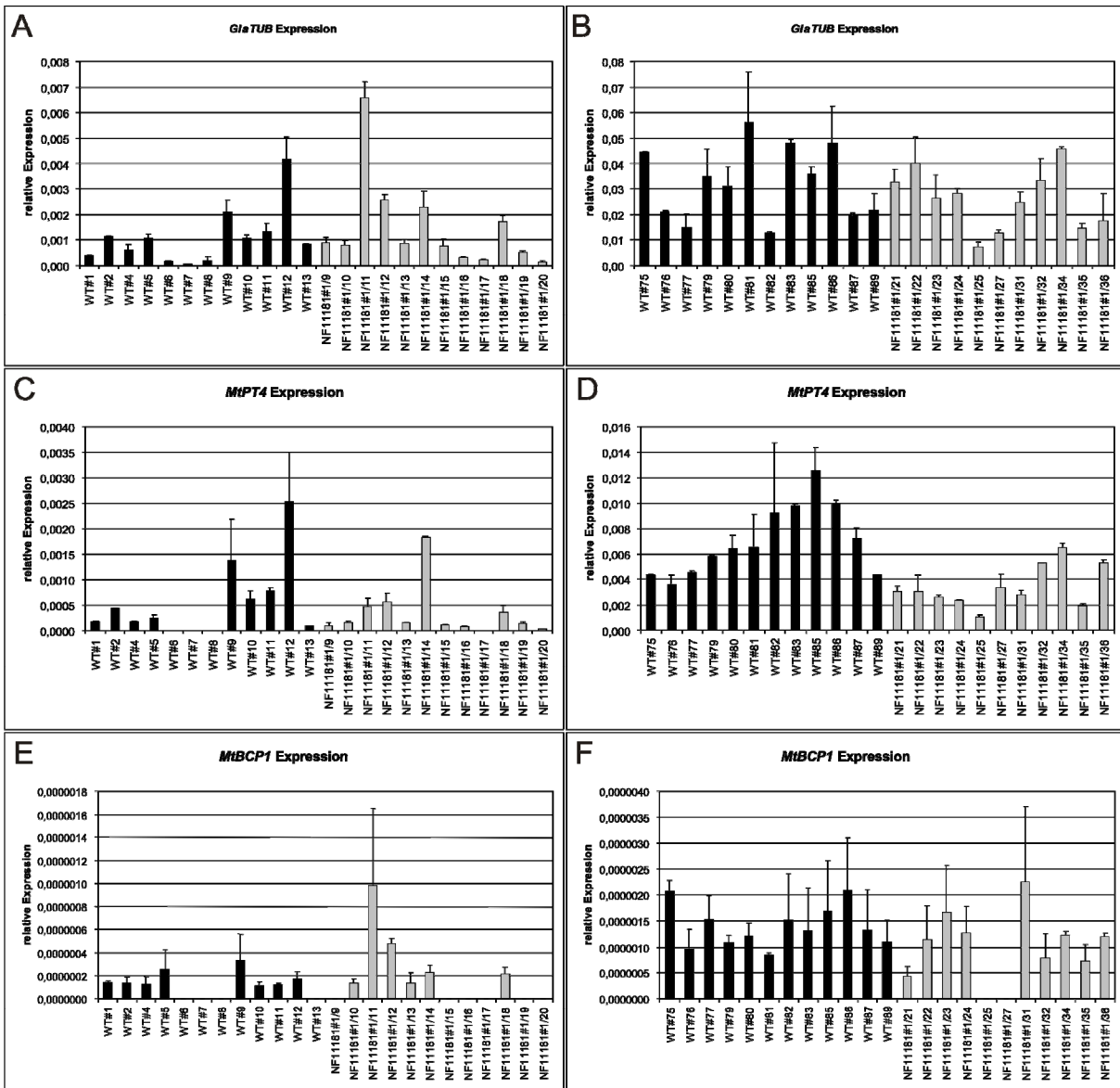
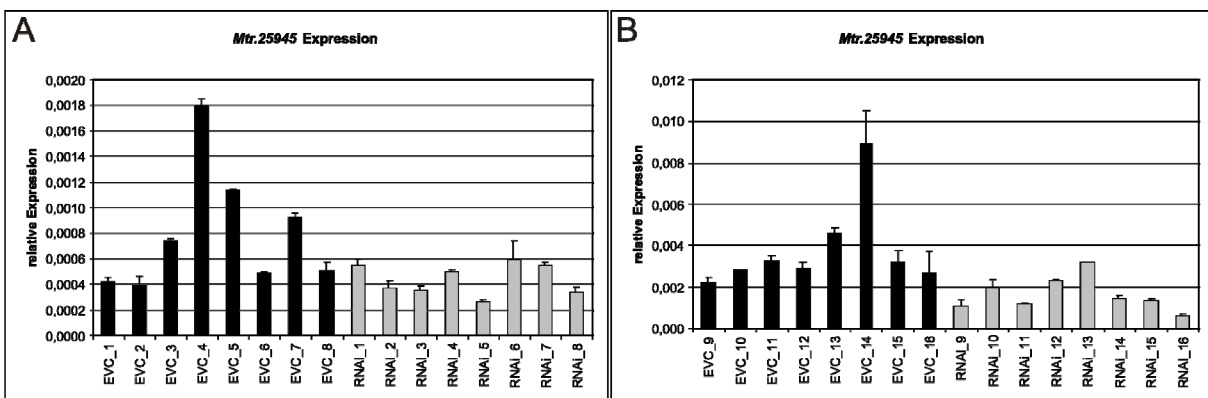
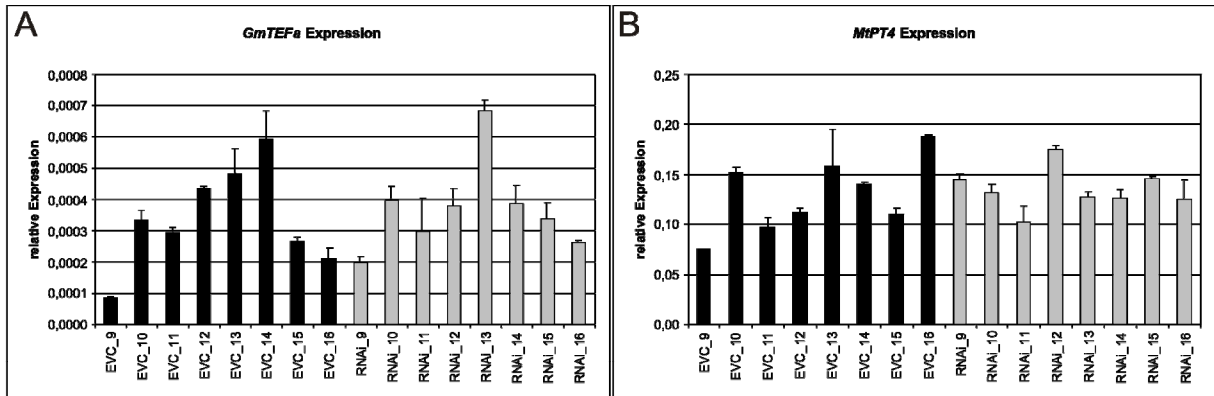


