

**Erste Schritte zur Etablierung und Verbesserung  
von Transformationssystemen  
für wurzelbesiedelnde Pilze**

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

dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von

Daniela Rhody  
aus Schopfheim

Marburg/Lahn 2002

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

Erstgutachter: PD Dr. P. Franken

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. Thauer

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2003

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 1999 bis Dezember 2002 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg in der Abteilung Biochemie von Prof. Dr. R. Thauer und unter der Betreuung von PD Dr. P. Franken durchgeführt.

## **Erklärung**

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Erste Schritte zur Etablierung und Verbesserung von Transformationssystemen für wurzelbesiedelnde Pilze“ selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

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

Marburg, 12.12.2002

Daniela Rhody

Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht:

**Rhody, D.; Stommel, M.; Roeder, C.; Mann, P. und Franken, P. (in press).** Differential RNA accumulation of two beta-tubulin genes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* in press

Weitere Veröffentlichungen:

**Bütehorn, B.; Rhody, D. & Franken, P. (2000).** Isolation and characterisation of Pitef1 encoding the translation elongation factor EF-1 alpha of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biology* **2**, 687-692

**Franken, P.; Requena, N.; Bütehorn, B.; Krajinski, F.; Kuhn, G.; Lapopin, L.; Mann, P.; Rhody, D. und Stommel, M. (1999).** Molecular analysis of the arbuscular mycorrhiza symbiosis. *Arch. Acker-Pfl. Boden* **00**,1-16

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>I Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>II Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>III Material und Methoden</b>	<b>12</b>
1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
2. Standardpuffer und -lösungen, Kulturmedien und Düngelösung	12
3. Organismen und deren Kultivierung	16
3.1 Verwendete Organismen	16
3.2 Kultivierung und Infektion	17
4. Molekularbiologische Methoden	18
4.1 Vektoren und Banken	18
4.2 Oligonukleotide	19
4.3 Plasmide	20
4.4 Extraktion von Nukleinsäuren	20
4.5 Restriktionsverdau	21
4.6 Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Gelen	21
4.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
4.8 RT-PCR	22
4.9 Klonierung und Transformation in <i>Escherichia coli</i>	22
4.10 Herstellung von DIG-markierten Sonden und Southern Hybridisierung	22
4.11 Konstruktion und Screening einer Phagenbank	23
4.12 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)	23
4.13 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)	23
4.14 Transformation mit dem Biolistic® PDS 1000/He Particle Delivery System	24
4.15 Transformation mit <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	24
4.16 Analyse der potentiellen Transformanten	25
<b>IV Ergebnisse</b>	<b>26</b>
5. Der Promotor des Gens <i>Pitef 1</i> von <i>Piriformospora indica</i>	26
6. Konstruktion von Vektoren für die Transformation von <i>Piriformospora indica</i>	28
7. Transformation von <i>Piriformospora indica</i>	30
7.1 Bestimmung der MHK von Hygromycin	30
7.2 `Particle Bombardment`	30
7.3 <i>Agrobacterium</i> -vermittelte Transformation	32
8. Identifikation eines nahen Verwandten von <i>Piriformospora indica</i>	32
9. Transformationsexperimente mit dem Isolat 29830	36
10. Promotorsuche bei <i>Gigaspora rosea</i>	36
10.1 Expressionsanalyse des $\beta$ -Tubulin-Gens in <i>Gigaspora rosea</i> und <i>Glomus mosseae</i>	36
10.2 Charakterisierung eines cDNA-Fragmentes des <i>tef 1</i> -Gens von drei AM Pilzen	38
10.3 Expressionsanalyse des <i>tef 1</i> -Gens in <i>Gigaspora rosea</i> und <i>Glomus mosseae</i>	38
10.4 Durchsuchen einer genomischen Bank von <i>Gigaspora rosea</i> in Lambda DASH Phagen	39

10.5	Screening einer genomischen Bank von <i>Glomus mosseae</i> in Lambda DASH Phagen	39
11.	Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)	40
11.1	Phosphat	42
11.2	Schwermetalle	44
12.	Das Metallothionein-Gen von <i>Gigaspora rosea</i>	46
<b>V</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
<b>VI</b>	<b>Literatur</b>	<b>59</b>

## Abkürzungen

Amp	Ampicillin
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre ('complementary') DNA
CM	Komplett- ('complete') Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FDA	Fluoresceindiacetat
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kb	Kilo-Basenpaare
LB	Luria-Bertani-Medium
PCR	Polymerasekettenreaktion ('polymerase chain reaction')
RACE	'rapid amplification of cDNA ends'
RNase	Ribonuklease
SDS	'sodium dodecyl sulfate'
SMART™	'switching mechanism at 5' end of RNA template'
SSC	'saline sodium citrate'
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktosid

# I Zusammenfassung

Die Entwicklung eines leistungsfähigen Transformationssystems ist ein wichtiger Schritt zur Analyse der molekularen Grundlage der Symbiose zwischen Pilzen und Pflanzen. So kann durch die Expression eines Markergens, wie dem GFP, die Infektion des Pilzes *in vivo* verfolgt werden. Außerdem ist es möglich die Funktionen von bisher unbekannt Genen zu untersuchen und positive Eigenschaften der Pilze durch Überexpression bestimmter Gene zu verbessern. In dieser Arbeit sollte ein Transformationssystem für *Piriformospora indica* etabliert werden. Dieser Pilz besiedelt eine große Anzahl Pflanzen verschiedenster Gattungen und ist unter anderem zur Ausbildung einer funktionellen Orchideenmykorrhiza befähigt. Mit der Isolierung der vollständigen Promotorsequenz des Gens für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  aus *P. indica* war es möglich, Vektoren zu konstruieren, in denen Markergene wie das GFP oder die Hygromycin-Phosphotransferase unter der Kontrolle dieses Promotors stehen. Die Versuche, diese Konstrukte über verschiedene Methoden, wie 'Particle Bombardment' und *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, in den Pilz zu transformieren, scheiterten jedoch. Auf der Suche nach einem besser transformierbaren nahen Verwandten dieses Pilzes wurde das Isolat 29830, mit großer phylogenetischer Nähe zur Familie der *Sebacinaceae*, als nächster Verwandter von *P. indica* identifiziert. Auch dieses Isolat ließ sich mit den verwendeten Methoden nicht transformieren.

Für Vertreter der arbuskulären Mykorrhizapilze konnte bereits eine Transformation durch 'Particle Bombardment' erreicht werden. Allerdings werden die verwendeten Markergene nur sehr schwach exprimiert, da bisher noch kein homologer, konstitutiv aktiver Promotor isoliert werden konnte. In dieser Arbeit wurde die Expressionsstärke der in Frage kommender Gene für das  $\beta$ -Tubulin und den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Glomus mosseae* und *Gigaspora rosea* untersucht und erste Schritte zur Isolierung der Promotorsequenz unternommen. Darüber hinaus wurden in zwei cDNA-Banken aus extraradikulären Hyphen von *Glomus intraradices* Transkripte isoliert, die eine Rolle bei der verbesserten Phosphatnahrung der Pflanze, und der durch die Pilze vermittelten Resistenz gegen Schwermetallbelastung spielen. Die so identifizierten Transkripte könnten durch Überexpression in den Pilzen deren positive Eigenschaften verbessern.

## II Einleitung

In ihrer natürlichen Umgebung leben Pflanzen, wie alle Lebewesen, immer mit einer Vielzahl anderer Organismen zusammen. Besonders im Wurzelbereich gibt es eine ganze Reihe von miteinander verflochtenen Wechselwirkungen, an denen sehr häufig Bodenpilze beteiligt sind. Man geht davon aus, dass bisher mit ca. 5 % nur ein Bruchteil der etwa 1,5 Millionen auf der Erde lebenden Pilze charakterisiert und beschrieben ist (Hawksworth & Rossman, 1997). Einen ähnlichen Prozentsatz kann man für Pilzarten in der Rhizosphäre annehmen. Bis zur vollständigen Aufklärung der Zusammenhänge in diesem Ökosystem ist es folglich noch ein weiter Weg. Die Interaktionen auf und in der Wurzel können eine positive, neutrale oder negative Wirkung auf die beteiligten Organismen haben. Viele Pilze profitieren als Kommensalisten von den von der Pflanze abgegebenen Wurzelexsudaten, ohne direkten Einfluss auf das Wachstum der Pflanze zu nehmen. Im Falle der Besiedlung von Pflanzen durch Pilze gibt es als Extreme die pathogene und die symbiontische Wechselwirkung. Pathogene Pilze rufen bei der Kolonisierung einer Pflanzenwurzel Krankheiten hervor, die zum Teil drastische Ausmaße bis hin zum Absterben der Pflanze haben können. Die prominentesten Beispiele sind hier die durch verschiedene Pilze hervorgerufenen Wurzelfäulen oder auch die Umfallkrankheit, die in der Landwirtschaft zu nicht unerheblichen Ernteverlusten führen (Weber, 1993).

Im Gegensatz dazu steht als positive Interaktion die Mykorrhizasymbiose. Fast alle Pflanzenarten gehen diese Wechselwirkung mit unterschiedlichen Vertretern der Pilzreiche ein. Sie ist für beide Partner von Vorteil und für den pilzlichen Partner in einigen Fällen sogar unerlässlich zur Vollendung des Lebenszyklus, also aus Sicht des Pilzes eine obligate Symbiose. Man kann davon ausgehen, dass die ausgebildete Mykorrhiza und nicht die unkolonisierte Pflanzenwurzel das Organ der Stoffaufnahme aus dem Boden ist. Obwohl die erste Beschreibung der Symbiose schon im Jahr 1885 datiert (Frank, 1885), rückt dieser Umstand erst in jüngerer Zeit verstärkt in den Fokus der Untersuchungen zur Physiologie von Pflanzen. Man unterscheidet nach den beteiligten Partnern verschiedene Formen der Mykorrhiza, die sich auch durch unterschiedliche symbiontische Strukturen auszeichnen. Allen gemeinsam ist die Tatsache, dass die Pilze ausschließlich den Wurzelbereich besiedeln und dort niemals in den Zentralzylinder eindringen.

Wenn man allgemein von Pilzen spricht, wird oft zuerst an die Hutpilze des Waldes gedacht. Diese Pilze gehören meist zu den Holobasidiomycota oder unitunikaten Ascomycota und sind mit den holzigen Angio- und Gymnospermen vergesellschaftet. Die Pilze besiedeln die Cortextbereiche der Wurzel interzellulär, dringen aber niemals in die pflanzlichen Zellen ein, weshalb man von einer **Ektomykorrhiza** spricht. Die symbiontische Struktur ist das Hartigsche Netz, ein Hyphenmantel im Innern der Wurzel. Hier findet der Austausch von Nährstoffen statt. Die Pilze versorgen die Pflanzen vornehmlich mit Stickstoffverbindungen, aber auch mit anderen Mineralstoffen. Im Gegenzug erhalten sie von der Pflanze Kohlenstoffverbindungen aus der Photoassimilation (Smith & Read, 1997). Mitglieder der Familie Ericaceae gehen in der **erikoiden Mykorrhiza** eine Symbiose mit bestimmten Ascomyceten ein. Die Pilze bilden in der Rhizodermis intrazelluläre Hyphenknäule und liefern Mineralstoffe an die Pflanze, die sie im Boden solubilisieren (Smith & Read, 1997). Einen Sonderfall stellt die **orchidoide Mykorrhiza** dar. Die beteiligten Basidiomyceten erhalten nicht, wie bei den anderen Mykorrhizaformen, Kohlenstoffverbindungen von der Pflanze, sondern geben sie im Gegenteil über intrazelluläre Hyphenknäule an die in jungen Entwicklungsstadien chlorophylllosen Orchideen ab. Die Pilze gehören zur Rhizoctonia-Formgattung und können auf anderen Pflanzen als Pathogene agieren (Pope & Carter, 2001). Sie sind entweder in der Lage, als Saprophyten Nährstoffe aufzunehmen, oder besiedeln eine photosynthetisch aktive Pflanze, von der sie Assimilate erhalten (Selosse et al., 2002). Die Orchidee lebt in diesem Stadium parasitisch vom Pilz, bildet also keine echte Symbiose. Hier wird sehr deutlich, dass die Übergänge der Formen des Zusammenlebens oft fließend sind (Smith & Read, 1997).

Die häufigste terrestrische Symbiose ist die **arbuskuläre Mykorrhiza (AM)**. Etwa 80% aller vaskulären Landpflanzen der unterschiedlichsten phylogenetischen Gruppen gehen diese Wechselwirkung ein (Newman & Reddell, 1987). Sie ist nicht nur weit verbreitet, sondern auch eine sehr alte Symbiose, deren erstes Auftreten in fossilen Funden aus der Zeit des Devons vor etwa 400 - 460 Mio. Jahren datiert (Stubblefield et al., 1987) (Pirozynski & Dalpé, 1989). Da die Pflanzen in dieser Ära begannen, das Land als Lebensraum zu erobern, wird eine entscheidende Beteiligung der Pilze an diesem Prozess diskutiert (Pirozynski & D.W., 1975). Die beteiligten pilzlichen Partner gehören alle in das Reich der Glomeromycota, einem eigenständigen Zweig der Eumycota neben den Basidio-, Asco- und Zygomycota (Schüssler et al., 2001). Die Pilze besiedeln die Pflanzenwurzeln inter- und intrazellulär und bilden in den Pflanzenzellen bäumchenartige Verzweigungen der Hyphen aus. Diese

charakteristischen symbiontischen Strukturen sind die Arbuskel. Sie sind wahrscheinlich die aktivsten Austauschplätze für Nährstoffe (Gianinazzi-Pearson, 1996). Die Pflanze gibt dabei Photoassimilate an den Pilz ab (Pfeffer et al., 1999) und erhält dafür Mineralstoffe, hauptsächlich Phosphat (Harrison, 1999; Saito, 2000), aber auch Stickstoffverbindungen (Hawkins et al., 2000). Die Ernährung ist jedoch nicht der einzige wichtige Aspekt dieser Symbiose. Der Pilz beeinflusst auch die Abwehrreaktion der Pflanze gegen andere pathogene Pilze (Blee & Anderson, 2000; Bodker et al., 1998; Pozo et al., 2002) und greift durch die Produktion von Phytohormonen in die Physiologie und das Wachstum der Pflanze ein (Barker & Tagu, 2000; Ludwig-Müller, 2000). Weiterhin kann der Pilz die Pflanze vor schädlichen Umwelteinflüssen wie Trockenheit (Auge, 2001; Ruiz-Lozano et al., 2001) oder Schwermetallen schützen (Hall, 2002; Rivera-Becerril et al., 2002).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Pilzen gearbeitet, die eine arbuskuläre Mykorrhiza oder eine Ekto- und Orchideenmykorrhiza ausbilden können. *Glomus mosseae*, *Gigaspora rosea*, *Gigaspora margarita* und *Glomus intraradices* sind arbuskuläre Mykorrhizapilze. Sie sind die Vertreter ihres Reiches, für die momentan die meisten Daten molekularbiologischer Untersuchungen vorliegen (Franken et al., 1997; Franken & Requena, 2001; Requena et al., 2002). *Piriformospora indica* ist ein Basidiomycet und besiedelt ein weites Spektrum verschiedener Pflanzen (Varma et al., 1999; Verma et al., 1998). Unter anderem ist er zur Ausbildung einer funktionellen Orchideenmykorrhiza befähigt (Blechert et al., 1998). Bei der Besiedlung der Wurzeln von Maispflanzen und *Medicago truncatula* konnte ein nekrotropher Charakter festgestellt werden, obwohl das Wachstum der Pflanzen durch den Pilz gefördert wurde (Rhody, 1999). Alle Untersuchungen dazu wurden in Topfkulturen durchgeführt, spiegeln also nicht die natürlichen Verhältnisse wider. Es ist denkbar, dass der Pilz unter anderen Umweltbedingungen oder auf Pflanzen aus der natürlichen Umgebung (Indien) durchaus auch als Pathogen agieren kann.

Zur Analyse der molekularen Hintergründe dieser Symbiosen ist ein Transformationssystem für die Pilze von großer Wichtigkeit. Nur so können Gene, die in der Wechselwirkung eine Rolle spielen, bezüglich ihrer Funktion eindeutig charakterisiert werden. Für einige arbuskuläre Mykorrhizapilze konnte eine Transformation von Sporen durch 'Particle Bombardment' erreicht werden (Forbes et al., 1998; Harrier et al., 2002). Die Expression des verwendeten Markergens ist allerdings nur relativ schwach, was an dem verwendeten Promotor für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus *Aspergillus nidulans* liegen könnte. Die Verwendung heterologer Promotoren in Pilzen ist oft problematisch, da die

enthaltenen Motive nicht erkannt werden. Bisher ist nur wenig über die Promotorstrukturen bei AM Pilzen bekannt (Harrier, 2001), die Isolierung der Sequenz eines starken und konstitutiv aktiven Promotors wäre also wichtig zur Verbesserung des bestehenden Systems. Gene, deren Promotoren bereits erfolgreich für Transformationsexperimente verwendet wurden, sind die Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (Christiansen et al., 1997; Rohel et al., 2001), das Aktin (Matheucci et al., 1995; Schilde et al., 2001), das  $\beta$ -Tubulin (Cummings et al., 1999; Hoyt et al., 2000) und der Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  (Burmester, 1995; Kitamoto et al., 1998). In dieser Arbeit wurde die Expression der beiden letztgenannten Gene in den unterschiedlichen Differenzierungsstadien des Pilzes untersucht und erste Schritte zur Isolierung der Promotorsequenzen unternommen.

Für *P. indica* wurde bereits von Britta Bütchorn das Gen für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  ausgewählt und charakterisiert (Bütchorn et al., 2000). Da jedoch nur 492 bp der Promotorregion isoliert werden konnten, sollte in dieser Arbeit der Bereich erweitert werden, um alle, eventuell für die Promotorstärke wichtigen, Elemente zu berücksichtigen. Die volle Promotorsequenz sollte dann die konstitutive Expression von Markergenen ermöglichen. Die Einschleusung der Vektoren in den Pilz setzt allerdings ein funktionstüchtiges Transformationssystem voraus. Für eine ganze Reihe von Pilzen ist die Transformation von Protoplasten über Elektroporation oder Polyethylenglycol erfolgreich angewendet worden (Fincham, 1989). Erste Versuche zur Anwendung der Protoplastierung bei *P. indica* wurden von Britta Bütchorn unternommen. Die Erzeugung von Protoplasten war zwar möglich, sie waren aber nicht in der Lage, durch den Aufbau einer neuen Zellwand wieder auszukeimen. Zur Transformation filamentöser Pilze stehen als weitere Methoden, das 'Particle Bombardment' und die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation zur Verfügung, die im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden.

Das 'Particle Bombardment' wird seit Ende der 80er Jahre erfolgreich genutzt, um DNA in Organismen einzubringen (Klein et al., 1987). Es ist nicht, wie die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation, an eine bestimmte Organismengruppe gebunden, sondern kann für Pflanzen, Tiere und Mikroorganismen eingesetzt werden (Armaleo et al., 1990; Johnston, 1990). Die Methode beruht auf der starken Beschleunigung DNA-beschichteter Gold- oder Wolframpartikel zum Beispiel durch chemische Explosion, einen definierten Heliumdruck oder die Vaporisation eines Wassertropfen durch elektrische Entladung (Sanford et al., 1987). Die durch die folgende Schockwelle auf sehr hohe Geschwindigkeiten beschleunigten Partikel treffen dann auf die Zellen auf. Durch den Druck der hohen Geschwindigkeit werden die Zellwände und Membranen penetriert und die Partikel gelangen so in das Cytoplasma. Die

DNA wird durch die zellulären wässrigen Flüssigkeiten von den Partikeln gelöst und dann ins Genom integriert. Die Methode wurde unter anderem bereits erfolgreich bei folgenden Pilzen verwendet: *Botryotinia fuckeliana* (Hilber et al., 1994), *Paxillus involutus* (Bills et al., 1995), *Aspergillus nidulans* (Herzog et al., 1996), *Laccaria bicolor* (Bills et al., 1999) und *Puccinia graminis* (Schillberg et al., 2000). Die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation wird ebenfalls schon seit den 80er Jahren bei Pflanzen eingesetzt (Fraley et al., 1983; Hooykaas & Schilperoort, 1992) und wurde später auch für Pilze adaptiert (Covert et al., 2001) (Pardo et al., 2002). Sie beruht auf der natürlichen Fähigkeit verschiedener *Agrobacterium*-Stämme, die so genannte Transfer-DNA (T-DNA) in eine Pflanze einzuschleusen und stabil in das pflanzliche Genom zu integrieren. Durch die vom „tumor inducing“(Ti-) Plasmid kodierten Cytokinine (Akiyoshi et al., 1984) und Auxine (Thomashow et al., 1984) wird die Bildung eines Tumors induziert. Diese Tumor-Zellen produzieren dann wiederum Opine, die exklusiv von den Agrobakterien verwertet werden können (de la Riva et al., 1998). So verschafft sich das Bakterium Zugang zu einer effizienten Nahrungsquelle, die ausschließlich von ihm selbst genutzt werden kann. In der Gentechnik wird die T-DNA durch die gewünschte zu transformierende DNA ersetzt und dann vom Agrobakterium in die Pflanze eingebracht. Die Integration ins Genom erfolgt über unspezifische Rekombination der „right“- und „left border“-Sequenzen mit der pflanzlichen DNA (Caplan et al., 1985; Mayerhofer et al., 1991). Die Anwendung dieser Methode zur Transformation von Pilzen erfordert die Zugabe pflanzlicher Signalstoffe, um die Bakterien gleichsam zu überlisten. Phenolische Substanzen, wie das Acetosyringon, werden von verwundeten Pflanzen ausgeschüttet und veranlassen die Bakterien zur Infektion der Pflanze über diese Wundstelle (Melchers et al., 1989). Gibt man diese Substanz zu einer Pilzkultur, kann die Aktivierung der Virulenz zu einer Infektion führen (Mullins & Kang, 2001). Seit der ersten erfolgreichen Transformation von Hefe (Bundock et al., 1995) wurde die Methode auch für filamentöse Pilze verwendet (Degroot et al., 1998; Rho et al., 2001).

Ist ein Transformationssystem erstmal etabliert, ergeben sich neben der Erforschung der Grundlagen der Symbiosen auch anwendungsorientierte Möglichkeiten. So könnte die Überexpression von Genen, die in den positiven Eigenschaften der Pilze eine Rolle spielen, zu einer Verbesserung der entsprechenden Stoffwechsellistung führen, wie es in der Industrie schon zur Produktion von Enzymen vielfach eingesetzt wird (Gordon et al., 2001). Damit ergäbe sich in der Landwirtschaft die Möglichkeit, Pflanzen mit den verbesserten Pilzen zu inokulieren, und sie so zum Beispiel resistenter gegen Schwermetalle zu machen oder eine effizientere Aufnahme von Phosphat und Nitrat aus dem Boden zu erreichen. Ein

solcher Ansatz wird bereits im Fall der Kontrolle parasitischer Nematoden durch verbesserte Nematoden-fangende Pilze verfolgt (Ahman et al., 2002).

