

Regulation der Photosynthese in *Solanum lycopersicum*
durch die symbiotische Interaktion mit dem arbuskulären
Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis*

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. Jennifer Göing
geboren am 05.09.1986 in Hannover

2016

Referent: Dr. Sascha Offermann
Korreferent: Prof. Dr. Georg Guggenberger
Tag der Promotion: 17.10.2016

Summary

Up to 80 % of all higher plant species are able to form a symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi, which makes it the most popular symbiosis in the world. Arbuscular mycorrhiza deliver mineral nutrients to the plants and in return obtain photoassimilates produced by photosynthesis. Previous analyses showed that plants having established an arbuscular mycorrhizal symbiosis have higher photosynthesis and increased biomass. However, the mechanism of regulation is still unknown.

In the first part of this work, photosynthetic parameters and the metabolome of mycorrhized tomato plants (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) were analyzed by gas exchange measurements and GC-MS analysis, respectively. Plants mycorrhized with the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* showed both an increased photosynthesis and transpiration compared to non-mycorrhized plants while both growth and leaf phosphorus content were unchanged. Metabolic analyses verified the increased photosynthetic performance as indicated by enhanced leaf sucrose, glucose and fructose amounts. Increased sucrose amounts were also observed for roots. Additionally, roots of mycorrhized plants showed an accumulation of trehalose.

In the second part, sugar transport from source to sink organs was analyzed by $^{13}\text{CO}_2$ -labeling. Mycorrhized plants showed an increased transport of sucrose from leaves to roots, thus, making sugars available for the fungus.

In the third part of this work, changes in the leaf transcriptome of tomato plants in symbiosis with *Rhizophagus irregularis* were analyzed by RNA-sequencing. The analysis showed greatest variation in the GO-group of protein metabolism as a consequence of the established symbiosis. Genes that were classified as members of the group of protein degradation were higher expressed in leaves of mycorrhized plants. Furthermore, the data showed the influence of arbuscular mycorrhiza symbiosis on stress-dependent gene expression.

We conclude that mycorrhized tomato plants showed both an improved water supply and a reduced stress level. Higher CO_2 fixation rates and, consequently, higher photosynthesis was assumed to be caused by reduced stress and better water supply by the fungus. In summary, this study provides a fully and complete analysis of a leaf during an established arbuscular mycorrhizal symbiosis and reveals new findings about the role of arbuscular mycorrhizal fungi in the regulation of photosynthesis and carbon metabolism in tomato plants.

Keywords: photosynthesis, arbuscular mycorrhiza, *Solanum lycopersicum*

Zusammenfassung

Bis zu 80 % aller Landpflanzen sind in der Lage eine Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen auszubilden. Im Allgemeinen verbessert der Pilz die Versorgung der Pflanze mit Mineralstoffen, im Gegenzug liefert die Pflanze durch die Photosynthese fixierten Kohlenstoff an den Pilz. Untersuchungen zeigten unter anderem eine erhöhte Photosynthese und Biomassesteigerung durch die Mykorrhizierung. Der Mechanismus dieser Regulation ist jedoch völlig unklar.

Im ersten Teil der Arbeit wurden mit Hilfe von Gaswechselfmessungen und GC-MS Analysen photosynthetische Parameter und das Metabolom von Tomatenpflanzen (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) während der Mykorrhiza-Symbiose untersucht. Pflanzen, die mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* mykorrhiziert wurden, zeigten eine erhöhte Photosynthese und Transpiration bei gleichem Wachstum und Sprossphosphatgehalt. Metabolitanalysen bestätigten die erhöhte Photosynthese durch Anstieg von Saccharose, Glucose und Fructose im Blatt. Für die Wurzel konnte ebenfalls ein erhöhter Saccharosegehalt quantifiziert werden. Zusätzlich konnte die spezifische Akkumulation von Trehalose in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen gezeigt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit $^{13}\text{CO}_2$ Markierungsexperimenten der Transport zwischen produzierenden und verbrauchenden Gewebe analysiert. Hierbei zeigten mykorrhizierte Pflanzen einen erhöhten Transport von Saccharose vom Blatt in die Wurzel. In der Wurzel mykorrhizierter Pflanzen wird der Zucker vom Pilz für den eigenen Zuckermetabolismus verwendet.

Im dritten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe der RNA-Sequenzierung die Veränderung des Blatttranskriptoms während der Mykorrhiza-Symbiose untersucht. Die Analysen von Blättern mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen zeigten die größte Regulation in der GO-Gruppe des Proteinmetabolismus. Hierbei waren Gene, die der Proteindegradation zugeordnet werden konnten, in Blättern mykorrhizierten Pflanzen stärker exprimiert. Darüber hinaus deuten die Transkriptomdaten auf einen Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die stressabhängige Expression von Genen hin.

Wir kommen zu dem Schluss, dass Tomatenpflanzen in der Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen eine verbesserte Wasserversorgung und ein geringeres Stresslevel zeigen. Durch reduzierten Stress sowie die verbesserte Wasserversorgung sind die Pflanzen in der Lage, mehr CO_2 zu fixieren und demzufolge eine höhere Photosynthese zu leisten. Zusammenfassend bietet die Arbeit durch die umfassende und komplette Analyse des Blattes mykorrhizierter Pflanzen neue Erkenntnisse über die Rolle der arbuskulären Mykorrhizapilze in der Regulation der Photosynthese und des Kohlenstoffmetabolismus in Tomate.

Schlagworte: Photosynthese, arbuskuläre Mykorrhiza, *Solanum lycopersicum*

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
I. Einleitung	3
I.1 Lichtabhängiger Kohlenhydratmetabolismus in Pflanzen (Photosynthese).....	3
I.2 Regulation der Photosynthese	4
I.3 Charakteristika der Mykorrhizapilze.....	6
I.4 Zuckermetabolismus	9
I.4.1 Zuckermetabolismus in Pflanzen	9
I.4.2 Zuckermetabolismus in arbuskulären Mykorrhizapilzen	10
I.5 Regulation der Photosynthese durch arbuskuläre Mykorrhizapilze	11
I.5.1 Regulation durch Nährstoffe	12
I.5.2 Regulation durch Wasser.....	12
I.5.3 Regulation durch erhöhte Kohlenstoffnachfrage	14
I.5.4 Regulation durch Signalmoleküle und Phytohormone	14
I.6 Ziel der Arbeit.....	16
II. Material und Methoden.....	17
II.1 Material	17
II.1.1 Allgemein gebräuchliche Chemikalien und Verbrauchsmaterial	17
II.1.2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
II.1.3 Apparaturen, Geräte und Zubehör.....	18
II.1.4 Software und Internetprogramme	19
II.1.5 Reaktionskits.....	20
II.1.6 Enzyme	20
II.1.7 Größenstandards	20
II.1.8 Häufig verwendete Puffer, Medien und Lösungen	20
II.1.9 Verwendete Oligonukleotide.....	22
II.2 Methoden	24
II.2.1 Pflanzenanzucht.....	24
II.2.1.1 Sterilisation und Anzucht von <i>Solanum lycopersicum</i>	24
II.2.1.2 Pflanzenbehandlung	24

INHALTSVERZEICHNIS

II.2.2	Physiologische Messungen	25
II.2.2.1	Gaswechselfmessungen	25
II.2.2.2	Aufnahme der Wachstumsparameter	25
II.2.2.3	Bestimmung der Bindungseigenschaften des Substrats	25
II.2.2.4	Elementaranalyse	26
II.2.2.5	Quantifizierung der Mykorrhizierung	26
II.2.3	Molekularbiologische Methoden	27
II.2.3.1	Extraktion der Gesamt-RNA	27
II.2.3.2	Aufbereitung der Gesamt-RNA für die RNA-Sequenzierung	28
II.2.3.3	RNA-Sequenzierung	28
II.2.3.4	Trennung der Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese	29
II.2.3.5	cDNA-Synthese	29
II.2.3.6	Real-time quantitative PCR (real-time qPCR)	30
II.2.4	Analytische Methoden	31
II.2.4.1	Metabolitisolierung und Gaschromatographie-Massenspektrometrie	31
II.2.4.2	Markierung und Verfolgung von schwerem Kohlenstoff	32
II.2.5	Statistische Methoden	33
II.2.5.1	Arithmetischer Mittelwert	33
II.2.5.2	Standardabweichung	33
II.2.5.3	Student's t-Test	33
III.	Ergebnisse	34
III.1	Physiologische Charakterisierung von Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose	34
III.1.1	Untersuchung des Wachstums von Tomate durch die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose	38
III.1.2	Untersuchung des Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf den Gaswechsel von Tomate	41
III.1.3	Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf das Metabolom von Tomate	45
III.2	Verfolgung von schwerem Kohlenstoff in Tomaten	57
III.3	Transkriptomanalyse von Blättern mykorrhizierter Tomaten	65

INHALTSVERZEICHNIS

III.3.1	Identifikation von Mykorrhiza regulierten Genen im Blatt von Tomate	65
III.3.2	Überprüfung und Validierung der Genexpression mittels real-time qPCR.....	69
III.4	Untersuchung des Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die Physiologie und Genexpression von Tomaten unter Stressbedingungen.....	80
IV.	Diskussion.....	84
IV.1	Die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz <i>Rhizophagus irregularis</i> führt zu einer gesteigerten Photosynthese unter Phosphatlimitierung.....	84
IV.2	Eine aktive Mykorrhizierung mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz <i>Rhizophagus irregularis</i> korreliert mit der Transpiration der Tomatenpflanzen	86
IV.3	Die Stresstoleranz von mykorrhizierten Pflanzen zeigt sich auf Ebene der Genexpression.....	88
IV.4	Die GO-Gruppe des Proteinmetabolismus ist die am stärkste regulierte Gruppe in Blättern mykorrhizierter Tomatenpflanzen.....	93
IV.5	Veränderung des Primärmetabolismus in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose..	94
IV.6	Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose bewirkt einen erhöhten Zuckertransport in die Wurzeln von Tomatenpflanzen	97
IV.7	Allgemeine Zusammenfassung und Modell zur Regulation der Photosynthese durch den arbuskulären Mykorrhizapilz.....	100
IV.8	Ausblick.....	102
V.	Literaturverzeichnis	104
VI.	Anhang.....	118
VI.1	Abbildungsverzeichnis.....	118
VI.2	Tabellenverzeichnis.....	125
VI.3	Zusätzliche Daten	128
VI.3.1	Photosynthetische Parameter	128
VI.3.2	Korrelation von Metaboliten und physiologischen Parametern mit der aktiven Mykorrhiza.....	129
VI.3.3	Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils an ¹³ C-Fructose.....	130
VI.3.4	GC-MS Programmierung.....	131
VI.3.5	Ergebnis der MapMan-Analyse	133
VI.3.6	Bestimmung der Bindungseigenschaften des Sand-Seramis-Gemisches.....	139

INHALTSVERZEICHNIS

Publikationsliste	140
Konferenzbeiträge	140
Persönlicher Werdegang	141
Erklärung zur Dissertation.....	142

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Micro Gramm
µl	Micro Liter
ABA	Abscisinsäure
ADP	Adenosin-Di-Phosphat
AM	Arbuskuläre Mykorrhiza
AMF	Arbuskulärer Mykorrhizapilz
AMS	Arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose
ATP	Adenosin triphosphat
Bp	Basenpaar (e)
cDNA	complementary DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DNA	Deoxyribonucleotide acid
dNTP	Desoxyribonukleosid-Tri-Phosphat
FAME	Fettsäuremethylester
FG	Frischgewicht
GC-MS	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie
H	Stunde
H ₂ O	Wasser
L	Liter
M	Mol
Min	Minute
ml	Milliliter
MMLV-RT	Reverse transcriptase (from Moloney Murine Leukemia virus)
mRNA	Messenger RNA
Ng	Nanogramm
Nm	Nanometer
nmol	Nanomol
NADPH	Nicotinamid adenin dinucleotid phosphat (reduziert)
O ₂	Sauerstoff
P	Phosphat (P _i)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPA	Präpenetrations Apparat
qPCR	Quantitative Real-time PCR
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase-oxygenase
TG	Trockengewicht

v/v	Volume
w/v	Weight/volume
Wpi	weeks post inoculation

I. Einleitung

I.1 Lichtabhängiger Kohlenhydratmetabolismus in Pflanzen (Photosynthese)

Während der Photosynthese wird die elektromagnetische Energie in chemische Energie umgewandelt, die von photosynthetisch aktiven Pflanzen zum Aufbau organischer Moleküle genutzt werden kann (Koussevitzky et al., 2007). Hierbei spielen die Chloroplasten, eine zentrale Rolle. Chloroplasten enthalten Chlorophylle, die in der Lage sind, das Licht der Sonne zu absorbieren und die gewonnene Energie weiterzuleiten.

Die gewonnene Energie aus der Fixierung und die Reduktion von organischen Molekülen werden in photosynthetisch aktiven Organismen zum Aufbau von weiteren organischen Substanzen verwendet und dienen somit unter anderem der Biomasseproduktion.

Die Photosynthese gliedert sich in zwei Teilbereiche. Zum einen die lichtabhängige Reaktion (Thylakoid-Reaktion) und zum anderen die lichtunabhängige Reaktion (Kohlenstofffixierung). Die lichtabhängige Reaktion findet an der inneren Membran der Chloroplasten, den Thylakoiden, statt. Hier sind zwei unterschiedliche Photosysteme, das Photosystem I und II lokalisiert, die in der Lage sind, elektromagnetische Energie in chemische Energie umzusetzen. Die Anregung der Pigmente erfolgt durch Photonen, die einen Elektronentransport initiieren. Durch den Transport über eine Reihe von Molekülen stehen die Elektronen der Reduktion von NADP^+ zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat) zur Verfügung. Die Lichtenergie wird weiterhin zur Oxidation von Wasser verwendet. Die freiwerdenden Protonen dienen dem Aufbau eines Protonengradienten an der Thylakoidmembran. Hierdurch kann ATP (Adenosin-Triphosphat) durch das Protein ATP-Synthase synthetisiert werden. ATP ist eine energiereiche Phosphatverbindung mit dessen Hilfe die Lichtenergie gespeichert und für die Dunkelreaktion genutzt werden kann.

Die lichtunabhängige Reaktion findet im Stroma der Chloroplasten durch den Calvin-Zyklus statt. Hierzu wird anorganischer Kohlenstoff in organische Verbindungen fixiert und reduziert. Der Calvin-Zyklus gliedert sich in drei Teilbereiche, die in Abbildung I-1 dargestellt sind. Während der Kohlenstofffixierung katalysiert das Enzym Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO) die Carboxylierung (CO_2) von Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) zu 3-Phosphoglycerat (Phase 1). Unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten und Energie aus der lichtabhängigen Reaktion wird diese weiter zu Glycerinaldehyd-3-phosphat (G3P) reduziert (Phase 2). Die Regeneration des Akzeptors RubP findet im letzten Teilbereich des Calvin-Zyklus, der Regeneration (Phase 3), statt (Campbell et al., 2007; Ruan et al., 2012).

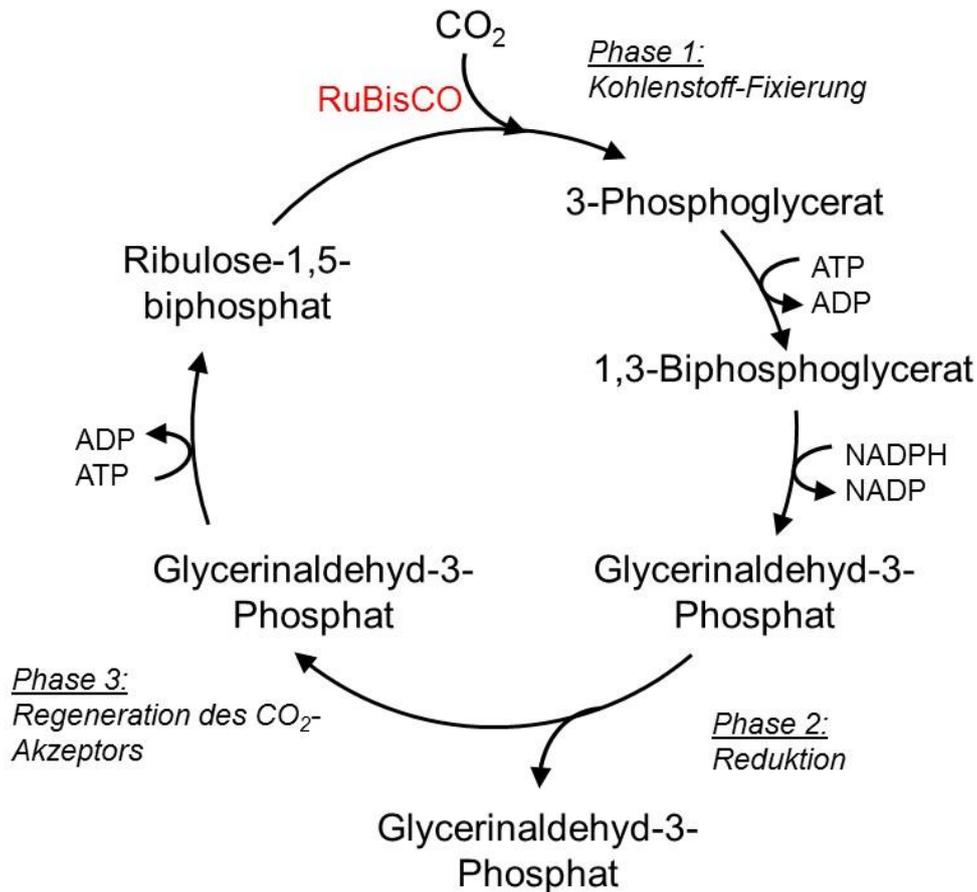


Abbildung I-1: Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus. Kohlenstoffdioxid wird durch den Enzymkomplex RuBisCO auf Ribulose-1,5-biphosphat (RubP) übertragen (Kohlenstoff-Fixierung). Der entstehende C6-Körper zerfällt in zwei C3-Körper. Mit Hilfe von ATP (Adenosin-Triphosphat) und NADPH (Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat) wird Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) gebildet (Reduktion). Im letzten Abschnitt wird GAP wieder zu RubP regeneriert (Regeneration des CO_2 -Akzeptors) (modifiziert nach Jiang et al., 2012)

I.2 Regulation der Photosynthese

Die Photosynthese wandelt Lichtenergie in energiereiche Verbindungen um, die von der Pflanze für Wachstum genutzt werden können. Da sich die äußeren Bedingungen wie Lichtintensität, Verfügbarkeit von Wasser und Nährstoffen oder die Temperatur stark variieren, muss die Pflanze in der Lage sein, ihren Metabolismus schnell und effizient anzupassen. Bereits in den 1960er Jahren haben Forscher begonnen, die Regulation der Photosynthese zu untersuchen (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; 06.07.2016). Bis heute wurden verschiedene Mechanismen aufgedeckt, die limitierend oder regulierend auf die Photosynthese wirken. Darunter zählen drei biochemische Prozesse (Abbildung I-2). Die Bindung von Sauerstoff durch das Enzym RuBisCO ist einer von drei limitierenden biochemischer Prozesse in der Photosynthese. RuBisCO ist das am häufigsten vorkommende Protein in der Welt und besitzt neben seiner Carboxylierungsaktivität auch eine Oxygenierungsaktivität. Beide Moleküle CO_2 und Sauerstoff (O_2) konkurrieren um die aktive Domäne von RuBisCO (Brooks und Farquhar,

1985). Die Fixierung von CO₂ führt zur Produktion von Kohlenhydraten (Taiz und Zeiger, 2010). Hingegen fixiert RuBisCO in maximal 25 % der Bindungen Sauerstoff, welches in der verlustreichen Photorespiration endet (Peterhansel et al., 2010). Bei gleicher Konzentration von Sauerstoff und Kohlenstoff wird die Fixierung von Kohlenstoff präferiert, wodurch die Carboxylierung die Oxygenierung übersteigt (Taiz und Zeiger, 2010). RuBisCO weist zwar eine höhere Affinität gegenüber Kohlenstoff auf, jedoch ist die Konzentration von Sauerstoff in der Luft gegenüber Kohlenstoff deutlich erhöht (Reumann und Weber, 2006). Die Oxygenasereaktion kann dementsprechend als Überbleibsel aus früheren Zeiten gedeutet werden, in der die Strukturähnlichkeit von Sauerstoff und Kohlenstoff aufgrund der geringer Sauerstoffkonzentration in der Atmosphäre keinen Nachteil darstellte (Bauwe et al., 2010). Weiterhin sinkt die Spezifität von RuBisCO mit steigender Temperatur. Da die Löslichkeit von Kohlenstoff schneller sinkt als die von Sauerstoff, verändert sich das Verhältnis zugunsten des Sauerstoffes. Zusätzlich schließt die Pflanze ihre Spaltöffnung bei höheren Temperaturen, um den Wasserverlust zu verringern. Hierdurch gelangt weniger Kohlenstoff in die Pflanzenzelle. Zeitgleich verringert sich die interzelluläre Kohlenstoffkonzentration durch die Metabolisierung während der Photosynthese. Infolgedessen begünstigen hohe Temperaturen die Fixierung von Sauerstoff und die damit verbundene Photorespiration (Peterhansel et al., 2010). Im Weiteren kann die Regeneration von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP) im Calvin-Zyklus durch fehlende Elektronen aber auch durch Phosphatmangel verlangsamt und limitiert sein (Farquhar et al., 1980). Phosphat kann über einen Transporter in den Chloroplasten gelangen. Dabei werden Triosephosphate in das Cytosol für die Saccharosesynthese transportiert und freies Phosphat aus dem Cytosol in den Chloroplasten importiert.

Die Nutzung von Triosephosphat kann als letzter biochemischer Prozess der Photosynthese zur Limitierung führen (von Caemmerer, 2000; Farquhar et al., 1980; Sharkey, 1985). Triosephosphate werden zur Biosynthese von Saccharose verwendet. Die Saccharose, der Transportzucker der Pflanze, wird dann über das Phloem zu den Bedarfsorganen in der Pflanze transportiert und dort metabolisiert. Bei reduziertem Bedarf an Saccharose (*sink strength*) wird gleichzeitig die Synthese von Saccharose gehemmt (Endprodukthemmung).

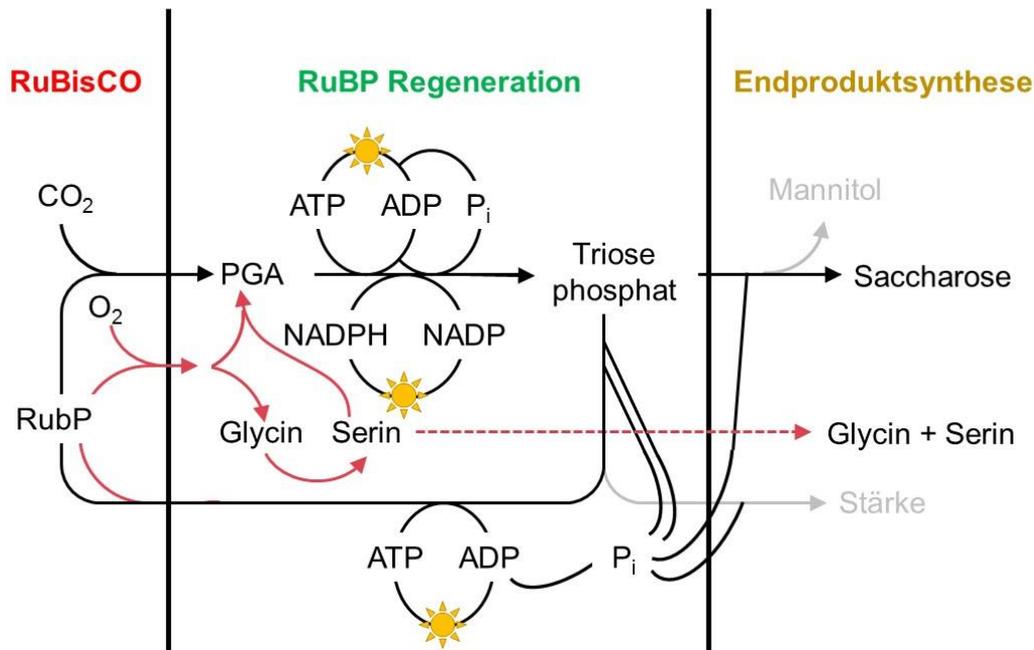


Abbildung I-2: Limitierung der Photosynthese durch die drei biochemischen Prozesse. Das Enzym RuBisCO ist in der Lage neben Kohlenstoff (CO₂) auch Sauerstoff (O₂) zu binden, Bei der Carboxylierung wird aus Ribulose-1,5-biphosphat (RubP) und CO₂ 3-Phosphoglycerat (PGA) synthetisiert, welches unter Verbrauch von ATP und NADPH während des Calvin-Zyklus Triosephosphat bildet. Triosephosphat wird im Cytosol zur Bildung von Saccharose genutzt. Neben Saccharose können Intermediate des Calvin-Zyklus auch zum Aufbau von Stärke verwendet werden. Die Oxygenasereaktion von RuBisCO resultiert in der Photorespiration. Über mehrere verlustreiche enzymatische Schritte wird 3-Phosphoglycerat recycelt (rot) (modifiziert nach Kaschuk et al., 2009; Stitt, 1986; Wright et al., 1998a)

Neben den drei biochemischen Prozessen gibt es noch weitere Faktoren wie Wasserverfügbarkeit, Temperatur, Nährstoffe, Co-Faktoren (Mg, Fe, Cu, Mn) oder Enzyme, die regulierend auf die Photosynthese wirken können (Cakman und Engels, 1999; Lambers et al., 2000).

I.3 Charakteristika der Mykorrhizapilze

Die Assoziation von Landpflanzen und dem Mykorrhizapilz ist eine der am weitesten verbreiteten Symbiosen. Bereits im 19. Jahrhundert beschrieb Albert B. Frank die Kolonisierung von Pflanzenwurzeln durch im Boden lebenden Pilze. Er definierte den Begriff Mykorrhiza, welchen er aus den griechischen Worten *mycos* (Pilz) und *rhiza* (Wurzel) herleitete (Frank, 1885).

Innerhalb der Mykorrhiza kann man zwischen zwei unterschiedlichen Typen unterscheiden. Zum einen die Ektomykorrhiza-Symbiose, bei der das Pilzmyzel einen dichten Mantel um junge, unverkorkte Wurzelspitzen bildet und im extrazellulären Raum ein Netzwerk, das sogenannte Hartigsche Netz, ausbildet. Der Ektomykorrhizapilz dringt dabei nicht in die Wurzelzelle ein (Frank, 1885). Im Vergleich dazu, dringt der Pilz bei der Endomykorrhiza-

Symbiose in die Wurzelzellen ein und bildet dort Strukturen, sogenannte Haustorien, aus (Abbildung I-3) (Bonfante und Genre, 2010).

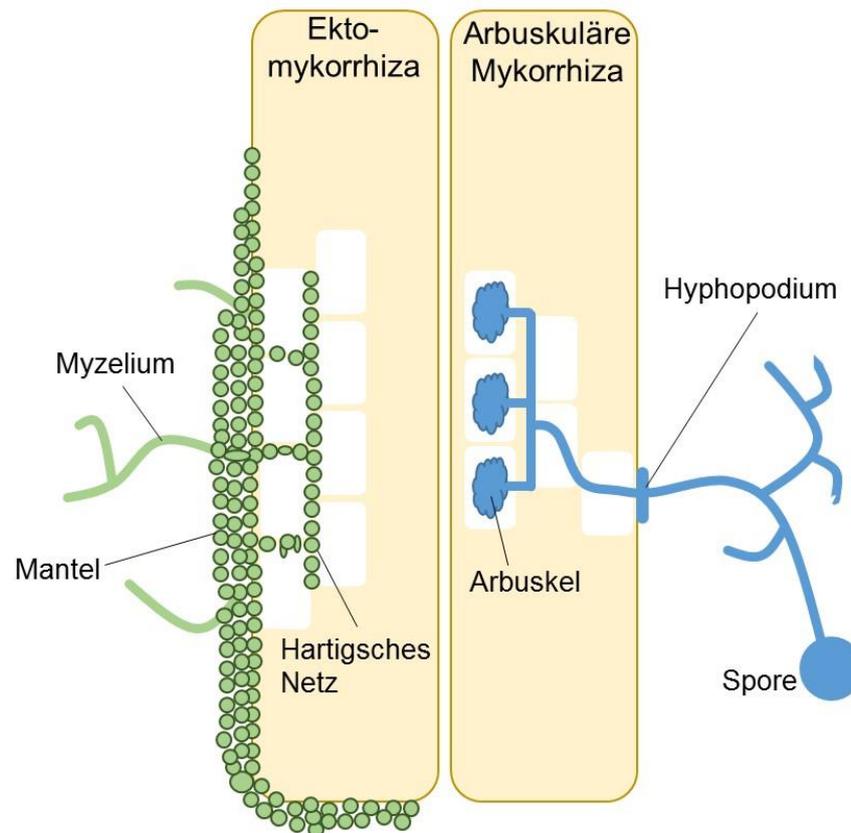


Abbildung I-3: Gegenüberstellung der Ektomykorrhiza und Arbuskulären Mykorrhiza. Ektomykorrhizapilze bilden einen dichten Hyphenmantel um die Wurzelspitze und formen ein Hartigsches Netz um die Epidermiszellen (grün). Arbuskuläre Mykorrhizapilze dringen in die Wurzel ein. Die Intraradikale Kolonialisierung findet intra- und interzellulär statt und endet mit der Bildung der Arbuskeln (blau) (modifiziert nach Bonfante und Genre, 2010).

Die Endomykorrhiza kann weiterhin in drei Formen unterteilt werden. Die orchid, ericoid und arbuskuläre Mykorrhiza-Interaktion (Smith und Read, 2008). Hierbei bildet die arbuskuläre Mykorrhiza die größte Gruppe. Etwa 70-90% der heute vorkommenden Landpflanzen bilden eine solche Symbiose mit Pilzen des Phylum *Glomeromycota* (Schüßler et al., 2001). Die Pilzstämme dieses Phylums zeigen eine geringe Wirtsspezifität (Smith und Read, 2008) und einzelne Pflanzen können durch mehrere verschiedene AM-Pilzspezies kolonialisieren werden (Santos-González et al., 2007; Fitter, 2005).

Der Beginn der Entwicklung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose wird als „presymbiotische Phase“ bezeichnet und beginnt mit dem Auskeimen der Spore. Durch die Absonderung von Signalmolekülen durch die Pflanze, sogenannten Strigolaktone, wird das Wachstum und die Verzweigung der Hyphen initiiert. Im Gegenzug sondert der Pilz Myk-Faktoren ab, die zu spezifischen Reaktionen in der Pflanzenzelle führen.

Sobald der Kontakt zwischen Pilzhyphe und Pflanzenwurzel hergestellt wurde, formt der Pilz aus vollentwickelten Hyphen ein Hyphopodium. Gleichzeitig bildet die Pflanzenzelle ein

“Penetration Apparat” (PPA), der das Eindringen des Pilzes in die Wurzelzelle steuert. Innerhalb der Wurzelzelle formt der arbuskuläre Mykorrhizapilz bäumchenartige Strukturen im inneren Cortex, sogenannten Arbuskeln, in denen der Nährstoffaustausch zwischen Pflanze und Pilz stattfindet (Parniske, 2008). Im weiteren Verlauf der Entwicklung bildet der Pilz Vesikel als Speicherorgane, die häufig im Apoplast zu finden sind, und neue Sporen außerhalb der Pflanzenwurzel um den Lebenszyklus beenden.

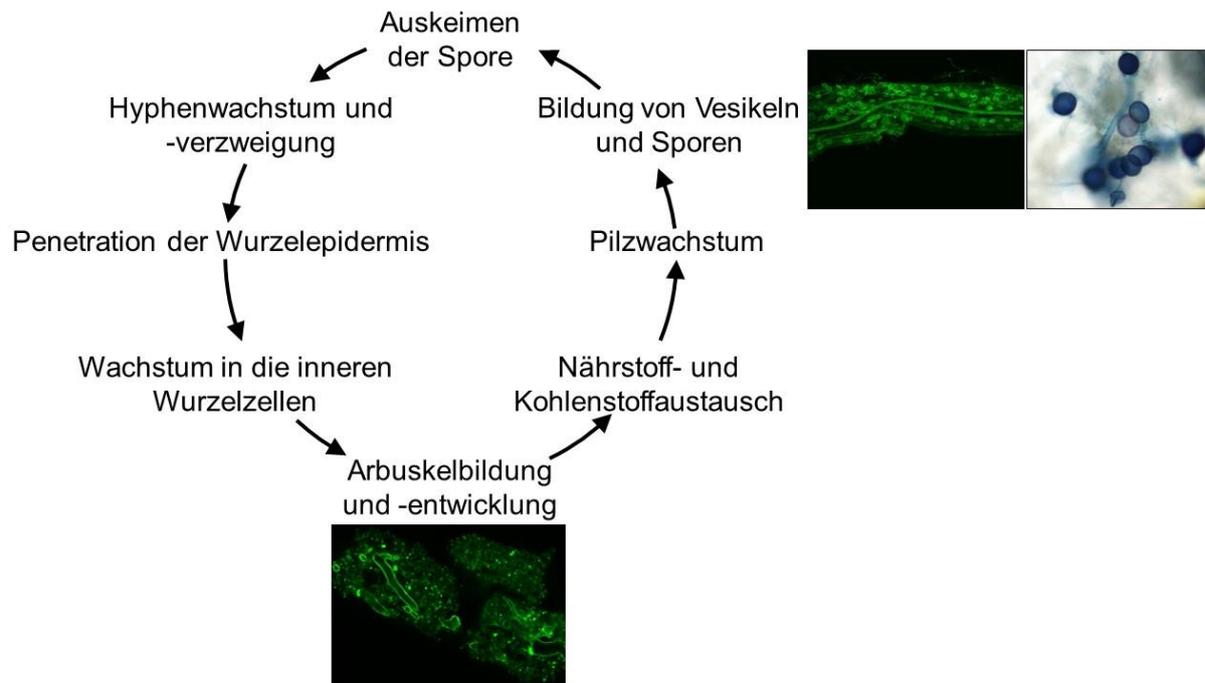


Abbildung I-4: Der Lebenszyklus des arbuskulären Mykorrhizapilzes beginnt mit dem Auskeimen der Spore gefolgt von dem Hyphenwachstum und der Hyphenverzweigung, initiiert durch Signalmoleküle. Die Penetration der Wurzelepidermis und Ausbildung eines Haustoriums schließt sich an. Der Pilz wächst in das Innere der Wurzel und bildet Arbuskeln aus, durch die der Nährstoff- und Kohlenstoffaustausch stattfindet. Der Pilz wächst und bildet Speicherorgane (Vesikel) und Sporen für den nächsten Lebenszyklus (modifiziert nach Bucking et al., 2012).

Während der arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose bildet der Pilz ein weitreichendes, bis zu 100 m langes Hyphennetzwerk aus, welches aus der Wurzelzone hinauswächst und Zugang zu zusätzlichen Nährstoffen und Wasser ermöglicht (Finlay, 2008; Smith und Read, 2008). Durch das sehr feine Pilzmyzel ermöglicht das Vordringen in kleinste Poren. Folglich ermöglicht der Pilz eine bessere Versorgung mit Wasser und Nährstoffen. Zusätzlich wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass die Pflanzenfitness und Stressantwort in der Symbiose ebenfalls verbessert sind (Augé et al., 2014). Die Regulation der Photosynthese durch arbuskuläre Mykorrhiza wird detaillierter im Abschnitt I.5 behandelt. Dieser Vorteil für die Pflanze wird in der Literatur häufig als *benefit* bezeichnet.

Im Gegenzug zu der optimierten Versorgung mit Wasser und Nährstoffen ist der Pilz durch seine obligat biotrophe Lebensweise auf die Versorgung mit Kohlenstoff durch die Pflanzen angewiesen. Solaiman (1997) und Bago (2003) haben bereits gezeigt, dass bis zu 20 % des in der Photosynthese fixierten Kohlenstoffs für die Versorgung des Pilzes aufgewendet werden

(*cost*) (Bago et al., 2003; Fitter, 2005; Solaiman und Saito, 1997). Somit steht der Pflanze ein reduzierter Gehalt an Kohlenstoff für den eigenen Metabolismus zur Verfügung. Es wird vermutet, dass dieser „Verlust“ durch Steigerung der Photosynthese kompensiert wird (Kaschuk et al., 2009).

I.4 Zuckermetabolismus

I.4.1 Zuckermetabolismus in Pflanzen

Während der lichtunabhängigen Reaktion der Photosynthese findet die Synthese von organischen Verbindungen aus Wasser und Kohlenstoffdioxid statt. Während des Calvin-Zyklus wird das durch RuBisCO fixierte CO₂ über verschiedenen Zwischenprodukte zu Glucose assimiliert. Unter Bedingungen mit reduziertem Energiebedarf wird die produzierte Glucose in Stärke umgewandelt und gespeichert. Bei Änderung des Energiebedarfs, beispielsweise bei der Blühinduktion kann die Stärke wiederum in Glucose gespalten und in das Cytosol transportiert werden, wo Saccharose aufgebaut wird (Abbildung I-5).

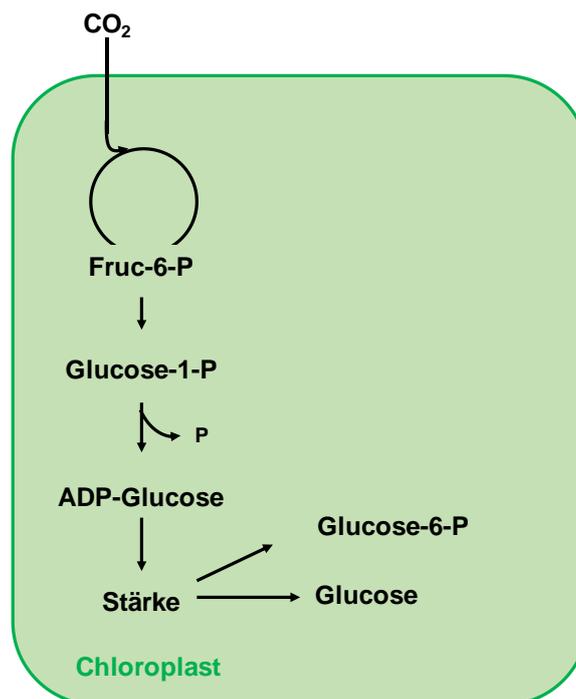


Abbildung I-5: Stärkesynthese in Pflanzen. Fructose-6-Phosphat (Fruc-6-P) wird über verschiedene enzymatische Schritte im Chloroplasten zu aktivierter Glucose (ADP-Glucose) umgewandelt, welches zur Stärkesynthese dient. Glucose-1-Phosphat (Glucose-1-P), Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P), Phosphat (P) (modifiziert nach Tiessen und Padilla-Chacon, 2012).

Als weiteren Reaktionsweg kann die Synthese von Saccharose auch über das Calvin-Zyklus-Intermediat Glycerinaldehyde-3-phosphate (G3P) bzw. Dihydroxyacetone phosphate (DHAP) stattfinden. Beide Substanzen (G3P und DHAP) können über einen Triosephosphat/Phosphat-Transporter aus dem Chloroplasten exportiert werden und im Cytosol für die Saccharosesynthese verwendet werden. Als Gegentransport findet ein Import von Phosphat

in den Chloroplasten statt, welches für die Synthese von Energie (ATP) und Reduktionsäquivalenten (NADPH) verwendet werden kann. Durch eine Kondensationsreaktion zwischen G3P und DHAP wird Fructose-1,6-bisphosphat im Cytosol gebildet. Durch eine Dephosphorylierung von Fructose-1,6-bisphosphat entsteht Fructose-6-Phosphat. Nach einer Isomerisierung zu Glucose-6-Phosphat findet eine Aktivierung mit UTP zu UDP-Glucose statt. Abschlussreaktion ist eine weitere Kondensation durch das Enzym Saccharose-Phosphat-Synthase. Hierbei kondensieren UDP-Glucose und Fructose-6-Phosphat zu Saccharose-6-Phosphat. Nach einer Phosphorylierung und Freisetzung des Phosphatrestes durch das Enzym Saccharose-Phosphat-Phosphatase entsteht Saccharose (Abbildung I-6).

Die produzierte Saccharose wird für den Transport und die Verteilung in der Pflanze in das Phloem geladen (Flügge, 1995; Kaschuk et al., 2009).

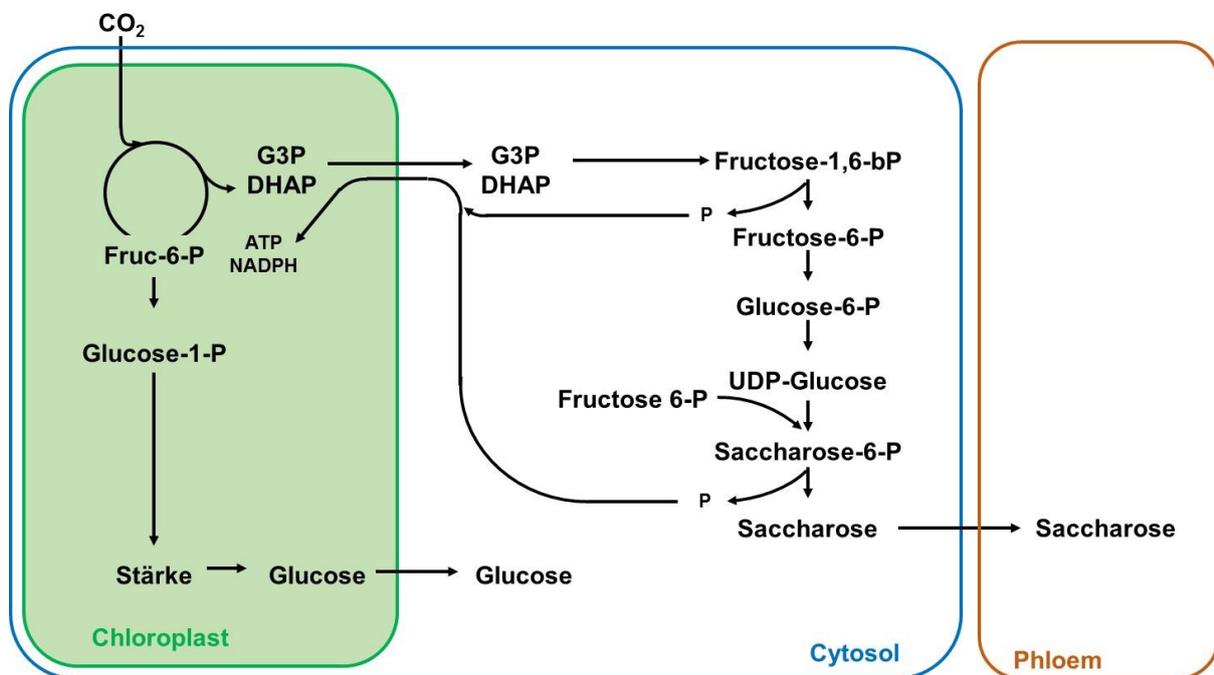


Abbildung I-6: Saccharose Synthese in Pflanzen. Triosephosphate (G3P/DHAP) werden aus den Chloroplasten exportiert. Im Cytosol findet eine Kondensation zu Fructose 1-6-bisphosphat statt. Über verschiedene enzymatische Schritte wird Saccharose synthetisiert, welches über das Phloem zu den Bedarfsorganen transportiert werden kann. Fructose-1-6-bisphosphat (Fructose-1-6-bP), Fructose-6-Phosphat (Fructose-6-P), Glucose-1-Phosphat (Glucose-1-P), Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P), Saccharose-6-Phosphat (Saccharose-6-P), Phosphat (P) (modifiziert nach Flügge, 1995).

I.4.2 Zuckermetabolismus in arbuskulären Mykorrhizapilzen

Aufgrund der obligat biotrophen Lebensweise der arbuskulären Mykorrhizapilze sind die Pilze vollständig von der Kohlenstoffversorgung der Pflanze abhängig. Im Gegenzug, zu der verbesserten Nährstoffversorgung durch den Pilz (I.5.1), transportiert die Pflanze bis zu 20 % des in der Photosynthese produzierten Kohlenstoffs zum Pilz (Harrison, 1999). Über das Phloem wird Saccharose, der Transportzucker der Pflanze, zu den Bedarfsorganen (*sink*) transportiert. Die Kolonialisierung der Wurzel durch den arbuskulären Mykorrhizapilz führt zu

einer Erhöhung des Saccharose Bedarfs der Wurzel (*sink strength*), wodurch die Pflanze die transportierende Kohlenstoffmenge steigert und an den Bedarf anpasst (Wright et al., 1998a; Blee und Anderson, 1998).

In den verbrauchenden Geweben wird die Saccharose durch Invertasen in die Hexosen Glucose und Fructose gespalten (Flügge, 1995). Die Hexosen können dann für den Pflanzenmetabolismus verwendet werden oder vom Pilz über spezielle Transporter aufgenommen werden. Nach Aufnahme der Hexosen werden diese im inneren Pilzmyzel durch den pilzlichen Metabolismus in Trehalose, Glycogen oder Triose umgewandelt oder für den Pentose Phosphatweg (PPP) genutzt (Bago et al., 2000). Die Triosen werden im Weiteren für den Aufbau von Triacylglyceride verwendet. Diese können, neben Glycogen, auch in das externe Pilzmyzel transportiert werden. Die Triacylglyceride werden dort für die β -Oxidation und den Aufbau von Aminosäuren über den Glyoxylatzyklus verwendet. (Abbildung I-7).

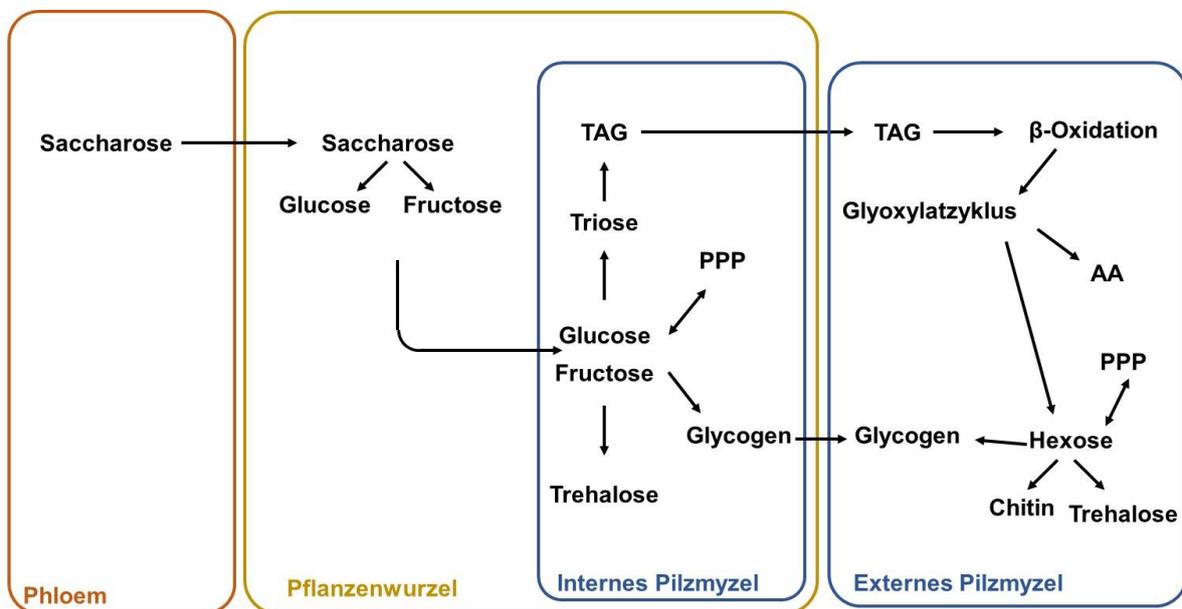


Abbildung I-7: Zuckermetabolismus in arbuskulären Mykorrhizapilzen. Saccharose wird über das Phloem in die Pflanzenwurzel transportiert. Nach Spaltung durch Invertasen werden Hexosen vom Pilz aufgenommen und weiter metabolisiert. Pentose Phosphatweg (PPP), Triacylglycerine (TAG), Aminosäuren (AA) (modifiziert nach Bago et al., 2000).