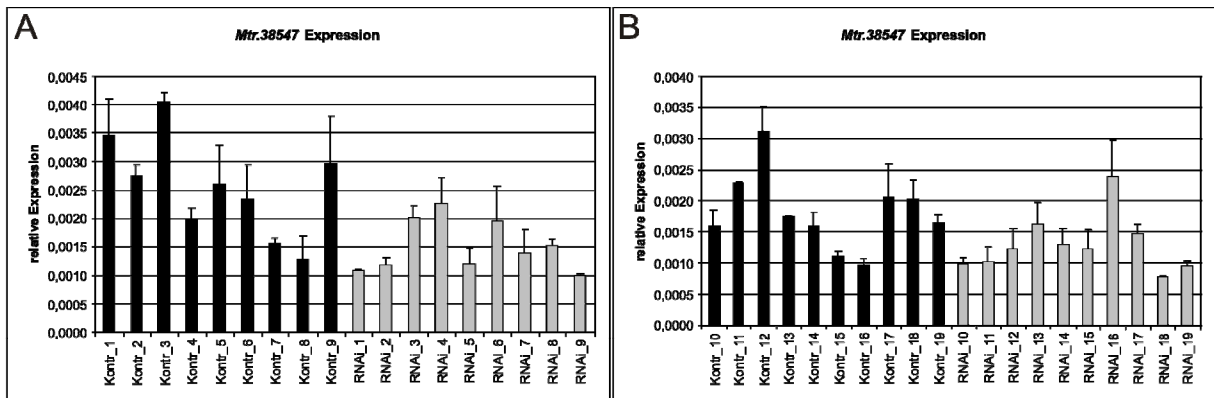
Abbildung C.11: Die relative Expression von *GliaTUB*, *MtPT4* und *MtBCP1* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und *Tnt1*-Insertionsmutanten der Linie NF1181. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GliaTUB* (A und B), *MtPT4* (C und D) und *MtBCP1* (E und F) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der *Tnt1*-Insertionsmutante NF1181#1 (graue Balken) nach 14 (A, C und E) und 28 (B, D und F) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.12:** Die relative Expression von *Mtr.25945* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.25945* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.25945* (graue Balken) generiert wurden nach 0 (A) bzw. 28 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.13:** Die relative Expression von *GmTEFα* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.25945* (graue Balken) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.14:** Die relative Expression von *Mtr.38547* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.38547* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:*GUS* (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.38547* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.38547* (graue Balken) generiert wurden nach 0 (A) bzw. 21 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

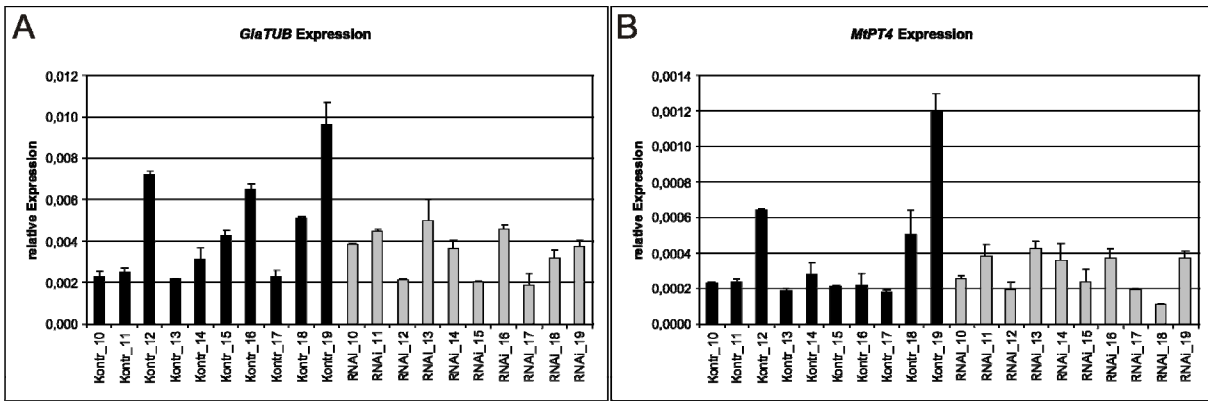


Abbildung C.15: Die relative Expression der AM-Markergene *GliaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GliaTUB* (A) und *MtPT4* (B) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.38547* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.38547 (graue Balken) generiert wurden nach 21 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