Schwermetalle wirken in Organismen meist als Enzymgifte oder durch die Induktion von oxidativem Stress (Schutzendubel & Polle, 2002). Sie können in Metalloproteinen den Platz des korrekten Metall-Ions einnehmen und so die Funktion blockieren oder durch eine Bindung an Sulfidgruppen die Struktur von Proteinen verändern. Auch durch die Bindung weiterer funktioneller Gruppen wie Phosphat- und Carboxyl-Gruppen sind deren Inaktivierung und damit verbundene Schädigungen möglich (Schlegel, 1992). Diese Schäden werden nicht nur von den nicht essentiellen Schwermetallen wie Cadmium, Blei und Quecksilber hervorgerufen, sondern auch von Metallen, die in geringerer Konzentration als essentielle Spurenelemente wichtig sind, wie Kupfer und Zink. Dem Organismus stehen wiederum verschiedene Möglichkeiten der Detoxifikation zur Verfügung. Besonders in Mykorrhizapilzen beobachtet man eine Akkumulierung der Schwermetalle in den Hyphen, wo sie in gebundener Form abgelagert werden (Kaldorf et al., 1999) oder an die äußeren Wände adsorbieren (Galli et al., 1994). Auf diese Weise wird der pflanzliche Partner durch diese Filterwirkung der Pilze geschützt (Karagiannidis & Nikolaou, 2000). Es konnte mit dem Metallothionein bereits ein Enzym, das Metallionen binden kann, in arbuskulären Mykorrhizapilzen identifiziert werden (Lanfranco et al., 2002). Ein weiteres Transkript mit Homologie zu Metallothioneinen wurde in einer cDNA-Bank von *G. rosea* gefunden (Stommel et al., 2001) und die vollständige Sequenz der kodierenden Region im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt. Zur Isolierung weiterer Transkripte wurde im Rahmen dieser Arbeit eine cDNA-Bank hergestellt, die für unter Schwermetall-Belastung vermehrt exprimierte Gene angereichert ist. Dazu wurde der AM Pilz *Glomus intraradices* in einem *in vitro*-System mit *Agrobacterium rhizogenes*-transformierten Karottenwurzeln ('hairy roots') angezogen und die extraradikulären Hyphen nach Inkubation mit Cadmium-, Kupfer- und Zinkchlorid geerntet. Das *in vitro*-System ermöglicht die Ernte relativ großer Mengen sauberer und intakter Hyphen des Pilzes, was wegen der obligaten Biotrophie in anderen Systemen nicht einfach ist (Fortin et al., 2002). Die erste erfolgreiche Mykorrhizierung von *Convolvulus sepium* 'hairy roots' mit *Glomus mosseae* gelang Mugnier und Mosse (Mugnier & Mosse, 1987). Bécard und Fortin erreichten in dem auch hier verwendeten System mit Karottenwurzeln und *Glomus intraradices* die Sporulation und damit den vollständigen Ablauf des Lebenszyklus des Pilzes *in vitro* (Becard & Fortin, 1988).

In einem analogen Ansatz zur Schwermetallbelastung wurde der Kultur eine hohe oder sehr geringe Menge Phosphat angeboten, um Transkripte zu isolieren, die unter Phosphatmangel-

Bedingungen verstärkt exprimiert werden. Zur Aufnahme und dem Transport des Phosphats in den Hyphen wurden auf physiologischer Ebene schon eine ganze Reihe an Untersuchungen durchgeführt (George et al., 1995; Jakobsen et al., 2001; Schweiger et al., 1999; Smith et al., 2001). Auch auf molekularbiologischer Ebene konnte bereits von Harrison *et al.* ein pilzlicher Hochaffinitäts-Phosphattransporter kloniert werden, der für die Aufnahme von Phosphat aus dem Boden verantwortlich ist (Harrison & Van Buuren, 1995). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass weitere Transporter involviert sind, die andere Eigenschaften bezüglich ihrer Regulationsmechanismen und Affinitäten haben. Die Weitergabe des Phosphats an die Pflanze erfolgt wahrscheinlich über die tubulär gestalteten Vakuolen in Form von Polyphosphaten, die durch Enzyme auf- und wieder abgebaut werden müssen (Ashford & Allaway, 2002; Ezawa et al., 2001; Uetake et al., 2002). Zur Aufklärung des Weges der Phosphataufnahme und -weitergabe wäre die Identifikation der beteiligten Gene hilfreich, deren Überexpression in der Zukunft die Leistung der AM Pilze verbessern könnte.

### III Material und Methoden

#### 1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, Biochemikalien und Reagenzien wurden von den Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), AppliChem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Biorad Laboratories (München), Difco Laboratories (Detroit, MI, USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) und Stratagene (Amsterdam, Niederlande) bezogen. Die Enzyme zur Modifikation von DNA und RNA lieferten die Firmen Amersham Biosciences (Freiburg), Gibco BRL Life Technologies (Karlsruhe), Invitrogen (Karlsruhe), New England Biolabs (Frankfurt) und Promega (Heidelberg). Die Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Biozym (Hess. Oldendorf), Kobe (Marburg) und Sarstedt (Nürnberg), die Autoradiographiefilme von Fuji (Tokio, Japan) und die Nylonmembranen Hybond N+ von Amersham Biosciences. Die Oligonukleotidsynthesen führten Metabion (Martinsried) oder MWG Biotech (Ebersberg) durch. Die Sequenzierungen erfolgten durch MediGenomix (Martinsried) oder MWG Biotech. Abweichungen und Ergänzungen dieser Angaben sind im Text gesondert vermerkt.

#### 2. Standardpuffer und -lösungen, Kulturmedien und Düngelösung

##### Puffer und Lösungen:

TAE	40 mM Tris-Acetat pH 8,0 1 mM EDTA
TE	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
20× SSC	0,4 M Natriumcitrat pH 7,0 4 M NaCl
Standardhybridisierungspuffer	5× SSC 1% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) 0,1% N-Lauroylsarcosin, Natrium-Salz 0,02% SDS

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
Neutralisationslösung (für Southern Blot-Hybridisierungen)	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 3 M NaCl
Neutralisationslösung (für Plaque-Hybridisierungen)	0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl
2× Waschpuffer	2× SSC 0,1% SDS
0,5× Waschpuffer	0,5× SSC 0,1% SDS
SM-Puffer	5,8 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O 50 ml Tris-HCl pH 7,5 5 ml 1% Gelatine
Blaumarker für Agarosegele	30% Glycerin 1 mM EDTA 0,25% Bromphenol-Blau

**Kulturmedien und Düngelösung** (alle Angaben pro Liter, für die Herstellung von Festmedien wurden 1,5% Agar zugesetzt):

LB	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl
LB-Glc	LB mit 1 g Glucose
Topagar	LB mit 0,8% Agarose
TY	5 g Trypton 3 g Hefeextrakt 0,9 g CaCl <sub>2</sub>
Induktionsmedium (IM)	0,8 ml 1,25 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 4,8 20 ml Mg-NaCl-Lösung (30 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O, 15 g NaCl) 1 ml 1% CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O 10 ml 0,01% FeSO <sub>4</sub> 2,5 ml 20% NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 10 ml 50% Glycerin

	40 ml 1M MES pH 5,5 5 ml Spurenelementlösung 5 mM Glucose (1 ml 0,2 M Acetosyringon in DMSO)
Spurenelementlösung für IM	100 mg $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ 100 mg $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$ 100 mg $H_3BO_3$ 100 mg $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ 100 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$
CM	20 g Glucose 2 g Pepton 1 g Hefeextrakt 1 g Casaminsäuren 50 ml 20× Salzlösung 1 ml Spurenelementlösung 1 ml Vitaminlösung
20× Salzlösung	120 g $NaNO_3$ 30,4 g $KH_2PO_4$ 10,4 g KCl 10,4 g $MgSO_4$
Spurenelementlösung für CM	2,2 g $ZnSO_4$ 1,1 g $H_3BO_3$ 0,5 g $MnCl_2$ 0,5 g $FeSO_4$ 0,18 g $CoCl_2$ 0,18 g $CuSO_4$ 0,11 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ 5,0 g $Na_4EDTA$ ad 80 ml $H_2O$
Vitaminlösung	Biotin Pyridoxin-HCl Thiamin Riboflavin p-Aminobenzoessäure Nicotinsäureamid Je 0,01% (w/v)
Malzmedium	10 g Malzextrakt 4 g Glucose 4 g Hefeextrakt
M-Medium	25 ml Makroelemente 1 ml Mikroelemente 5 ml Calcium 1 ml Phosphat 5 ml Eisen-EDTA

	10 ml Vitamine
	10 g Saccharose
	3 g Phytigel (für Platten)
	pH 5,5
Makroelemente	3,2 g KNO <sub>3</sub>
	29,2 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	2,6 g KCl
Mikroelemente	6 g MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
	1,5 g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
	2,65 g ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	0,75 g KJ
	0,0024 g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
	0,13 g CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O
Calcium	57,6 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Phosphat	4,8 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Eisen-EDTA	1,6 g NaFe-EDTA
Vitamine	0,3 g Glycin
	5 g Myo-Inositol
	50 mg Nicotinsäure
	10 mg Pyridoxin-HCl
	10 mg Thiamin-HCl
Long Ashton Lösung:	0,808 g KNO <sub>3</sub>
	1,888 g Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
	0,0208 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O
	0,368 g MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	0,022 g NaFe-EDTA
	1% (v/v) Lösung A
	0,1% (v/v) Lösung B
Lösung A (Mikroelemente)	2,23 g MnSO <sub>4</sub> · 4 H <sub>2</sub> O
	0,25 g CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O
	0,29 g ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O
	3,1 g H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>
	5,9 g NaCl
Lösung B	0,88 g (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O

### 3. Organismen und deren Kultivierung

#### 3.1 Verwendete Organismen

Organismus	Stamm, Isolat, Kultivar	Herkunft, Referenz
<i>Piriformospora indica</i> (Verma, Varma, Kost, Rexer & Franken)	DSM 11827	(Verma, et al., 1998)
Isolat 29830	DAR 29830	(Williams, 1985), Dr. Karl-Heinz Rexer, Universität Marburg
<i>Sebacina vermifera</i>	DAR 57283	Dr. Karl-Heinz Rexer, Universität Marburg
<i>Sebacina vermifera</i>	305839	Dr. Karl-Heinz Rexer, Universität Marburg
<i>Tulasnella calospora</i>		Dr. Karl-Heinz Rexer, Universität Marburg
<i>Rhizoctonia globularis</i>		Dr. Karl-Heinz Rexer, Universität Marburg
<i>Gigaspora rosea</i> (Nicolson & Schenck)	BEG 9	Banque européenne des Glomales, INRA, Dijon, Frankreich
<i>Glomus mosseae</i> (Nicolson & Gerdemann)	BEG 12	Banque européenne des Glomales, INRA Dijon, Frankreich
<i>Glomus intraradices</i> (Schenck & Smith)	DAOM 197198 (Stock Center Ottawa, Kanada)	G. Becard, CNRS Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich
<i>Zea mays</i> L.	<i>var. gracillima minima</i>	Weigelt & Co, Erfurter Samenzucht
<i>Medicago truncatula</i> Gaertn.	Jemalong 5	Andreas Perlick, Universität Bielefeld
<i>Daucus carota</i> L.	transformiert mit <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	G. Becard, CNRS Université Paul Sabatier, Toulouse, Frankreich
<i>Escherichia coli</i>	XL1-Blue	Stratagene
<i>Escherichia coli</i>	MRA, MRA(P2)	Stratagene
<i>Escherichia coli</i>	TOP 10 F <sup>+</sup> oder DH 5 $\alpha$	Invitrogen
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV 3101	Dr. Bettina Hause, Universität Halle

## **3.2 Kultivierung und Infektion**

### **3.2.1 Kultivierung von *Piriformospora indica* und der anderen Basidiomyceten**

Die Pilze wurden auf CM- oder Malzextrakt-Agar angezogen und durch Übersetzen einer ca. 0,5 mm großen Agarscheibe auf neue Platten überimpft. Zur Kultivierung in Flüssigmedium wurden die vegetativen Sporen einer Agarplatte abgeschwemmt und als Inokulum verwendet. Die Kultur wurde unter leichtem Schütteln bei etwa 100 rpm inkubiert. Die optimale Wachstumstemperatur lag für *P. indica* bei 37° C und für die anderen Pilze bei 30° C.

### **3.2.2 Anzucht und Inokulierung von *Medicago truncatula* und *Zea mays***

Die Samen beider Pflanzen wurden durch kurze Behandlung mit 70% Ethanol, zwei 15-minütigen Inkubationen in 3,5% Natriumhypochlorit und anschließendem Waschen in sterilem destilliertem Wasser oberflächensterilisiert. Die Keimung erfolgte auf Wasseragar in Petrischalen für ca. 3 Tage im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Keimlinge wurden dann in ein Substratgemisch aus Vermiculite und Terra Green oder Blähton gesetzt und mit dem entsprechenden Pilz inokuliert. Die Basidiomyceten wurden dafür in Flüssigkulturen angezogen und ein Gramm Myzel pro 400 ml Substrat eingesetzt. Die Mykorrhizierung erfolgte durch ein käuflich erwerbliches *Glomus mosseae*-Inokulum (Biorize, Dijon, Frankreich), es wurden 40 g Inokulum pro 400 ml Substrat verwendet.

### **3.2.3 Ernte der Pflanzen und Auswertung der Wachstumsparameter**

Nach vier oder fünf Wochen wurden die Pflanzen der Wachstumsexperimente geerntet. Die Wurzeln wurden vom Substrat befreit, der Spross abgeschnitten und beides getrennt gewogen. Die Wurzel wurde in 1 cm lange Fragmente geschnitten und mit Fluoresceindiacetat gefärbt. Der Farbstoff musste zunächst in fluoreszenzfreiem Aceton in einer Konzentration von 1 mg/10 ml gelöst werden. Unmittelbar vor der Färbung erfolgte eine 1:10 Verdünnung dieser Lösung in Phosphat-Puffer (52,8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 21,12 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Die Wurzelfragmente wurden für etwa eine halbe Stunde in dieser Lösung inkubiert, fünfmal in Phosphatpuffer gewaschen und dann sofort im Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 340 nm ausgewertet.

### **3.2.4 Kultivierung und Ernte der *in vitro* Wurzelkulturen**

Die in dieser Arbeit verwendeten dualen Kulturen von *Agrobacterium rhizogenes*-transformierten *Daucus carota*-Wurzeln und *Glomus intraradices* wurden von Herrn Prof. Guillaume Bécard (Toulouse) zur Verfügung gestellt und auf M-Medium kultiviert (Becard & Fortin, 1988). Für die Ernte von extraradikulärem Mycel von *G. intraradices* erfolgte die Anzucht auf geteilten Petrischalen, bei denen das Medium im Hyphenkompartiment nach ca.

vier Wochen ausgetauscht und durch flüssiges M-Medium ohne Saccharose ersetzt wurde (Sawaki & Saito, 2001). Bei diesem neuen Medium konnten dann die, je nach gewünschter Untersuchung nötigen Modifikationen vorgenommen werden. Nach weiteren zwei bis drei Wochen waren die Hyphen über die Barriere in das neue Medium gewachsen und konnten geerntet werden.

### 3.2.5 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht von *E. coli* erfolgte wie bei Sambrook et al. (1989) beschrieben auf LB-Medium, dem je nach Experiment Antibiotika, X-Gal oder IPTG zugesetzt wurden.

### 3.2.6 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Bakterien wurden für zwei Tage bei 28°C in TY-Medium, mit den zur Selektion eventuell benötigten Antibiotika inkubiert. Die Flüssigkulturen wurden wie bei *E. coli* auf Rollern oder Schütteltischen bei ca. 160 rpm angezogen.

## 4. Molekularbiologische Methoden

### 4.1 Vektoren und Banken

In dieser Arbeit wurden die folgenden Vektoren und Banken verwendet.

Name	Beschreibung	Referenz
TOPO pCR 2.1	PCR-Klonierungsvektor	Invitrogen
pGEM Teasy	PCR-Klonierungsvektor	Promega
pBluescript II KS(-)	Plasmidvektor	Stratagene
Lambda DASH	$\lambda$ -Phagenvektor	Stratagene
pGREEN	Binärer Plasmidvektor für Transformation mit <i>A. tumefaciens</i>	(Hellens et al., 2000)
<i>P. indica</i> genomische Bank	Genomische Bank in Lambda DASH	diese Arbeit
<i>G. rosea</i> genomische Bank	Genomische Bank in Lambda DASH	V. Gianinazzi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich
<i>G. mosseae</i> genomische Bank	Genomische Bank in Lambda DASH	V. Gianinazzi-Pearson, INRA, Dijon, Frankreich

## 4.2 Oligonukleotide

Die folgenden Oligonukleotide wurden für diese Arbeit verwendet.

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3'-Richtung)	Annealing-Temperatur (°C)	Referenz
ITS 1	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	55	(White et al., 1990)
ITS 4	CTC CGC TTA TTG ATA TGC T	55	(White, et al., 1990)
M 13 for	GTA AAA CGA CGG CCA G	58	Invitrogen
M 13 rev	CAG GAA ACA GCT ATG AC	58	Invitrogen
Met Giro 1	ATG TGT GAC GAT TGC AAA TGC GG	59	diese Arbeit
Met Giro 2	ACA TTT ACA AGC TCC TTG AGT GC	59	diese Arbeit
Metallo Giro 5'1	CTG TTT CAA TTT GCT TGT CGA CG	62	diese Arbeit
NEB-ATG	AGG GGA ATT CAC CAT GAA AAA GCC TGA ACT CAC C	64	diese Arbeit
NEB rev	TAC CGA GCT CGA ATT CAC TGG CC	64	diese Arbeit
SMART PCR Primer	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GT	60	BD Clontech
SMART Oligo II	AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTA CGC GGG	62	BD Clontech
T3 mod	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GGA AC	57	diese Arbeit
T7 mod	CTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG CC	57	diese Arbeit
Tef 5' 1	TCG AAG ATG CGG CCG CCC TTG TC	66	diese Arbeit
Tef 5' 2	TTC CGT CGA CGA CGT CGG ACT AC	66	diese Arbeit
Tef deg 1	ACT TGA T(CT)T ACA AGT G(CT)G GTG G	58	diese Arbeit
Tef deg 2	T(CT)T GAC C(AG)T CCT TGG A(AG)A TAC C	58	diese Arbeit
Tef DIG 1	TCA GCG GGC TGG TCA ACG TCG G	62	diese Arbeit
Tef DIG 2	TCG AAG ACG CCT TGT ACA AGA TCG	62	diese Arbeit
Tef Inv 1a	TTC GAT CTT GTA CAA GGC GTC TTC	61	diese Arbeit
Tef Prom 1	AGA TTT ATG TCA TGC TCG CAG TC	58	diese Arbeit
Tef Prom 2	TTT ACC CAT TTT TTA GTA TGA AAA AG	58	diese Arbeit
Tef Prom 2 ohne ATG	GAA AAA GAT GTG TGA GGG ACT TC	58	diese Arbeit
TUB II for	GAC CTT ATC AGT ACA TCA GTT G	58	(Rhody et al., in press)
TUB II rev	GGC AAA TCC GAC CAT AAA GAA A	58	(Rhody, et al., in press)
TUB I for	TTC CGA TGA GCA TGG TGT CGA CC	55	(Rhody, et al., in press)

TUB I rev	AGG TTG TGA TAC CGC TCA TAG C	55	(Rhody, et al., in press)
-----------	-------------------------------	----	------------------------------

### 4.3 Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Name	Beschreibung	Referenz
PNEB-Hyg ΔEco	Plasmidvektor für Transformation der Basidiomyceten	Prof. Michael Bölker, Universität Marburg
TOPO-GFP	TOPO pCR 2.1 mit sGFP in <i>Not</i> I-Schnittstelle	Dr. Reinhard Fischer, Universität Marburg
PiTef 1 Prom	1,6 kb Promotorregion von <i>P. indica</i> in TOPO	diese Arbeit
TOPO PiTef(P)::GFP	<i>Pitef</i> 1 Promotor vor sGFP-Gen in TOPO	diese Arbeit
pNEB PiTef(P)::Hyg	<i>Pitef</i> 1 Promotor vor Hygromycin-Phosphotransferase in pNEB-Hyg	diese Arbeit
pGREEN PiTef(P)::GFP	PiTef(P)::GFP-Kassette in pGREEN	diese Arbeit
pGREEN PiTef(P)::Hyg	PiTef(P)::Hyg-Kassette in pGREEN	diese Arbeit

### 4.4 Extraktion von Nukleinsäuren

#### 4.4.1 Extraktion von DNA

Die Isolierung von DNA erfolgte mit dem DNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen (Hilden). Für die Extraktion aus pilzlichem Material der Basidiomyceten wurde Mycel aus Flüssigkulturen abfiltriert, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und laut Angaben des Herstellers weiterverarbeitet. Für die DNA-Extraktion aus arbuskulären Mykorrhizapilzen wurden ca. 10000 Sporen in einem Eppendorf-Cup ohne Stickstoffzugabe gemörsert.

#### 4.4.2 Extraktion von RNA

Für die Extraktion von RNA aus Hyphen und Sporen der AM Pilze wurde das Material in einem Eppendorf-Cup ohne Zugabe von Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert und dann mit dem RNeasy Plant Mini Kit der Firma Qiagen extrahiert. Die mykorrhizierten Wurzeln wurden mit dem gleichen Kit verarbeitet, hier wurde jedoch das Material unter Zugabe von Stickstoff in einem Porzellanmörser zerkleinert.

#### **4.4.3 Extraktion von Plasmid-DNA**

Plasmid-DNA wurde durch alkalische Lyse nach einem Protokoll von Sambrook et al. (1989) extrahiert. Wurde hochreine Plasmid-DNA für die Transformationen der Pilze benötigt, erfolgte die Extraktion mit den Plasmid Midi Kits der Firmen Qiagen oder Macherey-Nagel (Düren).

#### **4.4.4 Extraktion von Phagen-DNA**

Zur Extraktion von Phagen-DNA wurden die Phage DNA Purification Kits der Firmen Qiagen und Stratagene nach Angaben der Hersteller benutzt.

#### **4.4.5 Konzentrationsbestimmung und Qualitätskontrolle**

Die Konzentration der DNA wurde durch photometrische Messung im Ultrospec III Photometer (Amersham Biosciences) bestimmt. Eine Absorption bei 260 nm von 1 entspricht dabei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml (Sambrook et al., 1989). Die Qualität und Konzentration der RNA wurde mit dem Lab Chip-System RNA 6000 Nano Kit (Agilent) im Bioanalyser 2100 gemessen.

#### **4.5 Restriktionsverdau**

Der Verdau von Plasmid-DNA erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit 5 bis 20 U des gewünschten Restriktionsenzym in dem entsprechenden Puffer des Herstellers. Die Inkubation erfolgte für ca. zwei Stunden bei der optimalen Reaktionstemperatur des Enzyms. Der komplette Verdau von genomischer DNA wurde über Nacht inkubiert.

#### **4.6 Gelelektrophorese und Aufreinigung von DNA aus Gelen**

Die Auftrennung von DNA erfolgte in 1-2% Agarosegelen in 0,5x TAE Puffer. Als Größenmarker wurden die 1 kb- und 100 bp-Leitern von Gibco BRL Life Technologies verwendet. Die DNA wurde in einem Ethidiumbromidbad angefärbt und unter UV-Licht (302 nm) mit einem Video Printer System (INTAS, Göttingen) dokumentiert. Die Reisolierung von DNA aus den Gelen erfolgte durch Ausschneiden der gewünschten Bande aus dem Gel und anschließender Reinigung mit dem QiaQuick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen.

#### **4.7 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

In die Standardreaktion wurden 100 pg bis 10 ng DNA eingesetzt, die Amplifikation erfolgte in einem Volumen von 20 µl mit 1-2 U *Taq*-Polymerase (Gibco BRL Life Technologies) unter den vom Hersteller des Enzyms angegebenen Bedingungen. Für die Amplifikation wurde ein Trio-Thermoblock (Biometra, Göttingen) mit folgenden Konditionen verwendet: Denaturierung der DNA bei 95°C für 30 sec, Primer-spezifische Annealing-Temperatur (siehe Tabelle 3) 30 sec, Elongation bei 72°C für 30 sec bis 3 min (je nach Länge des zu erwartenden Fragments), 28 bis 35 Zyklen.