I.5 Regulation der Photosynthese durch arbuskuläre Mykorrhizapilze

Neben der Anpassung der Photosynthese an äußere Bedingungen (I.2) kann auch der arbuskuläre Mykorrhizapilz die Photosynthese der Pflanze beeinflussen. Der Pilz ist in der Lage, verschiedene Aspekte der Pflanzenphysiologie, wie Nährstoffgehalt, Wachstum oder Abwehrmechanismen, auf vielfältige Weise zu beeinflussen (Budi et al., 1999). Es konnte bereits in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass mykorrhizierte Pflanzen im Vergleich zu ihren gleich gedüngten Kontrollpflanzen eine erhöhte Wachstumsleistung und einen Biomassevorteil aufweisen (Kaschuk et al., 2010; Gutjahr et al., 2009; Sieh et al., 2013; Sheng

et al., 2008). Für die genaue Regulation der Photosynthese durch die arbuskuläre Mykorrhiza werden verschiedene Theorien diskutiert, die im Weiteren näher erläutert werden.

I.5.1 Regulation durch Nährstoffe

Der arbuskuläre Mykorrhizapilz bildet durch sein externes Myzel ein weitreichendes Hyphennetzwerk im Boden aus, durch das der Pilz ein großes Bodenvolumen erschließt und zusätzliche Nährstoffe verfügbar machen kann. Zusätzlich können Bodenbereiche erschlossen werden, die für die Pflanzenwurzel nicht verfügbar sind (Bethlenfalvay et al., 1988; Dakessian et al., 1986; Franson et al., 1991). Für *Medicago truncatula* konnte gezeigt werden, dass eine Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen zu einer verbesserten Versorgung mit Phosphat führt. Aber auch die Versorgung mit anderen Nährstoffen wie Stickstoff und Zink ist verbessert (Olsson et al., 2005; Sieh et al., 2013). Viele beschrieben Mykorrhizaeffekte, wie gesteigertes Wachstum, Biomassevorteil oder gesteigerte Photosynthese lassen sich somit mit der verbesserten Nährstoffversorgung durch den Pilz erklären (Smith und Read, 1997).

In der Photosynthese ist Phosphat als Energielieferant, für die Regeneration von Ribulosebiphosphat (RubP) und der Regulation der Saccharose- und Stärke-Synthese essentiell (Cakman und Engels, 1999; De Groot et al., 2003; Rychter und Rao, 2005). Girsch und Robinson (1987) haben durch Versuche mit isolierten Chloroplasten von Spinat den Einfluss der Phosphatlimitierung auf die Physiologie der Pflanze gezeigt. Neben der verminderten Leistung der ATP-Synthese haben die Autoren auch die reduzierte Umwandlung von 3-Phosphoglycerate zu Triosephosphate gezeigt. Durch eine reduzierte Phosphatkonzentration im Cytosol kommt es außerdem zu einem inhibierten Export von Triosephosphat durch den Triosephosphat/Phosphat Transport und somit zu einem Anstieg von Triosephosphat im Chloroplasten (Girsch und Robinson, 1987).

I.5.2 Regulation durch Wasser

Neben der verbesserten Nährstoffaufnahme durch das extraradikale Myzel des Pilzes wird auch die Wasserversorgung der Pflanze verbessert. Das feine Hyphengeflecht ermöglicht dem Pilz den Zugang zu Substratporen mit einem Radius $<20 \mu\text{m}$, in denen Restwasser gebunden wird. Somit hat der Pilz Zugriff auf bodengebundenes Wasser, welches für die Pflanzen nicht verfügbar ist (Bethlenfalvay et al., 1988; Dakessian et al., 1986; Franson et al., 1991). Die verbesserte Wasserversorgung hat ebenfalls einen Einfluss auf die photosynthetische Leistung der Pflanze. Das pflanzliche Blatt besitzt für den Gasaustausch sogenannte Stomata, über die Kohlenstoffdioxid in die Zellen und Sauerstoff aus den Zellen diffundieren. Gleichzeitig findet an den Stomata die (stomatäre) Transpiration, die Verdunstung von Wasser, statt.

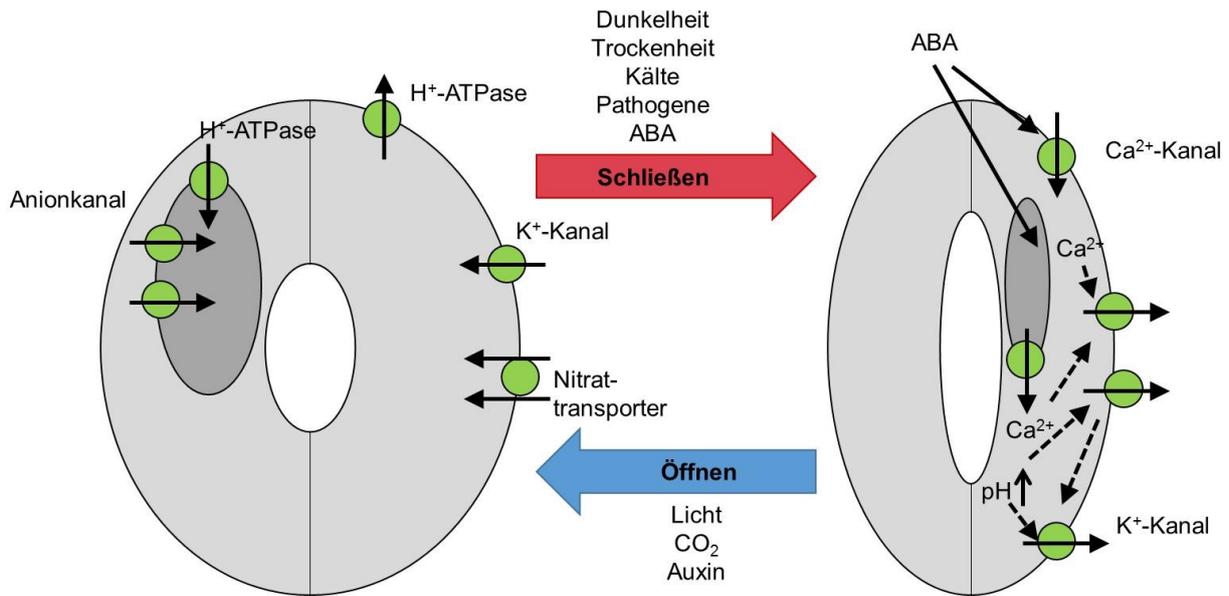


Abbildung I-8: Regulation der Stomataöffnung. Unter Stressbedingungen wie Trockenheit, Kälte oder Pathogenbefall steigt die Konzentration an Abscisinsäure (ABA) im Blatt. Eine gesteigerte ABA-Konzentration verursacht einen Calciumeinstrom in den Schließzellen und eine Erhöhung des pH-Wertes. Die Öffnung verursacht weiterhin einen Ausstrom von Kalium und Wasser in den Apoplasten. Durch Ausstrom von Wasser aus der Schließzelle vermindert sich der Turgordruck der Zelle und die Stomata werden geschlossen (modifiziert nach Kwak et al., 2008).

Eine verbesserte Wasserversorgung sorgt durch einen Flüssigkeitseinstrom im Blatt für einen Druckanstieg, der die Öffnung der Blattstomata durch Wölbung der Schließzellen bewirkt. Der Eintritt von Kohlenstoffdioxid in die Blattzellen wird durch eine größere Öffnung der Stomata erleichtert und die Kohlenstoffkonzentration innerhalb des Blattes steigt. Durch eine höhere Kohlenstoffdioxidkonzentration im Blatt wird die Carboxylierungsreaktion des Enzyms RuBisCO bevorzugt (I.2). Weiterhin kann auch die intrazelluläre CO₂-Konzentration oder geringe Konzentration an kohlenstoffenthaltenden Substraten im Blatt, zum Beispiel durch eine erhöhte Synthese von Zucker, die Stomataöffnung regulieren (Jarvis et al., 1999; Mansfield et al., 1990).

Im Gegensatz dazu werden bei nicht optimaler Wasserversorgung, Kälte oder Dunkelheit die Stomata geschlossen, um den Wasserverlust der Pflanze zu reduzieren (Abbildung I-8). Da das interzelluläre CO₂ (c_i) weiterhin für die Photosynthese verwendet wird, sinkt die interzelluläre CO₂-Konzentration. Hierdurch verschiebt sich das CO₂:O₂ Verhältnis in der Zelle und die Photorespiration wird begünstigt (I.2).

Aber auch die Pflanze selbst kann die Öffnung und Schließung der Stomata regulieren. Ein Calciumeinstrom in die Zellen (Allen et al., 2001), verursacht durch das Phytohormon Abscisinsäure (ABA), bewirkt das Schließen der Stomata (Abbildung I-8). Hierbei induziert ABA die Öffnung von Anionenkanälen, wodurch Anionen aus den Schließzellen austreten und das Membranpotential positiver wird. Die Depolarisation bewirkt wiederum eine Öffnung der Kaliumkanäle und ein Ausströmen von Kalium und Wasser in den Apoplasten (Steuer et al.,

1988). Die Synthese von ABA ist in Pflanzen häufig eine Antwort auf Stress. Auf den Einfluss von Phytohormonen wird um Abschnitt I.5.4 näher eingegangen

I.5.3 Regulation durch erhöhte Kohlenstoffnachfrage

Während der Photosynthese wird Lichtenergie in chemische Energie (ATP) umgewandelt, die zum Aufbau von Zucker verwendet werden. Der Zucker wird im Anschluss in Form von Saccharose, dem Transportzucker in der Pflanze, zu den Bedarfsorganen transportiert. Dieses Wechselspiel zwischen produzierenden und verbrauchenden Organen wird auch häufig als *source-sink* Verhältnis beschrieben und unterliegt einer gegenseitigen Regulation (Nagele et al., 2010).

Bei reduzierter Saccharosenachfrage kommt es aufgrund einer negativen Rückkopplung zu einer Verschiebung der Saccharose und Stärkesynthese. Hierbei wird die Synthese von Saccharose reduziert und vornehmlich Stärke als Speichersubstanz hergestellt (Abbildung I-5). Des Weiteren kommt es durch einen reduzierten Abtransport der Saccharose zu einer Anreicherung von Zuckern in den Chloroplasten. Die Akkumulation von Zuckern hat eine Hemmung der Photosynthese zur Folge (Paul und Pellny, 2003). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Akkumulation von Trehalose-6-Phosphat und die Aktivierung der Hexokinase regulierend auf die Photosynthese wirken und Signalfunktionen einnehmen (Chen et al., 2005; Hanson und Smeekens, 2009).

Während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose wird der Pilz durch die Pflanze mit Kohlenhydraten versorgt und stellt somit einen zusätzlichen Kohlenstoffbedarf (*sink*) dar. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Nachfrage nach Kohlenhydraten steigt und es zu einem schnelleren und erhöhten Transport von Zuckern aus den Chloroplasten (*source*) in Richtung Wurzel (*sink*) kommt, wodurch eine Limitierung der Photosynthese durch Zucker vermindert wird (Bethlenfalvai et al., 1988; Paul und Foyer, 2001).

I.5.4 Regulation durch Signalmoleküle und Phytohormone

Durch die Absonderung von Signalmolekülen durch die Pflanze, sogenannten Strigolaktonen, wird die Symbiose zwischen Pflanze und Pilz initiiert. Im Gegenzug sondert der Pilz sogenannte Myk-Faktoren ab, die zu spezifische Reaktionen und molekularen Reprogrammierungen der Pflanzenzelle führen (Parniske, 2008). Schon hier kann man sehen, dass Signalmoleküle in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose eine wichtige Rolle spielen. Auf der Suche nach frühen Signalen während der Symbiose, konnte Natalia Requena mit der *GmGIN1* (*Gypsy Integrase 1*) ein pilzliches Gen identifizieren, welches für einen Steroid-Rezeptor kodiert, der in der Plasmamembran der Hyphen lokalisiert ist und eine ATPase-Aktivität besitzt. Eine Modifizierung des Gens durch Pflanzensignale ermöglicht eine

Interaktion und Modifikation anderer Membranproteinen durch die ATPase-Aktivität (Requena et al., 2007).

Auch die Beteiligung von GRAS Transkriptionsfaktoren wie NSP1, NSP2 und RAM1 in dem Myc-Signalweg konnte gezeigt werden. Desweiteren konnte die Hochregulierung von micro-RNAs, die auf den Transkriptionsfaktor NSP2 abzielen, während der arbuskulären Mykorrhizasymbiose bewiesen werden (Dakessian et al., 1986; Delaux et al., 2013).

Alle diese Studien erläutern die Beteiligung von Signalen an der Etablierung der Symbiose in der Wurzel. Daher kann, unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Chen (2005) und Hanson (2009), die Zuckerintermediate als Signale nachgewiesen haben, vermutet werden, dass die pflanzliche Photosynthese ebenfalls durch Signale des Pilzes reguliert und modifiziert werden könnte (Chen et al., 2005; Hanson und Smeekens, 2009).

Die Beteiligung von Phytohormonen, wie Abscisinsäure (ABA), bei der Regulation des pflanzlichen Metabolismus durch den arbuskulären Mykorrhizapilz wird immer wieder diskutiert. ABA wird auch als wichtigstes Phytohormon in Kulturpflanzen bezeichnet (Shinozaki und Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Es wird aus dem Tetraterpengerüst der Carotenoide synthetisiert und hat damit den gleichen Syntheseursprung wie die Strigolaktone (Lopez-Raez, 2016). Für beide Moleküle konnte ebenfalls eine positive Korrelation gezeigt werden, bei der eine Blockierung der ABA-Synthese zu einem reduzierten Strigolaktone-Level führt (Lopez-Raez, 2016).

Mykorrhizierte Pflanzen zeigten im Allgemeinen einen reduzierten ABA-Gehalt, was auf ein geringeres Stresslevel hindeutet (Duan et al., 1996; Estrada-Luna und Davies, 2003; Aroca et al., 2013; Fernandez et al., 2014). Der reduzierte ABA-Gehalt kann, wie bereits beschrieben, zusätzlich einen Einfluss auf die Öffnung der Stomata und somit auf die Photosynthese haben. Des Weiteren führt ABA zu einer erhöhten Genexpression speziell von Proteinase-Inhibitoren (Nambara und Marion-Poll, 2005).

I.6 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll sowohl der Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza auf die Photosynthese als auch auf das Blattmetabolom und –transkriptom untersucht werden. Dabei sollen vergleichende Analysen von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen bei geringer Phosphatversorgung (50 μM P) mit gleichem Wachstum und Sprossphosphatgehalt durchgeführt werden. Als weitere Kontrolle dienen optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000 μM P) um einen möglichen Phosphateffekt zu identifizieren.

In der Arbeit sollen folgende Hauptfragestellungen beantwortet werden:

1. Ist die Photosynthese durch den Pilz gesteigert und wie wird sie reguliert?
2. Kommt es durch die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose zu Veränderungen des pflanzlichen Metaboloms?
3. Wie und vor allem in welcher Geschwindigkeit findet der Kohlenstofffluss während der Mykorrhizierung statt?
4. Sind pflanzliche Gene im Blatt durch den arbuskulären Mykorrhizapilz differentiell reguliert?

Die Fragen sollen mit einer Kombination aus physiologischen (Gaswechselfmessungen), analytischen (GC-MS) und molekularbiologischen (Expressionsanalysen) Methoden untersucht werden. Um neue Erkenntnisse über die Regulation und Einfluss der Photosynthese durch den arbuskulären Mykorrhizapilz zu gewinnen, werden physiologische Messung sowie die Analyse des Blatttranskriptoms und Blattmetaboloms durchgeführt. Hierfür wurde in allen drei Analysen das gleiche Blatt untersucht. Somit können die Daten miteinander verglichen werden und liefern eine komplette Analyse des Blattes während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose.

II. Material und Methoden

II.1 *Material*

II.1.1 Allgemein gebräuchliche Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Chemikalien wiesen mindestens den Reinheitsgrad p.a. auf und wurden von folgenden Firmen bezogen: AppliChem (Darmstadt), Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Duchefa Biochemie (Postbus, Niederlande), Invitek (Berlin), Merck KGaA (Darmstadt).

Die verwendeten allgemeinen Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Herstellern bezogen: Applied Biosystems (Darmstadt), Beckman Coulter (Fullerton, USA), Biometra (Göttingen), BioRad Laboratories GmbH (München), Eppendorf (Hamburg), Fuji (Düsseldorf), Greiner (Solingen), Heraeus (Osterode), Herolab (Wiesloch), Hettich Zentrifugen (Tuttlingen), Kodak (Stuttgart), Labomedic (Bonn), Millipore (Eschborn), MWG Biotech (München), Pharmacia (Freiburg), Serva (Heidelberg), Schott Glaswerke (Mainz), Sorvall (Bad Homburg), Whatman (Maidstone, GB), Zinsser Analytic (Frankfurt).

II.1.2 Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Tabelle II-1: Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien/Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Blaubandfilter 640d, pore size 0,45 µm	Machery-Nagel (Düren, Deutschland)
Carrier Material für Kontollinokulation	Symplanta (München, Deutschland)
dNTP-Mix	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Murashige&Skoog (MS) basal salt	Duchefa (Postbus, Niederlande)
<i>Rhizogenes irregularis</i> research grade (10.000 Sporen/g)	Symplanta (München, Deutschland)
Phosphate Standard Lösung	Merck (Darmstadt)
WGA Alexa Fluor® 488	Thermo Scientific (Waltham, USA)
¹³ CO ₂ (400 ppm)	Linde (Hannover, Deutschland)

II.1.3 Apparaturen, Geräte und Zubehör

Tabelle II-2: Verwendete Apparaturen, Geräte und Zubehör

Apparatur/Gerät/Zubehör	Hersteller/Bezugsquellen	Verwendungszweck
ABI Prism®7300	Applied Biosystems (Darmstadt)	Quantitative PCR
Agarosegel Apparaturen	Biozym (Hessisch Oldenburg)	Agarosegelelektrophorese
Agilent J&W GC Column VF-5ms	Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA)	Säule (Gaschromatograph)
Agilent 7890A	Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA)	Gaschromatograph
Autosampler MPS	Gerstel (Mülheim an der Ruhr Deutschland)	Derivatisierung
BioTek Synergy MX	BioTek (Vermont, USA)	Elisa-Reader
Eppendorf Mastercycler® Pro	Eppendorf (Hamburg)	PCR und cDNA-Synthese
ICP-MS 7500 CX	Agilent (Santa Clara, Kalifornien, USA)	Nährstoffanalyse
INTAS Gel-Imager	INTAS (Göttingen)	Dokumentation von Agarosegelen
Leco Pegasus HT	Leco Pegasus HT (St. Joseph, Mi, USA)	Auftrennung der Metabolite
LiCor 6400 XT	Lincoln, Nebraska USA	Photosynthesemessung
MobyLux GroBanks	CLF Plant Climatics (Wertingen)	Pflanzenanzucht
Muffelofen M104	Thermo Scientific (Waltham, USA)	Veraschen von Pflanzenmaterial
Speedvac	Eppendorf (Hamburg)	Vakuumzentrifugation

II.1.4 Software und Internetprogramme

Tabelle II-3: Verwendete Software und Internetprogramme

Software/ Internetprogramm	Charakteristika
ABI Prism® 7300 SDS Software 1.4	Software zur Betreuung des ABI Prism® 7300 Sequence Detection System und zur Auswertung
Bioconductor DESeq2	Statistikprogramm zur Auswertung von RNAseq Analysen (Love et al., 2014)
ChromaTOF	Programm zur Auswertung von Metabolitanalysen
CLC genomic workbench 7.5.1	Software zur Auswertung von RNAseq Analysen (http://www.clcbio.com/products/clc-genomics-workbench/)
Clone Manager	Programm zur Analyse von Nukleinsäuresequenzen
The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)	Internetdatenbank zur Sequenzanalyse und Literaturrecherche (http://www.ebi.ac.uk/)
FastQC	Programm zur Qualitätskontrolle der RNAseq Rohdaten (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/)
NCBI Home Page	Internetdatenbank zur Sequenzanalyse und Literaturrecherche (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)
Sol Genomic Network	Internetdatenbank für Solanaceae (www.solgenomics.net)
Trimmomatic	Programm zum Prozessieren der RNA-Sequenzierdaten (http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic) (Bolger et al., 2014)

II.1.5 Reaktionskits

Tabelle II-4: Verwendete Reaktionskits

Apparatur/Gerät/Zubehör	Hersteller/Bezugsquelle	Verwendungszweck
RNeasy MinElute Cleanup Kit	Quiagen (Hilden)	Aufreinigung und Konzentrierung der RNA
Platinum®SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with Rox	Invitrogen (Carlsbad, USA)	Quantitative PCR

II.1.6 Enzyme

Tabelle II-5: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller	Verwendungszweck
DNaseI	Invitrogen (Carlsbad, USA)	DNase Verdau/ cDNA-Synthese
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega (Mannheim)	cDNA-Synthese

II.1.7 Größenstandards

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Größenstandards der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) verwendet: GeneRuler™ 50bp Ladder und GeneRuler™ 1kb Ladder.

II.1.8 Häufig verwendete Puffer, Medien und Lösungen

Tabelle II-6: Häufig verwendete Puffer und Medien

Bezeichnung	Komponenten	Endkonzentration/Menge
Agarosegel-Ladepuffer (6x)	Glycerin	60% (v/v)
	EDTA pH 8	60 mM
	Tris-HCl pH 7,6	10 mM
	Orange G	0,03% (v/v)
DNaseI-Puffer	Tris-HCl pH 7,5	0,2 M
	MgCl ₂	20 mM
Hoagland Nährlösung (0,5x; pH 6,8)	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	2,5 mM
	KNO ₃	2,5 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1 mM
	KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄	50 µM/1 mM
	NaFeEDTA	50 µM
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,2 µM
	H ₃ BO ₃	10 µM
NiSO ₄ x 6 H ₂ O	0,2 µM	

	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1 µM
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	2 µM
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,5 µM
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,2 µM
Metabolit-Extraktionspuffer	Methanol	2,5 Teile
	Chloroform	1 Teil
	H ₂ O	1 Teil
MMLV-Puffer (5x)	Tris-HCl (pH 8.3 at 25°)	50 mM
	MgCl ₂	7 mM
	KCl	40 mM
	DTT	10 mM
	BSA	0,1 mg/ml
	[³ H]dTTP	0,5 mM
	oligo(dT)	0,025 mM
	poly(A)	0,25 mM
	NP-40	0,01 %
PBS-Puffer (1x) pH 7,4	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	KH ₂ PO ₄ (Gesamt-Phosphat)	12 mM
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) (50x)	Tris-HCl	2 M
	Eisessig	5 % (v/v)
	EDTA pH 8	50 mM
Trizol	Guanidiniumthiocyanat	0,8 M
	Ammoniumthiocyanat	0,4 M
	Na-Acetat pH 5	0,1 M
	Glycerin	5% (v/v)
	Phenol (Wasser äquilibriert)	38% (v/v)

II.1.9 Verwendete Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und Eurofins Genomics bezogen.

Tabelle II-7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide

Name(Gen)/Funktion		Sequenz (for/rev)
Haushaltgene		
Aktin2	Solyc03g078400	AAGCTCAATCCAAGAGGGGT/ GAGGTGCTTCAGTAAGCAGAA
<i>Sl.Ef1α</i>	Solyc06g009970 (Boldt et al., 2011)	TGGAAGTGTGCCTGTTGGTC/ ACATTGTCACCAGGGAGTGC
<i>Gi.Tef</i>		TGT TGC TTT CGT CCC AAT/ GGT TTA TCG GTA GGT CGA
Bestimmung der Mykorrhizierung		
Phosphattransporter 4	Solyc06g051850	GAAGGGGAGCCATTTAATGTGG/ CCTTCAATAATCGCAGTGTAAC
Phosphattransporter 3	Solyc09g090080	TTGTGTTAGGTTGTGTGAATTTTCTT/ AGCTCTTTGCACGATCTTAAATGAC
Phosphattransporter 5	Solyc06g051860	GCAGAACGAGACGCAGATGAA/ TGCTGAATTTGATAAACTTGCCAA
18S rRNS		GTATGCCTGTTTGAGGGTCAGTATT/ AAACTCCGGAACGTCCTAAAGAG
Sonstige Primer		
Random nonamer		NNNNNNNNN

Tabelle II-8: Oligonukleotide zur Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung

Name(Gen)/Funktion		Sequenz (for/rev)
Gene zur Überprüfung der RNAseq		
Sucrosetransporter 1	Solyc11g017010	GGTACAAAAGGGAAACTTACAGTT/ ATACCGAGTAATTGAACGTAAGGT
Sucrosetransporter 2	Solyc05g007190	GGCCTGCACCGCTATCATT/ GGTTACAGCAAGAGGAATGCC
Soluble diacylglycerol acyltransferase	Solyc12g098850	GAGAATCGAAGTATGTATGGGTGGTAAATGC/ CCCTGAAACTTTGACATTAGGACCAACTTTACA
ATP synthase β SU chloroplastic	Solyc01g007320	TCTACCAAAGAAGGGTCCATAACCTCTA/ GGATCTACTGCTGGATAAATACCTTTGGCA
Proteinase inhibitor I	Solyc09g084470	ATGGATTCAAAGTTTGCTCACATCATTGTTTTTC/ GGCCAGATTAGTTTTCTTTGCAGAAAGA
Kunitz-type protease inhibitor	Solyc03g098790	GTAGATAGCAGTTATTTCAAGATTGTTAAAGCATC AAC/CAAGAGGATTTTCGTTGACAAGAGCCAAAC
Plant-specific domain	Solyc06g007580	ACTCGTTACTTCGTCGATTTAGATTTGCGC/ CGTCGCTCATTGTTCTCAATATCTGCTTTAA
Threonine ammonia-lyase biosynthetic	Solyc09g008670	CTCAAATACATCCCACCATTGATGATCCAG/ AACAGGTATAAACACAGCGTGAATGTCCTT
Aquaporin	Solyc10g083880	ACGTGGAATTTTGTATTGGATTGCTCAATTG/ TACAATTTCTAGTACCAATGCATTGCCTAC
Choline dehydrogenase	Solyc03g121600	AAACAGGCCAACTACCAAACCTGTATAGT/ AATTTTAGCTCCGCCACTGAAAGC
Ferritin	Solyc06g050980	TCCATCATGCTTCTCAAGGTTGCT/ CAAAGGCTCAAACACAACCCCTG
Non-specific lipid-transfer protein	Solyc10g075150	TGCCTTCCTTATTTGCAGAACCGT/ AACTCCAGAAAGACCAGCAGCTTT
Proteinase inhibitor I	Solyc09g089510	TCATGTGCTTGCTTTCTTGCTTCT/ TGATTTCCCAACAAGTTCAGGCCA
MYB TF	Solyc06g005310	CATCCTGGTCTCAAACGTGGA/ TCTATTTCCCATTTGGAGTGG
Fructose-bP Aldolase	Solyc02g062340	GGCAACAGTGAACCTTAAATGCAATGAACAAA/ TCCACCTGTATACTTTCCAAGTGTTGC
RubiscoActivase	Solyc09g011080 (Fiorilli et al., 2009)	GGAAATGGATTGGAAGTACTGGAATTGAAC/ GCTTCTTTAAGGTAAGTACTTGTGAGCTAACTGAAC
Serine/Threonin protein kinase	Solyc04g009910	TAGCTCATCGTGACATTAAGCCGG/ TAAACCTCCGGCGCAACGTAATA

II.2 Methoden

II.2.1 Pflanzenanzucht

II.2.1.1 Sterilisation und Anzucht von *Solanum lycopersicum*

Samen von *Solanum lycopersicum* cv. *MoneyMaker* (Volmary) wurden für zwei Stunden in deionisiertem Wasser inkubiert und anschließend mit 2 % Natriumhypochlorit (NaOCL) für 6 min sterilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit sterilem destilliertem Wasser wurden die Samen unter sterilen Bedingungen auf 0,6 % (w/v) Plant Agar Platten ausgebracht und für die Keimung vier Tage in kompletter Dunkelheit und weitere vier Tage bei 14 h Licht mit einer Lichtintensität von $220 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ gelagert. Die Temperatur betrug je nach Experiment 24 °C oder 28 °C während der Lichtphase und 18 °C während der Dunkelheit.

Nach acht Tagen wurden die Keimlinge in Töpfe (Durchmesser 11 cm), getopft, die mit Substrat aus autoklavierten Sand-Seramis-Gemisch (2:1 w/w), gefüllt waren (II.2.1.2). Die Anzucht der Pflanzen fand in einer Anzuchtammer (MobyLux GroBanks; Tabelle II-2) mit folgenden Bedingungen statt: 14 h Licht ($220 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) / 10 h Dunkelheit, 65 % relative Luftfeuchte und einer CO₂ Konzentration von 360- 400 ppm. Die Temperatur betrug je nach Experiment 24 °C oder 28 °C während der Lichtphase und 18 °C während der Dunkelheit.

II.2.1.2 Pflanzenbehandlung

Die Experimente wurden mit drei unterschiedlichen Behandlungsgruppen durchgeführt:

- AMF: Mykorrhiziert unter Phosphatmangel (50 μM P):
Substrat enthält pro Topf 4-5 g eines *Rhizophagus irregularis* Inokulats (10.000 Sporen/g) research grade (Tabelle II-1)
- 50 μM P Nicht-mykorrhiziert unter Phosphatmangel (50 μM P):
Substrat enthält pro Topf 4-5 g eines Carrier Materials (Tabelle II-1)
- 1000 μM P Nicht-mykorrhiziert optimal mit Phosphat versorgt (1000 μM P):
Substrat enthält pro Topf 4-5 g eines Carrier Materials (Tabelle II-1)

Die Pflanzen wurden einmal wöchentlich mit modifizierter 0,5x-Hoagland-Nährlösung gegossen (Tabelle II-6). Die Nährlösung enthielt dabei unterschiedlichen Phosphatkonzentrationen von 50 μM und 1000 μM Phosphat (P_i). Zusätzlich wurden die Pflanzen ab der zweiten Woche in Substrat zusätzlich einmal wöchentlich mit Brauchwasser gegossen.

II.2.2 Physiologische Messungen

II.2.2.1 Gaswechselfmessungen

Die Gaswechselfmessungen wurden mit dem Li-COR 6400XT (Tabelle II-2) durchgeführt. Für die Aufzeichnung der photosynthetischen Parameter wurden mindestens acht Pflanzen pro Behandlung mit folgenden Einstellungen gemessen:

Tabelle II-9: Einstellung Licor 6400XT

Parameter	Einstellung
Blocktemperatur	22 °C
Relative Luftfeuchte	65 %
Lichtintensität	1300 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (90% red and 10% blue light)
Flow rate	300 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}$

Die Messungen wurden von dem zweiten voll entwickelten Blatt 4,5 Wochen nach Inokulation an drei aufeinander folgende Tage zwischen 9 h und 15 h durchgeführt. Die photosynthetischen Parameter wurden bei einer CO_2 -Konzentration von 400 ppm und 1000 ppm aufgenommen. Nach Abschluss der Messungen wurde das gemessene Blatt am darauffolgenden Tag nach vier Stunden Licht für die Metabolit- und die Transkriptanalysen geerntet.

II.2.2.2 Aufnahme der Wachstumsparameter

Frisch- und Trockengewicht von Spross und Wurzeln wurde von acht bis zehn Pflanzen fünf Wochen nach Inokulation ermittelt. Für die Bestimmung des Trockengewichts wurde das Material für sieben Tage bei 90 °C getrocknet.

II.2.2.3 Bestimmung der Bindungseigenschaften des Substrats

Die Bestimmung der Wasserbindekapazität wurde von der Bodenphysik des Instituts für Bodenkunde der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Hierbei wird der pF Wert, die Energie, mit der das Bodenwasser entgegen der Schwerkraft im Boden gehalten wird und der dazugehörige Wassergehalt [Vol %] des verwendeten Substrats bestimmt. Mit Hilfe des über das Topfgewicht ermittelten Wassergehalt [Vol %] während des Experiments, ist es möglich auf den pF Wert zu schließen und eine Aussage über die Wasserversorgung der Pflanze zu treffen.

II.2.2.4 Elementaranalyse

Für die Elementaranalyse wurden 40 mg des getrockneten und homogenisierten Sprossmaterials verwendet. Die Proben wurde bei 480 °C für 14 Stunden vermuffelt (Muffelofen M104; Tabelle II-2). Nach dem Abkühlen wurde 1 ml einer 1:3 HNO₃ Lösung auf die Proben gegeben und für zehn Minuten inkubiert bevor 9 ml „ultra-pure-water“ hinzugegeben wurden. Über Blaubandfilter (Tabelle II-1) wurde die Lösung filtriert. Das Filtrat wurde im Weiteren für die ICP-MS-Analyse (II.2.2.4.1) und zur photometrische Phosphatbestimmung (II.2.2.4.2) verwendet.

II.2.2.4.1 ICP-MS-Analyse

Die ICP-MS Analyse wurde vom Institut für Pflanzenernährung der Leibniz Universität Hannover durchgeführt. Nach Aufbereitung der Probe (II.2.2.4) wurde diese in die ICP-MS (ICP-MS, 7500 CX, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA, 2009) injiziert. Bei der ICP-MS Analyse wird mit Hilfe von Argonplasma die Probe auf 5000-10.000 °C erhitzt, wodurch diese ionisiert wird. Die Ionen gelangen über eine Öffnung (Cones) und ein Linsensystem (Abtrennung nicht ionisierter Partikel) in das Messgerät. Ein Quadropol filtert die gewünschte Masse (m/z). Der Detektor kann im Multiplier- sowie im Analogmodus messen.

II.2.2.4.2 Photometrische Phosphatbestimmung

Die photometrische Phosphatbestimmung wurde nach der Ammoniumvanadat-molybdatfärbung (Gericke und Kurmies, 1952) durchgeführt. Hierzu wurden gleiche Volumina von Probe und Färbelösung (Tabelle II-10) vereinigt und nach 20-minütiger Inkubation die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen. Über eine angelegte Standardreihe aus einer Phosphat-Standard-Lösung (Merck; Tabelle II-1) konnte auf die Phosphatmenge der Probe geschlossen werden.

Tabelle II-10: Komponenten der Färbelösung

Komponente	
Salpetersäure	1:3 (65 %)
Ammoniumvanadat Lösung	0,125 g in 50 ml dest. Wasser lösen +1000 µl 65 %ige Salpetersäure
Ammoniummolybdat Lösung	2,5 g/50 ml dest. Wasser

II.2.2.5 Quantifizierung der Mykorrhizierung

Der Mykorrhizierungsgrad der Pflanzen wurde mittels pflanzlicher und pilzlicher Markergene bestimmt (Gaude et al., 2012; Harrison et al., 2002). Vor Beginn der Versuche wurden zwei bis drei Pflanzen für eine Testfärbung geerntet und pilzliche Strukturen mittels *Trypan Blue* Färbung (II.2.2.5.1) beziehungsweise WGA Alexa Fluor® 488 (II.2.2.5.2) sichtbar gemacht.

II.2.2.5.1 *Trypan blue* Färbung

Die *Trypan blue* Färbung ermöglicht es, die pilzlichen Strukturen anzufärben und sichtbar zu machen. Sie erlaubt somit eine Überprüfung auf Mykorrhizierung. Die *Trypan blue* Färbung wurde nach der Methode von Phillips und Hayman (1970) durchgeführt. Hierzu wurden die Wurzelproben für 10 min bei 95 °C in 10 % (w/v) KOH inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde für die Färbung die *Trypan blue*-Färbelösung (Tabelle II-11) zur Probe gegeben, sodass die Wurzeln bedeckt waren. Die Färbung erfolgte bei 95 °C für 4 min. Anschließend wurde überschüssiger Farbstoff abgewaschen und die gefärbte Probe in Glycerin aufbewahrt. Die Detektion erfolgte durch ein Binokular oder Mikroskop.

Tabelle II-11: Komponenten der *Trypan blue* Färbelösung

Komponente	
<i>Trypan blue</i>	2 %
Glycerol	300 ml
Milchsäure	300 ml
ddH ₂ O	400 ml

II.2.2.5.2 WGA Alexa fluor Färbung

Alternativ zur *Trypan blue* Färbung kann eine Färbung mit Wheat Germ Agglutinin (WGA) Alexa Fluor® 488 durchgeführt werden. Das Weizenkeim Agglutinin ist ein Lektin, welches an Sialinsäure und *N*-Acetylglucosamin-Rückstände bindet. Alexa Fluor® 488 besitzt ein Anregungsmaximum bei 495 nm und einem Emissionsmaximum bei 519 nm. Für die Färbung wurden die Wurzelproben für 10 min bei 95 °C in 10 % (w/v) KOH inkubiert. Nach gründlichem Waschen wurde für die Färbung der Farbstoff zur Probe gegeben, sodass die Wurzeln bedeckt waren. Die Färbung erfolgte für 24 h bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde die Probe nochmals mit Wasser gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Die Detektion erfolgte unter einem Fluoreszenzbinokular mit den oben genannten Wellenlängen.

II.2.3 Molekularbiologische Methoden

II.2.3.1 Extraktion der Gesamt-RNA

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde das Blattmaterial bzw. das Wurzelmaterial nach der Ernte unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und homogenisiert. Für die Isolation der RNA mittels Trizol (Chomczynski, 1993) wurden 40 mg des Blattmaterials und 60 mg des Wurzelmaterials verwendet. Hierzu wurde 1 ml Trizol (Tabelle II-6) zu der Probe gegeben und für 15 min geschüttelt. Die Phasentrennung wurde durch Zugabe von Chloroform (0,2 Volumen) und Zentrifugation (16.000 xg, 15 min, 4 °C) erreicht. Der Überstand wurde mit

gleichen Volumen Chloroform für eine weitere Aufreinigung vermischt und nochmals zentrifugiert (16.000 xg, 10 min, 4 °C). Nach Zugabe von eiskaltem Ethanol (96 % (v/v)) zum Überstand und die anschließende Fällung bei -20 °C (30 min) wurde die Probe nochmals zentrifugiert (16.000 xg, 15 min, 4 °C). Die gefällte RNA wurde gewaschen und konnte nach kurzer Trocknung mit Wasser gelöst werden. Die Konzentration und Qualität der RNA wurde photometrisch (ELISA-Reader, Tabelle II-2) und mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt (II.2.3.4).

II.2.3.2 Aufbereitung der Gesamt-RNA für die RNA-Sequenzierung

Für die RNA-Sequenzierung wurde RNA wie unter Punkt II.2.3 beschrieben isoliert. Die RNA aus acht Proben wurde vereinigt, sodass pro Replikat und Behandlungsgruppe eine Probe analysiert wurde. Der DNA-Verdau und eine nochmalige Aufreinigung der RNA wurde mittels RNeasy MinElute Cleanup Kit (Tabelle II-4) nach Protokoll durchgeführt.

II.2.3.3 RNA-Sequenzierung

Die RNA-Sequenzierungsarbeiten wurden von der Firma GATC Biotech (Konstanz) übernommen. Nach der Isolation der poly(A)+ RNA und Fragmentierung der mRNA wurde eine cDNA-Synthese durchgeführt. Im Anschluss der Adapter-Ligation und PCR-Amplifikation konnte die cDNA mittels Illumina-Sequenzierung (single reads, Readlänge 1x50 bp, 30 Mio Reads) sequenziert werden.

Die Qualität der Rohdaten der Sequenzierung wurden mit der FastQC überprüft und mit der Trimmomatic Software prozessiert. Um die Rohdaten zu trimmen wurde der *Adapter Clipper*, *Leading Trimmer*, *Trailing Trimmer* und *Sliding window trimmer* des Programms mit den vorhandenen Einstellungen genutzt. Die prozessierten Daten wurden anschließend in die CLC genomic Workbench 7.5.1 geladen. Mit Hilfe des *RNASEq Analysis Tool* wurden die Sequenzen auf das Referenzgenom ITAG2.3 von Tomate *mapped*. Hierbei wurden die Standardeinstellungen des Programms verwendet. Lediglich die Parameter für *Length*- und *Similarity fraction* wurden abgeändert.

Tabelle II-12: Mapping Einstellungen in der CLC genomic workbench 7.5.1

Parameter	Wert
<i>Match score</i>	1
<i>Mismatch cost</i>	2
<i>Insertion cost</i>	3
<i>Deletion cost</i>	3
<i>Length fraction</i>	0,8
<i>Similarity fraction</i>	0,95

Die RPKM-Werte wurden für die Quantifizierung der absoluten Expression ermittelt (Mortazavi et al., 2008). Die Statistik wurde mit der empirischen Analyse des DGE Tools der CLC genomic Workbench 7.5.1, welches eine edgeR Analyse ist (Robinson et al., 2010) und der Benjamini-Hochberg Korrektur des p -Wertes (Benjamini und Hochberg, 1995) durchführt. Zur Überprüfung der Daten wurde ein weiterer statistischer Test durchgeführt. Hierzu wurde die Bioconductor DESeq2 Analyse verwendet (Love et al., 2014).

II.2.3.4 Trennung der Nukleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Gelelektrophorese beruht auf der Fähigkeit von Nukleinsäuren, sich in einem elektrischen Feld zu bewegen. Dabei wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren zur Kathode. Die Geschwindigkeit der Bewegung wird durch die Größe der Moleküle, die Konformation, die Porengröße der Matrix, die Spannungstärke und die Ionenstärke des verwendeten Puffers bestimmt (Reinard, 2010).

Die Agarosegelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuren wie DNA und RNA genutzt. Sie diente der Kontrolle der RNA-Isolierung (II.2.3) sowie zur Kontrolle der real-time qPCR (II.2.3.6). Es wurden 2 % ige Gele verwendet, denen 0,25 % (v/v) Ethidiumbromid (1 % ige Lösung) zugesetzt wurden. Ethidiumbromid interkaliert in die Doppelstränge der Nukleinsäuren und macht diese bei UV-Bestrahlung über Fluoreszenzstrahlung sichtbar. Die vollständig polymerisierten Gele wurden in entsprechende Laufkammern gelegt und mit 1x TAE-Puffer mit 0,25 % (v/v) Ethidiumbromid (1 % ige Lösung) (Tabelle II-6) vollständig bedeckt. Die Proben wurden mit 0,2 Volumen Ladebuffer (Tabelle II-6) versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung von Größe und Konzentration der aufgetrennten Fragmente wurde zusätzlich ein passender Größenstandard (II.1.7) aufgetragen. Je nach Größe des Gels erfolgte die Elektrophorese bei einer Feldstärke von 400-1000 V/m für 25-60 min.

II.2.3.5 cDNA-Synthese

Während der cDNA-Synthese wird eine RNA-Matrize durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase in einen komplementären DNA-Strang umgeschrieben. Um DNA

Kontaminationen zu verhindern, war der erste Schritt der cDNA-Synthese ein DNase-Verdau für 30 min bei 37 °C (Tabelle II-13).

Tabelle II-13: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den DNase Verdau

Komponente	Endkonzentration
DNaseI (Thermo Scientific)	1U
DNase Puffer (Thermo Scientific; Tabelle II-6)	1x
RNA	80-100 ng
Wasser	Ad 12 µl

Die DNase wurde bei 70 °C für 15 min inaktiviert bevor 50 pmol eines „random nonamer“ Oligonukleotids (Tabelle II-7) hinzugegeben wurden. Das Binden des Oligonukleotids an die RNA wurde bei 70 °C für 5 min begünstigt.

Für die reverse Transkription des RNA-Stranges wurde das Reaktionsgemisch (Tabelle II-14) zu den RNA-Proben gegeben und bei 37 °C für 60 min inkubiert. In jedem Experiment wurde zusätzlich drei Reaktionen ohne Reverse Transkriptase durchgeführt, um den DNase-Verdau zu überprüfen. Zur Bestimmung der Genexpression mittels real-time qPCR wurden 2 µl der cDNA in die PCR eingesetzt

Tabelle II-14: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die reversen Transkription

Komponente	Endkonzentration
dNTP-Mix	1 mM
MMLV-Puffer (Promega; Tabelle II-6)	1x
MMLV-RT (Promega)	200 U
Wasser	Ad 7 µl

II.2.3.6 Real-time quantitative PCR (real-time qPCR)

Die real-time qPCR wurde mit dem ABI PRISM 7300 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und der Verwendung des Platinum SYBR Green qPCR Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt.

Die real-time qPCR ist eine Weiterentwicklung der klassischen PCR, die nicht nur die Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente, sondern gleichzeitig auch eine Quantifizierung der Produkte nach jedem Zyklus erlaubt. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green I genutzt, der erst nach der Interkalierung in doppelsträngige DNA-Fragmente und Blaulichtbestrahlung eine spezifische Fluoreszenzstrahlung abgibt. Die detektierte Fluoreszenz kann durch die dazugehörige Software dargestellt werden. Zu Beginn der PCR findet eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt, während mit fortschreitender PCR die Sättigung erreicht wird. Zur Quantifizierung wird die Zykluszahl (C_T -Wert) benutzt, bei

der sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich vom Hintergrund abhebt. Daher wird bei Einsatz einer hohen Menge Ausgangsmaterial der C_T -Wert früher erreicht. Die C_T -Intensität des Signals ist somit umgekehrt proportional zur Menge der gebildeten dsDNA. Mit Hilfe von Standardreihen kann auf die Ausgangskonzentration der untersuchten Matrize geschlossen werden. Zusätzlich findet eine Standardisierung durch Haushaltsgene statt, wodurch Unterschiede in der mRNA ausgeglichen werden. Die Reaktion wurde gemäß den Herstellerangaben mit dem *Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix-UDG with Rox* (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug, abweichend zu den Herstellerangaben, 20 μ l pro Reaktion (Reinard, 2010).

Tabelle II-15: Zusammensetzung der qPCR

Komponente	Endkonzentration
PCR Puffer	1x
Primer forward	0,2 μ M
Primer revers	0,2 μ M
cDNA	0,2 pg-2 ng/ μ l
Wasser	Ad 20 μ l

Tabelle II-16: Termoprofil der qPCR

Reaktionsschritt	Temperatur [°C]	Dauer	Zyklen
Carry over protection	50	2 min	1x
Initiale Denaturierung	95	2min	1x
Denaturierung und	95	15 sek	40x
Synthese	60	1	

II.2.4 Analytische Methoden

II.2.4.1 Metabolitisolation und Gaschromatographie-Massenspektrometrie

Zur Isolation der wässrigen Metabolite (polaren Phase) wurden 40 mg in flüssigen Stickstoff gemörserteres Pflanzenmaterial mit 1 ml vorgekühlten Extraktionsmix (Tabelle II-6), der 5 μ l 2 M 13 C-Sorbitol als internen Standard enthält, versetzt. Die Proben wurden durch 5-minütiges schütteln bei 4 °C homogenisiert. Die Phasentrennung erfolgte durch 2-minütige Zentrifugation (16.000 x g, 4 °C). 500 μ l des Überstandes wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 250 μ l ultrareines Wasser für 10 sek gemischt. Im Anschluss an eine erneut 2-minütige Zentrifugation (16100 x g, 4 °C) wurden 250 μ l des Überstandes in ein 0,1 ml Mikroinsert (Roth) überführt, welcher sich in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befand. Die vollständige Trocknung der Proben fand über Nacht in einer Speed vac statt. Die

Derivatisierung, die Verwendung von zusätzlichen Standards und die Probeninjektion wurden wie in Lisec et al. (2006) beschrieben durchgeführt. Chromatogramme und Massenspektren wurden mittels ChromaTOF® (LECO Corporation, St. Joseph, Mi, USA) Software ausgewertet. Zur Identifikation der Substanzen und zur Berechnung des Metabolitgehalts wurde eine Standardreihe der Reinsubstanz verwendet.