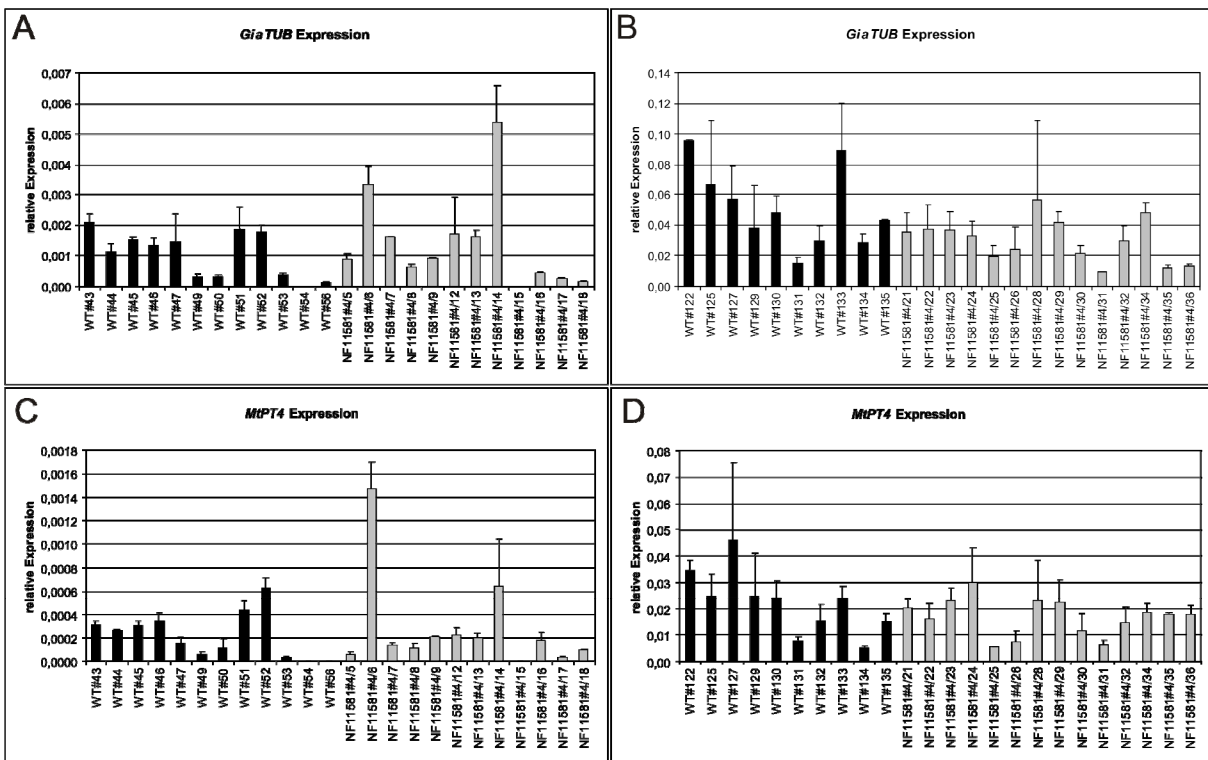
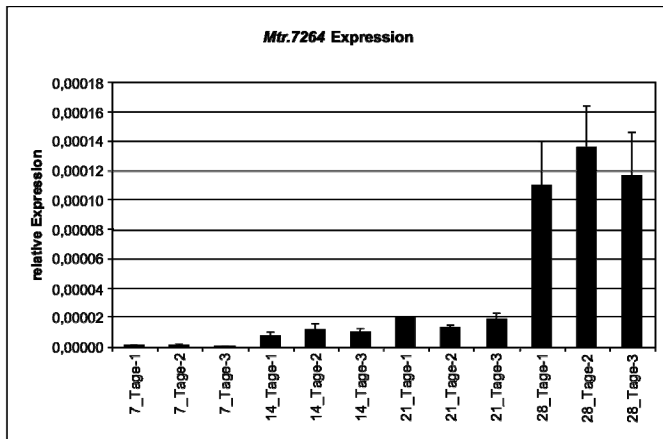
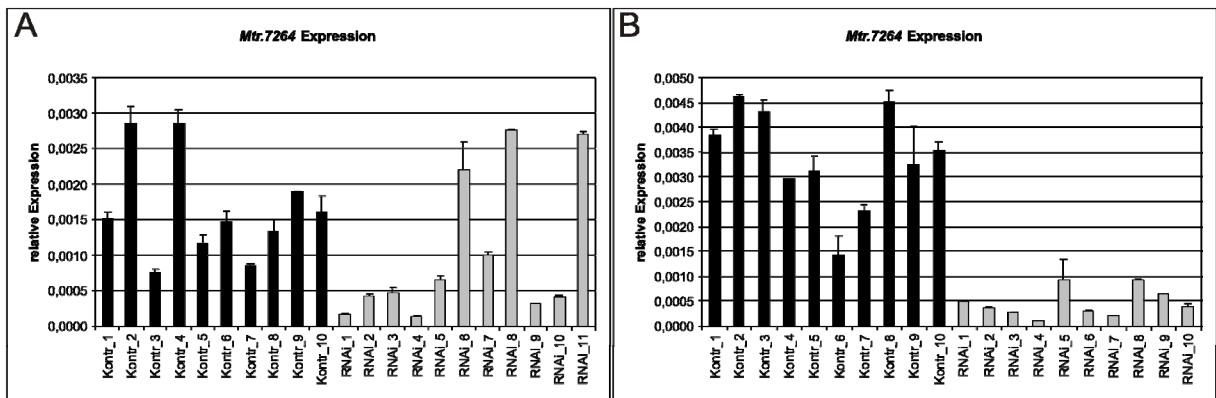


Abbildung C.16: Die relative Expression von *GliaTUB* und *MtPT4* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF11581. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GliaTUB* (A und B) und *MtPT4* (C und D) in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Wurzeln (schwarze Balken) und in Wurzeln der Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutante NF11581#4 (graue Balken) nach 14 (A und C) und 28 (B und D) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.17:** Die relative Expression von *Mtr.7264* in einer Zeitreihe von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.7264* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Anhang zu Abbildung C.18:** Die relative Expression von *Mtr.7264* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.7264* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken) generiert wurden nach 0 (A) bzw. 28 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).