#### **4.8 RT-PCR**

Die Herstellung von cDNA erfolgte unter Einsatz von 50 ng bis 500 ng RNA mit dem SMART™ PCR cDNA Synthesis Kit der Firma BD Clontech (Heidelberg) nach Angaben des Herstellers. Nach reverser Transkription und Amplifikation konnten aus dem Ausgangsmaterial etwa 4-6 µg cDNA pro Reaktion gewonnen werden. Diese wurde dann in Expressionsanalysen wie zum Beispiel der suppressiven subtraktiven Hybridisierung (SSH) eingesetzt.

#### **4.9 Klonierung und Transformation in *Escherichia coli***

Die Klonierung von PCR-Fragmenten erfolgte in die Vektoren TOPO™ pCR 2.1 (Invitrogen) oder pGEM Teasy (Promega) laut Angaben der Hersteller. Durch Restriktionsverdau gewonnene Fragmente wurden mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase (Stratagene oder Amersham Biosciences) in den entsprechend geschnittenen pBluescript KS (-) ligiert. Für die Transformation dienten chemokompetente *E. coli* TOP 10 F'- oder DH5α-Zellen (Invitrogen).

#### **4.10 Herstellung von DIG-markierten Sonden und Southern Hybridisierung**

##### **DIG markierte Sonden**

Der Einbau von DIG markiertem dUTP erfolgte über eine PCR analog dem „DIG DNA Labeling Kit“ von Roche (Mannheim). Der PCR-Ansatz wurde nach Analyse der positiven Kontrollreaktion in ca. 15 ml Standardhybridisierungspuffer aufgenommen.

##### **Southern Hybridisierungen**

Die zu analysierende genomische DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Denaturierung und Neutralisation

der DNA erfolgte der Übertrag auf eine Nylonmembran (Hybond N+) über einen Kapillartransfer. Die Hybridisierung wurde unter Standardbedingungen bei 65°C, die Waschungen mit 0,5× Wash bei 60°C durchgeführt (Sambrock et al., 1989). Die Detektion erfolgte durch das chemilumineszente Substrat CDP-Star (Roche). Für die Analyse von Plasmid-DNA wurde nach dem selben Protokoll verfahren, allerdings erfolgten die Waschungen mit 0,1× Wash bei 65°C.

#### **4.11 Konstruktion und Screening einer Phagenbank**

Zur Konstruktion einer genomischen Bank von *P. indica* wurde genomische DNA mit *Eco* RI partiell verdaut. Die DNA wurde in Lambda DASH Phagen ligiert und mit dem XL Gold Packaging Extract nach Angaben des Herstellers Stratagene verpackt. Anschließend konnten *E. coli* MRA (P2) infiziert und somit die Phagen vermehrt werden. Über eine Verdünnungsreihe der Phagensuspension wurde der Titer der Bank bestimmt.

Zum Durchsuchen der Phagenbank wurden ca. 20.000 Plaques pro Petrischale (15 cm Ø) in Topagar eingegossen, auf Porablot NY amp Membranen (Macherey-Nagel, Düren) übertragen und mit der entsprechenden DIG-markierten Sonde hybridisiert. Die Detektion erfolgte mit dem chromogenen Substrat NBT/BCIP (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, USA). Positive Plaques wurden ausgestochen und in einem 2. Screen vereinzelt, anschließend wurden sie amplifiziert und die DNA extrahiert.

#### **4.12 Rapid amplification of cDNA ends (RACE)**

Zur Identifikation des 5'Endes der cDNA von *GrosMt1* wurde die SMART<sup>TM</sup> Technologie genutzt. Das SMART<sup>TM</sup> Oligonukleotid II, das am 5'Ende des Transkriptes im homologen Anker bindet, wurde in Kombination mit einem genspezifischen Oligonukleotid zur Amplifikation der cDNA benutzt.

#### **4.13 Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)**

Für die Analyse differentiell exprimierter Gene in zwei unterschiedlich behandelten Hyphenpopulationen wurde die suppressive subtraktive Hybridisierung genutzt. Da die isolierten RNA Mengen aus Hyphen sehr gering waren, wurde der Clontech SMART<sup>TM</sup> PCR cDNA Synthesis Kit (BD Clontech, Heidelberg) vorgeschaltet, um die erforderliche cDNA Menge herzustellen. Diese cDNAs wurden dann in den PCR-SELECT<sup>TM</sup> cDNA Subtraction

Kit eingesetzt und nach Angaben des Herstellers bearbeitet. Die Produkte der letzten PCR wurden in den pGEM Teasy-Vektor kloniert. Die resultierende cDNA Bank wurde als Glycerin-Stock konserviert und die enthaltenen Klone hinsichtlich ihrer differentiellen Expression in einem Reverse-Northern-Experiment untersucht. Dazu wurden die Inserts mit M13-Primern amplifiziert und auf Membranen geblottet. Diese wurden dann mit cDNA-Sonden hybridisiert, die aus den verwendeten Ausgangsmaterialien hergestellt wurden. Klone, die nach der Hybridisierung mit den beiden Sonden eine unterschiedliche Signalintensität zeigten wurden sequenziert.

#### **4.14 Transformation mit dem Biolistic® PDS 1000/He Particle Delivery System**

Für die Transformation der Pilze wurde das Biolistic® PDS 1000/He Particle Delivery System der Firma Biorad (München) verwendet. Die Präparation der Goldpartikel erfolgte nach folgendem Protokoll: 40 mg Goldpartikel wurden mit 100% Ethanol gewaschen, in 1 ml 50% Glycerin aufgenommen und in 50 µl Aliquots eingefroren. Eines dieser Aliquots wurde mit 5 µl Plasmid versetzt und sofort gevortext. Dann wurden 50 µl 2,5 M CaCl<sub>2</sub> und 20 µl 0,1 M Spermidin an die Seite des Cups pipettiert und dann durch Vortexen mit dem Gold vermischt. Dieser Mix verblieb für eine Minute auf Eis, wurde eine Minute bei 5000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es folgte ein Waschschriff mit 100% Ethanol und, nach erneuter Zentrifugation, die Aufnahme des Pellets in 60 µl 100% Ethanol. Je 6 µl dieses Ansatzes wurden für einen Schuss verwendet. Die Bedienung der Maschine erfolgte nach Angabe des Herstellers.

#### **4.15 Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens***

Als zweite Methode zur Transformation der Pilze wurde die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation verwendet. Dazu wurden die gewünschten Promotor-Reporter-Gen-Konstrukte in den binären Vektor pGREEN kloniert und über Elektroporation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV 3101 transformiert. Diese Bakterien wurden dann nach einem Protokoll von P. Bundock (Degroot, et al., 1998) mit pilzlichen Conidiosporen kokultiviert, um eine Transformation zu erreichen.

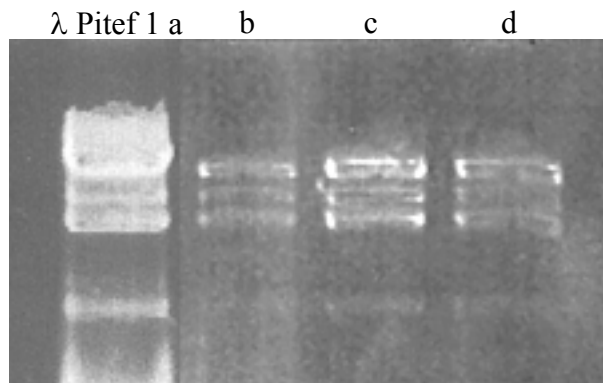
#### **4.16 Analyse der potentiellen Transformanten**

Die mit dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen transformierten Pilze wurden bei der experimentell ermittelten minimalen Hygromycin-Hemmkonzentration in Flüssigmedium oder auf Platten mit Hygromycin-haltigem Topagar inkubiert. Die mit dem GFP transformierten Pilze wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und anschließend in Flüssigmedium angezogen. Die DNA wurde extrahiert und auf das Vorhandensein des GFP-Gens untersucht.

## IV Ergebnisse

### 5. Der Promotor des Gens *Pitef 1* von *Piriformospora indica*

Die Isolierung eines starken und konstitutiv aktiven Promotors ist unerlässlich zur Konstruktion von Vektoren für die effiziente Transformation von Organismen. Im Rahmen ihrer Doktorarbeit konnte Britta Bütehörn die vollständige Sequenz des Gens *Pitef 1* für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  von *P. indica* aufklären, welches die gewünschten Kriterien erfüllt. Allerdings war nur ein relativ kurzes Fragment der Promotorregion verfügbar, so dass die Identifizierung eines größeren Bereiches nötig schien. Dazu mußte zunächst eine genomische Bank angelegt werden. Genomische DNA des Pilzes wurde isoliert, mit *Eco* RI partiell geschnitten und in Phagenarme ligiert. Nach anschließender Verpackung in Phagenköpfe und Transfektion in *E. coli* wurde der Titer der Bank mit  $6 \cdot 10^4$  pfu/ml bestimmt. Obwohl dies wahrscheinlich nicht einer vollständigen Abdeckung des Genoms entsprach, womit die Bank nicht repräsentativ war, wurde sie trotzdem mit einer Sonde aus dem 5' Bereich des *Pitef 1* Gens durchsucht. Es konnten vier positive Klone identifiziert werden, die, wie der Verdau mit *Eco* RI zeigte, identische Insertionen enthielten (Abb. 1).

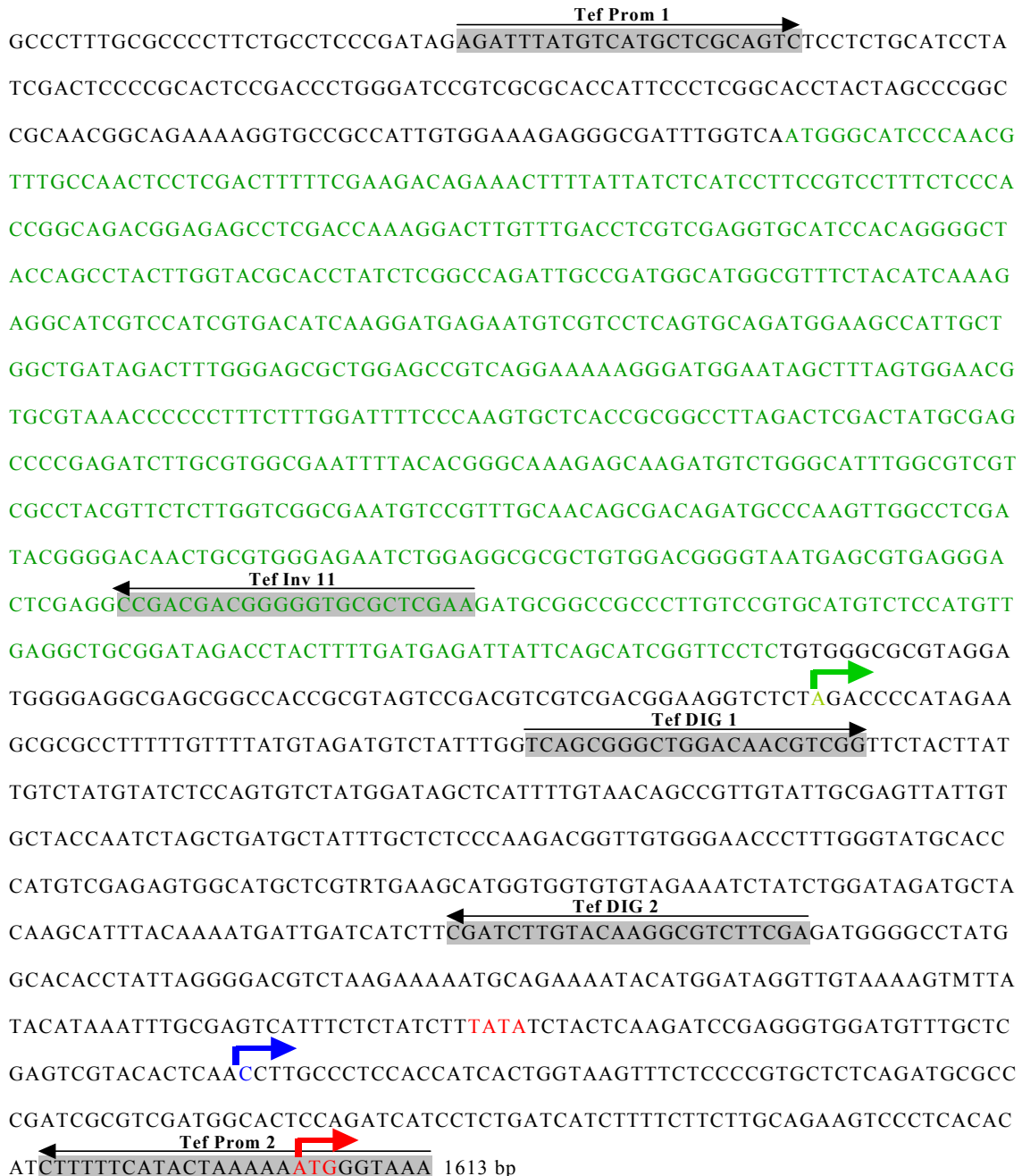


**Abbildung 1: Restriktionsverdau der DNA aus den Phagen  $\lambda$  Pitef 1 a-d**

Nach Durchsuchen einer genomischen Phagenbank mit einem Fragment des *Pitef 1* Gens von *P. indica* wurden vier Klone isoliert, amplifiziert und die DNA extrahiert. Die DNA der Klone  $\lambda$  Pitef 1 a-d wurde mit *Eco* RI verdaut und über ein Agarosegel aufgetrennt. Das identische Restriktionsmuster deutet darauf hin, dass die vier Phagen die gleiche Insertion enthalten.

Eine Subklonierung der Insertion nach Restriktionsverdau mit dem Enzym *Xho* I führte zu einer Identifizierung von weiteren 175 bp im 5' Bereich. Da dies wahrscheinlich immer noch nicht die gesamte Promotorregion umfasst, wurde eine PCR mit dem Ankerprimer T3, der im Phagenarm bindet, und dem genspezifischen Primer Tef Inv 11 durchgeführt. Obwohl unspezifische Banden auftraten, wurde der gesamte PCR-Ansatz in den TOPO-Vektor ligiert

und ein durch Verdau und PCR getestetes Plasmid sequenziert. Es enthielt eine 1605 bp große Insertion, die die 5'-nicht-translatierte Region des *Pitef 1* Gens einschließlich der Promotorregion umfasste. Durch die Sequenzierung einiger *Xho* I-Subklone stellte sich heraus, dass die Insertion außer dem *Pitef 1*-Gen noch Teile von Genen für eine Serin-Threonin-Kinase, ein ribosomales Protein sowie ein *mdm1*-Homolog enthielt.

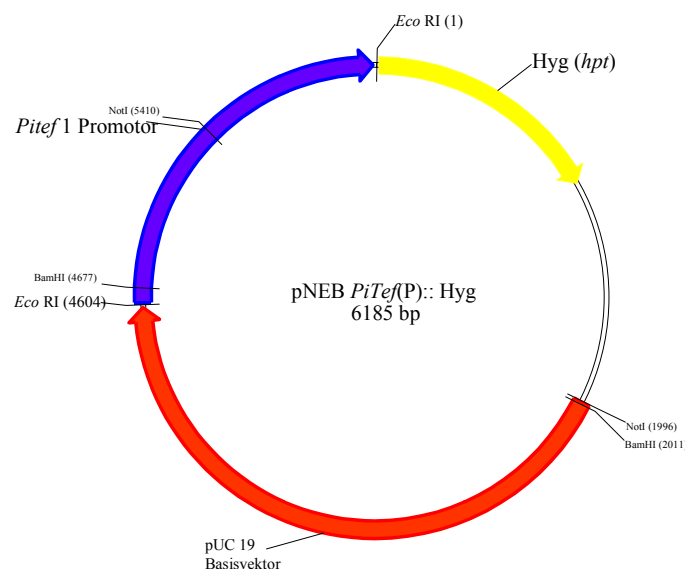


**Abbildung 2: Die Promotorregion des *Pitef 1* Gens von *P. indica***

Dargestellt ist die Promotorsequenz von *Pitef 1*. Die Primerbindestellen sind in der Sequenz grau unterlegt. Tef DIG 1&2 wurden zur Erstellung der Sonde zum Durchsuchen der genomischen Bank verwendet, Tef Prom 1&2 dienen zur Amplifikation des gesamten Promotorbereiches und Tef Inv 11 zur Aufklärung der Sequenz im 5' Bereich. In der Sequenz rot hervorgehoben sind die mögliche TATA-Box und das Startcodon der Translation. Der grüne Pfeil deutet auf den Beginn der von Britta Bütchorn aufgeklärten Sequenz hin, der blaue Pfeil kennzeichnet den wahrscheinlichen Transkriptions-, der rote Pfeil den Translationsstart. Der Bereich, der Ähnlichkeit zu dem Serin/Threonin-Kinase-Gen zeigte, ist in grünen Buchstaben dargestellt.

## 6. Konstruktion von Vektoren für die Transformation von *Piriformospora indica*

Die Promotorregion von *P. indica* sollte der konstitutiven Expression einer Hygromycin-Phosphotransferase (Hpt) und eines 'Green Fluorescent Protein' (GFP) in Transformationsexperimenten dienen. Dazu musste die entsprechende Promotorregion in bereits vorhandene Expressionsvektoren kloniert werden (pNEB-Hyg, zur Verfügung gestellt von Prof. Bölker, Philipps-Universität; TOPO-GFP, zur Verfügung gestellt von Dr. Fischer, Philipps-Universität). Der Vektor mit der Hygromycinresistenz enthielt den Tef-Genpromotor von *Ustilago maydis*, der zunächst herausgeschnitten und durch den Promotor von *P. indica* ersetzt werden musste. Da gleichzeitig eine Schnittstelle (*Eco* RI) kreiert und eine expressionsverstärkende Kozack-Konsensus-Sequenz vor dem Translationsstart eingefügt werden sollte, wurde der gesamte Vektor mit entsprechend formulierten Primern (NEB-ATG, NEB rev) amplifiziert. Anschließend erfolgte ein Verdau mit *Eco* RI und eine Ligation zu einem ringförmigen Plasmid. Dieses wurde erneut mit *Eco* RI aufgeschnitten und der Promotor in diese Schnittstelle kloniert (Abb. 3). Die korrekte Insertion unter Erhalt des richtigen Leserasters wurde durch PCR und Sequenzierung überprüft.

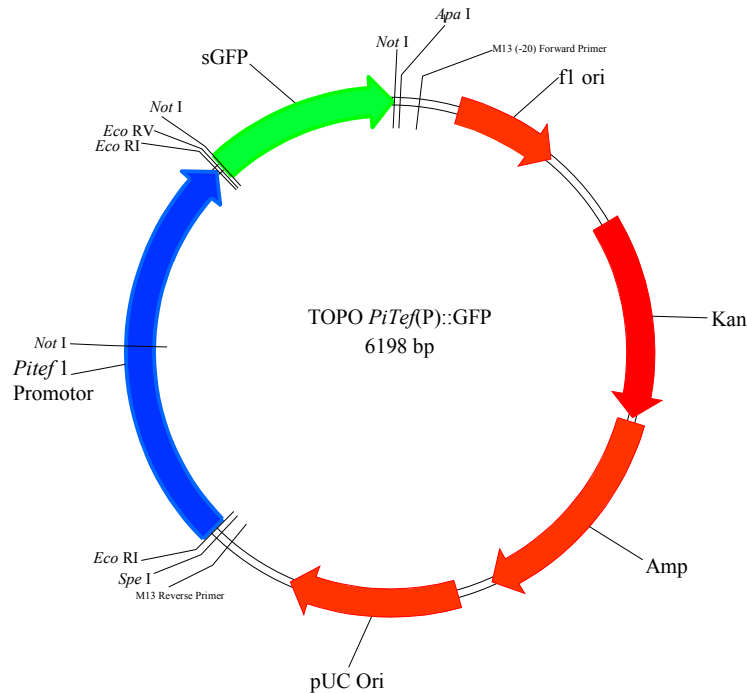


**Abbildung 3: Vektorkarte von pNEB Pitef (P)::Hyg**

Die Vektorkarte zeigt den Expressionsvektor pNEB mit dem *Pitef* 1 Promotor vor der kodierenden Region für die Hygromycin-Phosphotransferase (Hpt).

Der TOPO-Vektor mit der kodierenden Region für ein synthetisches GFP (sGFP) in der *Not* I-Schnittstelle wurde mit *Eco* RV und *Apa* I verdaut und das gewünschte Fragment (sGFP) der

Größe ~750 bp aus dem Gel eluiert. Der TOPO-Vektor mit dem *Pitef* 1-Promotor wurde mit den gleichen Enzymen geschnitten und mit dem sGFP-Fragment ligiert. Die nachfolgende Transformation ergab einige Klone, die die gewünschte Größe aufwiesen und durch eine PCR überprüft wurden.



**Abbildung 4: Vektorkarte TOPO-sGFP *Pitef* (P)::GFP**

Die Vektorkarte zeigt den TOPO pCR 2.1 Vektor mit dem *Pitef* 1 Promotor vor der kodierenden Region für das sGFP in der *Not* I- Schnittstelle.

Des weiteren wurden Vektoren für die Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* konstruiert. Dazu mussten die Promotor-Reportergen-Kassetten aus den Vektoren pNEB *Pitef* (P)::Hyg und pTOPO *Pitef* (P)::GFP herausgeschnitten und in den binären Vektor pGREEN kloniert werden. Dieser besitzt zwischen der 'right' und 'left border' der Ti-DNA, die der Integration in das Zielgenom dienen, eine multiple Klonierungsstelle, um Insertionen aufzunehmen. Für das Hygromycinkonstrukt wurde das Restriktionsenzym *Bam* HI gewählt, für das GFP-Konstrukt *Apa* I und *Spe* I. Anschließend wurden die neu konstruierten Vektoren pGREEN *Pitef*(P)::Hyg und pGREEN *Pitef*(P)::GFP mittels Elektroporation zunächst in *E. coli* transformiert, um die korrekte Insertion zu überprüfen, und nach einer Plasmidpräparation in *A. tumefaciens* transformiert.

## 7. Transformation von *Piriformospora indica*

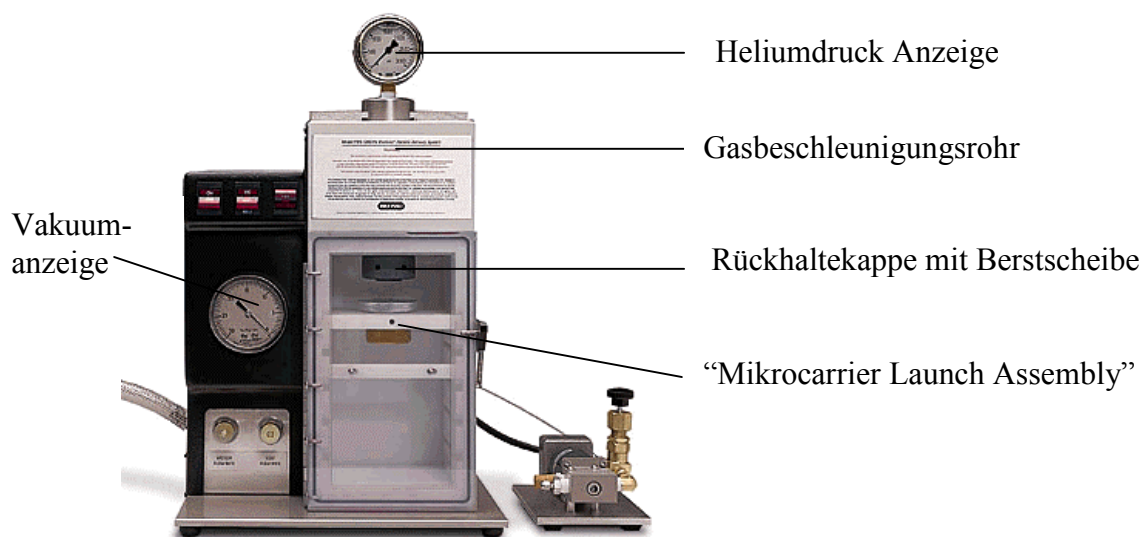
Die Vektoren pNEB Pitef(P)::Hyg und TOPO Pitef::GFP mit den Markergenen für Hygromycin-Resistenz und GFP wurden eingesetzt, um ein Transformationssystem für *P. indica* zu entwickeln. Die Einschleusung der Fremd-DNA in die pilzlichen Zellen sollte über zwei verschiedene Techniken erfolgen, 'Particle Bombardment' und eine *Agrobacterium*-vermittelte Transformation.