II.2.4.2 Markierung und Verfolgung von schwerem Kohlenstoff

Für die Verfolgung des markierten Kohlenstoffs innerhalb der Pflanze, wurden Pflanzen aller drei Behandlungsgruppen, wie unter II.2.1.1 beschrieben, angezogen. Für die Markierung wurde der Spross drei Stunden nach Beginn der Lichtphase mit einer Plastiktüte umhüllt (Abbildung II-1) und für 90 min mit dem schweren Kohlenstoffdioxid-Isotop ($^{13}\text{CO}_2$, 400 ppm, 0,5 bar) begast. Im Anschluss wurde das zweite voll entwickelte Blatt, der Stiel (außerhalb der Plastiktüte) und die Wurzel direkt nach dem Beenden des Markierens sowie nach einer, zwei, drei und vier Stunden geerntet und unverzüglich in Stickstoff eingefroren. Zusätzlich wurden nicht begaste Pflanzen geerntet, um die Daten um den Anteil an normal vorkommenden ^{13}C in der Luft zu korrigieren. Das Pflanzenmaterial wurde homogenisiert und wie unter Punkt II.2.4.1 beschrieben für die Metabolitanalyse aufgearbeitet.

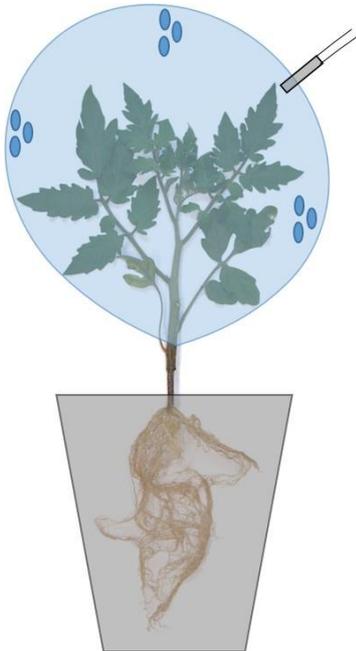


Abbildung II-1: Experimenteller Aufbau für die Markierung und Verfolgung des schweren Kohlenstoffisotops. Der Spross der Pflanze wird mit einer handelsüblich durchsichtigen Plastiktüte (Gefrierbeutel) umhüllt und mit Klebeband verschlossen. Der Luftaustausch ist durch Löcher in der Tüte gewährleistet. Über einen Schlauch wird das $^{13}\text{CO}_2$ mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 l/min in die Tüte geleitet.

II.2.5 Statistische Methoden

II.2.5.1 Arithmetischer Mittelwert

Der Mittelwert ist der Wert, bei dem die Summe der negativen Abweichung der einzelnen Werte vom Mittelwert gleich ist der Summe der positiven Abweichungen

$$x_{arith.Mittel} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

Formel II-1: Arithmetischer Mittelwert. $x_{arith. Mittel}$ = arithmetischer Mittelwert, n = Anzahl der Messwerte, x = Messwerte

II.2.5.2 Standardabweichung

Die Standardabweichung ist ein Maß für die Streuung der Einzelwerte um ihren Mittelwert. Die hier berechnete Standardabweichung gibt eine erwartungsgetreue Schätzung der Standardabweichung der Grundgesamtheit anhand einer Stichprobe wieder.

$$Stabw = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - x_{arith.Mittel})^2}$$

Formel II-2: Standardabweichung. $Stabw$ = Standardabweichung, n = Stichprobenumfang, $x_{arith. Mittel}$ = arithmetischer Mittelwert; x_i = Einzelstichprobenwerte

II.2.5.3 Student's t-Test

Mit dem t-Test als Zweistichprobentest kann getestet werden, ob der Unterschied zweier Stichproben statistisch signifikant ist. Der Test berücksichtigt die Varianz der Stichproben. Formel 2.7 zeigt die Berechnung des t-Wertes.

$$t - Test = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{\frac{SA_1^2}{n_1} + \frac{SA_2^2}{n_2}}}$$

Formel II-3: Student's t-Test: x_1 = Mittelwert 1, n_1 = Stichprobenumfang 1, SA_1 = Standardabweichung von x_1 , x_2 = Mittelwert 2, n_2 = Stichprobenumfang 2, SA_2 = Standardabweichung von x_2

Im Folgenden werden Unterschiede mit $p < 0,05$ ausdrücklich als signifikant unterschiedlichen bezeichnet.

III. Ergebnisse

III.1 *Physiologische Charakterisierung von Tomate in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose*

Im ersten Abschnitt der Arbeit soll die Physiologie von Tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) in arbuskulärer Mykorrhiza-Symbiose untersucht werden. Wie unter Punkt I.5 beschrieben, bietet die Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen, wie *Rhizophagus irregularis*, einen Vorteil für die Pflanze. Neben einer verbesserten Versorgung mit Nährstoffen und Wasser durch den Pilz zeigen Pflanzen in Symbiose auch eine erhöhte Resistenz gegen verschiedene Stressarten wie zB. Salz-, Hitze-, oder Trockenstress. Mykorrhizierte Pflanzen zeigen eine schnellere Adaption während und eine bessere Regeneration im Anschluss an Stresssituationen (Zhu et al., 2010; Zhu et al., 2012; Sheng et al., 2008; Lee et al., 2012; Maya und Matsubara, 2013). Im Gegenzug versorgt die Pflanze den Pilz mit Kohlenstoff aus der Photosynthese (Harrison, 1999). Obwohl durch die Mitversorgung des Pilzes ein Teil des Kohlenstoffs in Form von Zuckern verloren geht, und der Pflanze somit nicht mehr zur Verfügung steht, zeigen Experimente, dass dies keine negativen Auswirkungen auf die Biomasse und das Wachstum der Pflanzen hat (Kaschuk et al., 2010; Gutjahr et al., 2009; Sieh et al., 2013; Sheng et al., 2008). Im Gegenteil, die Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen resultiert in einer Erhöhung der Gesamtbiomasse der Pflanze. Hierbei zeigen mykorrhizierte *Medicago truncatula* Pflanzen einen Anstieg des Trockengewichts des Sprosses um 20 % und der Wurzel um 50 % (Wu und Xia, 2006; Gianinazzi-Pearson et al., 2006). Es wird davon ausgegangen, dass die pflanzliche Photosynthese durch die Symbiose mit den arbuskulären Mykorrhizapilzen gesteigert wird, wobei die Regulation jedoch völlig unklar ist (Birhane et al., 2012; Sheng et al., 2008; Wright et al., 1998a; Wright et al., 1998b; Zhu et al., 2012).

In dieser Arbeit soll sowohl der Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die Photosynthese als auch die Veränderung des Transkriptoms und des Metaboloms des Blattes untersucht werden. Hierzu wurden Pflanzen bei zwei unterschiedlichen Temperaturen (24 °C und 28 °C) angezogen und untersucht. Zur Bestimmung des Vorteils der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose bei Tomate, wurden vergleichende Analysen von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen bei geringer Phosphatversorgung (50 µM Phosphat) durchgeführt, die ein vergleichbares Wachstum und einen gleichen Sprossphosphatgehalt aufweisen. Hierdurch sollte der positive Effekt von Phosphat auf die Physiologie der Pflanze reduziert werden. Zur Differenzierung zwischen phosphatabhängigen und phosphatunabhängigen Effekten dienten optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen (1000 µM Phosphat) (Boldt et al., 2011; Cervantes-Gómez et al., 2016; Schweiger und Muller, 2015).



Abbildung III-1: Wachstumsphänotyp mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Wachstumsphänotyp von mykorrhizierten (AMF, links) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 μM P, mitte) und optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000 μM P, rechts) nach fünfwöchiger Symbiose bei 28 °C Anzuchttemperatur.

Abbildung II-1 zeigt den Wachstumsphänotyp nach fünfwöchiger Symbiose. Mykorrhizierte (AMF) und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel (50 μM P) zeigten keinen Wachstumsunterschied. Lediglich die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000 μM P) zeigten ein erhöhtes Wachstum (Tabelle III-2).

Die erfolgreiche Kolonialisierung der Wurzel durch den arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde vor jedem Experiment durch Färbung der pilzlichen Strukturen mittels WGA Alexa Fluor® 488 sowie *Trypan blue* getestet (Abbildung III-2a-e). Da durch die Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen ein starke und spezifische Reprogrammierung der pflanzlichen Wurzeln stattfindet (Gaude et al., 2012), ist die Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads mittels induzierter Markergene im Anschluss an die physiologischen Messungen und der Ernte der Pflanzen möglich. Hierbei wurden zum einen die Genexpression eines induzierten Phosphattransporters (*SIPt4*; Solyc06g051850) (Harisson et al., 2002) und zum anderen die pilzliche 18S rRNA (Gaude et al., 2012) bestimmt (Abbildung III-2f).

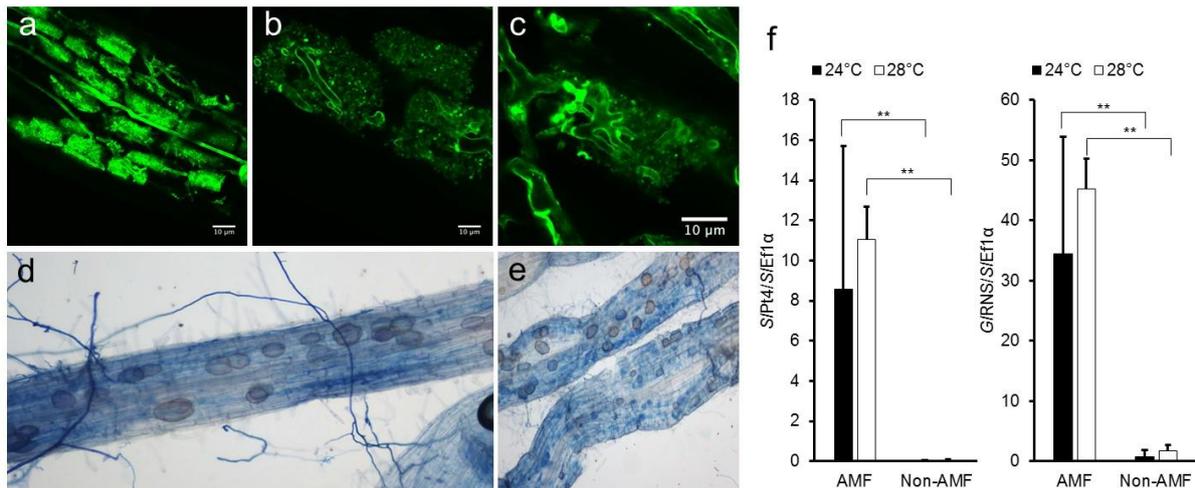


Abbildung III-2: Bestimmung des Mykorrhizierungsgrads nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis*. Färbung pilzlicher Strukturen durch WGA Alexa Fluor® 488 (2a-c) und *Trypan blue* (2d: 100x Vergrößerung; 2e: 40x Vergrößerung). Die Bestimmung des Expressionslevels des Phosphattransporters 4 (*SIP4*; Solyc06g051850) und der pilzlichen 18S rRNA erfolgte mit der real-time qPCR. Als Standardgen diente der Elongationsfaktor 1α (*SIEF1α*; Solyc06g009970). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Die Abbildung III-2a-c zeigen WGA Alexa Fluor® 488 gefärbte Wurzeln. Die grüne Fluoreszenz zeigt pilzliche Strukturen in Form von Hyphen und Arbuskeln. Die Abbildung III-2d-e zeigen mykorrhizierte Wurzeln, die mit *Trypan blue* gefärbt wurden. Dieser Färbemethode ermöglicht es, die pilzlichen Strukturen anhand der starken und dunklen Blaufärbung zu erkennen. Neben Pilzhyphen konnten auch Vesikeln, die Speicherorgane des Pilzes, detektiert werden. Zur Quantifizierung des Pilzes wurden die gefärbten Pflanzenwurzeln mit der *Gridline Intersection* Methode ausgezählt (Brundrett et al., 1996). Es konnte für die ausgezählten Pflanzen ein Mykorrhizierungsgrad von 65-75 % sowie eine Kolonisierungsdichte und ein Arbuskelgehalt von mindestens 40 % in den untersuchten Wurzeln detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Der Grad der Mykorrhizierung war vergleichbar mit bereits publizierten Daten, in denen dieser Grad als eine ausreichende Mykorrhizierung beschrieben wird (Fellbaum et al., 2014; Salvioli et al., 2012; Schweiger et al., 2014b; Sheng et al., 2008).

Abbildung III-2f zeigt die molekularbiologische Bestimmung des Mykorrhizierungsgrades anhand des induzierten Phosphattransporters 4 und der pilzlichen 18S rRNA. Beide Gene wurden ausschließlich in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen exprimiert.

Als weitere Kontrolle wurde die Nährstoffzusammensetzung des Sprosses untersucht. Hier wurde besonderes Augenmerk auf den Sprossphosphatgehalt gelegt. Dieser wurde neben der photometrischen Bestimmung (II.2.2.4.1, Tabelle III-2) zusätzlich mittels ICP-MS bestimmt (Tabelle III-1). Durch die photometrische Phosphatbestimmung konnten für die mykorrhizierten Pflanzen ein Sprossphosphatgehalt von 1,44 mg/g Trockengewicht bei 24 °C sowie 28 °C

Anzuchttemperatur bestimmt werden. Die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten bei beiden Anzuchttemperaturen Sprossphosphatgehalte von 1,45 mg/g und 1,28 mg/g Trockengewicht. Beide Methoden zeigten keinen Unterschied im Sprossphosphatgehalt mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen unter Phosphatmangel nach fünfwöchiger Symbiose. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten hingegen mit 2,52 mg/g und 3,18 mg/g Trockengewicht bei 24 °C und 28 °C einen signifikant höheren Sprossphosphatgehalt. Die vollständige Nährstoffzusammensetzung des Sprosses von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel sowie der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C wurden zusätzlich mittels ICP-MS untersucht.

Tabelle III-1: ICP-MS Bestimmung (II.2.2.4) der Nährstoffzusammensetzung des Sprosses (28 °C Anzucht). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$.

Nährstoffe [mg/g TG]	AMF	50 µM P	1000 µM P
Natrium	7,42±0,5	7,19±0,65	23,89±8,62
Magnesium	18,53±2,54	16,8±0,16	31,10±12,67
Kalium	19,65±2,39	19,65±3,1	42,82±2,23
Calcium	34,39±4,43	31,57±1,66	71,85±27,74
Phosphat	1,47±0,11	1,53±0,22	8,23±0,14
Bor	0,38±0,02	0,38±0,06	1,31±0,51
Aluminium	0,68±0,04	0,69±0,07	1,51±0,79
Silicium	1,61±0,14	1,77±0,38	3,22±1,49
Mangan	0,11±0,02	0,10±0,002	0,14±0,08
Eisen	0,53±0,09	0,57±0,1	0,94±0,42
Nickel	0,05±0,01	0,05±0,02	0,09±0,04
Kupfer	0,04±0,02	0,04±0,01	0,08±0,08
Zink	0,06±0,01	0,05±0,01	0,10±0,02
Molybdän	0,01±0,001	0,01±0,002	0,02±0,01

Die ICP Analyse zeigte zwischen mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen unter Phosphatmangel keine Unterschiede in den untersuchten Nährstoffsalzen. Der

Phosphatgehalt zeigte zu den photometrischen Messungen mit 1,47 mg/g Trockengewicht für die mykorrhizierten Pflanzen und 1,63 mg/g Trockengewicht für die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel vergleichbare Werte. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten auch in der ICP-MS Analyse eine signifikante Erhöhung (8,23 mg/g Trockengewicht). Für die weiteren Nährstoffsalze konnten lediglich für Natrium und Kalium signifikante Unterschiede in der optimal versorgten Pflanzen detektiert werden.

In den weiteren physiologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden Pflanzen verwendet, die eine gute Mykorrhizierung aufwiesen und einen gleichen Sprossphosphatgehalt zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten.

III.1.1 Untersuchung des Wachstums von Tomate durch die arbuskuläre Mykorrhizasymbiose

Wie schon in Abbildung III-1 gezeigt, zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen keinen Wachstumsunterschied. Um den Wachstumseffekt genauer zu charakterisieren wurden die Frischgewichte von Spross und Wurzel, das Trockengewicht des Sprosses als auch das Spross/Wurzel-Verhältniss bestimmt. Tabelle III-2 zeigt die Wachstumsparameter von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel sowie der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulärer Mykorrhizapilz (*Rhizophagus irregularis*) bei Anzuchttemperaturen von 24 °C und 28 °C. Weder bei 24 °C, noch bei 28 °C Anzuchttemperatur konnte ein signifikant verändertes Wachstum durch den Pilz beobachtet werden. Das Sprossfrischgewicht lag bei mykorrhizierten Pflanzen bei 24 °C Anzuchttemperatur bei 1,26 g. Die nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen zeigten mit 1,21 g ein um 1 % reduziertes Sprossfrischgewicht. Bei 28 °C zeigten Pflanzen aller Behandlungsgruppen, im Vergleich zu der Anzucht bei 24 °C, ein gesteigertes Sprossfrischgewicht, jedoch zeigten auch hier die beiden Behandlungsgruppen unter Phosphatmangel keine signifikanten Unterschiede (AMF: 2,29 g; 50 µM P: 2,15 g). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten bei beiden Anzuchttemperaturen mit 4,32 g und 7,92 g ein signifikant höheres Sprossfrischgewicht gegenüber den Pflanzen unter Phosphatmangel. Auch hier bewirkte die Temperaturerhöhung ein gesteigertes Wachstum.

Für das Wurzelfrischgewicht konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bei mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel festgestellt werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten bei 24 °C Anzuchttemperatur ein Wurzelfrischgewicht von 0,67 g, die nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen wiesen ein Wurzelfrischgewicht von 0,8 g auf. Die Erhöhung der Anzuchttemperatur hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Wurzelfrischgewicht. Mykorrhizierte Pflanzen produzierten im Durchschnitt 0,97 g Wurzelmasse, nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel 0,95 g. Wie auch bei dem

Parameter des Sprossfrischgewichtes zeigten optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen mit 2,69 g und 3,31 g ein signifikant erhöhtes Wurzelfrischgewicht.

Die Aufnahme des Sprosstrockengewichts ermöglicht es Unterschiede im Wassergehalt des Pflanzenmaterials zu untersuchen. Unter beiden Anzuchttemperaturen zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen keinen Unterschied. Das Sprosstrockengewicht entsprach bei beiden Anzuchtbedingungen etwa 10 % des Sprossfrischgewichtes.

Aufgrund des unveränderten Spross- und Wurzelfrischgewichts durch den arbuskulären Mykorrhizapilzes konnte auch keine Unterschiede in dem Spross/Wurzel-Verhältnis ermittelt werden. Es konnte für die mykorrhizierten Pflanzen ein Verhältnis von 1,78 ermittelt werden. Das im Verhältnis zur mykorrhizierten Pflanzen leicht reduzierte Sprossfrischgewicht und leicht erhöhte Wurzelfrischgewicht von nicht-mykorrhizierten Pflanzen entsprach einem Verhältnis von 1,57. Durch das gesteigerte Sprosswachstum durch die erhöhte Anzuchttemperatur zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel ein Spross/Wurzel-Verhältnis von 2,54 und 2,35. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen wiesen in diesem Parameter mit 1,66 und 2,43 ebenfalls ähnliche Werte auf.

Folglich konnte nach fünfwöchiger Symbiose eine gute Mykorrhizierung festgestellt werden (Abbildung III-2), die jedoch zu diesem Zeitpunkt noch keinen Einfluss auf Wachstum und Sprossphosphatgehalt hatte.

Tabelle III-2: Wachstumsparameter der Pflanzen nach fünfwöchigen Symbiose bei 24 °C und 28 °C Anzuchttemperatur als auch nach zehnwöchigen Symbiose bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$.

Wachstumsparameter	Temperatur [°C]	Dauer [wpi]	AMF	50 µM P	AMF-50 µM P [%]	1000 µM P
Frischgewicht Spross [g]	24	5	1,26±0,34	1,21±0,19	+1,04	4,32±0,62
	28	5	2,29±0,16	2,15±0,93	+6,51	7,92±1,47
	28	10	11,51±2,62	5,33±1,32	+115,94	
Frischgewicht Wurzel [g]	24	5	0,67±0,82	0,80±0,13	-16,25	2,69±0,33
	28	5	0,97±0,18	0,95±0,46	+2,10	3,31±0,39
	28	10	4,65±0,44	2,74±0,35	+69,71	
Trockengewicht Spross [g]	24	5	0,17±0,05	0,17±0,02	0,00	0,66±0,10
	28	5	0,26±0,03	0,25±0,11	+4,00	0,99±0,10
	28	10	1,51±0,35	0,64±0,14	+135,94	
Verhältnis Spross/Wurzel [FG]	24	5	1,78±0,07	1,57±0,39	+13,38	1,66±0,43
	28	5	2,54±0,48	2,35±0,38	+8,09	2,43±0,46
	28	10	2,30±0,29	2,1±0,11	+9,52	
Phosphatgehalt [mg/g]	24	5	1,44±0,04	1,45±0,03	-0,69	2,52±0,32
	28	5	1,44±0,23	1,28±0,09	+12,50	3,18±0,23
	28	10	1,19±0,12	0,94±0,10	+26,60	

Um einen späteren Wachstumseffekt durch den arbuskulären Mykorrhizapilz zu beweisen (Schweiger et al., 2014b), wurden zusätzlich mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel für einen Zeitraum von zehn Wochen beobachtet (Abbildung III-3).



Abbildung III-3: Wachstumsphänotyp mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Wachstumsphänotyp von mykorrhizierten (AMF, links) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ($50 \mu\text{M P}$, rechts) nach zehnwöchiger Symbiose bei 28°C Anzuchttemperatur.

Abbildung III-3 zeigt den Wachstumsphänotyp mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Tomatenpflanzen unter Phosphatmangel nach zehnwöchiger Symbiose. Die mykorrhizierten Pflanzen zeigten ein deutlich gesteigertes Wachstum. Auch die aufgenommenen Wachstumsparameter (Tabelle III-2) zeigten den deutlichen Vorteil von mykorrhizierten Pflanzen gegenüber der nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel.

Die aufgezeichneten Parameter zeigten eine signifikante Steigerung des Sprossfrischgewichts um 115 % und Sprosstrockengewichts um +135 %. Die Wurzelbiomasse nahm durch die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz ebenfalls signifikant zu (70 %). Der Pilz hat zusätzlich einen Einfluss auf den Sprossphosphatgehalt. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten mit $1,19 \text{ mg/g}$ Trockengewicht einen signifikant gesteigerten (27 %) Sprossphosphatgehalt gegenüber ihrer nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen unter Phosphatmangel ($0,94 \text{ mg/g}$ Trockengewicht). Eine längere Symbiose führt somit zu einer verbesserten Phosphatversorgung und gesteigerten Wachstum der Pflanzen.

III.1.2 Untersuchung des Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf den Gaswechsel von Tomate

Um den Effekt der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die Physiologie der Pflanzen zu untersuchen, wurden im Folgenden Pflanzen analysiert, die keinen Unterschied in Frisch- und Trockengewicht sowie Sprossphosphatgehalt aufwiesen. Hierzu wurde die Photosynthese und Transpiration des zweiten voll entwickelten Blattes jeder Pflanze mittels Gaswechselfmessungen (Li-COR 6400XT) untersucht (Abbildung III-4). Zusätzlich wurde die photosynthetische Leistung pro interzellulären CO_2 berechnet. Die Messungen fanden an drei aufeinanderfolgenden Tagen zwischen 9:00 und 15:00 Uhr bei einer Lichtintensität von $1300 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, einer Luftfeuchtigkeit von 65 % und einer Blocktemperatur von $24 \text{ }^\circ\text{C}$ statt. Alle Parameter wurden bei CO_2 -Konzentration von 400 ppm und 1000 ppm durchgeführt. 400 ppm entsprach der CO_2 -Konzentration während der Anzucht. Bei einer CO_2 -Konzentration von 1000 ppm wird davon ausgegangen, dass keine Photorespiration stattfindet (Sharkey, 1988). Durch Erhöhung der Kohlenstoffdioxidkonzentration in der Zelle wird eine Limitierung der Photosynthese durch die Sauerstoffbindung des Enzyms RuBisCO verhindert (1.2). Hierdurch soll überprüft werden, ob das Enzym RuBisCO während der arbuskulärer Mykorrhiza-Symbiose eine höhere Aktivität bzw. Spezifität aufweist.

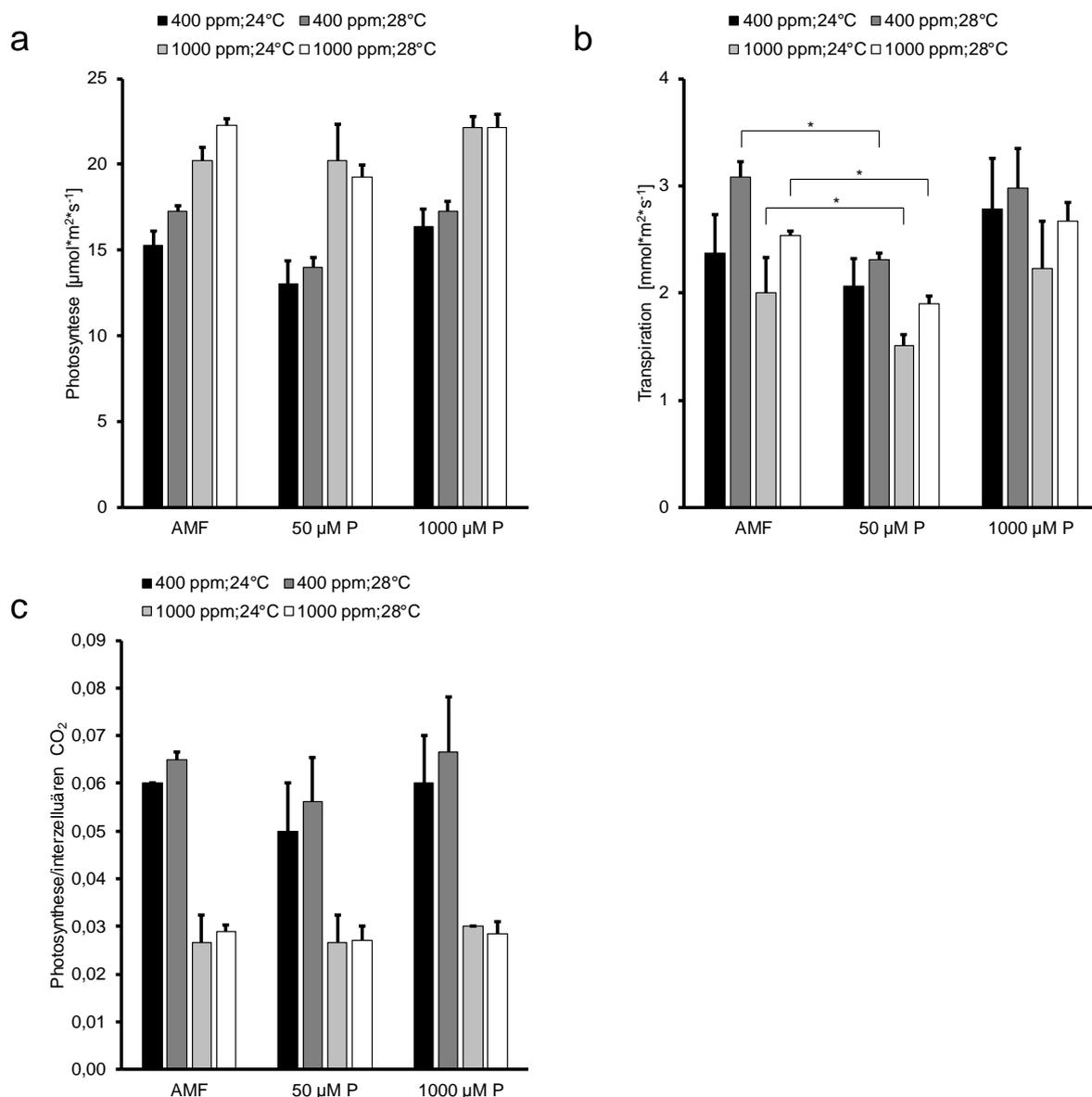


Abbildung III-4: Bestimmung photosynthetischer Parameter von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 $\mu\text{M P}$) und optimaler Phosphatversorgung (1000 $\mu\text{M P}$) nach 4,5-wöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei ambienten CO_2 Bedingungen (400 ppm) und erhöhten CO_2 Bedingungen (1000 ppm). Gemessen wurden die Photosynthese (a), Transpiration (b) und Photosynthese pro interzellulären CO_2 (c) des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an drei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$.

Tomatenpflanzen, die eine Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen ausgebildet hatten, zeigten im Vergleich zu nicht mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel bei beiden Anzuchttemperaturen (24 °C und 28 °C) eine erhöhte Photosynthese unter ambienten CO_2 -Bedingungen (400 ppm). Die Veränderungen in der Photosyntheseleistung zeigten jedoch keine signifikanten Unterschieden zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Bei 24 °C Anzuchttemperatur wiesen mykorrhizierte Pflanzen gegenüber der nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel mit 15,3

$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eine um 17 % erhöhte photosynthetische Leistung auf ($p=0,22$). Eine Erhöhung der Anzuchttemperatur auf 28 °C bewirkte einen Anstieg der Photosynthese von $15,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ auf $17,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ in mykorrhizierten Pflanzen und vergrößerte die Differenz zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen auf 23 % ($p=0,059$). Weiterhin zeigten die mykorrhizierten Pflanzen bei erhöhter Anzuchttemperatur trotz des Phosphatmangels die gleiche photosynthetische Leistung, wie die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen ($17,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen (1000 ppm) konnte bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C kein Unterschied in der photosynthetischen Leistung von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel gemessen werden ($p=0,44$). Beide Pflanzen zeigten eine Photosyntheseleistung von $20,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Wie zuvor für 400 ppm beschrieben, konnte in mykorrhizierten Pflanzen die Photosynthese durch Erhöhung der Anzuchttemperatur auf $22,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ gesteigert werden. Damit wiesen auch hier die mykorrhizierten Pflanzen eine Photosyntheseleistung auf, die vergleichbar mit der Photosyntheseleistung von optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen war ($22,2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Folglich bedeutete dies eine um 15 % tendenziell höhere photosynthetische Leistung im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ($19,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $p=0,262$).

Bei der Bestimmung der Transpiration bei 24 °C und 400 ppm zeigten mykorrhizierte Pflanzen mit $2,4 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ eine höhere (15 %), aber nicht signifikant unterschiedliche Transpiration im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen unter Phosphatmangel ($2,1 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$; $p=0,52$). Eine optimale Phosphatversorgung der Pflanzen führte zu einer Transpirationsleistung von $2,78 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Wie schon zuvor für die photosynthetische Leistung beobachtet, führte eine Erhöhung der Anzuchttemperatur auch zu einer generellen Steigerung der Transpiration in mykorrhizierten Pflanzen ($3,1 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Dieser Wert entsprach der Transpirationsleistung der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen und zeigte mit einer Zunahme von 33 % gegenüber der nicht-mykorrhizierten unter Phosphatmangel eine signifikante Steigerung ($p=0,023$).

Eine Erhöhung der CO_2 Konzentration bewirkte eine Reduktion der Transpiration unter beiden Anzuchttemperaturen. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten bei 24 °C Anzuchttemperatur eine Transpirationsleistung von $2,0 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ und wiesen damit eine signifikante Erhöhung im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel auf, die eine Transpiration von $1,5 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ zeigten ($p=0,032$). Vergleicht man die Transpirationsleistung der beiden Anzuchttemperaturen bei 1000 ppm, bewirkte auch hier eine Erhöhung der Temperatur einen Anstieg der Transpiration. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten eine Transpirationsleistung von $2,5 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, die sich signifikant von der Transpirationsleistung der nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ($1,9 \text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) unterschied ($p=0,032$). Die optimal mit

Phosphat versorgten Pflanzen zeigten unter erhöhten CO₂-Konzentration eine Transpiration von 2,2 mmol*m⁻²*s⁻¹ und 2,8 mmol*m⁻²*s⁻¹.

Die Berechnung der Photosynthese pro interzellulären CO₂ (c_i) gibt Aufschluss darüber, ob ein höherer CO₂-Konzentration in der Zelle Grund für eine gesteigerte Photosyntheseleistung ist. Eine erhöhte CO₂-Konzentration innerhalb der Zelle führt zur Verschiebung des CO₂/O₂ Verhältnisses und reduziert damit die Wahrscheinlichkeit der Fixierung von Sauerstoff durch RuBisCO.

Unter beiden Anzuchttemperaturen zeigten die mykorrhizierten Pflanzen eine Photosynthese pro interzellulären CO₂ (c_i) von 0,06 (24 °C) und 0,065 (28 °C). Einen identischen Wert zeigten die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen. Im Vergleich dazu zeigten nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel eine Photosyntheseleistung pro interzellulären CO₂ von 0,05 (24 °C) und 0,056 (28 °C). Dieser wick jedoch nicht signifikant von der Leistung der mykorrhizierten Pflanzen und der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen ab (24 °C: $p=0,15$; 28 °C: $p=0,18$).

Die Erhöhung der CO₂ Konzentration auf 1000 ppm resultierte auch in einer erhöhten CO₂-Konzentration im Blatt. Die Division der Photosyntheseleistung mit dem Wert der interzellulären CO₂-Konzentration führte daher zu geringeren Werten in allen Behandlungsgruppen. Es konnten weder bei 24 °C noch bei 28 °C Anzuchttemperatur Unterschiede in den drei Behandlungsgruppen festgestellt werden. Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel sowie die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten ein Verhältnis von Photosynthese pro interzellulären CO₂ von 0,028 (24 °C: $p=1$; 28 °C: $p=0,75$).

Es konnte durch die Gaswechselfmessungen in mykorrhizierten Pflanzen die Tendenz einer gesteigerten Photosyntheseleistung bei 400 ppm sowie bei 1000 ppm bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C in mykorrhizierten Pflanzen gezeigt werden. Des Weiteren konnte eine signifikant erhöhte Transpiration unter allen gemessenen Bedingungen, mit Ausnahme der 24 °C Anzucht und 400 ppm CO₂ nachgewiesen werden. Einen Einfluss des arbuskulären Mykorrhizapilzes auf die interzelluläre CO₂ Konzentration konnte nicht gezeigt werden.

III.1.3 Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf das Metabolom von Tomate

Um den Einfluss der tendenziell erhöhten Photosynthese auf die Physiologie zu untersuchen, wurden die Blattmetabolite bestimmt. Hauptaugenmerk lag auf den Metaboliten des Kohlenstoffmetabolismus. Glucose und Fructose sind Primärprodukte der Photosynthese. Als weiteres wurde Saccharose bestimmt, die aus den Hexosen Glucose und Fructose im Cytosol synthetisiert wird und die Transportform von Zucker innerhalb der Pflanze darstellt (I.4.1). Für die Metabolitanalyse wurde das bei der Gaswechsellmessung untersuchte Blatt verwendet, das am darauffolgenden Tag, nach vier Stunden Licht, geerntet wurde. Die wasserlöslichen Metabolite wurden mittels *polar phase* Extraktion extrahiert und durch Gaschromatographie-Massenspektrometrie analysiert. Um die einzelnen Metabolite zu identifizieren und zu quantifizieren, wurde eine Reinsubstanz als Referenzstandard verwendet.

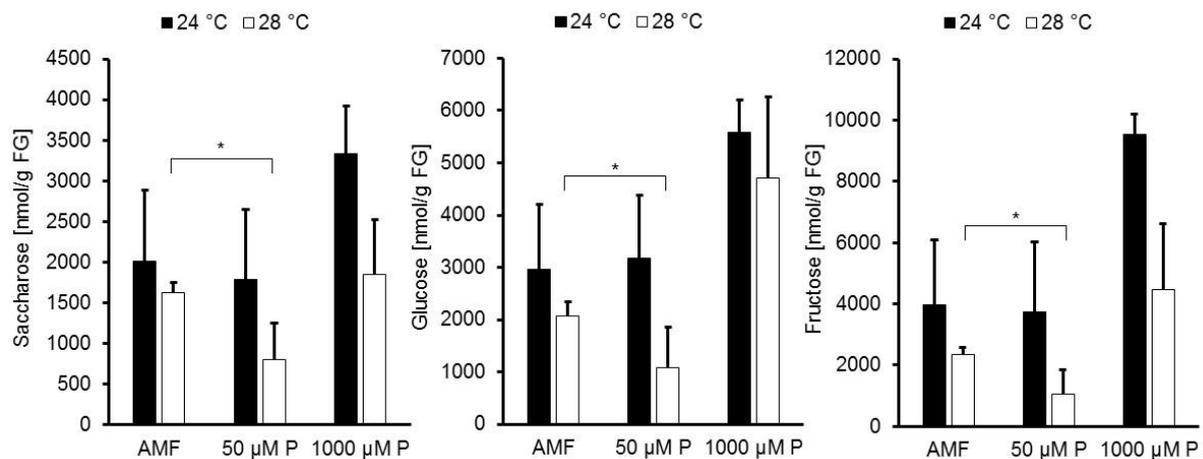


Abbildung III-5: Metabolitgehalt von Saccharose, Glucose und Fructose nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$.

Abbildung III-5 zeigt den Saccharose-, Glucose- und Fructosegehalt der Blätter von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel sowie der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen unter zwei verschiedenen Anzuchttemperaturen (24 °C und 28 °C).

Bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C konnte in mykorrhizierten Pflanzen ein Saccharosegehalt von 2015 nmol/g Frischgewicht (FG) bestimmt werden. Die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel wiesen hingegen einen um 12 % reduzierten Saccharosegehalt von 1789 nmol/g FG auf. Bei dem Vergleich der Glucose- und Fructosegehalte bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel keine Unterschiede. In den mykorrhizierten Pflanzen konnte ein Glucosegehalt von 2958 nmol/g FG und für die nicht-mykorrhizierten

Pflanzen konnte ein Gehalt von 3175 nmol/g FG (+6 %) bestimmt werden. Der Fructosegehalt in mykorrhizierten Pflanzen lag bei 3984 nmol/g FG und in nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel lediglich um 6 % reduziert bei 3725 nmol/g FG. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten eine Akkumulation von allen drei Zuckern. Der Saccharosegehalt lag bei 3334 nmol/g FG. Glucose und Fructose akkumulierten mit 5578 nmol/g FG und 9539 nmol/g FG in den Blättern der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen.

Beim Vergleich der beiden Anzuchttemperaturen fiel auf, dass die Erhöhung der Temperatur zu einer Reduktion des Gehalts aller drei Zucker führt. Dennoch konnte unter erhöhter Anzuchttemperatur in allen drei Metaboliten signifikante Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel detektiert werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten einen Saccharosegehalt von 1625 nmol/g FG und akkumulierten damit doppelt so viel Saccharose in ihren Blättern als die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel, die einen Wert von 803 nmol/g FG aufwiesen ($p=0,012$). Für Glucose und Fructose konnten ähnliche Differenzen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel gezeigt werden. Die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz bewirkte im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel eine um 93 % signifikant gesteigerte Akkumulation von Glucose auf 2075 nmol/g FG ($p=0,015$). Für Fructose zeigten die mykorrhizierten Pflanzen einen Gehalt von 2337 nmol/g FG und akkumulierten damit 118 % mehr Fructose als die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (1070 nmol/g FG; $p=0,022$).

Die optimale Versorgung mit Phosphat führte auch bei 28 °C zu der höchsten Metabolitakkumulation der drei Behandlungsgruppen. Optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen wiesen einen Saccharosegehalt von 1856 nmol/g FG, einen Glucosegehalt von 4706 nmol/g FG und einen Fructosegehalt von 4466 nmol/g FG auf.

Somit können die mykorrhizierten Pflanzen als Intermediat der beiden nicht-mykorrhizierten Kontrollen unter Phosphatmangel und optimaler Phosphatversorgung bezeichnet werden. Sie zeigten im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen einen signifikant erhöhten Zuckergehalt. Trotz einer ähnlichen photosynthetischen Leistung wie die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (Abbildung III-4), waren die mykorrhizierten Pflanzen jedoch nicht in der Lage, die Zuckergehalte von optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zu erreichen.

Im Weiteren wurden der Metabolitgehalt von Citratzyklus-Intermediate und einzelnen Aminosäuren im Blatt untersucht.

Die gebildeten Zucker werden im Anschluss in der Glykolyse zu Pyruvat metabolisiert, welches in dem Citratzyklus weiter umgewandelt werden kann. Die anschließende Atmungskette nutzt die während des Citratzyklus gebildeten Reduktionsäquivalente zur Energiegewinnung in Form von ATP. Da in mykorrhizierten Pflanzen ein erhöhter Zuckergehalt detektiert wurde,

kann ein erhöhter Fluss in den nachfolgenden Stoffwechselwegen vermutet werden. Der Metabolitgehalt der Citratzyklus-Intermediate wurde in Abbildung III-6 untersucht.

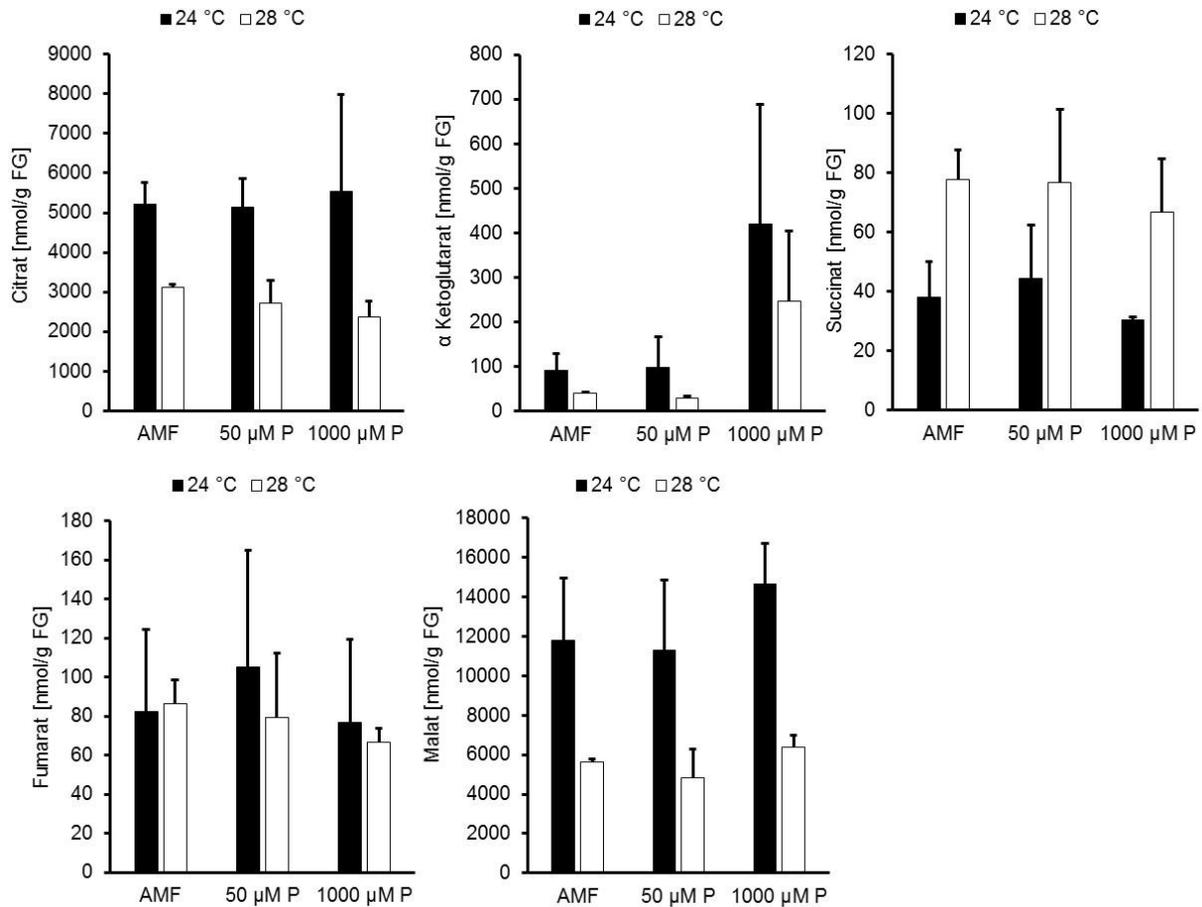


Abbildung III-6: Metabolitgehalt der Citratzyklus-Intermediate nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolisierung wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.

Keines der fünf untersuchten Citratzyklus-Intermediate zeigte Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Auffällig sind die unterschiedlichen Metabolitgehalte beim Vergleich der beiden Anzuchttemperaturen.

Citrat zeigte mit 5206 nmol/g FG und 5144 nmol/g FG in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel bei 24 °C Anzuchttemperatur einen ähnlichen Gehalt in beiden Behandlungsgruppen unter Phosphatmangel. Bei 28 °C Anzuchttemperatur zeigten mykorrhizierte Pflanzen mit 3126 nmol/g FG einen 15 % höheren Gehalt als nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (2706 nmol/g FG). Auch die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten mit 2371 nmol/g FG einen vergleichbaren Metabolitgehalt.

Der Gehalt von α -Ketoglutarat war unter 24 °C Anzuchttemperatur etwa doppelt so hoch wie unter 28 °C Anzuchttemperatur. Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatgehalt zeigten unter 24 °C Anzucht einen Gehalt von 91 nmol/g FG und 98 nmol/g FG. Unter 28 °C Anzucht hingegen zeigten die Pflanzen einen Gehalt von 40 nmol/g FG und 28 nmol/g FG. Für die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen konnte unter beiden Anzuchttemperaturen ein Anstieg des α -Ketoglutaratgehalts auf 420 nmol/g FG (24 °C) und 247 nmol/g FW (28 °C) verzeichnet werden. Somit hatte lediglich der Phosphatgehalt einen Einfluss auf die Menge von α -Ketoglutarat im Blatt.

Für Succinat war der Metabolitgehalt bei geringerer Anzuchttemperatur in allen Behandlungsgruppen tendenziell reduziert. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten mit 38 nmol/g FG einen um 14 % geringeren Gehalt als die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (44 nmol/g FG). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen wiesen einen Gehalt von 30 nmol/g FG auf. Die Erhöhung der Anzuchttemperatur führte zu einer Akkumulation von Succinat in allen drei Behandlungsgruppen. Mykorrhizierte Pflanzen besaßen einen Gehalt von 77 nmol/g FG, der vergleichbar mit dem Gehalt in nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (76 nmol/g FG) und optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (66 nmol/g FG) war.

Fumarat ist das einzige Citratzyklus-Intermediat, welches ähnliche Werte bei beiden Anzuchttemperaturen aufwies. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten bei 24 °C Anzuchttemperatur einen Gehalt von 82 nmol/g FG. Der Fumaratgehalt entsprach etwa 80 % des in nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel gemessenen Gehalts (105 nmol/g FG). Optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen zeigten einen Gehalt von 76 nmol/g FG. Unter erhöhter Anzuchttemperatur konnten die Gehälter von 86 nmol/g FG, 79 nmol/g FG und 66 nmol/g FG für die mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel sowie für die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen gemessen werden.

Für Malat konnte eine stärkere Akkumulation in Blättern detektiert werden, die bei 24 °C angezogen wurden. Bei 24 °C betrug der Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen lediglich 4 % (AMF 11820 nmol/g FG; 50 μ M P: 11284 nmol/g FG). Durch Erhöhung der Anzuchttemperatur stieg die Differenz auf 16 %. Die mykorrhizierten Pflanzen wiesen dabei einen Gehalt von 5622 nmol/g FG auf und die nicht-mykorrhizierten Pflanzen einen Gehalt von 4806 nmol/g FG. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten unter beiden Anzuchtbedingungen den höchsten Malatgehalt (24 °C: 14658 nmol/g FG; 28 °C: 6388 nmol/g FG).