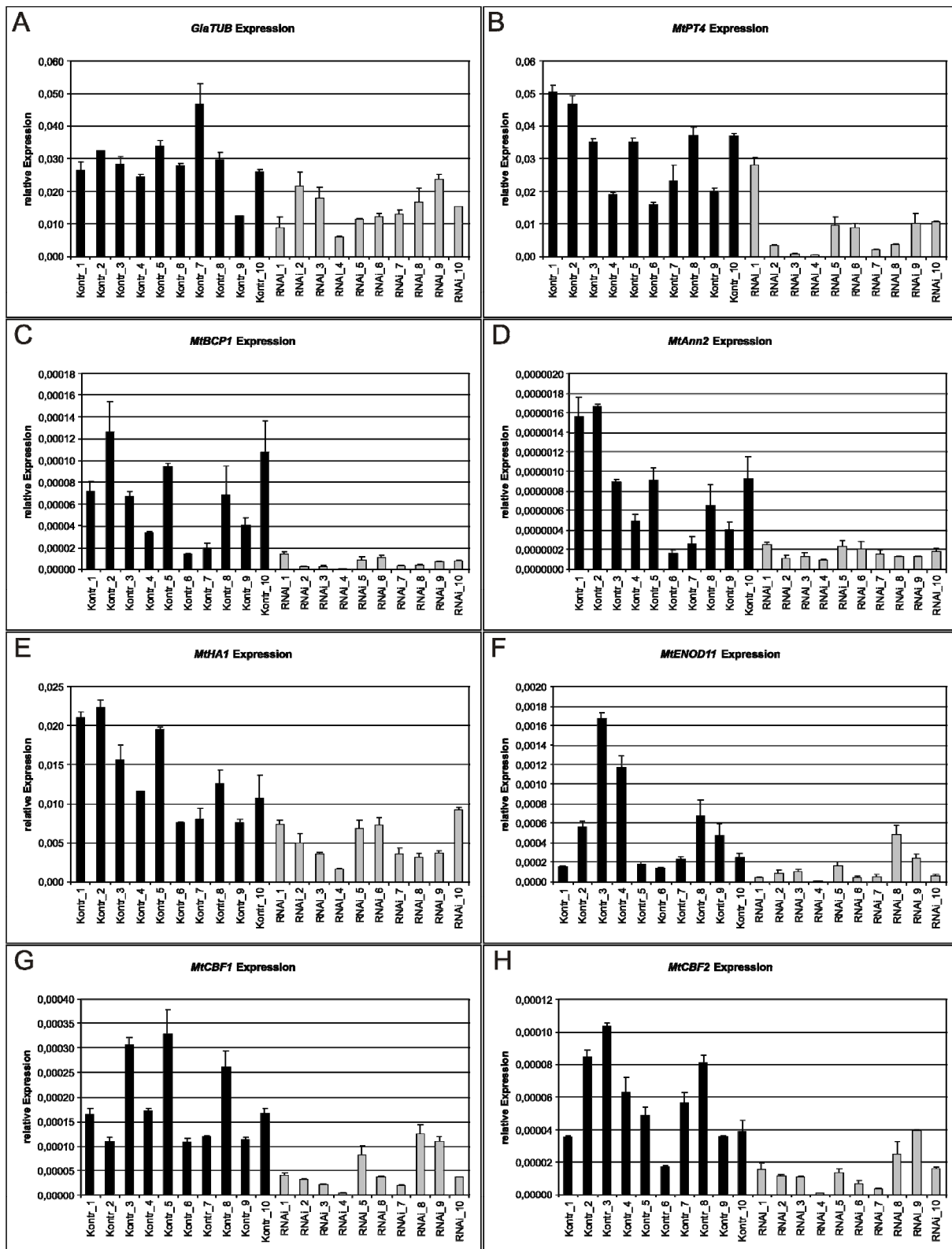
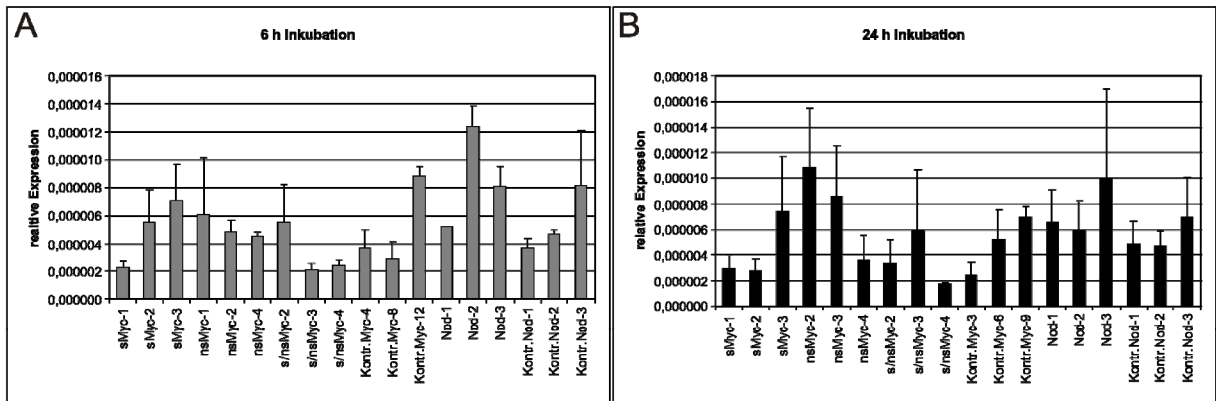
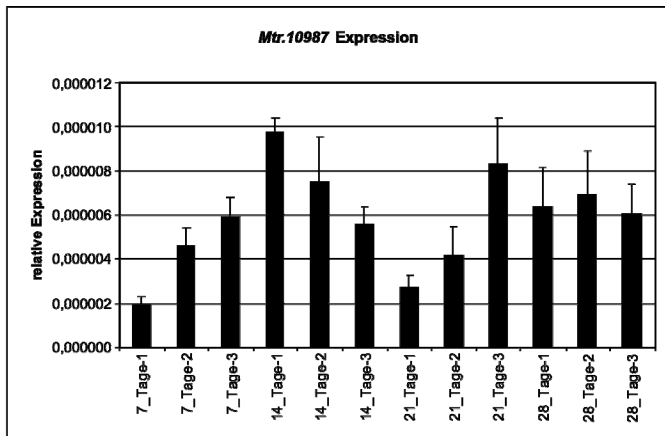