### 7.1 Bestimmung der MHK von Hygromycin

Zur Selektion der Pilzkulturen auf Hygromycin musste zunächst die minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt werden. Da die Selektion der Transformanten durch die Überschichtung der Platten mit Hygromycin-haltigem Topagar erfolgen sollte, wurde auch im Test der Konzentration Topagar verwendet. Folgende Konzentrationen wurden getestet: 5, 10, 15, 25, 30 und 50 µg/ml. Bereits bei einer Konzentration von 10 µg/ml Hygromycin wurde das Wachstum komplett inhibiert.

### 7.2 'Particle Bombardment'

Für die Bombardierung wurde das Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Abb. 5) der Firma Biorad (München) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Dabei wurden die in Tabelle 1 aufgeführten Parameter getestet.



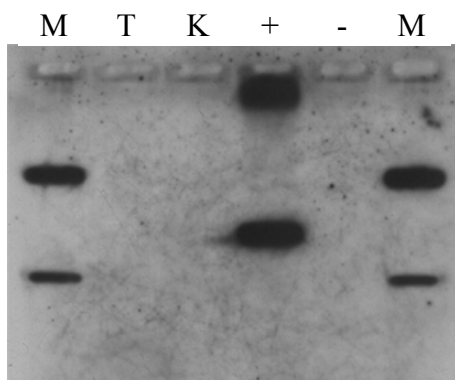
**Abbildung 5: Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Biorad)**

Gezeigt ist die Versuchsanordnung zur Bombardierung von Organismen mit DNA-beschichteten Goldpartikeln.

**Tabelle 1: Getestete Parameter für das 'Particle Bombardment'**

Parameter	Getesteter Bereich
Entwicklungsstadium der Pilzkultur	Junge Hyphen, alte Hyphen, Sporen, jeweils auf Agarplatten oder aus Flüssigkultur
Helium Druck (Berstscheibe)	1100 psi und 1350 psi, einzeln und in Kombination
Vakuum	20 mm Hg, 25 mm Hg, 27 mm Hg
Größe der Mikrocarrier (Gold)	0,6 µm und 1,6 µm
Abstand des Präparats von der Berstscheibe	6 cm, 12 cm
Methode der Präparation der Mikrocarrier	nach Protokoll der Firma Biorad oder nach Protokoll von L. Harrier (SAC, Edinburgh)

Getestet wurden auch diverse Kombinationen der möglichen Parameter. Es konnte jedoch bei keinem Ansatz eine erfolgreiche Transformation erreicht werden. Bei der Hygromycin-Selektion konnte kein Wachstum beobachtet werden und die mit dem GFP-Konstrukt transformierten Kulturen wiesen keine Fluoreszenz auf. Zusätzlich wurde von einer GFP-Kultur DNA extrahiert und versucht, eine eventuelle Insertion mit GFP-spezifischen Primern nachzuweisen, um die eventuelle Anwesenheit des Konstrukts in der Zelle ohne erfolgreiche Expression zu untersuchen. Doch selbst nach Hybridisierung der Amplifikationsprodukte konnte kein GFP detektiert werden (Abb. 6). Dies lässt den Rückschluss zu, dass das Konstrukt nicht in die Zelle eingebracht werden konnte.



**Abbildung 6: PCR-Southern Blot zur Detektion des GFP-Gens**

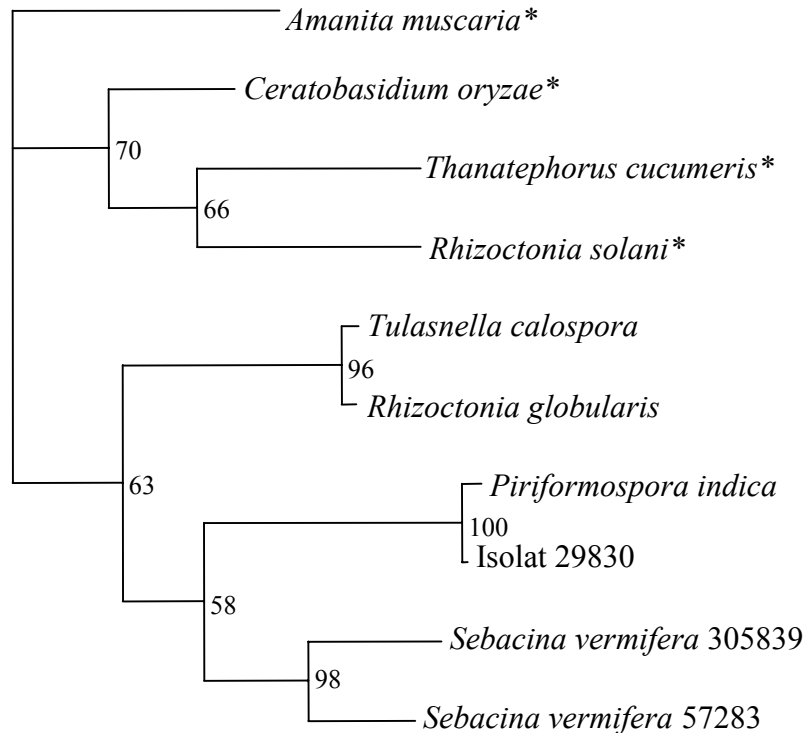
DNA aus transformierten und Kontroll-Kulturen wurde extrahiert und in eine PCR mit GFP-spezifischen Primern eingesetzt. Diese wurde über ein Agarosegel aufgetrennt und das Gel geblottet. Anschließend wurde mit einer GFP-Sonde hybridisiert. Ein Signal konnte nur in der Positivkontrolle detektiert werden. Die in der Abbildung verwendeten Abkürzungen bedeuten: M=Marker, T=transformierte Kultur, K=Kontrollkultur, +=Positivkontrolle, -=Negativkontrolle der PCR.

### **7.3 *Agrobacterium*-vermittelte Transformation**

Nach dem Scheitern der Technik des 'Particle Bombardment' wurde als weitere Methode die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation gewählt. Die binären Vektoren pGREEN Pitef(P)::Hyg und pGREEN Pitef(P)::GFP wurden zunächst in den *A. tumefaciens*-Stamm GV 3101 transformiert. Durch die Kokultivierung der Bakterien mit gekeimten Pilzsporen sollte in einem Induktionsmedium die Einschleusung der Plasmide in die Pilze erfolgen. In einer anschließenden Inkubation in Augmentin-haltigen Medium wurden die Bakterien dann abgetötet. Anschließend erfolgte die Selektion mit Hygromycin und die mikroskopische Auswertung der GFP-Transformation. Auch hier konnten keine Transformanten beobachtet werden.

## **8. Identifikation eines nahen Verwandten von *Piriformospora indica***

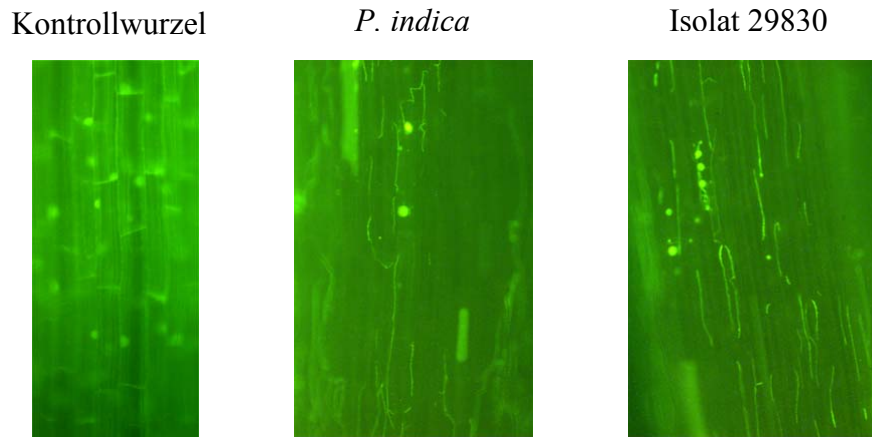
Da beide Transformationstechniken nicht zu einem positiven Ergebnis führten, musste über eine Alternative nachgedacht werden. Es erschien sinnvoll, einen nahe verwandten Pilz ebenfalls mit den Konstrukten und den selben Techniken zu transformieren. Die phylogenetischen Untersuchungen im Rahmen der Erstbeschreibung dieses Pilzes umfassten jedoch nur Pilze mit einer relativ großen Distanz zu *P. indica* (Verma, et al., 1998). *Piriformospora indica* ließ sich nach Analyse der 18 S rDNA in die *Rhizoctonia*-Gruppe unter den Basidiomyceten einordnen. Eine Suche nach näher verwandten Pilzen schien somit sinnvoll. Aufgrund von morphologischen und physiologischen Beschreibungen wählte Dr. Karl-Heinz Rexer (Philipps-Universität) potentiell nah verwandte Pilze aus und stellte sie für molekulare Analysen und Wachstumsversuche zur Verfügung. Die Pilze wurden zunächst in CM- oder Malz-Medium angezogen und die DNA aus dem Mycel isoliert. Anschließend konnten die ITS-Regionen mit den Primern ITS 1 und ITS 4 amplifiziert und sequenziert werden. Die resultierenden Sequenzen wurden einer phylogenetischen Analyse unterzogen, deren Ergebnis als Stammbaum in Abbildung 7 dargestellt ist.



**Abbildung 7: Dendrogramm der phylogenetischen Abstände der ITS-Region verschiedener Basidiomyceten**

DNA wurde aus Hyphen verschiedener Pilzisolat extrahiert und die ITS-Region des ribosomalen Genclusters amplifiziert und sequenziert. Sequenzen wurden mit Hilfe des Programms ClustalW untereinander und mit bekannten ITS-Sequenzen anderer Basidiomyceten (gekennzeichnet mit \*) verglichen. Der Vergleich wurde mit dem Programm PUZZLE einer phylogenetischen Analyse unterzogen, deren Ergebnis unter Einsatz des Programms TREEVIEW als Stammbaum dargestellt ist. Die statistischen Signifikanzwerte von 1000 Wiederholungen sind angegeben.

Die in die Untersuchung einbezogenen Pilze zeigten eine deutlich größere evolutionäre Nähe zu *P. indica* als der in der ersten Analyse als nächster Verwandter identifizierte *Rhizoctonia solani*. In einem Inokulationsexperiment sollte dann die Frage geklärt werden, ob diese Pilze auch bezüglich ihrer wachstumsfördernden Eigenschaften eine nähere Verwandtschaft zu *P. indica* erkennen lassen. Die ausgewählten Pilze wurden erneut in Flüssigkulturen angezogen und Erdbeermaiskeimlinge in Topfkulturen mit je einem Gramm Pilzmycel inokuliert. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus bei natürlichen Lichtverhältnissen gehalten und wöchentlich mit Long Ashton Lösung gedüngt. Nach etwa vier bis fünf Wochen wurden sie geerntet, die Gewichte von Spross und Wurzel gemessen und der Infektionsgrad durch eine FDA-Färbung abgeschätzt (Abb. 8).



**Abbildung 8: FDA-Färbung von Maiswurzeln**

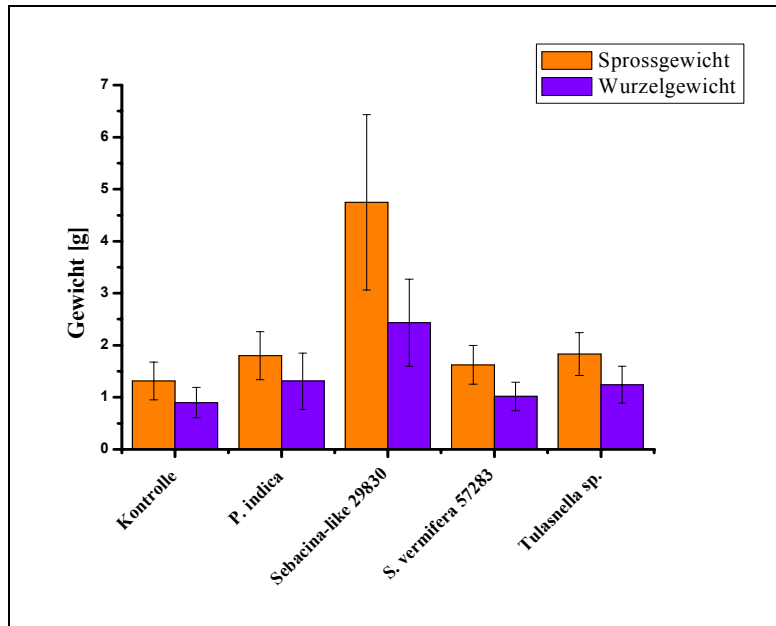
Maiswurzeln wurden mit *P. indica* und Isolat 29830 inokuliert und nach fünf Wochen geerntet. Die Wurzeln wurden in 1 cm lange Fragmente geschnitten und mit FDA gefärbt. Die Hyphen und Sporen sind als deutlich angefärbte Strukturen vor dem Hintergrund der größtenteils abgestorbenen Wurzel zu erkennen.

Die Färbung zeigte, dass in allen Ansätzen eine gute bis sehr gute Kolonisierung erreicht werden konnte. Es wurden jeweils 30 bis 75 Wurzelfragmente betrachtet und die Zahl der kolonisierten Fragmente vermerkt.

**Tabelle 2: Abschätzung des Infektionsgrades der Maiswurzeln**

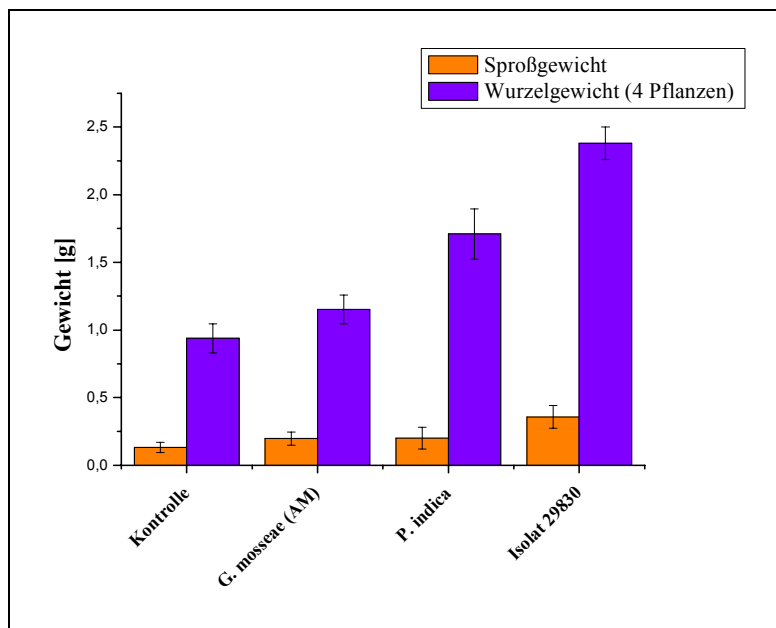
Erdbeermais wurde mit Pilzen der *Rhizoctonia*-Formgattung inokuliert und nach fünf Wochen geerntet. Fragmente der kolonisierten Maiswurzeln wurden mit FDA gefärbt und der prozentuale Anteil von Fragmenten mit Infektion ermittelt.

<b>Ansatz</b>	<b>Anzahl Fragmente</b>	<b>Kolonisierte Fragmente</b>	<b>% kolonisiert</b>
Kontrolle	60	0	0 %
<i>P. indica</i>	75	64	85 %
Isolat 29830	56	53	95 %
<i>S. vermifera</i> 57283	30	28	93 %
<i>Tulasnella</i>	30	19	63 %



**Abbildung 9: Wachstumseffekte von Pilzen der *Rhizoctonia*-Gruppe auf Maispflanzen**

Maiskeimlinge wurden mit je einem Gramm Pilzmycel inokuliert und nach fünf Wochen geerntet. Die Gewichte von Spross und Wurzel wurden bestimmt, Mittelwerte und Standardabweichungen von 9 – 14 Pflanzen sind graphisch aufgetragen.



**Abbildung 10: Wachstumseffekt von *G. mosseae*, *P. indica* und Isolat 29830 auf *Medicago truncatula***

*Medicago truncatula*-Keimlinge wurden mit je einem Gramm Pilzmycel inokuliert und nach vier Wochen geerntet. Die Gewichte von Spross und Wurzel wurden bestimmt, die Mittelwerte und Standardabweichungen von je vier Töpfen mit vier Pflanzen sind graphisch aufgetragen.

Wie in Abbildung 9 deutlich wird, konnten die stärksten Effekte auf das Wachstum mit dem Isolat 29830 festgestellt werden, das auch nach den Sequenzdaten die höchste Ähnlichkeit zu *P. indica* aufwies. Um einen weiteren Eindruck von dem wachstumsfördernden Potential dieses Pilzes zu bekommen, wurde auch der Einfluß auf die Entwicklung der dikotyledonen

Pflanze *Medicago truncatula* untersucht (Abb.10). Es wird deutlich, dass der wachstumsfördernde Effekt des Isolats 29830 auch auf *M. truncatula* signifikant stärker ist, als der von *P. indica*. Beide Pilze zeigen wiederum einen stärkeren Effekt als der arbuskuläre Mykorrhizapilz *Glomus mosseae*. Mit dem Isolat 29830 konnte somit ein phylogenetisch sehr nahe verwandter Pilz zu *P. indica* identifiziert werden, der auch in der Wechselwirkung mit Pflanzen ähnliche Eigenschaften aufweist. Deshalb wurde er für weitere Transformationsexperimente eingesetzt.

## 9. Transformationsexperimente mit dem Isolat 29830

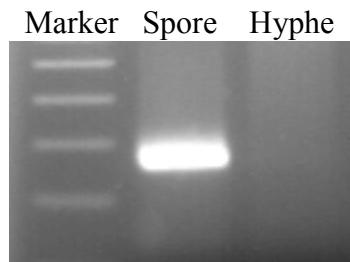
Die für *P. indica* in Kapitel 2 beschriebenen Transformationsansätze wurden in gleicher Weise mit dem Isolat 29830 durchgeführt. Es konnten die gleichen Plasmide verwendet werden, da dieser Pilz mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den Promotor eines sehr nahe verwandten Pilzes akzeptieren würde. Die Bestimmung der MHK von Hygromycin ergab eine Konzentration von 30 µg/ml. Doch auch bei diesem Pilz konnte mit beiden Methoden keine Transformation erreicht werden.

## 10. Promotorsuche bei *Gigaspora rosea*

Auch bei dem arbuskulären Mykorrhizapilz (AM Pilz) *Gigaspora rosea* war die Isolierung eines starken und konstitutiven Promotors nötig, um das bereits bestehende Transformationssystem zu verbessern (Forbes, et al., 1998). Die nach den Angaben in der Literatur in Frage kommenden Gene für das  $\beta$ -Tubulin und für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  wurden zunächst bezüglich ihres Expressionsmusters untersucht. Anschließend erfolgten erste Versuche zur Isolierung der Promotorsequenz.

### 10.1 Expressionsanalyse des $\beta$ -Tubulin-Gens in *Gigaspora rosea* und *Glomus mosseae*

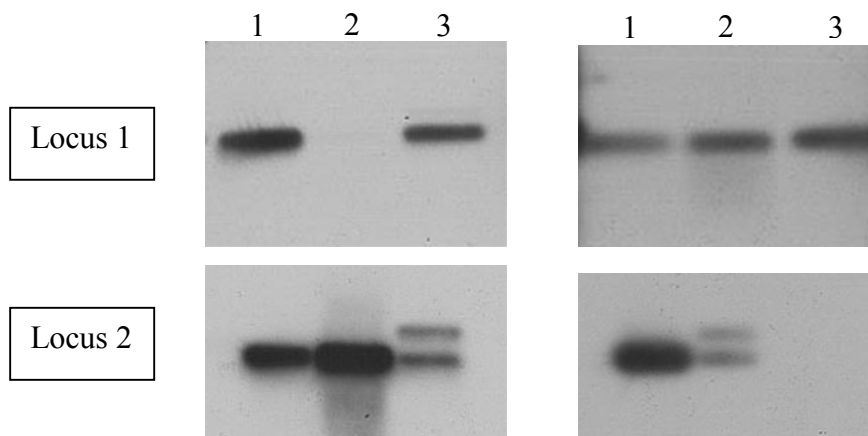
Im Rahmen des BEG-Net-Programms konnten Fragmente von  $\beta$ -Tubulin-Genen aus AM Pilzen kloniert und sequenziert werden. Dabei wurden zwei verschiedene Loci des Gens im Genom identifiziert. Für die Verwendung des Promotors ist die konstitutive Expression des Gens in allen Entwicklungsstadien des Pilzes eine zwingende Voraussetzung. In einer ersten RT-PCR wurde die Expression von *Grostub 2* in Sporen und Hyphen von *G. rosea* untersucht.



**Abbildung 11: RT-PCR des  $\beta$ -Tubulin-Gens *Grostub 2* von *Gigaspora rosea***

Aus cDNA unterschiedlicher Entwicklungsstadien (Sporen und extraradikuläre Hyphen) von *G. rosea* wurde das *Grostub2*-Gen mit den Primern TubII for und rev amplifiziert. Als Größenmarker diente die 100 bp-Leiter von Invitrogen.

Entgegen der Erwartungen konnte das *Grostub2*-Gen in den Hyphen nicht detektiert werden. Dieser Befund wurde zum Anlass für detailliertere Studien der Expression des  $\beta$ -Tubulin-Gens genommen. Unter Einbezug des zweiten Locus wurden RT-PCR-Analysen mit cDNA unterschiedlicher Entwicklungsstadien von *G. rosea* und *Glomus mosseae* durchgeführt (Abb. 12). Die Amplifikate wurden dann in einem Southern Blot mit DIG-markierten Sonden hybridisiert, da in einigen Fällen keine spezifischen Banden in der PCR erzeugt werden konnten. Als Vorlage für die Sonden dienten die in Plasmidvektoren klonierten Fragmente der  $\beta$ -Tubulin-Gene. Der erste Hinweis auf eine deutliche Regulation der  $\beta$ -Tubulin-Gene konnte bestätigt werden.