Unabhängig vom absoluten Metabolitgehalt zeigten die Citratzyklus-Intermediate unter beiden Anzuchttemperaturen die gleiche Tendenz zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Jedoch konnte für kein Citratzyklus-

Intermediat ein signifikanter Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel nachgewiesen werden.

Für alle Citratzyklus-Intermediate, mit Ausnahme von α -Ketoglutarat, zeigten die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen trotz erhöhten Zuckergehalts (Abbildung III-5) keinen Anstieg. Für α -Ketoglutarat konnte für beide Anzuchttemperaturen ein signifikanter Anstieg von α -Ketoglutarat im Blatt von optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen gezeigt werden. Jedoch wurde kein Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel detektiert.

Während der Synthese der Aminosäuren werden die Intermediate des Citratzyklus und der Glykolyse als Kohlenstoffgerüst genutzt. Es konnte bereits eine Akkumulation von Aminosäuren während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose gezeigt werden (Zhu et al., 2016). Die Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie erwies sich jedoch als schwierig. Aufgrund der ähnlichen Struktur und damit vergleichbaren Masse und Ladung der Aminosäuren findet bei der Detektion eine Überlagerung statt, wodurch eine Unterscheidung der einzelnen Aminosäuren nicht möglich war. Daher wurde sich im Folgenden auf die Aminosäuren Glycin, Serin und Prolin konzentriert. Glycin und Serin nutzen hierbei 3-Phosphoglycerat und Prolin α -Ketoglutarat als Kohlenstoffgerüst.

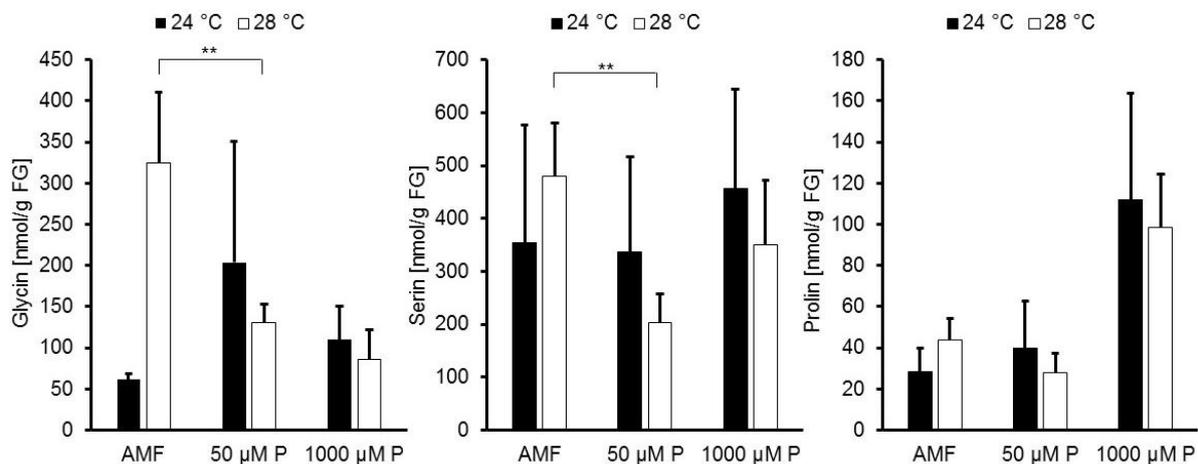


Abbildung III-7: Metabolitgehalt von Glycin, Serin und Prolin nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: **, $p < 0,01$.

Abbildung III-7 zeigt den Metabolitgehalt der drei identifizierten Aminosäuren Glycin, Serin und Prolin bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C und 28 °C. Glycin ist die kleinste und einfachste

Aminosäure und kann aus Serin synthetisiert werden. Beide Aminosäuren sind auch Intermediate der Photorespiration (Abbildung I-2).

Für Glycin zeigten die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel bei 24 °C mit 203 nmol/g FG einen tendenziell höheren Glycingehalt als die mykorrhizierten Pflanzen mit 61 nmol/g FG. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen besaßen einen Gehalt von 109 nmol/g FG. Im Vergleich dazu zeigten die mykorrhizierten Pflanzen bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C (324 nmol/g FG) einen signifikant erhöhten Glycingehalt gegenüber der nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (130 nmol/g FG). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten im Vergleich zu der 24 °C Anzuchttemperatur einen unveränderten Gehalt von 85 nmol/g FG. Für Glycin konnte für beide nicht-mykorrhizierte Kontrollgruppen ein vergleichbarer Metabolitgehalt unter beiden Anzuchttemperaturen detektiert werden. Im Vergleich dazu zeigten die mykorrhizierten Pflanzen bei 24 °C einen tendenziell reduzierten und bei 28 °C Anzuchttemperatur einen signifikant erhöhten Gehalt an Glycin.

Für Serin konnte bei 24 °C Anzuchttemperatur mit 354 nmol/g FG und 336 nmol/g FG ein ähnliches Metabolitlevel in mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel detektiert werden. Die Erhöhung der Temperatur führte in mykorrhizierten Pflanzen zu einer Steigerung des Seringehalts auf 479 nmol/g FG. In nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel führte der Temperaturanstieg jedoch zu einer Reduktion des Seringehalts (202 nmol/g FG). Dies resultierte in einen signifikant unterschiedlichen Seringehalt zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten bei den beiden untersuchten Temperaturen einen Seringehalt von 456 nmol/g FG (24 °C) und 350 nmol/g FG (28 °C).

Für Prolin konnte in mykorrhizierten Pflanzen ein Gehalt von 32 nmol/g FG bei 24 °C und 43 nmol/g FG bei 28 °C Anzuchttemperatur detektiert werden. In nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel zeigte der Prolingehalt im Vergleich zur mykorrhizierten Pflanzen bei 24 °C eine tendenzielle Erhöhung (45 nmol/g FG), hingegen unter 28 °C eine tendenzielle Reduktion (27 nmol/g FG). Der Prolingehalt in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen war mit 256 nmol/g FG (24 °C) und 98 nmol/g FG (28 °C) am höchsten.

Für Prolin konnten bei beiden Anzuchttemperaturen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pflanzen unter Phosphatmangel detektiert werden. Für die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigte sich, wie auch für das verwendete Kohlenstoffgerüst α -Ketoglutarat (Abbildung III-6), einen Anstieg. Hingegen konnten für Glycin und Serin Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Anstieg vor allem bei erhöhter Anzuchttemperatur. Grundsätzlich kann neben der gesteigerten Synthese der Aminosäuren

auch ein erhöhter Proteinabbau zu Veränderungen im Aminosäuregehalt führen (Hildebrandt et al., 2015).

Ob die Veränderungen tatsächlich auf einen erhöhten Proteinabbau zurückzuführen sind, soll in Kapitel III.3 mit Hilfe der RNA-Sequenzierungsdaten beantwortet werden. Die RNA-Sequenzierung kann Aufschluss über differentiell regulierte Gene, wie unter anderem Proteasen und Protease Inhibitoren, geben.

Wie unter Punkt I.3 beschrieben, ist der Pilz von der pflanzlichen Versorgung mit Kohlenhydraten abhängig. Um beantworten zu können, ob der zusätzlich gebildete Zucker für die Versorgung des Pilzes oder für andere Stoffwechselwege verwendet wird, wurden die Metabolitgehalte in der Wurzel analysiert. Für die Versorgung des Pilzes wird die im Blatt gebildete Saccharose über das Phloem in die Wurzel transportiert (Boldt et al., 2011; Flügge, 1995). Da der Pilz nicht in der Lage ist Saccharose aufzunehmen, ist eine Spaltung in Glucose und Fructose durch Invertasen nötig (Schaarschmidt et al., 2006; Schubert et al., 2004). Nach Aufnahme der Hexosen durch den Pilz werden diese für den Aufbau von Chitin, Trehalose oder für die Bildung von Triosephosphat verwendet (Bago et al., 2000) (Abbildung I-7). Aus diesem Grund wurden die Mengen der Zuckergehalt der drei Zucker Saccharose, Glucose und Fructose in den Wurzeln der Pflanze bestimmt. Zusätzlich wurde Trehalose als pilzspezifischer Zucker in die Analysen integriert.

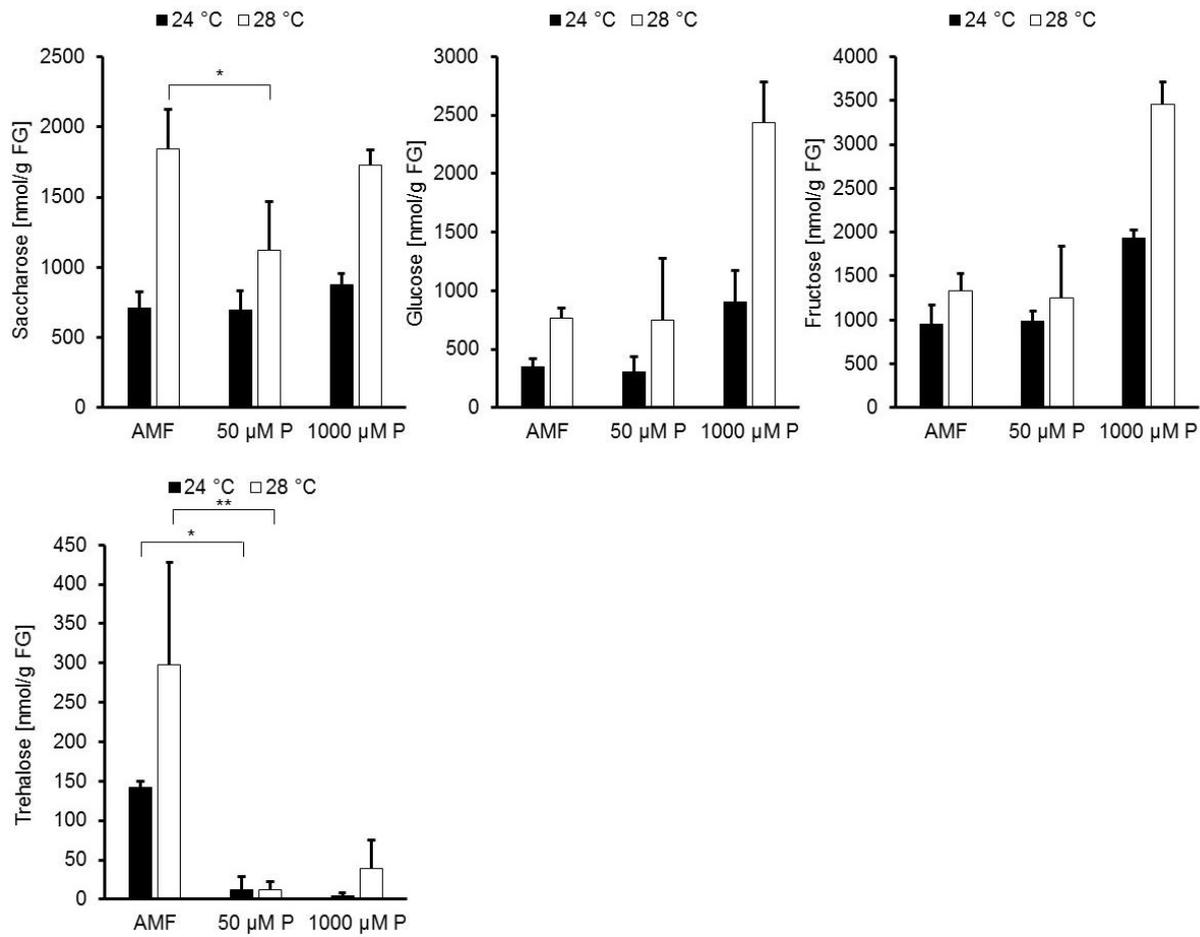


Abbildung III-8: Metabolitgehalt von Saccharose, Glucose, Fructose und Trehalose nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde die komplette Wurzel vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p = 0,01$.

Abbildung III-8 zeigt die Quantifizierung der Zuckergehälter der Wurzel. Bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C lag der Saccharosegehalt bei mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel bei 711 nmol/g FG und 693 nmol/g FG und zeigte damit keine signifikante Veränderung durch die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz. Der Saccharosegehalt von optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigte mit 877 nmol/g FG im Vergleich zu den Pflanzen unter Phosphatmangel ebenfalls einen ähnlichen Metabolitgehalt.

Durch den Temperaturanstieg konnten signifikante Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel detektiert werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten einen um 64 % signifikant erhöhten Saccharosegehalt im Vergleich zu ihrer nicht-mykorrhizierten Kontrolle. Die mykorrhizierte Pflanzen besaßen außerdem mit 1844 nmol/g FG einen ähnlichen Saccharosegehalt wie die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1726 nmol/g FG).

Für Glucose und Fructose hingegen konnten bei beiden Anzuchttemperaturen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten bei 24 °C einen Gehalt von 347 nmol/g FG. In nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel betrug der Gehalt 308 nmol/g FG. Eine Erhöhung der Temperatur bewirkte zwar einen Anstieg des Glucosegehalts auf 768 nmol/g FG in mykorrhizierten Pflanzen, die nicht-mykorrhizierten Pflanzen wiesen bei der Anzucht bei 28 °C aber ebenfalls einen erhöhten Gehalt von 752 nmol/g FG auf. Der Anstieg von Glucose in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen durch Temperaturerhöhung war jedoch deutlich stärker und resultierte in einem Glucosegehalt von 2493 nmol/g FG.

Bei Betrachtung des Fructosegehalts zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel bei 24 °C Anzuchttemperatur mit jeweils 960 nmol/g FG einen vergleichbaren Metabolitgehalt. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten einen Gehalt von 1931 nmol/g FG. Wie auch bereits für Glucose beschrieben, bewirkte ein Anstieg der Anzuchttemperatur auch eine Akkumulation von Fructose. Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel besaßen bei 28 °C einen Fructosegehalt von 1336 nmol/g FG und 1247 nmol/g FG. Für die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen betrug der Fructosegehalt 3458 nmol/g FG.

Die Analyse der Zuckergehälte in der Wurzel zeigte, analog zu dem Gehalt der drei Zucker im Blatt, eine signifikante Akkumulation von Saccharose in mykorrhizierten Pflanzen bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C. Hingegen konnte für die Anzucht bei 24 °C keine Unterschiede festgestellt werden. Der erhöhte Saccharosegehalt in den Wurzeln bei 28 °C weist auf einen erhöhten Zuckerbedarf (*sink strength*) hin. Der Transport von Saccharose vom Blatt in die Wurzel wird im Weiteren im Abschnitt III.2 behandelt. Trotz des erhöhten Saccharosegehalts in mykorrhizierten Pflanzen konnte für Glucose und Fructose keine Unterschiede zwischen den Pflanzen unter Phosphatmangel beobachtet werden, wenngleich der absolute Gehalt von Fructose und Glucose im Vergleich zu Saccharose deutlich geringer war.

Zusätzlich wurde der Gehalt an Trehalose bestimmt. Trehalose zeigte eine signifikante Akkumulation mit dem Faktor 14 bzw. 35 in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen bei 24 °C und 28 °C Anzuchttemperatur gegenüber den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Mykorrhizierte Pflanzen besaßen bei 24 °C einen Trehalosegehalt von 142 nmol/g FW. Ein Temperaturanstieg bewirkte eine Steigerung auf 298 nmol/g FG. In nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel konnte ein Gehalt von 12 nmol/g FG bei beiden Temperaturen gezeigt werden. Auch in den optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigte sich lediglich ein Trehalosegehalt von 4 nmol/g FG und 39 nmol/g FW für die beiden Anzuchtbedingungen.

Mögliche Ursache für die Detektion des geringen Trehalosegehalts in nicht-mykorrhizierten Pflanzen könnte die nicht-sterilen Anzucht sein. Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Mikrosymbionten, die ebenfalls Trehalose als Zucker verwenden, die Wurzel besiedeln (Tropis et al., 2005). Weiterhin kann die Fragmentierung anderer Zucker zu Fragmenten mit dem ähnlichen spezifischen Masse/Ladung-Verhältnis von Trehalose führen. Aufgrund der spezifischen Akkumulation von Trehalose in mykorrhizierten Pflanzen, kann von einem Mykorrhizaeffekt ausgegangen werden.

Neben den Metaboliten des Kohlenstoffmetabolismus konnte Inositol mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie identifiziert und quantifiziert werden. Inositol kommt in den Pflanzen vorwiegend als Phytinsäure vor und wird als bioaktive Substanz eingestuft. Es dient als Speicherstoff von Phosphat in pflanzlichen Geweben, vor allem in Getreide und ist an der Zellwandsynthese beteiligt (Raboy, 2003). Weiterhin wird eine Funktion bei der Reaktion gegen abiotischen und biotischem Stress diskutiert (Khodakovskaya et al., 2010).

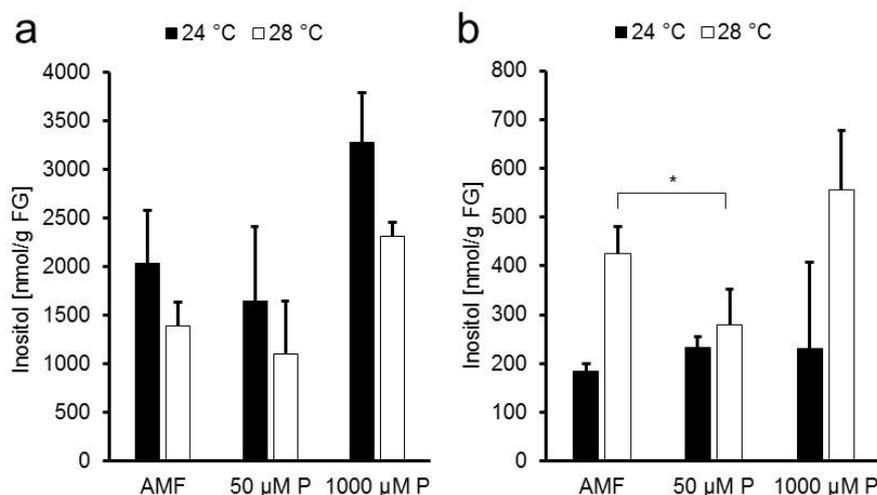


Abbildung III-9: Metabolitgehalt von Inositol in Blatt (a) und in der Wurzel (b) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde das zweite voll entwickelte Blatt und die komplette Wurzel vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$.

Abbildung III-9 zeigt den Inositolgehalt von Blatt und Wurzeln der drei Behandlungsgruppe, mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel, sowie der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten dabei unter beiden untersuchten Anzuchtbedingungen eine Inositol-Akkumulation von 25 % im Blatt, die jedoch zwischen

mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel nicht signifikant unterschiedlich war. Hierbei wurden bei 24 °C ein Inositolgehalt von 2032 nmol/g FG und bei 28 °C ein Gehalt von 1395 nmol/g FG quantifiziert. Unter beiden Anzuchtbedingungen zeigten optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen den höchsten Gehalt. In der Wurzel konnte für die Anzucht bei 28 °C eine signifikant erhöhte Akkumulation von Inositol von 425 nmol/g FG in mykorrhizierten Pflanzen beobachtet werden. Dies entsprach einer Steigerung von 51 % im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Anzucht bei 24 °C konnten keine Unterschiede im Inositolgehalt der drei Behandlungsgruppen detektiert werden. Ob der tendenziell erhöhte Gehalt von Inositol in Blatt zur Phosphatspeicherung dient oder eine Reaktion auf Stress ist, kann man anhand der Ergebnisse nicht klar feststellen. Für die Funktion als Phosphatspeicher spricht jedoch der erhöhte Blatt-Inositolgehalt in den optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (Raboy, 2003).

Um beantworten zu können, welcher physiologische Parameter durch die arbuskuläre Mykorrhizapilze beeinflusst wird, wurden die gewonnen photosynthetischen Parameter (Photosynthese, Transpiration) sowie der Metabolitgehalt im Blatt (Saccharose, Glucose, Fructose) mit dem Grad der Mykorrhizierung (aktive Mykorrhiza) korreliert. Aufgrund der Tatsache, dass die Akkumulation von Trehalose in der Wurzel spezifisch für die mykorrhizierten Pflanzen war, wurde auch dieser Parameter in die Korrelation miteinbezogen. Die aktive Mykorrhiza wurde durch Messung des induzierten und mykorrhiza-spezifischen Phosphattransporter *S/Pt4* bestimmt (Harrison et al., 2002). Für die Korrelation wurden aufgrund der homogeneren und signifikanteren Ergebnisse der Gaswechsellmessung und Metabolitanalyse die gewonnenen Daten der 28 °C Anzuchttemperatur verwendet. Abbildung III-10 zeigt die Korrelation der Transpiration sowie des Trehalosegehalts der Wurzel mit der aktiven Mykorrhizierung.

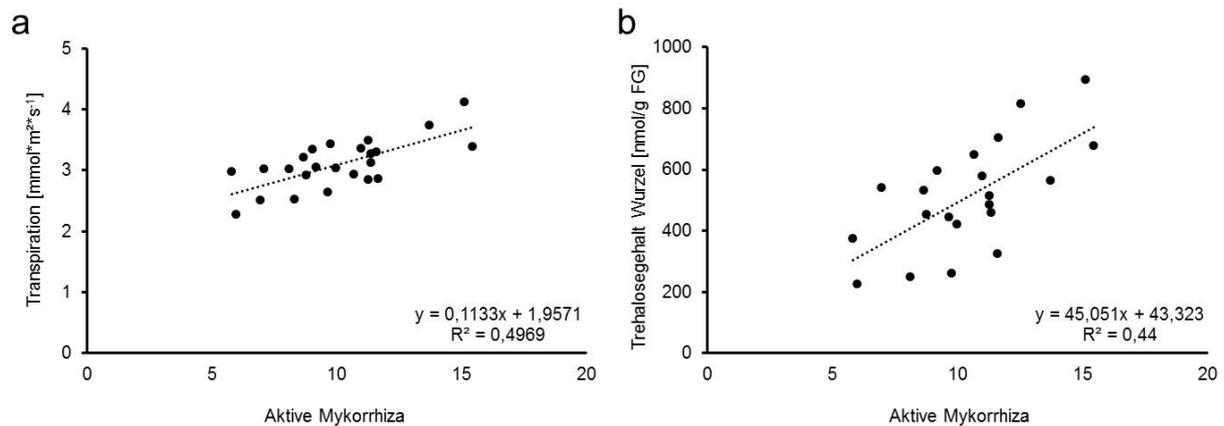


Abbildung III-10: Korrelation physiologischer Parameter und Metabolitgehalte mit der aktiven Mykorrhiza. Für die Korrelation wurden die Transpiration beziehungsweise der Wurzel-Trehalosegehalt jeder Pflanze gegen die aktive Mykorrhizierung aufgetragen. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach 4,5-wöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* für die Gaswechsellmessungen verwendet (III.1.2). Im Anschluss an die physiologischen Messungen wurden die Pflanzen am folgenden Tag, vier Stunden nach Tagesbeginn, geerntet und das Pflanzenmaterial für die Metabolitisolation sowie Transkriptionsanalyse verwendet. Für die Bestimmung der aktiven Mykorrhizierung wurde der spezifische Phosphattransporter 4 mit dem Elongationsfaktor Ef1 α standardisiert. Der absolute Metabolitgehalt wurde mittels Referenzsubstanz und entsprechender Standardgerade ermittelt.

Für die Korrelation wurden die aktive Mykorrhiza der einzelnen Pflanzen mit den jeweiligen Werten der physiologischen Parameter beziehungsweise dem Metabolitgehalt korreliert. Für die Metabolite Saccharose, Glucose und Fructose im Blatt sowie für die Photosyntheseleistung konnte keine Korrelation beobachtet werden (Abbildung VI-1). Lediglich die zwei in Abbildung III-10 dargestellten Parameter korrelierten mit der aktiven Mykorrhiza. Die Transpiration nahm mit steigender Mykorrhizierung zu. Beide Parameter korrelierten mit einer Steigung von 0,11 und einem Bestimmtheitsmaß von 0,5. Auch der Trehalosegehalt der Wurzel erhöhte sich mit steigender Mykorrhizierung. Hierbei konnte eine Steigung von 45,05 und einem Bestimmtheitsmaß von 0,44 berechnet werden. Aufgrund der spezifischen Akkumulation von Trehalose in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen kann Trehalose auch als Marker für die Mykorrhizierung bezeichnet werden (Ocon et al., 2007). Da Transpiration und Trehalose ein ähnliches Bestimmtheitsmaß zeigten, kann eine Einflussnahme der Mykorrhizierung auf die Transpiration vermutet werden.

III.2 Verfolgung von schwerem Kohlenstoff in Tomaten

Während Photosynthese wird der Kohlenstoff der Luft durch RuBisCO fixiert und in organische Substanzen, wie zum Beispiel Zucker, umgewandelt. Die Haupttransportform des Zuckers in der Pflanze ist Saccharose, die vom Ort der Synthese (*source*) zu den Bedarfsorganen (*sink*) verteilt und dort metabolisiert wird (Flügge, 1995). In Abschnitt III.1.3 konnte bereits eine Akkumulation von Saccharose, Glucose und Fructose im Blatt und Saccharose sowie Trehalose in der Wurzel mykorrhizierter Pflanzen gezeigt werden. Um eine Aussage treffen zu können, ob mykorrhizierte Pflanzen eine erhöhte bzw. schnellere Transportrate von Photosyntheseprodukten vom Blatt zur Wurzel aufweisen, wurde der Spross der Pflanze 90 Minuten mit schwerem $^{13}\text{CO}_2$ begast (Abbildung II-1). Nach dem Beenden des Markierens wurden Proben über einen Zeitraum von vier Stunden geerntet, in denen der Transport von ^{13}C in der Pflanze verfolgt werden sollte. Hierzu wurde der prozentuale Anteil von ^{13}C in den Metaboliten bestimmt. Eine absolute Bestimmung des Metabolitgehalts war aufgrund der langen Versuchsdurchführung (9:00h-16:00h) nicht möglich, da der Metabolitgehalt über den Tagesverlauf stark variierte.

Im Vergleich zum üblichen, in der Luft vorkommenden CO_2 mit der atomaren Masse von 12 Da, wurde zur Verfolgung ein schwereres Kohlenstoff-Isotop verwendet (13 Da). Durch die Verwendung von $^{13}\text{CO}_2$ wird eine Verschiebung des Masse-Ladungs-Verhältnis (m/z) der Substanzen erreicht, die ein schwereres Kohlenstoff-Isotop tragen und ermöglicht dadurch eine Detektion mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie. Hauptaugenmerk lag bei diesem Versuch auf der Saccharose und den Hexosen Glucose und Fructose. Zusätzlich wurde in der Wurzel der Anteil an ^{13}C -Trehalose bestimmt.

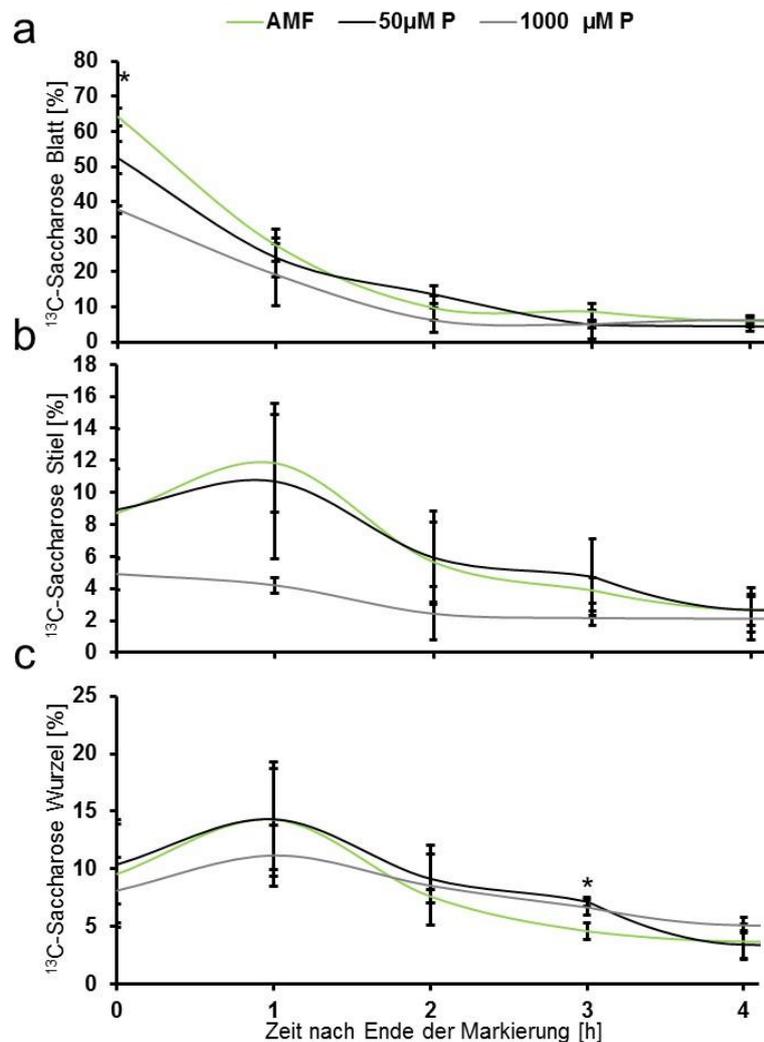


Abbildung III-11: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Saccharose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanz wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$.

Abbildung III-11 zeigt den aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteil der ^{13}C -Saccharose im Blatt (a), im Stiel (b) und in der Wurzel (c) im zeitlichen Verlauf. Für den ^{13}C -Anteil im Blatt konnte für alle drei Behandlungsgruppen der höchste Wert bei dem Erntezeitpunkt direkt nach dem Beenden des Markierens (Zeitpunkt 0) gemessen werden. Der prozentuale Anteil von ^{13}C -Saccharose lag bei den mykorrhizierten Pflanzen bei 64 %, hingegen bei nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel bei 52 %. Somit zeigten die mykorrhizierten Pflanzen eine signifikant erhöhten ^{13}C -Saccharosegehalt im Blatt direkt nach dem Beenden des Markierens ($p=0,02$). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten einen ^{13}C -Saccharose-Anteil von 37 %. Hier ist anzumerken, dass die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen ein deutlich stärkeres Wachstum aufwiesen und somit ein

Vergleich mit Pflanzen unter Phosphatmangel nicht möglich war. Im Verlauf des Experiments sank der Anteil an ^{13}C -Saccharose im Blatt in allen drei Behandlungsgruppen kontinuierlich. Die Abnahme an ^{13}C -Saccharose wurde durch eine lineare Gleichung zwischen dem Zeitpunkt null und dem Zeitpunkt zwei (2h nach dem Beenden des Markierens) beschrieben. Hierbei zeigte sich eine stärkere Abnahme in mykorrhizierten Pflanzen (Steigung -36,6). Im Vergleich dazu zeigten die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel eine Abnahme, die durch die negative Steigung von -28,3 beschrieben werden konnte. Ab dem Erntezeitpunkt drei (3h nach dem Beenden des Markierens) war der Ausgangswert von 5 % ^{13}C -Saccharose im Blatt erreicht, der durch unmarkierten Pflanzen ermittelt werden konnte.

In Abbildung III-11b ist der aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentuale Anteil an ^{13}C -Saccharose im Stiel zu sehen. Hierbei fiel auf, dass der Gehalt im Vergleich zum Blatt deutlich geringer ist. Der maximale Wert war bei allen drei Behandlungen bei Zeitpunkt eins zu erkennen. Dieser entsprach dem Erntezeitpunkt eine Stunde nach dem Beenden des Markierens. Auch im Stiel zeigten die mykorrhizierten Pflanzen mit 12 % den höchsten Wert beim Vergleich der Behandlungsgruppen. Bei den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel lag der maximale prozentuale Anteil an ^{13}C -Saccharose bei 10,5 %. Auch hier wurde mittels einer linearen Gleichung zwischen den Erntezeitpunkten eins und drei die Reduktion von ^{13}C -Saccharose bestimmt. In mykorrhizierten Pflanzen ließ sich die Reduktion durch die Steigung -6,2 beschreiben. Für nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel zeigte die Steigung mit -4,8 eine verlangsamte Reduktion von ^{13}C -Saccharose. Bei Erntezeitpunkt vier (4h nach dem Beenden des Markierens) erreichte der ^{13}C -Saccharose Anteil wieder den Ausgangswert (2 %). Ab diesem Zeitpunkt konnte daher von einem kompletten Weiter- bzw. Abtransport von ^{13}C -Saccharose ausgegangen werden.

Abbildung III-11c zeigt den aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteil an ^{13}C -Saccharose in der Wurzel. In den Wurzeln zeigten mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel eine Stunde nach dem Beenden des Markierens mit 14 % den höchsten Wert. Beide Behandlungen unterschieden sich hinsichtlich der maximalen Werte nicht. Jedoch konnte durch eine lineare Geradengleichung zwischen Zeitpunkt eins und drei die Reduktion von ^{13}C -Saccharose quantifiziert werden. Hierbei zeigten die mykorrhizierten Pflanzen eine größere negative Steigung (-6,7) als die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (-5,2). Dies resultiert in einen signifikant unterschiedlichen prozentualen Anteil an ^{13}C -Saccharose drei Stunden nach Beendigung der Markierung.

Zusammengefasst zeigten die mykorrhizierten Pflanzen einen signifikant erhöhten prozentualen Anteil an ^{13}C -Saccharose im Blatt direkt nach Beendigung der Markierung. Desweiteren konnte der Transport von ^{13}C -Saccharose vom Blatt in Stiel und Wurzel innerhalb der Pflanze durch Quantifizierung von ^{13}C -Saccharose gezeigt werden.

Saccharose wird im photosynthetisch aktiven Gewebe der Pflanzen über phosphorylierte Hexosen im Cytosol gebildet. Um zu untersuchen, ob bereits im Vorfeld der Saccharosesynthese ein Unterschied in dem prozentualen Anteil von ^{13}C vorliegt, wurde neben Saccharose auch Glucose und Fructose untersucht. Eine Unterscheidung zwischen verschiedenen phosphorylierten Zuckern war jedoch mit der angewandten Gaschromatographie-Massenspektrometrie Methode nicht möglich. Analog zu Saccharose konnte auch für Glucose der aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentuale Anteil an ^{13}C in Blatt, Stiel und Wurzel bestimmt werden (Abbildung III-12). Für Fructose konnte weder im Blatt, noch im Stiel und Wurzel der Anteil an ^{13}C nachgewiesen werden (Abbildung VI-2).

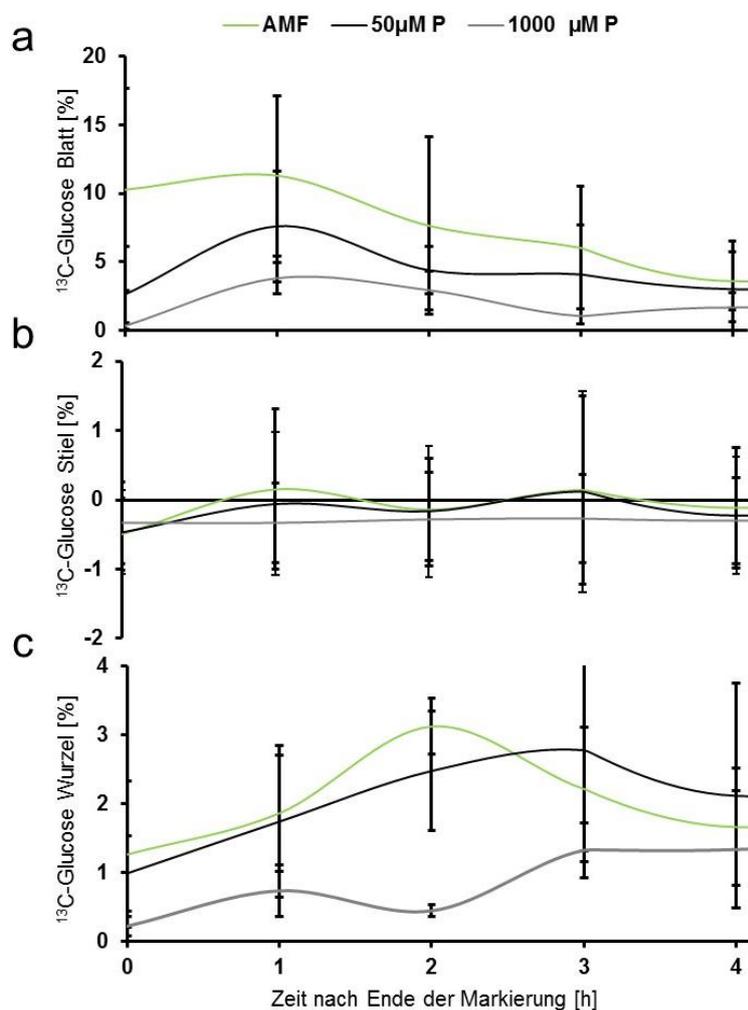


Abbildung III-12: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Glucose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.

Der aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentuale Anteil an ^{13}C -Glucose im Blatt zeigte eine Stunde nach dem Beenden des Markierens in allen drei Behandlungsgruppen den höchsten Wert. Die mykorrhizierten Pflanzen zeigten hierbei mit 11,3 % ^{13}C -Glucose im

Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel mit 7,6 % ^{13}C -Glucose einen höheren Wert. Auffällig war, dass bereits direkt nach dem Beenden des Markierens (Zeitpunkt 0) ein im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel tendenziell höherer Wert messbar war (10,2 %, $p=0,18$). Ab dem Zeitpunkt eins (eine Stunde nach dem Beenden des Markierens) sank der Anteil an ^{13}C -Glucose im Blatt, bis zum Ursprungswert (3 %), der vier Stunden nach dem Beenden des Markierens erreichte wurde. Im Stiel der Pflanzen (Abbildung III-12b) zeigte die Quantifizierung von ^{13}C -Glucose für alle Behandlungsgruppen sehr geringe Werte zwischen -1 % und 1 %.

In der Wurzel (Abbildung III-12c) zeigte der ^{13}C -Glucose Anteil in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel einen unterschiedlichen Verlauf. Während in mykorrhizierten Pflanzen zwei Stunden nach dem Beenden des Markierens der maximale Wert an ^{13}C -Glucose (4 %) detektiert werden konnte, war bei nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel das Maximum (3 %) erst drei Stunden nach dem Beenden des Markierens erreicht. Somit zeigten nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel eine verzögerte Akkumulation von ^{13}C -Glucose in der Wurzel. Weiterhin zeigten mykorrhizierte Pflanzen eine schnellere Reduktion von ^{13}C -Glucose in der Wurzel.

Wie bereits in Abbildung III-8 gezeigt, konnte eine Akkumulation von Trehalose in Wurzel mykorrhizierter Pflanzen beobachtet werden. Daher wurde im Markierungsexperiment zusätzlich der aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentuale Anteil an ^{13}C -Trehalose in der Wurzel mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen unter Phosphatmangel untersucht (Abbildung III-13).

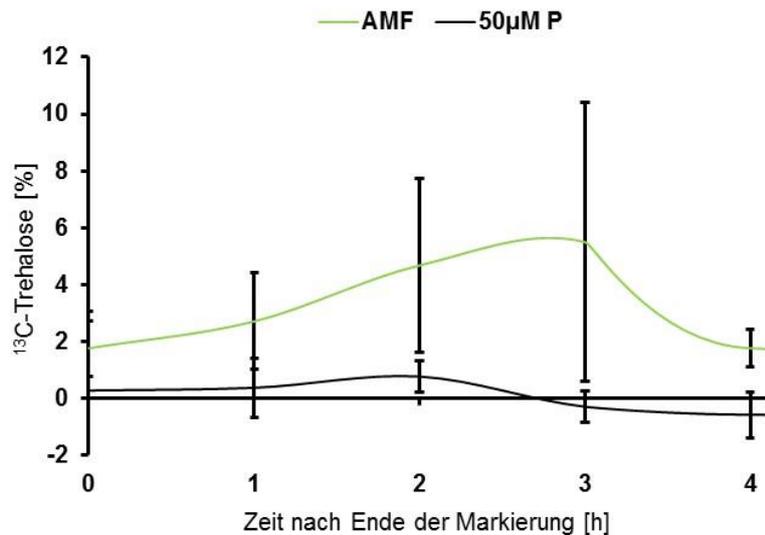


Abbildung III-13: Zeitlicher Verlauf des aus der ¹³C-Markierung stammenden prozentualen Anteils an ¹³C-Trehalose in der Wurzeln mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit ¹³CO₂ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.

Abbildung III-13 zeigt den aus der ¹³C-Markierung stammenden prozentualen Anteil an ¹³C-Trehalose der Wurzel von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Wie bereits in der Metabolitanalyse der Wurzeln (III.1.3) gezeigt, konnte auch im Markierungsexperiment nur in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen Trehalose nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an ¹³C-Trehalose stieg bis drei Stunden nach dem Beenden des Markierens an (5,5 %) und sank innerhalb einer Stunde wieder auf den Ursprungswert (1 %). In nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel konnten nur 1 % ¹³C-Trehalose quantifiziert werden.

Wie bereits einleitend (I.4.2) beschrieben, ist der Pilz nicht in der Lage, die von der Pflanze in die Wurzel transportierte Saccharose aufzunehmen. Die Saccharose wird daher zuvor durch Invertasen zu Glucose und Fructose gespalten. Über spezifische Transporter kann der Pilz die Hexosen aufnehmen und für den eigenen Metabolismus verwenden. Der Zusammenhang von Saccharose, Glucose und Trehalose in der Wurzel ist in Abbildung III-14 für mykorrhizierte (a) und nicht-mykorrhizierte (b) Pflanzen unter Phosphatmangel dargestellt.

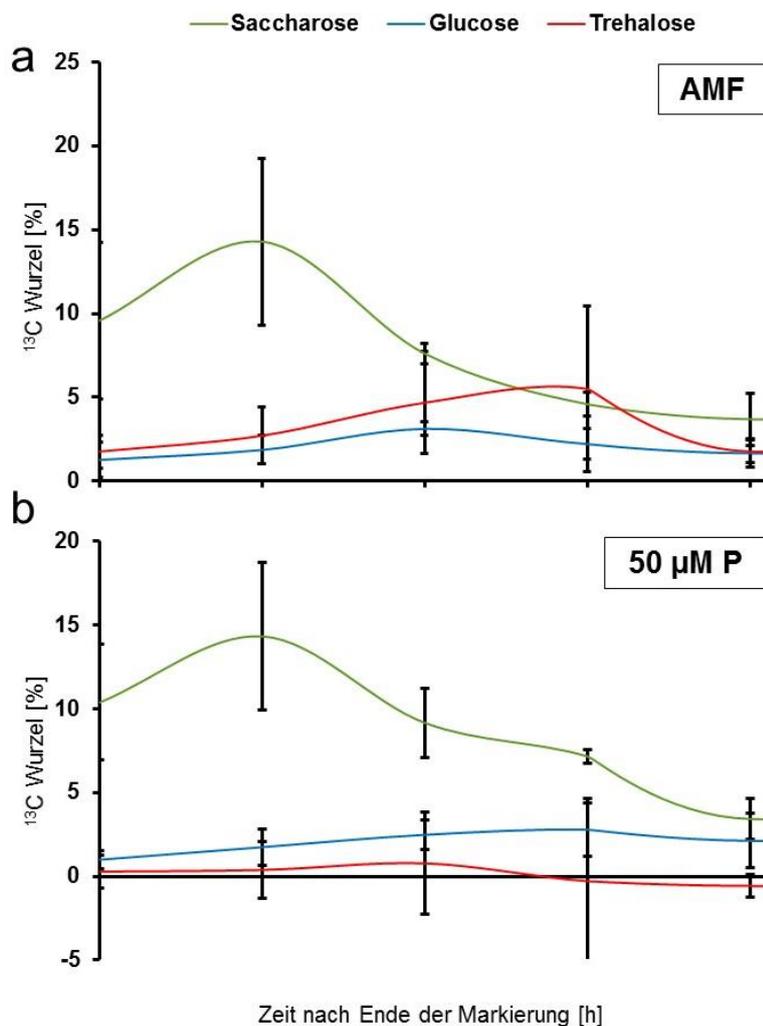


Abbildung III-14: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Saccharose, ^{13}C -Glucose und ^{13}C -Trehalose in der Wurzel mykorrhizierter (a) und nicht-mykorrhizierter (b) Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.

Abbildung III-14a zeigt den aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteil an ^{13}C in Saccharose, Glucose und Trehalose in der Wurzel mykorrhizierter Pflanzen. Wie bereits in Abbildung III-11 gezeigt, lag in der Wurzel der maximale prozentuale Anteil an ^{13}C -Saccharose bereits eine Stunde nach dem Beenden des Markierens vor. Für ^{13}C -Glucose konnte der maximale Wert zwei Stunden (Abbildung III-12) und für ^{13}C -Trehalose drei Stunden (Abbildung III-13) nach dem Beenden des Markierens nachgewiesen werden. Die Darstellung in Abbildung III-14 zeigt, dass zum Zeitpunkt der ^{13}C -Saccharose Reduktion ein Anstieg der ^{13}C -Glucose messbar war. Ebenfalls konnte ein Anstieg von ^{13}C -Trehalose bei Reduktion von ^{13}C -Glucose detektiert werden. Bei nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel konnte wie bei mykorrhizierten Pflanzen ein Anstieg an ^{13}C -Glucose bei der Reduktion von ^{13}C -

Saccharose beobachtet werden. Jedoch blieb der ^{13}C -Trehaloseanteil unverändert bei maximal 1 %.

Abbildung III-14 zeigt somit anschaulich den Zusammenhang der drei Zucker Saccharose, Glucose und Trehalose in der Wurzel während der Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz.

III.3 *Transkriptomanalyse von Blättern mykorrhizierter Tomaten*

III.3.1 Identifikation von Mykorrhiza regulierten Genen im Blatt von Tomate

Im Versuchsteil III.1 konnte der Einfluss des Pilzes auf die Photosynthese und Kohlenstoffhaushalt gezeigt werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten eine erhöhte Photosynthese, Transpiration und Zuckergehälter im Blatt. Parallel dazu konnte in Versuchsteil III.2 der Transport von Saccharose vom Blatt in die Wurzel bewiesen werden.

Um die molekulare Grundlage des Einflusses von arbuskulären Mykorrhizapilzen auf diese Prozesse zu verstehen, wurden umfassende Transkriptanalysen des Blattes mittels RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierzu wurden Blätter von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel verwendet, die bereits umfassend im Versuchsteil III.1 analysiert wurden.

Für die Transkriptomanalyse wurden Pflanzen (Anzuchttemperatur 28 °C) verwendet, die keinen Unterschied im Wachstum sowie im Sprossphosphatgehalt (Tabelle III-2) aufwiesen, bei denen jedoch eine höhere Photosynthese (Abbildung III-4) und erhöhte Zuckergehalte im Blatt (Abbildung III-5) messbar waren. Die mykorrhizierten Pflanzen wurden zuvor auf den Mykorrhizierungsgrad untersucht (Abbildung III-2).

Blatt-RNA mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen wurde isoliert (II.2.3) und mittels RNeasy MinElute Cleanup Kit (II.2.3.2) nochmals aufgereinigt. Für die RNA-Sequenzierung (II.2.3.3) wurden acht RNA Proben je Behandlung vereinigt. Die Illumina Sequenzierung wurde durch GATC (Koblenz) mit drei unabhängigen Replikaten durchgeführt. Tabelle III-3 zeigt das Resultat des *Read-Mappings* auf das sequenzierte und annotierte Tomatengenom ITAG2.3.