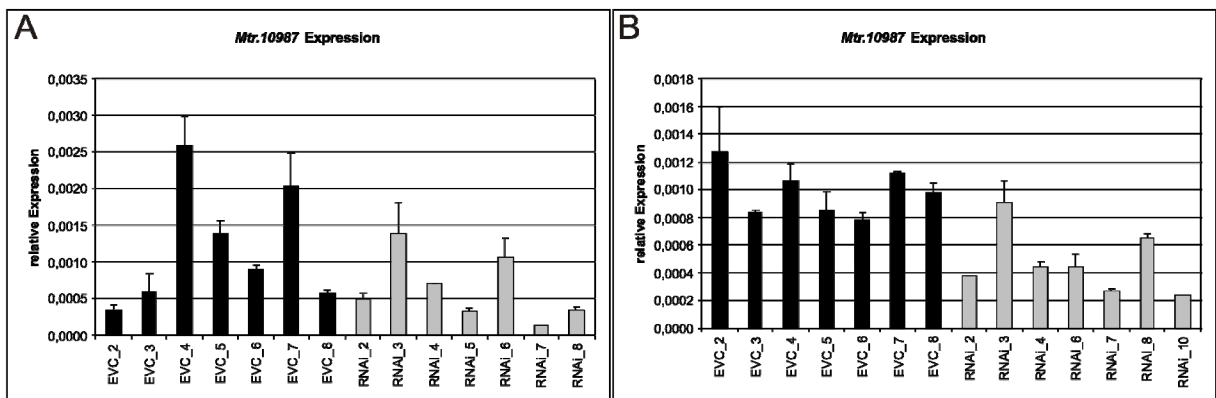
Abbildung C.19: Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real-time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GlaTUB* (A), *MtPT4* (B), *MtBCP1* (C), *MtANN2* (D), *MtHA1* (E), *MtENOD11* (F), *MtCBF1* (G) und *MtCBF2* (H) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (schwarze Balken) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (graue Balken) generiert wurden 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler (Quelle: modifiziert nach Schaepe, 2011).



**Abbildung C.20:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in mit Myc- und Nod-LCOs behandelten *Medicago truncatula* Wurzeln. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* nach einer 6-stündigen (A) und 24-stündigen (B) Behandlung mit  $10^{-8}$  M sMyc-LCOs (sMyc),  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (nsMyc), einer Mischung aus  $10^{-8}$  M sMyc- und  $10^{-7}$  M nsMyc-LCOs (s/nsMyc),  $10^{-8}$  M Nod-LCOs (Nod) sowie entsprechenden Kontrollen (Kontr. Myc und Kontr. Nod). Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.