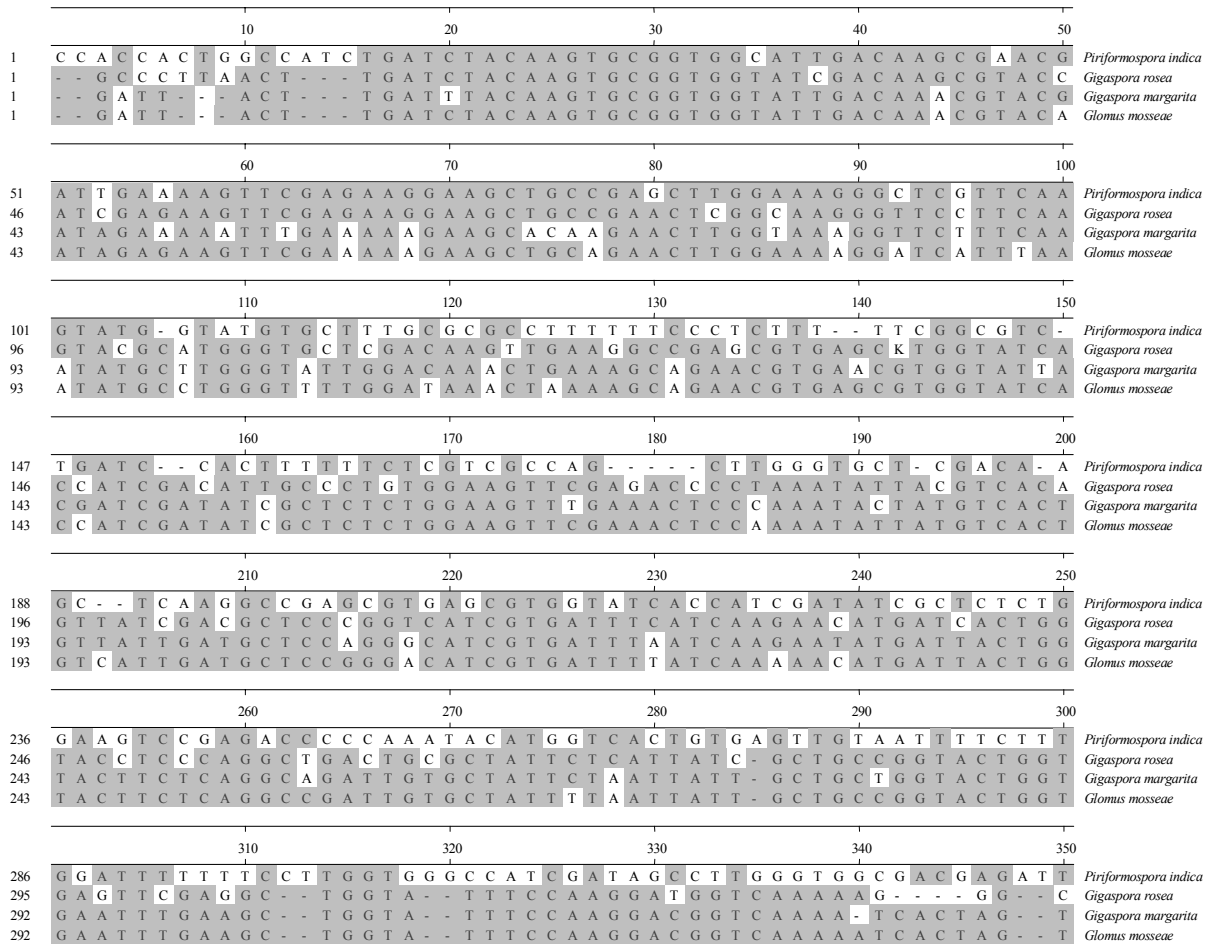


**Abbildung 12: Differentielle Expression der beiden  $\beta$ -Tubulin-Loci in *Gigaspora rosea* und *Glomus mosseae*** Die beiden Loci der  $\beta$ -Tubulin-Gene in *G. rosea* und *G. mosseae* wurden mit spezifischen Primern amplifiziert und in einem Southern Blot mit der jeweils spezifischen Sonde hybridisiert. Dieser Schritt war nötig, da sich in der PCR einige unspezifische Banden zeigten. Für dieses Experiment wurde cDNA von 1= Sporen, 2= Hyphen und 3= Mykorrhiza mit *M. truncatula* benutzt.

Da für das  $\beta$ -Tubulin eine Regulation der Expression in unterschiedlichen Entwicklungsstadien erkennbar und damit die Verwendung in Transformationsexperimenten nicht sinnvoll war, wurde eine entsprechende Analyse mit dem Gen für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  durchgeführt.

## 10.2 Charakterisierung eines cDNA-Fragmentes des *tef 1*-Gens von drei AM Pilzen

Da in der Literatur keine Sequenzdaten für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  (*tef 1*) von AM Pilzen vorlagen, wurde zunächst mittels der degenerierten Oligonukleotide Tef deg 1 und 2 ein Teil des Gens aus cDNA amplifiziert und kloniert. Dies erfolgte bei den drei AM Pilzen *G. rosea*, *Gigaspora margarita* und *G. mosseae*, da für alle drei Pilze die Isolierung eines homologen Promotors wichtig wäre.

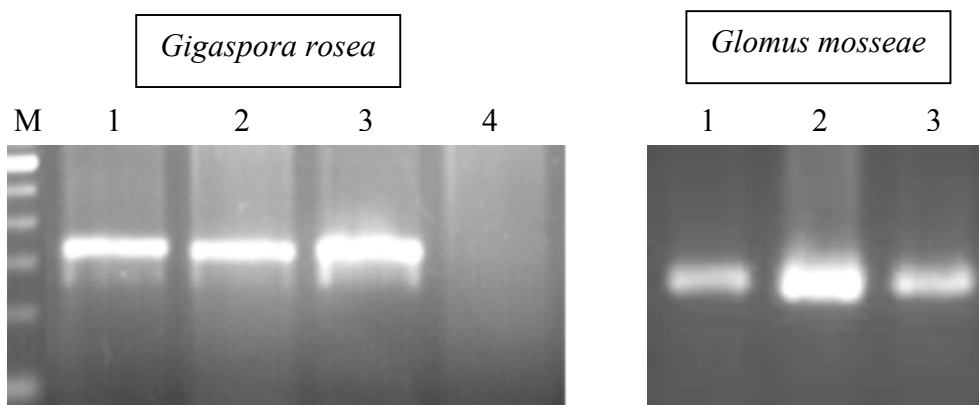


**Abbildung 13: Vergleich der cDNA-Sequenz von *tef 1*-Genen**

Die Sequenzen von cDNA-Fragmenten des *tef 1*-Gens von *Gigaspora rosea*, *Gigaspora margarita* und *Glomus mosseae* wurden aufgeklärt und hier im Vergleich zu dem entsprechenden Genbereich von *Piriformospora indica* dargestellt. Das Alignment erfolgte mit dem Programm MegAlign (DNASTar).

## 10.3 Expressionsanalyse des *tef 1*-Gens in *Gigaspora rosea* und *Glomus mosseae*

Analog zu der Analyse der  $\beta$ -Tubulin-Gene wurde eine RT-PCR mit den *tef 1*-Gen-spezifischen Primern Tef deg 1 und 2 durchgeführt. Da dieselben cDNAs als Vorlagen verwendet wurden, stellt dieser Ansatz auch eine Kontrolle der Ergebnisse der RT-PCR mit den  $\beta$ -Tubulin-Genen dar.



**Abbildung 14: RT-PCR des *tef 1*-Gens in *Gigaspora rosea* und *Glomus mosseae***

In einer RT-PCR mit den Primern *Tef deg 1* und *2* wurde das entsprechende Genfragment aus cDNA unterschiedlicher Entwicklungsstadien (1= Spore, 2= Hyphe, 3= Mykorrhiza mit *M. truncatula*, 4= Kontrolle: *M. truncatula* allein) amplifiziert. Bei beiden untersuchten Pilzen konnte das ca. 350 bp große Transkript in allen Stadien nachgewiesen werden.

Das Transkript des *tef 1*-Gens konnte in allen Stadien des Pilzes nachgewiesen werden. Es scheint also wie erwartet stark und konstitutiv exprimiert zu sein. Folglich eignet sich der zugehörige Promotor wahrscheinlich sehr gut für die Expression von Markergenen in Transformationsexperimenten. Es wurden im folgenden erste Schritte zur Isolierung der Promotorsequenz unternommen.

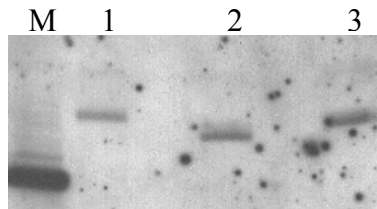
#### **10.4 Durchsuchen einer genomischen Bank von *Gigaspora rosea* in Lambda DASH Phagen**

Die cDNA Sequenz des *Groste f 1*-Gens wurde zur Synthese einer DIG-markierten Sonde verwendet und damit eine genomische Bank von *G. rosea* in Lambda DASH Phagen (zur Verfügung gestellt vom INRA, Dijon) hybridisiert. Es konnten mehrere deutlich positive Plaques identifiziert werden, von denen vier näher analysiert wurden. Alle vier Phagen enthielten identische Insertionen, wie durch eine Southern Blot-Analyse gezeigt werden konnte. Die Insertion wurde durch Restriktionsverdau und Subklonierungen einer Analyse zugänglich gemacht. Alle aus diesen Phagen gewonnenen Klone enthielten jedoch humane DNA-Sequenzen. Da die DNA, mit der die Bank konstruiert wurde, offensichtlich verunreinigt war, musste die Bank verworfen werden.

#### **10.5 Screening einer genomischen Bank von *Glomus mosseae* in Lambda DASH Phagen**

Eine genomische Bank in Lambda DASH Phagen (zur Verfügung gestellt vom INRA, Dijon) wurde mit der *Gmostef 1*-Sonde hybridisiert. Es konnten aber keine positiven Plaques festgestellt werden. Da jedoch die Expressionsanalyse des zweiten  $\beta$ -Tubulin-Gens-Locus eine recht starke Expression in Hyphen und Sporen und eine nachweisbare Expression in Mykorrhiza zeigte, wurde auch mit diesem Genfragment eine Hybridisierung durchgeführt.

Es konnten positive Plaques identifiziert werden. Ein Restriktionsverdau der isolierten DNA der Insertion eines Phagen wurde in einem Southern Blot erneut mit der Sonde hybridisiert und eine eindeutig positive Bande detektiert.



**Abbildung 15: Southern Blot der DNA aus dem Phagen  $\lambda$  Gmostub 1**

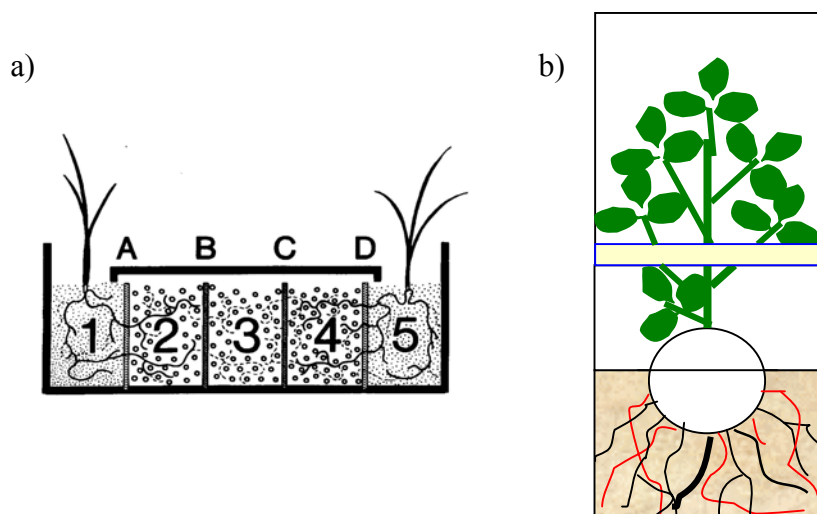
Eine genomische Bank von *G. mosseae* wurde mit der  $\beta$ -Tubulin-Locus 2-Sonde durchsucht und ein positiver Plaque isoliert. Die DNA des Phagen wurde aufgereinigt, mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut (1= *Bam* HI, 2= *Eco* RI, 3= *Xba* I, M= Marker) und erneut mit der  $\beta$ -Tubulin-Sonde hybridisiert. Es zeigten sich eindeutig positive Banden, deren Größe bei 3,5 bis 4,5 kb lag.

Durch einen Restriktionsverdau mit *Eco* RI konnte ein 3,5 kb großes Fragment erzeugt werden, das in den Plasmid-Vektor pKS- (Stratagene) subkloniert wurde. Die folgende Sequenzierung ergab, dass die Insertion tatsächlich einen Teil des *Gmostub 2*-Gens enthielt, allerdings scheinbar nicht die gesuchte Promotorregion. Zur Klärung, ob die Promotor-Region noch auf der Phageninsertion liegt, wurde eine PCR mit einem genspezifischen (TubII rev) und einem Ankerprimer des Phagenarms (T3 mod) durchgeführt. Die PCR ergab ein ca. 700 bp großes Fragment, das die bereits bekannte cDNA Sequenz enthielt. Da das Gen am Ende der Phageninsertion lag und kein weiterer positiver Plaque identifiziert werden konnte, war es nicht möglich, aus dieser genomischen Bank den Promotor des  $\beta$ -Tubulin-Gens (*Gmostub 2*) zu isolieren.

## 11. Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH)

Nach der Entwicklung eines zuverlässigen Transformationssystems für Mykorrhizapilze sollte dieses genutzt werden, um durch Überexpression von Genen die positiven Eigenschaften der Pilze zu verbessern und so eine noch effizientere Symbiose zu erreichen. Dabei waren besonders solche Gene interessant, die in Zusammenhang mit der Nährstoffversorgung und der erhöhten Schwermetallresistenz stehen. Zur Identifikation der an diesen Prozessen beteiligten Gene erschien es sinnvoll, eine cDNA Bank zu etablieren, die für die unter Phosphatmangel und Schwermetallbelastung verstärkt exprimierte Gene angereichert ist. Da die Menge des biologischen Materials bei diesen obligat symbiontischen Pilzen sehr limitiert ist, war es zunächst wichtig, das richtige experimentelle System zu finden. In einem ersten Ansatz wurde eine Mykorrhiza mit *G. mosseae* und *M. truncatula* in einem

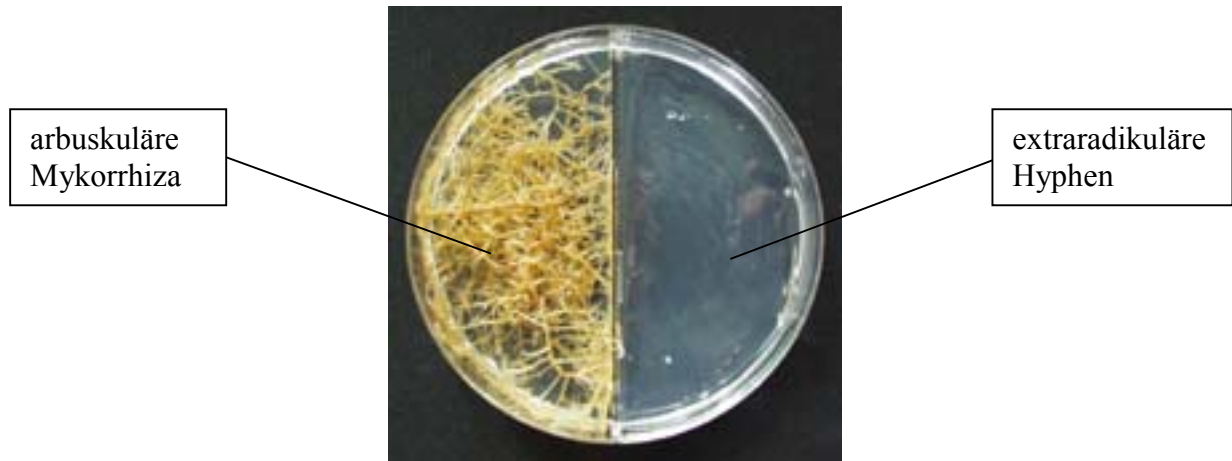
Kompartimentsystem ausgebildet (Abb. 16) (Redecker et al., 1995). Die einzelnen Abteilungen sind dabei durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite voneinander getrennt. Es konnte allerdings nur eine sehr geringe Menge pilzlichen Materials gewonnen werden, aus dem keine qualitativ hochwertige RNA isoliert werden konnte. Die nächste Möglichkeit stellte das `Sandwich`-System dar, bei dem Sporen von *G. rosea* zwischen zwei Membranen mit einem *M. truncatula* Keimling in Kontakt gebracht wurden (Abb. 16). Die Mykorrhizierung war allerdings sehr schlecht und die extraradikulären Hyphen ließen sich nur sehr schwer aus dem umgebenden Sand extrahieren.



**Abbildung 16: Experimentelle Systeme zur Ernte von Hyphen arbuskulärer Mykorrhizapilze**

Bei dem Kompartimentsystem in Abb. 16 a) werden die Pilzhyphen aus den Glasperlen in Kompartiment 3 geerntet. In diesen Bereich können die Wurzeln nicht wachsen, da die Maschen der Nylonnetze B und C mit 0,1 mm zu eng sind. Die Netze A und D haben eine Maschenweite von 1 mm und können von den Wurzeln durchwachsen werden. In den Kompartimenten 1 und 5 finden sich zu einem frühen Zeitpunkt häufig nur nicht kolonisierte Wurzeln, während sich die ausgebildete Mykorrhizasymbiose in den Kompartimenten 2 und 4 befindet. Beim Sandwichsystem in Abb. 16 b) erfolgt die Ernte aus dem durch zwei Nylonmembranen gebildeten Sandwich, sowie aus dem umgebenden Quarzsand.

Als biologisches System wurde schließlich die *in vitro*-Kultur von *Glomus intraradices* und Karottenwurzeln gewählt, da nur hier eine relativ einfache Ernte größerer Mengen sauberer und vitaler Hyphen möglich war.



**Abbildung 17: Geteilte Petrischale mit *Glomus intraradices*- inokulierter Wurzelkultur zur Hyphenernte**  
Wurzeln von *Daucus carota* wurden durch Transformation mit *Agrobacterium rhizogenes* in Kulturen gehalten und mit *G. intraradices* inokuliert. Die Wurzelkultur wurde auf eine Seite einer geteilten Petrischale gesetzt und die auswachsenden extraradikulären Hyphen aus dem anderen Kompartiment geerntet.

### 11.1 Phosphat

Eine Suppressive Subtraktive Hybridisierung (SSH) diente der Identifikation von Genen, die unter Phosphat-limitierten Bedingungen verstärkt exprimiert werden. *G. intraradices* wurde in einer *in vitro*-Kultur zusammen mit transformierten Karottenwurzeln angezogen und der Inhalt des Hyphenkompartiments nach vier Wochen ausgetauscht. In drei Platten wurde M-Medium mit einem Phosphatgehalt von 35  $\mu\text{M}$  eingefüllt, was einen Mangel für die Pflanze darstellt, in drei andere M-Medium mit einem erhöhtem Phosphatgehalt von 3,5 mM. Nach weiteren drei Wochen erfolgte die Ernte der Hyphen, die Extraktion der RNA und die Durchführung der SSH ausgehend von jeweils 250 ng RNA. Dabei wurde cDNA von Hyphen aus Medium mit hohem Phosphatgehalt von der cDNA aus Phosphat mangelernährten Hyphen abgezogen. Die Produkte der letzten PCR wurden kloniert. Es konnten etwa 320 Klone erzeugt und analysiert werden. In einer ersten Reverse Northern-Analyse von 79 Klonen wurden 27 Gene als differentiell exprimiert identifiziert und sequenziert. Das Ergebnis der anschließenden Homologiesuche ist in Tabelle 3 dargestellt. Es wurde bei 20 Klonen keine signifikante Homologie gefunden.

**Tabelle 3: Ergebnis der Sequenzierung von 7 differentiell exprimierten Klonen der Phosphat-SSH**

Klon	Länge (bp)	wahrscheinlich kodierend für	von Organismus	Signifikanz
C 9	374	hypothetisches Protein	<i>Nostoc sp.</i>	$3 e^{-22}$
C 10	540	Chitin Synthase Klasse IV	<i>Magnaporthe grisea</i>	$3 e^{-71}$
C 1	299	hypothetisches Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-21}$
B 2	154	Glycogen-Synthase	<i>Macaca mulatta</i>	$2 e^{-4}$
21	150	Skt 5 Protein (Chitin-Synthase)	<i>Encephalitozoon cuniculi</i>	$4 e^{-4}$
19	229	Antisense-Transkript ribosomaler RNA	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1 e^{-5}$
16	713	ABC-Transporter	<i>Oryza sativa</i>	$6 e^{-14}$

Weitere 83 Klone wurden sequenziert, ohne vorher die differentielle Expression zu überprüfen. Bei 67 Klonen konnte bei einer Suche mit BlastX (NCBI) keine signifikante Homologie in der Datenbank gefunden werden. Die Homologien der übrigen 16 Klone sind in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4: Ergebnis der Sequenzierung von 16 zufällig ausgewählten Klonen der Phosphat-SSH**

Klon	Länge (bp)	wahrscheinlich kodierend für	von Organismus	Signifikanz
A 2	644	Peroxidase Precursor	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$2 e^{-11}$
A 3	566	„far-red impaired response protein“	<i>Oryza sativa</i>	$3 e^{-4}$
A 10	392	Helikase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$2 e^{-4}$
B 2	331	unbenanntes Protein Produkt	<i>Homo sapiens</i>	$1 e^{-9}$
C 3	230	Ribonukleoprotein	<i>Homo sapiens</i>	$2 e^{-6}$
C 6	242	ähnlich zu „myotubularin dual specificity phosphatase“	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$1 e^{-12}$
C 10	476	Transkriptionsfaktor	<i>Candida albicans</i>	$7 e^{-19}$
D 3	344	Methionin-Synthase-Reduktase	<i>Homo sapiens</i>	$2 e^{-8}$
D 7	721	GRR 1 F-Box Protein (Signaltransduktion, Glucoserepression)	<i>Anopheles gambiae</i>	$1 e^{-7}$
D 11	462	26S Proteasom regulatorische Untereinheit	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-38}$
E 2	553	Transposase	<i>Drosophila melanogaster</i>	$1 e^{-14}$
E 5	531	Sphingosin-1-Phosphatase/Lyase	<i>Neurospora crassa</i>	$7 e^{-31}$
E 11	279	Mitose-Kontrollprotein	<i>Plasmodium falciparum</i>	0,009
F 10	282	Tuberin	<i>Homo sapiens</i>	$2 e^{-12}$
G 9	391	Protease/RT/RNase H/Integrase (Retrotransposon)	<i>Drosophila melanogaster</i>	$2 e^{-5}$
H 11	562	Helikase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$3 e^{-4}$

## 11.2 Schwermetalle

In einem analogen Ansatz zum Phosphat-Experiment wurden Hyphen mit Schwermetallen inkubiert. Beim Austausch des Festmediums im Hyphenkompartiment gegen Flüssigmedium wurden 4,5  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$ , 75  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  und 50  $\mu\text{M}$   $\text{CuCl}_2$  zugesetzt. Auch hier wurden von 320 erzeugten Klonen zunächst 70 in einer Reverse-Northern-Analyse überprüft und 25 Gene als durch Schwermetalle induziert bestätigt und sequenziert. Es wurde bei 13 Klonen keine signifikante Homologie gefunden.

**Tabelle 5: Ergebnis der Sequenzierung von 12 differentiell exprimierten Klonen der Schwermetall-SSH**

Klon	Länge (bp)	wahrscheinlich kodierend für	von Organismus	Signifikanz
A 7	614	Aldo-Keto-Reduktase	<i>Deinococcus radiodurans</i>	$1 e^{-57}$
A 10	207	Dna J-ähnliches Protein (heat shock protein)	<i>Nicotiana tabacum</i>	$7 e^{-15}$
7	533	Glutathion S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$4 e^{-17}$
5	500	Glutathion S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$2 e^{-19}$
17	523	Glutathion S-Transferase	<i>Glycine max</i>	$4 e^{-19}$
12	513	Glutathion S-Transferase	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	$3 e^{-14}$
D 1	631	Guanosin-Diphosphatase	<i>Kluyveromyces lactis</i>	$3 e^{-48}$
C 9	425	PEP-Carboxykinase	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	$2 e^{-66}$
C 3	487	Glutathion S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$1 e^{-15}$
C 1	284	Histon-Deacetylase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-7}$
B 11	292	Velvet A	<i>Aspergillus nidulans</i>	$9 e^{-9}$
B1	406	Glutathion S-Transferase	<i>Glycine max</i>	$3 e^{-12}$

Auch von dieser Bank wurden 89 zufällig ausgewählte Klone sequenziert, ohne vorher ihre differentielle Expression zu prüfen. Bei 27 Klonen wurde eine signifikante Homologie zu bekannten Proteinen in der BlastX-Datenbank gefunden. Auch hier wurde für einen sehr hohen Anteil der Klone von ca. 70 % keine Homologie gefunden.