Tabelle III-3: Ergebnis des *Read-Mappings*. Die sequenzierten Fragmente der mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten (50 µM P) Probe wurden dem Referenzgenom von Tomate ITAG 2.3 zugeordnet. Folgende Parametern wurden in der CLC genomic workbench 7.5.1 verwendet: Match score 1; mismatch cost: 2; Insertion cost: 3; Deletion cost: 3; Length fraction: 0,8; Similarity fraction: 0,95)

Replikat	Name	Anzahl Reads	Fragmentlänge	Fragmentanzahl	
				total	%
1	AMF	33173637	51	29626545	89,31
	50 µM P	55977373	51	50018692	89,36
2	AMF	46128989	51	39231425	85,05
	50 µM P	54083049	51	47207329	87,29
3	AMF	489890316	51	42135974	86,03
	50 µM P	36034273	51	31505775	87,43

Die erhaltenen Sequenzen wurden auf das Tomatengenom ITAG2.3 mit den unter Abschnitt II.2.3.2 beschriebenen Parametern und Einstellungen *gemapped*. Hierbei konnten für alle sechs Proben mindestens 85 % der erhaltenen Sequenzen dem Referenzgenom zugeordnet werden.

Über die in der CLC genomic workbench integrierte Statistik (Empirical analysis of DGE) wurden Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen untersucht. Die Empirical analysis of DGE (EDGE) wurde entwickelt um verschiedene Merkmale in wenigen Replikaten gleichzeitig zu untersuchen. Der Test basiert auf der Annahme, dass die Daten einer negativen binomialen Verteilung folgen, erlaubt aber eine nicht konstante Mittelwertvarianz (Robinson et al., 2010; Robinson und Smyth, 2007). Zusätzlich wurde eine Benjamini-Hochberg-Prozedur angewendet, um die Wahrscheinlichkeit von Falsch-Positiven Werten (FDR) zu ermitteln. Tabelle III-4 zeigt das nach der FDR sortierte Ergebnis der RNA-Sequenzierung. Die Veränderung (FC) zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten spiegelt das Verhältnis mykorrhiziert/nicht-mykorrhiziert wieder.

Tabelle III-4: Differentiell regulierte Gene in Blättern mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Aufgelistet sind die 20 Gene mit der kleinsten FDR. Die Veränderungen (FC) stellt das Verhältnis mykorrhiziert/nicht-mykorrhiziert dar und wurde mittels EdgeR Statistik in der CLC genomic workbench 7.5.1 analysiert.

Feature ID	Annotation 2.3	FC	p-value	FDR
Solyc12g098850.1.1	Soluble diacylglycerol acyltransferase	4,5	3,90E-06	0,13
Solyc03g098790.1.1	Kunitz-type protease inhibitor	0,1	2,33E-05	0,39
Solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor	0,4	1,78E-03	1
Solyc01g086660.2.1	Unknown Protein	0,3	1,30E-02	1
Solyc03g121600.2.1	Choline dehydrogenase	1,6	4,24E-03	1
Solyc04g009910.2.1	Serine/Threonine protein kinase 1	0,5	4,70E-02	1
Solyc07g066560.1.1	Auxin responsive SAUR protein	0,4	1,10E-03	1
Solyc06g005330.2.1	MYB transcription factor	0,6	5,21E-03	1
Solyc09g018280.1.1	Serine/Threonine protein kinase	0,6	1,90E-02	1
Solyc05g009890.1.1	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like	1,7	6,00E-02	1
Solyc06g050980.2.1	Ferritin	0,5	5,08E-04	1
Solyc10g075150.1.1	Non-specific lipid-transfer protein	0,5	3,77E-04	1
Solyc01g100490.2.1	Nicotianamine synthase	0,5	5,65E-04	1
Solyc09g089510.2.1	Proteinase inhibitor I	0,6	6,39E-04	1
Solyc08g079090.2.1	Laccase-22	1,4	2,80E-02	1
Solyc08g079900.1.1	Subtilisin-like protease	0,5	8,90E-02	1
Solyc01g095140.2.1	Late embryogenesis abundant protein	0,1	2,19E-01	1

Solyc09g082820.2.1	Unknown Protein	0,5	1,60E-02	1
Solyc05g009470.2.1	Alpha-glucosidase	1,4	1,70E-02	1
Solyc09g098290.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,4	1,13E-01	1
Solyc01g099970.2.1	F-box/LRR-repeat protein 14	0,6	1,53E-01	1

Tabelle III-4 zeigt die nach False Discovery Rate (FDR) sortierten Gene. FDR beschreibt ein statistisches Verfahren, welches von Yoav Benjamini und Yosi Hochberg 1995 erstmals beschrieben wurde. In der Benjamini-Hochberg-Prozedur testet man neben der Wahrscheinlichkeit, dass das Ergebnis zufällig/nicht zufällig eintritt auch das Ausmaß an Falsch-Positiven Ergebnissen.

Alle aufgeführten Gene zeigten bei Betrachtung des p -Wertes eine signifikante differentielle Expression zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen. Bei Betrachtung der FDR war jedoch keines der aufgeführten Gene in den beiden Behandlungsgruppen signifikant unterschiedlich reguliert ($FDR < 0,05$). Die stärksten Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel waren anhand des Fold changes (FC) erkennbar. Die *Soluble diacylglycerol acyltransferase* (FC: 4,5), die *Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like* (FC: 1,7), die *Choline dehydrogenase* (FC: 1,6), die *Laccase-22* (FC: 1,4) und die *Alpha-glucosidase* (FC: 1,4) waren stärker in mykorrhizierten Pflanzen exprimiert als in nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Zu den Genen, mit der größten Veränderung und schwächerer Expression in mykorrhizierten Pflanzen gehörten der *Kunitz-type protease inhibitor* (FC: 0,1), das *Late embryogenesis abundant protein* (FC: 0,1) und das *Auxin responsive SAUR protein* (0,4).

Zur Überprüfung der Daten wurde mit der DESeq2-Methode (Love et al., 2014) ein zweiter statistischer Test angewendet. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle III-5 aufgeführt.

Tabelle III-5: Differentiell regulierte Gene in Blättern mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierter Gene. Aufgelistet sind die 20 Gene mit der kleinsten FDR. Die Veränderungen (FC) stellt das Verhältnis mykorrhiziert/nicht-mykorrhiziert dar und wurde mit der DESeq2-Statistik ausgewertet.

Feature ID	Annotation 2.3	FC	p-value	FDR
Solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor	0,6	3E-07	0,01
Solyc01g086660.2.1	Unknown Protein	0,6	1E-05	0,15
Solyc03g121600.2.1	Choline dehydrogenase	1,5	2E-05	0,19
Solyc04g009910.2.1	Serine/Threonine protein kinase 1	0,6	3E-05	0,19
Solyc07g066560.1.1	Auxin responsive SAUR protein	0,6	8E-05	0,31
Solyc06g005330.2.1	MYB transcription factor	0,7	7E-05	0,31
Solyc09g018280.1.1	Serine/Threonine protein kinase	0,7	8E-05	0,31
Solyc05g009890.1.1	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like	1,5	1E-04	0,36

Solyc06g050980.2.1	Ferritin	0,7	1E-04	0,36
Solyc10g075150.1.1	Non-specific lipid-transfer protein	0,7	1E-04	0,36
Solyc01g095140.2.1	Late embryogenesis abundant protein	0,7	2E-04	0,41
Solyc01g100490.2.1	Nicotianamine synthase	0,7	2E-04	0,41
Solyc08g079900.1.1	Subtilisin-like protease	1,4	2E-04	0,41
Solyc09g089510.2.1	Proteinase inhibitor I	0,7	2E-04	0,41
Solyc08g079090.2.1	Laccase-22	0,7	2E-04	0,41
Solyc09g082820.2.1	Unknown Protein	0,7	3E-04	0,48
Solyc01g099970.2.1	F-box/LRR-repeat protein 14	1,3	3E-04	0,48
Solyc05g009470.2.1	Alpha-glucosidase	1,4	3E-04	0,48
Solyc09g098290.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,7	3E-04	0,48
Solyc07g026660.2.1	Unknown Protein	0,7	4E-04	0,57

Tabelle III-5 zeigt das Ergebnis der DESeq2-Statistik. Auch hier wurden die Gene anhand ihrer FDR sortiert. Im Vergleich zur EdgeR Statistik (Tabelle III-4) war mit dem *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1) ein signifikant differentiell reguliertes Gen vorhanden. Die Expression des *MYB transcription factor* betrug in Blättern mykorrhizierter Pflanzen laut RNA-Sequenzierung den Faktor 0,6 bei einer FDR von 0,01. Im Vergleich zur EdgeR Statistik fielen die Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel weniger stark aus. Zu den Genen, die tendenziell stärker in mykorrhizierten Pflanzen exprimiert wurden, gehörten die *Choline dehydrogenase* (FC: 1,5), das *Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like* (FC: 1,5), die *Subtilisin-like protease* (FC: 1,4) und die *Alpha-glucosidase* (FC:1,4). Zu den Genen, die tendenziell schwächer in mykorrhizierten Pflanzen exprimiert wurden gehörte der *MYB transcription factor* (FC: 0,6), die *Serine/Threonine protein kinase 1* (FC:0,6) und das *Auxin responsive SAUR protein* (0,6).

Vergleicht man die Grundlagen beide statistischen Test, ist DESeq2 weniger strikt und EdgeR sensitiver gegenüber Ausreißern (Anders et al., 2013). Aufgrund dessen es zu Unterschieden im Ergebnis kommen kann. Beide Ergebnisse (Tabelle III-4, Tabelle III-5) zeigten dennoch Übereinstimmungen. Jeweils sechs der ersten zwanzig Gene mit dem geringsten FDR waren in beiden Datensätzen zu finden. Dazu gehörten der *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1) die *Serine/Threonine protein kinase 1* (Solyc04g009910.2.1), das *Auxin responsive SAUR protein* (Solyc07g066560.1.1), das *Ferritin* (Solyc06g050980.2.1), das *Non-specific lipid-transfer protein* (Solyc10g075150.1.1) sowie der *Proteinase inhibitor I* (Solyc09g089510.2.1).

Da anhand der statistischen Auswertung beider Tests nur ein signifikant reguliertes Gen identifiziert werden konnte, wurde aus beiden Datensätze Kandidaten ausgewählt, um die Genexpression über real-time qPCR zu überprüfen (II.2.3.6).

III.3.2 Überprüfung und Validierung der Genexpression mittels real-time qPCR

Anhand beider Analysen wurden Kandidaten Gene ausgewählt und mittels real-time qPCR für jede individuelle Pflanze bestimmt. Die Auswahl erfolgte anhand des FDRs und des p -Wertes. Zusätzlich wurden Gene aus bereits veröffentlichten Studien ausgewählt, die am Kohlenstoffkreislauf beteiligt sind. Tabelle III-6 zeigt die Übersicht der analysierten Gene.

Tabelle III-6: Übersicht über die per real-time qPCR analysierte Gene. Die Auswahl erfolgte auf Basis der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (III.3.1)

Feature ID	Annotation 2.3
Solyc01g007320.2.1	ATP synthase β subunit, chloroplastic
Solyc02g062340.2.1	Fructose-bisphosphate aldolase
Solyc03g121600.2.1	Choline dehydrogenase
Solyc03g098790.1.1	Kunitz-type protease inhibitor
Solyc04g009910.2.1	Serine/Threonine protein kinase
Solyc05g007190 (Boldt et al., 2011)	Sucrose transporter 2
Solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor
Solyc06g050980.2.1	Ferritin
Solyc07g053900.2.1	Plant-specific domain TIGR01615 family protein
Solyc09g008670.2.1	Threonine ammonia-lyase biosynthetic
Solyc09g089510.2.1	Proteinase inhibitor I
Solyc10g075150.1.1	Non-specific lipid-transfer protein
Solyc10g083880.1.1	Aquaporine (<i>Sl.TIP1.3</i>)
Solyc11g017010.2.1 (Boldt et al., 2011)	Sucrose transporter 1
Solyc12g098850.1.1	Soluble diacylglycerol acyltransferase
Solyc09g011080.2.1 (Fiorilli et al., 2009)	Rubisco Aktivase

Die Expression der in Tabelle III-6 aufgelisteten Gene wurden mittels real-time qPCR (II.2.3.6) analysiert. Hierzu wurde Gesamt-RNA (II.2.3.1) in cDNA umgeschrieben (II.2.3.5). Um die Daten aus der RNA-Sequenzierung mit den Expressionsmessungen der real-time qPCR vergleichen zu können wurde die identische RNA verwendet. Jedoch wurden in der real-time qPCR die Genexpression der Einzelpflanzen ermittelt. Zusätzlich wurde die Genexpression der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen bestimmt. Abbildung III-15 und Abbildung III-16 zeigen die Expression der Kandidatengene in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten

Pflanzen unter Phosphatmangel, sowie von optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen. Hierbei sind in Abbildung III-15 die Gene zu finden, die in mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel stärker exprimierten wurden, und in Abbildung III-16 die Gene, die in mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel schwächer exprimierten wurden. Im Vergleich zur RNA-Sequenzierung, bei der nur ein Gen mit signifikanter Regulation identifiziert werden konnte (MYB TF, Solyc06g005310.2.1), konnten in der real-time qPCR weitere signifikant differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Hierzu zählten die *Fructose-bisphosphate aldolase* (Solyc02g062340.2.1), und die *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600.2.1) die in Blättern mykorrhizierter Pflanzen signifikant hochreguliert waren (Abbildung III-15), sowie die *Serine/Threonine protein kinase 1* (Solyc04g009910.2.1), der *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1), das *Ferritin* (Solyc06g050980.2.1), die *Plant-specific domain* (Solyc07g053900.2.1) und das *Non-specific lipid-transfer protein* (Solyc10g075150.1.1), die eine signifikant reduzierte Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen zeigten (Abbildung III-16).

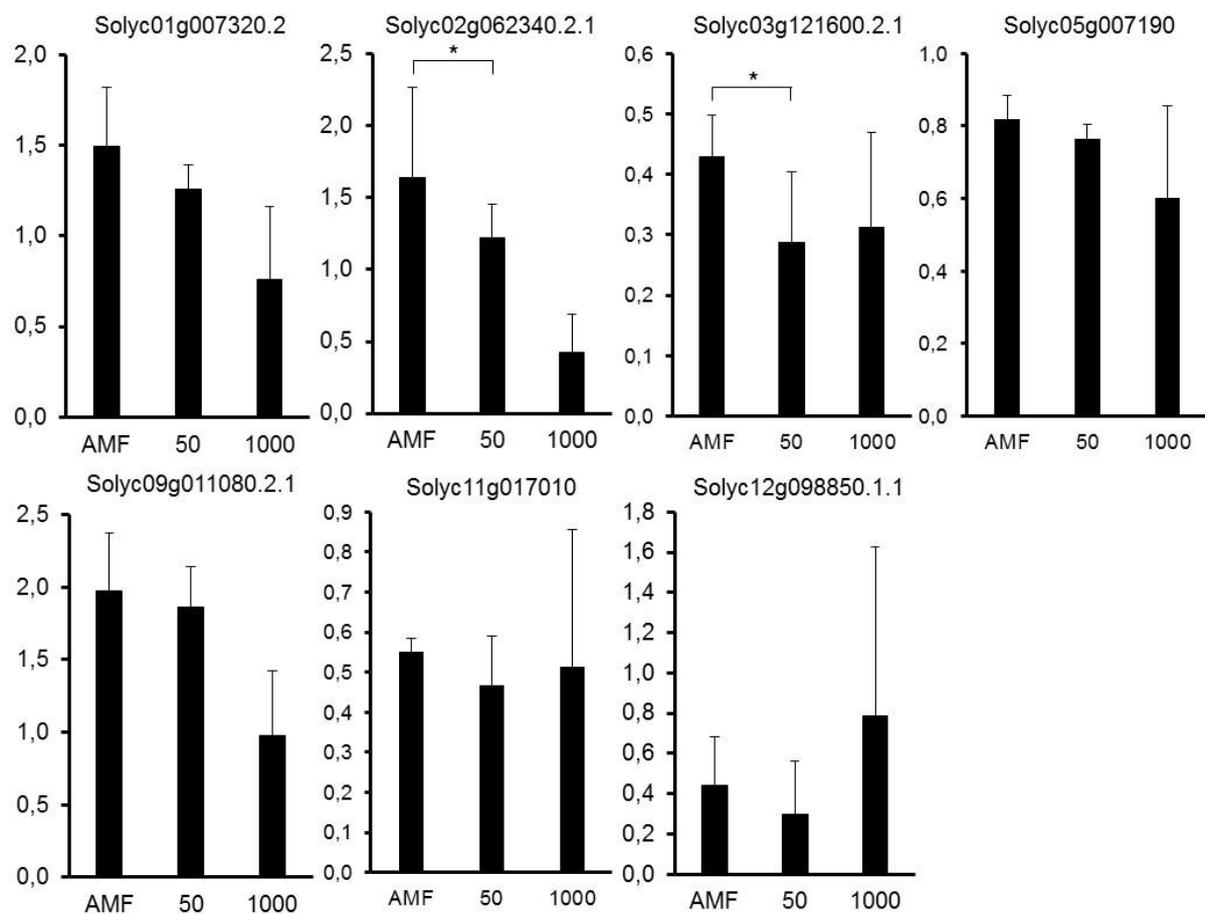


Abbildung III-15: Überprüfung der Kandidatengene der RNA-Sequenzierung mittels real-time qPCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene in mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50) sowie in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000). Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen. Nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *ATP Synthase* (Solyc01g007320), *Fructose-bisphosphat aldolase* (Solyc02g062340.2.1), *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600.2.1), *Sucrosetransportern 2* (Solyc05g007190), *Sucrosetransportern 1* (Solyc11g017010), *Soluble Diacylglycerol acyltransferase* (Solyc12g098850.1.1), *Rubisco Activase* (Solyc09g011080.2.1) erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$.

Abbildung III-15 zeigt die in mykorrhizierten Pflanzen, im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel, hochregulierten Gene. In der real-time qPCR konnten signifikante Unterschiede in der Expression der *Fructose-bisphosphat aldolase* (Solyc02g062340) und der *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600.2.1) gemessen werden. Die *Fructose-bisphosphat aldolase* (Solyc02g062340.2.1) wurde in den Blättern mykorrhizierter Pflanzen nach der Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Aktin 2* mit dem relativen Level von 1,64 exprimiert. Die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten eine Expression von 1,22. In den optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigte die Genexpression mit 0,42 den geringsten Wert. Somit wird das Gen in mykorrhizierten Pflanzen

im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel um das 1,3-fache höher exprimiert ($p=0,015$). In der RNA-Sequenzierung lag die Veränderung bei einem Faktor von 1,1.

Das zweite signifikant regulierte Gen war die *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600.2.1). Diese zeigte in Blättern mykorrhizierter Pflanzen eine standardisierte Expression von 0,43. In nicht-mykorrhizierten Pflanzen war die Expression um das 1,5-fache signifikant reduziert (0,28, $p=0,04$). Optimal mit Phosphat versorgte Pflanzen zeigten eine Expression, die mit 0,31 zwischen den beiden Pflanzen unter Phosphatmangel lag. In beiden Statistiken der RNA-Sequenzierung zeigte das Gen mit der Veränderung von 1,7 und 1,5 einen vergleichbaren Wert.

Für die *Soluble diacylglycerol acyltransferase* (Solyc12g098850.1.1), der *ATP synthase β subunit* (Solyc01g007320) den *Sucrosetransporter 1* (Solyc11g017010), *Sucrosetransporter 2* (Solyc05g007190) und die *Rubisco Activase* (Solyc09g011080.2.1) konnte keine signifikante differentielle Expression im Blatt zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen nachgewiesen werden.

Die *Soluble diacylglycerol acyltransferase* (Solyc12g098850.1.1) wurde um das 1,5-fache stärker in mykorrhizierten Pflanzen exprimiert (p -Wert=0,052). Nach der Standardisierung zeigte das Gen Expressionswerte von 0,44 für die mykorrhizierte Pflanze, 0,30 für die nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel und 0,79 für die optimal mit Phosphat versorgte Pflanze. Die *Soluble diacylglycerol acyltransferase* war damit das einzige Gen, welches die höchste Expression in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigte. Die EdgeR-Statistik hatte für dieses Gen eine Veränderung mit dem Faktor 4,5 ergeben. Die DESeq-Statistik ergab eine Veränderung mit dem Faktor 1,2.

Die durch die real-time qPCR ermittelte Expression der *ATP synthase β subunit* (Solyc01g007320) lag bei mykorrhizierten Pflanzen bei 1,5. Die nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen zeigten unter Phosphatmangel eine Expression von 1,3 und bei optimaler Phosphatversorgung von 0,8. Dies entsprach einer Veränderung zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel von 1,2. Die DESeq-Statistik hatte zuvor eine Veränderung von 1,1 berechnet. Die EdgeR-Statistik hingegen ermittelte eine 2,5-fache Veränderung.

Für den *Sucrosetransporter 1* (Solyc11g017010) und *Sucrosetransporter 2* (Solyc05g007190) sowie für die *Rubisco Activase* (Solyc09g011080.2.1) zeigten alle drei angewendeten Methoden die gleichen Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel.

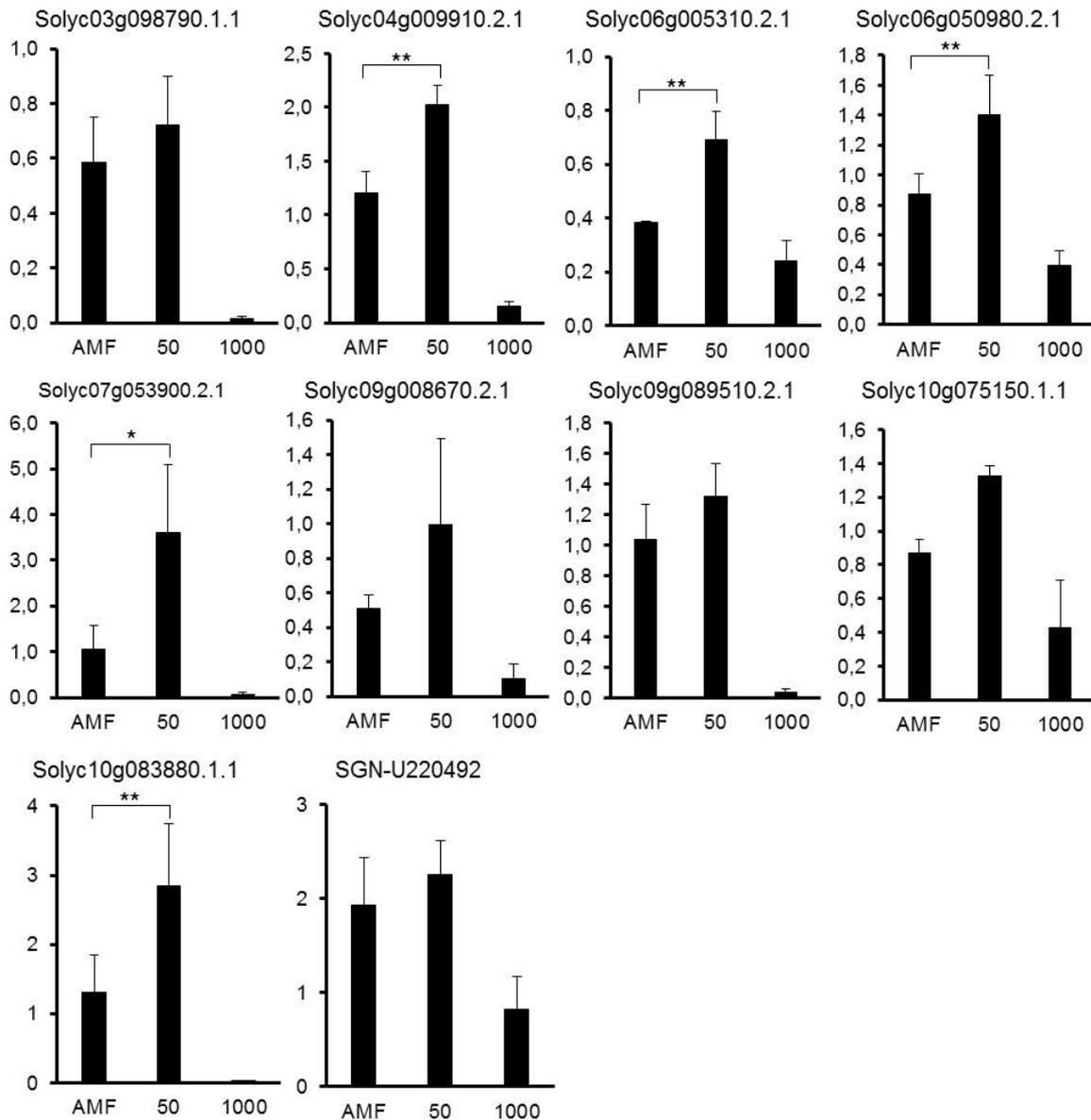


Abbildung III-16: Überprüfung der Kandidatengene der RNA-Sequenzierung mittels real-time qPCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene in mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50) sowie in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000). Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen. Nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *Kunitz-type protease inhibitor* (Solyc03g098790.1.1), *Serine/Threonine protein kinase 1* (Solyc04g009910.2.1), *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1), *Ferritin* (Solyc06g050980.2.1), *Plant specific domain* (Solyc07g053900.2.1), *Threonine ammonia-lyase biosynthetic* (Solyc09g008670.2.1), *RuBisCO Activase* (Solyc09g011080), *Proteinase inhibitor* (Solyc09g089510.2.1), *Non-specific lipid-transfer protein* (Solyc10g075150.1.1), *Aquaporine* (Solyc10g083880.1.1), erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Wie auch in den Daten der RNA-Sequenzierung war die Expression des *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1) in Blättern mykorrhizierter Pflanzen bei der Analyse mittels real-time qPCR signifikant reduziert (FC 0,6, p -Wert=0,00006). Die mykorrhizierten Pflanzen

zeigten mit einer standardisierten Expression von 0,39 eine um 44 % geringere Expression als die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (0,89). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten die geringste Expression (0,096).

Im gleichen Bereich (FC 0,6) in mykorrhizierten Pflanzen signifikant herunterreguliert war die *Serine/Threonine protein kinase 1* (Solyc04g009910.2.1; p -Wert=0,00007) und das *Ferritin* (Solyc06g050980.2.1; p -Wert=0,002). Auch hier zeigten die Analyse der RNA-Sequenzierung und der real-time qPCR übereinstimmende Werte. Die Expression der *Serine/Threonine protein kinase 1* lag bei mykorrhizierten Pflanzen bei 1,20. Bei nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel erhöhte sich die Expression auf 2,03. Die Expression bei optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen lag bei 0,15.

Das *Ferritin* zeigte im Vergleich zur *Serine/Threonine protein kinase 1* eine geringere Expression. In Blättern mykorrhizierter Pflanzen betrug die Genexpression 0,87. Die nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen wiesen eine Expression von 1,40 unter Phosphatmangel und 0,39 in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen auf.

Ein weiteres signifikant runterreguliertes Gen (FC: 0,3, p -Wert: 0,02) trug die Bezeichnung Solyc07g053900.2.1 In den Datenbanken wird es als *polypeptide feature inferred from GFF3 feature* beschrieben. Die Gensequenz zeigte Sequenzhomologien mit der im Mais beschriebenen Pflanzenspezifischen Domäne. Die Expression in mykorrhizierten Pflanzen lag mit 1,1 nur bei etwa 70 % des Expressionsniveaus nicht-mykorrhizierter Pflanzen unter Phosphatmangel (3,60). Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten für dieses Gen eine Expression von 0,06.

Ebenfalls in mykorrhizierten Pflanzen um 54 % signifikant herunterreguliert (FC: 0,5, p -Wert=0,0007) war das *Aquaporine* (tonoplast intrinsic proteins 1.3) (Solyc10g083880.1.1). Mykorrhizierte Pflanzen zeigten mit 1,31 eine 0,5-fache Reduktion im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (2,85). Für die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen lag die Expression bei 0,02.

Für den *Kunitz-type protease inhibitor* (Solyc03g098790.1.1), die *Threonine ammonia-lyase biosynthetic* (Solyc09g008670.2.1), den *Proteinase inhibitor* (Solyc09g089510.2.1) sowie das *Non-specific lipid-transfer protein* (Solyc10g075150.1.1) konnte in der real-time qPCR wie auch in der RNA-Sequenzierung keine signifikante differentielle Expression nachgewiesen werden. Es fiel jedoch auf, dass der *Kunitz-type protease inhibitor* (Solyc03g098790.1.1) in der real-time qPCR eine ähnliche Veränderung (0,9) wie in der DESeq2 ermittelte Veränderung (0,8) aufwies. Unter Phosphatmangel konnte eine Genexpression von 0,58 in mykorrhizierten Pflanzen und 0,72 in nicht-mykorrhizierten Pflanzen ermittelt werden. Die Expression in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen lag bei 0,01. Die EdgeR-Statistik zeigte hingegen eine mit 0,1 deutlich stärkere Veränderung zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel.

Für alle Gene zeigten die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen die geringste Expression. Eine Übersicht der Veränderungen der Genexpression aller drei Datensätze ist in Tabelle III-7 zu sehen.

Tabelle III-7: Vergleich der Veränderung (FC) in den Blättern mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen die durch die zwei unterschiedlichen Statistiken (EdgeR und DESeq) im Anschluss an die RNA-Sequenzierung sowie der real-time qPCR ermittelt wurden.

Solyc Nr.	Annotation	RNAseq	RNAseq	qPCR
		EdgeR	DESeq2	
		FC	FC	FC
Solyc01g007320.2.1	ATP synthase SU β	2,5	1,1	1,2
Solyc07g065900.2.1	Fructose bp aldolase	1,3	1,1	1,3
Solyc03g121600.2.1	Choline dehydrogenase	1,7	1,5	1,5
Solyc05g007190.2.1	Sucrosetransporter 2	1,1	1,1	1,1
Solyc11g017010.1.1	Sucrosetransporter 1	1,1	1,1	1,2
Solyc12g098850.1.1	Soluble diacylglycerol acyltransferase	4,5	1,2	1,5
Solyc09g011080.2.1	Rubisco Aktivase	1,0	1,1	1,1
Solyc03g098790.1.1	Kunitz-type protease inhibitor	0,1	0,9	0,8
Solyc04g009910.2.1	Serine/Threonine protein kinase 1	0,5	0,6	0,6
Solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor	0,4	0,6	0,6
Solyc06g050980.2.1	Ferritin	0,5	0,7	0,6
Solyc07g053900.2.1	Plant specific domain	0,4	0,9	0,3
Solyc09g089510.2.1	Proteinaseinhibitor I	0,6	0,7	1,2
Solyc10g075150.1.1	Non-specific lipid-transfer protein	0,5	0,7	0,7
Solyc10g083880.1.1	Aquaporine	0,6	0,9	0,5
Solyc08g079900.1.1	Subtilisin-like protease	0,5	0,7	0,7

Beim Vergleich der Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel der drei Methoden fällt auf, dass die Veränderungen der Genexpression der *ATP synthase SU β* , *Soluble diacylglycerol acyltransferase* und *Kunitz-type protease inhibitor* der EdgeR-Statistik nicht mit den Daten der DESeq-Statistik und der real-time qPCR vergleichbar sind. Die EdgeR-Statistik zeigten zwar die gleiche Tendenz wie in den anderen beiden Datensätzen, jedoch waren die ermittelten Veränderungen in der Genexpression deutlich stärker. Die Gene waren die am stärksten regulierten Gene in der EdgeR-Analyse und die einzigen, die einen FDR Wert kleiner eins zeigten (Tabelle III-4)

Die DESeq2-Analyse und die real-time qPCR zeigten, mit Ausnahme des *Proteinase inhibitor I* (Solyc09g089510.2.1) vergleichbare Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel.

Die Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (RNA-Sequenzierung und real-time qPCR) waren jedoch in beiden Methoden im Allgemeinen sehr gering.

Der DESeq2-Datensatz wurde weiterhin für eine Analyse mittels MapMan-Software für die Eingruppierung der Gene in Funktionsgruppen genutzt. Da die Benjamini-Hochberg-Prozedur nur ein signifikant reguliertes Gen ergeben hatte (MYB TF) wurde für die MapMan-Analysen alle Gene verwendet, die einen p -Wert kleiner 0,05 besaßen. Die Grenze für den \log_2FC wurde auf 0,7 gesetzt.

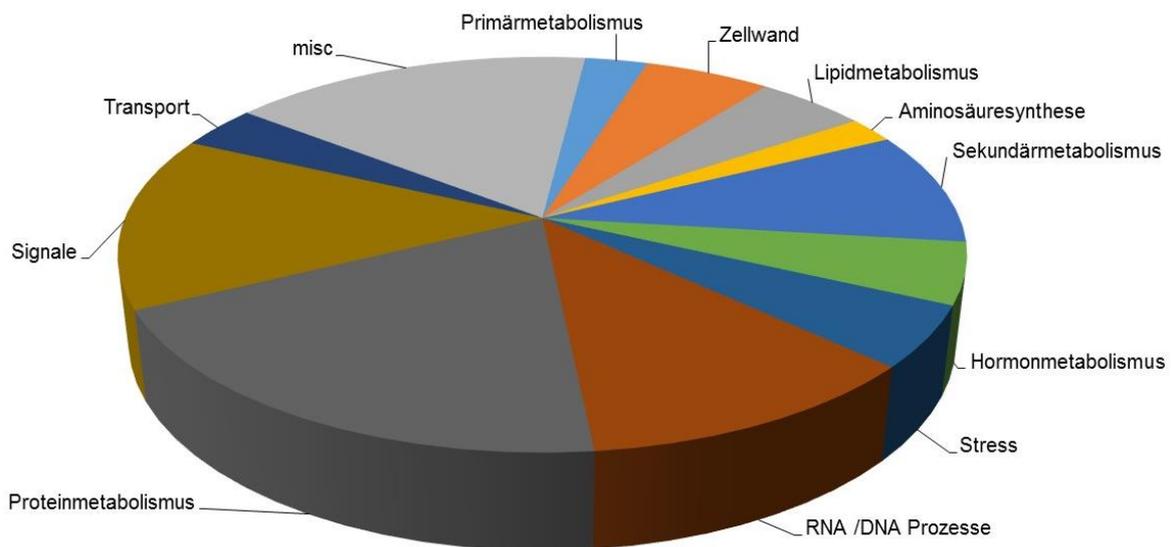


Abbildung III-17: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan-Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik (III.3.1; Tabelle III-5) verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert < 0,05 und einem \log_2 -Foldchange < 0,7 verwendet (186 Gene).

Mit Hilfe des Filters (p -Wert < 0,05; \log_2FC < 0,7) konnte die eine MapMan-Analyse mit 186 Genen durchgeführt werden. Hiervon konnten 174 in der MapMan-Software ihrer Funktionsgruppe (BINs) zugeordnet werden. Dabei sind in Bättern mykorrhizierter Pflanzen 33 Gene herunter reguliert und 133 Gene stärker exprimiert. Eine Übersicht über die Zuordnung zu den Funktionsgruppen ist in Abbildung III-17 zu sehen. Durch die Einordnung der regulierten Gene zu ihren Funktionen wird deutlich, dass die drei am stärksten regulierten Gruppen der Proteinmetabolismus, Signale und RNA/DNA Prozesse sind (Tabelle III-8).

Tabelle III-8: Auflistung der annotierten Gene der drei am stärksten regulierten Gruppe Proteinmetabolismus, Signale und RNA/DNA Prozesse. Die Annotation der Gene erfolgte anhand der Solyc Nr., die dem Referenzgenom von Tomate ITAG2.3 zugeordnet wurden.

Proteinemetabolismus		
Proteinaktivierung und -targeting		FC
Solyc11g007000.1.1	Heme A synthase	1,25
Solyc02g070810.2.1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	1,28
Solyc09g074940.1.1	Translocase of chloroplast 90, chloroplastic	1,26
Proteinmodifikation		
Solyc02g086360.2.1	Octicosapeptide/Phox/Bem1p domain-containing protein	1,25
Solyc09g082510.2.1	Kinase interacting family protein	1,26
Solyc04g009910.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	0,66
Solyc09g018280.1.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	0,71
Solyc04g009900.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	0,71
Solyc06g053620.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	0,73
Solyc04g075000.1.1	Serine/threonine protein kinase	1,26
Solyc02g091470.2.1	Serine/threonine protein kinase-like	1,25
Solyc01g109950.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	1,40
Solyc09g008640.1.1	Receptor-like protein kinase At3g21340	1,30
Proteindegradation		
Solyc04g082120.2.1	Prolyl endopeptidase	1,30
Solyc02g069630.2.1	Subtilisin-like serine protease	1,25
Solyc08g079900.1.1	Subtilisin-like protease	0,66
Solyc02g092670.1.1	Subtilisin-like protease	1,28
Solyc06g083720.1.1	Subtilisin-like protease	1,32
Solyc07g006030.2.1	Protein TIF31 homolog	1,28
Solyc02g032940.2.1	Aspartic proteinase	1,28
Solyc01g079950.2.1	Xylanase inhibitor	1,37
Solyc02g081550.2.1	ATP-dependent Zn protease cell division protein FtsH homolog	1,31
Solyc02g069470.2.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	1,27
Solyc08g042100.2.1	Armadillo/beta-catenin repeat family protein	1,29
Solyc04g076860.2.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	1,30
Solyc01g099970.2.1	F-box/LRR-repeat protein 14	0,71
Proteinglycolisierung		
Solyc09g007420.2.1	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	1,35

Signale		
Zucker- und Nährstoffphysiologie		
Solyc10g074540.1.1	Expressed protein	1,35
Rezeptorkinasen/Leucine rich proteins		
Solyc09g008860.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,33
Solyc01g107650.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	1,25
Solyc04g078590.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,28
Solyc03g118510.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,27
Solyc10g085120.1.1	Receptor like kinase, RLK	1,25
Solyc03g026040.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,30
Solyc03g043770.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,30
Solyc09g098290.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,41
Solyc10g079170.1.1	Receptor like kinase, RLK	1,28
Solyc02g023950.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,38
Solyc11g005150.1.1	Leucine-rich repeat family protein	1,41
Solyc06g048950.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,27
Solyc03g093330.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,39
DUF26		
Solyc08g059730.1.1	S-receptor kinase -like protein	1,28
Misc		
Solyc09g090680.2.1	Cysteine-rich repeat secretory protein 3	1,30
Solyc03g043770.2.1	Receptor like kinase, RLK	1,30
Calcium		
Solyc10g005000.2.1	Os03g0648300 protein	1,27
Licht		
Solyc02g092600.2.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	0,73
Solyc02g090070.2.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	1,27
RNA/DNA Prozesse		
RNA Prozessierung		
Solyc02g081200.1.1	At1g62390-like protein	1,27
Solyc08g066120.2.1	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	1,27
Solyc05g007950.2.1	Ribonuclease T2	0,73
Regulation der Transkription		
Solyc01g008910.2.1	Scarecrow transcription factor family protein	1,28
Solyc07g066110.1.1	Pentatricopeptide repeat-containing protein	1,32

Solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor	0,57
Solyc06g005330.2.1	MYB transcription factor	0,66
Solyc01g101030.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	1,28
Solyc08g076390.2.1	Lysine-specific demethylase 5A	1,25
Solyc08g005240.1.1	Lysine-specific demethylase 5B	1,30
Solyc04g080490.2.1	Zinc finger-homeodomain protein 1	1,27
Solyc05g009890.1.1	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like	1,52
Solyc09g011040.1.1	Aspartic proteinase nepenthesin I	1,41
DNA Synthese/Chromatin Struktur		
Solyc01g102810.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	1,26
Solyc04g045530.2.1	DNA primase large subunit	1,27
Solyc03g111680.2.1	DNA polymerase III gamma/tau subunit	1,31

Bei genauer Betrachtung der drei GO Gruppen konnten in der Gruppe der Proteinmodifikation 27 Gene annotiert werden, wobei 12 Gene den Degradationsprozessen zugeordnet werden konnten. Vier der sechs Gene die eine tendenziell reduzierte Expression zeigten kodieren für die *Phosphoenolpyruvate carboxylase* (3 Gene) und eine *Serin/Threonin Protein Kinase*. Die *Phosphoenolpyruvatecarboxylase* besitzt ebenfalls eine Serin/Threonin Kinase Aktivität. In der Gruppe der Signale konnten 20 Gene annotiert werden. Hierbei konnten 13 Gene den *Receptor like kinase* zugeordnet werden. Bis auf ein Gen (*Phototropic-responsive NPH3 family protein*) zeigten alle Gene dieser Gruppe eine tendenziell erhöhte Expression in mykorrhizierten Pflanzen. Der Gruppe der RNA/DNA Prozesse konnten 13 Gene zugeordnet werden. Drei Gene zeigten eine tendenziell reduzierte Expression in mykorrhizierten Pflanzen, wobei zwei für einen *MYB transcription factor* kodieren. Das dritte Gen zeigte Ähnlichkeiten zu einer Ribonuklease (Tabelle III-8).

III.4 Untersuchung des Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die Physiologie und Genexpression von Tomaten unter Stressbedingungen

Um die Hypothese zu testen, ob die Symbiose mit arbuskuläre Mykorrhizapilzen in Tomaten hauptsächlich die Wasserversorgung der Pflanzen beeinflusst, wurde ein Trockenstressexperiment durchgeführt. Hierzu wurden Pflanzen wie unter Punkt II.2.1.1 und II.2.1.2 beschrieben angezogen, mit dem Unterschied, dass eine Behandlungsgruppe (Trockenstress) neben der üblichen Menge an Hoagland-Nährlösung zusätzlich nur mit 50% der üblichen Menge an Brauchwasser gegossen wurde. Die Menge der Hoagland-Nährlösung wurde nicht verändert, um zu verhindern, dass die zwei Behandlungsgruppen einen unterschiedlichen Nährstoffgehalt aufweisen. Nach fünfwöchiger Symbiose wurden die photosynthetische Aktivität der Pflanzen mittels Gaswechsellmessung (II.2.2.1) bestimmt.

Tabelle III-9: Photosynthetische Parameter (CO_2 -Assimilation und Transpiration) von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ($50 \mu\text{M P}$) unter Trockenstress und optimaler Wasserversorgung (Kontrolle) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei ambienten CO_2 -Bedingungen (400 ppm) und erhöhter CO_2 -Bedingungen, (1000 ppm). Gemessen wurden die photosynthetischen Parameter des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an zwei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$.

	Trockenstress		Kontrolle		
	AMF	50 $\mu\text{M P}$	AMF	50 $\mu\text{M P}$	
400 ppm	Photosynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	15,6\pm1,80	13,2 \pm 2,45	15,7 \pm 1,54	14,4 \pm 1,50
		p=0,03; 18%		p=0,06; 9%	
1000 ppm	Transpiration [$\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	1,8 \pm 0,55	1,5 \pm 0,38	2,0 \pm 0,33	1,79 \pm 0,39
		p=0,17; 21%		p=0,2; 12%	
400 ppm	Photosynthese [$\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	22,9 \pm 0,92	20,6 \pm 4,13	23,3 \pm 1,74	22,4 \pm 1,86
		p=0,13; 12%		p=0,25; 4%	
1000 ppm	Transpiration [$\text{mmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$]	1,88 \pm 0,35	1,56 \pm 0,77	1,78 \pm 0,21	1,76 \pm 0,39
		p=0,3; 20%		p=0,85; 1%	

Die Gaswechsellmessungen zeigten beim Vergleich von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel und Trockenstress eine signifikant erhöhte Photosyntheseleistung von $15,6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ in mykorrhizierten Pflanzen (+18 %, p -Wert=0,03). In der Kontrollgruppe zeigten die mykorrhizierten Pflanzen ebenfalls mit $15,7 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ eine vergleichbare Photosyntheseleistung wie die Pflanzen unter Trockenstressbedingungen. Mykorrhizierten Pflanzen wiesen im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel unter den Kontrollbedingungen lediglich eine um 9 % leicht erhöhte Photosyntheseleistung ($14,4 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) auf. Der gleiche Effekt war bei der Transpiration erkennbar. Die mykorrhizierten Pflanzen zeigten unter

Trockenstressbedingungen mit $1,8 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ und unter Kontrollbedingungen mit $2,0 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ eine tendenziell höhere Transpiration als ihre nicht-mykorrhizierte Kontrolle ($1,5 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, $1,79 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$). Dies entsprach einer Zunahme von 21 % und 12 % in mykorrhizierten Pflanzen.

Unter Bedingungen mit erhöhter CO_2 Konzentration (1000 ppm) zeigten die mykorrhizierten Pflanzen gegenüber der nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ausschließlich unter Trockenstress einen Vorteil in der photosynthetischen Leistung und Transpiration. Der Vorteil in Photosynthese und Transpiration zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel war jedoch nicht signifikant. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten mit $22,9 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ eine um 12 % erhöhte Photosynthese und mit $1,88 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ eine um 20 % erhöhte Transpiration im Vergleich zu ihrer nicht-mykorrhizierten Kontrolle. Unter den Kontrollbedingungen war weder in der Photosynthese noch in der Transpiration ein Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel messbar. Mykorrhizierte und nicht-mykorrhizierte Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten eine Photosyntheseleistung von $23,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ und $22,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ sowie eine Transpiration von $1,78 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ und $1,76 \text{ mmol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$.

Eine tendenziell erhöhte Photosyntheseleistung und Transpiration von mykorrhizierten Pflanzen unter Kontrollbedingungen konnte auch in diesem Experiment nachgewiesen werden. Der Einfluss des arbuskulären Mykorrhizapilzes auf die Photosynthese und Transpiration wurde durch den zusätzlich applizierten Trockenstress vergrößert.

Im Anschluss an die Messungen wurde das zweite voll entwickelte Blatt jeder Pflanze am darauffolgenden Tag nach vier Stunden Licht geerntet. Das geerntete Blattmaterial wurde für die RNA-Isolation und cDNA-Synthese verwendet. Mittels real-time qPCR wurde die Genexpression der *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600), des *Aquaporine* (Solyc10g083880) und des *MYB transcription factors* (Solyc06g005310) in trockengestressten mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel sowie der optimal gewässerten Kontrollgruppe bestimmt. Die Auswahl der Gene erfolgte Anhand der Ergebnisse aus Kapitel III.3.2. Hierbei konnte lediglich für den *MYB transcription factor* eine signifikante differentielle Regulation zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen ermittelt werden. Durch Messung der Expression des *Aquaporins* unter Trockenstressbedingungen sollte der Einfluss der Wasserversorgung durch den arbuskulären Mykorrhizapilz überprüft werden. Die *Choline dehydrogenase* wird als Osmoprotektor beschrieben und schützt die Pflanze unter Stressbedingungen (McNeil et al., 1999). Durch Messung der Expression sollte die Induktion durch Stress und die verbesserte Anpassung an Stressbedingungen durch die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose getestet werden.