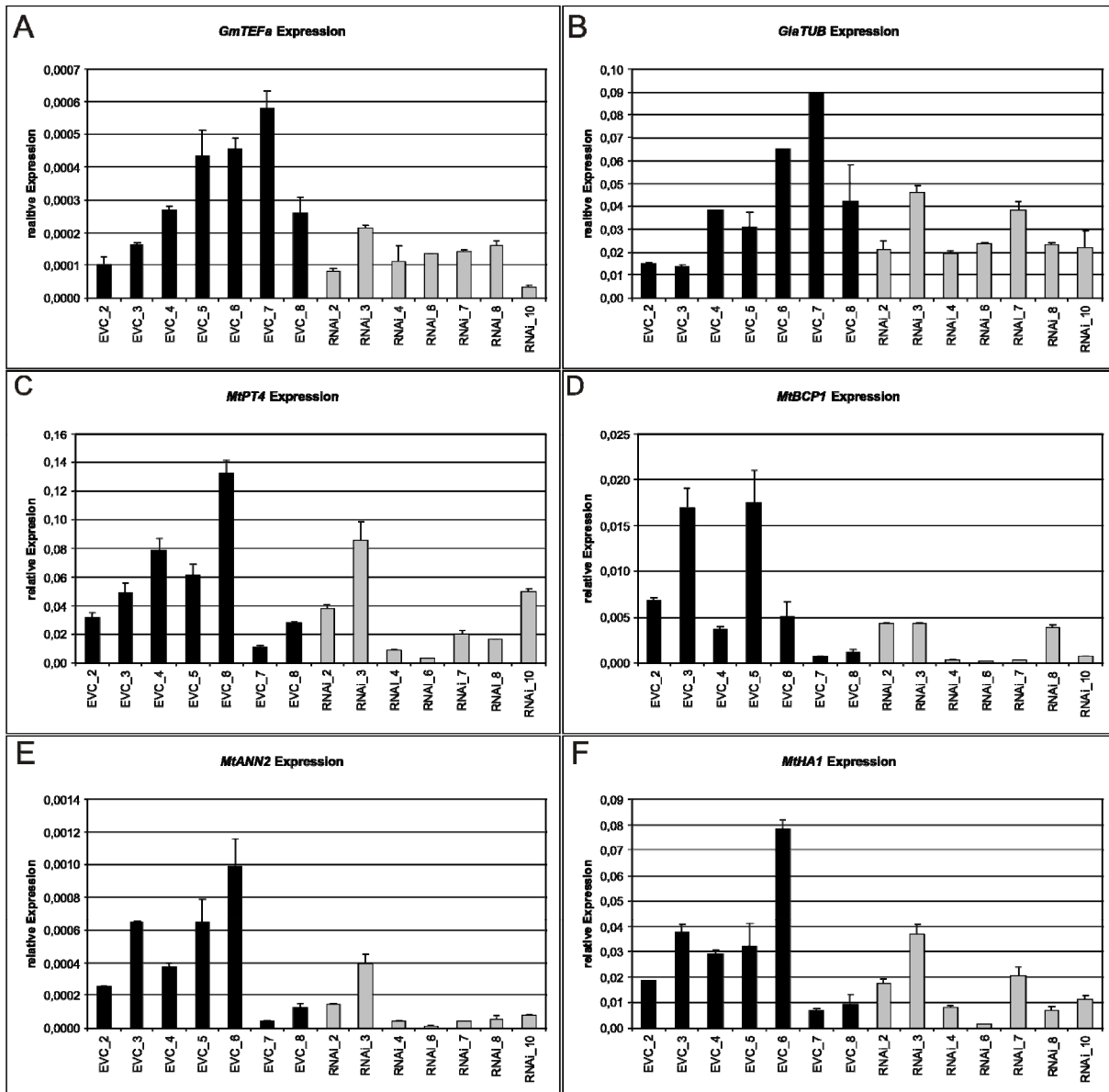


**Abbildung C.21:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in einer Zeitreihe von mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wurzeln. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* in *M. truncatula* Wurzeln nach 7, 14, 21 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je drei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



**Abbildung C.22:** Die relative Expression von *Mtr.10987* in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *Mtr.10987* in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2: *Mtr.10987* (graue Balken: RNAi) generiert wurden nach 0 (A) bzw. 28 (B) Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.





**Abbildung C.23:** Die relative Expression verschiedener AM-Markergene in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*. Dargestellt ist die mittels *real time* RT-PCR gemessene relative Expression von *GmTEFα* (A), *GiaTUB* (B), *MtPT4* (C), *MtBCP1* (D), *MtANN2* (E) und *MtHA1* (F) in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem empty vector control Konstrukt pK7GWIWG2(II) (schwarze Balken: EVC\_2-8) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:*Mtr.10987* (graue Balken: RNAi\_2-10) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Bei den dargestellten relativen Expressionen handelt es sich um Mittelwerte aus je zwei technischen Replikaten pro Probe. Die dargestellten Fehlerbalken repräsentieren den entsprechenden Standardfehler.



## Anhang D: Mykorrhizierungsdaten

### **Tabelle D.1 (Seite 234 links): Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF4499.**

Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen und in Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF4499#1, NF4499#4 und NF4499#13 nach 35 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

### **Tabelle D.2 (Seite 234 rechts): Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8500.**

Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen und in Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF8500#7 nach 14 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

### **Tabelle D.3 (Seite 235 links): Die Kolonisationsrate und die Anteile verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten *Medicago truncatula* Wildtyp-Pflanzen und Tnt1-Insertionsmutanten der Linie NF8710.**

Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in *M. truncatula* R108 Wildtyp-Pflanzen und in Nachkommen der Tnt1-Insertionsmutanten NF8710#3 nach 14 und 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp-Kontrollen und Insertionsmutanten sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

### **Tabelle D.4 (Seite 235 rechts): Das Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierter Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.**

Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (EVC) sowie dem gegen *Mtr.25945* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.25945 (RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Probe	EH	IH	EH/IH	EH/IH/A/V	EH/IH/A	IH/A	IH/A/V	EH/IH/V	IH/V	nicht mykorrhiziert
WT#1+2	73	2	35	58	54	13	12	14	1	41
WT#3+4	45	0	33	101	68	14	6	4	0	45
WT#5+6	89	1	29	35	34	1	1	9	0	105
WT#7	52	0	32	95	61	5	0	28	1	31
WT#8	89	0	12	49	66	11	10	15	1	56
WT#9	21	5	24	44	108	28	7	10	1	52
WT#10	74	1	49	55	55	12	2	20	0	56
NF4499#1/5	103	2	16	47	45	16	6	5	2	58
NF4499#1/6	103	5	16	44	50	10	7	20	1	51
NF4499#1/9	63	2	2	64	54	8	5	17	0	87
NF4499#1/10	96	1	16	34	31	14	6	19	2	81
NF4499#4/3	102	1	12	65	37	14	12	13	3	41
NF4499#4/4	51	2	15	91	74	19	16	8	0	32
NF4499#13/1	93	0	21	50	51	10	1	16	1	65
t-Test WT vs. NF4499	0,0778*	0,5390	0,0048***	0,6250	0,1624	0,7815	0,4174	0,9392	0,1517	0,7306

Probe	EH	IH	EH/IH	EH/IH/A/V	EH/IH/A	IH/A	IH/A/V	EH/IH/V	IH/V	nicht myk.
<b>14 Tage Mykorrhizierung:</b>										
WT#1-7	20	2	9	7	3	4	3	0	0	220
WT#8-14	15	2	7	6	8	10	1	0	0	183
NF8500#7/6-10	45	1	15	0	6	5	1	1	0	174
NF8500#7/12-16	43	0	20	0	2	1	0	0	0	186
t-Test WT vs. NF8500	0,0102**	0,0955*	0,0718*	0,0059***	0,6855	0,3828	0,3118	0,4226	1,0000	0,3841
<b>28 Tage Mykorrhizierung:</b>										
WT#15-27	83	2	19	19	26	5	0	10	0	136
WT#18-20	74	1	18	28	28	5	0	8	0	138
WT#21-23	71	1	21	28	25	6	0	11	0	137
WT#24-26	76	1	19	25	26	5	0	10	0	138
NF8500#7/18-20	60	0	26	22	46	5	0	4	0	137
NF8500#7/21-23	76	1	18	12	43	4	1	1	0	144
NF8500#7/24-27	61	2	24	12	44	14	0	0	0	143
NF8500#7/28-30	68	1	25	7	48	8	0	1	0	142
t-Test WT vs. NF8500	0,0733*	0,6202	0,0804*	0,0212**	0,0000***	0,3118	0,3559	0,0003***	1,0000	0,0400**