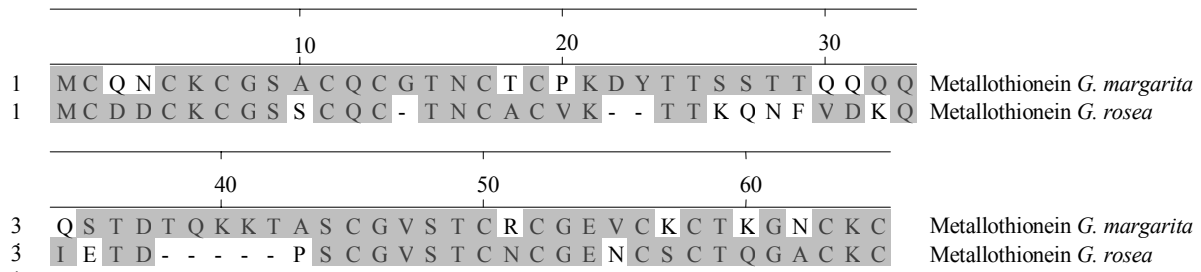
**Tabelle 6: Ergebnis der Sequenzierung von 27 zufällig ausgewählten Klonen der Schwermetall-SSH**

Klon	Länge (bp)	wahrscheinlich kodierend für	von Organismus	Signifikanz
M A 5	410	Cyclophilin 33B	<i>Homo sapiens</i>	$2 e^{-31}$
M A 10	551	Aldo-Keto-Reduktase	<i>Salmonella enterica</i>	$1 e^{-41}$
M B 1	305	Thioredoxin	<i>Aspergillus nidulans</i>	$4 e^{-9}$
M B 4	607	tRNA-Synthetase Klasse II	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-14}$
M B 5	528	Glutathion-S-Transferase	<i>Glycine max</i>	$1 e^{-19}$
M B 6	575	Glutathion-S-Transferase	<i>Glycine max</i>	$1 e^{-16}$
M B 7	516	Cytochrom P450	<i>Musca domestica</i>	$4 e^{-21}$
M B 10	536	hypothetisches Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$7 e^{-6}$
M C 2	512	hypothetisches Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-5}$
M C 3	510	Zink-Finger-Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$1 e^{-24}$
M C 10	476	CARG-Protein (Transkriptionsfaktor)	<i>Mus musculus</i>	$1 e^{-16}$
M D 2	435	Adrenoleukodystrophie Protein (ABC Transporter, Lipidmetabol.)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	$3 e^{-27}$
M D 5	541	Ribosomales Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$3 e^{-10}$
M D 8	298	Aldehyd-Dehydrogenase	<i>Homo sapiens</i>	$3 e^{-6}$
M D 9	632	Ornithin-Aminotransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$7 e^{-18}$
M F 7	722	HLA Kl. II Gen KE2 (Prefoldin)	<i>Homo sapiens</i>	$2 e^{-20}$
M F 9	668	Mehltau-assoziiertes Protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$6 e^{-4}$
M F 10	602	Glutathion-S-Transferase	<i>Naegleria fowleri</i>	$4 e^{-20}$
M G 3	227	Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$4 e^{-8}$
M G 10	405	60S ribosomales Protein	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-34}$
M H 5	527	Glutathion-S-Transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$7 e^{-19}$
M H 8	545	tRNA-Synthetase	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	$2 e^{-16}$
M H 10	453	hypothetisches Protein	<i>Nostoc sp.</i>	$1 e^{-30}$

Es konnten in beiden Banken einige Gene identifiziert werden, deren weitere Analyse vielversprechend scheint.

## 12. Das Metallothionein-Gen von *Gigaspora rosea*

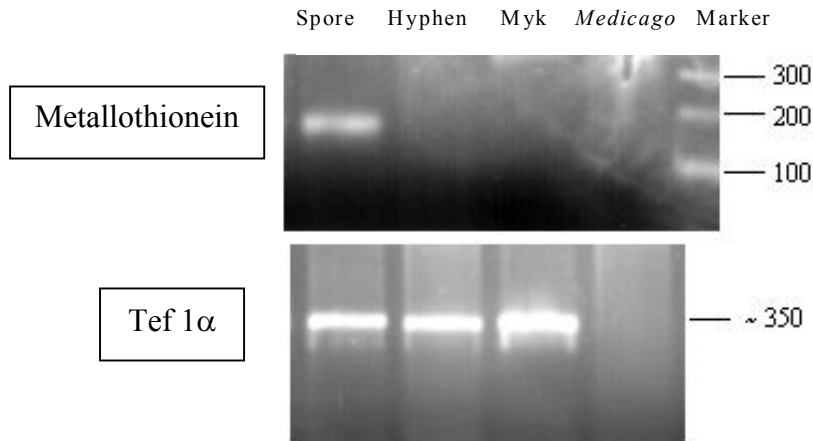
Zur molekularen Untersuchung der durch Mykorrhiza vermittelten erhöhten Schwermetalltoleranz von Pflanzen wurde zusätzlich in einem gerichteten Ansatz ein Genfragment eines potentiellen Metallothionein-Gens näher betrachtet. Es wurde in einer EST-Bank von ruhenden Sporen des Mykorrhizapilzes *G. rosea* gefunden. Der Sequenzvergleich mit anderen Metallothioneinen wie dem von *G. margarita* (Lanfranco, et al., 2002) ergab, dass die cDNA im 3' Bereich vollständig war, jedoch im 5' Bereich noch etwa 30 bp fehlten. Diese fehlende Sequenz wurde durch ein RACE aufgeklärt. Dabei wurde die SMART™-Technologie genutzt, bei der ein bekannter Adaptor am 5' Ende der cDNA vorhanden ist. In einer PCR konnte mit genspezifischen und dem entsprechenden Adaptorprimer der fehlende Bereich amplifiziert werden. In einer ersten PCR wurde mit dem SMART™ Oligo II und Metallo Giro 5'2, in einer zweiten „Nested PCR“ mit Metallo Giro 5'1 gearbeitet. Die PCR ergab nur eine sehr schwache Bande auf dem Gel, trotzdem wurde der gesamte Ansatz in einen PCR-Klonierungsvektor ligiert und in *E. coli* transformiert. Durch die folgende Sequenzierung konnte der fehlende Bereich aufgeklärt werden.



**Abbildung 18: Die Sequenz des Metallothioneins von *Gigaspora rosea* im Vergleich zu dem von *Gigaspora margarita***

Die von den cDNA Sequenzen abgeleiteten Proteine von GrosMT1 und GmarMT1 wurden mit dem Programm MEGalign verglichen und dargestellt.

Zur Untersuchung des Expressionsmusters dieses Gens in verschiedenen Entwicklungsstadien von *G. rosea* wurden spezifische Primer formuliert, die die gesamte Länge der cDNA umspannten. Nun wurde eine RT-PCR auf SMART™ cDNA von Sporen, Hyphen und Mykorrhiza durchgeführt. Die Abbildung 19 zeigt, dass das Gen nur in Sporen detektiert werden kann.



**Abbildung 19: RT-PCR des Metallothionein-Gens von *Gigaspora rosea***

Die gesamte Länge des Metallothionein-Gens wurde mit den spezifischen Primern Met Giro 1&2 aus cDNA unterschiedlicher Entwicklungsstadien von *G. rosea* amplifiziert. Als Kontrolle diente die Amplifikation eines Teiles des *Grosteif* 1-Gens, womit die Anwesenheit von genügend cDNA in allen Ansätzen nachgewiesen werden konnte.

Um zu prüfen, ob die kodierende Region dieses Gens tatsächlich eine erhöhte Schwermetallresistenz vermitteln kann, wurde sie in einen Hefeexpressionsvektor kloniert und für weitere Analysen in die Arbeitsgruppe von C. Azcon-Aguilar in Granada übergeben.

## V Diskussion

### Promotorsuche und Transformation von *P. indica*

Die Entwicklung eines leistungsfähigen Transformationssystems ist heutzutage fast eine Grundvoraussetzung für die effektive Analyse der Genexpression in Organismen (Hynes, 1996; Mullins & Kang, 2001). Zur Etablierung eines solchen Transformationssystems ist ein Vektor hilfreich, der einen starken und konstitutiv aktiven Promotor des jeweiligen Organismus enthält, welcher die Expression eines bestimmten Markergens steuert. Erfolgreich verwendet wurden dazu in Pilzen bereits die Promotoren für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  (Burmester, 1995; Schillberg, et al., 2000), für das Aktin (Kang et al., 1998; Schilde, et al., 2001), für die Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Christiansen, et al., 1997; Hirano et al., 1999; Ma et al., 2001) oder für das  $\beta$ -Tubulin (Christiansen, et al., 1997; Cummings, et al., 1999). Britta Bütchorn isolierte im Rahmen ihrer Doktorarbeit die kodierende Region des Translationselongationsfaktors  $1\alpha$ , da sich dafür aufgrund der großen Homologie der Gene verschiedener Organismen hier besonders gute degenerierte Primer zur Klonierung des Gens aus *P. indica* ableiten ließen (Bütchorn, 1999). Weiterhin konnte in einer Southern Blot Analyse gezeigt werden, dass nur eine Kopie des Gens im Genom existiert. Im Verlauf der Infektion von Pflanzen korreliert die nachweisbare Transkriptmenge des Gens mit der Besiedlungsdichte des Pilzes und kann somit auch als Standard zur Normalisierung pilzlicher RNA in infizierten Wurzeln genutzt werden (Rhody, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte der Promotor des Gens *Pitef 1* für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  von *Piriformospora indica* isoliert und in einen Expressionsvektor vor das Gen für die Hygromycin-Phosphotransferase (*hpt*) oder das GFP-Gen kloniert werden. Besonders das *hpt*-Gen wurde bereits erfolgreich eingesetzt, um Transformationssysteme für Pilze zu etablieren (Bills, et al., 1995; Schillberg, et al., 2000) (Balint-Kurti et al., 2001). Die Hygromycin-Phosphotransferase inaktiviert durch eine Phosphorylierung des Hygromycin B, welches die Proteinsynthese durch Störung der Translokation am 70S Ribosom hemmt, sowie Fehler beim Ablesen der mRNA verursacht. Als weiterer Marker wurde das Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) der Qualle *Aequorea victoria* verwendet. Das GFP ist seit seinem ersten Einsatz als Marker in transgenen *E. coli* und *Caenorhabditis elegans* aus der Molekularbiologie nicht mehr wegzudenken (Chalfie et al., 1994). Es wird häufig verwendet, um auf relativ unkomplizierte Weise die

Expression von Genen räumlich und zeitlich zu studieren und die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu beobachten, was besonders in der heutigen Zeit bei der funktionellen Analyse einer großen Anzahl von Genen aus den Sequenzierprojekten zunehmend an Wichtigkeit gewinnt (Simpson et al., 2001). Zum Studium des Infektionsmodus von phytopathogenen Pilzen ist es sehr gut geeignet, da durch die Fluoreszenz in den pilzlichen Hyphen die Kolonisierung der Pflanze durch den Pilz *in vivo* verfolgt werden kann (Rohel, et al., 2001; Spellig et al., 1996; Vandenwymelenberg et al., 1997). Dies stellt einen großen Vorteil gegenüber den meisten Färbungen dar, bei denen die Organismen abgetötet werden und so eine Verfolgung der Infektion über einen bestimmten Zeitraum nicht möglich ist.

Zur Transformation von Pilzen stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Die Transformation von Protoplasten durch Polyethylenglycol oder Elektroporation ist die am häufigsten verwendete Methode (Kinghorn & Turner, 1992). Die Versuche, Protoplasten von *P. indica* zu erzeugen und zu regenerieren scheiterte jedoch, da die Protoplasten nicht wieder auskeimen konnten (Britta Bütchorn, persönliche Mitteilung). Dies beruht wahrscheinlich auf dem Unvermögen des Pilzes, eine neue Zellwand auszubilden. Als nächste Möglichkeit wurde die Transformation über 'Particle Bombardment' getestet, die ebenfalls zur Transformation von Pilzen angewendet wird (Bills, et al., 1999; Herzog, et al., 1996). Dabei werden mit Plasmid-DNA beschichtete Goldpartikel durch hohen Druck in die Zellen eingebracht. Es konnte jedoch mit dieser Methode keine Einschleusung erreicht werden. Wahrscheinlich wurden die sehr feinen Hyphen und die relativ kleinen Sporen des Pilzes durch die Goldpartikel zu stark beschädigt, obwohl bereits mit der kleinsten Korngröße gearbeitet wurde. Eine weitere Technik stellt die *Agrobacterium*-vermittelte Transformation dar. Diese eigentlich für Pflanzen entwickelte Methode lässt sich mit einigen Abwandlungen auch für Pilze verwenden (Bundock, et al., 1995; Degroot, et al., 1998; Mikosch et al., 2001; Pardo, et al., 2002). Die Bakterien sind in der Lage, ein Plasmid mit der gewünschten Fremd-DNA in den Pilz einzuschleusen und stabil ins Genom zu integrieren. Wichtig ist hier die Zugabe des pflanzlichen Induktionsstoffes Acetosyringon, welcher die Virulenz der Agrobakterien auslöst. Dieser wurde schon erfolgreich bei der Transformation von monokotyledonen Pflanzen eingesetzt, die das *Agrobacterium* normalerweise ebenfalls nicht infizieren kann (Komari et al., 1998). Auch mit diesem Ansatz ließen sich keine Transformanten erzeugen. Mögliche Fehlerquellen sind eine ungenügende Virulenz der Bakterien, die Zusammensetzung der pilzlichen Zellwand durch eine eventuell induzierte Abwehr des Pilzes oder die Instabilität der Fremd-DNA in der Zelle. Auch die Auswahl des

Bakterienstamms kann das Ergebnis der Transformation beeinflussen. Es konnte also mit keiner der momentan für die Transformation von Pilzen zur Verfügung stehenden Methoden eine erfolgreiche Einschleusung der Vektoren in die pilzlichen Zellen erreicht werden.

### **Suche eines nahen Verwandten**

Wegen der misslungenen Transformationsversuche von *P. indica* wurde die Suche nach einem nahe verwandten Pilz aufgenommen, bei dem vielleicht eine bessere Transformierbarkeit vorliegen könnte. Aufgrund morphologischer Merkmale und physiologischer Eigenschaften, wie der Fähigkeit zur Ausbildung einer Orchideenmykorrhiza, wurden von Dr. K.-H. Rexer einige Isolate ausgewählt, die dann mit molekularen Methoden bezüglich ihrer phylogenetischen Verwandtschaft zu *P. indica* untersucht wurden. Es ergab sich ein hoher Verwandtschaftsgrad zu der Familie *Sebacinaceae*, deren Mitglieder Orchideen- und/oder Ektomykorrhiza ausbilden (Warcup, 1988; Weiss & Oberwinkler, 2001). Getestet wurden verschiedene Isolate von *Sebacina vermifera*. Dieser Pilz wurde erstmals von Prof. Oberwinkler in Bayern beschrieben (Oberwinkler, 1964) und nur wenig später dann auch von Prof. Warcup in Australien gefunden (Warcup & Talbot, 1967). *S. vermifera* kann sowohl eine Orchideenmykorrhiza als auch eine Endo- und Ektomykorrhiza ausbilden (Warcup, 1988). Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch eine Besiedlung einer monokotyledonen Pflanze (*Zea mays*) erreicht werden. Die höchste Ähnlichkeit zu *P. indica* in allen untersuchten Bereichen zeigte Isolat 29830, welches 1985 von P. G. Williams in Australien beschrieben wurde (Williams, 1985). Interessanterweise wurde dieses Isolat wie auch *P. indica* aus Sporen eines arbuskulären Mykorrhizapilzes isoliert. Die Homologie im Bereich der ITS-Region ist sogar so hoch, dass man von Vertretern der gleichen Art sprechen kann. Überraschend war das Ausmaß der Förderung des Pflanzenwachstums, welches das Potential von *P. indica* noch übertraf. Der Mechanismus dieses Phänomens ist ungeklärt. Es könnte bedingt sein durch die verbesserte Bereitstellung von Nährstoffen wie bei der arbuskulären Mykorrhiza (Marschner & Dell, 1994), durch die Produktion von Phytohormonen wie man es bei einigen pathogenen und Ektomykorrhizapilzen beobachten kann (Barker & Tagu, 2000; Rademacher, 1994) oder eine Kombination beider Faktoren. Eine genauere Untersuchung der Grundlagen des offensichtlich sehr weiten Wirtsspektrums sowie der Mechanismen der Wachstumsförderung durch diesen Pilz erscheint vielversprechend.

Die Transformationsversuche wurden dann mit den gleichen Konstrukten und Konditionen wie bei *P. indica* wiederholt, ergaben jedoch ebenfalls keine positiven Ergebnisse. Da

besonders in der *Agrobacterium*-vermittelten Transformation noch einige Möglichkeiten, wie die Verwendung eines anderen Bakterienstamms, offen sind, könnten hier weitere Versuche noch zum Erfolg führen. Dass die Verwendung eines geeigneten Stamms einer der kritischen Faktoren für die erfolgreiche Transformation ist, konnte bereits bei Pflanzen gezeigt werden (Torregrosa et al., 2002).

### **Promotorsuche bei AM Pilzen**

Auch zur Untersuchung der Genexpression in arbuskulären Mykorrhizapilzen wäre die effiziente Transformation ein wichtiges Werkzeug. Es konnte hier bereits mit dem 'Particle Bombardment' eine Einschleusung von Plasmid-DNA in Sporen von *Gigaspora rosea* (Forbes, et al., 1998), *Gigaspora margarita* und *Glomus mosseae* erreicht werden (Harrier, et al., 2002). Da in den Konstrukten der heterologe Promotor für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase von *Aspergillus nidulans* verwendet wurde, ist die Expression der Markergene nicht sehr stark. Bei der Verwendung des  $\beta$ -Glucuronidase-Gens reichte dies aus, um die erfolgreiche Transformation nachzuweisen (Harrier, et al., 2002). Sollte aber das GFP-Gen eingesetzt werden, um eine *in vivo* Beobachtung der pilzlichen Entwicklung zu ermöglichen, wäre der Promotor zu schwach. Hier ist also die Isolierung eines homologen Promotors und dessen Einbau in die Konstrukte sinnvoll. Im Rahmen des EU-Projekts GENOMYCA sollten starke und konstitutiv exprimierte Promotoren der drei erwähnten Pilze isoliert werden. Da aus einem früheren Projekt bereits Sequenzen von  $\beta$ -Tubulin-Genen vorlagen (Bütehorn et al., 1999; Franken, et al., 1997), wurde zunächst deren Expression in den verschiedenen Entwicklungsstadien der Pilze näher untersucht. Dabei wurde besonders auf die getrennte Betrachtung der beiden Loci des Gens Wert gelegt, was in früheren Analysen nicht geschehen war. Überraschenderweise ergab sich eine starke Regulation der Loci des Gens, wobei jedoch in einem Organismus immer mindestens einer der beiden Loci exprimiert wird. Einen guten Überblick über das Zytoskelett der Mykorrhiza-Symbiose gibt das kürzlich erschienene Review von Timonen (Timonen & Peterson, 2002). So ist bereits seit längerem bekannt, dass die Etablierung der Mykorrhiza-Symbiose zu einer umfangreichen Umorganisation des pflanzlichen Cytoskeletts führt (Genre & Bonfante, 1997). Über die Organisation des pilzlichen Cytoskeletts liegen dagegen bisher nur sehr wenig Daten vor (Aström et al., 1994; Timonen et al., 2001). Erste Hinweise ergaben, dass sich überraschenderweise die Mikrotubuli der intrazellulären Hyphen und Arbuskel nur wenig von denen der extraradikulären Hyphen unterscheiden (Timonen, et al., 2001). In beiden Fällen erscheinen die Mikrotubuli als längliche Filamente und Bündel. Auf molekularer

Ebene ist eine differentielle Expression von  $\beta$ -Tubulin-Genen bereits bei Tieren (Hoyle et al., 1995) und Pflanzen (Artlip et al., 1995; Vassilevskaia et al., 1996) bekannt. In AM Pilzen konnte bereits eine Regulation von unterschiedlichen Genkopien der Chitin-Synthase Klasse II beobachtet werden (Lanfranco et al., 1999; Ubalijoro et al., 2001). Anscheinend haben diese Pilze ein komplexes System zur Regulation der Expression von Genen nicht nur zwischen den verschiedenen Kernen, sondern auch innerhalb eines einzelnen Kerns, welches sich wiederum von Art zu Art unterscheidet.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde wie schon bei *P. indica* bei der Promotorisolierung das Gen für den Translationselongationsfaktor 1  $\alpha$  verwendet. Die RT-PCR zeigte in allen Entwicklungsstadien der getesteten Pilze eine hohe Expression. Da sich in einem genomischen Southern Blot erste Hinweise auf das Vorliegen nur einer Kopie im Genom zeigten (Daten nicht gezeigt, da Signale nur sehr schwach), scheint dies ein guter Promotor für die Überexpression von Zielgenen in AM Pilzen zu sein. Trotz verschiedener Ansätze, den Promotor aus genomischen Banken zu isolieren, liegt die Sequenz leider zur Zeit noch nicht vor.

### **Identifikation interessanter Zielgene**

Die herausragendste Eigenschaft der AM Pilze ist ihre Fähigkeit, das Wachstum (Marschner & Dell, 1994) und die Gesundheit (Bodker, et al., 1998; Dugassa et al., 1996) von Pflanzen zu verbessern. Die genauen molekularen Mechanismen sind dabei noch größtenteils ungeklärt. Durch die SMART™ Technologie (BD Clontech) wurde ein entscheidender Fortschritt bei der Untersuchung der differentiellen Genexpression erzielt. Nun ist es möglich auch mit dem Einsatz kleinster Mengen cDNA eine große Anzahl regulierter Transkripte zu identifizieren. Dabei wurden Gene identifiziert, die in die frühe Entwicklung keimender Sporen von *G. mosseae* involviert sind (Requena, et al., 2002) oder bei der Reaktion des Pilzes *G. rosea* auf pflanzliche Wurzelexsudate eine Rolle spielen (Tamasloukht et al., 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte mit dieser Technik die molekulare Antwort des AM Pilzes *Glomus intraradices* auf Phosphatmangel und Schwermetallbelastung untersucht werden. In den resultierenden cDNA-Banken fand sich eine extrem hohe Anzahl von Transkripten, für die keine Homologie in den gängigen Datenbanken gefunden wurde. Dies zeigt deutlich, dass hier noch großer Bedarf an weiteren Untersuchungen ist. Es wurden aber auch in beiden Fällen einige Homologien zu Genen gefunden, die interessante Kandidaten für die geplanten Überexpressionen sein könnten.