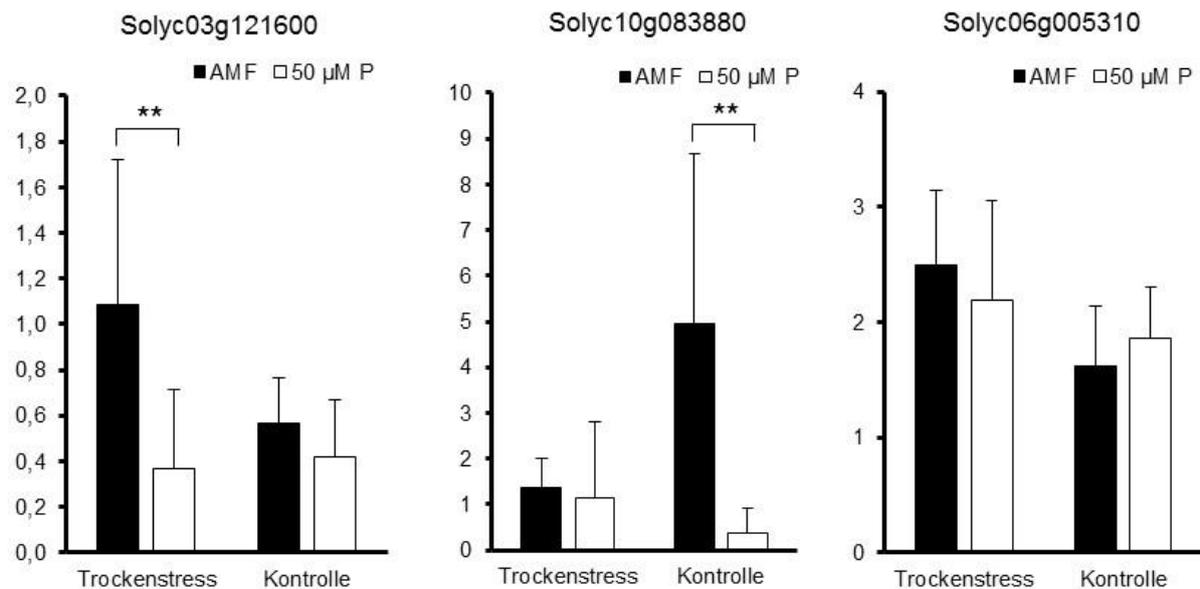


Abbildung III-18: Genexpression von Blättern mykorrhizierter (AMF, schwarz) und nicht-mykorrhizierter (50 µM P, weiß) Pflanzen unter Phosphatmangel. Der Trockenstress wurde durch Reduktion des Brauchwassers um 50 % für zwei Wochen erzeugt. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600), des *Aquaporine* (Solyc10g083880), des *MYB transcription factor* (Solyc06g005310) erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

Die Messungen der Genexpression der *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600) hat eine signifikant erhöhte Genexpression von 1,08 in mykorrhizierten Pflanzen unter Trockenstress ergeben. Die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel zeigten eine Expression von 0,36. Damit zeigten die mykorrhizierten Pflanzen eine um den Faktor drei erhöhte Expression der *Choline dehydrogenase* unter Trockenstress. In der Kontrollgruppe zeigten die mykorrhizierten Pflanzen mit 0,57 nur eine leicht erhöhte Expression im Vergleich zu ihren nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen unter Phosphatmangel mit 0,42. Die Veränderung mit dem Faktor 1,36 entsprach der zuvor ermittelten Veränderung durch die RNA-Sequenzierung (Tabelle III-7) und zeigte keinen signifikanten Unterschied.

Das analysierte *Aquaporine* (Solyc10g083880) zeigte unter Trockenstress eine minimal veränderte Genexpression (FC: 1,2). Die mykorrhizierten Pflanzen zeigten eine standardisierte Genexpression von 1,37 und die nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel von 1,13. Bei der Kontrollgruppe zeigten mykorrhizierten Pflanzen (FC: 4,97) im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (FC: 0,36) jedoch eine signifikant gesteigerte Expression (FC: 13,69, p -Wert=0,004). Der *MYB transcription factor* (Solyc06g005310) zeigte unter beiden Bedingungen, Trockenstress und Kontrolle, nur minimale Veränderungen zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (FC: 1,1 und 0,9). Bei Trockenstressbedingungen zeigten mykorrhizierten

Pflanzen (2,49) im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (2,19) eine tendentiell erhöhte Expression. Unter Kontrollbedingungen hingegen zeigten mykorrhizierte Pflanzen eine im Vergleich zu Trockenstress tendentiell reduzierte Expression (1,62). Die nicht-mykorrhizierten Pflanzen zeigten eine Expression von 1,86.

Aufgrund der stark variierenden Expressionsdaten, vor allem in mykorrhizierten Pflanzen unter Trockenstress für die *Choline dehydrogenase* und in den Kontrollbedingungen für das *Aquaporine* kann keine eindeutige Aussage zur Expression der untersuchten Gene getroffen werden. Um den möglichen Einfluss des Mykorrhizapilzes auf die Genexpression unter Trockenstress eindeutig zeigen zu können, wäre eine Wiederholung des Experiments nötig.

IV. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Regulation der Photosynthese durch den arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* in Tomate (*Solanum lycopersicum* cv. Moneymaker) untersucht werden. Grundlage der Arbeit waren Veröffentlichungen, die gezeigt haben, dass die Symbiose mit arbuskulären Mykorrhizapilzen in einer erhöhten Photosynthese resultiert. Verschiedene Hypothesen bezüglich des Einflusses des Pilzes auf die Pflanze wurden bereits einleitend diskutiert.

IV.1 *Die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz Rhizophagus irregularis führt zu einer gesteigerten Photosynthese unter Phosphatlimitierung*

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Pflanzen in einer arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose eine erhöhte Photosynthese zeigen, die gleichzeitig zu einer gesteigerten Biomasseproduktion führt (Kaschuk et al., 2010; Gutjahr et al., 2009; Sieh et al., 2013; Sheng et al., 2008; (Bethlenfalvay et al., 1988; Lee et al., 2012; Ngwene et al., 2013; Zhang et al., 2011). Es wird allgemein angenommen, dass die Versorgung der Pflanze mit Nährstoffen während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose durch den Pilz verbessert wird. Jedoch haben viele Studien den Nährstoffgehalt der Pflanze nicht berücksichtigt und demzufolge nicht analysiert (Bethlenfalvay et al., 1988; Lee et al., 2012; Ngwene et al., 2013; Zhang et al., 2011), wodurch keine genaue Aussage darüber getroffen werden kann, ob die erhöhte Photosynthese der Pflanze eine Folge der verbesserten Nährstoffversorgung durch den Pilz oder anderer Effektoren ist.

Durch die Bestimmung des Nährstoffgehalts des Sprosses konnte in dieser Arbeit sichergestellt werden, dass trotz guter Mykorrhizierung der Wurzel (Abbildung III-2) keine Unterschiede im Nährstoffgehalt beim Vergleich von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomatenpflanzen vorlagen (Tabelle III-1, Tabelle III-2). Dies spiegelt sich ebenfalls in den aufgezeichneten Wachstumsparametern der Behandlungsgruppen wieder (Abbildung III-1, Tabelle III-2). Die Tomatenpflanzen zeigten weder bei 24°C noch bei 28°C Anzuchttemperatur einen Vorteil durch den arbuskulären Mykorrhizapilz nach fünfwöchiger Symbiose unter Phosphatmangel. Die parallel angezogenen optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen zeigten ein signifikant verstärktes Wachstum und signifikant erhöhte Sprossphosphatgehalte. Das bessere Wachstum der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen ist auf die verbesserte Nährstoffversorgung, vor allem mit Phosphat, zurückzuführen. Ein direkter Vergleich zwischen Pflanzen unter Phosphatmangel und optimaler Phosphatversorgung ist daher nicht möglich. Die optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen dienen lediglich dazu, einen möglichen Effekt durch Phosphat zu identifizieren (Schweiger und Muller, 2015).

Ein Wachstumsvorteil durch den arbuskulären Mykorrhizapilz konnte hingegen nach zehnwöchiger Symbiose beobachtet werden. Hierbei zeigten mykorrhizierte Pflanzen im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel einen signifikanten Anstieg im Sprossfrischgewicht sowie im Sprossphosphatgehalt (Abbildung III-3; Tabelle III-2). Die Beobachtung eines späten Wachstumsvorteils und Sprossphosphatgehalts wurden schon in Studien mit Klee und *Plantago major* beschrieben. Diese Untersuchungen zeigten, dass der Effekt des Wachstumsvorteils und einer verbesserten Phosphatversorgung erst bei längerer Symbiose zwischen Pilz und Pflanze eintritt. Für *Plantago major* konnte erst 62 Tage und für Klee 53 Tage nach Inokulation ein signifikanter Vorteil der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose bezüglich des Phosphatgehalts und des Wachstums detektiert werden (Wright et al., 1998a; Schweiger et al., 2014b). Studien mit Tomate zeigten ebenfalls, dass erst nach zehnwöchiger Symbiose mit den arbuskulären Mykorrhizapilzen *Rhizophagus irregularis* und *Funneliformis mosseae* eine Frischgewichtszunahme zu beobachten war (Chitarra et al., 2016).

Wie auch in bereits publizierten Studien (Boldt et al., 2011; Schweiger et al., 2014b; Wright et al., 1998a) konnte in dieser Arbeit während der frühen Symbiose, in der noch kein phänotypischer Effekt sichtbar war, eine tendenziell erhöhte Photosyntheseleistung bestätigt werden. Die tendenziell erhöhte Photosyntheseleistung von mykorrhizierten Pflanzen konnte im Vergleich zu der nicht-mykorrhizierten Kontrollgruppe unter Phosphatmangel für zwei unterschiedliche Anzuchttemperaturen gezeigt werden (Abbildung III-4), wobei der Unterschied zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel durch Erhöhung der Anzuchttemperatur zunahm. Die Bestimmung der Photosyntheseleistung von Tomaten *Cuttings* (cv. *Moneymaker*) nach sechswöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus mosseae* zeigte eine erhöhte Photosyntheseleistung bei allen getesteten Lichtintensitäten und Kohlenstoffdioxidkonzentrationen (Boldt et al., 2011). Jedoch wiesen diese Daten, aufgrund der sehr geringen Werte für die stomatare Leitfähigkeit, auf einen Wasserstress, beziehungsweise auf einen nicht optimalen Wasserhaushalt der Pflanzen hin (Boldt et al., 2011). Für die Sorte *San Marzano nano* konnte eine erhöhte Photosynthese nach zehnwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* beobachtet werden. Bei der Inokulation mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Funneliformis mosseae* blieb die Erhöhung der Photosyntheseleistung jedoch aus (Chitarra et al., 2016).

Mit Hilfe der aufgenommenen Parameter während der Gaswechselformenmessungen konnte ebenfalls die Photosynthese pro interzellularem CO₂ (A/ci) berechnet werden (Abbildung III-4). Lediglich die Erhöhung der CO₂-Konzentration von 400 ppm auf 1000 ppm beeinflusst die

Photosynthese pro interzellularen CO₂. Ein Unterschied zwischen den mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen konnte nicht nachgewiesen werden. Somit kann eine Anreicherung des Kohlenstoffdioxids im Blatt von mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel ausgeschlossen werden.

Eine erhöhte CO₂-Konzentration in der Nähe des Enzyms RuBisCO führt zur Verschiebung des Verhältnisses von CO₂ und O₂ im Inneren des Blattes. Durch Erhöhung der CO₂-Konzentration wird folglich die Bindung von CO₂ mit der folgenden Photosynthese gegenüber der Oxygenierung und der damit verbundenen Photorespiration bevorzugt (Sharkey, 1985; Peterhansel et al., 2010).

IV.2 Eine aktive Mykorrhizierung mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* korreliert mit der Transpiration der Tomatenpflanzen

Als weiteren Parameter wurde die Transpiration der Pflanzen bestimmt. Hierbei zeigten mykorrhizierte Pflanzen eine signifikante Steigerung der Transpiration bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C (400 ppm und 1000 ppm) sowie bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C und 1000 ppm CO₂ (Abbildung III-4). Durch Erhöhung der Anzuchttemperatur konnte die Differenz zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel von 15 % bei 24 °C auf 33 % bei 28 °C gesteigert werden. Da die Steigerung in der Photosyntheseleistung lediglich 6 % betrug (24 °C: 17 %; 28 °C: 23 %), scheint der arbuskuläre Mykorrhizapilz einen größeren Einfluss auf den Parameter der Transpiration zu haben. Zusätzlich konnte eine Korrelation zwischen der aktiven Mykorrhiza und der Transpiration (Abbildung III-10) gezeigt werden. Die aktive Mykorrhizierung korreliert jedoch nur schwach Photosyntheseleistung der Pflanzen (Abbildung VI-1). Auch dieses Ergebnis untermauert die Regulation der Transpiration durch den arbuskulären Mykorrhizapilz. Somit ist der Pilz in der Lage, die Kapazität des Gaswechsels der Pflanze zu beeinflussen und durch Verringerung des stomatären Widerstands die Transpiration und folglich die Photosynthese zu erhöhen (Subramanian und Charest, 1995).

Die Transpiration findet über die Spaltöffnungen des Blattes statt und ermöglicht den Gasaustausch der Pflanze. Kohlenstoffdioxid kann in das Blattinnere gelangen. Im Gegenzug verliert die Pflanze durch die Öffnung der Stomata Wasser. Aus diesem Grund reguliert die Pflanze die Öffnung der Stomata unter anderem anhand ihres Wasserstatus (Xu und Zhou, 2008). Für mykorrhizierte Tomaten konnte im Vergleich zur nicht-mykorrhizierten Kontrolle eine um den Faktor zwei gesteigerte Dichte an Stomata in den Blättern sowie eine erhöhte Expression des Gen *LeEPFL9*, welches in die Entwicklung der Stomata involviert ist, gezeigt werden (Chitarra et al., 2016). Durch die Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung konnte ebenfalls eine erhöhte Expression (FC: 1,32) des Gens *Solyc06g083720.1.1* in Blättern mykorrhizierter Pflanzen gemessen werden. Das Gen *Solyc06g083720.1.1* zeigt

Sequenzähnlichkeiten mit dem *Arabidopsis thaliana* Gen At1g04110, welches als *Stomatal Density and Distribution 1* annotiert ist. Somit ist es, wie das Gen *LeEPFL9*, an der Regulation der Stomatadichte und –entwicklung beteiligt.

In der Studie von Chitarra et al. (2016) zeigten die mykorrhizierten Pflanzen ebenfalls eine erhöhte Transpiration und Photosyntheseleistung. Die Autoren schlussfolgern, dass die erhöhte Photosynthese aus der verbesserten Wasserverfügbarkeit in mykorrhizierten Pflanzen resultiert (Chitarra et al., 2016). Jedoch sollte in die Bewertung der photosynthetischen Parameter die in dieser Studie beobachtete Frischgewichtszunahme, vor allem der Wurzelmasse, durch den arbuskulären Mykorrhizapilz berücksichtigt werden. Aufgrund der Biomassesteigerung kann davon ausgegangen werden, dass die Wasser- und Nährstoffabsorption aus dem Boden ebenfalls erhöht ist und es damit zu einer veränderten Wasserversorgung der zu vergleichenden Behandlungsgruppen kommt (McElrone et al., 2013).

Der Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf den Wasserhaushalt der Pflanze konnte bereits 1981 gezeigt werden. Der Vergleich des Wasserpotentials im Boden von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen zeigte, dass die mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu ihren nicht-mykorrhizierten Kontrollpflanzen unter Phosphatmangel erst bei einem geringeren Wasserpotential welken (Hardie und Leyton, 1981). Der Pilz ist somit in der Lage, mit Hilfe seines feinen Hyphennetzwerks (Smith und Smith, 2011), Wasser aus dem Boden aufzunehmen, welches für die Wurzel allein nicht verfügbar ist (Bethlenfalvay et al., 1988; Khalvati et al., 2005).

Darüber hinaus konnte seit den frühen 1980er Jahren in verschiedenen Arbeiten immer wieder der Effekt der arbuskulären Mykorrhizapilze auf die stomatäre Leitfähigkeit oder das Wasserpotential verschiedener Pflanzen wie Zitrone (*Citrus jambhiri*), Mais oder Moskitograss (*Bouteloua gracilis*) während der Symbiose gezeigt werden (Allen et al., 2001; Krikun und Levy, 1980; Sánchez-Díaz und Honrubia, 1994; Subramanian und Charest, 1995; Zhu et al., 2012).

Der Einfluss der Wasserverfügbarkeit im Zusammenhang mit der Transpiration wurde auch in verschiedenen Studien gezeigt, in denen der Effekt des arbuskulären Mykorrhizapilzes bei unterschiedlichen Gießintervallen untersucht wurde (Birhane et al., 2012; Evelin et al., 2009; Ruiz-Lozano et al., 1995; Chitarra et al., 2016).

Ein Vergleich von vorhandenen Studien ist jedoch schwer, da die stomatäre Leitfähigkeit und Transpiration von vielen weiteren Einflüssen, wie Kohlenstoffdioxidkonzentration, Licht oder Größe der Pflanze beeinflusst wird (Smith und Gianinazzi-Pearson; Sánchez-Díaz und Honrubia, 1994; Smith und Read, 1997; Augé, 2001; Chitarra et al., 2016). Dennoch hat Augé et al. (2014) 460 Studien bezüglich des Einflusses der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf die stomatäre Leitfähigkeit untersucht und ausgewertet. Er konnte eine im Mittel um 24 %

erhöhte stomatäre Leitfähigkeit in mykorrhizierten Pflanzen feststellen. Weiterhin fasste er bereits 2001 den Einfluss von Wasser auf die Transpiration während der Mykorrhizierung zusammen und beschrieb, dass der arbuskuläre Mykorrhizapilz die Sensitivität der Stomata auf die Luftfeuchtigkeit beeinflusst (Augé, 2001).

In vielen Studien konnte ausschließlich unter Trockenstress ein Vorteil in mykorrhizierten Pflanzen beobachtet werden (Augé, 2001; Lee et al., 2012). Ein Trockenstress kann in dem durchgeführten Experiment (III.1) jedoch ausgeschlossen werden. Durch die Werte der Transpiration und der stomatären Leitfähigkeit bei der Gaswechsellmessung sowie durch Messung der Wasserbindefähigkeit des Substrats und die Aufzeichnung des Wassergehalts [Volumen %] bei der Ernte der Pflanzen nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz zeigten, dass zum Zeitpunkt der Gaswechsellmessung, beziehungsweise der Ernte ausreichend pflanzenverfügbares Wasser im Substrat vorhanden war (Tabelle VI-9).

Um zu überprüfen, ob der Effekt der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose durch Stress vergrößert wird, wurde ein Trockenstressexperiment durchgeführt. Hierbei zeigte sich beim Vergleich mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen eine größere Differenz zwischen der Photosyntheseleistung und der Transpiration unter Trockenstressbedingungen (Tabelle III-8). Eine signifikant erhöhte Photosynthese unter Trockenstress konnte ebenfalls für mykorrhizierte Gerste (*Hordeum vulgare L. cv. Pallas*) gemacht werden. Dabei stellten die Autoren ebenfalls fest, dass der arbuskuläre Mykorrhizapilz in der Lage ist, die Trockentoleranz der Pflanze durch Verbesserung der Wasserversorgung zu steigern (Li et al., 2014). Für Tomate konnte eine erhöhte Toleranz gegenüber Wasserstress bei dem Vergleich von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen bewiesen werden. Die Analyse enthielt zeitgleich einen Vergleich von zwei verschiedenen Pilzen (*Funneliformis mosseae* und *Rhizophagus intraradices*). Der Vergleich zeigte jedoch auch, dass der Mechanismus der Stressantwort vom Pilz abhängig ist (Chitarra et al., 2016).

IV.3 Die Stresstoleranz von mykorrhizierten Pflanzen zeigt sich auf Ebene der Genexpression

Die Transkriptomanalyse von Blättern mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen diente der Untersuchung der molekularen Grundlage für die gesteigerte Photosyntheseleistung in mykorrhizierten Pflanzen. Mykorrhizierte Pflanzen besitzen eine verbesserte Wasserversorgung (III.1.2, IV.2). Demzufolge ist zu erwarten, dass zum Beispiel Aquaporine verstärkt exprimiert werden. Eine erhöhte Expression von Aquaporinen wurde bereits von Chitarra et al. (2016) und Giovannetti et al. (2012) beobachtet (Chitarra et al., 2016; Giovannetti et al., 2012).

Im Gegensatz zu dieser Erwartung, konnte durch die RNA-Sequenzierung eine reduzierte Expression von Aquaporinen in mykorrhizierten Pflanzen gezeigt werden (Tabelle III-7). In

Tomate sind bislang 47 Aquaporine identifiziert worden, die anhand ihrer Phylogenie und Aminosäuresesequenz in fünf unterschiedliche Gruppen eingeordnet werden konnten (PIPs, TIPs, NIPs, SIPs, XIPs) (Reuscher et al., 2013). Aquaporine sind Proteine, die den Transport von Wasser in der Pflanze durch Bildung von Kanälen in der Zellmembran erleichtern. Neben dem Transport von Wasser schützen sie die Pflanze auch vor Verlust von Nährstoffen und Salz-Ionen (Chakrabarti et al., 2004; Jensen et al., 2003; Kaldenhoff et al., 2007).

In der RNA-Sequenzierung konnten insgesamt 41 der 47 Aquaporine identifiziert werden, von denen 26 eine reduzierte Expression im Blatt mykorrhizierter Pflanzen zeigten.

Barzana et al. (2014) haben in Maiswurzeln die differenzielle Regulation von Aquaporinen während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose untersucht. Sie ordneten die Aquaporine nach ihrem Expressionsmuster bei optimaler Wasserversorgung und unter Trockenstress in Gruppen ein. In fünf der sechs Gruppen zeigten die mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu der nicht-mykorrhizierten Pflanze eine reduzierte Expression der Aquaporine bei optimaler Wasserversorgung (Barzana et al., 2014). Auch in Tomate (*Solanum lycopersicum* var. *San Marzano nano*) konnte eine differentielle Regulation von Aquaporinen in der Wurzel detektieren. Das Aquaporin *SNIP1;3* zeigte unter Kontrollbedingungen sowie unter Trockenstressbedingungen eine erhöhte Expression in mykorrhizierten Pflanzen. Die Messung der Aquaporine *SPIP1;1* und *STIP2;3* zeigte hingegen nur unter Kontrollbedingungen eine erhöhte Expression in mykorrhizierten Pflanzen (Chitarra et al., 2016). Die Tomatenpflanzen waren zum Analysezeitpunkt mit zehn Wochen jedoch deutlich älter als die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzen, wodurch ein direkter Vergleich nicht möglich ist.

Zudem ist auch aufgrund des unterschiedlichen Gewebes ein Vergleich mit den bereits publizierten und oben beschriebenen Daten schwierig. Bislang sind keine publizierten Daten über die Expression von Aquaporinen in Blättern mykorrhizierter Pflanzen verfügbar.

Um eine mögliche Regulation des Aquaporins durch Stress zu testen, wurde ein Trockenstressexperiment durchgeführt (III.4.). In der RNA-Sequenzierung zeigten die mykorrhizierten Pflanzen (Tabelle III-7) eine tendenziell reduzierte Expression des Aquaporins. Hingegen konnte in den Kontrollbedingungen einen signifikanten Anstieg der Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen beobachten werden. Eine ähnliche Beobachtung machten auch Calvo-Polanco et al. (2014), die die Expression verschiedener Aquaporine in gefluteten und nicht-gefluteten Tomatenwurzeln gemessen haben. Hierbei konnte für das Aquaporine *SPIP1;7* bei Flutung der Wurzeln eine etwa 6-fach erhöhte Expression in mykorrhizierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanzen beobachtet werden. Auch hier zeigten die unterschiedlichen Aquaporine eine differentielle Regulation bei gleichem Stress.

Aufgrund des starken Anstiegs der Genexpressions und der großen Variabilität in der Kontrollgruppe des Trockenstressexperiments (Abschnitt III-4) wäre eine Verifizierung des Experiments ratsam, da anhand der gewonnenen Daten keine eindeutige Aussage getroffen werden kann.

Aquaporine sind weiterhin in der Lage, kleine Moleküle wie CO₂, Glycerol, Urea, NH₃/NH₄, Silikon, Malat, Glycin (Kaldenhoff et al., 2007) und Hydrogenperoxide (H₂O₂) (Bienert et al., 2011) zu transportieren. Hierdurch sind sie neben der Wasserversorgung auch in die Kohlenstofffixierung und in die Antwort auf abiotischen und biotischen Stress involviert und unterliegen weiterer Regulationen. Daher ist eine allgemein gültige Aussage bezüglich der Aquaporine und ihres Expressionsmusters und Regulation zum jetzigen Zeitpunkt nicht möglich.

In dem Kontext der Transpiration und Stomataöffnung wird auch immer wieder der Zusammenhang mit Phytohormonen diskutiert (Krikun und Levy, 1980). Zwar wurden in dieser Arbeit keine Untersuchungen der Phytohormone durchgeführt, dennoch weisen die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung auf eine Beteiligung von Phytohormonen hin.

Für den *MYB transcription factor*, den *Proteinase inhibitor*, das *Ferritin* sowie das *Non-specific lipid transfer protein* konnte eine signifikant reduzierte Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen detektiert werden (Abbildung III-16). Die Literatur weist für diese Gene auf einen Einfluss bei Stressreaktionen der Pflanze und Interaktion mit dem Phytohormon Abscisinsäure hin (Vaseva et al., 2012; Kizis et al., 2001; Arosio et al., 2009; Torres-Schumann et al., 1992). Eine reduzierte Expression von Genen, die in den Signalweg oder die Synthese von Abscisinsäure involviert sind, könnte auf einen reduzierten Gehalt an Abscisinsäure hinweisen. Abscisinsäure ist unter anderem in die Öffnungen und Schließung der Stomata involviert. Hierbei reguliert Abscisinsäure den Ionenfluss in den Schließzellen und führt so zu einer Veränderung des pH-Wertes (I.5.2; Abbildung I-8). Dies sind häufig Reaktionen auf veränderte äußere Bedingungen, wie der Tagesrhythmus, aber auch Reaktionen auf biotischen und abiotischen Stress. Daher wird Abscisinsäure auch im Allgemeinen als Stresshormon bezeichnet (Steuer et al., 1988).

Herrera-Medina et al. (2007) konnten eine positive Korrelation zwischen Abscisinsäure und Strigolaktonen, den Signalmolekülen bei der Etablierung der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose, in Tomate zeigen. Eine Inhibierung der Abscisinsäuresynthese führte in ihren Versuchen zu einer Reduktion von Strigolaktonen. Weiterhin zeigten mykorrhizierte Pflanzen eine generelle Reduktion des Abscisinsäuregehalt (Duan et al., 1996; Estrada-Luna und Davies, 2003; Fernandez et al., 2014; Aroca et al., 2008; Aroca et al., 2013). Die Messung der Abscisinsäure in Blättern und Wurzel von Tomate ergab einen reduzierte Metabolitgehalt in

beiden Geweben, sowie eine erhöhte Expression des Schlüsselenzyms der ABA Synthese, *nced* (Chitarra et al., 2016).

Weiterhin zeigten bereits Delaux et al. (2013) und Laressergues et al. (2012) die Beteiligung von Transkriptionsfaktoren bei der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose. In den Transkriptomanalyse konnte mit dem *MYB transcription factor* (Solyc06g005310) ebenfalls ein Transkriptionsfaktor identifiziert werden, der signifikant differentiell reguliert war. Die MYB Transkriptionsfaktoren werden auch als Master-Regulatoren bezeichnet (Ambawat et al., 2013), da sie entscheidende biologische Prozesse in der Zelle steuern. MYB-Transkriptionsfaktoren steuern aber auch Prozesse wie Entwicklung, Metabolismus, Differenzierung, Abwehrreaktionen sowie biotische und abiotische Stressreaktionen (Meshi und Iwabuchi, 1995; Mengiste et al., 2003; Xiang et al., 1997; Kizis et al., 2001). Sie sind unter anderem an der Abscisinsäure (ABA) Antwort beteiligt und können mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren. Die große und funktionell vielfältige Familie der MYB-Transkriptionsfaktoren ist in allen Eukaryoten zu finden. In Tomate konnten bislang 127 Proteine mit mindestens einer MYB-Domäne identifiziert werden (tomato genomic resource database; 03.06.2016). Die MYB-Proteine weisen eine spezielle konservierte DNA-Bindedomäne mit einer Größe von ca. 53 Aminosäuren auf, die als MYB-Domäne bezeichnet wird. Diese Sequenzwiederholung kann einfach (1R), doppelt (R2R3) oder dreifach (3R) vorliegen (Kranz et al., 1998; Kranz et al., 2000). Eine Einordnung und Zuordnung des untersuchten *MYB transcription factor* ist anhand der RNA-Sequenzierung und Annotation mit der ITAG2.3 Referenzgenom jedoch nicht möglich. Ein Nukleotidsequenzblast mit der Sequenz des analysierten Gens zeigte eine 95 %ige Sequenzhomologie mit einem MYB Transkriptionsfaktor, der den Namen *R2R3 MYB transcription factor 59 SIMYB59* (Solyc06g05330.2) trägt. Untersuchungen im Wurzelgewebe von Tomaten ergaben eine Induktion des *R2R3 MYB transcription factor 59 SIMYB59* durch Hormone (Sol Genomic Network, Blast).

Für den homologen MYB Transkriptionsfaktoren in *Arabidopsis thaliana* AtMYB60, ebenfalls ein R2R3 MYB Transkriptionsfaktor, konnte eine Beteiligung in der Regulation der Stomataöffnung und -schließung gezeigt werden. Hierbei wird der Transkriptionsfaktor exklusiv in den Schließzellen exprimiert und zeigte eine reduzierte Expression durch das Phytohormon Abscisinsäure (Cominelli et al., 2005).

Um eine stressbedingte Regulation des *MYB transcription factor* zu überprüfen, wurde daher die Expression in einem Trockenstressexperiment überprüft. Hierbei zeigten sich unter beiden Bedingungen, Trockenstress und Kontrollbedingung, keine signifikanten Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Daher kann vermutet werden, dass der *MYB transcription factor* im Blatt nicht an der Regulation bei abiotischem Stress beteiligt ist. Die differentielle Expression zwischen mykorrhizierten und

nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel könnte somit auf die Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz zurückzuführen sein. Um den *MYB transcription factor* mit seiner Funktion genauer zu identifizieren und zu charakterisieren, bedarf es jedoch weiterer Analysen. Der Vergleich von Pflanzen mit gestörter Expression des *MYB transcription factor* könnte den Informationen über den Einfluss beziehungsweise die Funktion des Gens liefern. Zusätzlich zu der reduzierten Expression des MYB-Transkriptionsfaktors zeigte die Cholindehydrogenase (Solyc03g121600) eine signifikant erhöhte Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen (Abbildung III-15). Eine erhöhte Genexpression der *Choline dehydrogenase* wird als Reaktion der Pflanze bei Stress beschrieben und weist ebenfalls auf eine verbesserte Reaktion der Pflanzen gegenüber Stress hin (Zhu et al., 2012).

Die Cholindehydrogenase katalysiert die Oxidation des Aminoalkohols Cholin zu Betainealdehyd. Cholin, das Substrat der Dehydrogenase, entsteht in der Pflanze durch Decarboxylierung von Serin, welches in Blättern mykorrhizierter Pflanzen einen signifikant erhöhten Gehalt zeigte (Abbildung III-7). Betainealdehyd wird im Anschluss für die Synthese von Glycinbetain genutzt. Glycinbetain fungiert in der Pflanze als Osmoprotektor und stabilisiert Proteine und Membranen (McNeil et al., 1999). Unter Stressbedingungen werden dabei die Aminoalkohole durch Zerfall der Membranen freigesetzt (Mascher et al., 2005) und aktivieren zelluläre Resistenz- und Toleranzmechanismen (Leinhos und Bergmann, 1995; Bergmann et al., 1994). Eine erhöhte Stressresistenz der Pflanzen konnte zusätzlich auch durch externe Applikation von Aminoalkoholen gezeigt werden (Bergmann et al., 1994; Leinhos und Bergmann, 1995; Mascher et al., 2005).

Desweiteren konnte eine Erhöhung der Cholin- und Glycinbetainesynthese in *Arabidopsis thaliana* durch Integration der Phosphoethanolamine N-Methyltransferase (PEAMT) von *Bacillus subtilis* zeigen, dass Pflanzen mit einem erhöhten Metabolitgehalt eine Toleranz gegenüber osmotischem Stress besitzen (Zhang et al., 2010). Auch in Tomate wurden die Applikation von Glycinbetain und daraus resultierenden Auswirkungen auf die Physiologie der Pflanze untersucht. Hierbei zeigten Tomaten nach Applikation von Glycinbetaine eine erhöhte Photosynteserate (Mäkelä, 2004).

In dem durchgeführten Trockenstressexperiment (III.4) konnte eine stressinduzierte Expression der *Choline dehydrogenase* in Blättern mykorrhizierten Pflanzen gezeigt werden (Abbildung III-18). Unter den Kontrollbedingungen hingegen war die Expression mit dem Faktor 1,3 nicht signifikant gesteigert und damit vergleichbar mit den Veränderungen, die durch die RNA-Sequenzierung ermittelt wurden (III.3.1). Demnach zeigte die *Choline dehydrogenase*, wie von Russell et al. (1997) beschrieben, eine durch Trockenstress induzierte Expression.

In dieser Arbeit konnte die Erhöhung der Aminoalkohole nicht direkt nachgewiesen werden, dennoch lässt eine erhöhte Expression der *Choline dehydrogenase* in mykorrhizierten

Pflanzen einen gesteigerten Fluss durch den Glycinbetaine-Stoffwechselweg vermuten. Durch die Induktion der *Choline dehydrogenase* in mykorrhizierten Pflanzen kann somit eine verbesserte Toleranz gegenüber Stress erreicht werden, was zu einer positiven Stimulation der Photosynthese führt.

IV.4 Die GO-Gruppe des Proteinmetabolismus ist die am stärkste regulierte Gruppe in Blättern mykorrhizierter Tomatenpflanzen

Die Eingruppierung der differentiell regulierten Gene in ihre Funktionsgruppen zeigte, dass Gene aus der Gruppe des Proteinmetabolismus der stärksten Regulation unterliegen (Abbildung III-17). Dieses Ergebnis ist konsistent mit dem Ergebnissen von Cervantes-Gómez et al. (2016), der ebenfalls das Blatttranskriptom von mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Tomaten untersucht hat. Im Vergleich zu der Analyse in dieser Arbeit, in der 186 differentiell regulierte Gene identifiziert werden konnten, konnten in der Analyse von Cervantes-Gómez et al. 768 differentiell regulierte Gene identifiziert werden. Weiterhin zeigten die Gene eine stärkere Regulation zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Zwar wurden von Cervantes-Gómez et al. (2016) die Effekte des arbuskulären Mykorrhizapilzes nach einem ähnlichen Symbiosezeitraum (4 wpi) untersucht, dennoch sind die Pflanzen aufgrund einer vorherigen Kultivierung bei der Analyse bereits acht Wochen alt. Weiterhin zeigten die Überprüfung der Daten aus der RNA-Sequenzierung mittels real-time qPCR zum Teil eine große Varianz zwischen beiden Methoden (Cervantes-Gómez et al., 2016).

Die Gruppe des Proteinmetabolismus zeigte bei detaillierter Betrachtung eine Überrepräsentanz von Proteinen, die an der Degradation von Proteinen beteiligt sind (Tabelle III-8). Hierbei zeigte sich vor allem eine Induktion von *Serin-type Endopeptidases*. Endopeptidase spalten enzymatische Peptidbindungen innerhalb des Proteins. Proteine werden dabei zu Aminosäuren abgebaut (Hildebrandt et al., 2015).

Die Sequenz des analysierten *Proteinase inhibitors* (Abbildung III-16), für den eine reduzierte Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen beobachtet wurde, besitzt Ähnlichkeiten zu dem in Kartoffel beschriebenen Proteaseinhibitor I13, der eine *serine-type endopeptidase inhibitor* Aktivität zeigt (<http://www.ebi.ac.uk/>; 21.06.2016). Durch eine reduzierte Expression des *Proteinase inhibitors I* kann es somit zu einer reduzierten Inhibierung der Serin-Endopeptidase kommen.

Aber auch eine tendenziell erhöhte Expression einer *Phosphoserin Aminotransferase* (Solyc02g082830.1.1) konnte in Blättern mykorrhizierter Pflanzen detektiert werden (FC:1,3; Tabelle III-8). Die *Phosphoserin Aminotransferase* katalysiert die Reaktion von 3-Phosphohydroxypyruvat zu 3-Phosphoserin unter Umwandlung von Glutamat zu α -

Ketoglutarat. Durch eine Dephosphorylierung von 3-Phosphoserin entsteht die Aminosäure Serin (Ho et al., 1998).

Durch die tendenziell erhöhte Expression von Genen, die an der Proteindegradation (*Serintype Endopeptidase*) sowie der Aminosäuresynthese (*Phosphoserin Aminotransferase*) beteiligt sind, könnte auch den erhöhten Gehalt der Aminosäuren Glycin und Serin erklären (Abbildung III-7). Beide Aminosäuren sind lediglich durch einen enzymatischen Schritt ineinander umwandelbar, der durch eine Serinhydroxymethyl-Transferase katalysiert wird. Ein erhöhter Gehalt von Aminosäuren und vor allem an Glycin in mykorrhizierte Pflanzen konnte bereits gezeigt werden (Zhu et al., 2016).

Weiterhin konnten vier von sechs tendenziell reduziert exprimierten Gene (FC: 0,6) aus der Gruppe der Proteinmodifikation Funktionen als Serin/Threonin Kinase zugeordnet werden. Proteinkinase phosphorylieren die Hydroxygruppe der Aminosäuren. Ihre Aktivierung erfolgt unter anderem durch einen Calciumeinstrom, wodurch sie in den Calciumabhängigen Signalweg involviert sind (Anil et al., 2000). Serin/Threonin Kinase sind aufgrund der Aktivierung durch Calcium ebenfalls an der Stomataöffnung beteiligt. Sie aktivieren Cl-Kanäle in den Schließzellen und steuern so den Ein- und Ausstrom der Anionen (Pei et al., 1996). Wie bereits zuvor diskutiert, wird eine erhöhte Photosynthese aufgrund der gesteigerten Transpirationsleistung durch die verbesserte Wasserversorgung vermutet.

IV.5 Veränderung des Primärmetabolismus in der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose

Aufgrund der tendenziell erhöhten Photosyntheseleistung wurde die Regulation von Genen vermutet, die in photosynthetische Prozesse und in den Kohlenstoffkreislauf involviert sind. Zouari et al. (2014) und Kollegen haben den Einfluss der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose auf den Metabolismus von Tomatenfrüchten untersucht. Es konnte eine generelle Regulation des Primärmetabolismus gezeigt werden. Früchte mykorrhizierter Pflanzen zeigten eine überrepräsentierte Anzahl in den GO-Klassen Photosynthese, Stressantwort, Transport, Aminosäuresynthese und Kohlenhydratmetabolismus (Zouari et al., 2014). Bei Transkriptanalysen von Wurzeln in *Medicago truncatula* konnte ebenfalls eine zellspezifische Regulation von Transportern für Nährstoffe und Kohlenhydraten in arbuskelhaltigen Zellen mykorrhizierter Wurzeln gezeigt werden (Baier et al., 2010; Duensing, 2013).

Eine vergleichende Studie des Transkriptom von Tomatenblättern hat gezeigt, dass die am stärksten regulierten Gene in Primär- und Sekundärmetabolismus sowie Abwehrreaktionen, Zellorganisation, Proteinmodifikationen und transkriptioneller Regulation einzuordnen sind (Fiorilli et al., 2009). Jedoch zeigten die Pflanzen in dieser Studie einen Wachstumsvorteil durch den arbuskulären Mykorrhizapilz, wodurch eine genaue Aussage welcher Effekt durch die Symbiose herbeigeführt wurde, nicht möglich ist.

Die Funktionsgruppe des Primärmetabolismus war zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel in dieser Arbeit jedoch nur sehr gering differentiell reguliert (Abbildung III-17). Von den insgesamt 186 Genen konnten lediglich vier Gene dem Primärmetabolismus zugeordnet werden. Diese waren eine *NAD(P)H-quinone oxidoreductase* (FC:1,27), eine *Sucrose-phosphate synthase* (FC:1,3); eine *Beta-fructofuranosidase insoluble isoenzyme 2* (1,26) und eine *Alpha alpha-trehalase* (FC:1,26) (Tabelle VI-7). Zusätzlich konnte eine signifikant erhöhte Expression der *Fructose-biphosphat-aldolase* (Solyc02g062340.2.1) (FC: 1,3) in mykorrhizierten Pflanzen gezeigt werden (Abbildung III-15).

Die Fructose-biphosphat-Aldolase spaltet Fructose-1,6-biphosphat zu Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) und ist somit Bestandteil der Glykolyse und des Calvin-Zyklus und essentiell für die Energiegewinnung. Die Überexpression der plastidären *Fructose 1,6-bisphosphate aldolase* in *Arabidopsis thaliana* hatte eine Stimulation der Ribulose 1,5-biphosphat Regeneration und eine erhöhte CO₂-Fixierung zur Folge, die zu einem Wachstumsvorteil in transgenen Pflanzen führten (Uematsu et al., 2012).

Eine tendenzielle Induktion der Gene der Zuckersynthese spricht für eine erhöhte Zuckerproduktion in mykorrhizierten Pflanzen. Durch die Metabolitbestimmung im Blatt konnte die gesteigerte Zuckersynthese bestätigt werden. Mykorrhizierte Pflanzen zeigten bei 28°C Anzuchttemperatur im Vergleich zu den nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel einen signifikant erhöhten Gehalt von Saccharose, Glucose und Fructose im Blatt (Abbildung III-5). Die Analyse des systemischen Effekts auf die Blattmetabolite verschiedener Pflanzenspezies zeigte ebenfalls einen Anstieg von Kohlenhydraten. Hier zeigten Fructose, Glucose und Stärke einen erhöhten Gehalt, während die Analyse von Saccharose in Gerste (*H. vulgaris*) einen verminderten Saccharosegehalt in Blättern mykorrhizierten Pflanzen aufwies (Schweiger und Muller, 2015). Die Bestimmung des Zuckergehalts in Tomatenblättern zeigte hingegen keine Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen (Boldt et al., 2011). Da in dieser Studie durch Erhöhung der Anzuchttemperatur auf 28 °C die Differenz im Zuckergehalt zwischen mykorrhizierten Pflanzen und nicht-mykorrhizierten Pflanzen beobachtet werden konnte, ist davon auszugehen, dass die Unterschiede zu bereits publizierten Daten durch die veränderte Pflanzenanzucht resultieren. Trotz des erhöhten Zuckergehalts in Blättern mykorrhizierter Pflanzen konnten in den Citratzyklus-Intermediate keine signifikanten Unterschiede zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen festgestellt werden. Dies könnte für eine schnelle Metabolisierung der Citratzyklus-Intermediate zu Aminosäuren in mykorrhizierten Pflanzen sprechen. Für eine schnelle Metabolisierung der Citratzyklus-Intermediate spricht außerdem der im Vergleich zur 24 °C Anzuchttemperatur reduzierte Gehalt an Citratzyklus-Intermediate

bei 28 °C (Abbildung III-6). Hierbei zeigten die mykorrhizierte Pflanzen, mit Ausnahme von Succinat und Fumarat, bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C trotz eines vergleichbaren Zuckergehaltes einen deutlich geringeren Metabolitgehalt der Citratzyklus-Intermediate (Abbildung III-6).

Eine Akkumulation von Aminosäuren wird als Reaktion der Pflanze während der Stressakklimation beschrieben. Die Akkumulation der Aminosäuren kann dabei aus der erhöhten Aminosäureproduktion oder der erhöhten Proteindegradation resultieren (Krasensky und Jonak, 2012). Sowohl eine erhöhte Aminosäureproduktion als auch eine erhöhte Proteindegradation konnte in der RNA-Sequenzierung gezeigt werden (Tabelle III-8) und wurden bereits diskutiert (IV.4).

Möglicherweise bewirkte der Temperaturanstieg eine Umstellung des Metabolismus, wodurch die Pflanzen bei 28 °C Anzuchttemperatur als Stressreaktion vermehrt Aminosäuren akkumulieren. Für die Synthese werden dabei die Citratzyklus-Intermediate verwendet.

Bei der Bestimmung der Citratzyklus-Intermediate fiel zusätzlich eine Akkumulation von α -Ketoglutarat in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen unter beiden Anzuchttemperaturen auf. Die beiden Behandlungsgruppen unter Phosphatmangel zeigten hingegen niedrigere Werte (Abbildung III-6). Somit kann die verbesserte Nährstoffversorgung (Tabelle III-1) der optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen die Akkumulation von α -Ketoglutarat beeinflussen. Das Citratzyklus-Intermediat α -Ketoglutarat ist das Kohlenstoffgerüst für die Aminosäuren Glutamat und verknüpft dadurch den Kohlenstoff und Stickstoffkreislauf der Pflanze (Zhao et al., 2010). Die Aminosäure Prolin zeigte ebenfalls einen erhöhten Metabolitgehalt in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (Abbildung III-7). Prolin wird aus der Aminosäure Glutamat synthetisiert, und nutzt daher ebenfalls α -Ketoglutarat als Kohlenstoffgerüst.

Tomaten sind in der Lage, die im Blatt produzierten Hexosen direkt in Saccharose umzuwandeln, die dann über das Phloem zu den Bedarfsorganen transportiert wird. Während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose stellen die Pflanzenwurzeln aufgrund der Mitversorgung des Pilzes einen erhöhten Bedarf dar (Boldt et al., 2011). Ein signifikant erhöhter Saccharosegehalt konnte ebenfalls in der Wurzel mykorrhizierter Pflanzen gemessen werden (Abbildung III-8). Die Saccharose wird in den Bedarfsorganen durch Invertasen in Glucose und Fructose gespalten, die im Anschluss durch nachfolgende Stoffwechselwegen metabolisiert werden können. Eine erhöhte Invertaseaktivität konnte durch Schaarschmidt et al. (2006) nach fünfwöchiger Symbiose für mykorrhizierte Tomatenwurzeln gezeigt werden. Die Invertase LIN6 zeigte dabei eine 1,8-fache Induktion, die nach elfwöchiger Symbiose bis auf eine 3-fach erhöhte Expression anstieg (Schaarschmidt et al., 2006). Die differentielle Regulation der Invertase konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). In der Arbeit von Schaarschmidt konnte jedoch ausschließlich bei Verwendung höherer

Konzentration des arbuskulären Mykorrhizapilzes eine gesteigerte Invertaseaktivität detektiert werden (Schaarschmidt et al., 2006). Möglicherweise war die verwendete Inokulationsmenge in diesem Versuch (III.1) nicht ausreichend.

In den Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen konnte zusätzlich eine signifikant erhöhte Expression des *Sucrosetransporter 2* gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Der Sucrosetransporter 2 ist in der periarbuskulären Membran lokalisiert und für den Rücktransport von Zuckern aus der periarbuskulären Matrix in die Pflanzenzelle verantwortlich (Bitterlich et al., 2014). Analysen des Sucrosetransporters 2 lassen aber auch eine Funktion bei der Entladung des Phloems vermuten (Reuscher et al., 2014).

Ogleich ein Unterschied im Saccharosegehalt gemessen werden konnte, konnte kein Unterschied im Glucose- und Fructosegehalt in mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Wurzeln detektiert werden. Der absolute Gehalt an Glucose war jedoch im Vergleich zum Fructosegehalt geringer. Diese Beobachtung machten auch Boldt et al. (2011) und formulierten als möglichen Grund, die präferierte Aufnahme von Glucose durch den Pilz (Boldt et al., 2011). Der Pilz nutzt die aufgenommenen Hexosen für den eigenen Zuckermetabolismus. Als erste Reaktion werden die Hexosen zu Triosen, Glykogen oder Trehalose umgewandelt (Abbildung I-7). Es konnte ausschließlich in den Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen eine signifikante Akkumulation von Trehalose beobachtet werden (Abbildung III-8). Aufgrund der spezifischen Akkumulation der Trehalose in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen und der nachgewiesenen Korrelation mit der aktiven Mykorrhiza (Abbildung III-10) kann man Trehalose als weiteren Marker für die Mykorrhizierung betrachten (Wright et al., 1998a; Ocon et al., 2007).

Durch die Abhängigkeit des Pilzes von der Kohlenstoffversorgung der Pflanze beeinflusst der Pilz den Kohlenstoffkreislauf der Pflanze. Es wird vermutet, dass die erhöhte Nachfrage aufgrund der Mitversorgung des Pilzes, zu einer verstärkten Saccharosesynthese und Stimulation der Photosynthese (I.5.3) führt (Bethlenfalvay et al., 1988; Kaschuk et al., 2009). Für weißen Klee konnte eine höhere Photosynthese unabhängig von der Transpiration gezeigt werden (Wright et al., 1998b). Die Erhöhung der Photosyntheseleistung in Sojabohne und Bohne (*Phaseolus vulgaris* L) führten Bethlenfalvay et al. (1988) sowie Mortimer et al. (2008) auf eine gesteigerte Nachfrage nach Zucker durch den Pilz zurück. Ebenfalls zeigten Experimente mit Kartoffeln, dass eine reduzierte Aldolaseaktivität und damit eine verlangsamte Glykolyse zu einer Limitierung der Photosynthese führten (Haake et al., 1998).