Probe	EH	IH	EH/IH	EH/IH/A/V	EH/IH/A	IH/A	IH/A/V	EH/IH/V	IH/V	nicht myk.
<b>14 Tage Mykorrhizierung:</b>										
WT#21-26	65	5	67	25	23	5	2	8	0	100
WT#27-33	63	1	52	30	18	7	1	6	0	122
NF8710#3/5-8,10	53	0	34	10	26	6	2	3	0	166
NF8710#3/11,12,16,17	64	3	24	12	22	2	0	6	0	177
t-Test WT vs. NF8710	0,4289	0,6094	0,0773*	0,0256**	0,3884	0,4655	0,6985	0,2999	1,0000	0,0389**
<b>28 Tage Mykorrhizierung:</b>										
WT#35-41	66	0	25	114	61	2	4	13	0	15
WT#42-48	75	3	22	102	58	7	3	14	0	16
NF8710#3/19-22	67	1	49	28	81	8	0	9	0	57
NF8710#3/26-28,30,32	67	5	53	30	90	8	0	3	0	44
t-Test WT vs. NF8710	0,5181	0,6094	0,0082***	0,0059***	0,0317**	0,2965	0,0198**	0,1325	1,0000	0,0330**
<b>Probe</b>										
EVC Wurzel 1-3	28	2	27	119	60	9	9	11	1	34
EVC Wurzel 4-6	29	0	21	140	57	8	2	14	0	29
RNAi Wurzel 1-3	27	0	36	125	50	7	6	15	1	33
RNAi Wurzel 4-6	20	2	26	111	90	8	2	8	0	33
t-Test EVC vs. RNAi	0,2929	1,0000	0,3528	0,4583	0,6243	0,2929	0,7455	0,8174	1,0000	0,6094

**Tabelle D.5: Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Aufgelistet ist die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge (in mm) von Infektionseinheiten in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (RNAi) generiert wurden nach 7 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Am Ende der Tabelle sind zudem die jeweiligen Mittelwerte für Kontroll- und RNAi-Wurzeln angegeben.

Probe	Kontaktstellen mit externen Hyphen	Infektionseinheiten	Länge der Infektionseinheiten [mm]
Kontr_1	3	0	
Kontr_2	0	0	
Kontr_3	7	2	2/1
Kontr_4	2	0	
Kontr_5	24	13	0,1/1/0,5/0,5/0,2/7/1,5/1/1/2/8/0,5/5
Kontr_6	17	6	2,5/1/1,5/2/1/2,5
Kontr_7	29	8	0,1/0,1/1/0,1/0,1/0,1/0,1/5
Kontr_8	22	3	0,1/0,1/4,5
Kontr_9	0	1	0,2
Kontr_10	7	1	0,1
Kontr_11	26	9	2/1/2/0,2/0,1/7/0,1/0,1/0,1
Kontr_12	16	7	0,1/1/3,5/3/5/1/4
Kontr_13	15	9	2/6/4/3/4/2/0,5/3/1,5
Kontr_14	20	4	2/0,2/1,5/1
Kontr_15	18	8	2/4/5/4/0,5/5/2/5
Kontr_16	2	3	4/4/2
Kontr_17	15	5	0,1/4/3/0,1/1,5
Kontr_18	9	2	2/0,1
Kontr_19	6	3	0,2/3/1,5
Kontr_20	12	2	2/2,5
RNAi_1	0	0	
RNAi_2	1	0	
RNAi_3	11	0	
RNAi_4	6	4	0,5/0,1/0,1/2,5
RNAi_5	18	6	0,1/1/5/3/1,5/0,5
RNAi_6	10	4	2,5/1/0,2/6
RNAi_7	9	0	
RNAi_8	12	0	
RNAi_9	27	14	1/2/0,5/0,2/0,5/1/0,5/0,1/1/0,5/2/0,2/0,1/0,5
RNAi_10	13	14	8/3/0,2/3/15/3/2/5/2/2/5/6/5/0,1
RNAi_11	23	7	2,5/1/2/1/0,5/0,1/10
RNAi_12	14	22	0,1/0,1/0,1/0,1/0,1/0,1/0,1/5/10/5/1/3/4/2/1/0,1/0,2/1/3/4/5/2
RNAi_13	0	0	
RNAi_14	7	2	2/4
RNAi_15	24	5	0,5/1/0,4/1/3
RNAi_16	12	7	3/0,5/0,2/2/4/8/2,5
RNAi_17	12	2	3,5/5
RNAi_18	9	6	1/10/5/5/4/3
RNAi_19	5	4	5/7/2,5/0,1
RNAi_20	11	7	0,2/0,5/3/4/6/2/4
Mittelwert Kontr.	12,50	4,30	2,00
Mittelwert RNAi	11,20	5,20	2,50
t-Test Kontr. vs. RNAi	0,62	0,56	0,14

**Tabelle D.6 (Seite 238 links): Das Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierter Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem Kontroll-Konstrukt pK7GWIWG2:GUS (Kontr.) sowie dem gegen *Mtr.7264* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:MtGras1 (RNAi) generiert wurden nach 14 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