In der Phosphat-Bank wurde zum Beispiel ein Transkript mit hoher Homologie zu einem „ATP-binding cassette“ (ABC)-Transporter gefunden. Diese Klasse von Transportern kann unter ATP-Verbrauch Substanzen über eine Membran transportieren. Die Funktion dieser Transporter in Pilzen wurde bisher besonders im Hinblick auf die Detoxifikation der Zelle bei Antibiotika-Belastung untersucht (Schoonbeek et al., 2002). Die Transporter können aktiv toxische Komponenten aus der Zelle schleusen und so eine gewisse Resistenz gegen Antibiotika vermitteln. Im vorliegenden System wäre eine Akkumulierung von toxischen Substanzen in der Zelle durch die Phosphatmangel-Situation denkbar, bei deren Ausschleusung der Transporter beteiligt sein könnte. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Funktion als Phosphattransporter. Es konnte bereits in *E. coli* gezeigt werden, dass ein Hoch-Affinitäts-Phosphattransporter ebenfalls eine „ATP-binding cassette“ besitzt (Harris et al., 2001). In *E. coli* wird dieser Transporter unter Phosphatmangel zusätzlich zu dem konstitutiv exprimierten Phosphattransporter Pit angeschaltet, der von dem Protonengradienten betrieben wird. Die Abhängigkeit von ATP läßt sich mit einem effizienten, aktiven Transportprozeß gegen einen bestehenden Phosphatgradienten erklären. Da die Aufnahme von Phosphat aus dem Boden eine wichtige Funktion der AM Pilze ist, wird bereits seit längerem versucht, die zugrundeliegenden Mechanismen auf physiologischer und molekularer Ebene zu verstehen (Smith & Smith, 1990). Ein Durchbruch auf diesem Gebiet gelang mit der Charakterisierung des ersten pilzlichen Phosphattransporters (Harrison & Van Buuren, 1995) und des ersten pflanzlichen Phosphattransporters, der ausschließlich während der Mykorrhizasymbiose in den Arbuskeln exprimiert wird (Harrison et al., 2002). Neben diesen Zielgenen wäre natürlich auch der Mechanismus der Signaltransduktion interessant. Der ebenfalls in der SSH-Bank gefundene Klon mit hoher Homologie zu einem Transkriptionsfaktor ist ein erster Ansatzpunkt zur Identifikation der beteiligten Faktoren.

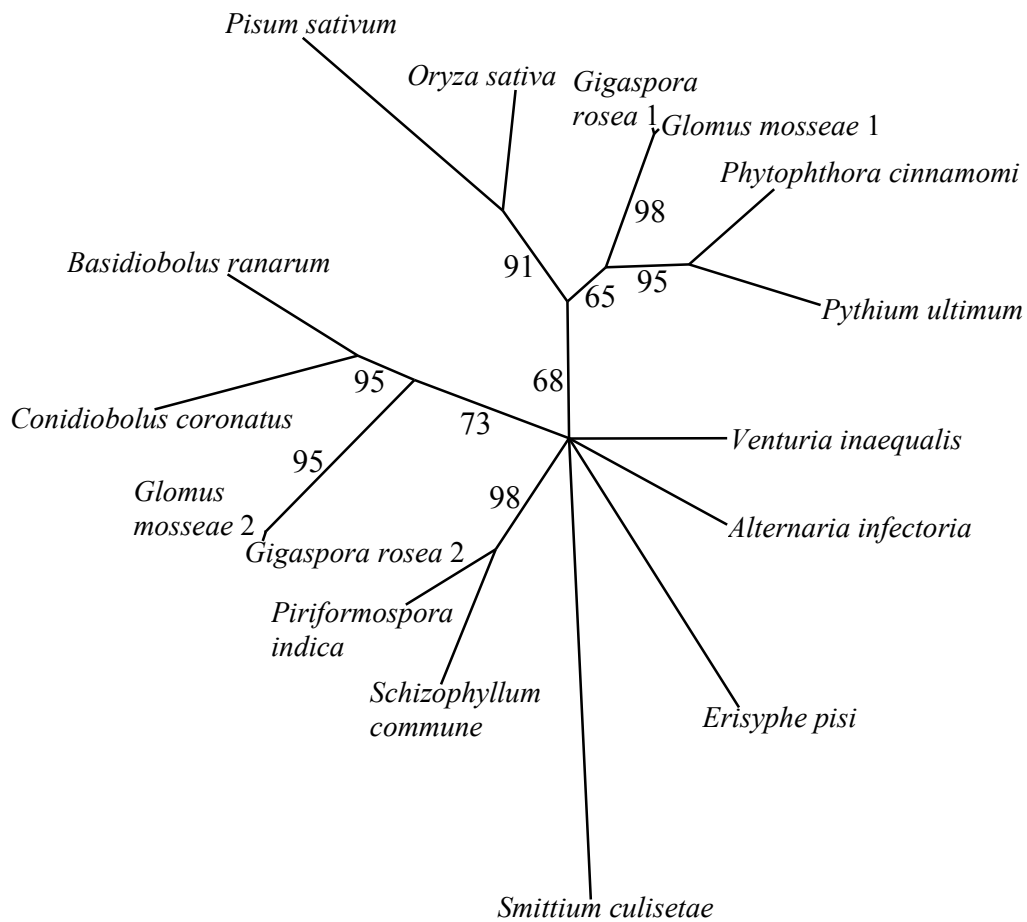
In der Schwermetall-Bank wurden mehrere Klone mit hoher Homologie zu einer Glutathion-S-Transferase gefunden. Dieses ubiquitär verbreitete Enzym spielt nicht nur eine Rolle im normalen zellulären Metabolismus, sondern vermittelt auch eine gewisse Resistenz gegen eine ganze Reihe von Stressfaktoren wie zum Beispiel Herbizide, oxidativer Stress, Pathogenbefall und Schwermetalltoxizität bei Pflanzen (Marrs, 1996). Dabei wird ein reduziertes Glutathion (GSH) auf die elektrophile toxische Substanz übertragen und dieser Komplex dann ausgeschieden oder, bei Pflanzen, in der Vakuole eingelagert. Die vermehrte Expression der GSTs bei Schwermetallbelastung von Pflanzen basiert wahrscheinlich auf dem erhöhten oxidativen Stress, den die Schwermetalle in der Zelle auslösen. Die Bedeutung der GST bei der Belastung durch Schwermetalle ist auch bei Pilzen bereits bekannt und

untersucht (Fraser et al., 2002). Weitere Klone der SSH-Bank zeigen ebenfalls Homologien zu Stress-induzierten Proteinen wie dem Cyclophilin oder dem Mehltau-assoziierten Protein. Einen Hinweis auf den Mechanismus der differentiellen Expression von Genen während der Schwermetall-Belastung gibt die mögliche Anwesenheit einer Histon-Deacetylase. Dieses Enzym spielt zusammen mit seinem Gegenspieler, der Histon-Acetylase, eine wichtige Rolle bei der Aktivierung (Transkription) oder Ruhigstellung bestimmter Abschnitte des Genoms (Graessle et al., 2000; Graessle et al., 2001).

Neben den ungerichteten Ansätzen der SSH-Banken wurde auch gezielt ein Gen untersucht, dass sehr wahrscheinlich in die Resistenz gegen Schwermetalle involviert ist. Das Metallothionein wurde in einer EST-Bank aus ruhenden Sporen von *G. rosea* identifiziert. Es zeigt die typischen CXC-Motive aus zwei benachbarten Cysteinen, die die Metallionen binden können und so unschädlich machen. Die Überexpression dieses Gens in AM Pilzen ist erfolgversprechend, da die cDNA mit 174 bp sehr kurz ist und sich somit wahrscheinlich leichter in die Zellen und das Genom einbringen lässt als eine mehrere hundert Basen lange Sequenz.

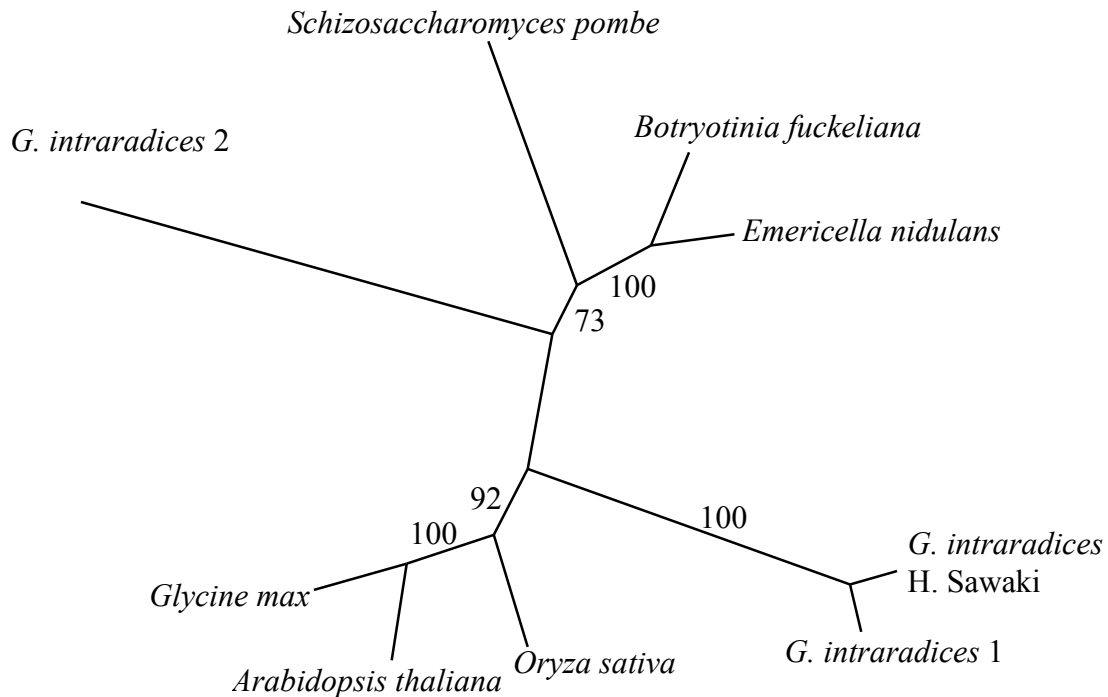
### **Genfamilien in AM Pilzen**

Bei der Auswertung der SSH-Klone fiel auf, dass unterschiedliche Klone mit Sequenzhomologie zu GSTs vorhanden waren, von denen eine sehr ähnlich zu dem entsprechenden pilzlichen Gen war, während andere die größten Homologien zu pflanzlichen Genen zeigten. Da schon die beiden Loci des  $\beta$ -Tubulin-Gens in zwei verschiedenen Clustern auftraten (Abb. 20), lag die Vermutung nahe, dass es sich bei den GST-Genen um ein ähnliches Phänomen handelt. Daher wurden aus den Datenbanken die Sequenzen für weitere GST-Gene herausgesucht und mit denen von *G. intraradices* verglichen (Abb.21).



**Abbildung 20: Phylogenetischer Stammbaum der  $\beta$ -Tubulin-Gene**

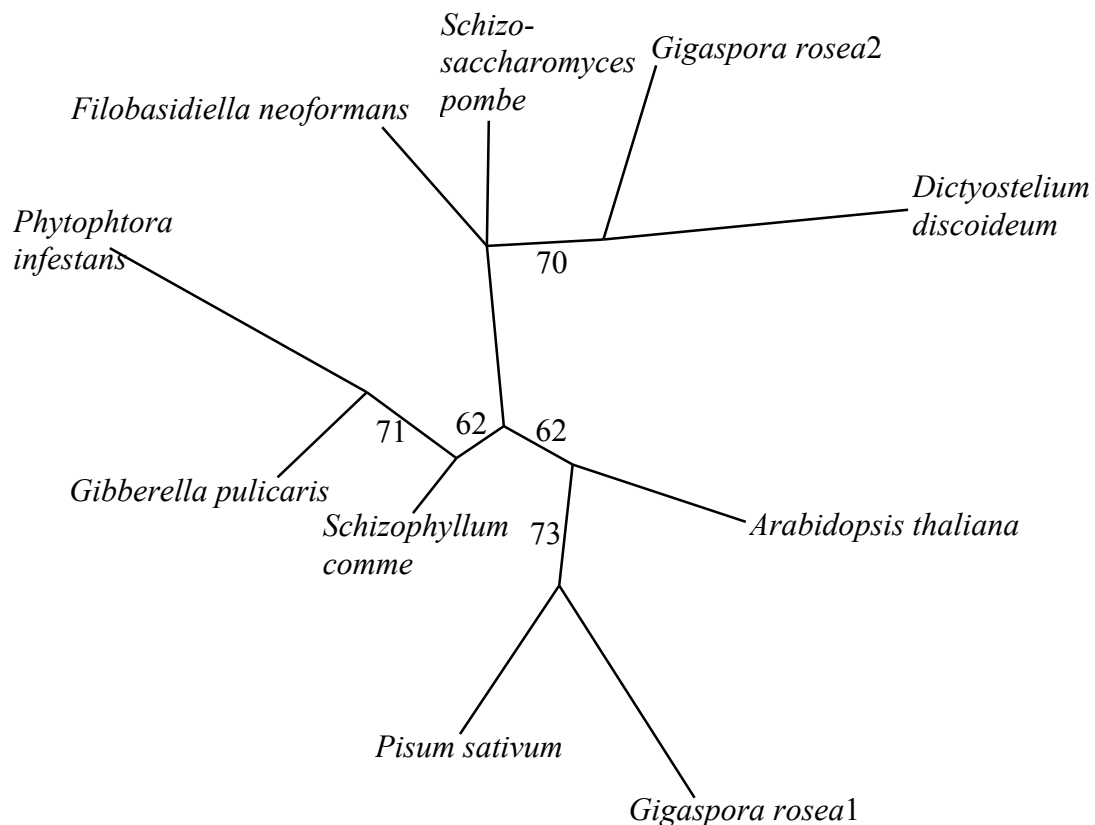
Die Sequenzen verschiedener  $\beta$ -Tubulin-Gene aus der NCBI-Datenbank wurden mit denen der beiden Loci von *Gigaspora rosea* und *Glomus mosseae* verglichen (ClustalW), phylogenetisch analysiert (Phylip) und als Stammbaum dargestellt (Treeview).



**Abbildung 21: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Glutathion S-Transferasen**

Die zwei Sequenzen der Glutathion S-Transferase-Gene von *Glomus intraradices* aus der Schwermetall-SSH-Bank wurden mit anderen GSTs aus der NCBI-Datenbank verglichen. Darunter befindet sich auch eine GST-Gensequenz von *G. intraradices*, die von H. Sawaki in einer EST-Bank identifiziert wurde (Sawaki, 2002). Die Sequenzen wurden mit dem Programm ClustalW verglichen, die Phylogenie mit dem Programm Phylip erstellt und mit Treeview dargestellt.

Aus dem Stammbaum lässt sich deutlich ersehen, dass sich die beiden GST-Gene aus *G. intraradices* ähnlich wie die  $\beta$ -Tubulin-Gene in zwei unterschiedliche Cluster einordnen lassen. Auch hier zeigt die eine Sequenz größere Verwandtschaft zu pflanzlichen Sequenzen, während die andere eher pilzlichen Sequenzen ähnelt. Um diesen Befund noch weiter zu untermauern, wurde als drittes das Ubiquitin-Gen betrachtet (Abb. 22), von dem ebenfalls zwei unterschiedliche Sequenzen in *Gigaspora rosea* vorliegen (Stommel, et al., 2001).



**Abbildung 22: Phylogenetischer Stammbaum verschiedener Ubiquitin-Gene**

Die zwei Sequenzen des Ubiquitin-Gens aus einer EST-Bank von *Gigaspora rosea* wurden mit weiteren Ubiquitin-Sequenzen aus der NCBI-Datenbank verglichen und die phylogenetische Verwandtschaft mit den Programmen ClustalW (Sequenzvergleich), Phylip (Phylogenie) und Treeview (Stammbaum) dargestellt.

Auch für das Ubiquitin lassen sich die beiden Genkopien phylogenetisch in unterschiedliche Gruppen einordnen. Wie es zu diesem Phänomen kommt, kann nur spekuliert werden. Das Nächstliegende ist ein Gentransfer zwischen den beiden Partnern der Mykorrhizasymbiose. Die Symbiose zwischen Pilz und Pflanze existiert schon seit sehr langer Zeit (400 – 460 Mio. Jahre), und somit gibt es auch eine lange Koevolution. Welcher der Partner dem anderen die Genkopie übertragen hat, lässt sich daher nur schwer nachvollziehen. Hiromichi Sawaki diskutiert im Fall der GST den Transfer vom Pilz zur Pflanze, da es ein protektives Gen bei der Adaption von Pflanzen an das Leben an Land gewesen sein könnte (Sawaki, 2002). Diese Theorie geht von dem Modell aus, dass die heutigen Landpflanzen aus einer Symbiose zwischen Pilzen und Algen entstanden sind (Pirozynski & D.W., 1975). Der umgekehrte Fall des Transfers ist aber ebenfalls denkbar. Dass Übertragung von Genen der Pflanze auf den Pilz tatsächlich vorkommen kann, wurde im Falle der Kokultivierung von *Aspergillus niger* mit transgenen Pflanzen gezeigt (Hoffmann et al., 1994). Zwei *Brassica*-Arten, *Datura innoxin* und *Vicia narbonensis* wurden mit dem Hygromycin-Phosphotransferase-Gen transformiert und in einem Mikrokosmos mit *Aspergillus niger* kokultiviert. Daraufhin waren

signifikant mehr Pilze resistent gegen Hygromycin als in der Kultivierung mit nicht transformierten Pflanzen. In einem Fall konnte das *hpt*-Gen sogar mit Teilen des flankierenden Pflanzentransformationsvektors in dem Pilz nachgewiesen werden, was den Transfer beweist. In einer so engen Symbiose wie der Mykorrhiza wäre es also durchaus möglich, dass eine Kopie des Gens auf den Pilz transferiert wurde. Es gibt noch eine weitere Möglichkeit des Gentransfers in AM Pilze und zwar die Übertragung von Genen aus mykopathogenen Oomycota. Die Sequenzen der  $\beta$ -Tubulin-Gene von Pflanzen und Oomyceten sind nahe verwandt und somit kann man nicht genau sagen, woher die entsprechende Genkopie stammt (Mu et al., 1999). Die Anwesenheit von vielen verschiedenen Organismen in AM Pilzen ist bereits seit längerem bekannt. Aus Sporen von *Gigaspora gigantea* konnten 44 verschiedene Pilzarten isoliert werden (Lee & Koske, 1994). Auch hier liegt eine sehr enge räumliche und physiologische Bindung vor, die einen Austausch von genetischem Material möglich macht.

### **Ausblick**

Die nächsten Schritte zur Etablierung eines Transformationssystems für *P. indica* oder das Isolat 29830 müssen in der Optimierung des *Agrobacterium*-vermittelten Ansatzes liegen. Durch die Verwendung eines anderen Plasmids oder Bakterienstamms könnte vielleicht eine Einschleusung der DNA in die pilzliche Zelle erreicht werden.

Für die Verbesserung der Eigenschaften der AM Pilze stehen nunmehr einige interessante Gene zur Verfügung, deren Überexpression die Schlüsseleigenschaften der Pilze verbessern könnte. Die Bemühungen müssen sich hier auf die Isolierung der Promotorsequenz des Gens für den Translationselongationsfaktor  $1\alpha$  konzentrieren. Bis zur potentiellen Anwendung dieser genetisch veränderten Pilze in der Landwirtschaft oder im Zierpflanzenbau ist es sicher noch ein weiter Weg, der sich aber in ferner Zukunft auszahlen könnte.

## VI Literatur

- Ahman, J., Johansson, T., Olsson, M., Punt, P. J., van den Hondel, C. & Tunlid, A. (2002).** Improving the pathogenicity of a nematode-trapping fungus by genetic engineering of a subtilisin with nematotoxic activity. *Applied & Environmental Microbiology* **68**, 3408-3415.
- Akiyoshi, D. E., Klee, H., Amasino, R. M., Nester, E. W. & Gordon, M. P. (1984).** T-DNA of *Agrobacterium tumefaciens* encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5994-8.
- Armaleo, D., Ye, G. N., Klein, T. M., Shark, K. B., Sanford, J. C. & Johnston, S. A. (1990).** Biolistic nuclear transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and other fungi. *Curr Genet* **17**, 97-103.
- Artlip, T. S., Setter, T. L. & Madison, J. T. (1995).** Tubulin Isotypes in Maize Endosperm - Alterations During Development and Water Deficit. *Physiologia Plantarum* **94**, 158-163.
- Ashford, A. E. & Allaway, W. G. (2002).** The role of the motile tubular vacuole system in mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **244**, 177-187.
- Aström, H., Giovannetti, M. & Raudaskoski, M. (1994).** Cytoskeletal components in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**, 309-312.
- Auge, R. M. (2001).** Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis [Review]. *Mycorrhiza* **11**, 3-42.
- Balint-Kurti, P. J., May, G. D. & Churchill, A. C. L. (2001).** Development of a transformation system for *Mycosphaerella* pathogens of banana: a tool for the study of host/pathogen interactions. *FEMS Microbiology Letters* **195**, 9-15.
- Barker, S. J. & Tagu, D. (2000).** The roles of auxins and cytokinins in mycorrhizal symbioses. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 144-154.
- Becard, G. & Fortin, J. A. (1988).** Early events of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *The New Phytologist* **108**, 211-218.
- Bills, S., Podila, G. K. & Hiremath, S. (1999).** Genetic engineering of an ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* for use as a biological control agent. *Mycologia* **91**, 237-242.
- Bills, S. N., Richter, D. L. & Podila, G. K. (1995).** Genetic Transformation of the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus* by Particle Bombardment. *Mycological Research* **99**, 557-561.

- Blechert, O., Kost, G., Hassel, A., Rexer, K.-H. & Varma, A. (1998).** First remarks on the symbiotic interaction between *Piriformospora indica* and terrestrial orchids. In *Mycorrhiza*, pp. 683-688. Edited by A. Varma & B. Hock. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Blee, K. A. & Anderson, A. J. (2000).** Defense responses in plants to arbuscular mycorrhizal fungi. In *Current Advances in Mycorrhizae Research*. Edited by G. K. Podila & D. D. Douds. St. Paul, Minnesota: APS Press.
- Bodker, L., Kjoller, R. & Rosendahl, S. (1998).** Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* **8**, 169-174.
- Bundock, P., Dendulkas, A., Beijersbergen, A. & Hooykaas, P. J. J. (1995).** Trans-Kingdom T-DNA Transfer from *Agrobacterium Tumefaciens* to *Saccharomyces Cerevisiae*. *EMBO Journal* **14**, 3206-3214.
- Burmester, A. (1995).** Analysis of the Gene for the Elongation Factor-1-Alpha from the Zygomycete *Absidia-Glauca* - Use of the Promoter Region for Constructions of Transformation Vectors. *Microbiological Research* **150**, 63-70.
- Bütehorn, B. (1999).** Erste cytologische und molekulare Untersuchungen zu *P. indica*, einem pflanzenwachstumsfördernden Endophyten. *Doktorarbeit Philipps-Universität Marburg*.
- Bütehorn, B., Gianinazzi-Pearson, V. & Franken, P. (1999).** Quantification of beta-tubulin RNA expression during asymbiotic and symbiotic development of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research* **103**, 360-364.
- Bütehorn, B., Rhody, D. & Franken, P. (2000).** Isolation and characterisation of Pitef1 encoding the translation elongation factor EF-1 alpha of the root endophyte *Piriformospora indica*. *Plant Biology* **2**, 687-692.
- Caplan, A. B., Van Montagu, M. & Schell, J. (1985).** Genetic analysis of integration mediated by single T-DNA borders. *J Bacteriol* **161**, 655-64.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. (1994).** Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.
- Christiansen, S. K., Justesen, A. F. & Giese, H. (1997).** Disparate Sequence Characteristics of the Erysiphe Graminis F Sp Hordei Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene. *Current Genetics* **31**, 525-529.
- Covert, S. F., Kapoor, P., Lee, M. H., Briley, A. & Nairn, C. J. (2001).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Fusarium circinatum*. *Mycological Research* **105**, 259-264.