IV.6 Die arbuskuläre Mykorrhiza-Symbiose bewirkt einen erhöhten Zuckertransport in die Wurzeln von Tomatenpflanzen

Der Transport von Kohlenstoff vom produzierenden zum verbrauchenden Gewebe in Form von Saccharose wurde mit ¹³C-Markierungsexperiment verfolgt (Abbildung III-11). Durch einen

signifikant höheren prozentualen Anteil an ^{13}C -Saccharose im Blatt mykorrhizierter Wurzeln direkt nach dem Beenden des Markierens (Abbildung III-11) konnte auch in diesem Versuch eine tendenziell erhöhte Photosynthese in mykorrhizierten Pflanzen nachgewiesen werden, da das ^{13}C lediglich über die Fixierung von $^{13}\text{CO}_2$ durch das Enzym RuBisCO während der Photosynthese erfolgen kann.

Im weiteren Verlauf nimmt der Anteil an ^{13}C -Saccharose bei allen Behandlungsgruppen ab, was durch den Abtransport der Saccharose über das Phloem erklärt werden kann (Szecowka et al., 2013). Auch in der Transportrate zeigten die mykorrhizierten Pflanzen den höchsten Wert (Abbildung III-11).

Im Stiel und der Wurzel fällt ebenfalls auf, dass die Abnahme von ^{13}C -Saccharose in mykorrhizierten Pflanzen schneller verläuft als in nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. In beiden Geweben kann eine Stunde nach dem Beenden des Markierens der höchste Wert an ^{13}C -Saccharose detektiert werden (Abbildung III-11). Üblicherweise würde man eine zeitliche Verzögerung zwischen den Geweben erwarten. Aufgrund der Dauer des Markierens mit 90 min und der Größe der Pflanzen mit 12 cm, ist von einem schnellen Transport auszugehen. Die Inokulation von Sojabohne mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Glomus fasciculatum* führte ebenfalls zu einem gesteigerten Transport von Photoassimilaten zum Pilz. Nach sechswöchiger Symbiose wurden insgesamt 17 % der Photosyntheseprodukte von dem Pilz aufgenommen und metabolisiert (Harris et al., 1985).

Glucose und Fructose sind Zwischenprodukte der Saccharosesynthese und wurden daher zusätzlich analysiert. Für Fructose konnte kein zeitlicher Verlauf dargestellt werden. Alle Zeitpunkte zeigten für den Anteil an ^{13}C -Fructose einen negativen Wert, wodurch diese für die weitere Analyse nicht berücksichtigt werden konnten (Abbildung VI-2). Ursache für die negativen Werte könnte die Berechnung des prozentualen ^{13}C Anteils sein. Um den prozentualen Anteil des während der Markierung aufgenommenen ^{13}C zu berechnen, wurde der Anteil an ^{13}C , welches natürlich in der Luft vorkommt, durch eine nicht mit $^{13}\text{CO}_2$ markierte Pflanze bereinigt. Durch einen höheren Wert an ^{13}C in der nicht-markierten Pflanze, ergaben sich in allen drei durchgeführten, unabhängigen Replikaten negative Werte für Fructose.

Glucose konnte allerdings im Blatt, sowie in der Wurzel detektiert werden. In beiden Geweben konnte ein tendenziell erhöhter prozentualer Anteil an ^{13}C -Glucose in mykorrhizierten Pflanzen nachgewiesen werden. Für den Stiel konnte jedoch aufgrund des geringen Glucosegehalts und der hohen Variabilität keine eindeutige Aussage getroffen werden (Abbildung III-12). Glucose wird in Pflanzen ausschließlich in photosynthetisch aktivem Gewebe gebildet und in verbrauchenden Gewebe (*sink*) metabolisiert. Der Transport vom produzierenden zum verbrauchenden Gewebe wird über den Transportzucker Saccharose realisiert. Dieser konnte, wie in Abbildung III-11 gezeigt, im Stiel nachgewiesen werden. Zwar betreibt auch der Stiel von Tomatenpflanzen Photosynthese, jedoch im Vergleich zum Blatt zu einem deutlich

geringeren Anteil. Im Stiel findet hauptsächlich der Transport von Metaboliten und Nährstoffen statt.

In der Wurzel konnte für die mykorrhizierten Pflanzen zwei Stunden nach dem Beenden des Markierens die stärkste Akkumulation von ^{13}C -Glucose ermittelt werden. Hingegen zeigten die nicht-mykorrhizierten Pflanzen erst drei Stunden nach dem Beenden des Markierens den höchsten Wert. Wie bereits erläutert, wird Glucose in den Bedarfsorganen durch die Spaltung von Saccharose mittels Invertasen gebildet. Es konnte zwar keine differentielle Regulation der LIN6-Invertase gezeigt werden, jedoch besitzen Pflanzen neben der LIN6-Invertase noch weitere Isoformen (LIN5, LIN7, LIN 8, LIN 9) (Sol Genomic Network) von denen bislang noch keine Expression bestimmt wurde.

Unabhängig vom Zeitpunkt des höchsten ^{13}C -Glucose Wertes konnte ein tendenziell schnellerer Abbau der ^{13}C -Glucose in der Wurzel mykorrhizierter Pflanzen beobachtet werden (Abbildung III-12). Da der Pilz durch die Pflanze mit Kohlenhydraten versorgt wird, ist davon auszugehen, dass der Pilz die Unterschiede verursacht und die markierte Glucose im pilzlichen Zuckermetabolismus nutzt (I.4.2, Abbildung I-7).

Wie bereits in Abbildung III-8 gezeigt, konnte Trehalose in der Metabolitanalyse ausschließlich in mykorrhizierten Wurzeln nachgewiesen werden. Trehalose konnte auch in dem Markierungsversuch exklusiv in den Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen nachgewiesen werden (Abbildung III-13). Hierbei zeigte sich ein Anstieg der ^{13}C -Trehalose in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen drei Stunden nach dem Beenden des Markierens. Die gleichzeitige Darstellung von Saccharose, Glucose und Trehalose in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen (Abbildung III-14) zeigt eindrucksvoll die Interaktion der drei Zucker, die zeitlich verzögert akkumulieren. Für nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel konnte hingegen bei Reduktion von Saccharose nur ein leichter Anstieg der Glucose beobachtet werden (Abbildung III-14).

Durch das Markierungsexperiment konnte ein tendenziell erhöhter Export von Saccharose aus dem Blatt und der Transport über den Stiel in die Wurzel mykorrhizierter Pflanzen nachgewiesen werden. Bisherige Studien haben sich lediglich auf die Analyse der Kohlenstoffaufnahme und -speicherung des Pilzes und den Kohlenstofftransport innerhalb des Pilzmyzels konzentriert (Bago et al., 2003; Lendenmann et al., 2011).

Der Pilz nimmt die Kohlenhydrate über spezielle Transport auf (Baier et al., 2010; Duensing, 2013) und verwendet sie im Anschluss für den eigenen Metabolismus. Eine endgültige und eindeutige Aussage, ob und wieviel des Kohlenstoffs vom Pilz aufgenommen wird, kann jedoch nicht getroffen werden, da Pilz und Wurzel nur gemeinsam betrachtet wurden. Eine Bestimmung des vom Pilz aufgenommenen Kohlenstoffs kann mittels PLFA (*Phospholipid-derived fatty acids*) und NLFA (*Neutral lipid fatty acid*) Analyse stattfinden.

IV.7 Allgemeine Zusammenfassung und Modell zur Regulation der Photosynthese durch den arbuskulären Mykorrhizapilz

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Symbiose von Tomatenpflanzen mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* zu einer tendenziell erhöhten Photosynthese und signifikant erhöhten Transpiration führt. Der positive Effekt des arbuskulären Mykorrhizapilzes konnte durch Erhöhung der Anzuchttemperatur und durch Applikation von Trockenstress zusätzlich gesteigert werden. Weiterhin konnte eine signifikante Akkumulation von Zuckern im Blatt und ein signifikant erhöhter Saccharose- und Trehalosegehalt in Wurzeln mykorrhizierter Pflanzen beobachtet werden.

Generell ist bei Untersuchungen der photosynthetischen Leistung und Physiologie der Pflanze ein Vergleich mit anderen Studien schwierig, da viele unterschiedliche Faktoren Einfluss auf die einzelnen Parameter und deren Regulation haben. Bereits 2009 haben Kaschuk und Kollegen festgestellt, dass nur eine geringe Anzahl an Studien vergleichbare Messungen von Photosynthese und der Nährstoffzusammensetzung des Blattes durchgeführt haben. Erschwerend kommt hinzu, dass für die Photosyntheseleistung unterschiedliche Berechnungen der Photosynthese zu unterschiedlichen Aussagen führen. Dabei kann die Photosyntheseleistung auf die Blattfläche, Blattmasse oder auf die komplette Pflanze bezogen werden (Kaschuk et al., 2009). Sie fügten hinzu, dass die zu vergleichenden Pflanzen eine gleiche Größe aufweisen müssen. Zu diesem Ergebnis sind 2014 auch Schweiger und Kollegen gekommen. Sie raten bei vergleichenden Analysen zusätzlich zu einer optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen im Versuchsaufbau, um möglich Effekte durch unterschiedliche Nährstoffversorgung zu identifizieren. Zusätzlich sollten die nicht-mykorrhizierten Kontrollgruppen mit einem Kontrollinokulat versetzt werden (Schweiger et al., 2014b).

Weiterhin hat die Pflanze-Pilz-Assoziation einen wesentlichen Einfluss auf die Veränderung der Photosynthese und des Metabolismus der Pflanze (Ross, 1971; Smith und Read, 2008; Walder und Heijden van der, 2015; Chitarra et al., 2016). Parallele Versuche mit zwei unterschiedlichen arbuskulären Mykorrhizapilzen (*Funneliformis mosseae* und *Rhizophagus intraradices*) haben Unterschiede in physiologischen und metabolischen Parametern, sowie in der Genexpression gezeigt (Chitarra et al., 2016). Auch die Transpirationsleistung der Pflanzen ist von dem verwendeten Pilz abhängig (Ruiz-Lozano et al., 1995; Gong et al., 2013). Neben dem Einfluss des Pilzes zeigten auch verschiedene Pflanzen unterschiedliche Effekte in der Symbiose mit arbuskulären Mykorrhiza. Die Identifizierung eines „Core“- Metaboloms während der arbuskulären Mykorrhiza-Symbiose zeigte die Akkumulation von spezies-spezifische Metaboliten sowie unterschiedliche Reaktionen der Pflanzen (Schweiger et al., 2014a). Bei der Untersuchung des Einflusses der Mykorrhizierung auf das Blattmetabolom, zeigten sich neben den bereits genannten Regulatoren noch zusätzlich entwicklungsabhängige Veränderung des Metaboloms (Schweiger und Muller, 2015).

Dabei reguliert der arbuskuläre Mykorrhizapilz die Photosynthese indirekt über eine verbesserte Wasserversorgung und der daraus resultierenden erhöhten Transpiration. Weiterhin resultieren die verbesserte Wasserversorgung und der verbesserte Gasaustausch der mykorrhizierten Pflanzen in einem geringeren Stresslevel. Hierdurch kommt es in mykorrhizierten Pflanzen zu einer verminderten Produktion von Stresssignalen. Das geringere Level von Stresssignalen wirkt sich ebenfalls positiv auf die Photosyntheseleistung der Pflanzen aus (Vanlerberghe et al., 2016).

Die erhöhte Photosynthese produziert Zucker, der für den pflanzlichen und pilzlichen Metabolismus verwendet werden kann. Eine Akkumulation von Zucker in den Chloroplasten verursacht aber ebenfalls eine Limitierung der Photosynthese (Paul und Pellny, 2003). Durch die zusätzliche Versorgung des Pilzes mit Zucker ist der Export aus den Chloroplasten erhöht. Hierdurch wird eine Akkumulation von Zuckern im Chloroplasten verhindert, wodurch eine mögliche Hemmung der Photosynthese reduziert wird. Durch die Transkriptomanalyse der Blätter konnten neue Erkenntnisse über differentiell regulierte Gene im Blatt durch den arbuskulären Mykorrhizapilz gewonnen werden. Hier zeigte sich vor allem der Einfluss von Phytohormonen auf die Genregulation. Aber auch die Regulation von Transkriptionsfaktoren (MYB-Transkriptionsfaktor) oder Aquaporinen durch den arbuskulären Mykorrhizapilz ist möglich.

IV.8 Ausblick

Die Untersuchung des Blatt-Transkriptoms zeigte vor allem Veränderungen von Genen, die in Zusammenhang mit der Synthese von Abscisinsäure stehen oder durch Abscisinsäure reguliert werden. In folgenden Analysen wäre daher eine Bestimmung der Phytohormonkonzentration im Blatt sinnvoll. Weiterhin weisen die Ergebnisse und bereits veröffentlichte Arbeiten auf einen Einfluss von Abscisinsäure auf die Erhöhung der Photosynthese hin. Hierbei kann die Abscisinsäure die Stomataöffnung beeinflussen, als auch mit anderen Phytohormonen interagieren. Das Gen *nced* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) ist das Schlüsselenzym in der Abscisinsäuresynthese und zeigt eine mögliche Regulation durch den arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* (Li et al., 2014).

Weiterhin wäre die Wiederholung des Trockenstressexperiments inklusive der Genexpressionsanalyse hilfreich, um eine genaue Aussage über die stressinduzierte Expression der überprüften Gene zu erhalten. Hierbei zeigte der *MYB transcription factor* als einziges Gen eine stressunabhängige erhöhte Expression in Blättern mykorrhizierter Pflanzen. Sollte sich dieses Ergebnis bestätigen, scheint die Expression des *MYB transcription factor* durch den arbuskulären Mykorrhizapilz reguliert zu sein. Hier wäre eine genaue Charakterisierung und Analyse des Gens hilfreich.

Es konnte ebenfalls ein erhöhter Transport von Zuckern in die Wurzel mykorrhizierter Pflanzen gezeigt werden. Jedoch kann auch mit der spezifischen Akkumulation von Trehalose in mykorrhizierten Wurzeln nicht endgültig beantwortet werden, ob und wieviel Kohlenstoff von dem Pilz aufgenommen wurden, da in dieser Arbeit Wurzel und Pilz nur gemeinsam betrachtet wurde. Eine Bestimmung des vom Pilz aufgenommenen Kohlenstoffs kann mittels PLFA (*Phospholipid-derived fatty acids*) und NLFA (*Neutral lipid fatty acid*) Analyse stattfinden. Die Methode macht sich zu Nutze, dass die PLFAs exklusiv in Mikrobionten synthetisiert werden. Der Mykorrhizapilz speichert die Lipide, vor allem 18:2 w6c und 16:1 w5c, in den Vesikeln. Daher werden die Bestimmungen der Lipide 18:2 w6c und 16:1 w5c oft als Indikator für den Pilzgehalt und als Biomarker genutzt (van Aarle und Olsson, 2003).

V. Literaturverzeichnis

- Allen G, Chu S, Harrington C, Schumacher K, Hoffmann T, Tang Y, Grill E, Schroeder J** (2001) A defined range of guard cell calcium oscillation parameters encodes stomatal movements. *Nature* **411**: 1053–1057.
- Ambawat S, Sharma P, Yadav NR, Yadav RC** (2013) MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **19**: 307–321.
- Anders S, McCarthy D, Chen Y, Okoniewski M, Smyth G, Huber W, Robinson M** (2013) Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols* **8**: 1765–1786.
- Anil V, Harmon A, Rao KS** (2000) Spatio-temporal accumulation and activity of calcium-dependent protein kinases during embryogenesis, seed development, and germination in sandalwood. *Plant Physiology* **122**: 1035–1043.
- Aroca R, Ruiz-Lozano J, Zamarreno A, Paz J, Garcia-Mina J, Pozo M, Lopez-Raez J** (2013) Arbuscular mycorrhizal symbiosis influences strigolactone production under salinity and alleviates salt stress in lettuce plants. *Journal of Plant Physiology* **170**: 47–55.
- Aroca R, Vernieri P, Ruiz-Lozano J** (2008) Mycorrhizal and non-mycorrhizal *Lactuca sativa* plants exhibit contrasting responses to exogenous ABA during drought stress and recovery. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2029–2041.
- Arosio P, Ingrassia R, Cavadini P** (2009) Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochimica et Biophysica Acta* **1790**: 589–599.
- Augé M** (2001) Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza* **11**: 3–42.
- Augé M, Toler H, Saxton A** (2014) Arbuscular mycorrhizal symbiosis alters stomatal conductance of host plants more under drought than under amply watered conditions: a meta-analysis. *Mycorrhiza* **25**: 13–24.
- Bago B, Pfeffer P, Abubaker J, Jun J, Allen J, Brouillette J, Douds D, Lammers P, Shachar-Hill Y** (2003) Carbon export from arbuscular mycorrhizal roots involves the translocation of carbohydrate as well as lipid. *Plant Physiology* **131**: 1496–1507.
- Bago B, Pfeffer P, Shachar-Hill Y** (2000) Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas. *Plant Physiology* **124**: 949–958.

- Baier M, Keck M, Gödde V, Niehaus K, Küster H, Hohnjec N** (2010) Knockdown of the Symbiotic Sucrose Synthase MtSucS1 Affects Arbuscule Maturation and Maintenance in Mycorrhizal Roots of *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* **152**: 1000–1014.
- Barzana G, Aroca R, Bienert G, Chaumont F, Ruiz-Lozano J** (2014) New insights into the regulation of aquaporins by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in maize plants under drought stress and possible implications for plant performance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 349–363.
- Bauwe H, Hagemann M, Fernie A** (2010) Photorespiration: players, partners and origin. *Trends in Plant Science* **15**: 330–336.
- Benjamini Y, Hochberg Y** (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B* **57**: 289–300.
- Bergmann H, Machelett B, Leinhos V** (1994) Effect of natural amino alcohols on the yield of essential amino acids and the amino acid pattern in stressed barley. *Amino Acids* **7**: 327–331.
- Bethlenfalvay G, Brown M, Ames R, Thomas RS** (1988) Effects of drought on host and endophyte development in mycorrhizal soybeans in relation to water use and phosphate uptake. *Physiologia Plantarum* **72**: 565–571.
- Bienert G, Bienert M, Jahn T, Boutry M, Chaumont F** (2011) Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant Journal* **66**: 306–317.
- Birhane E, Sterck F, Fetene M, Bongers F, Kuyper T** (2012) Arbuscular mycorrhizal fungi enhance photosynthesis, water use efficiency, and growth of frankincense seedlings under pulsed water availability conditions. *Oecologia* **169**: 895–904.
- Bitterlich M, Krugel U, Boldt-Burisch K, Franken P, Kuhn C** (2014) Interaction of brassinosteroid functions and sucrose transporter SISUT2 regulate the formation of arbuscular mycorrhiza. *Plant Signaling & Behavior* **9**: e970426.
- Blee K, Anderson A** (1998) Regulation of arbuscule formation by carbon in the plant. *The Plant Journal* **16**: 523–530.
- Boldt K, Pors Y, Haupt B, Bitterlich M, Kuhn C, Grimm B, Franken P** (2011) Photochemical processes, carbon assimilation and RNA accumulation of sucrose transporter genes in tomato arbuscular mycorrhiza. *Journal of Plant Physiology* **168**: 1256–1263.
- Bolger A, Lohse M, Usadel B** (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**: 2114–2120.

- Bonfante P, Genre A** (2010) Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. *Nature Communication* **1**: 48.
- Brooks A, Farquhar G** (1985) Effect of temperature on the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and the rate of respiration in the light. Estimates from gas-exchange measurements on spinach. *Planta* **165**: 397–406.
- Brundrett M, Bougher N, Dell B, Grove T, Malajczuk N** (1996) Working with Mycorrhizas in Forestry and Agriculture. ACIAR Monograph **32**. 184-185.
- Bucking, H, Liepold, E, Ambilwade, P**, eds, (2012) The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. Plant Science, InTech.
- Budi S, van Tuinen D, Martinotti G, Gianinazzi S** (1999) Isolation from the Sorghum bicolor Mycorrhizosphere of a Bacterium Compatible with Arbuscular Mycorrhiza Development and Antagonistic towards Soilborne Fungal Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 5148–5150.
- Cakman, I, Engels, C**, eds, (1999) Mineral nutrients in crops: mechanism and implications. Role of mineral nutrients in photosynthesis and yield formation. The Haworth Press, New York.
- Calvo-Polanco M, Molina S, Zamarreno A, Garcia-Mina J, Aroca R** (2014) The symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis* drives root water transport in flooded tomato plants. *Plant and Cell Physiology* **55**: 1017–1029.
- Campbell, N, Reece J.B., Markl J.**, eds, (2007) *Biologie*, Ed. 6. Pearson Studium, München.
- Cervantes-Gómez R, Bueno-Ibarra M, Cruz-Mendivil A, Calderón-Vázquez C, Ramírez-Douriet C, Maldonado-Mendoza I, Villalobos-López M, Valdez-Ortíz A, López-Meyer M** (2016) Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis-Induced Expression Changes in *Solanum lycopersicum* Leaves Revealed by RNA-seq Analysis. *Plant Molecular Biology Reporter* **34**: 89–102.
- Chakrabarti M, Nilmadhab M, Tajkhorshid E, Roux B, Régis Pomès** (2004) Molecular Basis of Proton Blockage in Aquaporins. *Structure* **12**: 65–74.
- Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Bornke F** (2005) Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning, and reduces growth. *Planta* **221**: 479–492.

- Chitarra W, Pagliarani C, Maserti B, Lumini E, Siciliano I, Cascone P, Schubert A, Gambino G, Balestrini R, Guerrieri E** (2016) Insights on the Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Tomato Tolerance to Water Stress. *Plant Physiology* **171**: 1009–1023.
- Chomczynski P** (1993) A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* **15**: 532-4, 536-7.
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta S, Tonelli C** (2005) A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology* **15**: 1196–1200.
- Dakessian S, Brown M, Bethlenfalvay G** (1986) Relationship of mycorrhizal growth enhancement and plant growth with soil water and texture. *Plant and Soil* **94**: 439–443.
- De Groot C, Van Den Boogaard R, Marcelis L, Harbinson J, Lambers H** (2003) Contrasting effects of N and P deprivation on the regulation of photosynthesis in tomato plants in relation to feedback limitation. *Journal of Experimental Botany* **54**: 1957–1967.
- Delaux P, Becard G, Combier J** (2013) NSP1 is a component of the Myc signaling pathway. *New Phytologist* **199**: 59–65.
- Duan X, Neumann DS, Auge R.M.** (1996) Mycorrhizal influence on hydraulic and hormonal factors implicated in the control of stomatal conductance during drought. *Journal of Experimental Botany* **47**: 1541–1550.
- Duensing N** (2013) Transport processes in the arbuscular mycorrhizal symbiosis.
- Estrada-Luna A, Davies FJ** (2003) Arbuscular mycorrhizal fungi influence water relations, gas exchange, abscisic acid and growth of micropropagated chile ancho pepper (*Capsicum annuum*) plantlets during acclimatization and post-acclimatization. *Journal of Plant Physiology* **160**: 1073–1083.
- Evelin H, Kapoor R, Giri B** (2009) Arbuscular mycorrhizal fungi in alleviation of salt stress: a review. *Annals of Botany* **104**: 1263–1280.
- Farquhar G, Caemmerer S von, Berry JA** (1980) A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species. *Planta* **149**: 78–90.
- Fellbaum C, Mensah J, Cloos A, Strahan G, Pfeffer P, Kiers E, Bucking H** (2014) Fungal nutrient allocation in common mycorrhizal networks is regulated by the carbon source strength of individual host plants. *The New phytologist* **203**: 646–656.

- Fernandez I, Merlos M, Lopez-Raez J, Martinez-Medina A, Ferrol N, Azcon C, Bonfante P, Flors V, Pozo M** (2014) Defense related phytohormones regulation in arbuscular mycorrhizal symbioses depends on the partner genotypes. *Journal of Chemical Ecology* **40**: 791–803.
- Finlay R** (2008) Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis: with special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium. *Journal of Experimental Botany* **59**: 1115–1126.
- Fiorilli V, Catoni M, Miozzi L, Novero M, Accotto G, Lanfranco L** (2009) Global and cell-type gene expression profiles in tomato plants colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **184**: 975–987.
- Fitter A** (2005) Darkness visible: reflections on underground ecology. *Journal of Ecology* **93**: 231–243.
- Flügge U** (1995) Phosphate translocation in the regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany*: 1317–1323.
- Frank B** (1885) Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* **3**: 128–145.
- Franson R, Brown M, Bethlenfalvay G** (1991) The Glycine-Glomus-Bradyrhizobium symbiosis. XI. Nodule gas exchange and efficiency as a function of soil and root water status in mycorrhizal soybean. *Physiologia Plantarum* **83**: 476–482.
- Gaude N, Bortfeld S, Duensing N, Lohse M, Krajinski F** (2012) Arbuscule-containing and non-colonized cortical cells of mycorrhizal roots undergo extensive and specific reprogramming during arbuscular mycorrhizal development. *The Plant Journal* **69**: 510–528.
- Gericke S, Kurmies B** (1952) Über die colorimetrische Bestimmung der Phosphorsäure mit Vanadat-Molybdat. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie* **137**.
- Gianinazzi-Pearson, V, Maldonado-Mendoza, I, López-Meyer, M, Weidmann, S, Harrison, M**, eds, (2006) *Medicago truncatula handbook. Arbuscular Mycorrhiza*. The Samuel Roberts Noble Foundation.
- Giersch C, Robinson SP** (1987) Regulation of photosynthetic carbon metabolism during phosphate limitation of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts. *Photosynthesis Research* **14**: 211–227.
- Giovannetti M, Balestrini R, Volpe V, Guether M, Straub D, Costa A, Ludewig U, Bonfante P** (2012) Two putative-aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicus*. *BMC Plant Biology* **12**: 1–14.

- Gong M, Tang M, Chen H, Zhang Q, Feng X** (2013) Effects of two *Glomus* species on the growth and physiological performance of *Sophora davidii* seedlings under water stress. *New Forests* **44**: 399–408.
- Gutjahr C, Novero M, Guether M, Montanari O, Udvardi M, Bonfante P** (2009) Presymbiotic factors released by the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* induce starch accumulation in *Lotus japonicus* roots. *New Phytologist* **183**: 53–61.
- Haake V, Zrenner R, Sonnewald U, Stitt M** (1998) A moderate decrease of plastid aldolase activity inhibits photosynthesis, alters the levels of sugars and starch, and inhibits growth of potato plants. *The Plant Journal* **14**: 147–157.
- Hanson J, Smeekens S** (2009) Sugar perception and signaling--an update. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 562–567.
- Hardie K, Leyton L** (1981) The Influence of vesicular-arbuscular mycorrhiza on on growth and water relation of red clover. *New Phytologist* **89**: 599–608.
- Harris D, Pacovsky RS, Paul EA** (1985) Carbon economy of Soybean-Rhizobium-Glomus associations. *New Phytologist* **101**: 427–440.
- Harrison M** (1999) Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 361–389.
- Harrison M, Dewbre G, Liu J** (2002) A Phosphate Transporter from *Medicago truncatula* Involved in the Acquisition of Phosphate Released by Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *The Plant Cell* **14**: 2413–2429.
- Herrera-Medina M, Steinkellner S, Vierheilig H, Ocampo Bote J, Garcia Garrido J** (2007) Abscisic acid determines arbuscule development and functionality in the tomato arbuscular mycorrhiza. *The New phytologist* **175**: 554–564.
- Hildebrandt T, Nunes Nesi A, Araújo W, Braun H** (2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Molecular Plant* **8**: 1563–1579.
- Ho CL, Noji M, Saito M, Yamazaki M, Saito K** (1998) Molecular characterization of plastidic phosphoserine aminotransferase in serine biosynthesis from *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**: 443–452.
- Jarvis A, Mansfield T, Davies W** (1999) Stomatal behaviour, photosynthesis and transpiration under rising CO₂. *Plant, Cell & Environment* **22**: 639–648.
- Jensen M, Tajkhorshid E, Schulten K** (2003) Electrostatic Tuning of Permeation and Selectivity in Aquaporin Water Channels. *Biophysical Journal* **85**: 2884–2899.

- Jiang Y, Wang D, Wen J** (2012) The independent prokaryotic origins of eukaryotic fructose-1, 6-bisphosphatase and sedoheptulose-1, 7-bisphosphatase and the implications of their origins for the evolution of eukaryotic Calvin cycle. *BMC Evolutionary Biology* **12**: 208.
- Kaldenhoff R, Bertl A, Otto B, Moshelion M, Uehlein N** (2007) Characterization of plant aquaporins. *Methods in Enzymology* **428**: 505–531.
- Kaschuk G, Kuyper T, Leffelaar P, Hungria M, Giller K** (2009) Are the rates of photosynthesis stimulated by the carbon sink strength of rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses? *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1233–1244.
- Kaschuk G, Leffelaar P, Giller K, Alberton O, Hungria M, Kuyper T** (2010) Responses of legumes to rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi: A meta-analysis of potential photosynthate limitation of symbioses. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 125–127.
- Khalvati M, Hu Y, Mozafar A, Schmidhalter U** (2005) Quantification of water uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae and its significance for leaf growth, water relations, and gas exchange of barley subjected to drought stress. *Plant Biology* **7**: 706–712.
- Khodakovskaya M, Sword C, Wu Q, Perera I, Boss W, Brown C, Winter Sederoff H** (2010) Increasing inositol (1,4,5)-trisphosphate metabolism affects drought tolerance, carbohydrate metabolism and phosphate-sensitive biomass increases in tomato. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 170–183.
- Kizis D, Lumberras V, Pages M** (2001) Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *Federation of European Biochemical Societies-Letters* **498**: 187–189.
- Koussevitzky S, Nott A, Mockler T, Hong F, Sachetto-Martins G, Surpin M, Lim J, Mittler R, Chory J** (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science (New York, N.Y.)* **316**: 715–719.
- Kranz H, Denekamp M, Greco R, Jin H, Leyva A, Meissner R, Petroni K, Urzainqui A, Bevan M, Martin C, Smeekens S, Tonelli C, Paz-Ares J, Weisshaar B** (1998) Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**: 263–276.
- Kranz H, Scholz K, Weisshaar B** (2000) c-MYB oncogene-like genes encoding three MYB repeats occur in all major plant lineages. *The Plant Journal* **21**: 231–235.
- Krasensky J, Jonak C** (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593–1608.
- Krikun J, Levy Y** (1980) Effect of vesicular arbuscular mycorrhiza on citrus growth and mineral composition. *Phytoparasitica* **8**: 195–200.

- Kwak J, Mäser P, Schroeder J** (2008) The Clickable Guard Cell, Version II: Interactive Model of Guard Cell Signal Transduction Mechanisms and Pathways. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **6**: e0114.
- Lambers H, Chapin III F, Pons T** (2000) Plant physiological ecology. *Journal of Agronomy and Crop Science* **184**: 143–144.
- Lauressergues D, Delaux P, Formey D, Lelandais-Briere C, Fort S, Cottaz S, Becard G, Niebel A, Roux C, Combier J** (2012) The microRNA miR171h modulates arbuscular mycorrhizal colonization of *Medicago truncatula* by targeting NSP2. *The Plant Journal* **72**: 512–522.
- Lee B, Muneer S, Avice J, Jung W, Kim T** (2012) Mycorrhizal colonisation and P-supplement effects on N uptake and N assimilation in perennial ryegrass under well-watered and drought-stressed conditions. *Mycorrhiza* **22**: 525–534.
- Leinhos V, Bergmann H** (1995) Effect of amino alcohol application, rhizobacteria and mycorrhiza inoculation on the growth, the content of protein and phenolics and the protein of drought stressed lettuce (*Lactuca sativa* L.cv. "Amerikanischer Brauner").
- Lendenmann M, Thonar C, Barnard R, Salmon Y, Werner R, Frossard E, Jansa J** (2011) Symbiont identity matters: carbon and phosphorus fluxes between *Medicago truncatula* and different arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **21**: 689–702.
- Li T, Lin G, Zhang X, Chen Y, Zhang S, Chen B** (2014) Relative importance of an arbuscular mycorrhizal fungus (*Rhizophagus intraradices*) and root hairs in plant drought tolerance. *Mycorrhiza* **24**: 595–602.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie A** (2006) Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols* **1**: 387–396.
- Lopez-Raez J** (2016) How drought and salinity affect arbuscular mycorrhizal symbiosis and strigolactone biosynthesis? *Planta* **243**: 1375–1385.
- Love M, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology* **15**: 550.
- Mäkelä P** (2004) Agro-industrial uses of glycinebetaine. *Sugar Tech* **6**: 207–212.
- Mansfield T, Hetherington A, Atkinson C** (1990) Some Current Aspects of Stomatal Physiology. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **41**: 55–75.
- Mascher R, Fischer S, Scheiding W, Neagoe A, Bergmann H** (2005) Exogenous 2-aminoethanol can diminish paraquat induced oxidative stress in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Growth Regulation* **45**: 103–112.

- Maya M, Matsubara Y** (2013) Influence of arbuscular mycorrhiza on the growth and antioxidative activity in cyclamen under heat stress. *Mycorrhiza* **23**: 381–390.
- McElrone A, Choat B, Gambetta G, Brodersen C** (2013) Water Uptake and Transport in Vascular Plants. *Nature Education Knowledge* **4(5):6**.
- McNeil S, Nuccio M, Hanson A** (1999) Betaines and related osmoprotectants. Targets for metabolic engineering of stress resistance. *Plant Physiology* **120**: 945–950.
- Mengiste T, Chen X, Salmeron J, Dietrich R** (2003) The BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 gene encodes an R2R3MYB transcription factor protein that is required for biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**: 2551–2565.
- Meshi T, Iwabuchi M** (1995) Plant transcription factors. *Plant and Cell Physiology* **36**: 1405–1420.
- Miransari M** (2010) Contribution of arbuscular mycorrhizal symbiosis to plant growth under different types of soil stress. *Plant Biology* **12**: 563–569.
- Mortazavi A, Williams B, McCue K, Schaeffer L, Wold B** (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods* **5**: 621–628.
- Mortimer P, Pérez-Fernández M, Valentine A** (2008) The role of arbuscular mycorrhizal colonization in the carbon and nutrient economy of the tripartite symbiosis with nodulated *Phaseolus vulgaris*. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1019–1027.
- Nagele T, Henkel S, Hormiller I, Sauter T, Sawodny O, Ederer M, Heyer A** (2010) Mathematical modeling of the central carbohydrate metabolism in Arabidopsis reveals a substantial regulatory influence of vacuolar invertase on whole plant carbon metabolism. *Plant Physiology* **153**: 260–272.
- Nambara E, Marion-Poll A** (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 165–185.
- Ngwene B, Gabriel E, George E** (2013) Influence of different mineral nitrogen sources (NO₃⁻-N vs. NH₄⁺-N) on arbuscular mycorrhiza development and N transfer in a *Glomus intraradices*-cowpea symbiosis. *Mycorrhiza* **23**: 107–117.
- Ocon A, Hampp R, Requena N** (2007) Trehalose turnover during abiotic stress in arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **174**: 879–891.
- Olsson P, Burleigh S, van Aarle I** (2005) The influence of external nitrogen on carbon allocation to *Glomus intraradices* in monoxenic arbuscular mycorrhiza. *New Phytologist* **168**: 677–686.

- Page M, Di Cera E** (2008) Serine peptidases: Classification, structure and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* **65**: 1220–1236.
- Parniske M** (2008) Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature Reviews Microbiology* **6**: 763–775.
- Paul M, Foyer CH** (2001) Sink regulation of photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1383–1400.
- Paul M, Pellny T** (2003) Carbon metabolite feedback regulation of leaf photosynthesis and development. *Journal of Experimental Botany* **54**: 539–547.
- Pei Z, Ward J, Harper J, Schroeder J** (1996) A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. *The EMBO Journal* **15**: 6564–6574.
- Peterhansel C, Horst I, Niessen M, Blume C, Kebeish R, Kurkcuoglu S, Kreuzaler F** (2010) Photorespiration. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists* **8**: e0130.
- Phillips J, Hayman D** (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* **55**: 158 - IN18.
- Raboy V** (2003) myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. *Phytochemistry* **64**: 1033–1043.
- Reinard T** (2010) *Molekularbiologische Methoden*, Ed. 1. Ulmer UTB, Stuttgart.
- Requena N, Serrano E, Ocon A, Breuninger M** (2007) Plant signals and fungal perception during arbuscular mycorrhiza establishment. *Phytochemistry* **68**: 33–40.
- Reumann S, Weber A** (2006) Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of the photorespiratory C2 cycle have become filled--others remain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1763**: 1496–1510.
- Reuscher S, Akiyama M, Mori C, Aoki K, Shibata D, Shiratake K** (2013) Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PloS one* **8**: e79052.
- Reuscher S, Akiyama M, Yasuda T, Makino H, Aoki K, Shibata D, Shiratake K** (2014) The sugar transporter inventory of tomato: genome-wide identification and expression analysis. *Plant & cell physiology* **55**: 1123–1141.
- Robinson M, McCarthy D, Smyth G** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–140.
- Robinson M, Smyth G** (2007) Moderated statistical tests for assessing differences in tag abundance. *Bioinformatics* **23**: 2881–2887.

- Ross J** (1971) Effect of Phosphat Fertilization on Yield of Mycorrhizal and Nonmycorrhizal Soybean. *Phytopathology* **61**: 1400–1403.
- Ruan C, Shao H, Teixeira da Silva J** (2012) A critical review on the improvement of photosynthetic carbon assimilation in C3 plants using genetic engineering. *Critical Reviews in Biotechnology* **32**: 1–21.
- Ruiz-Lozano J, Azcon R, Gomez M** (1995) Effects of Arbuscular-Mycorrhizal Glomus Species on Drought Tolerance: Physiological and Nutritional Plant Responses. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 456–460.
- Russell B, Rathinasabapathi B, Hanson A** (1997) Osmotic Stress Induces Expression of Choline Monooxygenase in Sugar Beet and Amaranth. *Plant Physiology* **116**: 859–865.
- Rychter A, Rao I** (2005) Role of Phosphorus in Photosynthetic Carbon Metabolism. In M Pessaraki, ed, *Handbook of Photosynthesis*. CRC Press.
- Salvioli A, Zouari I, Chalot M, Bonfante P** (2012) The arbuscular mycorrhizal status has an impact on the transcriptome profile and amino acid composition of tomato fruit. *BMC Plant Biology* **12**: 44.
- Sánchez-Díaz M, Honrubia M** (1994) Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. In S Gianinazzi, H Schüepp, eds, *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. Birkhäuser Basel, Basel, pp. 167–178.
- Santos-González J, Finlay R, Tehler A** (2007) Seasonal Dynamics of Arbuscular Mycorrhizal Fungal Communities in Roots in a Seminatural Grassland. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5613–5623.
- Schaarschmidt S, Roitsch T, Hause B** (2006) Arbuscular mycorrhiza induces gene expression of the apoplastic invertase LIN6 in tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Journal of Experimental Botany* **57**: 4015–4023.
- Schubert A, Allara P, Morte A** (2004) Cleavage of sucrose in roots of soybean (*Glycine max*) colonized by an arbuscular mycorrhizal fungus. *New Phytologist* **161**: 495–501.
- Schüßler A, Schwarzott D, Walker C** (2001) A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**: 1413–1421.
- Schweiger R, Baier M, Muller C** (2014b) Arbuscular mycorrhiza-induced shifts in foliar metabolism and photosynthesis mirror the developmental stage of the symbiosis and are only partly driven by improved phosphate uptake. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 1403–1412.
- Schweiger R, Baier M, Persicke M, Müller C** (2014a) High specificity in plant leaf metabolic responses to arbuscular mycorrhiza. *Nature Communication* **5**.

- Schweiger R, Muller C** (2015) Leaf metabolome in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology* **26**: 120–126.
- Sharkey T** (1985) Photosynthesis in intact leaves of C3 plants: Physics, physiology and rate limitations. *The Botanical Review* **51**: 53–105.
- Sharkey T** (1988) Estimating the rate of photorespiration in leaves. *Physiologia Plantarum* **73**: 147–152.
- Sheng M, Tang M, Chen H, Yang B, Zhang F, Huang Y** (2008) Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza* **18**: 287–296.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 217–223.
- Sieh D, Watanabe M, Devers E, Brueckner F, Hoefgen R, Krajinski F** (2013) The arbuscular mycorrhizal symbiosis influences sulfur starvation responses of *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **197**: 606–616.
- Smith S, Gianinazzi-Pearson V** Physiological Interactions Between Symbionts in Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **1988**: 221–244.
- Smith S, Read D** (1997) *Mycorrhizal Symbiosis*. *New Phytologist* **137**: 563–568.
- Smith, S, Read, D**, eds, (2008) *Mycorrhizal Symbiosis*. Elsevier Academic Press, New York.
- Smith S, Smith F** (2011) Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystem scales. *Annual Review of Plant Biology* **62**: 227–250.
- Solaiman M, Saito M** (1997) Use of sugars by intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi revealed by radiorespirometry. *New Phytologist* **136**: 533–538.
- Steuer B, Stuhlfauth T, Fock H** (1988) The efficiency of water use in water stressed plants is increased due to ABA induced stomatal closure. *Photosynthesis Research* **18**: 327–336.
- Stitt M** (1986) Limitation of Photosynthesis by Carbon Metabolism. I. Evidence for Excess Electron Transport Capacity in Leaves Carrying Out Photosynthesis in Saturating Light and CO₂. *Journal of Plant Physiology* **81**: 1115–1122.
- Subramanian K, Charest C** (1995) Influence of arbuscular mycorrhizae on the metabolism of maize under drought stress. *Mycorrhiza* **5**: 273–278.

- Szecowka M, Heise R, Tohge T, Nunes-Nesi A, Vosloh D, Huege J, Feil R, Lunn J, Nikoloski Z, Stitt M, Fernie A, Arrivault S** (2013) Metabolic fluxes in an illuminated Arabidopsis rosette. *The Plant Cell* **25**: 694–714.
- Taiz, L, Zeiger, E**, eds, (2010) *Plant Physiology*, Ed. 5. Sinauer Associates, Sunderland USA.
- Tiessen A, Padilla-Chacon D** (2012) Subcellular compartmentation of sugar signaling: links among carbon cellular status, route of sucrolysis, sink-source allocation, and metabolic partitioning. *Frontiers in Plant Science* **3**: 306.
- Torres-Schumann S, Godoy J, Pintor-Toro J** (1992) A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology* **18**: 749–757.
- Tropis M, Meniche X, Wolf A, Gebhardt H, Strelkov S, Chami M, Schomburg D, Kramer R, Morbach S, Daffe M** (2005) The crucial role of trehalose and structurally related oligosaccharides in the biosynthesis and transfer of mycolic acids in *Corynebacterineae*. *The Journal of biological chemistry* **280**: 26573–26585.
- Uematsu K, Suzuki N, Iwamae T, Inui M, Yukawa H** (2012) Increased fructose 1,6-bisphosphate aldolase in plastids enhances growth and photosynthesis of tobacco plants. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3001–3009.
- van Aarle I, Olsson P** (2003) Fungal lipid accumulation and development of mycelial structures by two arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6762–6767.
- Vanlerberghe G, Martyn G, Dahal K** (2016) Alternative oxidase: a respiratory electron transport chain pathway essential for maintaining photosynthetic performance during drought stress. *Physiologia Plantarum* **157**: 322–337.
- Vaseva, I, Sabotic, J, Sustar-Vozlic, J, Meglic, V, Kidric, M, Demirevska, K, Simova-Stoilova, L**, eds, (2012) *Droughts: New Research. The Response of Plants to Drought Stress: The Role of Dehydrins, Chaperones, Proteases and Protease Inhibitors in Maintaining Cellular Protein Function*. Nova Science Publishers, Inc., New York, New York.
- von Caemmerer, S**, ed, (2000) *Biochemical Models of Leaf Photoynthesis*, Vol 2. CSIRO Publishing, Collingwood.
- Walder F, Heijden van der M** (2015) Regulation of resource exchange in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature* **1**: 15159.
- Wright D, Read D, Scholes, J. D.** (1998a) Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **21**: 881–891.

- Wright D, Scholes, J. D., Read D** (1998b) Effects of VA mycorrhizal colonization on photosynthesis and biomass production of *Trifolium repens* L. *Plant, Cell & Environment* **21**: 209–216.
- Wu Q, Xia R** (2006) Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology* **163**: 417–425.
- Xiang C, Miao Z, Lam E** (1997) DNA-binding properties, genomic organization and expression pattern of TGA6, a new member of the TGA family of bZIP transcription factors in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **34**: 403–415.
- Xu Z, Zhou G** (2008) Responses of leaf stomatal density to water status and its relationship with photosynthesis in a grass. *Journal of Experimental Botany* **59**: 3317–3325.
- Zhang H, Murzello C, Sun Y, Kim M, Xie X, Jeter R, Zak J, Dowd S, Paré P** (2010) Choline and Osmotic-Stress Tolerance Induced in *Arabidopsis* by the Soil Microbe *Bacillus subtilis* (GB03). *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1097–1104.
- Zhang Q, Zhang L, Weiner J, Tang J, Chen X** (2011) Arbuscular mycorrhizal fungi alter plant allometry and biomass-density relationships. *Annals of Botany* **107**: 407–413.
- Zhao M, Jiang Y, He Y, Chen Y, Teng Y, Chen Y, Zhang C, Zhou C** (2010) Structural basis for the allosteric control of the global transcription factor NtcA by the nitrogen starvation signal 2-oxoglutarate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 12487–12492.
- Zhu X, Song F, Liu F** (2016) Altered amino acid profile of arbuscular mycorrhizal maize plants under low temperature stress. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **179**: 186–189.
- Zhu X, Song F, Liu SQ, Liu T, Zhou X** (2012) Arbuscular mycorrhizae improves photosynthesis and water status of *Zea mays* L. under drought stress. *Plant, Soil & Environment* **58**: 186–191.
- Zhu X, Song F, Liu T, Liu S** (2010) Arbuscular mycorrhizae reducing water loss in maize plants under low temperature stress. *Plant Signaling & Behavior* **5**: 591–593.
- Zouari I, Salvioli A, Chialva M, Novero M, Miozzi L, Tenore G, Bagnaresi P, Bonfante P** (2014) From root to fruit: RNA-Seq analysis shows that arbuscular mycorrhizal symbiosis may affect tomato fruit metabolism. *BMC Genomics* **15**: 221.