**Tabelle D.7 (Seite 238 rechts): Das Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Aufgelistet ist das mittels der *gridline intersections* Methode bestimmte Auftreten verschiedener AM-Pilzstrukturen in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.10987 (RNAi) generiert wurden nach 28 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices* und anschließender Färbung mit WGA-Alexa Fluor® 488. Bei den ausgezählten Pilzstrukturen wurde zwischen einer Kolonisation mit externen Hyphen (EH), mit internen Hyphen (IH), mit externen und internen Hyphen (EH/IH), mit externen und internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (EH/IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Arbuskeln (EH/IH/A), mit internen Hyphen und Arbuskeln (IH/A), mit internen Hyphen, Arbuskeln und Vesikeln (IH/A/V), mit externen und internen Hyphen und Vesikeln (EH/IH/V), mit internen Hyphen und Vesikeln (IH/V), sowie nicht mykorrhizierten Wurzeln unterschieden. Signifikante Unterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

**Tabelle D.8 (Seite 239): Die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge von Infektionseinheiten in mit *Glomus intraradices* mykorrhizierten Kontroll- und RNAi-Wurzeln von *Medicago truncatula*.** Aufgelistet ist die Anzahl der Kontaktstellen mit externen Hyphen sowie die Anzahl und Länge (in mm) von Infektionseinheiten in unabhängigen, transgenen *M. truncatula* Wurzeln die mit dem *empty vector control* Konstrukt pK7GWIWG2(II) (EVC) sowie dem gegen *Mtr.10987* gerichteten RNAi-Konstrukt pK7GWIWG2:Mtr.10987 (RNAi) generiert wurden nach 7 Tagen Mykorrhizierung mit *G. intraradices*. Am Ende der Tabelle sind zudem die jeweiligen Mittelwerte für EVC- und RNAi-Wurzeln angegeben. Signifikante Unterschiede zwischen EVC- und RNAi-Wurzeln sind folgendermaßen gekennzeichnet: \*  $p \leq 0,1$ ; \*\*  $p \leq 0,05$  und \*\*\*  $p \leq 0,01$ .

Probe	EH	IH	EH/IH	EH/IH/A/V	EH/IH/A	IH/A	IH/A/V	EH/IH/V	IH/V	nicht mykorrhiziert
Kontr. Wurzel 1-7	58	6	44	12	7	6	3	9	0	255
Kontr. Wurzel 8-15	81	5	33	6	11	2	1	5	0	268
RNAi Wurzel 1-7	72	3	26	14	10	2	0	5	0	268
RNAi-Wurzel 8-15	66	3	12	28	4	3	3	2	0	279
t-Test Kontr. vs. RNAi	0,9703	0,0377**	0,1599	0,2558	0,6349	0,5425	0,8075	0,2965	1,0000	0,2941

Probe	EH	IH	EH/IH	EH/IH/A/V	EH/IH/A	IH/A	IH/A/V	EH/IH/V	IH/V	nicht mykorrhiziert
EVC Wurzel 1-3	25	4	43	111	61	6	2	20	2	26
EVC Wurzel 4-6	26	3	47	89	71	10	2	11	0	41
RNAi Wurzel 1-3	18	5	55	83	39	6	3	69	2	23
RNAi Wurzel 4-6	27	4	72	75	32	3	0	57	1	29
t-Test EVC vs. RNAi	0,5757	0,2929	0,1683	0,2146	0,0378**	0,2965	0,7706	0,0240**	0,6985	0,4512

Probe	Kontaktstellen mit externen Hyphen	Infektions-einheiten	Länge Infektionseinheitn [mm]
EVC_1	2	2	2/1
EVC_2	7	1	2
EVC_3	0	0	
EVC_4	0	0	
EVC_5	7	1	1
EVC_6	1	0	
EVC_8	4	2	0,5/1
EVC_9	3	14	1/1/2/1/1/1/3/0,5/1/1/1/2/1,5/0,5
EVC_10	10	1	10
EVC_11	2	1	0,5
EVC_12	5	3	1/1/2
EVC_13	0	1	1,5
EVC_14	9	9	0,5/2,5/1/1/1/1/0,5/2
EVC_15	8	9	0,5/3/3/0,5/0,5/4/3/5/6
EVC_16	6	5	1/4/0,5/1/2
EVC_17	8	6	3/2/1,5/2/3/2
EVC_18	4	2	5/1,5
EVC_19	6	2	2/0,2
EVC_20	0	0	
EVC_21	3	1	6
EVC_22	5	0	
EVC_23	16	3	0,2/2/1
EVC_24	0	0	
EVC_25	1	2	0,2/2
EVC_26	3	3	2/10/1,5
EVC_27	0	1	2,5
EVC_28	5	11	1,5/1/1/0,5/0,2/3/1/1/2/1/0,5
RNAi_1	0	0	
RNAi_2	0	0	
RNAi_3	0	0	
RNAi_4	4	1	1
RNAi_5	0	1	0,2
RNAi_6	0	0	
RNAi_7	0	0	
RNAi_8	12	9	15/1/0,5/10/10/1/1/1,5
RNAi_9	1	0	
RNAi_10	6	5	1/1/0,5/1/1,5
RNAi_11	0	0	
RNAi_12	2	1	2
RNAi_13	0	2	10/5
RNAi_14	0	0	
RNAi_15	0	0	
RNAi_16	0	0	
RNAi_17	0	1	2
RNAi_18	7	0	
RNAi_19	5	4	2/5/0,5/3
RNAi_20	0	1	3
RNAi_21	3	3	4/2/0,2
RNAi_22	3	2	1/2
RNAi_23	1	0	
RNAi_24	1	2	2/1
RNAi_25	0	0	
Mittelwert EVC	4,26	2,96	1,85
Mittelwert RNAi	1,80	1,28	2,87
t-Test EVC vs. RNAi	0,01***	0,05**	0,05**





## ERKLÄRUNG ZUR DISSERTATION

gemäß §6(1) der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover für die Promotion zum Dr. rer. nat.

Hierdurch erkläre ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

Analyse der Funktion von Signaltransduktions-assoziierten Genen  
in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose von *Medicago truncatula*

selbständig verfasst und die benutzten Hilfsmittel und Quellen sowie gegebenenfalls die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe. Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

---

(Lisa F. Czaja)