- Cummings, W. J., Celerin, M., Crodian, J., Brunick, L. K. & Zolan, M. E. (1999).** Insertional mutagenesis in *Coprinus cinereus*: use of a dominant selectable marker to generate tagged, sporulation-defective mutants. *Current Genetics* **36**, 371-382.
- de la Riva, G. A., González-Cabrera, J., Vázquez-Padrón, R. & Ayra-Pardo, C. (1998).** *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* **1**, No 3.
- Degroot, M. J. A., Bundock, P., Hooykaas, P. J. J. & Beijersbergen, A. G. M. (1998).** *Agrobacterium Tumefaciens*-Mediated Transformation of Filamentous Fungi. *Nature Biotechnology* **16**, 839-842.
- Dugassa, G. D., Vonalten, H. & Schonbeck, F. (1996).** Effects of Arbuscular Mycorrhiza (Am) on Health of *Linum Usitatissimum* L Infected by Fungal Pathogens. *Plant & Soil* **185**, 173-182.
- Ezawa, T., Smith, S. E. & Smith, F. A. (2001).** Differentiation of polyphosphate metabolism between the extra- and intraradical hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* **149**, 555-563.
- Fincham, J. R. S. (1989).** Transformation of fungi. *Microbiological Reviews* **53**, 148-170.
- Forbes, P. J., Millam, S., Hooker, J. E. & Harrier, L. A. (1998).** Transformation of the Arbuscular Mycorrhiza *Gigaspora Rosea* by Particle Bombardment. *Mycological Research* **102**, 497-501.
- Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. & Piche, Y. (2002).** Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures [Review]. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **80**, 1-20.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. & Woo, S. C. (1983).** Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4803-7.
- Frank, A. B. (1885).** Über die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Bäume durch unterirdische Pilze. *Bericht der deutschen botanischen Gesellschaft* **3**, 128-148.
- Franken, P., Lapopin, L., Meyergauen, G. & Gianinazzipearson, V. (1997).** Rna Accumulation and Genes Expressed in Spores of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus, *Gigaspora Rosea*. *Mycologia* **89**, 293-297.
- Franken, P. & Requena, N. (2001).** Analysis of gene expression in arbuscular mycorrhizas: new approaches and challenges [Review]. *New Phytologist* **150**, 517-523.

**Fraser, J. A., Davis, M. A. & Hynes, M. J. (2002).** A gene from *Aspergillus nidulans* with similarity to URE2 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a glutathione S-transferase which contributes to heavy metal and xenobiotic resistance. *Applied & Environmental Microbiology* **68**, 2802-2808.

**Galli, U., Schuepp, H. & Brunold, C. (1994).** Heavy metal binding by mycorrhizal fungi. *Physiologia Plantarum* **92**, 364-368.

**Genre, A. & Bonfante, P. (1997).** A Mycorrhizal Fungus Changes Microtubule Orientation in Tobacco Root Cells. *Protoplasma* **199**, 30-38.

**George, E., Marschner, H. & Jakobsen, I. (1995).** Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Uptake of Phosphorus and Nitrogen from Soil. *Critical Reviews in Biotechnology* **15**, 257-270.

**Gianinazzi-Pearson, V. (1996).** Plant cell responses to arbuscular mycorrhizal fungi - getting to the roots of symbiosis [Review]. *Plant Cell* **8**, 1871-1883.

**Gordon, C., Thomas, S., Griffen, A., Robson, G. D., Trinci, A. P. J. & Wiebe, M. G. (2001).** Combined use of growth rate correlated and growth rate independent promoters for recombinant glucoamylase production in *Fusarium venenatum*. *FEMS Microbiology Letters* **194**, 229-234.

**Graessle, S., Dangl, M., Haas, H., Mair, K., Trojer, P., Brandtner, E. M., Walton, J. D., Loidl, P. & Brosch, G. (2000).** Characterization of two putative histone deacetylase genes from *Aspergillus nidulans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure & Expression* **1492**, 120-126.

**Graessle, S., Loidl, P. & Brosch, G. (2001).** Histone acetylation: plants and fungi as model systems for the investigation of histone deacetylases [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **58**, 704-720.

**Hall, J. L. (2002).** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance [Review]. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1-11.

**Harrier, L. A. (2001).** Isolation and sequence analysis of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol & Gerd.) Gerdemann & Trappe 3-phosphoglycerate kinase (PGK) gene promoter region. *DNA Sequence* **11**, 463-473.

**Harrier, L. A., Millam, S. & Franken, P. (2002).** Biolistic transformation of arbuscular mycorrhizal fungi: advances and applications. In *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Edited by S. Gianinazzi, H. Schüepp, J. M. Barea & K. Haselwandter. Schweiz: Birkhäuser Verlag.

- Harris, R. M., Webb, D. C., Howitt, S. M. & Cox, G. B. (2001).** Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **183**, 5008-5014.
- Harrison, M. J. (1999).** Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **50**, 361-389.
- Harrison, M. J., Dewbre, G. R. & Liu, J. Y. (2002).** A phosphate transporter from *Medicago truncatula* involved in the acquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Cell* **14**, 2413-2429.
- Harrison, M. J. & Van Buuren, M. L. (1995).** A phosphate transporter from the mycorrhizal fungus *Glomus versiforme*. *Nature* **378**, 626-629.
- Hawkins, H. J., Johansen, A. & George, E. (2000).** Uptake and transport of organic and inorganic nitrogen by arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant & Soil* **226**, 275-285.
- Hawksworth, D. L. & Rossman, A. Y. (1997).** Where are all the undescribed fungi [Review]. *Phytopathology* **87**, 888-891.
- Hellens, R. P., Edwards, E. A., Leyland, N. R., Bean, S. & Mullineaux, P. M. (2000).** pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology* **42**, 819-832.
- Herzog, R. W., Daniell, H., Singh, N. K. & Lemke, P. A. (1996).** A Comparative Study on the Transformation of *Aspergillus nidulans* by Microprojectile Bombardment of Conidia and a More Conventional Procedure Using Protoplasts Treated with Polyethyleneglycol. *Applied Microbiology & Biotechnology* **45**, 333-337.
- Hilber, U. W., Bodmer, M., Smith, F. D. & Koller, W. (1994).** Biolistic transformation of conidia of *Botryotinia fuckeliana*. *Curr Genet* **25**, 124-7.
- Hirano, T., Sato, T., Okawa, K., Kanda, K., Yaegashi, K. & Enei, H. (1999).** Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Lentinus edodes*. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry* **63**, 1223-1227.
- Hoffmann, T., Golz, C. & Schieder, O. (1994).** Foreign DNA Sequences Are Received by a Wild-Type Strain of *Aspergillus niger* after Co-Culture with Transgenic Higher Plants. *Current Genetics* **27**, 70-76.
- Hooykaas, P. J. & Schilperoort, R. A. (1992).** *Agrobacterium* and plant genetic engineering. *Plant Mol Biol* **19**, 15-38.
- Hoyle, H. D., Hutchens, J. A., Turner, F. R. & Raff, E. C. (1995).** Regulation of Beta-Tubulin Function and Expression in *Drosophila* Spermatogenesis. *Developmental Genetics* **16**, 148-170.

- Hoyt, M. A., Broun, M. & Davis, R. H. (2000).** Polyamine regulation of ornithine decarboxylase synthesis in *Neurospora crassa*. *Molecular & Cellular Biology* **20**, 2760-2773.
- Hynes, M. J. (1996).** Genetic Transformation of Filamentous Fungi. *Journal of Genetics* **75**, 297-311.
- Jakobsen, I., Gazey, C. & Abbott, I. K. (2001).** Phosphate transport by communities of arbuscular mycorrhizal fungi in intact soil cores. *New Phytologist* **149**, 95-103.
- Johnston, S. A. (1990).** Biolistic transformation: microbes to mice. *Nature* **346**, 776-7.
- Kaldorf, M., Kuhn, A. J., Schroder, W. H., Hildebrandt, U. & Bothe, H. (1999).** Selective element deposits in maize colonized by a heavy metal tolerance conferring arbuscular mycorrhizal fungus. *Journal of Plant Physiology* **154**, 718-728.
- Kang, H. A., Kim, J. Y., Ko, S. M., Park, C. S., Ryu, D. D. Y., Sohn, J. H., Choi, E. S. & Rhee, S. K. (1998).** Cloning and Characterization of the *Hansenula Polymorpha* Homologue of the *Saccharomyces Cerevisiae* Pmr1 Gene. *Yeast* **14**, 1233-1240.
- Karagiannidis, N. & Nikolaou, N. (2000).** Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of *Vitis vinifera* L. (cv. Razaki). *American Journal of Enology & Viticulture* **51**, 269-275.
- Kinghorn, J. R. & Turner, G. (1992).** *Applied molecular genetics of filamentous fungi*. London: Chapman & Hall.
- Kitamoto, N., Matsui, J., Kawai, Y., Kato, A., Yoshino, S., Ohmiya, K. & Tsukagoshi, N. (1998).** Utilization of the Tef1-Alpha Gene [Tef1] Promoter For Expression of Polygalacturonase Genes, P<sub>gaa</sub> and P<sub>gab</sub>, in *Aspergillus Oryzae*. *Applied Microbiology & Biotechnology* **50**, 85-92.
- Klein, T. M., Wolf, E. D., Wu, R. & Sanford, J. C. (1987).** High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* **327**, 70-73.
- Komari, T., Hiei, Y., Ishida, Y., Kumashiro, T. & Kubo, T. (1998).** Advances in cereal gene transfer [Review]. *Current Opinion in Plant Biology* **1**, 161-165.
- Lanfranco, L., Bolchi, A., Ros, E. C., Ottonello, S. & Bonfante, P. (2002).** Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Physiology* **130**, 58-67.
- Lanfranco, L., Vallino, M. & Bonfante, P. (1999).** Expression of chitin synthase genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **142**, 347-354.
- Lee, P.-J. & Koske, R. E. (1994).** *Gigaspora gigantea*: parasitism of spores by fungi and actinomycetes. *Mycological Research* **98**, 458-466.

- Ludwig-Müller, J. (2000).** Hormonal Balance in Plants during Colonisation by Mycorrhizal Fungi. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Edited by Y. Kapulnik & D. D. Douds. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers.
- Ma, B., Mayfield, M. B. & Gold, M. H. (2001).** The green fluorescent protein gene functions as a reporter of gene expression in *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied & Environmental Microbiology* **67**, 948-955.
- Marrs, K. A. (1996).** The functions and regulation of Glutathion S-Transferases in plants [Review]. *Annual Review of Plant Physiology & Plant Molecular Biology* **47**, 127-158.
- Marschner, H. & Dell, B. (1994).** Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. *Plant and Soil* **159**, 89-102.
- Matheucci, E., Henriquesilva, F., Elgogary, S., Rossini, C. H. B., Leite, A., Vera, J. E., Urioste, J. C. C., Crivellaro, O. & Eldorrry, H. (1995).** Structure, Organization and Promoter Expression of the Actin-Encoding Gene in *Trichoderma Reesei*. *Gene* **161**, 103-106.
- Mayerhofer, R., Koncz-Kalman, Z., Nawrath, C., Bakkeren, G., Cramer, A., Angelis, K., Redei, G. P., Schell, J., Hohn, B. & Koncz, C. (1991).** T-DNA integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *Embo J* **10**, 697-704.
- Melchers, L. S., Regensburg-Tuink, A. J., Schilperoort, R. A. & Hooykaas, P. J. (1989).** Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol Microbiol* **3**, 969-77.
- Mikosch, T. S. P., Lavrijssen, B., Sonnenberg, A. S. M. & van Griensven, L. (2001).** Transformation of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* (Lange) using T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Genetics* **39**, 35-39.
- Mu, J. H., Bollon, A. P. & Sidhu, R. S. (1999).** Analysis of beta-tubulin cDNAs from taxol-resistant *Pestalotiopsis microspora* and taxol-sensitive *Pythium ultimum* and comparison of the taxol-binding properties of their products. *Molecular & General Genetics* **262**, 857-868.
- Mugnier, J. & Mosse, B. (1987).** Vesicular-arbuscular infections in Ri T-DNA transformed roots grown axenically. *Phytopathology* **77**, 1045-1050.
- Mullins, E. D. & Kang, S. (2001).** Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants [Review]. *Cellular & Molecular Life Sciences* **58**, 2043-2052.
- Newman, E. I. & Reddell, P. (1987).** The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist* **106**, 745-751.
- Oberwinkler, F. (1964).** Intrahymeniale Heterobasidiomyceten. Fruchtkörperlose Sebacin-Sippen und ihre systematische Stellung. *Nova Hedwigia* **7**, 489-499.

- Pardo, A. G., Hanif, M., Raudaskoski, M. & Gorfer, M. (2002).** Genetic transformation of ectomycorrhizal fungi mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Mycological Research* **106**, 132-137.
- Pfeffer, P. E., Douds Jr, D. D., Becard, G. & Shachar-Hill, Y. (1999).** Carbon uptake and the metabolism and transport of lipids in an arbuscular mycorrhiza. *Plant Physiol* **120**, 587-98.
- Pirozynski, K. A. & D.W., M. (1975).** The origin of land plants: a matter of mycotropism. *Biosystems* **6**, 153-164.
- Pirozynski, K. A. & Dalpé, Y. (1989).** Geological history of the Glomaceae with particular reference to mycorrhizal symbiosis. *Symbiosis* **7**, 1-36.
- Pope, E. J. & Carter, D. A. (2001).** Phylogenetic placement and host specificity of mycorrhizal isolates belonging to AG-6 and AG-12 in the *Rhizoctonia solani* species complex. *Mycologia* **93**, 712-719.
- Pozo, M. J., Cordier, C., Dumas-Gaudot, E., Gianinazzi, S., Barea, J. M. & Azcon-Aguilar, C. (2002).** Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants. *Journal of Experimental Botany* **53**, 525-534.
- Rademacher, W. (1994).** Gibberellin Formation in Microorganisms. *Plant Growth Regulation* **15**, 303-314.
- Redecker, D., Thierfelder, H. & Werner, D. (1995).** A new cultivation system for arbuscular mycorrhizal fungi on glass beads. *Angewandte Botanik* **69**, 189-191.
- Requena, N., Mann, P., Hampp, R. & Franken, P. (2002).** Early developmentally regulated genes in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*: identification of GmGIN1, a novel gene with homology to the C-terminus of metazoan hedgehog proteins. *Plant & Soil* **244**, 129-139.
- Rho, H. S., Kang, S. & Lee, Y. H. (2001).** *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Molecules & Cells* **12**, 407-411.
- Rhody, D. (1999).** Mikroskopische und molekulare Analyse der Wechselwirkungen zwischen *Piriformospora indica* und Wurzeln von *Zea mays*. *Diplomarbeit Philipps-Universität Marburg*.
- Rhody, D., Stommel, M., Roeder, C., Mann, P. & Franken, P. (in press).** Differential RNA accumulation of two beta-tubulin genes in arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **in press**.

- Rivera-Becerril, F., Calantzis, C., Turnau, K., Caussanel, J. P., Belimov, A. A., Gianinazzi, S., Strasser, R. J. & Gianinazzi-Pearson, V. (2002).** Cadmium accumulation and buffering of cadmium-induced stress by arbuscular mycorrhiza in three *Pisum sativum* L. genotypes. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1177-1185.
- Rohel, E. A., Payne, A. C., Fraaije, B. A. & Hollomon, D. W. (2001).** Exploring infection of wheat and carbohydrate metabolism in *Mycosphaerella graminicola* transformants with differentially regulated green fluorescent protein expression. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **14**, 156-163.
- Ruiz-Lozano, J. M., Collados, C., Barea, J. M. & Azcon, R. (2001).** Cloning of cDNAs encoding SODs from lettuce plants which show differential regulation by arbuscular mycorrhizal symbiosis and by drought stress. *Journal of Experimental Botany* **52**, 2241-2242.
- Saito, M. (2000).** Symbiotic Exchange of Nutrients in Arbuscular Mycorrhizas: Transport and Transfer of Phosphorus. In *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. Edited by Y. Kapulnik & D. D. Douds. Dordrecht, Niederlande: Kluwer Academic Publishers.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989).** *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Press.
- Sanford, J. C., Klein, T. M., Wolf, E. D. & Allen, N. (1987).** Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Journal of Particulate Science and Technology* **5**, 27-37.
- Sawaki, H. (2002).** Sequence similarity of Glutathione S-Transferase between a land plant and an arbuscular mycorrhizal fungus. *Plant Biotechnology* **19**, 197-201.
- Sawaki, H. & Saito, M. (2001).** Expressed genes in the extraradical hyphae of an arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus intraradices*, in the symbiotic phase. *FEMS Microbiology Letters* **195**, 109-113.
- Schilde, C., Wostemeyer, J. & Burmester, A. (2001).** Green fluorescent protein as a reporter for gene expression in the mucoralean fungus *Absidia glauca*. *Archives of Microbiology* **175**, 1-7.
- Schillberg, S., Tiburzy, R. & Fischer, R. (2000).** Transient transformation of the rust fungus *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Molecular & General Genetics* **262**, 911-915.
- Schlegel, H. G. (1992).** *Allgemeine Mikrobiologie*, 7 edn. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Schoonbeek, H. J., Raaijmakers, J. M. & De Waard, M. A. (2002).** Fungal ABC transporters and microbial interactions in natural environments. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**, 1165-1172.

- Schüssler, A., Schwarzott, D. & Walker, C. (2001).** A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* **105**, 1413-1421.
- Schutzendubel, A. & Polle, A. (2002).** Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1351-1365.
- Schweiger, P. F., Thingstrup, I. & Jakobsen, I. (1999).** Comparison of two test systems for measuring plant phosphorus uptake via arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycorrhiza* **8**, 207-213.
- Selosse, M. A., Weiss, M., Jany, J. L. & Tillier, A. (2002).** Communities and populations of sebacinoid basidiomycetes associated with the achlorophyllous orchid *Neottia nidus-avis* (L.) LCM Rich. and neighbouring tree ectomycorrhizae. *Molecular Ecology* **11**, 1831-1844.
- Simpson, J. C., Neubrand, V. E., Wiemann, S. & Pepperkok, R. (2001).** Illuminating the human genome [Review]. *Histochemistry & Cell Biology* **115**, 23-29.
- Smith, S. E., Dickson, S. & Smith, F. A. (2001).** Nutrient transfer in arbuscular mycorrhizas: how are fungal and plant processes integrated? *Australian Journal of Plant Physiology* **28**, 683-694.
- Smith, S. E. & Read, D. J. (1997).** *Mycorrhizal Symbiosis*, 2 edn. London: Academic Press.
- Smith, S. E. & Smith, F. A. (1990).** Structure and function of the interfaces in biotrophic symbioses as they relate to nutrient transport. *The New Phytologist* **114**, 1-38.
- Spellig, T., Bottin, A. & Kahmann, R. (1996).** Green Fluorescent Protein (Gfp) as a New Vital Marker in the Phytopathogenic Fungus *Ustilago Maydis*. *Molecular & General Genetics* **252**, 503-509.
- Stommel, M., Mann, P. & Franken, P. (2001).** EST-library construction using spore RNA of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Mycorrhiza* **10**, 281-285.
- Stubblefield, S. B., Taylor, T. N. & Trappe, J. M. (1987).** Vesicular-arbuscular mycorrhizae from the triassic of Antarctica. *The American Journal of Botany* **74**, 1904-1911.
- Tamasloukht, M., Sejalon-Delmas, N., Kluever, A., Jauneau, A., Roux, C., Becard, G. & Franken, P. (2002).** Root factor induce mitochondrial-related-gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology* **in press**.
- Thomashow, L. S., Reeves, S. & Thomashow, M. F. (1984).** Crown gall oncogenesis: evidence that a T-DNA gene from the *Agrobacterium* Ti plasmid pTiA6 encodes an enzyme that catalyzes synthesis of indoleacetic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5071-5.
- Timonen, S. & Peterson, R. L. (2002).** Cytoskeleton in mycorrhizal symbiosis. *Plant & Soil* **244**, 199-210.

- Timonen, S., Smith, F. A. & Smith, S. E. (2001).** Microtubules of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* in symbiosis with tomato roots. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **79**, 307-313.
- Torregrosa, L., Iocco, P. & Thomas, M. R. (2002).** Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *American Journal of Enology & Viticulture* **53**, 183-190.
- Ubalijoro, E., Hamel, C., McClung, C. R. & Smith, D. L. (2001).** Detection of chitin synthase class I and II type sequences in six different arbuscular mycorrhizal fungi and gene expression in *Glomus intraradices*. *Mycological Research* **105**, 470-476.
- Uetake, Y., Kojima, T., Ezawa, T. & Saito, M. (2002).** Extensive tubular vacuole system in an arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. *New Phytologist* **154**, 761-768.
- Vandenwymelenberg, A. J., Cullen, D., Spear, R. N., Schoenike, B. & Andrews, J. H. (1997).** Expression of Green Fluorescent Protein in *Aureobasidium Pullulans* and Quantification of the Fungus on Leaf Surfaces. *Biotechniques* **23**, 686-690.
- Varma, A., Verma, S., Sudha, Sahay, N., Butehorn, B. & Franken, P. (1999).** *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied & Environmental Microbiology* **65**, 2741-2744.
- Vassilevskaia, T. D., Bekman, E., Jackson, P., Ricardo, C. P. & Rodriguespousada, C. (1996).** Developmental Expression and Regulation by Light of Two Closely Related Beta-Tubulin Genes in *Lupinus Albus*. *Plant Molecular Biology* **32**, 1185-1189.
- Verma, S., Varma, A., Rexer, K. H., Hassel, A., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B. & Franken, P. (1998).** *Piriformospora Indica*, Gen. Et Sp. Nov., a New Root-Colonizing Fungus. *Mycologia* **90**, 896-903.
- Warcup, J. H. (1988).** Mycorrhizal associations of isolates of *Sebacina vermifera*. *New Phytologist* **110**, 227-231.
- Warcup, J. H. & Talbot, P. H. B. (1967).** Perfect states of *Rhizoctonias* associated with Orchids. *New Phytologist* **66**, 631-641.
- Weber, H. (1993).** *Allgemeine Mykologie*. Jena: Gustav Fischer Verlag.
- Weiss, M. & Oberwinkler, F. (2001).** Phylogenetic relationships in Auriculariales and related groups - hypotheses derived from nuclear ribosomal DNA sequences. *Mycological Research* **105**, 403-415.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In *PCR protocols*, pp. 315-322. Edited by M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White. New York: Academic press.

**Williams, P. G. (1985).** Orchidaceous rhizoctonias in pot cultures of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Canadian Journal of Botany-Revue Canadienne de Botanique* **63**, 1329-1333.

## Lebenslauf

---

### Persönliche Daten:

Name: Daniela Rhody  
Anschrift: Am Hofacker 9  
35094 Lahntal  
Geboren am: 08.04.1975  
Geboren in: Schopfheim (Kreis Lörrach)

### Ausbildung:

Seit November 1999 Anfertigung einer Dissertation am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. R. Thauer unter Betreuung von Herrn PD Dr. P. Franken

November 1998 – August 1999 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: Mikroskopische und molekulare Analyse der Wechselwirkungen zwischen *Piriformospora indica* und Wurzeln von *Zea mays*

Oktober 1996 – September 1999 Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg, Abschluß mit Diplom, Note: sehr gut

Oktober 1994 – September 1996 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität Kiel, Vordiplom, Note: gut

1987 – Juli 1994 Gymnasium Holstenschule in Neumünster, Abschluß mit Abitur

## **Danke**

Mein ganz besonders herzlicher Dank geht an Herrn PD Dr. Philipp Franken für die ausgezeichnete Betreuung dieser Arbeit und die ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Thauer danke ich für die Bereitstellung des exzellent ausgestatteten Arbeitsplatzes am Max-Planck-Institut und die Erstellung des Zweitgutachtens.

Allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern unserer Mykorrhiza-Gruppe danke ich für die sehr gute Zusammenarbeit, die Hilfe, die Diskussionen und das Teilen der großen und kleinen Laborsorgen.

Für die seelische und moralische Unterstützung geht mein Dank an Marion und ganz besonders an Christian, ohne euch hätte ich es nicht geschafft...

Die Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Europäischen Union (GENOMYCA QLK5-CT-2000-01319).