VI. Anhang

VI.1 *Abbildungsverzeichnis*

Abbildung I-1: Schematische Darstellung des Calvin-Zyklus. Kohlenstoffdioxid wird durch den Enzymkomplex RuBisCO auf Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) übertragen (Kohlenstoff-Fixierung). Der entstehende C₆-Körper zerfällt in zwei C₃-Körper. Mit Hilfe von ATP (Adenosin-Triphosphat) und NADPH (Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat) wird Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) gebildet (Reduktion). Im letzten Abschnitt wird GAP wieder zu RubP regeneriert (Regeneration des CO₂-Akzeptors) (modifiziert nach Jiang et al., 2012) 4

Abbildung I-2: Limitierung der Photosynthese durch die drei biochemischen Prozesse. Das Enzym RuBisCO ist in der Lage neben Kohlenstoff (CO₂) auch Sauerstoff (O₂) zu binden, Bei der Carboxylierung wird aus Ribulose-1,5-bisphosphat (RubP) und CO₂ 3-Phosphoglycerat (PGA) synthetisiert, welches unter Verbrauch von ATP und NADPH während des Calvin-Zyklus Triosephosphat bildet. Triosephosphat wird im Cytosol zur Bildung von Saccharose genutzt. Neben Saccharose können Intermediate des Calvin-Zyklus auch zum Aufbau von Stärke verwendet werden. Die Oxygenasereaktion von RuBisCO resultiert in der Photorespiration. Über mehrere verlustreiche enzymatische Schritte wird 3-Phosphoglycerat recycelt (rot) (modifiziert nach Kaschuk et al., 2009; Stitt, 1986; Wright et al., 1998a)..... 6

Abbildung I-3: Gegenüberstellung der Ektomykorrhiza und Arbuskulären Mykorrhiza. Ektomykorrhizapilze bilden einen dichten Hyphenmantel um die Wurzelspitze und formen ein Hartigsche Netz um die Epidermiszellen (grün). Arbuskuläre Mykorrhizapilze dringen in die Wurzel ein. Die Intraradikale Kolonialisierung findet intra- und interzellulär statt und endet mit der Bildung der Arbuskeln (blau) (modifiziert nach Bonfante und Genre, 2010)..... 7

Abbildung I-4: Der Lebenszyklus des arbuskulären Mykorrhizapilzes beginnt mit dem Auskeimen der Spore gefolgt von dem Hyphenwachstum und der Hyphenverzweigung, initiiert durch Signalmoleküle. Die Penetration der Wurzelepidermis und Ausbildung eines Haustoriums schließt sich an. Der Pilz wächst in das Innere der Wurzel und bildet Arbuskeln aus, durch die der Nährstoff- und Kohlenstoffaustausch stattfindet. Der Pilz wächst und bildet Speicherorgane (Vesikel) und Sporen für den nächsten Lebenszyklus (modifiziert nach Bucking et al., 2012)..... 8

Abbildung I-5: Stärkesynthese in Pflanzen. Fructose-6-Phosphat (Fruc-6-P) wird über verschiedene enzymatische Schritte im Chloroplasten zu aktivierter Glucose (ADP-Glucose) umgewandelt, welches zur Stärkesynthese dient. Glucose-1-Phosphat (Glucose-1-P), Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P), Phosphat (P) (modifiziert nach Tiessen und Padilla-Chacon, 2012)..... 9

- Abbildung I-6:** Saccharose Synthese in Pflanzen. Triosephosphate (G3P/DHAP) werden aus den Chloroplasten exportiert. Im Cytosol findet eine Kondensation zu Fructose 1-6-biphosphat statt. Über verschieden enzymatische Schritte wird Saccharose synthetisiert, welches über das Phloem zu den Bedarfsorganen transportiert werden kann. Fructose-1-6-biphosphat (Fructose-1-6-bP), Fructose-6-Phosphat (Fructose-6-P), Glucose-1-Phosphat (Glucose-1-P), Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P), Saccharose-6-Phosphat (Saccharose-6-P), Phosphat (P) (modifiziert nach Flügge, 1995).10
- Abbildung I-7:** Zuckermetabolismus in arbuskulären Mykorrhizapilzen. Saccharose wird über das Phloem in die Pflanzenwurzel transportiert. Nach Spaltung durch Invertasen werden Hexosen vom Pilz aufgenommen und weiter metabolisiert. Pentose Phosphatweg (PPP), Triacylglycerine (TAG), Aminosäuren (AA) (modifiziert nach Bago et al., 2000).11
- Abbildung I-8:** Regulation der Stomataöffnung. Unter Stressbedingungen wie Trockenheit, Kälte oder Pathogenbefall steigt die Konzentration an Abscisinsäure (ABA) im Blatt. Eine gesteigerte ABA-Konzentration verursacht einen Calciumeinstrom in den Schließzellen und eine Erhöhung des pH-Wertes. Die Öffnung verursacht weiterhin einen Ausstrom von Kalium und Wasser in den Apoplasten. Durch Ausstrom von Wasser aus der Schließzelle vermindert sich der Turgordruck der Zelle und die Stomata werden geschlossen (modifiziert nach Kwak et al., 2008).13
- Abbildung II-1:** Experimenteller Aufbau für die Markierung und Verfolgung des schweren Kohlenstoffisotops. Der Spross der Pflanze wird mit einer handelsüblich durchsichtigen Plastiktüte (Gefrierbeutel) umhüllt und mit Klebeband verschlossen. Der Luftaustausch ist durch Löcher in der Tüte gewährleistet. Über einen Schlauch wird das $^{13}\text{CO}_2$ mit einer Fließgeschwindigkeit von 0,5 l/min in die Tüte geleitet.32
- Abbildung III-1:** Wachstumsphänotyp mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Wachstumsphänotyp von mykorrhizierten (AMF, links) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 μM P, mitte) und optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000 μM P, rechts) nach fünfwöchiger Symbiose bei 28 °C Anzuchttemperatur.35
- Abbildung III-2:** Bestimmung der Mykorrhizierungsgrads nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis*. Färbung pilzlicher Strukturen durch WGA Alexa Fluor® 488 (2a-c) und *Trypan blue* (2d: 100x Vergrößerung; 2e: 40x Vergrößerung). Die Bestimmung des Expressionslevels des Phosphattransporters 4 (*SPT4*; Solyc06g051850) und der pilzlichen 18S rRNA erfolgte mit der real-time qPCR. Als Standardgen diente der Elongationsfaktor 1 α (*S/EF1 α* ; Solyc06g009970). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$36

Abbildung III-3: Wachstumsphänotyp mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Wachstumsphänotyp von mykorrhizierten (AMF, links) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 μM P, rechts) nach zehnwöchiger Symbiose bei 28 °C Anzuchttemperatur.....40

Abbildung III-4: Bestimmung photosynthetischer Parameter von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 μM P) und optimaler Phosphatversorgung (1000 μM P) nach 4,5-wöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei ambienten CO₂ Bedingungen (400 ppm) und erhöhten CO₂ Bedingungen (1000 ppm). Gemessen wurden die Photosynthese (a), Transpiration (b) und Photosynthese pro interzellulären CO₂ (c) des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an drei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$42

Abbildung III-5: Metabolitgehalt von Saccharose, Glucose und Fructose nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulärer Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolierung wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$45

Abbildung III-6: Metabolitgehalt der Citratzyklus-Intermediate nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolierung wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.47

Abbildung III-7: Metabolitgehalt von Glycin, Serin und Prolin nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die

Metabolitisolation wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: **, $p < 0,01$49

Abbildung III-8: Metabolitgehalt von Saccharose, Glucose, Fructose und Trehalose nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde die komplette Wurzel vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p = 0,01$52

Abbildung III-9: Metabolitgehalt von Inositol in Blatt (a) und in der Wurzel (b) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei einer Anzuchttemperatur von 24 °C (schwarz) und 28 °C (weiß). Der Metabolitgehalt wurde mittels Referenzstandard einer Reinsubstanz identifiziert und basierend auf der Peak-Area quantifiziert. Für die Metabolitisolation wurde das zweite voll entwickelte Blatt und die komplette Wurzel vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und die wässrigen Metabolite mittels *polar phase* Extraktion extrahiert. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$54

Abbildung III-10: Korrelation physiologischer Parameter und Metabolitgehalte mit der aktiven Mykorrhiza. Für die Korrelation wurden die Transpiration beziehungsweise der Wurzel-Trehalosegehalt jeder Pflanze gegen die aktive Mykorrhizierung aufgetragen. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach 4,5-wöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* für die Gaswechsellmessungen verwendet (III.1.2). Im Anschluss an die physiologischen Messungen wurden die Pflanzen am folgenden Tag, vier Stunden nach Tagesbeginn, geerntet und das Pflanzenmaterial für die Metabolitisolierung sowie Transkriptionsanalyse verwendet. Für die Bestimmung der aktiven Mykorrhizierung wurde der spezifische Phosphattransporter 4 mit dem Elongationsfaktor Ef1 α standardisiert. Der absolute Metabolitgehalt wurde mittels Referenzsubstanz und entsprechender Standardgerade ermittelt.56

Abbildung III-11: Zeitlicher Verlauf des aus der ¹³C-Markierung stammenden prozentualen Anteils an ¹³C-Saccharose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und

nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$58

Abbildung III-12: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Glucose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.60

Abbildung III-13: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Trehalose in der Wurzeln mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach dem Beenden der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.62

Abbildung III-14: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Saccharose, ^{13}C -Glucose und ^{13}C -Trehalose in der Wurzeln mykorrhizierter (a) und nicht-mykorrhizierter (b) Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt nach der Markierung, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.63

Abbildung III-15: Überprüfung der Kandidatengene der RNA-Sequenzierung mittels real-time qPCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene in mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50) sowie in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000). Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen. Nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *ATP Synthase* (Solyc01g007320), *Fructose-*

bisphosphate aldolase (Solyc02g062340.2.1), *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600.2.1), *Sucrosetransportern 2* (Solyc05g007190), *Sucrosetransportern 1* (Solyc11g017010), *Soluble Diacylglycerol acyltransferase* (Solyc12g098850.1.1), *Rubisco Activase* (Solyc09g011080.2.1) erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$71

Abbildung III-16: Überprüfung der Kandidatengene der RNA-Sequenzierung mittels real-time qPCR. Dargestellt ist die Expression der Kandidatengene in mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50) sowie in optimal mit Phosphat versorgten Pflanzen (1000). Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen. Nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *Kunitz-type protease inhibitor* (Solyc03g098790.1.1), *Serine/Threonine protein kinase 1* (Solyc04g009910.2.1), *MYB transcription factor* (Solyc06g005310.2.1), *Ferritin* (Solyc06g050980.2.1), *Plant specific domain* (Solyc07g053900.2.1), *Threonine ammonia-lyase biosynthetic* (Solyc09g008670.2.1), *RuBisCO Activase* (Solyc09g011080), *Proteinase inhibitor* (Solyc09g089510.2.1), *Non-specific lipid-transfer protein* (Solyc10g075150.1.1), *Aquaporine* (Solyc10g083880.1.1), erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$73

Abbildung III-17: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan-Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik (III.3.1; Tabelle III-5) verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert $< 0,05$ und einem \log_2 -Foldchange $< 0,7$ verwendet (186 Gene).76

Abbildung III-18: Genexpression von Blättern mykorrhizierter (AMF, schwarz) und nicht-mykorrhizierter (50 μ M P, weiß) Pflanzen unter Phosphatmangel. Der Trockenstress wurde durch Reduktion des Brauchwassers um 50 % für zwei Wochen erzeugt. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* wurde das zweite voll entwickelte Blatt vier Stunden nach Tagesbeginn geerntet und für die Transkriptionsanalyse (II.2.3.6) verwendet. Die Bestimmung der Expression der *Choline dehydrogenase* (Solyc03g121600), des *Aquaporine* (Solyc10g083880), des *MYB transcription factor* (Solyc06g005310) erfolgte durch Standardisierung mit dem Haushaltsgen *Actin2* (Solyc03g078400). Die Mittelwerte ergeben

sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$82

Abbildung IV-1: Modell zur Regulation der Photosynthese. Der arbuskuläre Mykorrhizapilz beeinflusst die Photosynthese der Pflanze indirekt durch eine verbesserte Wasserversorgung. Der verbesserte Wasserstatus führt zu einer Öffnung der Stomata und der damit verbundenen erhöhten Transpiration (gelb). Die verbesserte Wasserversorgung sowie die Öffnung der Stomata führen zu einer Reduktion des Stresslevels (blau). Beides resultiert in einer erhöhten Photosynthese. Eine erhöhte Photosynthese führt zu einer gesteigerten Zuckersynthese. Durch die Mitversorgung des Pilzes erhöhen die Pflanzen den Export von Kohlenstoff aus dem Blatt, wodurch eine Hemmung der Photosynthese durch Zuckerakkumulation verhindert wird (orange).....101

Abbildung VI-1: Korrelation physiologischer Parameter und Metabolitgehalte mit der aktiven Mykorrhiza. Für die Korrelation wurden die Photosyntheseleistung bzw. der Metabolitgehalt jeder Pflanze gegen die aktive Mykorrhiza aufgetragen. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* für die Gaswechsellmessungen verwendet (III.1.2). Im Anschluss an die physiologischen Messungen wurden die Pflanzen am folgenden Tag, vier Stunden nach Tagesbeginn, geerntet und das Pflanzenmaterial für die Metabolitisolierung sowie Transkriptionsanalyse verwendet. Für die Bestimmung der aktiven Mykorrhiza wurde der spezifische Phosphattransporter 4 mit dem Elongationsfaktor Ef1 α standardisiert. Der absolute Metabolitgehalt wurde mittels Referenzsubstanz und entsprechender Standardgerade ermittelt.129

Abbildung VI-2: Zeitlicher Verlauf des aus der ¹³C-Markierung stammenden prozentualen Anteils an ¹³C-Fructose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit ¹³CO₂ (400 ppm) begast und direkt, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.130

Abbildung VI-3: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert $< 0,05$ und einem log₂-Foldchange $< 0,7$ verwendet (186 Gene). Die Rot gekennzeichneten Gene werden im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanze unter Phosphatmangel in mykorrhizierten

Pflanzen schwächer, die in blau gekennzeichneten Gene stärker exprimiert. Jedes Quadrat repräsentiert ein Gen. BINS ohne ein identifiziertes Gen zeigen einen grauen Punkt. Die Zuordnung der BINs zu den Funktionsgruppen sind in Tabelle VI-6 zu finden..... 133

VI.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle II-1: Spezielle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	17
Tabelle II-2: Verwendete Apparaturen, Geräte und Zubehör.....	18
Tabelle II-3: Verwendete Software und Internetprogramme.....	19
Tabelle II-4: Verwendete Reaktionskits.....	20
Tabelle II-5: Verwendete Enzyme.....	20
Tabelle II-6: Häufig verwendete Puffer und Medien.....	20
Tabelle II-7: In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide.....	22
Tabelle II-8: Oligonukleotide zur Überprüfung der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung.....	23
Tabelle II-9: Einstellung Licor 6400XT.....	25
Tabelle II-10: Komponenten der Färbelösung.....	26
Tabelle II-11: Komponenten der <i>Trypan blue</i> Färbelösung.....	27
Tabelle II-12: Mapping Einstellungen in der CLC genomic workbench 7.5.1.....	29
Tabelle II-13: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für den DNase Verdau.....	30
Tabelle II-14: Zusammensetzung des Reaktionsgemisches für die reverse Transkription..	30
Tabelle II-15: Zusammensetzung der qPCR.....	31
Tabelle II-16: Termoprofil der qPCR.....	31
Tabelle III-1: ICP-MS Bestimmung (II.2.2.4) der Nährstoffzusammensetzung des Sprosses (28 °C Anzucht). Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$	37
Tabelle III-2: Wachstumsparameter der Pflanzen nach fünfwöchigen Symbiose bei 24 °C und 28 °C Anzuchttemperatur als auch nach zehnwöchigen Symbiose bei einer Anzuchttemperatur von 28 °C. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$	39
Tabelle III-3: Ergebnis des <i>Read-Mappings</i> . Die sequenzierten Fragmente der mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten (50 µM P) Probe wurden dem Referenzgenom von Tomate ITAG 2.3 zugeordnet. Folgende Parameter wurden in der CLC genomic workbench 7.5.1 verwendet: Match score 1; mismatch cost: 2; Insertion cost: 3; Deletion cost: 3; Length fraction: 0,8; Similarity fraction: 0,95).....	65

Tabelle III-4: Differentiell regulierte Gene in Blättern mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierter Pflanzen. Aufgelistet sind die 20 Gene mit der kleinsten FDR. Die Veränderungen (FC) stellt das Verhältnis mykorrhiziert/nicht-mykorrhiziert dar und wurde mittels EdgeR Statistik in der CLC genomic workbench 7.5.1 analysiert.....	66
Tabelle III-5: Differentiell regulierte Gene in Blättern mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierter Gene. Aufgelistet sind die 20 Gene mit der kleinsten FDR. Die Veränderungen (FC) stellt das Verhältnis mykorrhiziert/nicht-mykorrhiziert dar und wurde mit der DESeq2-Statistik ausgewertet.....	67
Tabelle III-6: Übersicht über die per real-time qPCR analysierte Gene. Die Auswahl erfolgte auf Basis der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung (III.3.1)	69
Tabelle III-7: Vergleich der Veränderung (FC) in den Blättern mykorrhizierter und nicht-mykorrhizierter Pflanzen die durch die zwei unterschiedlichen Statistiken (EdgeR und DESeq) im Anschluss an die RNA-Sequenzierung sowie der real-time qPCR ermittelt wurden.	75
Tabelle III-8: Auflistung der annotierten Gene der drei am stärksten regulierten Gruppe Proteinmetabolismus, Signale und RNA/DNA Prozesse. Die Annotation der Gene erfolgte anhand der Solyc Nr., die dem Referenzgenom von Tomate ITAG2.3 zugeordnet wurden. .	77
Tabelle III-9: Photosynthetische Parameter (CO ₂ -Assimilation und Transpiration) von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 µM P) unter Trockenstress und optimaler Wasserversorgung (Kontrolle) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz <i>Rhizophagus irregularis</i> bei ambienten CO ₂ -Bedingungen (400 ppm) und erhöhter CO ₂ -Bedingungen, (1000 ppm). Gemessen wurden die photosynthetischen Parameter des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an zwei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$	80
Tabelle VI-1: Photosynthetische Parameter (CO ₂ -Assimilation und Transpiration) von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 µM P) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulärer Mykorrhizapilz <i>Rhizophagus irregularis</i> bei ambienten CO ₂ Bedingungen (400 ppm) und erhöhten CO ₂ Bedingungen, (1000 ppm) (Abbildung III-4). Gemessen wurden die photosynthetischen Parameter des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an drei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$	128
Tabelle VI-2: Injektions-Methode mit Gerstel MPS.....	131
Tabelle VI-3: Wasch-Programm.....	131

Tabelle VI-4: GC-Methode	131
Tabelle VI-5: MS-Methode	132
Tabelle VI-6: Zuordnung der BINs zu den jeweiligen Funktionsgruppen	133
Tabelle VI-7: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert < 0,05 und einem \log_2 -Foldchange < 0,7 verwendet (186 Gene). Die Annotation der Gene erfolgte anhand der Solyc Nr., die dem Referenzgenom von Tomate ITAG2.3 zugeordnet wurden.....	134
Tabelle VI-8: Bestimmung der Bindungseigenschaft des Sand-Seramis-Gemisches. pF: dekadischer Logarithmus des Betrags der Bodenwasserspannung in Hektopascal. pF 4,2 entspricht dem permanenten Welkepunkt (PWP). Zwischen pF 1,8-pF 4,2 ist das von der Pflanze nutzbare Wasser gebunden.....	139
Tabelle VI-9: Wassergehalt Vol [%] des Sand-Seramis-Gemisches bei der Ernte nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz Die Mittelwerte ergeben sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$	139

VI.3 Zusätzliche Daten

VI.3.1 Photosynthetische Parameter

Tabelle VI-1: Photosynthetische Parameter (CO₂-Assimilation und Transpiration) von mykorrhizierten (AMF) und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel (50 µM P) nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulärer Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* bei ambienten CO₂ Bedingungen (400 ppm) und erhöhten CO₂ Bedingungen, (1000 ppm) (Abbildung III-4). Gemessen wurden die photosynthetischen Parameter des zweiten voll entwickelten Blattes zwischen 9 und 15 Uhr an drei aufeinander folgenden Tagen. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$.

	Parameter	Anzuchttemperatur [°C]	AMF	50 µM P	1000 µM P
400 ppm	Photosynthese [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	24	15,3±1,44	13,0±2,31	16,37±1,74
		28	17,3±0,43	14±1,11	17,3±1,07
	Transpiration [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	24	2,4±0,62	2,1±0,44	2,78±0,82
		28	3,1±0,29	2,3±0,12	2,9±0,63
1000 ppm	Photosynthese [$\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	24	20,2±1,37	20,2±3,56	22,1±1,19
		28	22,3±0,84	19,3±1,38	22,2±1,34
	Transpiration [$\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$]	24	2,0±0,58	1,5±0,17	2,2±0,77
		28	2,5±0,08	1,9±0,11	2,8±0,30

VI.3.2 Korrelation von Metaboliten und physiologischen Parametern mit der aktiven Mykorrhiza

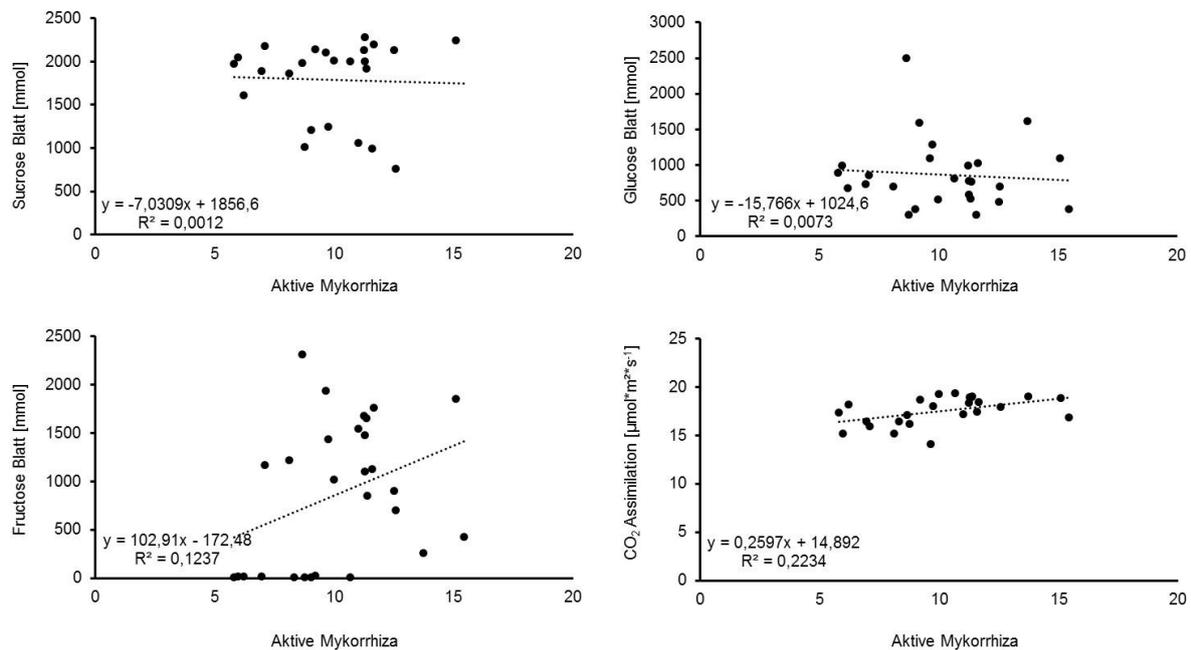


Abbildung VI-1: Korrelation physiologischer Parameter und Metabolitgehälter mit der aktiven Mykorrhiza. Für die Korrelation wurden die Photosyntheseleistung bzw. der Metabolitgehalt jeder Pflanze gegen die aktive Mykorrhiza aufgetragen. Die Pflanzen wurden bei 28 °C angezogen und nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis* für die Gaswechselfmessungen verwendet (III.1.2). Im Anschluss an die physiologischen Messungen wurden die Pflanzen am folgenden Tag, vier Stunden nach Tagesbeginn, geerntet und das Pflanzenmaterial für die Metabolitisolation sowie Transkriptionsanalyse verwendet. Für die Bestimmung der aktiven Mykorrhiza wurde der spezifische Phosphattransporter 4 mit dem Elongationsfaktor Ef1 α standardisiert. Der absolute Metabolitgehalt wurde mittels Referenzsubstanz und entsprechender Standardgerade ermittelt.

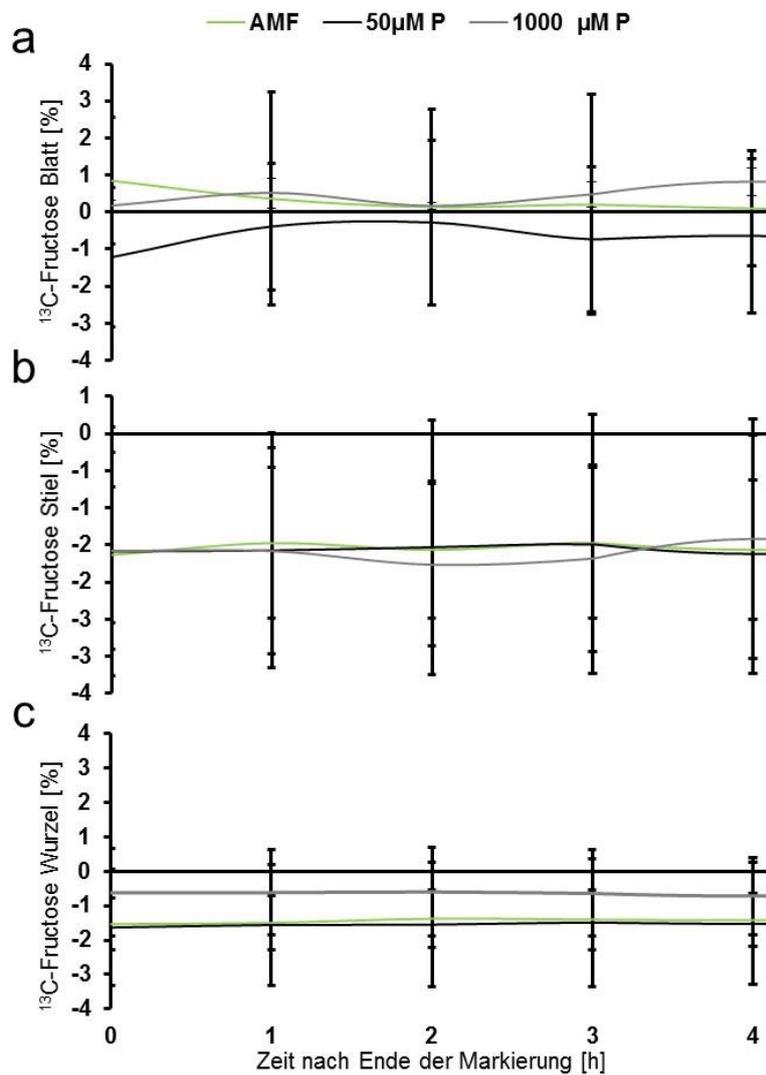
VI.3.3 Zeitlicher Verlauf des prozentualen Anteils an ^{13}C -Fructose

Abbildung VI-2: Zeitlicher Verlauf des aus der ^{13}C -Markierung stammenden prozentualen Anteils an ^{13}C -Fructose in Blatt (a), Stiel (b) und Wurzeln (c) mykorrhizierter (grün) und nicht-mykorrhizierter (schwarz) Pflanzen unter Phosphatmangel sowie optimal mit Phosphat versorgter (grau) Pflanzen. Für die Markierung wurden Pflanzen für 90 min mit $^{13}\text{CO}_2$ (400 ppm) begast und direkt, sowie einer, zwei, drei und vier Stunden nach dem Beenden der Markierung geerntet. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Replikaten mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate.

VI.3.4 GC-MS Programmierung

Tabelle VI-2: Injektions-Methode mit Gerstel MPS

System	Runtime	25 min
	GC Cool down time	10 min
	Cryo-Timeout	60 min
CIS	Heater Mode	Standard
	Initial Temp.	200
	Equilibr. time	0,05
	Initial time	1
Ramp 1	Rate CIS	10
	End Temp.	320
	Hold time	1

Tabelle VI-3: Wasch-Programm

		Preclean	postclean
1. wash 2	Ethylacetat	1	2
2. wash 1	Hexan	1	2
Sample			
Fill speed	5 µl/s		
Eject speed	50 µl/s		

Tabelle VI-4: GC-Methode

Backinlet Type	Gerstel
Carrier Gas	Helium
Backinlet mode	Speedless
Column 2/ Back Inlet	
Rate (ml/min)	Initial
Target Flow	2 ml/min
Back Inlet Septum Purge	3 ml/min
Back Inlet Purge Time	60 sek
Back Inlet Purge Flow	20 ml/min
Back Inlet Total Flow	22 ml/min
Back Inlet Temp.	Initial: 200°C; 1 min 600°C; 320°C; 1 min

Back Inlet Gas Server Flow	15 ml/min
Back Inlet Gas Server Time	5 ml/min
Oven temp.	Initial; 85°C; 2 min 15°C/min; 330°C; 6 min
Transfer line	250°C

Tabelle VI-5: MS-Methode

Aquisition delay	225 sek		
Start mass	70		
End mass	600		
Aquisition rate	20		
Detector voltage	1550		
Electron energy	-70		
Mass detector mode	Manual		
Start of run	225 sek		Filament off
	225 sek	End of run	Filament on
Source	250°C		

MPS

Liquid	
Syringe 10 µl	
Inf. Volume	1 µl
Inj. Speed	100 µl/sek
Fill volume	3 µl
Fill stroke f. sample	3 µl/sek
Fill speed	1 µl/sek
Eject speed	30 µl/sek
Injection Penetration	30 mm
Vial Penetration	24 mm

VI.3.5 Ergebnis der MapMan-Analyse



Abbildung VI-3: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert $< 0,05$ und einem \log_2 -Foldchange $< 0,7$ verwendet (186 Gene). Die Rot gekennzeichneten Gene werden im Vergleich zu nicht-mykorrhizierten Pflanze unter Phosphatmangel in mykorrhizierten Pflanzen schwächer, die in blau gekennzeichneten Gene stärker exprimiert. Jedes Quadrat repräsentiert ein Gen. BINS ohne ein identifiziertes Gen zeigen einen grauen Punkt. Die Zuordnung der BINS zu den Funktionsgruppen sind in Tabelle VI-6 zu finden

Tabelle VI-6: Zuordnung der BINS zu den jeweiligen Funktionsgruppen

BIN Nummer	Funktionsgruppe	BIN Nummer	Funktionsgruppe
1	Photosynthese	19	Tetrapyrrolesynthese
2	Major CHO	20	Stress
3	Minor CHO	21	Redox
4	Glykolyse	22	Polyaminmetabolismus
5	Fermentation	23	Nukleotidmetabolismus
6	Glukogeogenese	24	Biodegradation und Xenobiotics
7	OPP	25	C1 Metabolismus
8	TCA	26	Misc
9	ETC	27	RNA Prozessierung
10	Zellwand	28	DNA Synthese
11	Lipidmetabolismus	29	Proteine

12	N-Metabolismus	30	Signale
13	Aminosäuremetabolismus	31	Zelle
14	Schwefelassimilation	32	Micro RNA
15	Metalhandhabung	33	Entwicklung
16	Sekundärmetabolismu	34	Transport
17	Hormonmetabolismus	35	Nicht zugewiesen
18	Co-Faktoren und Vitaminmetabolismus		

Tabelle VI-7: Funktionelle Annotation der in der RNA-Sequenzierung ermittelten differentiell regulierten Gene zwischen mykorrhizierten und nicht-mykorrhizierten Pflanzen unter Phosphatmangel. Für die Analyse mittels MapMan Software wurde der Datensatz der DESeq2 Statistik verwendet. Es wurden ausschließlich Gene mit einem p -Wert < 0,05 und einem \log_2 -Foldchange < 0,7 verwendet (186 Gene). Die Annotation der Gene erfolgte anhand der Solyc Nr., die dem Referenzgenom von Tomate ITAG2.3 zugeordnet wurden.

Solyc Nr.	Annotation ITAG2.3	\log_2 FC	FC
Photosynthese			
solyc01g007660.2.1	NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit 2 A, chloroplastic	0,34	1,27
Major CHO			
solyc09g092130.2.1	Sucrose phosphate synthase	0,40	1,32
solyc10g083300.1.1	Beta-fructofuranosidase insoluble isoenzyme 2	0,33	1,26
Minor CHO			
solyc08g082860.2.1	Alpha alpha-trehalase	0,33	1,26
Zellwand			
solyc09g072820.2.1	Cellulose synthase	0,35	1,28
solyc09g007660.1.1	Fasciclin-like arabinogalactan protein 7	0,39	1,31
solyc11g005150.1.1	Leucine-rich repeat family protein	0,50	1,41
solyc08g078290.1.1	Glycoprotein homolog	0,34	1,26
solyc03g114860.2.1	Alpha-1 4-glucan-protein synthase	-0,42	0,75
solyc04g008230.2.1	Polygalacturonase	0,36	1,28
solyc05g005170.2.1	Polygalacturonase 2	0,40	1,32
solyc01g109500.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,38	1,31
Lipidmetabolismus			
solyc09g065780.2.1	Fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase	0,42	1,34
solyc03g005320.2.1	Fatty acid elongase 3-ketoacyl-CoA synthase	0,36	1,28
solyc06g007130.2.1	Omega-3 fatty acid desaturase	0,40	1,32
solyc03g045140.2.1	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	0,39	1,31
solyc10g075150.1.1	Non-specific lipid-transfer protein	-0,60	0,66
solyc05g012950.1.1	Sulfotransferase family protein	0,36	1,28
solyc02g077110.2.1	Lipase-like protein	0,32	1,25
Aminosäuremetabolismus			

solyc07g021630.2.1	Branched-chain-amino-acid aminotransferase	-0,49	0,71
solyc02g082830.1.1	Phosphoserine aminotransferase	0,33	1,26
solyc09g061840.2.1	3-ketoacyl CoA thiolase 1	-0,42	0,75
Metalhandhabung			
solyc06g050980.2.1	Ferritin	-0,60	0,66
Sekundärmetabolite			
solyc04g079960.1.1	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase 2	0,35	1,28
solyc06g066310.2.1	Phosphomevalonate kinase	-0,50	0,71
solyc12g006570.1.1	Germacrene-D synthase	0,38	1,30
solyc08g005720.2.1	Ent-kaurene synthase-like protein 1	0,36	1,29
solyc08g005640.2.1	Ent-kaurene synthase-like protein 1	0,38	1,30
solyc01g068140.2.1	10-deacetylbaicatin III-10-O-acetyl transferase-like	0,32	1,25
solyc01g106000.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	-0,40	0,76
solyc08g006830.2.1	Caffeoyl-CoA O-methyltransferase 1	0,32	1,25
solyc02g030480.2.1	Cinnamyl alcohol dehydrogenase-like protein	0,39	1,31
solyc01g088430.2.1	CER1	0,46	1,38
solyc09g011960.1.1	Laccase	0,40	1,32
solyc02g085110.2.1	Laccase	0,36	1,28
solyc02g062650.2.1	Laccase	0,33	1,25
Hormonmetabolismus			
solyc02g090190.1.1	Molybdenum cofactor sulfuryase	0,41	1,33
solyc07g054580.2.1	GH3 family protein	0,34	1,27
solyc07g066560.1.1	Auxin responsive SAUR protein	-0,60	0,66
solyc10g007570.2.1	Gibberellin 2-oxidase 3	-0,50	0,71
solyc01g111080.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	-0,40	0,76
solyc09g055890.2.1	Lipoxygenase	0,40	1,32
solyc07g042170.2.1	Jasmonate ZIM-domain protein 3	-0,42	0,75
Stress			
solyc08g080620.1.1	Osmotin-like protein	-0,50	0,71
solyc03g081230.1.1	NHL1	-0,43	0,74
solyc03g046200.1.1	Endo-1 3-beta-glucanase	0,40	1,32
solyc07g005100.2.1	Chitinase-like protein	-0,44	0,74
solyc07g042170.2.1	Jasmonate ZIM-domain protein 3	-0,42	0,75
solyc12g097010.1.1	Lrr, resistance protein fragment	0,39	1,31
solyc03g033500.2.1	Cold shock protein-1	0,32	1,25
solyc01g099580.1.1	Desiccation-related protein PCC13-62	-0,50	0,71
solyc02g089250.2.1	Pollen Ole e 1 allergen and extensin	0,37	1,30
Redox			
solyc04g082460.2.1	Catalase	0,37	1,29
Biodegradation und Xenobiotics			
solyc10g086650.1.1	Glyoxal oxidase	0,34	1,26
Misc			
solyc03g078770.2.1	UDP-glucuronosyltransferase	0,34	1,26
solyc07g064050.2.1	Glycosyltransferase	0,48	1,39
solyc10g085870.1.1	UDP-glucosyltransferase family 1 protein	0,33	1,25
solyc02g083700.2.1	Alpha-mannosidase	0,35	1,27
solyc05g009470.2.1	Alpha-glucosidase	0,40	1,32
solyc07g049370.2.1	Glucan endo-1 3-beta-glucosidase A6	0,33	1,26
solyc12g055840.1.1	Glucan endo-1 3-beta-glucosidase 7	0,37	1,29
solyc02g070450.1.1	Glucan endo-1 3-beta-glucosidase 7	-0,51	0,70

solyc02g080670.2.1	Laccase-22	0,32	1,25
solyc08g079090.2.1	Laccase-22	0,40	1,32
solyc03g121600.2.1	Choline dehydrogenase	0,60	1,52
solyc05g047680.2.1	Cytochrome P450	-0,47	0,72
solyc05g011970.2.1	Cytochrome P450	-0,47	0,72
solyc09g092620.2.1	Cytochrome P450	0,33	1,26
solyc03g111940.2.1	Cytochrome P450	0,39	1,31
solyc02g080330.2.1	Cytochrome P450	0,34	1,27
solyc01g094750.2.1	Cytochrome P450	0,37	1,29
solyc06g050440.2.1	Peroxidase	-0,48	0,72
solyc11g005820.1.1	Pectinesterase inhibitor	0,33	1,26
solyc03g117560.2.1	Blue copper-like protein	0,40	1,32
solyc12g009650.1.1	Proline rich protein	0,35	1,27
solyc10g083170.1.1	2,5-dichloro-2,5-cyclohexadiene-1,4-diol dehydrogenase	0,45	1,36
solyc10g017570.2.1	Carbonyl reductase 3	-0,44	0,74
RNA Prozessierung			
solyc02g081200.1.1	At1g62390-like protein	0,34	1,27
solyc08g066120.2.1	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase	0,35	1,27
solyc05g007950.2.1	Ribonuclease T2	-0,45	0,73
solyc01g008910.2.1	Scarecrow transcription factor family protein	0,36	1,28
solyc07g066110.1.1	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0,40	1,32
solyc06g005310.2.1	MYB transcription factor	-0,80	0,57
solyc06g005330.2.1	MYB transcription factor	-0,60	0,66
solyc01g101030.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,36	1,28
solyc08g076390.2.1	Lysine-specific demethylase 5A	0,33	1,25
solyc08g005240.1.1	Lysine-specific demethylase 5B	0,37	1,30
solyc04g080490.2.1	Zinc finger-homeodomain protein 1	0,34	1,27
solyc05g009890.1.1	Chloroplast nucleoid DNA binding protein-like	0,60	1,52
solyc09g011040.1.1	Aspartic proteinase nepenthesin I	0,49	1,41
DNA Synthese			
solyc01g102810.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,33	1,26
solyc04g045530.2.1	DNA primase large subunit	0,34	1,27
solyc03g111680.2.1	DNA polymerase III gamma/tau subunit	0,39	1,31
Proteinemetabolismus			
solyc11g007000.1.1	Heme A synthase	0,33	1,25
solyc02g070810.2.1	Nuclear pore membrane glycoprotein 210	0,36	1,28
solyc09g074940.1.1	Translocase of chloroplast 90, chloroplastic	0,33	1,26
solyc02g086360.2.1	Octicosapeptide/Phox/Bem1p domain-containing protein	0,32	1,25
solyc09g082510.2.1	Kinase interacting family protein	0,33	1,26
solyc04g009910.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	-0,60	0,66
solyc09g018280.1.1	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type 1	-0,50	0,71
solyc04g009900.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	-0,49	0,71
solyc06g053620.2.1	Calcium-dependent protein kinase 2	-0,45	0,73
solyc04g075000.1.1	Serine/threonine protein kinase	0,34	1,26
solyc02g091470.2.1	Serine/threonine protein kinase-like	0,32	1,25
solyc01g109950.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,49	1,40
solyc09g008640.1.1	Receptor-like protein kinase At3g21340	0,37	1,30

solyc04g082120.2.1	Prolyl endopeptidase	0,38	1,30
solyc02g069630.2.1	Subtilisin-like serine protease	0,32	1,25
solyc08g079900.1.1	Subtilisin-like protease	-0,60	0,66
solyc02g092670.1.1	Subtilisin-like protease	0,36	1,28
solyc06g083720.1.1	Subtilisin-like protease	0,40	1,32
solyc07g006030.2.1	Protein TIF31 homolog	0,35	1,28
solyc02g032940.2.1	Aspartic proteinase	0,35	1,28
solyc01g079950.2.1	Xylanase inhibitor	0,45	1,37
solyc02g081550.2.1	ATP-dependent Zn protease cell division protein FtsH homolog	0,39	1,31
solyc02g069470.2.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	0,34	1,27
solyc08g042100.2.1	Armadillo/beta-catenin repeat family protein	0,36	1,29
solyc04g076860.2.1	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H2	0,38	1,30
solyc01g099970.2.1	F-box/LRR-repeat protein 14	-0,50	0,71
solyc09g007420.2.1	Galactosylgalactosylxylosylprotein 3-beta-glucuronosyltransferase 1	0,43	1,35
Signale			
solyc10g074540.1.1	Expressed protein	0,43	1,35
solyc09g008860.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,41	1,33
solyc01g107650.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,32	1,25
solyc04g078590.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,36	1,28
solyc03g118510.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,34	1,27
solyc10g085120.1.1	Receptor like kinase, RLK	0,33	1,25
solyc03g026040.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,38	1,30
solyc03g043770.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,38	1,30
solyc09g098290.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,50	1,41
solyc10g079170.1.1	Receptor like kinase, RLK	0,35	1,28
solyc02g023950.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,46	1,38
solyc11g005150.1.1	Leucine-rich repeat family protein	0,50	1,41
solyc06g048950.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,34	1,27
solyc03g093330.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,48	1,39
solyc08g059730.1.1	S-receptor kinase -like protein	0,35	1,28
solyc09g090680.2.1	Cysteine-rich repeat secretory protein 3	0,38	1,30
solyc03g043770.2.1	Receptor like kinase, RLK	0,38	1,30
solyc10g005000.2.1	Os03g0648300 protein	0,35	1,27
solyc02g092600.2.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	-0,45	0,73
solyc02g090070.2.1	Phototropic-responsive NPH3 family protein	0,35	1,27
Zelle			
solyc11g071730.1.1	Kinesin-like protein	0,36	1,28
solyc03g120810.2.1	BY-inesin-like protein 10	0,32	1,25
solyc09g042740.2.1	Formin 3	0,38	1,31
solyc09g007360.2.1	Interactor of constitutive active ROPs 3	0,35	1,28
solyc10g084550.1.1	Ankyrin-repeat protein	0,34	1,27
solyc10g007720.2.1	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 5	0,34	1,27
Entwicklung			
solyc01g095140.2.1	Late embryogenesis abundant protein	-0,40	0,76
solyc02g094190.2.1	Nodulin family protein	0,33	1,26
solyc07g055950.2.1	Meiosis 5	0,37	1,29
solyc07g017760.1.1	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0,38	1,30
Transport			
solyc08g005980.2.1	AT4G35080-like protein	0,33	1,25
solyc08g077170.2.1	Peptide transporter-like protein	0,36	1,29

solyc08g007060.2.1	Peptide transporter-like protein	-0,50	0,71
solyc02g087410.2.1	Lipid A export ATP-binding/permease protein msbA	0,32	1,25
solyc07g066110.1.1	Pentatricopeptide repeat-containing protein	0,40	1,32
Nicht zugewiesen			
solyc03g115690.1.1	Genomic DNA chromosome 5 P1 clone MFB13	0,34	1,26
solyc07g054310.1.1	Gty37 protein	0,35	1,28
solyc03g044020.2.1	Condensin-2 complex subunit G2	0,33	1,25
solyc03g062700.2.1	Binding protein	0,44	1,36
solyc09g089510.2.1	Proteinase inhibitor I	-0,50	0,71
solyc02g055460.1.1	Disulfide-isomerase A3	0,32	1,25
solyc01g109090.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	-0,47	0,72
solyc02g083610.2.1	BZIP transcription factor	0,40	1,32
solyc06g024210.1.1	TO54-2	-0,46	0,73
solyc06g076700.1.1	UPF0503 protein At3g09070, chloroplastic	0,38	1,30
solyc08g078030.2.1	Hydroxycinnamoyl CoA shikimate/quinic acid hydroxycinnamoyltransferase	0,36	1,28
solyc08g080090.2.1	Senescence-inducible chloroplast stay-green protein 2	-0,43	0,74
solyc07g005470.2.1	Reticulon-like protein B21	0,48	1,39
solyc03g113680.2.1	Microtubule-associated protein TORTIFOLIA1	0,33	1,26
solyc02g063230.1.1	At1g67050	0,32	1,25
solyc01g107340.2.1	PAPA-1-like conserved region family protein expressed	0,37	1,29
solyc01g007730.2.1	ORF91	-0,48	0,72
solyc03g033510.2.1	Armadillo/beta-catenin repeat family protein	0,38	1,30
solyc06g069000.2.1	Uncharacterized GPI-anchored protein At4g28100	0,34	1,27

VI.3.6 Bestimmung der Bindungseigenschaften des Sand-Seramis-Gemisches

Tabelle VI-8: Bestimmung der Bindungseigenschaft des Sand-Seramis-Gemisches. pF: dekadischer Logarithmus des Betrags der Bodenwasserspannung in Hektopascal. pF 4,2 entspricht dem permanenten Welkepunkt (PWP). Zwischen pF 1,8-pF 4,2 ist das von der Pflanze nutzbare Wasser gebunden.

pF	Wassergehalt Vol [%]
1,5	42,2
1,8	35,8
2,5	22,9
4,2	4,74
TF	1,00

Tabelle VI-9: Wassergehalt Vol [%] des Sand-Seramis-Gemisches bei der Ernte nach fünfwöchiger Symbiose mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz Die Mittelwerte ergeben sich aus einem Replikat mit jeweils acht Pflanzen pro Behandlungsgruppe. Angegeben sind die Standardabweichungen der biologischen Replikate. Signifikanzen wurden mit dem Student's-t-Test berechnet: Fett, $p < 0,05$

Wassergehalt Vol [%]	
AMF	21,5±3,44
50 µM P	15,6±3,65
1000 µM P	5,6±1,20

$p=0,006$

Publikationsliste

Fromm S, Göing J, Lorenz C, Peterhansel C, Braun HP (2016) Depletion of the "gamma-type carbonic anhydrase-like" subunits of complex I affects central mitochondrial metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics* **1857**: 60-71

Konferenzbeiträge

26. Tagung "Molekularbiologie der Pflanzen" in Dabringhausen (Februar 2013)

Poster: Regulation of Photosynthesis by arbuscular mycorrhiza

Second Doctoral Reseachers' Conference of GRK 1798 „Signaling at the Plant-Soil Interface“ in Goslar (September 2015)

Vortrag: Control of Photosynthesis and Respiration in arbuscular mycorrhiza symbiosis

The 12th Solanaceae Conference in Bordeaux (Oktober 2015)

Poster: Control of Photosynthesis and Respiration in arbuscular mycorrhiza symbiosis

Persönlicher Werdegang

Persönliche Angaben	
Name	Jennifer Göing
Geburtsdatum	05.September 1986
Geburtsort	Hannover
Familienstand	Ledig
Hochschulausbildung	
10/2012-08/2016	Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Botanik der Leibniz Universität Hannover (Promotion)
10/2010-09/2012	Master Studium „Pflanzenbiotechnologie“ an der Leibniz Universität Hannover
10/2007-09/2010	Bachelor Studium „Pflanzenbiotechnologie“ an der Leibniz Universität Hannover
Schulbildung	
1999-2007	Hölty-Gymnasium Wunstorf
1997-1999	Orientierungsstufe Süd Wunstorf
1993-1997	Grundschule in Bokeloh

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

Regulation der Photosynthese in *Solanum lycopersicum* durch die symbiotische Interaktion mit dem arbuskulären Mykorrhizapilz *Rhizophagus irregularis*

selbstständig 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.

(Jennifer Göing)